



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# SLEDOVÁNÍ OBSAHU VITAMINU E VE VZORCÍCH OBILOVIN

MONITORING OF VITAMIN E CONTENT IN THE SAMPLES OF CEREALS

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Pavla Cibulcová

## VEDOUcí PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Karolína Benešová, Ph.D.

BRNO 2017

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1033/2016  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Pavla Cibulcová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **Ing. Karolína Benešová, Ph.D.**  
Akademický rok: 2016/17

### Název diplomové práce:

Sledování obsahu vitamínu E ve vzorcích obilovin

### Zadání diplomové práce:

- 1) Zpracování přehledné literární rešerše na dané téma
- 2) Optimalizace extrakce a vhodné analytické metody (HPLC/FLD)
- 3) Analýza reálných vzorků obilovin
- 4) Vyhodnocení výsledků a porovnání s aktuální literaturou

### Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

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

-----  
Bc. Pavla Cibulcová  
student(ka)

-----  
Ing. Karolína Benešová, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce se zabývá analýzou vitamínu E ve vzorcích obilovin, jmenovitě ječmene a pšenice a z nich vyrobeného sladu. Vybrané vzorky byly ošetřeny výbojem nízkoteplotního plazmatu, fungicidem a biologickým mořením, za účelem likvidace plísní a mykotoxinů. Cílem práce bylo zjistit, jaký vliv má dané ošetření, kombinace více druhů tohoto ošetření, na změny obsahu vitamínu E v zrna a sladu. Zda se nesnižuje obsah zdravotně pozitivních látek a nezamezuje se dalšímu využití zrna pro potravinářské, sladařské, případně krmivářské účely. Teoretická část je věnována vlastnostem, výskytu, biochemii a významu vitamínu E pro živé organismy. Dále je věnována vlastnostem obilovin, které jsou významným zdrojem vitamínu E. Popsána je také výroba sladu a ošetření vzorků. Experimentální část popisuje polní pokus, jednotlivé druhy ošetření, extrakci vitamínu E ze vzorků a stanovení obsahu vitamínu E vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s fluorescenční detekcí. Získané výsledky jsou srovnány s aktuální literaturou. Bylo zjištěno, že dané ošetření nemá významný negativní vliv na obsah vitamínu E.

## **ABSTRACT**

Thesis deals with the analysis of vitamin E in cereal samples, namely barley and wheat and malt produced from them. Selected samples were treated with low-temperature plasma, fungicide and biological treatment to elimination fungus and mycotoxins. The aim of the thesis was to find out the influence of the treatment, the combination of several types of treatment on vitamin E content in grain and malt. If the content of health-positive substances is not reduced and grain can be used for food, malt, or for feed purposes. The theoretical part focuses on the properties, occurrence, biochemistry and importance of vitamin E for living organisms. It also focuses on the properties of cereals that are a significant source of vitamin E. Malt production and sample treatment are also described. The experimental part describes the field experiment, individual types of treatment, extraction of vitamin E from the samples and determination of vitamin E content by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. The results are compared with the current literature. It was found that the treatment did not have a significant negative effect on vitamin E content.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

vitamin E, tokoferol, tokotrienol, pšenice, ječmen, obiloviny, HPLC, nízkoteplotní plazma

## **KEY WORDS**

vitamin E, tocopherol, tocotrienol, wheat, barley, cereals, HPLC, low-temperature plasma

CIBULCOVÁ, P. *Sledování obsahu vitamínu E ve vzorcích obilovin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 48 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Karolína Benešová, Ph.D.

## **PROHLÁŠENÍ**

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

.....  
podpis studenta

Tato práce byla vypracována v rámci projektu TAČR TA 04021252 s názvem „Vývoj zařízení pro fyzikální ošetření semen a sladu pomocí nízkoteplotního plazmatu“.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí diplomové práce Ing. Karolíně Benešové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, vstřícnost při konzultacích a lidský přístup při realizaci této práce.

## OBSAH

1 ÚVOD .....	7
2 TEORETICKÁ ČÁST .....	8
2.1 Vitamin E .....	8
2.1.1 Vitamin E v potravinách .....	8
2.1.2 Fyziologie – biochemie .....	11
2.1.3 Deficit .....	11
2.1.4 Vlastnosti .....	11
2.1.5 Vznik .....	12
2.2 Stres rostlin .....	12
2.3 Obiloviny .....	13
2.3.1 Stavba obilovin .....	13
2.3.2 Chemické složení zrna obilovin .....	14
2.3.3 Ječmen setý ( <i>Hordeum vulgare</i> L.) .....	15
2.3.4 Pšenice setá ( <i>Triticum aestivum</i> L.) .....	19
2.3.5 Kukuřice ( <i>Zea mays</i> ) .....	20
2.3.6 Žito ( <i>Secale cereale</i> L.) .....	20
2.3.7 Oves ( <i>Avena sativa</i> L.) .....	21
2.4 Výroba sladu .....	21
2.4.1 Ječmen .....	21
2.4.2 Čištění, třídění .....	21
2.4.3 Skladování ječmene .....	22
2.4.4 Máčení ječmene .....	22
2.4.5 Klíčení ječmene .....	22
2.4.6 Hvozdnění zeleného sladu .....	22
2.4.7 Odkličování a uskladnění sladu .....	23
2.5 Druhy sladů .....	23
2.5.1 Světlé slady .....	23
2.5.2 Vídeňský slad .....	23
2.5.3 Tmavé slady .....	23
2.5.4 Speciální slady .....	23
2.6 Možnosti ošetření zrna .....	24
2.6.1 Nízkoteplotní plazma .....	24

2.6.2	Biologické moření .....	24
2.6.3	Chemické moření.....	24
2.7	HPLC .....	25
2.7.1	Pojmy.....	25
2.7.2	Instrumentace.....	25
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	27
3.1	Chemikálie .....	27
3.2	Pomůcky.....	27
3.3	Přístroje .....	27
3.4	Příprava roztoků.....	28
3.5	Příprava zásobního roztoku standardů tokoferolů a tokotrienolů .....	28
3.6	Vzorky.....	28
3.6.1	České Budějovice .....	28
3.6.2	Umělá infekce.....	29
3.6.3	Sladování .....	30
3.6.4	Ošetření výbojem nízkoteplotního plazmatu.....	30
3.7	Stanovení vitamínu E .....	31
3.7.1	Příprava vzorku.....	31
3.7.2	Extrakce .....	31
3.7.3	Příprava kalibračních křivek.....	31
3.7.4	Analýza a detekce .....	31
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	33
4.1	Opakovatelnost extrakce .....	33
4.2	Kalibrační křivky .....	33
4.3	Výpočet koncentrace jednotlivých izomerů.....	34
4.4	Výsledky jednotlivých souborů vzorků .....	34
4.4.1	České Budějovice .....	35
4.4.2	Umělá infekce.....	41
5	ZÁVĚR .....	44
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	45

# 1 ÚVOD

Vitamin E je soubor chemických látek (tokoferolů a tokotrienolů), patří do skupiny vitaminů rozpustných v tucích a naše tělo si jej neumí syntetizovat samo, proto ho musíme přijímat v potravě. Tokoferoly patří mezi přírodní antioxidanty, nejvýznamnější složkou vitaminu E je  $\alpha$ -tokoferol, který vycytává peroxylové radikály. Nachází se ve fosfolipidové dvojvrstvě buněčných membrán, a proto je důležitý pro buňku.

Obiloviny jsou významnou složkou výživy už po dlouhou dobu. V České republice jsou obiloviny základní surovinou pro různé potravinářské výroby, slouží jako krmivo i jako průmyslová surovina. Abychom mohli vypěstovat zdravé rostliny a získat tak zdravé obilky, musíme ji uchránit před nepříznivými vlivy, jako je napadení rostliny hmyzími škůdci nebo houbovými infekcemi. Zrna se proto ošetřují chemickým nebo biologickým mořením. Vymýšlejí se nová ošetření, která by zamezila rozvoji onemocnění a infekcí, například fyzikální ošetření pomocí nízkoteplotního plazmatu.

Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda ošetření nízkoteplotním plazmatem a jinými druhy ošetření snižuje obsah vitaminu E ve vybraných obilovinách, a zda zrno po takovémto ošetření neztratí nutriční hodnoty natolik, aby nemohlo být dále využito v potravinářství nebo jako krmivo.

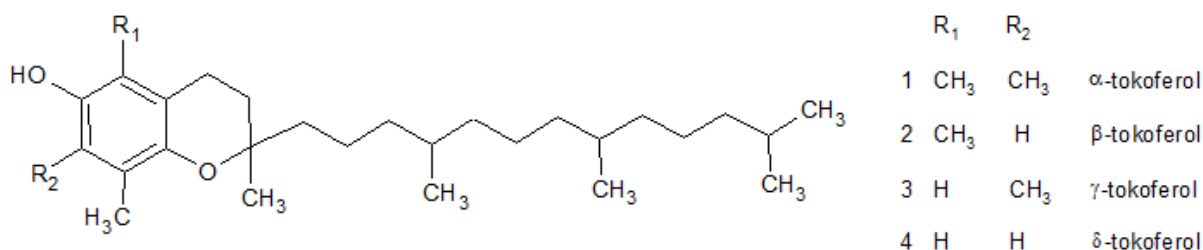
## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Vitamin E

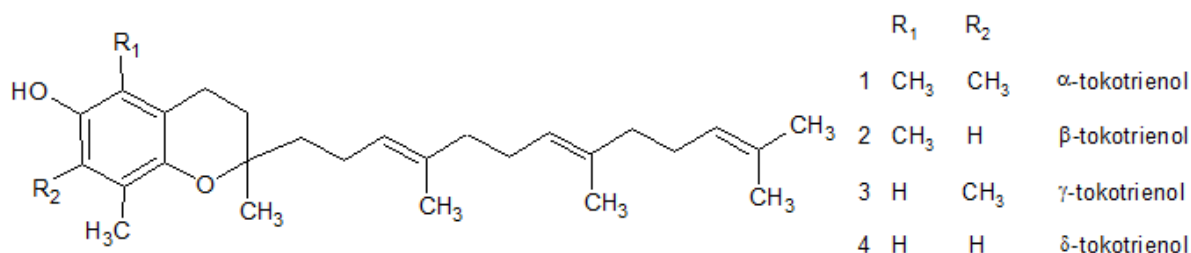
Do skupiny vitamínu E se řadí látky odvozené od tokolu [2-methyl-2-(4',8',12'-trimethyldecyl)-6-hydroxychroman] a tokotrienolu [2-methyl-2-(4',8',12'-trimethyldecyl-3',7',11'-trienyl)-6-hydroxychroman]. Tyto molekuly se skládají z chromanového jádra a postranního řetězce. Základní látkou je  $\alpha$ -tokoferol, ale vyskytují se i  $\beta$ -tokoferol,  $\gamma$ -tokoferol a  $\delta$ -tokoferol. Tokoferoly mají lišící se antisterilní účinnost (nejúčinnější je  $\alpha$ -tokoferol), také byla pozorována odlišná účinnost mezi tokoferoly z přírodních zdrojů a syntetickými tokoferoly. Všechny přírodní tokoferoly jsou opticky aktivní (většinou pravotočivé), syntetické vytvářejí racemickou směs [1]. Aktivita vitamínu E se definuje jako ekvivalent  $\alpha$ -tokoferolu, vypočítá se jako součet obsahu  $\alpha$ -tokoferolu a ostatních tokoferolů a tokotrienolů vynásobené příslušným koeficientem se zohledněním jejich biologické aktivity, viz rovnice 1 [2].

$$\text{Aktivita} = \alpha_T + (0,4 \cdot \beta_T) + (0,1 \cdot \gamma_T) + (0,01 \cdot \delta_T) + (0,3 \cdot \alpha_{T3}) + (0,05 \cdot \beta_{T3}) + (0,01 \cdot \gamma_{T3}) + (0,01 \cdot \delta_{T3}) \quad (1)$$

Tokoferoly a tokotrienoly se liší svou biologickou účinností – poměry jsou následovné:  $\alpha$ -T :  $\beta$ -T :  $\gamma$ -T :  $\delta$ -T :  $\alpha$ -T3 :  $\beta$ -T3 :  $\gamma$ -T3 :  $\delta$ -T3 = 100 : 25-40 : 5-8 : 1 : 29 : 5 [3].



Obrázek 1: Strukturální vzorec tokoferolů [4]



Obrázek 2: Strukturální vzorec tokotrienolů [4]

#### 2.1.1 Vitamin E v potravinách

V potravě je nutnost přijímat vitamin E, protože tokoferoly jsou přírodními antioxidanty, které se tvoří jen v rostlinách a jsou přítomny ve všech lipidech rostlinného původu. Výborným zdrojem  $\alpha$ -tokoferolů je olej z obilných klíčků, řepkový a slunečnicový olej.  $\beta$ -tokoferol je obsažen v oleji z obilných klíčků,  $\gamma$ -tokoferol a  $\delta$ -tokoferol je obsažen v sójovém oleji. Vedle rostlinných olejů je tokoferol obsažen také v jádrech ořechů, hrášku, kukuřici,



obilných výrobcích a zelenině. Nejen rostliny jsou dobrým zdrojem, ale i živočichové. Například vejce, játra a ostatní vnitřnosti, vepřové a králičí maso také obsahují tokoferoly [1]. Obsahy jsou uvedeny v tabulce 1, tabulce 2 a tabulce 3. Tokoferoly jsou obsaženy hlavně v polynenasycených rostlinných olejích a klíčcích semen obilovin, zatímco tokotrienoly se nacházejí v palmovém oleji a v aleuronové a subaleuronové vrstvě obilovin [5]. Vitamin E se v potravě vyskytuje rozpuštěný v tucích, uvolňuje se a následně resorbuje během jejich štěpení ve střevě [6]. Potřebná dávka je 8-10 mg, asi 60-70 % přijatého vitamínu se vyloučí stolicí – na rozdíl od jiných vitamínů rozpustných v tucích se v těle uchovává jen krátkou dobu. Alternativní cesta eliminace degradačních produktů tokoferolu a tokotrienolu je močí [5, 7]. Množstvím 1 miligramu  $\alpha$ -tokoferolu se docílí stejného účinku vitamínu E, který se rovná 1 I.E. (mezinárodní jednotce) vitamínu E. Pomocí této jednotky se počítá účinnost všech látek, které vykazují stejný účinek, jaký má vitamin E [8]. Lidé absorbují v potravě všechny izomerní formy vitamínu E, ale tělo nejvíce využije  $\alpha$ -tokoferol. Například koncentrace  $\gamma$ -tokoferolu v krevní plazmě je u Američanů obvykle desetinásobně nižší než koncentrace  $\alpha$ -tokoferolu, i když v USA je ve stravě nejvíce zastoupený  $\gamma$ -tokoferol kvůli požívání velkého množství sóji a kukuřičných olejů [5].

Tabulka 1: Obsah vitamínu E ve vybraných potravinách [9]

<b>potravina</b>	<b>Obsah vitamínu E [mg·kg<sup>-1</sup>]</b>	<b>potravina</b>	<b>Obsah vitamínu E [mg·kg<sup>-1</sup>]</b>
hovězí maso libové	5,0	brambory	0,6
párky	7,3	hrášek zelený	30,0
špekáčky	8,2	kapusta růžičková	17,0
vepřový kotlet	6,2	mrkev	20,0
vepřové maso tučné	11,0	paprika	8,0
vepřový řízek	1,6	rajčata	12,2
játra hovězí	10,0	špenát	25,0
kapr	5,0	žampiony	8,3
králík	10,0	jablka	5,9
kuře	2,1	broskve	6,0
makrela	16,0	ořechy vlašské	200,0
máslo	0,2	ořechy burské	200,0
margarin	7,0	chléb pšenično-žitný	12,0
palmový olej	100,0	mouka pšeničná	14,0
sádlo vepřové	22,0	ovesné vločky	37,0
slanina anglická	4,0	piškoty	42,0
vejce slepičí	10,0	rýže	10,2

Tabulka 2: Obsah tokoferolů (T) a tokotrienolů (T3) v krmných surovinách [3]

Krmná surovina	Obsah [mg·kg <sup>-1</sup> ]								
	α-T	β-T	γ-T	δ-T	α-T3	β-T3	γ-T3	δ-T3	α-TE
Kukuřice	12,0	0,6	34,1	1,0	11,3	1,5	23,3	0,8	19,2
Pšeničné klíčky mačkané	186,5	61,6	1,2	< 0,3	5,9	27,8	< 0,3	< 0,3	220,5
Žitné otruby	8,3	2,7	< 0,3	< 0,3	60,0	38,8	< 0,3	< 0,3	29,6
Pšeničné otruby	27,7	12,5	0,6	< 0,3	28,4	81,8	< 0,3	< 0,3	71,8
Sladový květ	16,1	1,0	5,2	< 0,3	10,3	3,2	4,9	< 0,3	20,3
Slunečnicový šrot	10,8	0,7	0,4	< 0,3	0,8	1,7	< 0,3	< 0,3	11,6
Pšenice	10,0	4,4	0,2	< 0,3	6,0	27,6	< 0,3	< 0,3	15,4
Ječmen	8,2	0,3	2,3	< 0,3	42,1	5,5	12,5	< 0,3	21,5
Žito	11,5	2,5	0,4	< 0,3	19,4	13,5	4,0	< 0,3	19,2
Řepkový šrot	16,1	0,6	7,9	< 0,3	< 0,3	13,7	< 0,3	< 0,3	17,8
Řepkové výlisky	60,1	0,6	41,7	< 0,3	< 0,3	28,3	< 0,3	< 0,3	66,0
Sojový extrahovaný šrot	3,2	0,2	8,0	2,3	< 0,3	0,7	< 0,3	< 0,3	4,2
Vojtěšková moučka	50,0	0,8	1,8	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	50,6
Ovesné vločky	9,8	0,9	0,4	< 0,3	33,1	3,4	< 0,3	< 0,3	20,3
Hrách	1,0	< 0,3	56,3	1,1	< 0,3	1,6	2,1	< 0,3	6,7
Bob koňský	11,7	< 0,3	40,1	1,0	< 0,3	1,9	3,0	< 0,3	15,8
Peluşka	1,1	< 0,3	55,8	1,2	< 0,3	2,7	2,0	< 0,3	6,9

Tabulka 3: Obsah tokoferolů (T) a tokotrienolů (T3) v potravinách [3]

Potravina	Obsah [mg·kg <sup>-1</sup> ]								
	α-T	β-T	γ-T	δ-T	α-T3	β-T3	γ-T3	δ-T3	α-TE
Pšeničná mouka	2,8	2,4	< 0,3	< 0,3	2,7	14,0	< 0,3	< 0,3	5,5
Rýže obyčejná	2,5	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	6,8	< 0,3	2,5
Rýže hnědá	8,7	2,1	2,6	< 0,3	8,8	< 0,3	28,1	3,4	12,7
Rýže parboild	2,1	< 0,3	< 0,3	< 0,3	2,5	< 0,3	7,5	< 0,3	2,9
Fazole bílé	0,9	< 0,3	38,3	1,9	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	4,7
Čočka	9,0	< 0,3	41,4	1,0	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	13,2
Soja	14,7	1,7	90,1	15,2	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	24,7
Olej olivový	134	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	134
Olej řepkový	202	< 0,3	81,4	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	210
Olej sojový	144	15,2	196	18,7	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	171
Olej slunečnice	477	12,6	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	483
Jáhly proso	2,0	< 0,3	8,2	3,6	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	2,9
Pohanka	3,9	< 0,3	49,1	2,1	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	8,8
Vločky pšeničné	5,2	3,2	< 0,3	< 0,3	5,3	19,2	< 0,3	< 0,3	9,3
Vločky žitné	3,2	1,1	< 0,3	< 0,3	13,1	9,9	< 0,3	< 0,3	8,1
Vločky ječné	2,3	< 0,3	0,9	0,7	22,9	4,0	9,5	1,2	9,4
Sušené mléko plnotučné	4,1	< 0,3	0,6	< 0,3	0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	4,3
Sušené mléko odtučněné	0,8	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	0,8
Ořechy vlašské	8,3	< 0,3	58,2	3,1	< 0,3	< 0,3	1,0	< 0,3	14,2
Ořechy lískové	129	2,7	25,6	1,0	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	132,9
Mák	9,8	< 0,3	31,7	< 0,3	< 0,3	< 0,3	1,4	< 0,3	13,0
Lněné semínko	2,0	< 0,3	87,3	0,8	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	10,7

### 2.1.2 Fyziologie – biochemie

Vitamin E v lidském organismu působí jako antioxidant membrán, který přerušuje kaskádu volných radikálů a chrání biomembrány před oxidativním útokem radikálů. Nejvyšší antioxidační účinek má  $\alpha$ -tokoferol, vychytává peroxylové radikály a tím zabraňuje jejich účasti v řetězových reakcích [1]. Za základní formu vitamínu E považujeme  $\alpha$ -tokoferol, protože se přednostně váže na vazebné bílkoviny. Krví se transportuje navázan v LDL cholesterolu. Působí také synergicky se selenem – inhibuje mutageny v gastrointestinálním traktu a chrání erythrocyty před homolýzou [6]. Vitamin E také přispívá k prevenci proti rakovině, snižuje riziko šedého zákalu, snižuje srážlivost krve a rozpouští krevní sraženiny, urychluje hojení spálenin, brání vzniku svalových křečí, působí preventivně proti Alzheimerově nemoci. Vysoké dávky  $\alpha$ -tokoferolu snižují hladinu  $\gamma$ -tokoferolu v krevní plazmě, ale užívání  $\gamma$ -tokoferolu se zvyšuje hladina  $\alpha$ - i  $\gamma$ -tokoferolu [7]. Vitamin E má i léčebné účinky, zmírňuje při revmatu zánětlivé procesy a tiší bolest. Antioxidační (konzervační) účinky se využívají v kosmetickém průmyslu – přimíchává se do mastí a krémů, které následně zabraňují zánětům a zvyšují schopnost horní vrstvy pokožky udržovat vlhkost. Přidává se také do opalovacích krémů, kde tlumí účinky slunečního záření, které vytváří vznik rakoviny kůže [8]. Vitamin E se primárně nachází ve fosfolipidové dvojvrstvě buněčných membrán. Další hlavní biologická role vitamínu E je chránit PUFA a další složky buněčných membrán a lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL) před oxidací volnými radikály. Vitamin E inhibuje agregaci krevních destiček tím, že inhibuje produkci prostaglandinů [10].

### 2.1.3 Deficit

U zdravých lidí se zpravidla neobjevují projevy nedostatku, protože vitamin E je uložen v tukových tkáních a nachází se ve všech základních potravinách. Při nedostatku se může objevovat odbourání nervové tkáně, svalové hmoty, dochází k alergiím a poruchám trávení. Může zavinit spontánní potraty a neplodnosti žen [8, 11]. Nedostatek vitamínu E se projevuje jako hemolytická anémie, snížená životnost červených krvinek, zvýšená tvorba trombocytů, funkční změny periferních nervů, zvýšení koncentrace lipoperoxidů a tím poškození buněčné membrány a následná buněčná smrt [6].

### 2.1.4 Vlastnosti

Tokoferoly jsou za normálních podmínek slabě nažloutlé oleje, dají se destilovat bez degradace za velmi nízkého tlaku. D- $\alpha$ -tokoferol má bod tání 2,5-3,5 °C, D- $\gamma$ -tokoferol -3 °C až -2 °C. Jsou dobře rozpustné v tucích, lipofilních rozpouštědlech, etheru, petroletheru, chloroformu, méně v alkoholu, acetonu a nerozpustné ve vodě [11]. Největší teplotní stabilita byla pozorována u izomeru  $\alpha$ -tokotrienolu [12]. Pod 40 °C jsou tokoferoly stabilní vůči silným alkáliím, takže se mohou připravit opatrným zmýdelněním esterů v inertní atmosféře [13]. Jsou citlivé na vzdušný kyslík a další oxidační činidla. Při klesajícím počtu methylskupin na chromanovém kruhu se snižuje citlivost na vzdušný kyslík, ale i biologická aktivita. Roste však antioxidační účinek. Stabilita tokoferolů se zvyšuje jejich esterifikací a zároveň se slabě zvyšuje i biologická aktivita. Tokoferoly jsou silnými redukčními činidly, snadno

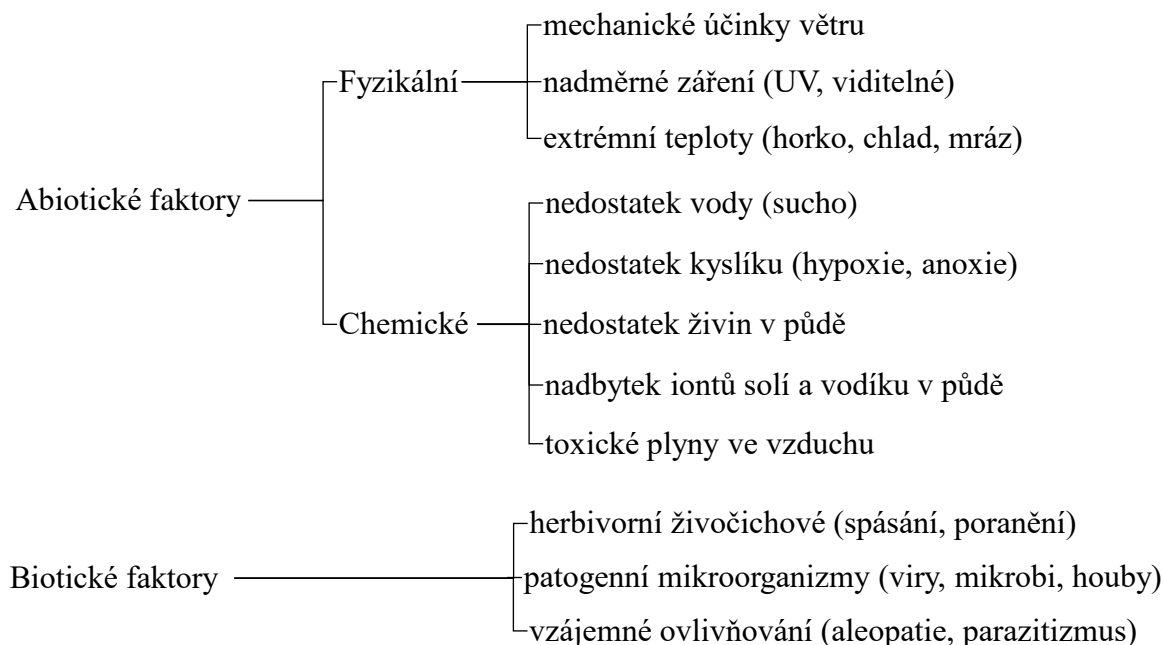
se oxidují. Při oxidaci kyselinou dusičnou v alkoholovém prostředí vznikne tokoferolová červeň, což je oranžově až červeně zbarvený *o*-chinon. Tokoferoly a tokotrienoly absorbují světlo při 292-295 nm a jsou přirozenými fluorescenty (excitují při 205-295 nm, emitují při 330 nm) [11].

### 2.1.5 Vznik

V rostlinách jsou plastidy jediným místem pro syntézu skupiny prenylovaných lipidů, včetně tokoferolů, tokotrienolů, chlorofylů a phyllochinonů [5].

## 2.2 Stres rostlin

Stresové faktory jsou nepříznivé vlivy vnějšího prostředí, které závažně ohrožují rostlinu. Termín stres se používá pro označení stavu, kdy se rostlina nachází pod vlivem stresových faktorů. U rostlin je problematika stresu komplikovanější než u živočichů. Rostliny, kvůli svému přisedlému způsobu života, nemohou uniknout před stresovými faktory. Rostliny se brání proti působení těchto faktorů buď zvýšením ochrany (například tlustou kutikulou na listech a impregnací buněčných stěn) nebo fyziologicky spuštěním řetězce změn, kdy došlo k proniknutí stresových faktorů až k plazmatické membráně buněk. Nejdůležitější stresové faktory jsou vyobrazeny na obrázku 3.



Obrázek 3: Stresové faktory vyskytující se u rostlin v přírodě [14]

Mechanismus působení každého z uvedených stresorů je do značné míry specifický. Stejně rozmanité jsou i reakce rostliny směřující k potlačení následků působení stresoru (aklimační reakce).

K nejčastějším společným změnám, které vedou ke zvýšení odolnosti vůči několika stresovým faktorům, patří tvorba stresových proteinů, tvorba a odstraňování aktivních forem kyslíku, tvorba „stresových“ fytohormonů (etylenu, kyseliny abscisové, kyseliny jasmonové, metyljasmonátu a polyaminů) a tvorba osmoregulačních sloučenin (cukrů, polyalkoholů a jednoduchých dusíkatých látek).

Mechanismy ochrany před oxidačním poškozením se dělí do několika skupin. Do první patří systém přímé deaktivace. Patří sem především karotenoidy, které odstraňují singletový kyslík z protein-pigmentových komplexů chloroplastu. Vzniklý excitovaný tripletový stav karotenoidů se snadno vrací do základního stavu za uvolnění tepla. Odstranění dalších forem aktivního kyslíku lze také přeměnou violaxantinu na zeaxantin. V membránách se také vyskytuje lipofilní sloučenina  $\alpha$ -tokoferol, která je schopná deaktivovat singletový kyslík a chránit membránové lipidy před peroxidací. Aktivní formy kyslíku vznikají jako nebezpečné produkty při působení stresových faktorů a rostliny musí mít účinné systémy na jejich deaktivaci, ale mohou mít také kladnou úlohu jako signály nebo ochranné látky při některých typech stresů, proto je žádoucí jejich koncentraci udržovat na určité úrovni [14].

## 2.3 Obiloviny

### 2.3.1 Stavba obilovin

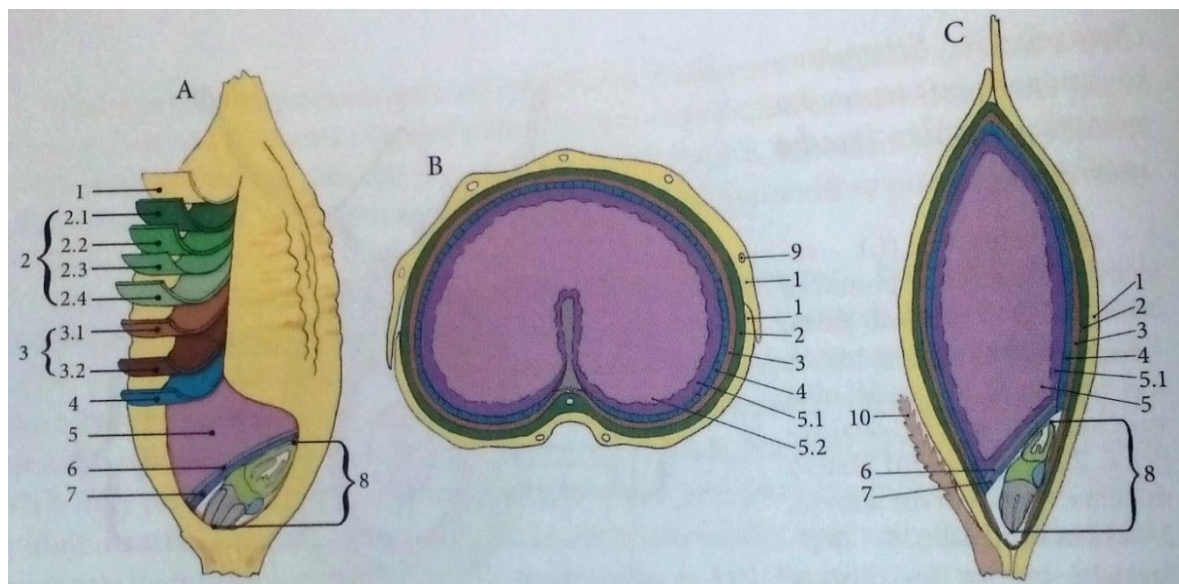
Obiloviny vytváří nadzemní orgány (stébla, listy, květenství, plody) a podzemní (kořeny, odnožovací kolénka). Netvoří se zásobní vegetativní orgány jako hlízy, bulvy nebo cibule [15].

Kořeny upevňují rostlinu v půdě, syntetizují se v nich významné organické látky. Také čerpají vodu a živiny z půdy a zásobují jimi rostlinu [12]. Kořeny jsou svazčité, rozdělené na primární a sekundární kořenovou soustavu. Primární kořenová soustava se vytváří při klíčení obilí – nazývají se zárodečné kořínky. Podle počtu zárodečných kořínků se rozlišují jednotlivé druhy obilnin. Později se z odnožovacího kolénka vytváří mohutný kořenový systém – tyto kořeny se nazývají sekundární [15]. Významnou součástí kořenů i celé rostliny jsou cévní svazky, ty rozvádí organické živiny (produkty fotosyntézy) z místa zdroje k místům potřeby. Rozvádí také minerální živiny z kořenové soustavy směrem nahoru do nadzemních částí rostliny [12].

Stonek se u obilnin nazývá stéblo (*culmus*), po sklizni se nazývá sláma. Stéblo je kruhového průřezu, mírně kónické a duté. Dutina ve stéble vzniká mechanickým potrháním buněčných stěn při růstu. Stéblo je děleno pomocí kolének (uzlin, *nodus*) na články (*internodium*). Uzliny jsou ztlustělé místa na stéble, vyrůstají z nich listy, poslední uzlina nese základ květenství. Články jsou ve spodní části stébla kratší a směrem vzhůru se prodlužují. Součástí stébla jsou jeho vodivá pletiva – uzavřené cévní svazky [12, 15, 16].

Listy vyrůstají z horní části každého kolénka, jsou přisedlé a vztyčené. Mají úzkou čárkovitou čepel a pochvu [15]. Listy slouží k výměně plynů, odpařování vody a k fotosyntéze. Na povrchu listu je krycí pletivo – pokožka (*epidermis*), pokryté vrstvou vosku – ten chrání listy před slunečním zářením a nadměrným výparem. Také je bariérou proti patogenům [12].

Obiloviny mají jednosemenný suchý plod zvaný nažka neboli obilka (například obilka ječmene je uvedena na obrázku 4).



Obrázek 4: Obilka ječmene, A – schématické znázornění anatomických struktur pluchaté obilky ječmene; B – příčný řez obilkou ječmene; C – podélný řez obilkou ječmene (1 – pluchy, 2 – oplodí, 2.1 – epidermis, 2.2 – hypodermis, 2.3 – mezokarp, 2.4 – endokarp, 3 – osemení, 3.1 – osemení, 3.2 – hyalinní vrstva, 4 – aleuronová vrstva, 5 – endosperm, 5.1 – subaleuronová vrstva, 5.2 – škrobový endosperm, 6 – vrstva stlačených buněk, 7 – štítek, 8 – zárodek, 9 – cévní svazek, 10 – štětička) [12]

### 2.3.2 Chemické složení zrna obilovin

Zrna obilovin obsahují odlišné množství chemických látek. Ukázkou chemického složení pěti rozdílných zrn obilovin vidíme v tabulce 4.

Tabulka 4: Složení celého zrna různých obilovin [17]

	Pšenice	Ječmen	Žito	Oves	Kukuřice	Rýže
Voda (%)	13	12	13	13	13	10-11
Bílkoviny (%)	12	10	11	13	10	8
Tuk (%)	2	2-3	2	7	4	1-2
Škrob (%)	59	52	52	40	63	70
Ostatní sacharidy (%)	10	19	17	23	8	< 1
Vláknina (%)	2	4	2	10	2	9
Popel (%)	2	3	2	3	1	5
Ca (mg/kg)	230-500	350	500	600	120	150
Fe (mg/kg)	33-66	40	35	38	50	28
Thiamin (mg/kg)	4	3	3	5	3	2,5
Riboflavin (mg/kg)	1	2	1	1	1	1
Niacin (mg/kg)	< 1	70	12	13	15	10
Limitující AK	Lys	Lys	Lys	Lys	Trp, Lys	Lys, Thr

### 2.3.3 Ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.)

Ječmen se systematicky řadí do říše rostlin (*Plantae*), podříše cévnaté rostliny (*Tracheobionta*), nadoddělení semenné rostliny (*Spermophyta*), oddělení krytosemenné (*Magnoliophyta*), třídy jednoděložné rostliny (*Monocotyledones*), řád lipnicotvaré (*Poales*), čeledi lipnicovité (*Poaceae*). Je to vyšlechtěná jednoletá tráva. Do čeledi lipnicovité patří všechny druhy obilnin (cereálií), jejíž plody mají vysoký obsah škrobu a jsou základem pro výrobu potravin [12, 15].

Má 5-8 zárodečných kořínků, 5-7 článků na stéble, výška ječmene je 70-120 cm [12, 15]. Květenstvím ječmene je klas, ten se skládá z klasového větvena, ze kterého vyrůstají po obou stranách klásky. Klásky jsou tvořeny z několika květů. Ječmen má listy střídavé, na stéble jsou postaveny ve 2 řadách nad sebou. U ječmene bývá, že jedna polovina listu je širší než druhá polovina [12].

Obilka ječmene je pluchatá i bezpluchá. Před mletím se pluchaté obilky musí loupát, při šrotování obaly nevadí. Ječmen je složen z 13,8 % vody a zbytek je sušina. Hlavní součástí sušiny jsou sacharidy (60-70 %), dále 8-16 % bílkoviny (krmné ječmeny mají vysoký obsah bílkovin, kdežto sladovnický pod 11 %), 2,1 % tuku, 4,8 % celulosy (3,5 % vlákniny) a 2-3 % popelovin. Endosperm obsahuje kromě škrobu další polysacharidy (pentosany), obsahuje také zásobní bílkoviny, gliadiny (prolaminy) a gluteniny. Jsou ve vodě nerozpustné a rozpouštějí se v etanolu. Tyto bílkoviny se získají z mouky vypráním vodou. Aleuronová vrstva je tvořena parenchymatickými buňkami ve více vrstvách (až 4). Obsah bílkovinných frakcí v ječmeni je: albuminy 8,9 %, globuliny 3,2 %, prolaminy 49,3 %, gluteniny 27,1 % a zbytek 1,4 %. Obaly obilek se skládají hlavně z celulosy, plucha a pluška obsahují ještě hemicelulosy a lignin [15].

Zárodek (*embryo*), též nazývané klíček, je základem nové rostliny. Zárodek obsahuje málo škrobu nebo žádný škrob, je hlavně bohatý na dusíkaté látky (34 %), lipidy (14-17 %), popeloviny (5-10 %) a je velmi bohatý na cukry (15 % sacharosy, 5-10 % rafinosy, fruktosany), dále minerální látky a vitaminy skupiny B [12]. Klíček obsahuje zejména tuk, nejvíce kyseliny palmitové a stearové. Jsou zde zastoupeny také bílkoviny a vitamin E [15]. Štítek ječmene tvoří velké množství enzymů – karboxypeptidasy,  $\beta$ -glukanasy,  $\alpha$ -amylasy a další izoenzymy, které se uvolňují v raných stádiích klíčení [12].

#### 2.3.3.1 Růst, výživa a hnojení ječmene

Rostlina ve svém životně prochází obdobím vegetativním a generativním. Ve vegetativním období se tvoří a rostou orgány (kořeny, stéblo, listy). Dochází také ke kvantitativním změnám – přírůstek organické hmoty rostliny, vznik rostlinných orgánů a jejich prostorovému uspořádání. Pletiva rostliny se diferencují v rostlinné orgány. Současně dochází ke změnám kvalitativním, kterými dochází k přechodu z vegetativního do generativního období, zakončeného vytvořením rozmnožovacích orgánů. Tato fáze končí vytvořením nové obilky. Pro přechod do generativní fáze potřebuje rostlina určitý impulz z vnějšího prostředí. U ječmene je to délka světelného dne. Po vytvoření životaschopných obilek rostlina stárne a odumírá [12].

Ječmen není náročný na teplotu a vláhu, ale půdní nároky jsou vysoké. Nejvhodnějšími půdami jsou černozemě, hnědozemě, hlinité, jílovito-hlinité a písčito-hlinité půdy. Optimální pH půdy se pohybuje v rozmezí 6,2-7,2 (v řepařské výrobní oblasti) a 5,8-6,2 (v bramborářské oblasti) [12]. Minimální teplota potřebná ke klíčení je 3-4,5 °C. Pro pivovarské ječmeny je příznivější vnitrozemský typ podnebí než vlhký přímořský typ, jelikož vlhko škodí rostlině daleko víc než sucho [17].

### 2.3.3.2 Zrání obilek ječmene

Rozeznáváme 5 stádií zralosti obilek. 1. stádiem je *stadium mléčné zralosti*. Obilky dorůstají do konečné velikosti, začínají v nich převažovat sacharidy nad dusíkatými látkami. Zůstává aktivní  $\beta$ -amylasa, klesá aktivita  $\alpha$ -amylasy a katalasy. Obilky jsou stále zelené, buňky endospermu jsou živé s obsahem protoplazmy a vody (50-60 %), v níž jsou obsažena škrobová zrna. Obilka je poměrně měkká, protože obsah obilky je vodnatý. 2. *stadium voskové* – obsah obilky je měkký, mezi prsty je tvárný. 3. *stadium žluté zralosti* – obsah obilky už je pevný, stále vzniká rýha při vrypu nehtem. Měkká obilka žloutne, obsah vody klesá na 30-25 %, aktivita enzymů klesá, až ustává. 4. *stadium plné (sklizňové) zralosti* – je zde silný pokles vody v zrně (asi 17 %). Barva obilky je slámově žlutá, obilka je lesklá a tvrdá. Poslední 5. *stadium fyziologické zralosti* – je období po odležení sklizeného ječmene, kdy je vhodná doba, pro jeho zpracování na slad. Jelikož čerstvě sklizené zrně klíčí pomalu a nevyrovnaně, potřebuje dobu na posklizňové dozrávání, které je odlišné u odrůd a podmínek pěstování. V této době se také upraví citlivost na příjem vody při máčení. Je to období 4-11 týdnů po sklizni, kdy jsou odbourány inhibitory klíčení na principu oxidační degradace a uvolní se funkce stimulatoru klíčení (kyselina gibberelová) [12, 16, 18, 19].

Obilky rostou ve 3 časových fázích, lze sledovat rozdílnou akumulaci sušiny. V 1. fázi pozvolný nárůst, v 2. fázi rychlý nárůst a ve 3. trvalý pokles akumulace sušiny. V zrně se syntetizují z látek jednoduchých (ve vodě rozpustných) látky složitější ve vodě nerozpustné. Nejprve do zrna pronikají hlavně minerální látky (převážně dusík), později se ukládají bezdusíkaté asimiláty, z nich vzniká škrob. Mění se zastoupení jednoduchých dusíkatých látek, dochází k syntéze bílkovin. Nakonec se v zrně vytvoří tuky. S rostoucí koncentrací asimilátů narůstá obsah sušiny v zrně, zrně se dehydratuje a narůstá hmotnost zrna [12].

### 2.3.3.3 Druhy ječmene a využití

Ječmen se využívá v mnoha odvětvích – v pivovarnictví, mlynářství, lihovarnictví a v krmivářství. Podle využití se dělí na ječmen krmný, sladovnický, průmyslový, potravinářský a pícninářský. V pivovarnictví se naklícením obilek ječmene získává slad a sladový květ [15].

### 2.3.3.4 Chemické složení obilky ječmene

Voda je obsažena v obilce v rozmezí 11-16 %. Při vyšším obsahu vody ječmeny plesniví a znehodnocují se, naopak voda nesmí klesnout pod 10 %, jelikož by se porušily enzymy a zrně by ztratilo schopnost klíčivosti [17].

*Škrob* je základní organickou polysacharidickou sloučeninou ječmene, tvoří 60-65 % sušiny. Skládá se z amylosy a amylopektinu. Vzniká z nízkomolekulárních cukrů enzymovou cestou



[16]. V ječmeni má funkci rezervního polysacharidu a zásobárny živin pro klíček v době vývinu. V ječmeni i sladu se vyskytují malá a velká škrobová zrna. Velká zrna jsou snáze degradovatelná během varního procesu než malá zrna [12].

Další složkou jsou *nízkomolekulární sacharidy* – jsou obsaženy v zrně jako volné cukry. Jsou zde zastoupeny sacharosa, glukosa, rafinosa, fruktosa a maltosa. Jako energetický zdroj při respiraci skladovaného ječmene slouží fruktosa, sacharosa a rafinosa [12].

*Celulosa* je polysacharidická složka obsahující glukosu, mannosu a galaktosu, která zabírá 4-7 % sušiny ječného zrna. Tvoří zpevňující složku buněčných stěn. Neúčastní se při výrobě sladu metabolismu ječného zrna a je enzymaticky obtížně štěpitelná [12]. Není přítomna ve vlastním endospermu. Skládá se z glukosových zbytků, hlavní stavební jednotkou je disacharid celobiosa. Celulosa je bez chuti a zápachu, ve vodě nerozpustná [16, 19].

Další neškrobové polysacharidy jsou *hemicelulosa* a glykany, které se řadí do rostlinných gum. Hemicelulosa zpevňuje a vyplňuje prostor mezi celulosovými vlákny. V ječném zrně tvoří 75 % sušiny škrobových buněčných stěn v endospermu a 25 % v aleuronové vrstvě [12]. Gumovité látky jsou hemicelulosa rozpustné ve vodě s vysokou viskozitou. Skládají se z  $\beta$ -glukanů a pentosanů. Při rozpuštění ve vodě tvoří koloidní roztoky [16, 17].

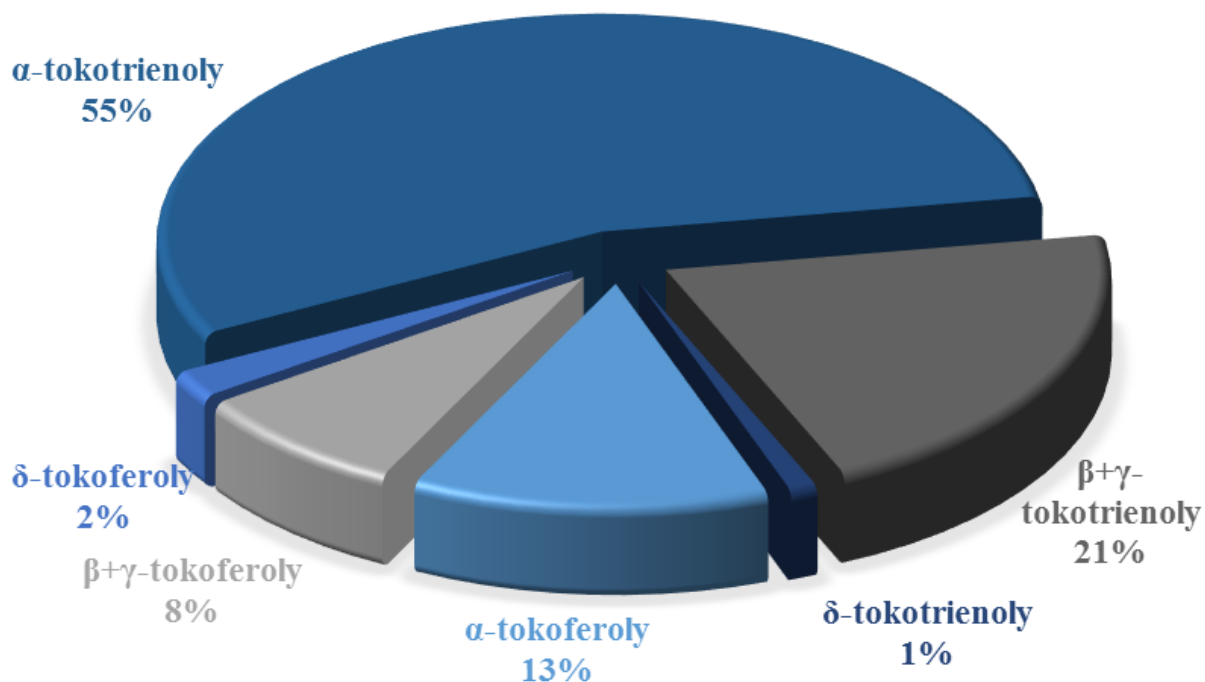
Důležitými nosiči biologických změn v průběhu výroby sladu jsou *dusíkaté látky* ječmene. Jsou to produkty štěpení bílkovin, které se tvoří během klíčení při tvorbě sladu. Jsou to makropeptidy, polypeptidy, nižší peptidy (dipeptidy, tripeptidy, tetrapeptidy apod.) a aminokyseliny. Bílkoviny ječmene se dělí do 4 skupin, jsou to albuminy, globuliny, prolaminy a gluteliny [12, 16].

Další látky obsaženy v ječmenu jsou *polyfenolové látky*, jsou obsaženy nejvíce v obalových částech zrna v podobě flavonoidních látek. Hlavní polyfenoly ječmene, ale i sladu, jsou fenolové kyseliny, barevné i bezbarvé flavonoidy, kondenzované a polymerní polyfenoly, kumariny a také ubichinony. Řada fenolových kyselin působí jako inhibitory klíčení [12].

Ječné *lipidy* obsahují 65-78 % neutrálních lipidů (hlavně triacylglycerolů), 7-13 % glykolipidů a 15-20 % fosfolipidů. V obilce jsou lipidy v embryu a z větší části v aleuronové vrstvě. Nejvíce mastných kyselin tvoří linolová kyselina [12].

*Fosfáty* ječmene jsou tvořeny fytnem (ester kyseliny fosforečné) a inositolem. Tyto látky mají důležitý fyziologický význam pro klíček [16].

Jsou zde zastoupeny *vitaminy* rozpustné ve vodě (B-komplex, vitamin C), ale také i rozpustné v tucích (vitamin E, prekursor vitamínu A) [12]. V zrně ječmene je zastoupeno všech 8 izomerů vitamínu E. Na obrázku 5 lze vidět příklad procentuálního zastoupení jednotlivých izomerů v obilce ječmene [20].



Obrázek 5: Procentuální zastoupení tokoferolů a tokotrienolů v ječné obilce [20]

V průběhu vegetace ječmene a tvorby zrna zajišťují *enzymy* metabolické procesy. Při sladování se aktivita enzymů výrazně zvyšuje a ovlivňuje technologickou kvalitu vyrobeného sladu [12]. Enzymy v jednotlivých částech zrna jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Enzymy obsažené v jednotlivých částech ječného zrna [16]

Část obilky	Enzymy
zárodek a štítek	hydrolasy, transferasy, oxidoreduktázy, amylasy, peptidasy, lipasy a fosfatasy
aleuronová vrstva	exo- a endopeptidasy, transaminasy, oxidoreduktasy, lipasy, fytasa a $\alpha$ -amylasa
subaleuronová vrstva	$\beta$ -amylasa
endosperm	$\beta$ -amylasa, endopeptidasa a fytasa

V tabulce 6 jsou uvedeny chemické složky v různých částech obilky.

Tabulka 6: Chemické a biochemické složky obsažené v hlavních částech ječné obilky [12]

Část obilky	Hlavní složky
pluchy	celulosa, pentosany, polyfenoly a polyfenolové kyseliny, křemík
zárodek	lipidy, sacharosa, rafinosa, proteiny, giberelová kyselina, draslík a hořčík
aleuronová vrstva	lipidy, sacharosa, proteiny, fosfáty, endosperm, degradující enzymy, draslík a hořčík, vitamin B, pentosany, $\beta$ -glukany
škrobový endosperm	škrob, proteiny, pentosany, $\beta$ -glukany buněčných stěn

### 2.3.3.5 Choroby ječmene

Nejrozšířenější choroby ječmene jsou sněti. *Prašná sněť*, ničí klásky, ty se rozpadají v černé výtrusy a rozprašují se do okolí. Zárodek sněti je uvnitř semene, je možno jej zničit pouze mořením horkou vodou. *Sněť ječnou* se nakazí ječmen při klíčení. *Rez ječmenná* postihuje listy, na kterých vytvoří žluté skvrny, kde vznikají žluté kupky a později hnědé až černé kupky výtrusů. Takovéto listy brzy zasychají a rostlina uvadá (tím zrno nedostane potřebné živiny a zakrňuje). *Pruhovitost ječmene* je rozšířená (postihuje 20-50 % sklizně). Objevuje se na čepeli listů jako hnědé podélné pruhy a poté pruhy usychají. *Padlí travní* vytváří na listech a stéblech bílý povlak, kde vznikají tečkovité černohnědé plodnice. Stébla se málo vyvinou a listy usychají [17, 19].

Ze živočišných škůdců jsou zde zastoupeny: *Bzunka ječná* tvoří larvy, které ničí listy. *Drátovci* – jsou larvy kovaříka, které okusují kořínky nebo klíčky klíčícímu obilí [17]. *Zelenuška žlutopásá* – larvy ožirají stéblo pod klasem. *Třásenka, muchnice a mšice* – napadají listy rostliny. *Pilous černý* – je skladištním škůdcem, vyhloďává zrno [19].

## 2.3.4 Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.)

Nejvíce pěstovaným druhem pšenice ve světě i u nás je pšenice setá. Stejně jako ječmen, patří pšenice do čeledi lipnicovité (*Poaceae*). Je to netradiční surovina pro přípravu sladu a následně piva. Má nelámavý klas, osinatý nebo bezosinný. Obilky jsou nahé (bezpluché), na řezu oblé [21]. Stéblo měří 60-130 cm a je kolénky dělena na 5-6 článků [15].

### 2.3.4.1 Klimatické a půdní podmínky

Pšenice vyžaduje strukturní, hlubší, hlinité a jílovitohlinité půdy neutrální až slabě kyselé (pH 6,2-7,0), které jsou dobře zásobené živinami. Nejvíce příznivé podmínky pro pěstování jsou oblasti dostatečně teplé až velmi teplé, převážně suché až velmi suché, průměrná teplota jarního a letního období 14-17 °C [21].

#### 2.3.4.2 Choroby pšenice

Mezi virové choroby patří *virus zakrslosti pšenice*, je přenášen mšicemi. *Pliseň sněžná* patří mezi houbové choroby. Příznaky jsou kroucení, skvrnitost klíčků, nárůst bílého hustého mycelia na listech, hnědnutí a odumírání kořenů, napadá také obilky v klase. Mezi komplex chorob pšenice také patří *pravý stéblolam*, ten zapříčiní přetržení stébla místo kořenů, při vytržení rostliny. *Kořenomorka obilná* způsobí bílé mycelium na kořenech a stéblech. Při *fuzariózi stébel* odumírají kořeny i stéblo. Na povrchu i uvnitř stébla je bílé (později růžové) mycelium. Ochrana proti komplexu chorob je v použití mořeného certifikovaného osiva. Do skupiny listových chorob patří *padlí travní*, *braničnatka plevová*, *askochyta pšenice*, *rez plevová*, *rez pšeničná a travní*. Choroby klasů způsobují *padlí* a *sněti*. Mezi škůdce patří *bzunka ječná*, *hrbáč osenní*, *kohoutek černý* a *modrý*, *vrtalky*, *bodruška obilná*, *zelenuška žlutopásá*, *třásněnky*, *plodomorky*, *mšice zhoubná* a *brvnatka pestrá* [21].

#### 2.3.4.3 Chemické složení obilky pšenice

Složení pšeničného zrna je velmi rozdílné a závisí na odrůdě a podmínkách pěstování (počasí, kvalita půdy, hnojení). Průměrné zrno pšenice seté vypěstované v ČR má vlhkost 10,0-15,0 %, dusíkaté látky 8,0-17,0 %, tuk 2,0-2,5 %, vláknina 2,0-2,5 %, minerální látky 1,5-2,0 %, cukry 2,0-3,0 % a škrob 63,0-71,0 % [15, 22]. V obilce pšenice je obsažen vitamin E o obsahu 35,72 mg·kg<sup>-1</sup> (α-tokoferol 9,12 mg·kg<sup>-1</sup> a β-tokoferol 4,77 mg·kg<sup>-1</sup>) a vitaminy skupiny B [23].

#### 2.3.4.4 Slad z pšenice

Pšenice se používá pro výrobu svrchně kvašeného piva. Pšeničné slady obsahují o 4-5 % více extraktu oproti ječmenu, mají také vyšší obsah dusíkatých látek, které podporují pomnožení kvasnic. Pšenice nemá pluchy na rozdíl od ječných sladů a obsahuje více dusíkatých a polysacharidických látek [12].

### 2.3.5 Kukuřice (*Zea mays*)

Kukuřice vyžaduje neutrální až slabě kyselou půdní reakci [24]. Obilka kukuřice je mnohem větší než obilky jiných obilovin. Pěstuje se kukuřice setá, cukrová a pukancová [22]. Na jedné rostlině dozraje 500 i více obilek, které jsou nahé, velké a převážně ploché. Obilka má výrazný klíček, který tvoří až 12 % hmotnosti obilky a obsahuje 30-35 % oleje [15]. Ze všech obilovin má kukuřičné zrno nejvyšší energetickou hodnotu. Obilky obsahují 8-10 % bílkovin, 3,5-5,5 % tuku, 67-75 % sacharidů (škrob, sacharosa), 2-2,5 % rozpustné i nerozpustné vlákniny a 1,5 % popelovin [15]. Z vitaminů je zastoupena skupina B, vitamin K, kys. pantotenová, vitamin E o obsahu 51,56 mg·kg<sup>-1</sup> [23].

### 2.3.6 Žito (*Secale cereale* L.)

Žito je obilnina pěstovaná na půdách s nižší úrodností, hlavně v bramborářské a horské výrobní oblasti [24]. Žitné zrno je bezpluché, stejně jako pšeničné, ale je delší a štíhlejší a má zelenošedou barvu [15, 22]. Obalové vrstvy jsou bohaté na arabinoxylany, celulosu a lignin. Minerální látky jsou hlavně v aleuronové vrstvě a sušina obsahuje 9-12 % bílkovin [22].

Ve srovnání s pšenicí je žito bohatší na nezbytné aminokyseliny – kys. olejová, linolová,  $\alpha$ -linolenová. Dále je obsažen vitamin E o obsahu  $41,85 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  ( $\alpha$ -tokoferol  $11,89 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  a  $\beta$ -tokoferol  $3,60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), vitaminy skupiny B, folová kyseliny a  $\beta$ -karoten [23].

### **2.3.7 Oves (*Avena sativa* L.)**

Oves je jarní obilnina, která se pěstuje na méně úrodných půdách bramborářské a horské výrobní oblasti [15, 22]. Zrno ovsa je pluchaté, ale byly vyšlechtěny také bezpluché varianty [22]. Oves obsahuje vyšší obsah bílkovin než ostatní obiloviny, vyšší obsah tuku s příznivou skladbou vyšších mastných kyselin (kyselina linolová), rozpustné cukry, více kvalitní vlákniny, vitaminy B (hlavně thiamin) a vitamin E,  $\beta$ -glukany, avenin, hořčík, železo, vápník atd. Oves je náročný na vláhu více než ostatní obilniny a potřebuje dostatek pohotových živin (hlavně dusík) [22, 24]. Oves obsahuje vitamin E o množství  $15,50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Z ovsa se vyrábí ovesné vločky, které mají dokonce  $22,93 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  vitaminu E a obsahují  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -tokoferol a  $\alpha$ ,  $\beta$ -tokotrienol [23].

## **2.4 Výroba sladu**

Slad je název pro naklíčené a usušené obilné zrno, převážně ječmenné. Sladování se provádí, aby se rozštěpily uložené polysacharidy v obilce na jednoduché sacharidy vhodné ke kvašení.

### **2.4.1 Ječmen**

Dovezený ječmen se před přijetím zanalyzuje. Poté se zvaží na přijímací rampě a vsype se do přijímacích košů. Pro přepravu ječmene se používají mechanické a pneumatické dopravníky [12].

### **2.4.2 Čištění, třídění**

Před uskladněním se musí ječmen zbavit všech nečistot (kamínků, písku, kovových částic, pluch, slámy, klasů), musí zůstat jen celá ječná zrna. Magnetem se odstraňují příměsi kovového charakteru, nekovových nečistot se zbavuje přes hrubá síta. Začíná se na aspirátorech (pro předčištění), pokračuje na triéru. Dále se třídí ječmen podle velikosti na dvě třídy kvality (I. a II. třída) a zbytek (nesladovatelnou zadinu – malá zrna s nečistostmi). V moderních aspirátorech se nejen odstraňují nečistoty, ale rovnou se třídí. Pro odprášení se používají různé filtry a cyklony. Třídění ječmene je důležité kvůli rozdílnému příjmu vody při máčení v důsledku rozdílné velikosti zrn. To by způsobovalo nerovnoměrné klíčení zrn [12].

### 2.4.3 Skladování ječmene

Ječmen lze skladovat při 8-10 % vody, tato vlhkost se nazývá konstituční voda a je nutná, aby nedošlo k trvalým negativním změnám v zrna. Zrno při skladování dýchá, což tvoří oxid uhličitý, teplo a vodu. Skladuje se na půdách na hromadách nebo v silech. Při skladování dochází k dormanci (klíčivý klid) [12, 19].

### 2.4.4 Máčení ječmene

Aby zrno mohlo klíčit, je třeba dodat vegetační vodu, pro zvýšení vody v zrna minimálně na 30 % (tehdy se zvýší životní pochody v zrna). Máčení je fyzikální proces, rychlost je závislá na velikosti a struktuře zrna, ale i na teplotě vody. Po určité době máčení dojde k nasycení zrna vodou a rychlost příjmu vody se zpomalí. Tehdy začne zrno rychle klíčit. Během máčení se prvně vyluhují snadno rozpustné látky z obalových vrstev, poté i z endospermu (polyfenoly, ionty solí apod.). Zvyšuje se aktivita enzymů, hlavně amylas, fosfatas, proteas a ribonukleas [12].

### 2.4.5 Klíčení ječmene

Při klíčení ječmene probíhá řada chemických, biochemických, fyzikálních a fyziologických změn zrna, při kterých se degradují vysokomolekulární látky – vede k rozluštění zrna. Klíčení probíhá na humnech. Stádia klíčení – mokrá hromada, suchá hromada, pukavka, stadium mladíka (mladá hromada), stadium vyrovnané hromady, stárnutí hromady, stará zavadlá hromada – zisk zeleného sladu. Ve stadiu suché hromady voda na povrchu zrna se vsákne nebo vypaří. Ve stadiu pukavky zrno silně dýchá, hromada se potí, má vůni po okurkách. Ve stadiu mladíka se odehrává nejdůležitější část klíčení. Období začínajících enzymových přeměn zrna, vytváření proteolytického a cytolýtického rozluštění zrna [12, 19].

### 2.4.6 Hvozdění zeleného sladu

Hvozděním se snižuje obsah vody na 3-4 % u světlých sladů a 1,5-2 % u tmavých sladů, zastavují se vegetační pochody, redukuje se část enzymových aktivit a vytváří se chuťové, barevné a oxidačně-redukční látky. Jsou zde 3 fáze hvozdění, 1. fází je *růstová fáze*, kdy obsah vody je nad 20 % a zrno je schopno stále klíčit. 2. fáze je enzymová fáze, kdy obsah vody klesne pod 20 %, zastaví se vegetační pochody, enzymové stále pokračují. Poslední fází je chemická fáze, kdy je obsah vody pod 10 %, jsou zastaveny i enzymové pochody, probíhají chemické změny, které vedou k tvorbě chuťových a barevných látek. Probíhá zde například Maillardova reakce, což je reakce redukujících sacharidů s aminokyselinami. Při této reakci vznikají karbonylové a aminokarbonylové sloučeniny, které reagují vzájemně, ale také s aminosloučeninami. Další reakcí je transformace samotných redukujících sacharidů za neúčasti aminosloučenin – karamelizace [12].

## 2.4.7 Odkličování a uskladnění sladu

Po hvozdnění má slad vysokou teplotu (až 80 °C) a musí se ochladit. Odklíčení sladu je proces, kdy se oddělí sladový květ (klíčky) od sladu. Klíčky rychle vlhnou a zhoršila by se skladovatelnost, také by klíčky zhoršily senzorické a analytické vlastnosti sladu. Slad se poté ještě čistí od zbytků sladového květu, prachu, rozdrčených zrn a leští se (políruje). Slad se po hvozdnění nechává odležet, nezpracovává se hned. Po sušení je totiž slad příliš suchý a problematizovalo by to další technologické zpracování. Slad se uskladňuje na půdách, v dřevěných nebo ocelových skříních nebo v silech [12].

## 2.5 Druhy sladů

Ze sladovnického ječmene se vyrábí několik druhů sladů, nejběžnější jsou světlé slady plzeňského typu a tmavé slady mnichovského (bavorského) typu. Mezi těmito dvěma typy je přechodový vídeňský slad. Existují také speciální typy sladů jako například karamelové typy a jiné barevné typy [12].

### 2.5.1 Světlé slady

Tyto slady se používají pro výrobu pív typu ležáků, konzumních pív a speciálních pív s různou koncentrací mladiny. Mají nižší hodnotu barvy po povaření [12].

### 2.5.2 Vídeňský slad

Tento slad je přechodovým typem mezi světlým a tmavým sladem. Má asi dvakrát vyšší hodnotu barvy než světlý slad. Dříve se používal pro zvýšení sytosti barvy světlého piva, dnes se používá pro výrobu speciálních pív [12].

### 2.5.3 Tmavé slady

Tyto slady se používají pro přípravu tmavých pív, mají vyšší hodnoty barvy a zvýšené koncentrace produktů Maillardovy reakce [12].

### 2.5.4 Speciální slady

Speciálních sladů existuje celá řada, používají se k úpravě určitých kritérií pív vyráběných ze světlých nebo tmavých sladů. *Karamelové slady* mají vysoký obsah barevných a aromatických látek. V pivě působí výrazné aroma, které je způsobené dusíkatými heterocyklickými sloučeninami. *Barevné slady* jsou nazývané slady barvicí, používají se hlavně při výrobě silně tmavých pív. Do barevných sladů patří čokoládový slad, ten má typicky tmavě hnědou barvu s chutí suchou, svíravou, kyselou, ale i sladkou. *Melanoidinové slady* se také používají při výrobě tmavých pív, zde probíhá intenzivněji Maillardova reakce (nikoliv zvýšená teplota, jak je tomu u barevných sladů). Nemají proto nahořklou příchuť, ale typickou sladovou vůni [12].

## 2.6 Možnosti ošetření zrna

### 2.6.1 Nízkoteplotní plazma

Plazma je elektricky buzený výboj, který vytváří prostředí nabitých a energeticky excitovaných částic a radikálů. Takovéto aktivní prostředí je dosaženo bez užití jiných chemikálií. Plazma pomůže k destrukci nebezpečných látek, i těch, které jsou těžko odbouratelné chemickou cestou. Tato destrukce je účinná i za pokojových teplot [25].

Nízkoteplotní plazma je generována v podobě výbojů šířících se mezi dvěma elektrodami, kde se na jednu elektrodu přivádí impuls vysokého napětí a druhá elektroda je uzemněna. Ve vodném prostředí se výboji tvoří protoplasma, ve které probíhá několik fyzikálních a chemických procesů, například silné elektrické pole a ultrafialové záření, které vytváří chemicky účinné látky a radikály. Protoplasma se obvykle vytváří pomocí plynu, který je vystaven účinkům elektrického pole, které urychlují pohyb elektronů a ty se střetnou s dalšími elektrony. Ionty a elektrony v reaktivní excitované formě mohou ztratit vnitřní energii, kvůli kolizi s jinými prvky, povrchem nebo fotony v UV oblasti. Právě tyto faktory jsou odpovědné za dezinfekční účinek plazmového plynu. Jednou z výhod použití nízkoteplotního plazmatu je inhibice mikroorganismů u tepelně citlivých substrátů [26].

### 2.6.2 Biologické moření

Biologické moření znamená ošetření příznivými druhy hub, využívané pro ochranu rostlin po celém světě.

#### 2.6.2.1 *Trichoderma virens*

Tento polyfágní druh houby je schopný potlačovat původce houbových onemocnění – například rody *Alternaria*, *Fusarium*, *Pythium*, *Sclerotinia* a *Rhizoctonia*. Přítomnost této houby v půdě také pozitivně ovlivňuje zakořeňování a rostliny bývají odolnější proti škodlivým organismům [27].

#### 2.6.2.2 *Metarhizium anisopliae*

Tento druh houby se přidává do půdy a je účinný v prevenci před poškozením klíčících a mladých rostlin půdním hmyzem [28].

### 2.6.3 Chemické moření

Chemické moření označuje ošetření rostliny pomocí chemikálií. Fungicidy jsou určeny k ničení hub a plísní u rostlinných kultur a zemědělských produktů. Některé fungicidy mají pouze fungistatický účinek, což znamená, že omezují další růst plísně, ale neusmrtí ji [29].



## 2.7 HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie patří do skupiny separačních metod. Tyto metody jsou založeny na rozdílné distribuci látek mezi 2 nemísitelné fáze – fází mobilní, která je pohyblivá, a stacionární, která je nepohyblivá. Stacionární fáze je tuhá látka nebo kapalina zakomponovaná na tuhém nosiči. Mobilní fáze je v případě kapalinové chromatografie kapalina a protéká stacionární fází. Při vysokoúčinné kapalinové chromatografii je přiváděna kapalina za vysokého tlaku. Distribuci látek mezi fáze popisuje rozdělovací konstanta  $K_D$ .

$$K_D = \frac{c_s}{c_m} \quad (2)$$

$c_s$  je koncentrace složky ve stacionární fázi,  $c_m$  je koncentrace v mobilní fázi [30]

### 2.7.1 Pojmy

Retenční čas  $t_R$  je doba uplynulá od nástřiku vzorku do maxima píku. Značí také kvalitativní charakter látky. Kvantitativní charakter je určen plochou píku nebo výškou píku.

Mrtvý retenční čas  $t_0$  je retenční čas složky, která není v koloně zadržována, pohybuje se stejnou rychlostí jako mobilní fáze.

Dělené látky se nachází v mobilní fázi stejný čas, odlišují se pouze dobou, kterou stráví ve stacionární fázi. Doba, ve které jsou látky zachyceny na stacionární fázi, se nazývá redukovaný retenční čas  $t'_R$  a zapisuje se jako mrtvý retenční čas odečtený od retenčního času.

$$t'_R = t_R - t_0 \quad (3)$$

Účinnost kolony je dána počtem teoretických pater, je to bezrozměrná veličina  $N$ .

$$N = konst \cdot \left( \frac{V_R}{w} \right)^2 \quad (4)$$

$w$  je šířka píku v základně,  $V_R$  je retenční objem. Porovnání kolon různých délek se provádí podle výškového ekvivalentu teoretického patra  $H$ .

$$H = \frac{L}{N} \quad (5)$$

kde  $L$  je délka kolony a  $N$  počet teoretických pater. Výškovému ekvivalentu teoretického patra se přiřazuje rozměr délky a udává délku kolony připadající na jedno patro [30].

### 2.7.2 Instrumentace

Kapalinový chromatograf se skládá z 8 částí. První je zde zásobník mobilní fáze, dále odplyňovač, směšovač mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, dávkovač, kolona (může být před ní také předkolona), detektor a nakonec datová stanice ve formě počítače se softwarem.

Odplyňování mobilní fáze se uskutečňuje, aby při změně tlaku nedocházelo k uvolňování bublinek rozpuštěných plynů. Kyslík rozpuštěný v mobilní fázi má negativní odezvu při fluorescenční detekci, zhasí emisní záření, čímž se snižuje citlivost detekce. Dalším

důsledkem uvolnění bublinek rozpuštěného plynu je kolísání tlaku v systému, nestabilita základní linie, neopakovatelné retenční časy a snížení citlivosti detekce. V současnosti se používají 2 typy odplynění – probublávání héliem a vakuový odplyňovač.

Chromatografická kolona je složena z kovového pláště a stacionární fáze. Délka kolon bývá od 10 do 300 mm a vnitřní průměr 2,1 až 5 mm. Jako náplně jsou použity částičky o velikosti 1-10  $\mu\text{m}$ .

Detektory zaznamenávají rozdíl signálu mezi průchodem čisté mobilní fáze a fáze obsahující analyzovanou složku. Dělí se na destrukční a nedestrukční. V destrukčních detektorech se detekovaná látka nevratně změní, kdežto v nedestrukčních zůstává v nezměněné podobě. Fluorescenční detektor funguje na principu fluorescence a měření sekundárního záření, které látka emituje po absorpci primárního excitačního záření [30].



Obrázek 6: HPLC Ultimate 3000 [31]

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Chemikálie

- Diethyl ether stabil G.R. (Lach-ner)
- Ethanol absolute (Emplura)
- Hydroxid draselný v pecičkách (Lachema, chemapol)
- Deionizovaná voda
- Methanol – Chromasolv, gradient grade for HPLC,  $\geq 99,9$  % (Sigma-Aldrich)
- Síran sodný bezvodý G.R. (Lach-ner)
- Kyselina askorbová L(+)-ascorbic acid F.G.
- Standardy  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tokoferou (Sigma-Aldrich), čistota 100 %
- Standardy  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tokotrienolu (Sigma-Aldrich), čistota 75 %, 98 %, 80 %, 65 %
- Dusík čistoty 5,5

### 3.2 Pomůcky

- Pipety – biotic proline 100-1000  $\mu$ l  
– transfer pipette S 100  $\mu$ l
- Mikrostríkačka Hamilton
- Odpařovací baňka s rovným dnem (250 ml)
- Lžička
- Zátka
- Dělicí baňka
- Kádinka
- Erlenmayerova baňka
- Vialka
- Víčka se silikonovým septem
- Vialky

### 3.3 Přístroje

- Vakuová odparka BÜCHI rotavapor R-114
- Vodní lázeň BÜCHI waterbath B-480
- Spektrofotometr Varian Cary 1E
- HPLC Ultimate 3000 (Dionex, USA), FLD detekce
- Laboratorní mlýnek
- Laboratorní váha Mettler toledo PG503-S Delta Range

### 3.4 Příprava roztoků

50% w/w vodný roztok hydroxidu draselného byl připraven smícháním 100 g tuhého KOH a 100 ml deionizované vody.

### 3.5 Příprava zásobního roztoku standardů tokoferolů a tokotrienolů

Zásobní roztoky standardů tokoferolů byly naváženy o přibližné koncentraci  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  do methanolu a jejich přesné koncentrace byly zjištěny spektrofotometricky dle ČSN EN 12822 [32], konkrétně  $\alpha$ -tokoferol při 292 nm,  $\beta$  při 296 nm,  $\gamma$  a  $\delta$  při 298 nm, následně naředěny do směsného zásobního roztoku, ze kterého byla připravena sedmibodová kalibrace. Do stejného zásobního roztoku byly naředěny i standardy tokotrienolů o známé koncentraci.

### 3.6 Vzorky

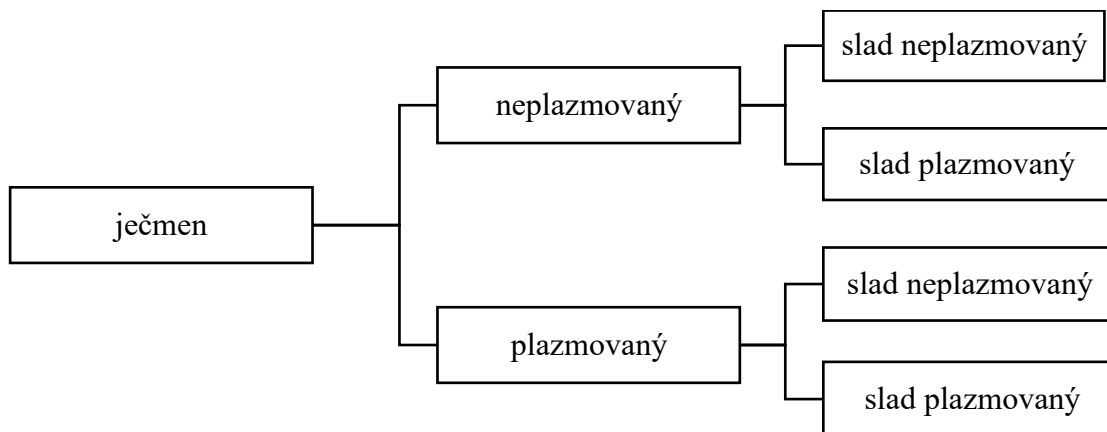
#### 3.6.1 České Budějovice

Sladovnický ječmen odrůda Francin byl pěstovaný na experimentálním poli Zemědělské fakulty, Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (viz tabulka 7). Před setím bylo osivo biologicky a fyzikálně ošetřeno (obrázek 7). Ječmen byl po sklizni uskladněný a následně sladovaný.

Osivo bylo zaseto 25. 3. 2015 a sklizeň proběhla 30. 7. 2015.

Tabulka 7: Informace o oseté oblasti

	<b>České Budějovice</b>
GPS	N48°58'40.61 N, 14°26'59.00 E
Výrobní typ	bramborářský
Výrobní oblast	obilnářská
Nadmořská výška	383 m. n. m.
Půdní typ	hnědozem
Půdní druh	písčito – hlinitá, jemná zrnitost
pH půdy	slabě kyselá
Prům. roční teplota	7,8 °C
Průměrné srážky	620 mm



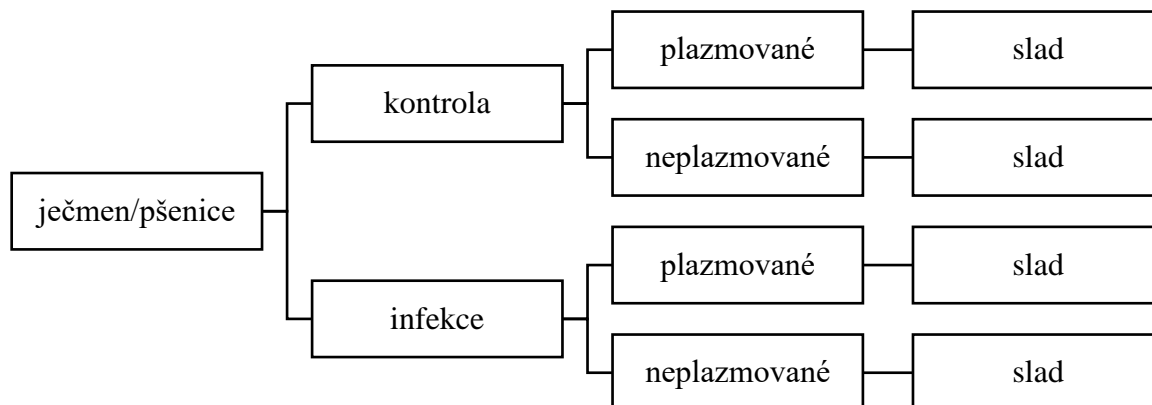
Obrázek 7: Diagram plazmování ječmene a sladu

### 3.6.1.1 Druhy ošetření

1. vzorek – ošetřen fungicidním mořením – mořidlo Raxil star s účinnými látkami fluopyram, prothioconazole a tebuconazole
2. vzorek – kontrolní vzorek, nemořené osivo
3. vzorek – vystaven nízkoteplotnímu plazmatu po dobu 4 minut
4. vzorek – vystaven nízkoteplotnímu plazmatu po dobu 4 minut a biologicky mořen houbou *Trichoderma virens* – proti půdním patogenům
5. vzorek – vystaven nízkoteplotnímu plazmatu po dobu 4 minut a biologicky mořen houbou *Metarhizium anisopliae* – proti půdním škůdcům
6. vzorek – biologicky mořen houbou *Trichoderma virens* – proti půdním patogenům
7. vzorek – biologicky mořen houbou *Metarhizium anisopliae* – proti půdním škůdcům [27]

### 3.6.2 Umělá infekce

V Troubsku byl pěstován ječmen a pšenice, které byly v průběhu růstu infikovány plísní rodu *Fusarium*. Plíseň byla napěstována v Petriho miskách, suspenze izolátu byla aplikována na porosty pšenice a ječmene v době kvetení. Ve stejné době byly pěstovány stejné obiloviny bez umělé infekce jako kontrolní vzorky. Po sklizni byla zrna kontrolní i infikovaná rozdělena na 2 části. Jedna část byla ošetřena plazmovým výbojem a druhá zůstala neošetřená. Tyto 4 vzorky byly následně sladovány. Vzniklo tedy 8 vzorků pro ječmen a 8 pro pšenici, dohromady 16 vzorků viz obrázek 8.



Obrázek 8: Diagram úpravy ječmene a pšenice

### 3.6.3 Sladování

Mikrosladování bylo provedeno v laboratorní mikrosladovně fy KVM (ČR). Každý vzorek byl sladován při hmotnosti 1000 g. Čas máčení 1. den 4 hodiny, 2. den 6 hodin. 3. den byl obsah vody ječmene upraven namáčkou nebo dokropením na 45 %. Teplota vody a teplota vzduchu byla nastavena na 14 °C. Po ukončení máčení byl ječmen přemístěn do kombinované skříně pro klíčení a hvozdění sladu. Klíčení probíhalo při teplotě 14 °C. Celkový čas máčení a klíčení byl 6 dní. Hvozdění probíhalo na jednodívkovém, elektricky vyhřívaném hvozdě 1 x 22 hodin, při teplotě předsušení 55 °C po dobu 12 hodin a při dotahovací teplotě 80 °C po dobu 4 hodin [33].

### 3.6.4 Ošetření výbojem nízkoteplotního plazmatu

Plazmový výboj typu Gliding Arc generovaný při atmosférickém tlaku. Energií vytvářející výboj dodává vysokonapěťový zdroj GVN1k-2011 firmy RADAN s vysokonapěťovým transformátorem (10 kV) s příkonem 750 W a pracující s frekvencí 50 Hz. Jako pracovní plyn byl použit stlačený vzduch, kdy byl přetlak v tlakové nádobě kompresoru nastaven na cca 600 kPa. K nastavení průtoku pracovního plynu byl použit rotametr Omega FL-2008 zabudovaný přímo v napájecím zdroji, který dovoluje měnit průtok v rozsahu od 10 do 100 SCFH (průtok 1 Nm<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup> odpovídá hodnotě 35,3 SCFH). V plazmové trysce byly použity dvě divergentní nerezové elektrody, mezi nimiž byla vzduchová mezera 2 mm. Elektrody byly obdélníkové s jedním zakulaceným rohem o průměru 6 mm. Vzdálenost mezi vzorkem a plazmovou tryskou byla 10 cm. Průtok pracovního plynu byla 30 SCFH. 150 g ošetřovaného vzorku bylo po celou dobu ošetření (4 min) umístěno v míchacím zařízení. Míchací zařízení je složeno z otevřeného děrovaného tubusu s míchací čepelí na dně, která se otáčela rychlostí 60 ot/min [27].

## 3.7 Stanovení vitamínu E

### 3.7.1 Příprava vzorku

Obilky ječmene nebo sladu byly namlety na mlýnku, do 250 ml odpařovací baňky s rovným dnem byly nasypány 2 g zhomogenizované mouky, bylo přidáno 100 mg kyseliny askorbové a přilito 50 ml ethanolu. Tato směs byla míchána minutovým třepáním a ponechána 5-10 minut. Poté bylo přidáno 10 ml 50% vodného roztoku hydroxidu draselného a opět byla směs míchána. Do baňky byl napuštěn dusík z tlakové láhve, aby byla vytvořena inertní atmosféra a vzorek byl ponechán 24 hodin při laboratorní teplotě na tmavém místě.

### 3.7.2 Extrakce

Zmýdelněný vzorek byl extrahován  $2 \times 50$  ml diethyletheru v dělicí baňce. Etherové extrakty byly spojeny a promyty  $2 \times 80$  ml deionizované vody, po odpuštění vodné fáze byl extrakt vysušen přidavkem bezvodého síranu sodného. Rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační vakuové odparce a odparek byl rozpuštěn ve 4 ml methanolu a převeden do vialek. Každý vzorek byl připraven ve dvou opakováních.

### 3.7.3 Příprava kalibračních křivek

Standardy tokoferolů byly rozpuštěny v methanolu o přibližné koncentraci  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a jejich přesná koncentrace byla stanovena spektrofotometricky dle ČSN 12822 (rovnice 6) [32]. Standardy  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  a  $\delta$ -tokotrienolů byly rozpuštěny v methanolu o přesných koncentracích  $1,25\text{--}4,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Z uvedených roztoků byl připraven zásobní roztok směšného standardu, ze kterého byla postupným ředěním připravena sedmibodová kalibrační křivka. Koncentrace jednotlivých izomerů byly voleny tak, aby odpovídaly předpokládaným koncentracím ve vzorcích obilovin.

$$c[\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}] = \frac{A \cdot 10000}{E_{1\text{cm}}^{1\%}} \quad (6)$$

$c$  je koncentrace tokoferolů,  $A$  absorbance,  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  tabulková hodnota 1% roztoku v methanolu s optickou drahou 1 cm [32]

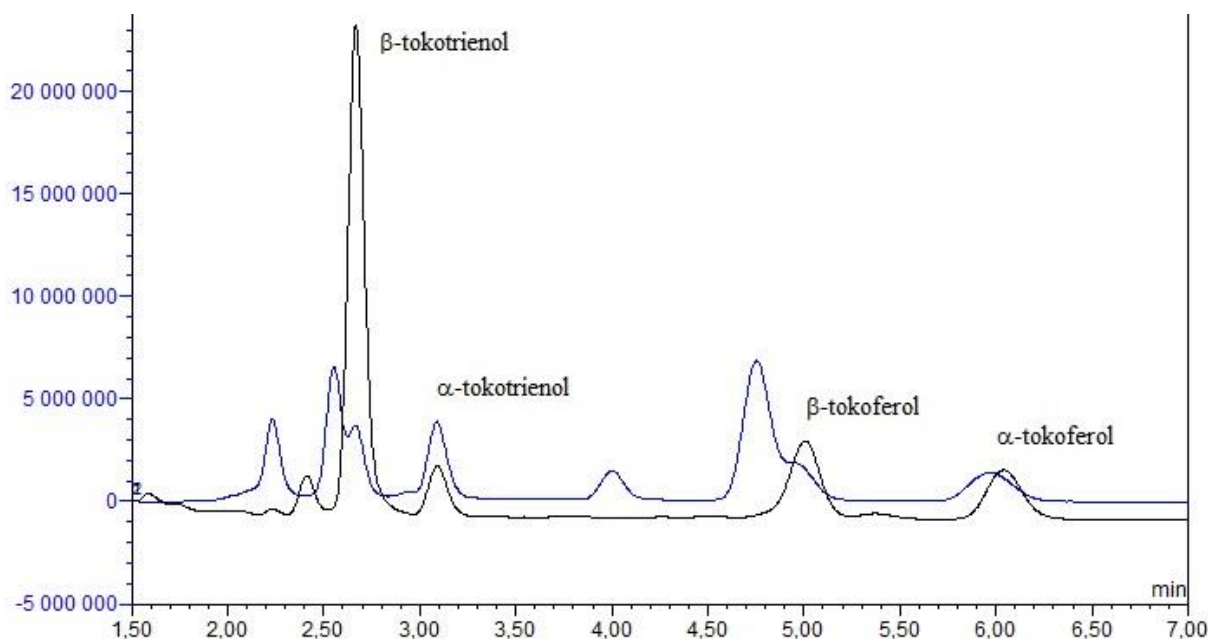
### 3.7.4 Analýza a detekce

Vialky byly vloženy do kapalinového chromatografu s nastavenými parametry. Podmínky chromatografické analýzy byly následující:

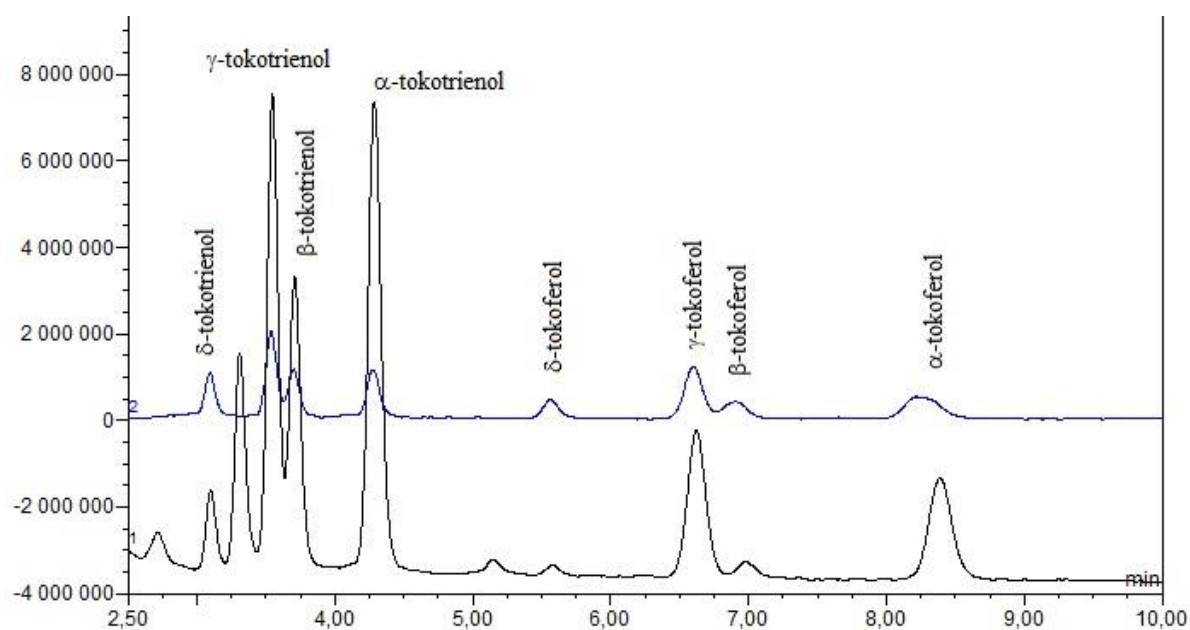
- Teplota kolony:  $30^\circ\text{C}$
- Mobilní fáze: Acetonitril, voda, methanol v poměru 67:3:30
- Eluce: izokratická
- Průtok mobilní fáze:  $0,70 \text{ ml}/\text{min}$
- Objem nástřiku:  $1 \mu\text{l}$
- Kolona: YMC C30 (YMC, Japonsko)

- Detekce: fluorescenční, excitace při 290 nm a emise při 330 nm

HPLC s reverzní fází, kdy stacionární fáze je silikagel s navázanými 30 uhlíkatými řetězci, dokáže rozdělit všech 8 izomerů, v následujícím pořadí:  $\delta$ -tokotrienol,  $\gamma$ -tokotrienol,  $\beta$ -tokotrienol,  $\alpha$ -tokotrienol,  $\delta$ -tokoferol,  $\gamma$ -tokoferol,  $\beta$ -tokoferol,  $\alpha$ -tokoferol [4].



Obrázek 9: Ukázka chromatogramu pšenice, modrá linie je standard, černá linie je vzorek



Obrázek 10: Ukázka chromatogramu ječmene, modrá linie je standard, černá linie je vzorek



## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Opakovatelnost extrakce

Jeden vzorek sladu byl připraven a vyextrahován ve čtyřech opakováních, následně změřen a vyhodnocen. Byla vypočítána směrodatná odchylka a průměr a z těchto hodnot byla následně vypočítána relativní směrodatná odchylka podle rovnice 7. Tato odchylka pro jednotlivé izomery nepřesáhla 16 %.

Tabulka 8: Obsahy tokoferolů (T) a tokotrienolů (T3) ve 4 extrakcích sladu

	<i>c</i> [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]							
	$\delta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\beta$ -T3	$\alpha$ -T3	$\delta$ -T	$\gamma$ -T	$\beta$ -T	$\alpha$ -T
<b>1</b>	0,432	2,008	1,907	12,028	0,127	1,419	0,194	4,878
<b>2</b>	0,418	2,013	1,923	11,482	0,080	1,450	0,193	4,704
<b>3</b>	0,440	2,399	1,937	15,273	0,109	1,759	0,196	6,184
<b>4</b>	0,450	2,128	1,991	12,345	0,110	1,517	0,207	5,011
<i>s</i>	0,012	0,159	0,031	1,471	0,017	0,133	0,006	0,581
$\bar{x}$	0,435	2,137	1,940	12,782	0,107	1,536	0,197	5,194
<b>RSD [%]</b>	<b>2,655</b>	<b>7,428</b>	<b>1,620</b>	<b>11,509</b>	<b>15,936</b>	<b>8,686</b>	<b>2,886</b>	<b>11,194</b>

$$RSD[\%] = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100[\%] \quad (7)$$

RSD je relativní směrodatná odchylka, *s* je směrodatná odchylka,  $\bar{x}$  je průměr

### 4.2 Kalibrační křivky

Pro kalibrační křivky byly použity koncentrace jednotlivých izomerů vitamínu E tak, aby byla zajištěna lineární závislost a aby odpovídaly předpokládaným koncentracím ve vzorcích obilovin. Koncentrace jednotlivých izomerů jsou vypsány v tabulce 9.

Tabulka 9: Příklad kalibračních rozsahů

	<i>c</i> [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]		<i>c</i> [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	
Izomer	tokoferol	R <sup>2</sup>	tokotrienol	R <sup>2</sup>
$\alpha$	0,384-23,053	0,9995	0,500-30,000	0,9989
$\beta$	0,099-5,949	0,9991	0,125-7,500	0,9991
$\gamma$	0,282-16,909	0,9985	0,125-7,500	0,9984
$\delta$	0,049-2,968	0,9989	0,125-7,500	0,9965

### 4.3 Výpočet koncentrace jednotlivých izomerů

Ze dvou měření jednoho vzorku byl spočítán průměr ploch píků, z kalibrační závislosti byla stanovena koncentrace jednotlivých izomerů ve vzorku metodou externího standardu. Byla zohledněna navážka, ředění a u tokotrienolů i čistota standardu viz rovnice 8.

$$c[\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}] = \frac{A-b}{a} \cdot \frac{V[\text{l}]}{m[\text{kg}]} \cdot k \quad (8)$$

$c$  je koncentrace ve vzorku;  $A$  je plocha píku roztoku vzorku;  $a$ ,  $b$  jsou koeficienty z kalibrační křivky ( $y = a \cdot x + b$ );  $V$  je celkový objem;  $m$  je navážka vzorku;  $k$  je koeficient čistoty

### 4.4 Výsledky jednotlivých souborů vzorků

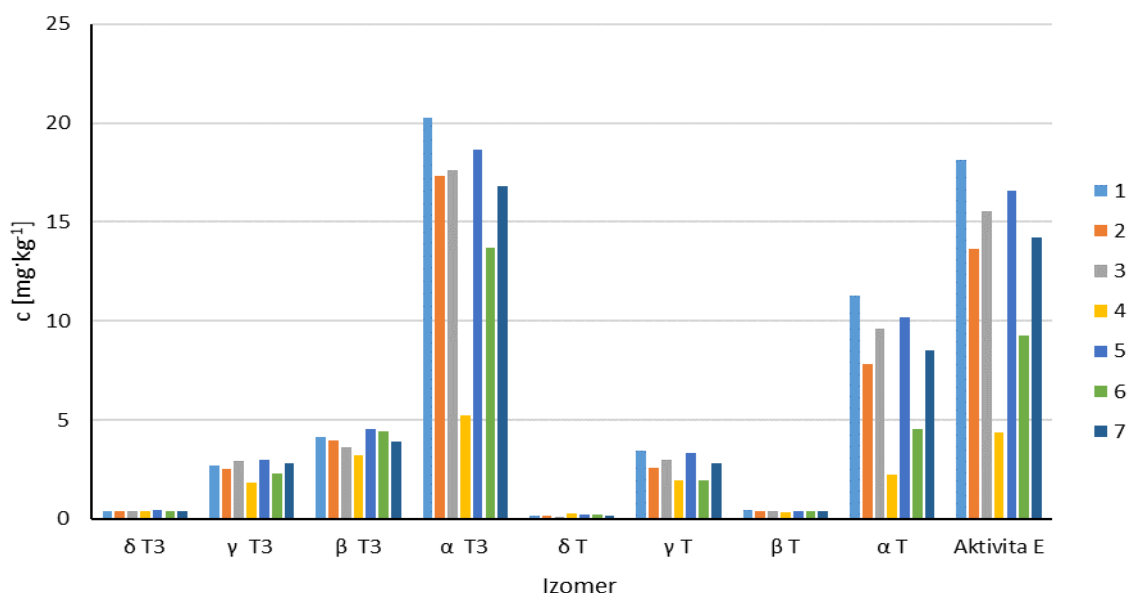
Na obsah vitamínu E má vliv mnoho faktorů, mezi ně patří odrůda obilniny, lokalita pěstování, teplota a vlhkost během roku a povětrnostní podmínky [37, 38, 42, 43]. V našem případě byla použita jediná odrůda ječmene, z jednoho stanoviště, pěstovaná a sklizená v roce 2015. Bylo proto možno sledovat vlivy sladování a různého ošetření na obsah vitamínu E. Uměle infikované vzorky jsou rovněž jediné odrůdy, z jediného stanoviště v daném ročníku, vliv na obsah vitamínu E by měla mít pouze tato infekce.

## 4.4.1 České Budějovice

### 4.4.1.1 Neplazmovaný ječmen

Tabulka 10: Obsahy jednotlivých izomerů a celkové aktivity v neplazmovaném ječmeni

ošetření	Obsah [ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]								
	$\delta\text{-T3}$	$\gamma\text{-T3}$	$\beta\text{-T3}$	$\alpha\text{-T3}$	$\delta\text{-T}$	$\gamma\text{-T}$	$\beta\text{-T}$	$\alpha\text{-T}$	Aktivita E
1	0,4	2,7	4,2	20,2	0,2	3,5	0,5	11,3	18,1
2	0,4	2,5	3,9	17,3	0,2	2,6	0,4	7,8	13,7
3	0,4	2,9	3,6	17,6	0,1	3,0	0,4	9,6	15,6
4	0,4	1,9	3,2	5,3	0,3	2,0	0,3	2,3	4,3
5	0,5	3,0	4,5	18,7	0,2	3,3	0,4	10,2	16,6
6	0,4	2,3	4,4	13,7	0,2	2,0	0,4	4,5	9,3
7	0,4	2,8	3,9	16,8	0,1	2,8	0,4	8,5	14,2



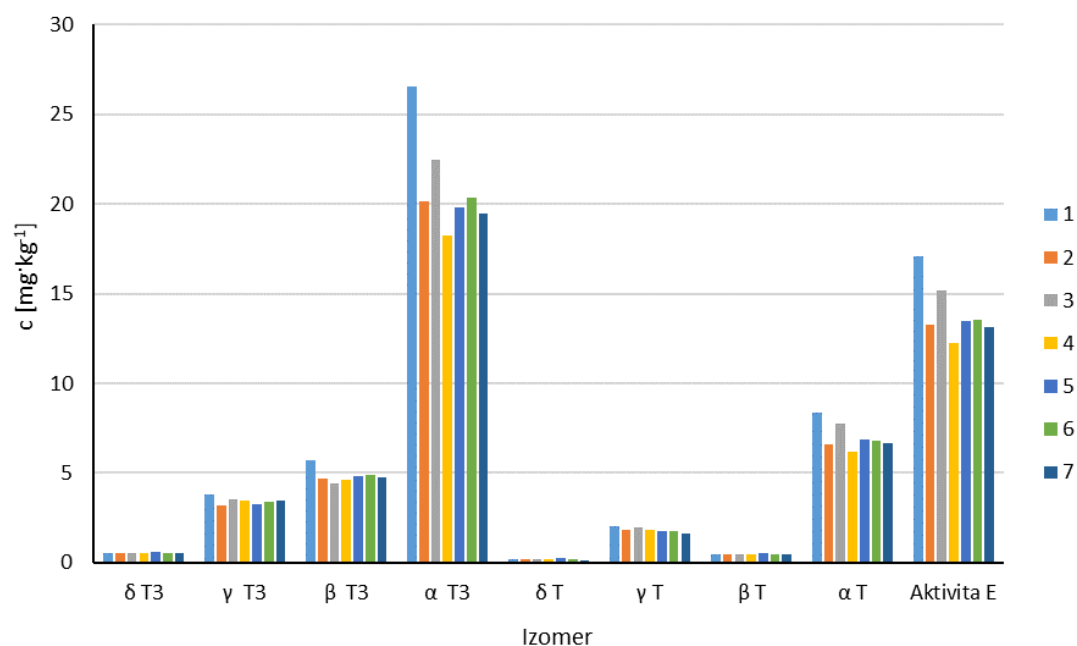
Obrázek 11: Obsahy jednotlivých izomerů a celkové aktivity v neplazmovaném ječmeni

Z obrázku 12 můžeme vidět, že nejvyšší obsah vitamínu E byl zaznamenán u ječmene 1, který byl ošetřen fungicidním mořením, s hodnotou  $18,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Tento ječmen má zároveň nejvyšší obsah  $\alpha$ -tokotrienolu a  $\alpha$ -tokoferolu. Nejméně vitamínu E měl ječmen 4 ( $4,3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), který byl ošetřený nízkoteplotním plazmatem a biologicky mořen houbou *Trichoderma virens*. Obsah  $\alpha$ -tokotrienolu je nižší, než udává TIWARI a CUMMINS [40] a CAVALLERO, GIANINETTI, FINOCCHIARO, DELOGU, STANCA [38].

#### 4.4.1.2 Slad neplazmovaný vyrobený z neplazmovaného ječmene

Tabulka 11: Obsahy jednotlivých izomerů a celkové aktivity v neplazmovaném sladu vyrobeného z neplazmovaného ječmene

ošetření	Obsah [ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]								
	$\delta\text{-T3}$	$\gamma\text{-T3}$	$\beta\text{-T3}$	$\alpha\text{-T3}$	$\delta\text{-T}$	$\gamma\text{-T}$	$\beta\text{-T}$	$\alpha\text{-T}$	Aktivita E
1	0,6	3,8	5,7	26,6	0,2	2,0	0,5	8,4	17,1
2	0,5	3,2	4,7	20,2	0,2	1,8	0,5	6,6	13,3
3	0,5	3,5	4,4	22,4	0,2	2,0	0,5	7,8	15,2
4	0,5	3,5	4,6	18,2	0,2	1,8	0,5	6,2	12,3
5	0,6	3,3	4,8	19,8	0,2	1,8	0,5	6,9	13,5
6	0,5	3,4	4,9	20,4	0,2	1,8	0,5	6,8	13,6
7	0,5	3,5	4,7	19,5	0,2	1,6	0,4	6,7	13,2



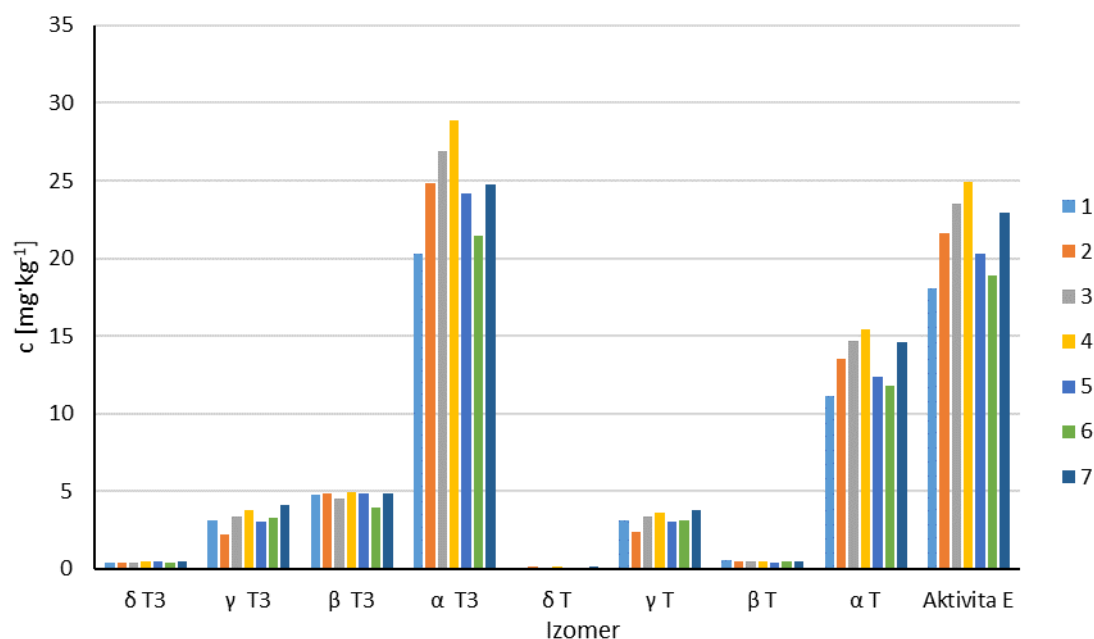
Obrázek 12: Obsahy jednotlivých izomerů a celkové aktivity v neplazmovaném sladu vyrobeného z neplazmovaného ječmene

V neplazmovaném sladu z neplazmovaného ječmene byl také nejvyšší obsah vitamínu E u ošetření 1 s hodnotou  $17,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Nejméně vitamínu obsahoval slad 4 ( $12,3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), ošetřený plazmatem a houbou *Trichoderma virens*.

#### 4.4.1.3 Slad plazmovaný vyrobený z neplazmovaného ječmene

Tabulka 12: Obsahy jednotlivých izomerů a celkové aktivity v plazmovaném sladu vyrobeného z neplazmovaného ječmene

ošetření	Obsah [ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]								
	$\delta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\beta$ -T3	$\alpha$ -T3	$\delta$ -T	$\gamma$ -T	$\beta$ -T	$\alpha$ -T	Aktivita E
1	0,4	3,1	4,8	20,3	0,1	3,1	0,6	11,1	18,0
2	0,4	2,2	4,8	24,9	0,1	2,3	0,5	13,5	21,6
3	0,4	3,4	4,5	26,9	0,1	3,4	0,4	14,7	23,5
4	0,5	3,8	5,0	28,9	0,1	3,6	0,5	15,4	24,9
5	0,4	3,1	4,8	24,1	0,1	3,1	0,4	12,3	20,3
6	0,4	3,3	4,0	21,4	0,1	3,1	0,4	11,8	18,9
7	0,5	4,1	4,9	24,8	0,1	3,8	0,5	14,6	22,9



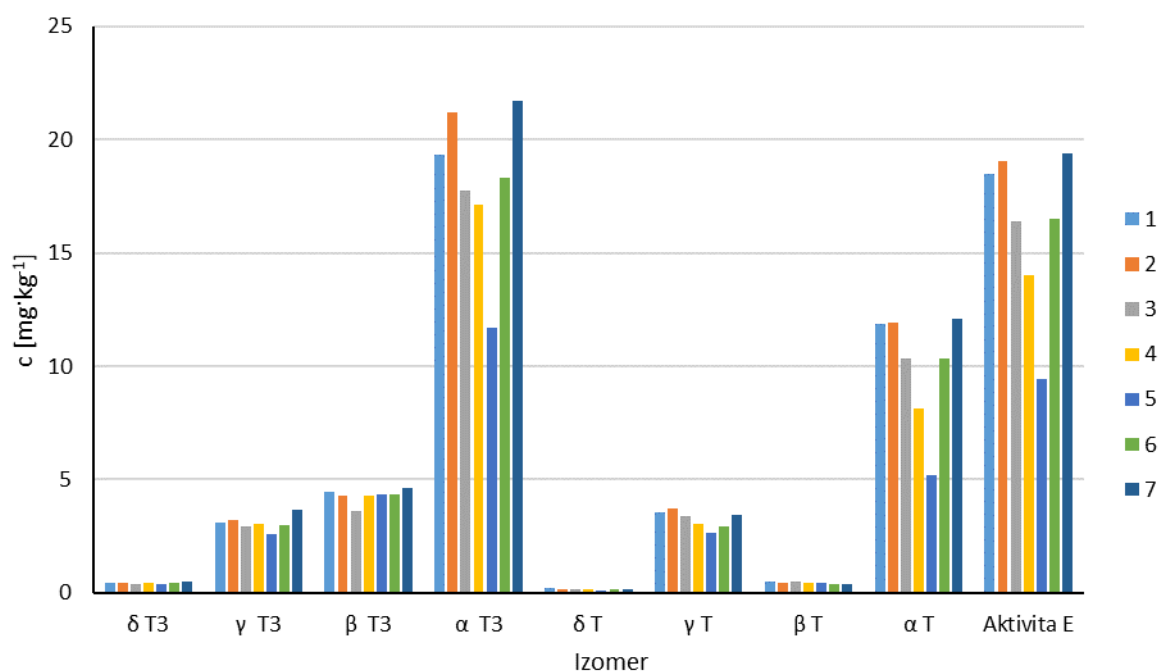
Obrázek 13: Obsahy jednotlivých izomerů a celkové aktivity v plazmovaném sladu vyrobeného z neplazmovaného ječmene

Slad, který byl ošetřen plazmovým výbojem, z neplazmovaného ječmene má hodnoty v rámci jednotlivých izomerů srovnatelné. Například  $\alpha$ -tokoferol je v rozmezí 11-16  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  a  $\alpha$ -tokotrienol v rozmezí 20-29  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Nejvíce vitamínu E má slad 4 (24,9  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), který byl ošetřený nízkoteplotním plazmatem a biologicky mořen houbou *Trichoderma virens*. Nejméně má slad 1 (18,0  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), který byl ošetřen chemickým mořením.

#### 4.4.1.4 Plazmovaný ječmen

Tabulka 13: Obsahy jednotlivých izomerů a celkové aktivity v plazmovaném ječmeni

ošetření	Obsah [ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]								
	$\delta\text{-T3}$	$\gamma\text{-T3}$	$\beta\text{-T3}$	$\alpha\text{-T3}$	$\delta\text{-T}$	$\gamma\text{-T}$	$\beta\text{-T}$	$\alpha\text{-T}$	Aktivita E
1	0,4	3,1	4,4	19,4	0,2	3,5	0,5	11,8	18,5
2	0,4	3,2	4,3	21,2	0,2	3,7	0,5	11,9	19,1
3	0,4	3,0	3,6	17,7	0,1	3,4	0,5	10,3	16,4
4	0,5	3,1	4,3	17,1	0,2	3,1	0,4	8,2	14,0
5	0,4	2,6	4,4	11,7	0,1	2,6	0,5	5,2	9,4
6	0,5	3,0	4,3	18,3	0,2	2,9	0,4	10,3	16,5
7	0,5	3,6	4,6	21,7	0,1	3,4	0,4	12,1	19,4



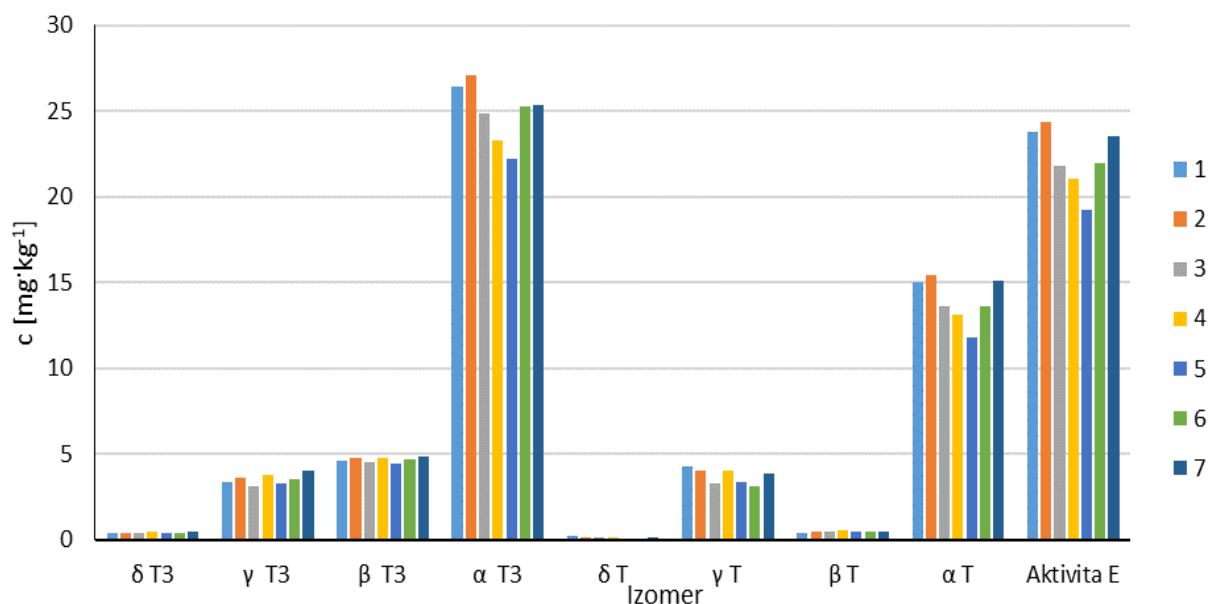
Obrázek 14: Obsahy jednotlivých izomerů a celkové aktivity v plazmovaném ječmeni

Hodnota vitamínu E se u plazmovaného ječmene pohybuje kolem  $15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Nejvíce je zastoupen v ječmeni 7 ( $19,4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), ošetřeném houbou *Metarhizium anisopliae*. Nejméně v ječmeni 5 ( $9,4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), ošetřeném plazmatem a houbou *Metarhizium anisopliae*.

#### 4.4.1.5 Slad plazmovaný vyrobený z plazmovaného ječmene

Tabulka 14: Obsahy jednotlivých izomerů a celkové aktivity v plazmovaném sladu vyrobeného z plazmovaného ječmene

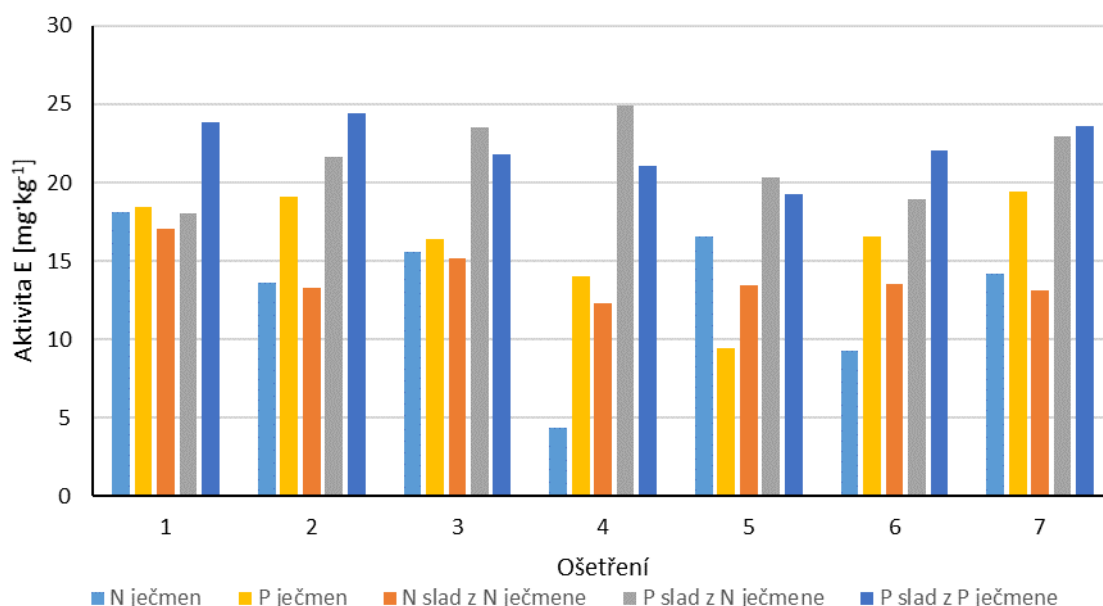
ošetření	Obsah [ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]								
	$\delta\text{-T3}$	$\gamma\text{-T3}$	$\beta\text{-T3}$	$\alpha\text{-T3}$	$\delta\text{-T}$	$\gamma\text{-T}$	$\beta\text{-T}$	$\alpha\text{-T}$	Aktivita E
1	0,4	3,4	4,6	26,4	0,2	4,3	0,4	15,0	23,8
2	0,4	3,6	4,8	27,1	0,1	4,1	0,5	15,4	24,4
3	0,4	3,1	4,5	24,8	0,2	3,3	0,5	13,6	21,8
4	0,5	3,8	4,8	23,3	0,1	4,0	0,5	13,2	21,1
5	0,4	3,3	4,4	22,3	0,1	3,4	0,5	11,8	19,3
6	0,4	3,5	4,7	25,3	0,1	3,1	0,4	13,7	22,0
7	0,5	4,1	4,9	25,4	0,2	3,9	0,5	15,1	23,6



Obrázek 15: Obsahy jednotlivých izomerů a celkové aktivity v plazmovaném sladu vyrobeného z plazmovaného ječmene

Slad ošetřený plazmatem vytvořený z plazmovaného ječmene má obsah vitamínu E v rozmezí  $19\text{-}25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Obsah  $\alpha$ -tokotrienolu se pohybuje kolem  $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  a  $\alpha$ -tokoferolu kolem  $13\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Nejvíce vitamínu E obsahuje slad 2, který nebyl ničím mořený (kontrolní vzorek), nejméně pak slad 5 ošetřený plazmatem a houbou *Metarhizium anisopliae*.

#### 4.4.1.6 Aktivita vitaminu E



Obrázek 16: Srovnání aktivit plazmovaných a neplazmovaných vzorků ječmene a sladu při různém ošetření

Při srovnání neplazmovaného a plazmovaného ječmene můžeme vidět trend, kdy plazmovaný ječmen má vyšší obsah vitaminu E než ječmen neošetřený plazmou. Neplazmovaný slad vytvořený z neplazmovaného ječmene má obsah vitaminu E mezi 12-17 mg·kg<sup>-1</sup>. U plazmovaného sladu z neplazmovaného ječmene je tato hodnota mezi 18-25 mg·kg<sup>-1</sup>. Plazmovaný slad vytvořený z plazmovaného ječmene má srovnatelné rozmezí hodnot obsahů vitaminu E, 19-25 mg·kg<sup>-1</sup>. Lze pozorovat, že použití nízkoteplotního plazmatu obsah vitaminu E nesnižuje, naopak mírně zvyšuje. Také lze pozorovat, že při tvorbě sladu z ječmene narůstá obsah vitaminu E, může to být způsobeno biochemickými procesy při klíčení. U ošetření 4 a 5, což je ošetření kombinací plazmatu a hub, je vidět největší kolísání obsahu vitaminu E.

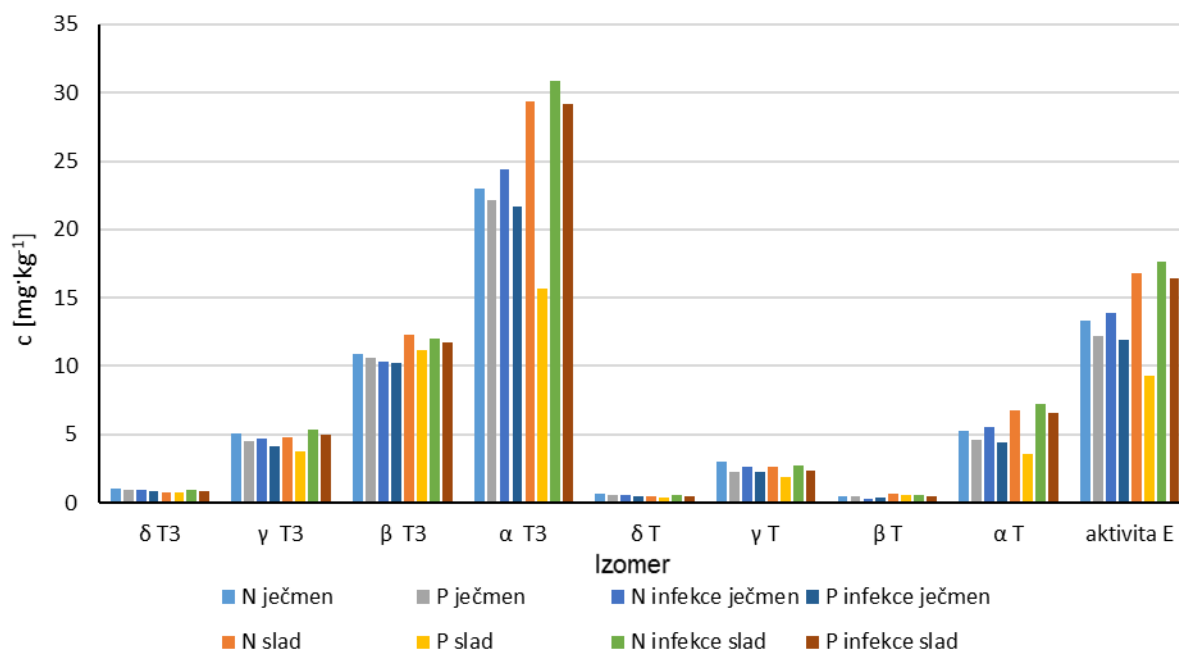


## 4.4.2 Umělá infekce

### 4.4.2.1 Umělá infekce u ječmene

Tabulka 15: Obsahy jednotlivých izomerů a celkové aktivity v ječmeni a z něj vyrobeného sladu v plazmovaných a neplazmovaných vzorcích při umělé infekci

ošetření		Obsah [ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]								
		$\delta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\beta$ -T3	$\alpha$ -T3	$\delta$ -T	$\gamma$ -T	$\beta$ -T	$\alpha$ -T	aktivita E
<b>ječmen</b>										
N	kontrola	1,0	5,1	10,9	23,0	0,6	3,0	0,5	5,3	13,3
P	kontrola	1,0	4,6	10,6	22,1	0,5	2,3	0,5	4,6	12,2
N	infekce	0,9	4,7	10,3	24,4	0,5	2,6	0,3	5,6	13,9
P	infekce	0,9	4,2	10,2	21,7	0,5	2,2	0,4	4,4	11,9
<b>slad</b>										
N	kontrola	0,8	4,8	12,3	29,4	0,5	2,6	0,6	6,8	16,8
P	kontrola	0,7	3,8	11,2	15,7	0,4	1,9	0,6	3,5	9,3
N	infekce	0,9	5,3	12,0	30,9	0,5	2,8	0,6	7,2	17,6
P	infekce	0,9	5,0	11,7	29,2	0,5	2,4	0,5	6,5	16,4



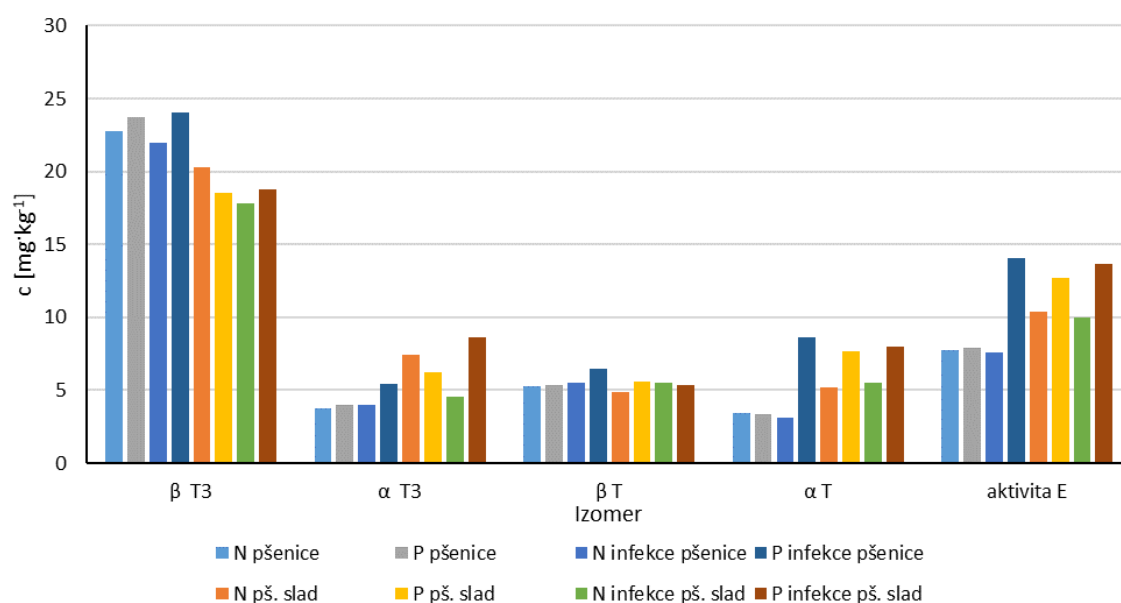
Obrázek 17: Obsahy jednotlivých izomerů a celkové aktivity u ječmene a sladu

Ve srovnání s literaturou TIWARI a CUMMINS [40], CAVALLERO, GIANINETTI, FINOCCHIARO, DELOGU, STANCA [38] a PANFILI, FRATIANNI a IRANO [36] je vidět vyšší obsah izomeru  $\beta$ -tokotrienolu, naopak snížený obsah  $\alpha$ -tokoferolu a  $\alpha$ -tokotrienolu, což při zohlednění biologické aktivity jednotlivých izomerů způsobilo celkové mírné snížení aktivity vitamínu E.

#### 4.4.2.2 Umělá infekce u pšenice

Tabulka 16: Obsahy jednotlivých izomerů a celkové aktivity v pšenici a z ní vyrobeného sladu v plazmovaných a neplazmovaných vzorcích při umělé infekci

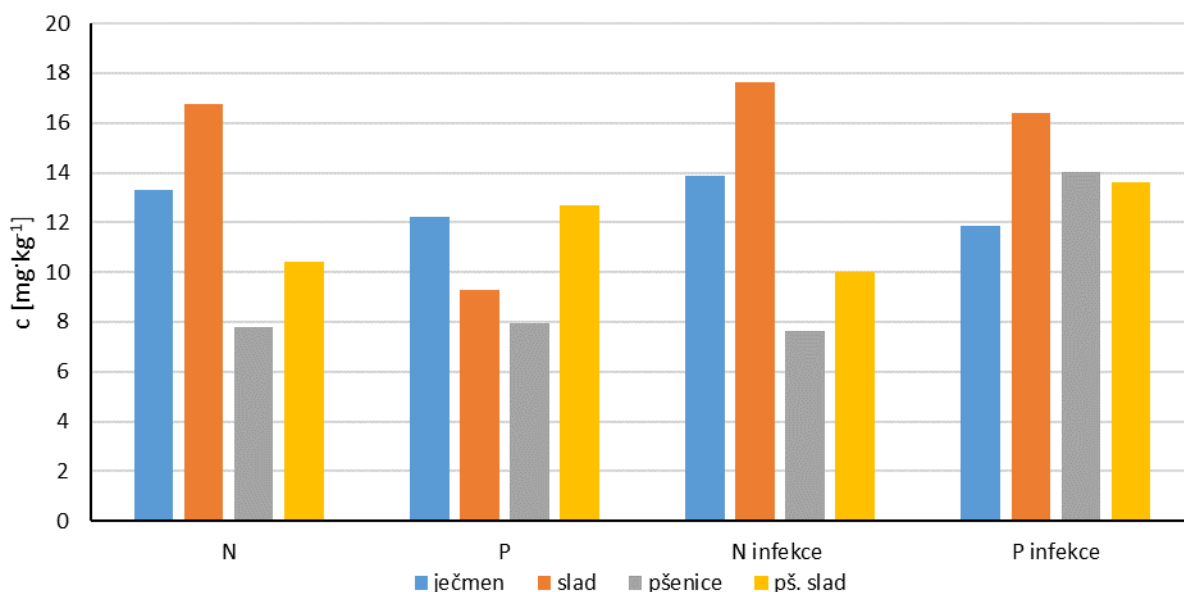
		Obsah [ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]					
ošetření		$\delta\text{-T3}$	$\beta\text{-T3}$	$\alpha\text{-T3}$	$\beta\text{-T}$	$\alpha\text{-T}$	aktivita E
<b>pšenice</b>							
N	kontrola	0,1	22,8	3,7	5,3	3,4	7,8
P	kontrola	0,1	23,7	4,0	5,4	3,4	7,9
N	infekce	0,1	22,0	4,0	5,5	3,1	7,6
P	infekce	0,1	24,0	5,4	6,5	8,6	14,0
<b>pšeničný slad</b>							
N	kontrola	0,1	20,3	7,4	4,9	5,2	10,4
P	kontrola	0,1	18,6	6,3	5,6	7,7	12,7
N	infekce	0,1	17,8	4,6	5,5	5,6	10,0
P	infekce	0,1	18,8	8,6	5,4	8,0	13,6



Obrázek 18: Obsahy jednotlivých izomerů a celkové aktivity v pšenici a pš. sladu

Ve srovnání s HIDALGO, BRANDOLINI, POMPEI a PISCOZZI [39] a PANFILI, FRATIANNI a IRANO [36] je velice snížený obsah  $\alpha$ -tokoferolu a  $\beta$ -tokotrienolu. Celková aktivita vitamínu E je kvůli nízkému obsahu  $\alpha\text{-T}$  také snižena. Pšenice nemá všech 8 izomerů, jak je tomu u ječmene, má pouze 4 izomery ( $\alpha$ - a  $\beta$ -tokoferol a  $\alpha$ - a  $\beta$ -tokotrienol) [36, 41]. Lze vidět, že u pšenice je nejvyšší obsah izomeru  $\beta$ -tokotrienolu.

#### 4.4.2.3 Srovnání aktivit u ječmene a pšenice



Obrázek 19: Porovnání obsahů aktivit vitamínu E v ječmeni, ječném sladu, pšenici a pšeničném sladu; P znamená plazmovaná zrna, N neplazmovaná.

Obsah vitamínu E u ječmene jak plazmovaného, neplazmovaného či infikovaného se pohybují mezi 12-14 mg·kg<sup>-1</sup>. Je zde nepatrný trend, že plazmovaný ječmen má nižší obsah vitamínu E než neplazmovaný, ale nijak významně.

U ječného sladu je trend podobný, avšak kontrolní plazmovaný slad má skoro 2x méně obsahu vitamínu E než kontrolní neplazmovaný slad. Dokonce má nižší obsah vitamínu E než ječmen, z něhož byl sladován. Infikovaný neplazmovaný slad má nevyšší obsah vitamínu E, může to být způsobeno tím, že rostlina reagovala na infekci (stres) tvorbou tokoferolů a tokotrienolů, především  $\alpha$ -izomery. Obsah vitamínu E u ječného sladu se pohybuje mezi 16-18 mg·kg<sup>-1</sup>, kromě kontrolního plazmovaného sladu, ten obsahuje 9,3 mg·kg<sup>-1</sup>.

U vzorků kontrolní pšenice je obsah srovnatelný pro neplazmovanou i plazmovanou pšenici kolem 8 mg·kg<sup>-1</sup>. Infikovaná plazmovaná pšenice má vyšší obsah vitamínu E (14 mg·kg<sup>-1</sup>) než kontrolní pšenice i infikované neplazmované pšenice.

U sladu ze pšenice jsou obsahy vitamínu E vyšší o 2-4 mg·kg<sup>-1</sup> u plazmovaných vzorků než u neplazmovaných. U pšeničného sladu jsou hodnoty vitamínu E vyšší než u samotné pšenice, výjimku tvoří infikovaný plazmovaný pšeničný slad, který má hodnoty srovnatelné se stejně ošetřenou pšenicí.

## 5 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo stanovit obsah vitamínu E ve vzorcích ječmene, pšenice a ječného a pšeničného sladu. Zrna byla podrobena různým způsobům ošetření, za účelem eliminace růstu plísní a výskytu mykotoxinů. Jednalo se o ošetření chemické, ošetření biologické – příznivými druhy hub a ošetření výbojem nízkoteplotního plazmatu. Vybrané vzorky ječmene, pšenice a pšeničného a ječného sladu pocházely z polního pokusu, kdy byla rostlina v době kvetení na poli uměle infikována plísní rodu *Fusarium*.

Z uvedených výsledků je zřejmé, že ošetření vzorků nízkoteplotním plazmatem nijak významně nesnižuje obsah vitamínu E. Při sladování se obsah vitamínu E zvyšuje, může to být způsobeno biochemickými procesy při klíčení zrna.

U ječmene bylo naměřeno všech 8 izomerů. Nejvyšší obsah vitamínu E byl zjištěn u plazmovaného ječmene, který byl následně ošetřený houbou *Metarhizium anisopliae* ( $19,4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). Největší výkyvy v obsahu vitamínu E byly u současného ošetření plazmatem a houbami. Plazmované slady měly srovnatelné hodnoty v rozmezí  $18\text{-}25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ .

Pšenice neobsahuje všech 8 izomerů, ale pouze 4 ( $\alpha$ -,  $\beta$ -tokoferol a  $\alpha$ -,  $\beta$ -tokotrienol), navíc má nejvyšší obsah  $\beta$ -tokotrienolu, u ječmene převládá  $\alpha$ -tokotrienol. Nejvyšší obsah vitamínu E byl zaznamenán u uměle infikované a plazmované pšenice a z ní připraveného sladu. Je možné, že plazmový výboj vyvolá u pšenice a sladu biochemické pochody k vyšší tvorbě vitamínu E.

Lze konstatovat, že ani žádný z použitých způsobů ošetření zrna ječmene, pšenice a z nich vyrobeného sladu významně nesnižuje obsah přítomných zdravotně významných látek a tím další případné využití ve sladařském, potravinářském či krmivářském průmyslu.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] HLÚBIK, P. a L. OPLTOVÁ. *Vitaminy*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2004, 232 s. ISBN 80-247-0373-4.
- [2] MCLAUGHLIN, P. J. a J. L. WEIHRAUCH. Vitamin E content of foods. *Journal of the American Dietetic Association*. 1979, **1979**(75), 647.
- [3] HOSMANOVÁ, R. a M. DOUŠA. HPLC stanovení obsahu vitamínu E v krmných surovinách, krmivech a potravinách. *Chemické listy* [online]. 2007, **2007**(101), 578-583. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007\\_07\\_578-583.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007_07_578-583.pdf)
- [4] ABIDI, S.L. Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants. *Journal of Chromatography A*. 2000, **2000**(881), 197-216.
- [5] PREEDY, V. R. a R. R. WATSON. *The encyclopedia of vitamin E*. Wallingford, Oxon, UK ; Cambridge, MA: CABI, c2007. ISBN 978-184-5930-752.
- [6] VÁVROVÁ, J. *Vitaminy a stopové prvky 2007*. Pardubice: SEKK, 2007. ISBN 978-80-254-1171-1.
- [7] MINDELL, E. a H. MUNDIS. *Nová vitaminová bible: nejnovější informace o vitamínech, minerálních látkách, antioxidantech, léčivých rostlinách, o doplňcích stravy, léčebných účincích potravin i lécích používaných v homeopatii*. Vyd. 2., (dopl., přeprac.). V Praze: Ikar, 2006. ISBN 80-249-0744-5.
- [8] UNGER-GÖBEL, U. *Vitaminy: účinné látky, podporující zdraví : [všechno, co musíte vědět o vitamínech, včetně údajů o jejich hodnotách v důležitých potravinách]*. Praha: Ikar, 1999. Kompas (Ikar). ISBN 80-720-2508-2.
- [9] *Potravinové tabulky*. Praha: SRV, 1992. 69 s.
- [10] SUBASREE, S. Role of Vitamin C and Vitamin E in Health and Disease. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* [online]. 2014, vol. 6, no. 1, s. 52-55. ISSN 0975-1459. Dostupné z: <https://mv.ezproxy.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/docview/1506445330?accountid=17115>
- [11] FRAGNER, J. *Vitaminy, jejich chemie a biochemie*. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1961.
- [12] BASAŘOVÁ, G. *Sladařství: teorie a praxe výroby sladu*. Praha: Havlíček Brain Team, 2015. ISBN 978-80-87109-47-2.
- [13] BAXTER, J. G., C. D. ROBESON, J. D. TAYLOR a R. W. LEHMAN. Natural  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -Tocopherols and Certain Esters of Physiological Interest 1. *Journal of the American Chemical Society*. 1943, **65**(5), 918-924. DOI: 10.1021/ja01245a041. ISSN 0002-7863. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja01245a041>
- [14] PROCHÁZKA, S. *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia, 1998. ISBN 80-200-0586-2.

- [15] BENDA, V., I. BABŮREK a J. ŽĎÁRSKÝ. *Biologie II: nauka o potravinářských surovinách*. Vyd. 3., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2000, 196 s. ISBN 80-708-0402-5.
- [16] BASAŘOVÁ, G. a J. ČEPIČKA. *Sladařství a pivovarství*. 1985. Praha: SNTL, 1985.
- [17] KOPLÍK, R. Přednášky. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. Praha [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: [https://web.vscht.cz/~koplíkr/2\\_Cere%  
c3%a1lie.pdf](https://web.vscht.cz/~koplíkr/2_Cere%c3%a1lie.pdf)
- [18] DYR, J. a I. HAUZAR. *Chemie a technologie sladu a piva: určeno pro posluchače fak. potravinářské technologie*. Praha: SNTL, 1961. Učební texty vysokých škol.
- [19] MOŠTEK, J. *Sladařství: Biochemie a technologie sladu*. Praha: SNTL, 1975. Řada potravinářské literatury.
- [20] ZIMOLKA, J. *Ječmen - formy a užitkové směry v České republice*. Praha: Profi Press, 2006. ISBN 80-867-2618-5.
- [21] ZIMOLKA, J. *Pšenice: pěstování, hodnocení a užití zrna*. Praha: Profi Press, c2005. ISBN 80-867-2609-6.
- [22] BUREŠOVÁ, I. a E. LORENCOVÁ. *Výroba potravin rostlinného původu: zpracování obilovin*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2013. ISBN 978-80-7454-278-7.
- [23] BULKOVÁ, V. *Rostlinné potraviny*. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2011. ISBN 978-80-7013-532-7.
- [24] KŘEN, J., L. NEUDERT, B. PROCHÁZKOVÁ, V. SMUTNÝ a J. HŮLA. *Obecná produkce rostlinná*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2015. ISBN 978-80-7509-325-7.
- [25] Hazmat Protect 2016: sborník abstraktů : 2. ročník mezinárodní konference o ochraně proti CBRN látkám = book of abstracts : 2nd international conference on CBRN protection : 9.-11.11.2016, SÚJCHBO, v.v.i., Kamenná, Česká republika. Milín: Státní ústav jaderné, chemické a biologické ochrany, 2016. ISBN 978-80-270-0474-4.
- [26] VAZDOVÁ, P., F. LÁD, P. KŘÍŽ, Z. HAVELKA a K. PEJCHOVÁ. Monitoring of changes in nutritional value of grains after treatment with low-temperature plasma discharge. In: *NutriNET*. Nitra, 2013, s. 163-164. ISBN 978-80-552-1065-0.
- [27] BENEŠOVÁ, K., S. BĚLÁKOVÁ, I. HARTMAN, P. BARTOŠ, P. KŘÍŽ, H. KÁBELOVÁ, Z. HAVELKA a A. BOHATÁ. Determination of vitamin E content in barley and malt after treatment with low-temperature plasma discharge. *Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiral 2016: book of abstracts and program : Olomouc, June 6th-9th, 2016*. Olomouc: Palacký University Olomouc, 2016, s. 75-76. ISBN 978-80-244-4961-6.
- [28] TIAGO, P. V., N. T. de OLIVEIRA a E. Á. de L. A. LIMA. Biological insect control using *Metarhizium anisopliae*: morphological, molecular, and ecological aspects. *Ciência Rural* [online]. 2014, **44**(4), 645-651 [cit. 2017-04-26]. DOI: 10.1590/S0103-

84782014000400012. ISSN 0103-8478. Dostupné z:  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext)

- [29] BUCHTOVÁ, H. *Průmyslové technologie II*. Ústí nad Labem: Univerzita J.E. Purkyně v Ústí nad Labem, Fakulta životního prostředí, 2014. ISBN 978-80-7414-802-6.
- [30] NOVÁKOVÁ, L. a M. DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [31] Direct Industry. In: *Direct Industry* [online]. 2017 [cit. 2017-04-02]. Dostupné z: <http://www.directindustry.com/prod/dionex/product-28284-401414.html>
- [32] ČSN EN 12822. *Potraviny - Stanovení vitaminu E metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie - Měření  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - a  $\delta$ -tokoferolu*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2015.
- [33] HARTMAN, I. Quality of malting barley from harvest 2013 in the Czech Republic. *Kvasný Průmysl* [online]. 2015-3-1, **61**(3), 69-74 [cit. 2017-04-26]. DOI: 10.18832/kp2015011. ISSN 00235830. Dostupné z: <http://kvasnyprumysl.cz/doi/10.18832/kp2015011.html>
- [34] HIDALGO, A. a A. BRANDOLINI. Protein, ash, lutein and tocopherols distribution in einkorn (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) seed fractions. *Food Chemistry*. 2008, **2008**(107), 444-448.
- [35] HEJTMÁNKOVÁ, K., J. LACHMAN, A. HEJTMÁNKOVÁ, V. PIVEC a D. JANOVSÁ. Tocopherols of selected spring wheat (*Triticum aestivum* L.), einkorn wheat (*Triticum monococcum* L.) and wild emmer (*Triticum dicoccum* Schuebl [Schrank]) varieties. *Food Chemistry*. 2010, **2010**(123), 1267-1274.
- [36] PANFILI, G., A. FRATIANNI a M. IRANO. Normal Phase High-Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2003, **51**(14), 3940-3944 [cit. 2017-04-06]. DOI: 10.1021/jf030009v. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf030009v>
- [37] PANFILI, G., A. FRATIANNI, T. DI CRISCIO a E. MARCONI. Tocopherol and  $\beta$ -glucan levels in barley varieties and in pearling by-products. *Food Chemistry* [online]. 2008, **107**(1), 84-91 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.07.043. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607007443>
- [38] CAVALLERO, A., A. GIANINETTI, F. FINOCCHIARO, G. DELOGU a A. M. STANCA. Tocopherols in hull-less and hulled barley genotypes grown in contrasting environments. *Journal of Cereal Science* [online]. 2004, **39**(2), 175-180 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1016/S0733-5210(03)00072-9. ISSN 07335210. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521003000729>
- [39] HIDALGO, A., A. BRANDOLINI, C. POMPEI a R. PISCOZZI. Carotenoids and tocopherols of einkorn wheat (*Triticum monococcum* ssp. *monococcum* L.). *Journal of*

- Cereal Science* [online]. 2006, **44**(2), 182-193 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1016/j.jcs.2006.06.002. ISSN 07335210. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521006000786>
- [40] TIWARI, U. a E. CUMMINS. Nutritional importance and effect of processing on tocopherols in cereals. *Trends in Food Science* [online]. 2009, **20**(11-12), 511-520 [cit. 2017-04-11]. DOI: 10.1016/j.tifs.2009.06.001. ISSN 09242244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224409002039>
- [41] PIIRONEN, V., E.-L. SYVAOJA, P. VARO, K. SALMINEN a P. KOIVISTOINEN. Tocopherols and Tocotrienols in Cereal Products from Finland. *Cereal chemistry* [online]. 1986, **1986**(63), 78-82 [cit. 2017-04-15]. Dostupné z: [http://www.aaccnet.org/publications/cc/backissues/1986/Documents/chem63\\_78.pdf](http://www.aaccnet.org/publications/cc/backissues/1986/Documents/chem63_78.pdf)
- [42] DO, T. D. T., D. COZZOLINO, B. MUHLHAUSLER, A. BOX a A. J. ABLE. Antioxidant capacity and vitamin E in barley: Effect of genotype and storage. *Food Chemistry*. 2015, **187**, 65-74. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.04.028. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615005749>
- [43] EHRENBERGEROVÁ, J., H. PLUHÁČKOVÁ, M. BRADÁČOVÁ, N. BŘEZINOVÁ BELCREDI, K. BENEŠOVÁ a K. VACULOVÁ. Changes in vitamin E content and activity as a response to abiotic stress in spring barley varieties. *Kvasny Prumysl*. 2011-7-1, **57**(7), 196-202. DOI: 10.18832/kp2011018. ISSN 00235830. Dostupné také z: <http://kvasnyprumysl.cz/doi/10.18832/kp2011018.html>
- [44] DABINA-BICKA, I., D. KARKLINA a Z. KRUMA. Polyphenols and vitamin E as potential antioxidants in barley and malt. *Foodbalt* [online]. 2011 [cit. 2017-04-20]. Dostupné z: <http://llufb.llu.lv/conference/foodbalt/2011/FOODBALT-Proceedings-2011-121-126.pdf>