

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Chemická charakterizace šalotky

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Věra Dosedělová
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
Rok:	2018

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Chtěla bych poděkovat doc. RNDr. Petru Tarkowskému, Ph.D. a Mgr. Tiboru Béresovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a cenné rady. Práce byla uskutečněna v rámci grantového projektu IGA (IGA_PrF_2018_033).

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Věra Dosedělová
Název práce	Chemická charakterizace šalotky
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Cibule šalotka (*Allium cepa* var. *aggregatum* L.) je významná pro svou chuť a řadu zdraví prospěšných účinků. Tyto vlastnosti jsou závislé na chemickém složení, které je ovlivňováno různými faktory. Fruktan- β -(2,1)-fruktosidasa (EC 3.2.1.153) hydrolyzuje terminální fruktosu z fruktanového řetězce. Screening metabolitů byl proveden v 87 kultivarech cibule šalotky a 3 kultivarech cibule kuchyňské (*Allium cepa* L.) ze dvou vegetačních období, 2016 a 2017. Glukosidy kvercetinu a malé sacharidy byly analyzovány HPLC, naopak fruktany byly kvantifikovány pomocí spektrofotometrické metody. Dále byly srovnány tři spektrofotometrické metody a HPLC pro určení enzymové aktivity. V šalotce byly stanoveny hladiny kvercetin-3,4'-O-diglukosidu (218-948 mg \cdot 100 g⁻¹ DW), kvercetin-4'-O-glukosidu (45-253 mg \cdot 100 g⁻¹ DW), sacharosy (8-18 mg \cdot 100 mg⁻¹ DW), glukosy (pod mezí detekce až 10 mg \cdot 100 mg⁻¹ DW), fruktosy (4-16 mg \cdot 100 mg⁻¹ DW) a fruktanů (21-55 mg \cdot 100 mg⁻¹ DW). Obsah analytů s výjimkou sacharosy byl mezi dvěma roky signifikantně odlišný. Na základě měření obsahu malých sacharidů a fruktanů byly vybrány sladké kultivary vhodné k okamžité konzumaci a kultivary vhodnější pro dlouhodobému skladování. Ve srovnání s cibulí bylo množství kvercetin-3,4'-O-diglukosidu v šalotce vyšší, sacharosy a glukosy nižší. HPLC metoda stanovení enzymové aktivity fruktan- β -(2,1)-fruktosidasy a metoda spektrofotometrická (založená na spřažených enzymových reakcích) byly nejvhodnější pro měření enzymové aktivity, která by mohla být využita ke stanovení konce dormance.

Klíčová slova	Cibule, šalotka, flavonoidy, malé sacharidy, fruktany, fruktan- β -(2,1)-fruktosidasa
Počet stran	92
Počet příloh	3
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Věra Dosedělová
Title	Chemical characterization of shallot
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
The year of presentation	2018

Abstract

Shallot (*Allium cepa* var. *aggregatum* L.) is important for its taste and many health benefits. These properties are dependent on a chemical composition that is influenced by various factors. Fructan exohydrolase (EC 3.2.1.153) hydrolyses terminal fructose from fructan chain. Metabolite screening was performed in 87 shallot cultivars and 3 onion cultivars (*Allium cepa* L.) from two growing seasons, 2016 and 2017. Quercetin glucosides and simple carbohydrates were determined by HPLC. On the contrary, fructans were quantified by the spectrophotometric method. In addition, three spectrophotometric methods and HPLC were compared for assessment of the enzyme activity. The levels of quercetin 3,4'-O-diglucoside (218-948 mg·100 g⁻¹ DW), quercetin 4'-O-glucoside (45-253 mg·100 g⁻¹ DW), sucrose (8-18 mg·100 mg⁻¹ DW), glucose (below the limit of detection to 10 mg·100 mg⁻¹ DW), fructose (4-16 mg·100 mg⁻¹ DW) and fructans (21-55 mg·100 mg⁻¹ DW) were determined in shallot. The analyte content except for glucose was significantly different between two years. Based on the amount of simple carbohydrates and fructans, the sweet cultivars suitable for immediate consumption and the cultivars more suitable for long-term storage were chosen. Shallot in comparison with onion had higher amount of quercetin 3,4'-O-diglucoside, lower amounts of sucrose and glucose. The HPLC method for determination fructan exohydrolase activity and the spectrophotometric method (based on the coupled enzyme assay) were the most suitable for measurement of the enzyme activity, which could be used to determine the end of dormancy.

Keywords	Onion, shallot, flavonoids, simple carbohydrates, fructans, fructan exohydrolase
Number of pages	92
Number of appendices	3
Language	Czech

Obsah

1 ÚVOD	9
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	11
2.1 Rod česnek (<i>Allium</i>)	11
2.1.1 Cibule kuchyňská (<i>Allium cepa</i> L.)	11
2.1.1.1 Cibule (bulbus)	11
2.1.1.2 Biologická aktivita cibule kuchyňské	12
2.1.2 Cibule šalotka (<i>Allium cepa</i> var. <i>aggregatum</i> L.)	14
2.2 Flavonoidy	15
2.2.1 Chemická struktura a výskyt	15
2.2.1.1 Flavonoly	16
2.2.2 Biosyntéza flavonoidů a kvercetinu	17
2.2.3 Biologická aktivita v rostlinách	19
2.2.4 Flavonoidy v cibuli kuchyňské	20
2.2.5 Metody stanovení flavonoidů	21
2.3 Malé nestrukturní sacharidy	24
2.3.1 Výskyt, chemická struktura a vlastnosti	24
2.3.2 Metabolické dráhy malých sacharidů	25
2.3.2.1 Syntéza	25
2.3.2.2 Degradace	26
2.3.3 Biologická aktivita v rostlinách	27
2.3.4 Metody stanovení malých sacharidů	28
2.4 Fruktooligosacharidy a fruktany	31
2.4.1 Výskyt, chemická struktura a vlastnosti	31
2.4.1.1 Inulin a neosérie inulinu	32
2.4.1.2 Levan a neosérie levanu	33
2.4.1.3 Větvený fruktan	33
2.4.2 Biologická aktivita v rostlinách	34
2.4.3 Nestrukturní sacharidy v cibuli kuchyňské	34
2.4.4 Metody stanovení fruktooligosacharidů a fruktanů	36
2.5 Rostlinný metabolismus fruktooligosacharidů a fruktanů	38
2.5.1 Enzymy syntézy	38
2.5.2 Enzymy degradace	38
2.5.3 Posklizňový metabolismus cibule kuchyňské	39
2.5.4 Metody měření enzymové aktivity fruktan- β -(2,1)-fruktosidasy	40
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	42
3.1 Materiál	42
3.1.1 Chemikálie	42
3.1.2 Přístroje a pomůcky	43
3.1.3 Biologický materiál	44
3.2 Metody	46
3.2.1 Zpracování rostlinného materiálu	46
3.2.2 Analýza glukosidů kvercetinu HPLC-UV	46
3.2.3 Optimalizace odezvy detektoru ELSD	47
3.2.4 Analýza malých sacharidů HPLC-ELSD	47
3.2.5 Validace spektrofotometrického měření fruktanů	48
3.2.6 Spektrofotometrické měření fruktanů	49
3.2.7 Měření enzymové aktivity fruktan- β -(2,1)-fruktosidasy	51
3.2.7.1 Příprava enzymového extraktu	51

3.2.7.2 Enzymová esej.....	51
3.2.7.3 Kalibrační přímky D-fruktosy.....	51
3.2.7.4 Metoda 3,5-dinitrosalicylové kyseliny (DNS).....	52
3.2.7.5 Neokuproinová metoda.....	52
3.2.7.6 Kit pro stanovení D-fruktosy a D-glukosy.....	52
3.2.7.7 Metoda HPLC-ELSD.....	53
3.2.8 Statistické vyhodnocení.....	53
4 VÝSLEDKY.....	54
4.1 Metoda HPLC-UV stanovení glukosidů kvercetinu.....	54
4.2 Optimalizace odezvy ELSD.....	56
4.3 Metoda HPLC-ELSD stanovení malých sacharidů.....	57
4.4 Spektrofotometrická metoda stanovení fruktanů.....	59
4.5 Screening metabolitů v rostlinném materiálu.....	60
4.5.1 Obsahové látky v cibuli šalotce.....	60
4.5.2 Obsahové látky v cibuli kuchyňské.....	62
4.6 Enzymová aktivita fruktan- β -(2,1)-fruktosidasy.....	65
5 DISKUZE.....	70
6 ZÁVĚR.....	74
7 LITERATURA.....	75
8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	85
9 PŘÍLOHY.....	86

Cíle práce

1. Vypracování literární rešerše s klíčovými slovy: cibule, šalotka, flavonoidy, malé sacharidy, fruktany, fruktan- β -(2,1)-fruktosidasa
2. Srovnání flavonolů, malých sacharidů a fruktanů ve vybraných položkách šalotky z kolekce Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i.
3. Porovnání množství obsahových látek v šalotce mezi dvěma vegetačními obdobími
4. Porovnání množství obsahových látek v šalotce s cibulí
5. Volba vhodné metody stanovení enzymové aktivity fruktan- β -(2,1)-fruktosidasy

1 ÚVOD

Cibule kuchyňská (*Allium cepa* L.) a její poddruh cibule šalotka (*Allium cepa* var. *aggregatum* L.) mají významnou roli nejen v kulinářství pro svou unikátní chuť, ale také vykazují řadu zdraví prospěšných biologických aktivit, např. antioxidační, protizánětlivé, prebiotické, antimikrobiální nebo antimykotické. Zmíněné vlastnosti souvisí s chemickým složením cibule, kdy se především jedná o sloučeniny obsahující síru, fenolové sloučeniny (flavonoidy), saponiny nebo fruktany. Potravinu rostlinného původu obsahují nejen důležité živiny, ale také látky, které příznivě působí na lidský organismus nebo mají význam prevence vzniku onemocnění. Tato skupina látek se označuje jako fytochemikálie, kam patří i flavonoidy (Schreiner a Huyskens-Keil, 2006). Flavonoidy jsou významnou skupinou sekundárních metabolitů, která ochraňuje rostliny před UV zářením, parazity nebo patogeny. Flavonoly jsou podtřídou flavonoidů s největším významem. Hlavním flavonolem cibule i šalotky je kvercetin, který se nejčastěji vyskytuje ve formách 3,4'-O-diglukosidu a 4'-O-glukosidu. Primární metabolismus je důležitý pro růst a vývoj, respiraci nebo fotosyntézu. Malé rozpustné sacharidy se řadí mezi primární metabolity, které mají také význam v signálních drahách a ochraně rostlin proti abiotickému stresu. Cibule během růstu zásobního orgánu ukládá fruktosu případně glukosu ve formě fruktanů, kde jsou jednotlivé podjednotky spojeny vazbou β -fruktofuranosyl-fruktosa. Inulin a jeho neosérie jsou typem fruktanu, který je typický v cibuli. Fruktany rostlině slouží jako energetická rezerva a ochrana proti abiotickým stresům.

Genová banka Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i. je instituce zabývající se, mimo jiné, uchováváním a péčí o genetické zdroje rostlin, které zahrnují geny, kombinace genů nebo genotypů. Příkladem jsou semena, hlízy nebo jiné reprodukční části rostlin, které mohou být použity k vytvoření nových odrůd s výhodnějšími hospodářskými znaky, tj. zvýšená odolnost k chorobám, škůdcům nebo vlivům okolního prostředí. Významnou činností genové banky je hodnocení variability kolekcí pomocí popisných deskriptorů zahrnující morfologické, biologické a hospodářské znaky a cytologickou charakterizaci (počet chromozomů, ploidie). Morfologické znaky se týkají celkového vzhledu rostliny a jednotlivých částí (kořen, stonek, list, květ, květenství, plod, semeno). Biologické a hospodářské znaky popisují vegetační fáze růstu, kvetení nebo dozrávání semen, obsahové látky a odolnost vůči biotickým a abiotickým stresům. Popisná data jsou zaznamenána ve stupnici 0-9, kdy 0 znamená nepřítomnost znaku, 1 je nejnižší a 9

nejvyšší úroveň projevu znaku. Veškerá data jsou uložena v informačním systému genetických zdrojů rostlin České republiky GRIN Czech (Hýbl *et al.*, 2016). Cibule šalotka je v databázi popsána pomocí deskriptorů růstu, morfologie a fyziologie (GRIN Czech 1.9.1). Diplomová práce se zabývá screeningem vysokého počtu kultivarů šalotek ze dvou vegetačních období a obohacení databáze o chemickou analýzu, která je důležitá pro zjištění rozsahu variace jednotlivých komponent. Doplněná informace může sloužit spotřebitelům nebo výzkumným účelům jako nástroj při výběru vhodného kultivaru z hlediska výživové hodnoty, odolnosti proti vnějším vlivům nebo chuti.

Hladiny rostlinných metabolitů jsou silně ovlivňovány genetickými a environmentálními faktory, podmínkami transportu nebo uskladněním. Příkladem je inulin, který je během skladování hydrolyzován enzymem fruktan- β -(2,1)-fruktosidasa. Předpokládá se, že enzymová aktivita fruktan- β -(2,1)-fruktosidasy by mohla být využita k predikci konce dormance a hodnocení kvality cibulí. Část diplomové práce je zaměřena na výběr vhodné metody měření enzymové aktivity.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Rod česnek (*Allium*)

Zelenina rodu česnek (*Allium*) již několik století hraje významnou roli nejen v kulinářství pro svou chuť, ale i v tradiční medicíně pro řadu zdraví prospěšných účinků (Rivlin, 2001). Česnek je přirozeně distribuován po severní polokouli především v sezónně suchých oblastech. V rodu lze nalézt řadu ekonomicky významných druhů, např. cibuli kuchyňskou (*Allium cepa* L.), česnek kuchyňský (*Allium sativum* L.), cibuli zimní (*Allium fistulosum* L.), pór letní (*Allium ampeloprasum* L.) nebo pažitku pobřežní (*Allium schoenoprasum* L.; Friesen *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010).

Dnešní taxonomická klasifikace zařazuje rod česnek do řádu chřestotvaré (*Asparagales*), čeledi amarylkovité (*Amaryllidaceae*) a podčeledi česnekové (*Allioideae*; Chase *et al.*, 2009). Rod česnek, který je dále rozdělen do 15 podrodů a 72 sekcí, se s více jak 850 druhy řadí mezi nejrozsáhlejší rody jednoděložných rostlin. Cibule kuchyňská a cibule šalotka (*Allium cepa* var. *aggregatum* L.) jsou klasifikovány do podrodu *Cepa* v sekci *Cepa* (Mill.) Prokh (Friesen *et al.*, 2006; Wheeler *et al.*, 2013).

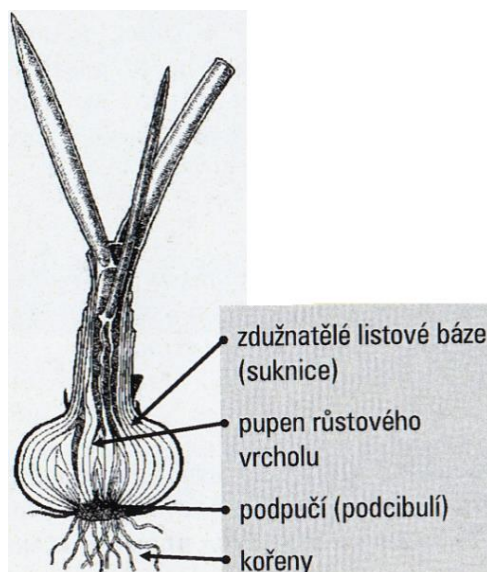
2.1.1 Cibule kuchyňská (*Allium cepa* L.)

Cibule kuchyňská (*Allium cepa* L.) je nejrozšířenějším druhem rodu česnek. Značným křížením vznikla řada odrůd a forem, které lze pěstovat na každém kontinentu kromě extrémně severních, vlhkých tropických a subtropických oblastí (Puizina, 2013).

Cibule kuchyňská je dvouletá rostlina, kdy tzv. vegetativní doba růstu je ukončena produkcí cibule (bulbus). Vernalizací následuje obnovený rapidní růst listů, vytvoření několika válcovitých stonků, které produkují jeden okolík složený z přibližně 200 květů. Každý květ produkuje maximálně šest černých semen (Griffiths *et al.*, 2002).

2.1.1.1 Cibule (bulbus)

Z rostlinného těla cibule kuchyňské se konzumuje nejen cibule (bulbus), ale i listy. Cibule je zdužnatělý zásobní orgán listového a stonkového původu. Cibule *A. cepa* (Obr. 1) je sukničitá a vzniká zdužnatěním dolních částí většího počtu listů. Podpučí (podcibulí) je silně zkrácený stonek, na kterém vyrůstají adventivní kořeny, zdužnatělé báze listů (suknice) a apikální vrcholový pupen. Suknice jsou uspořádány v soustředných vrstvách



Obr. 1 Sukničitá cibule (převzato z Vinter a Macháčková, 2013).

(Vinter a Macháčková, 2013). Odrůdy cibule vykazují velkou rozmanitost fyziologických a morfologických znaků. Mohou se lišit barvou, tvarem, velikostí, množstvím sušiny, štiplavostí nebo koncentrací biologicky aktivních látek (Griffths, *et al.*, 2002).

Voda tvoří většinu čerstvé hmoty cibule, tj. přibližně 90-95 % (Sance *et al.*, 2008). Cibule podobně jako jiná zelenina slouží k příjmu vitamínů a minerálů, avšak nestrukturní sacharidy (tj. glukosa, fruktosa, sacharosa a fruktany), které mohou zaujímat až 80 % sušiny, tvoří většinu přijatých živin (Darbyshire a Henry, 1979).

2.1.1.2 Biologická aktivita cibule kuchyňské

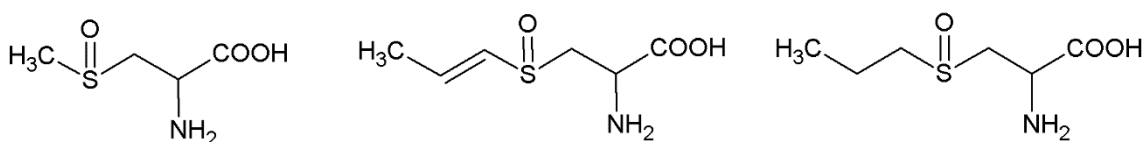
Extrakty cibule kuchyňské vykazují řadu biologických aktivit včetně antioxidační (Nuutila *et al.*, 2003), prebiotické (Gibson *et al.*, 1995), antimikrobiální (Elnima *et al.*, 1983), antimykotické (Shams-Ghahfarokhi *et al.*, 2006), antiagregační (Moon *et al.*, 2000), antiastmatické, protizánětlivé (Wagner *et al.*, 1990) nebo protinádorové (Zhou *et al.*, 2011). Tyto vlastnosti jsou spojené s chemickým složením cibule a přítomností několika skupin bioaktivních látek. Jedná se především o sloučeniny obsahující síru, fenolové sloučeniny, saponiny nebo fruktooligosacharidy a fruktany (Corzo-Martínez *et al.*, 2007).

Jednou skupinou fenolových sloučenin jsou flavonoidy (kapitola 2.2), kam patří podtřída flavonoly. Nejvíce biologicky aktivním flavonolem je kvercetin. McAnlis *et al.* (1999) ukázali, že je možné přijímat kvercetin ze stravy v takovém množství, aby došlo na určitou dobu ke zvýšení celkové antioxidační kapacity plazmy. Antioxidační a protizánětlivé vlastnosti kvercetinu jsou spojeny s prevencí kardiovaskulárních

onemocnění. Egert *et al.* (2009) pozorovali snížení krevního tlaku a oxidovaných lipoproteinů o nízké hustotě u rizikové skupiny obézních subjektů.

Lidský trávicí systém neobsahuje hydrolytické enzymy schopné hydrolýzy fruktanů (kapitola 2.4). Avšak bakterie střevní mikroflóry rapidně fermentují fruktany, což spolu se snížením pH stimuluje růst pro člověka prospěšných bakterií rodů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* (Gibson *et al.*, 1995). Fruktany kromě prebiotického efektu podporují snižování hladiny glukosy, insulinu a triacylglycerolů v krevním séru (Rumessen *et al.*, 1990; Brighenti, 2007), lepší absorpci minerálů (Scholz-Ahrens a Schrezenmeir, 2007), snižování rizika rakoviny tlustého střeva (Allsopp *et al.*, 2013) nebo stimulaci imunitního systému (Vogt *et al.*, 2013). Na druhou stranu mohou fruktany způsobit nadýmání, žaludeční bolesti a křeče nebo průjem. U zdravých jedinců se zmíněné příznaky projevují až při nadměrné konzumaci (Briet *et al.*, 1995).

Většina prospěšných a terapeutických vlastností zeleniny rodu česnek je přisuzována sloučeninám obsahující síru. Cibule se využívá jako ingredience v mnoha pokrmech díky své unikátní štiplavé chuti a aromatu. Zmíněné vlastnosti jsou způsobené degradací prekurzorů *S*-alk(en)yl-L-cysteinsulfoxidu, které jsou netěkavé, bez chuti a zápachu, enzymem allinasou (EC 4.4.1.4). V rostlinných buňkách jsou cysteinsulfoxidy lokalizovány v cytoplazmě, enzym naopak ve vakuole (Lancaster a Collin, 1981). Po narušení rostlinného pletiva vzniká pyruvát, amoniak a nestabilní sulfenové kyseliny. Sulfenové kyseliny samovolně kondenzují a vznikají nestabilní thiosulfináty, které se rozkládají na řadu silně vonících těkavých polysulfidů (Block, 1992). V cibuli jsou přítomné tři cysteinsulfoxidy (Obr. 2): methiin (*S*-methyl-L-cysteinsulfoxid), propiin (*S*-propyl-L-cysteinsulfoxid) a isoalliin (*S*-(prop-1-en-1-yl)-L-cysteinsulfoxid; Fritsch a Keusgen, 2006). Chuť cibule je komplexní a podílí se na ní více sloučenin. Sladkost je dalším sensorickým parametrem, díky přítomnosti malých sacharidů. Nicméně je často utlumena štiplavostí a bývá vnímána až po úpravě cibule například vařením (Crowther *et al.*, 2005). Flavonoidy mají naopak hořkou chuť (Vidal *et al.*, 2004).



Obr. 2 Prekurzory chuti cibule kuchyňské: methiin, isoalliin, propiin.

2.1.2 Cibule šalotka (*Allium cepa* var. *aggregatum* L.)

Cibule šalotka byla dříve zařazena jako samostatný druh *Allium ascalonicum* L., ale nyní je klasifikována jako poddruh cibule kuchyňské. Šalotka se pěstuje v mnohem menším měřítku, avšak z jedlých plodin rodu česnek se nejlépe přizpůsobuje tropickému a subtropickému podnebí. V jihovýchodní Asii a některých afrických státech je proto upřednostňováno pěstování šalotky (Phuong *et al.*, 2006; Puizina, 2013).

Cibule šalotka je vytrvalá rostlina, která má podlouhlé vejčité cibule s vedlejšími cibulkami člunkovitého charakteru. Typickým znakem je, že při růstu vytváří shluk cibulí. V květním okolíku vznikají pacibulky, výjimečně i semena (Malý *et al.*, 1998). Na Obr. 3 je ukázána morfologická diverzita tvaru cibule šalotky a cibule kuchyňské.

Studii testování biologické aktivity a účinků na zdraví je podstatně méně než v případě cibule kuchyňské. Beretta *et al.* porovnávali antiagregační a antioxidační aktivity zeleniny rodu česnek. Biologické aktivity šalotky byly ve srovnání s cibulí výrazně vyšší (Beretta *et al.*, 2017). Šalotka je navíc významná pro antimykotické (Teshima *et al.*, 2013), protirakovinné a protizánětlivé účinky (Mohammadi-Motlagh *et al.*, 2011). Obdobně jako cibule ukládá fruktosu ve formě fruktanů (Muir *et al.*, 2007). Koncentrace S-alk(en)yl-L-cysteinsulfoxidů je v šalotce nižší (Fritsch a Keusgen, 2006).



Obr. 3 Morfologická diverzita cibulí cibule kuchyňské (A) a cibule šalotky (B).

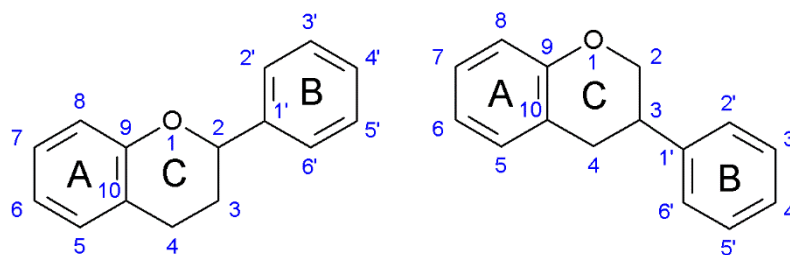
2.2 Flavonoidy

2.2.1 Chemická struktura a výskyt

Fenolové látky jsou sloučeniny s minimálně jedním hydroxylovaným aromatickým kruhem. Nejrozsáhlejší skupinou fenolových látek jsou flavonoidy s více jak 7000 chemickými strukturami (Crozier *et al.*, 2009; de Villiers *et al.*, 2016).

Flavonoidy jsou polyfenolické sloučeniny složené ze dvou benzenových kruhů (značené A, B), které jsou spojené heterocyklickým pyranovým kruhem nebo dihydropyranem (značený C). Podle pozice vazby kruhu B na kruh C lze flavonoidy rozdělit na flavonoidy (C2) a isoflavonoidy (C3; Obr. 4). Na základě chemické struktury se flavonoidy dělí do podtříd: anthokyanidiny, flavanoly, flavony, flavonoly, flavanony, isoflavony, flavandioly a dihydroflavonoly. Podtřídy flavonoidů se liší stupněm oxidace a substitucí kruhu C. Jednotlivé sloučeniny v rámci podtříd se liší typem substituce na kruhu A nebo B (Cook a Samman 1996; Kumar a Pandey, 2013). Nejčastějšími substitucemi jsou hydroxylace v polohách 5, 6, 7, 3', 4', 5' a glykosylace pozicí 3 a 7. Methylace, sulfatace, hydrogenace, isoprenylace a malonylace patří mezi v přírodě se vyskytující modifikace flavonoidů. Typ substituce ovlivňuje chemické vlastnosti flavonoidů. Zatímco sacharidy a hydroxylové skupiny zvyšují rozpustnost ve vodě, isoprenylové nebo metylové skupiny činí flavonoidy lipofilními (Aherne a O'Brien, 2002; Halbwirth, 2010). Základní chemické struktury nejdůležitějších podtříd jsou popsány v Tab. 1.

Flavonoidy se v rostlinách přirozeně vyskytují jako *O*-glykosidy, zřídka ve formě aglykonu, tzn. bez sacharidového zbytku. Nejběžněji navázaným sacharidem je glukosa a dále se vyskytuje galaktosa, rhamnosa, xylosa, arabinosa a vzácně manosa, fruktosa, kyselina glukuronová a galakturonová (Iwashina, 2000). Jsou distribuovány ve všech rostlinných orgánech, nejčastěji ve vakuolách květů, listů, stonků a kořenů. Flavonoidy byly také detekovány v buněčném jádře, membránách a chloroplastech, což může být asociováno s ochranou před oxidativním poškozením (Hutzler *et al.*, 1998; Iwashina, 2000; Feucht *et al.*, 2007).



Obr. 4 Základní chemické struktury flavonoidů (vlevo) a isoflavonoidů (vpravo).

Tab. 1 Chemické struktury nejvýznamnějších flavonoidních podtříd (Buško *et al.*, 2014)

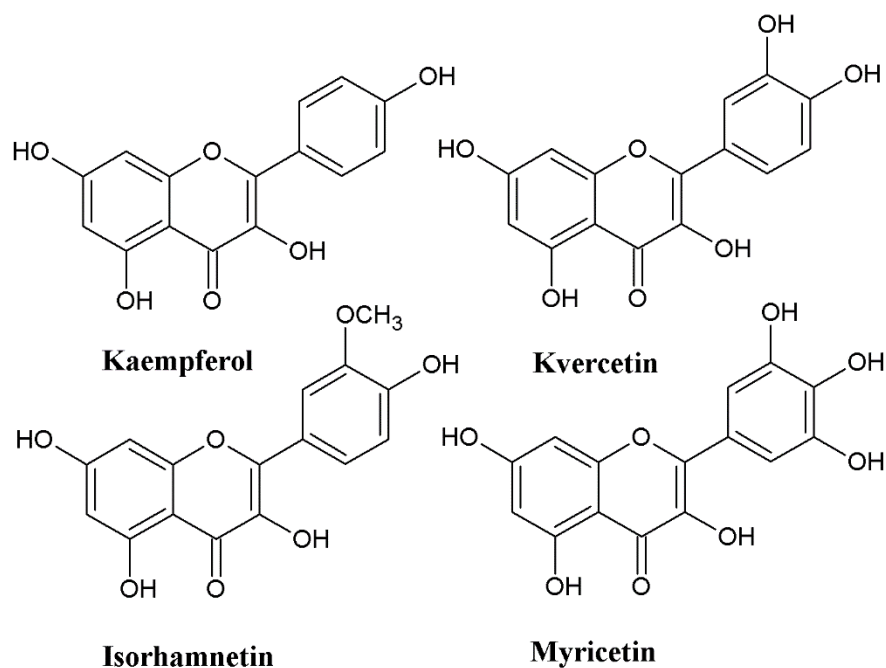
Podtřída	Nenasycenost v kruhu C	Funkční skupina kruhu C
Flavanoly	-	3-hydroxy
Flavanony	-	4-oxo
Flavony	C2-C3 dvojná vazba	4-oxo
Flavonoly	C2-C3 dvojná vazba	3-hydroxy, 4-oxo
Anthokyanidiny	C1-C2, C3-C4 dvojně vazby	3-hydroxy
Isoflavony*	C2-C3 dvojná vazba	4-oxo

* Kruh B je vázán na C3 kruhu C.

2.2.1.1 Flavonoly

Flavonoly jsou nejrozšířenější a nejdůležitější podtřídou flavonoidů, která se vyskytuje téměř u všech rostlin. Biosyntetické dráhy flavonolů jsou přítomné i v kapradinách (Markham a Viotto, 1988) nebo meších (Webby *et al.*, 1996).

Základní skelet flavonolů má hydroxylovou skupinu na pozici C3 a dvojnou vazbu mezi C2 a C3. Flavonoly jsou nejčastěji hydroxylované na C3' a C4' (Aherne a O'Brien, 2002). Většina flavonolů se přirozeně vyskytuje ve formě *O*-glykosidů, zřídka *C*-glykosidů. Jsou známy 3-, 7-, 3'-, 4'-glykosidy a jejich různé kombinace. Nejčastěji navázanými sacharidy jsou glukosa, galaktosa, arabinosa a rhamnosa (Iwashina, 2000). Glykosidy jsou lokalizovány především v nadzemních částech rostliny, hlavně v listech, květech a slupkách plodů. V podzemních orgánech se obvykle flavonoly vyskytují pouze ve stopových množstvích s výjimkou cibule (kapitola 2.2.5), která se řadí mezi potraviny s nejvyšším obsahem flavonolů (Aherne a O'Brien, 2002). Kvercetin, kaempferol, isorhamnetin, myricetin, jejichž strukturní vzorce jsou na Obr. 5, patří mezi flavonoly nejvíce zastoupené v dietě (Crozier *et al.*, 2009).

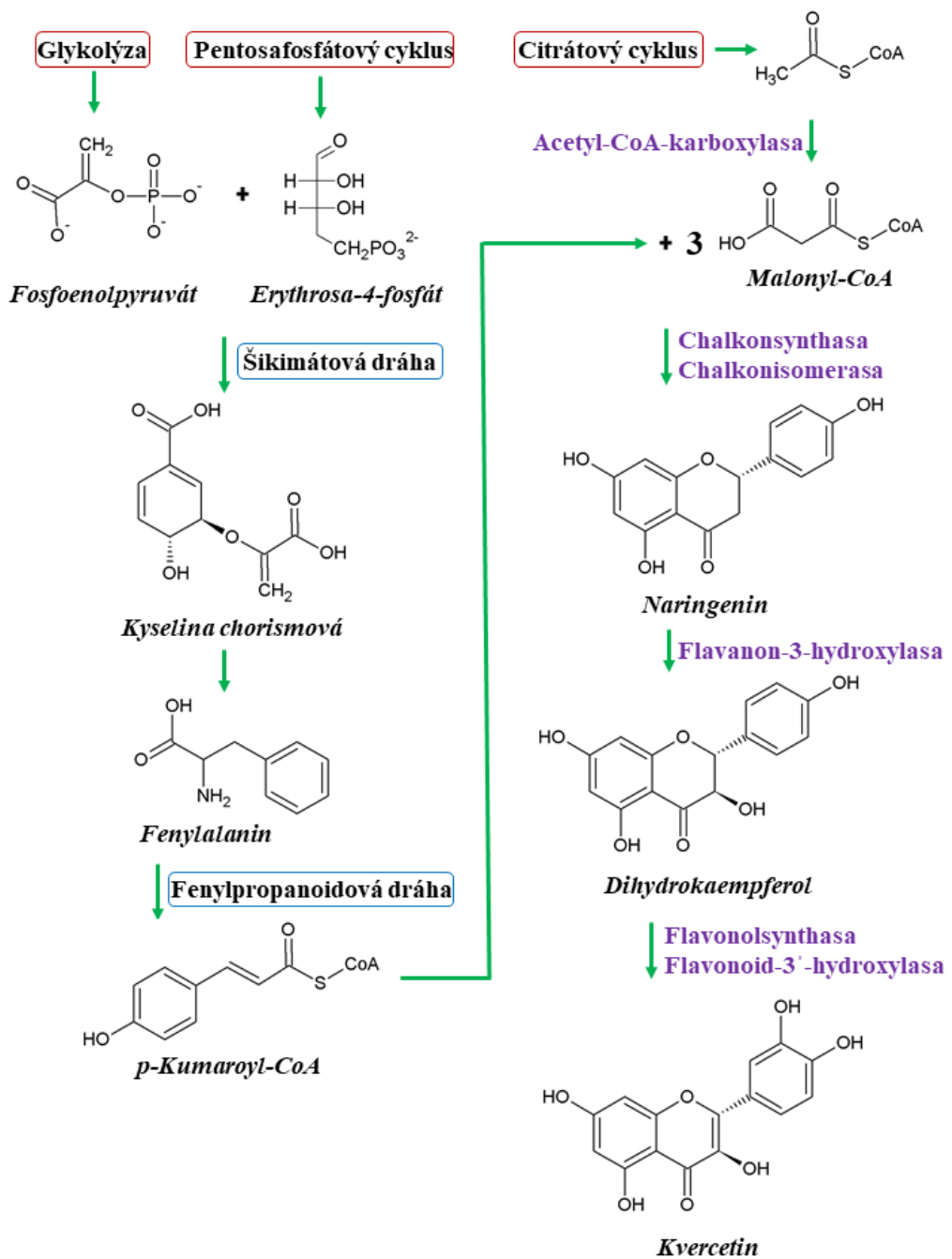


Obr. 5 Strukturní vzorce flavonolů.

2.2.2 Biosyntéza flavonoidů a kvercetinu

Biosyntézy flavonoidů jsou schopné pouze rostliny a pár druhů hub, např. *Aspergillus candidus* (Bird a Marshall, 1969). Prekurzory základního flavonoidního skeletu pocházejí z metabolismu sacharidů, tj. glykolýzy (kapitola 2.3.2.2) a pentosafosfátového cyklu.

Biosyntéza kombinuje významné metabolické dráhy, tj. šikimátová, fenylypropanoidová a polyketidová dráha. Šikimátová dráha, která má 7 kroků, vede k syntéze aromatických sloučenin. Prvním krokem je tvorba 3-deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfátu (DAHP) kondenzací fosfoenolpyruvátu (PEP) a erythrosa-4-fosfátu (Obr. 6) za přítomnosti enzymu DAHP-synthasy (EC 4.1.2.15). Následují dílčí reakce oxidace, redukce, eliminace, dehydratace a kondenzace s další molekulou PEP. Koncovým produktem je kyselina chorismová (Obr. 6; Herrmann a Weaver, 1999). Z kyseliny chorismové třemi kroky vzniká fenylalanin. První je reakce chorismátmutasy (EC 5.4.99.5) a vzniku prefenátu. Následuje aminotransferasová reakce za syntézy arogenátu a reakce arogenátdehydratasy (EC 4.2.1.91) produkuje fenylalanin (Obr. 6; Jung *et al.*, 1986). Se šikimátovou dráhou úzce souvisí fenylypropanoidová dráha. První enzym fenylalaninamoniaklyasa (EC 4.3.1.24) katalyzuje neoxidativní deaminaci fenylalaninu na *trans*-skořicovou kyselinu. Následuje hydroxylace cinnamát-4-hydroxylasou (EC 1.14.13.11) a reakce *p*-kumaroyl-CoA-ligasy (EC 6.2.1.12) za vzniku *p*-kumaroyl-CoA (Obr. 6; Dixon *et al.*, 2002).



Obr. 6 Biosyntéza kvercetinu.

Karboxylací acetyl-CoA enzymem acetyl-CoA-karboxylasou (EC 6.4.1.2) vzniká malonyl-CoA, který je prekurzorem polyketidové dráhy syntézy flavonoidů (Konishi a Sasaki, 1994). Polyketidová dráha je založena na aktivitě skupiny enzymů polyketidsynthas, které katalyzují sérii dekarboxylačních kondenzačních reakcí a tvorbu polyketidových řetězců lišící se délkou, složením a konečnými modifikacemi (Jez *et al.*, 2001). Pro syntézu flavonoidů je významný enzym chalkonsynthasa (EC 2.3.1.74), který katalyzuje sekvenční kondenzaci tří acetátových jednotek pocházejících z malonyl-CoA

na startérovou molekulu *p*-kumaroyl-CoA. Vzniká tetraketidový meziprodukt, následuje intramolekulární cyklizace a tvorba chalkonu (4,2',4',6'-tetrahydroxychalkon; Ferrer *et al.*, 1999). Chalkonisomerasa (EC 5.5.1.6) stereospecificky řídí doplňující cyklizaci za vzniku kruhu C a formaci naringenininu (Obr. 6; Jez *et al.*, 2000). Naringenin se řadí mezi flavanony a je prekurzorem dalších flavonoidů včetně kvercetinu. Biosyntézu flavonoidů doprovází velká skupina v cytosolu rozpustných enzymů, např. isomerasy, reduktasy, hydroxylasy, glykosyltransferasy nebo methyltransferasy (Winkel-Shirley, 1999).

Biosyntéza kvercetinu pokračuje hydroxylací naringenininu v pozici C3 enzymem flavanon-3-hydroxylasou (EC 1.14.11.9) za vzniku dihydrokaempferolu (Obr. 6), který se řadí do podtřídy dihydroflavonolů (Britsch a Grisebach, 1986). Následuje oxidační reakce flavonolsynthasy (EC 1.14.11.23) a produkce flavonolu kaempferolu. V případě biosyntézy kvercetinu enzym flavonoid-3'-hydroxylasa hydroxyluje v kruhu B pozici C3 (Obr. 6; Hagmann *et al.*, 1983).

Konečným krokem je glykosylace flavonolů skupinou enzymů glykosyltransferasy. Enzymy vykazují velkou substrátovou specifitu, kde UDP-sacharidy jsou donorovými molekulami. Například jeden z nejběžnějších flavonolů kvercetin-3-O-glukosid vzniká reakcí UDP-glukosa:flavonol-3-O-glukosyltransferasy (EC 2.4.1.91; Ford *et al.*, 1998).

2.2.3 Biologická aktivita v rostlinách

Flavonoidy jsou často spojovány s ochranou rostlin před UV zářením, avšak jejich mechanismus ve fotoprotekci nebyl zcela objasněn (Pollastri a Tattini, 2011). Kvůli narušené ozonové vrstvě se do atmosféry dostává více krátkovlnného slunečního UV-B záření o vlnových délkách 280-315 nm, které má negativní vliv na biosféru. Stresové faktory biotické a abiotické povahy včetně UV-B záření zvyšují v rostlinách produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), které se podílejí na vzniku oxidačního stresu (Jenkins, 2009). Antioxidanty vyhledávají a kontrolují tvorbu volných radikálů, a tím zabraňují oxidativnímu poškození buněčných komponent (Percival, 1998). Antioxidační aktivita flavonoidů je dána přítomností hydroxylových skupin, které jsou schopné redukce, donoru vodíku nebo chelatace pro rostlinu škodlivých kovových iontů (Leopoldini *et al.*, 2006). Většina flavonoidů schopných absorpce UV záření s výjimkou acylovaných derivátů nemají absorpční maximum v rozmezí vlnových délek UV-B záření, a proto neposkytují nejlepší ochranu (Harborne a Williams, 2000). Avšak při ozáření listů UV-B zářením, byla biosyntéza flavonoidů především flavonolů značně zesílena oproti ostatním

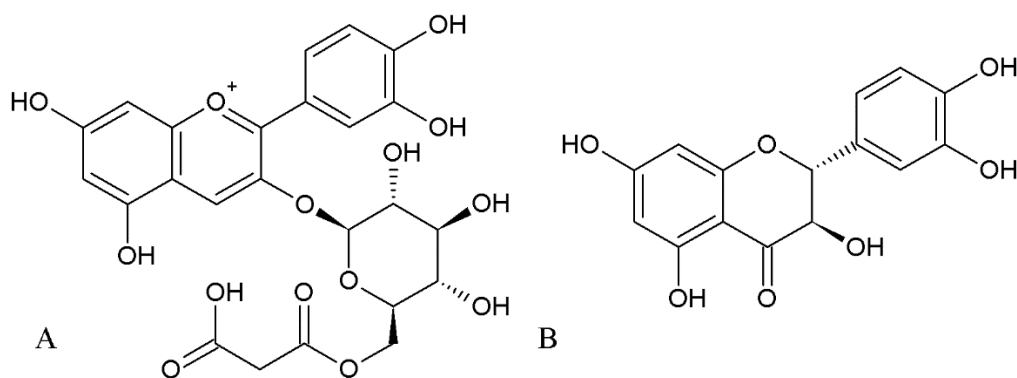
fenylpropanoidům. Jejich akumulace byla zvýšena nejen v epidermálních buňkách listů, ale i v buňkách mesofylu a ve žlaznatých trichomech (Tattini *et al.*, 2000). Také je zajímavé, že byl pozorován prudký vzrůst koncentrace kvercetin-glukosidu oproti acylovanému derivátu kaempferolu mající větší potenciál absorpce UV-B záření (Gerhardt *et al.*, 2008). Hlavní funkcí flavonoidů ve fotoprotekci rostlin pravděpodobně není absorpce záření, ale chránění buněčných komponent před oxidačním stresem redukováním ROS vzniklých následkem penetrace UV-B záření (Pollastri a Tattini, 2011).

Flavonoidy se rovněž podílí na odpuzování herbivorů, patogenů a parazitů, atraktanci půdních bakterií nebo rozptylování semen a pylu (Cook a Samman 1996; Gough *et al.*, 1997). Aglykony flavonolů jsou například nezbytné pro klíčení pylového zrna a růstu pylové láčky (Mo *et al.*, 1992). Anthokyany se nejvíce podílejí na pigmentaci rostlinných orgánů. Kopigmentace anthokyanů s glykosidy flavonolů a vliv pH výrazně ovlivňuje barvu ovoce a květů (Yoshitama *et al.*, 1992).

Flavonoidy mohou negativně regulovat auxinový transport. Flavonoidní inhibice se projevila gravitropismem a zpomalením růstu kořenů. Fenotypové změny byly podobné aplikaci syntetických inhibitorů transportu (Brown *et al.*, 2001).

2.2.4 Flavonoidy v cibuli kuchyňské

Flavonoly zastupují především deriváty kvercetinu, v menším měřítku kaempferolu a isorhamnetinu. Hlavními flavonoly cibule jsou kvercetin-4'-*O*-glukosid a kvercetin-3,4'-*O*-diglukosid, které představují více jak 85 % celkového množství flavonoidů (Tsushida a Suzuki, 1995). Bonaccorsi *et al.* (2008) srovnávali množství flavonolů v cibulích a šalotkách, kdy množství kvercetin-3,4'-*O*-diglukosidu bylo v šalotkách téměř dvojnásobné. Distribuce flavonolů záleží nejen na environmentálních podmínkách, ale i na genotypu. Patil *et al.* (1995) analyzovali 75 kultivarů cibule a zjistili, že nejvíce kvercetinu bylo ve žlutých odrůdách, následovaly červené odrůdy a v bílých odrůdách byla pouze stopová množství. Jednotlivé suknice cibule se také liší v obsahu flavonoidů. Množství kvercetinu se snižovalo v pořadí: první suknice s živými buňkami, vnější suchá suknice a vnitřní jedlá část. Suchá suknice také obsahovala nejvíce kvercetinu ve formě aglykonu (Beesk *et al.*, 2010).



Obr. 7 Strukturální vzorce kyanidinu-3-(6'-malonylglukosidu) (A) a taxifolinu (B).

Červené cibule jsou bohaté na anthokyany, např. kyanidin-3-(6'-malonylglukosid) (Obr. 7), kyanidin-3-glukosid a kyanidin-3-(3'-glukosylglukosid). Většina anthokyanů v cibuli je glykosylována na pozici C3 (Fossen *et al.*, 1996).

V cibuli byly detekovány i dihydroflavonoly, kde základní strukturou je taxifolin (Obr. 7), např. taxifolin-7-glukosid (Corea *et al.*, 2005).

2.2.5 Metody stanovení flavonoidů

Analýza jakéhokoliv metabolitu vyžaduje přípravu vzorku. Pevné materiály jsou často nejdříve vysušeny na vzduchu nebo lyofilizovány a následně homogenizovány. Kapalné vzorky jsou filtrovány nebo centrifugovány.

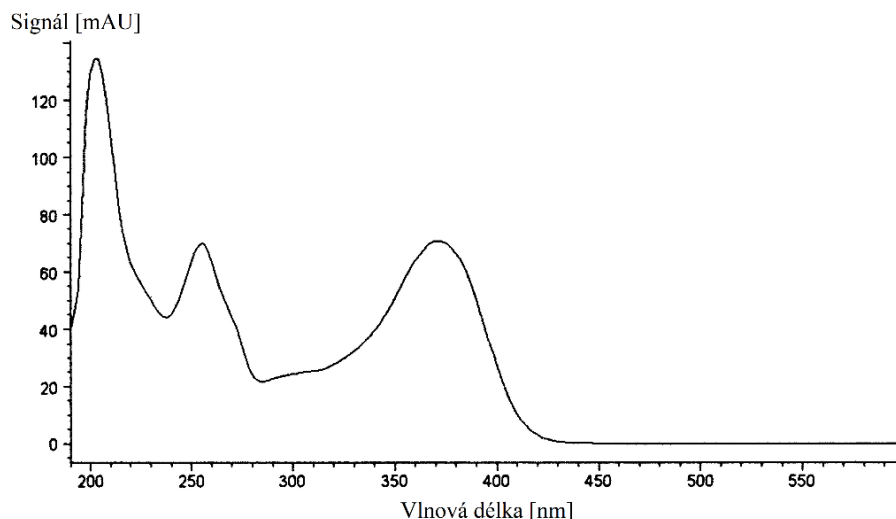
Extrakce je separační metoda, při které přechází složka ze směsi látek v kapalně či tuhé fázi do extrakčního roztoku (Stalikas, 2007). Flavonoidy jsou extrahovány methanolem, ethanolem, acetonem, vodou nebo směsí těchto rozpouštědel. Macerace, zahřívání pod refluxem a Soxhletova extrakce patří mezi tradiční jednoduché metody s vysokými výtěžky, nicméně jsou časově náročné a vyžadují relativně velkou spotřebu rozpouštědla (Zhu *et al.*, 2010). Mezi moderní extrakční techniky, které se využívají při práci s flavonoidy, patří například ultrazvukem asistovaná extrakce (UAE), superkritická fluidní extrakce (SFE) a mikrovlnně asistovaná extrakce (MAE). Tyto metody jsou jednoduché na provedení, zkracují dobu extrakce a snižují spotřebu rozpouštědla (Lin *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2010). Hrubé rostlinné extrakty lze dále přechistit, odsolit nebo zakonzentrovat extrakcí na pevné fázi (SPE; Rostagno *et al.*, 2005).

Některé publikace se zaměřují na stanovení sumy aglykonů, v těchto případech je nutná kyselá, alkalická nebo enzymová hydrolýza glykosidové vazby. Haghi a Hatami (2010) extrahovali a hydrolyzovali flavonoidy vodným roztokem methanolu s kyselinou chlorovodíkovou.

Spektrofotometrické metody jsou nejjednodušší pro kvantitativní stanovení celkových flavonoidů. Příkladem je tvorba barevného komplexu (510 nm) hydroxylových skupin s hlinitými ionty v přítomnosti dusitanu sodného (Zhishen *et al.*, 1999).

Pro separaci a kvantifikaci flavonoidů se využívá řada chromatografických metod. Chromatografie využívá dělení složek mezi dvě fáze, tj. mobilní a stacionární, na základě rozdílné afinity. Podle typu mobilní fáze lze chromatografii rozdělit na plynovou a kapalinovou (Sobotníková *et al.*, 2010). Plynová chromatografie (GC) zvláště ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) se vyznačuje vysokou citlivostí, selektivitou a využívá se i pro strukturní analýzy. V případě flavonoidů je nutná chemická derivatizace, která zvyšuje těkavost stabilních analytů. Příkladem je silylace hydroxylových skupin činidly trimethylchlorosilan (TMCS) a *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) v dimethylformamidu (DMF; Deng a Zito, 2003; Stalikas, 2007).

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, high performance liquid chromatography) je nejčastěji užívanou separační metodou analýzy flavonoidů. Flavonoidy jsou separovány v systému reverzních fází na kolonách C18 (oktadecylsilan). Eluční systém bývá složen ze dvou mobilních fází, kdy jedna je vodná okyselená fáze (např. kyselina octová, mravenčí, fosforečná) a druhou fází je méně polární organické rozpouštědlo (methanol, acetonitril; Merken a Beecher, 2000). Flavonoidy jsou běžně detekovány pomocí UV/VIS a detektoru diodového pole (DAD). Výhodou DAD je skenování spekter v reálném čase všech analytů procházejících detektorem (Stalikas, 2007). Schopnost flavonoidů absorpce UV/VIS záření je dána přítomností konjugované dvojně vazby a aromatických jader. První absorpční maximum je v oblastech 240-285 nm díky kruhu A. Druhé absorpční maximum kruhu B je v rozmezí vlnových délek 300-550 nm (Kumar a Pandley, 2013). Obr. 8 ukazuje absorpční spektrum kvercetinu.



Obr. 8 Absorpční spektrum kvercetinů (upraveno a převzato z Merken a Beecher, 2000).

Identifikaci alifatických acylových skupin nebo glykosidů nelze provést pomocí HPLC-DAD, protože tyto skupiny nemají silné UV chromofory. Spojení HPLC-MS s ionizací elektrosprejem umožňuje nejen jejich identifikaci, kvantifikaci ale také strukturní analýzy (Bonaccorsi *et al.*, 2008). Nukleární magnetická resonance (NMR) je nezbytným nástrojem pro objasňování chemických struktur. NMR je založena na rezonanci atomového jádra v externě aplikovaném magnetickém poli (Pykett *et al.*, 1982). Kvalitativní analýza je provedena na základě chemických posunů a interakčních konstant v ^{13}C nebo ^1H spektrech, kdy je možné v případě flavonoidů určit místa methylace, glykosylace a acylace a za určitých podmínek i identifikaci sacharidů (Markham *et al.*, 1978).

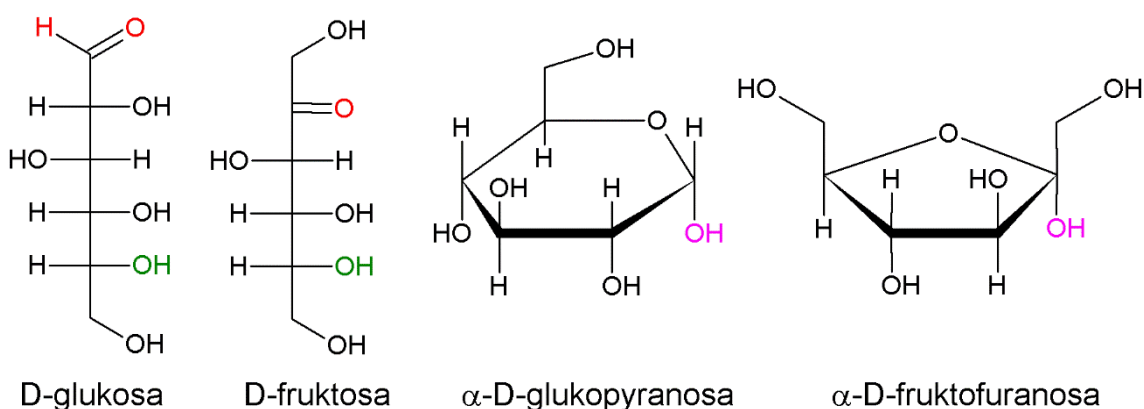
Celkovou antioxidační kapacitu rostlinných extraktů lze stanovit řadou spektrofotometrických metod. Esej FRAP (ferric reducing antioxidant power) je založena na schopnosti antioxidantů redukovat železitý komplex 2,4,6-tripyridyl-S-triazin. Metoda CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity) je založena na redukci měďnatých iontů a vzniku barevného produktu komplexací měďných iontů s neokuproinem. Metoda DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) využívá radikál DPPH $^{\bullet}$, který je stabilní a fialově zbarvený. Během reakce dochází k redukci radikálu a snižování absorbance (Prior *et al.*, 2005).

2.3 Malé nestrukturní sacharidy

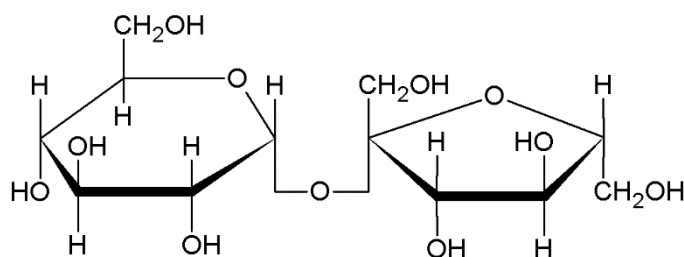
2.3.1 Výskyt, chemická struktura a vlastnosti

Sacharidy jsou nedílnou součástí rostlin i živočichů, kde se vyskytují volně, modifikované mohou být součástí například buněčných stěn nebo jsou uloženy jako zásobní polysacharidy. Sacharidy lze podle délky řetězce rozdělit na monosacharidy (glukosa, fruktosa), disacharidy (sacharosa), oligosacharidy (fruktooligosacharidy) a polysacharidy (fruktany). První dvě zmíněné skupiny budou rozebrány v této kapitole, poslední dvě v kapitole 2.4.

Monosacharidy se dělí podle počtu atomů uhlíku na triosy, tetrosy, pentosy, hexosy a heptosy nebo podle přítomnosti aldehydové či ketonové skupiny na aldosity a ketosy. Na základě této klasifikace je glukosa aldohexosa a fruktosa ketohexosa. Sacharidy mají různé varianty izomerie. Konfiguraci D nebo L určuje poloha hydroxylové skupiny na stereogenním centru, které je nejvzdálenější vůči karbonylové skupině. V přírodě se většina monosacharidů vyskytuje v konfiguraci D a ve Fisherově projekci hydroxylová skupina směřuje doprava (Obr. 9). Ve vodných roztocích sacharidy vytváří cyklické hemiacetaly, kdy nejčastěji vzniká šestičlenná pyranosa nebo pětičlenná furanosa, které se znázorňují Haworthovou projekcí (Obr. 9). Při cyklizaci monosacharidu se z atomu uhlíku karbonylové skupiny vytváří nové stereogenní centrum. Takto vzniklé dva diastereoisomery se nazývají anomery a hemiacetalový atom uhlíku je označován jako anomerní centrum. V případě D-glukosy se anomer, který má -OH skupinu na C1 orientovanou *trans* vůči substituentu -CH₂OH vázanému k atomu uhlíku C5 nazývá α -anomer, v opačném případě se jedná o β -anomer (Obr. 9; McMurry, 2007; Gleason a Chollet, 2012a; Murray *et al.*, 2012a).



Obr. 9 Fisherova a Haworthova projekce (červená – aldosa, ketosa; zelená – D-sacharid; fialová – α -anomer).



Obr. 10 Chemická struktura sacharosu (α -D-glukopyranosyl- β -D-fruktofuranosid).

Karbonylovou skupinu lze ve stádiu acyklické struktury redukovat na příslušné polyalkoholy zvané alditoly. Aldosy také snadno oxidují na odpovídající aldonové kyseliny v reakci například s Fehlingovým činidlem (Cu^{2+} ve vodném alkalickém roztoku vinanu sodného) nebo Tollensovým činidlem (Ag^+ ve vodném amoniaku) za vzniku vyredukovaných kovů, respektive oxidu měďného. Obě reakce se používají k důkazu přítomnosti redukujících sacharidů. I když je fruktosa ketosa, je schopna redukovat zmíněná činidla. Tato skutečnost je způsobena rychlou izomerací v bazickém prostředí sérií rovnovážných keto-enol tautomerních přesmyků. Na druhou stranu sacharosa (α -D-glukopyranosyl- β -D-fruktofuranosid; Obr. 10) nemá volnou hemiacetalovou skupinu, a proto není schopná redukce činidel (McMurry, 2007).

2.3.2 Metabolické dráhy malých sacharidů

Hlavní metabolické dráhy biosyntézy i degradace sacharidů jsou důležitými složkami primárního metabolismu a jsou nezbytné pro všechny živé organismy. Syntéza řady sekundárních metabolitů vychází z cukerných prekurzorů (viz kapitola 2.2.3).

2.3.2.1 Syntéza

V sekundární fázi fotosyntézy dochází ke karboxylaci ribulosa-1,5-bisfosfátu za katalýzy ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy (EC 4.1.1.39; RUBISCO). Vzniklý glyceraldehyd-3-fosfát je izomerován na dihydroxyacetonfosfát fosfotriosaisomerasou (EC 5.3.1.1). Enzym aldolasa (EC 4.1.2.13) syntetizuje z glyceraldehyd-3-fosfátu a dihydroxyacetonfosfátu fruktosa-1,6-bisfosfát. Enzym fruktosa-1,6-bisfosfatasa (EC 3.1.3.11) hydrolyzuje fruktosa-1,6-bisfosfát na fruktosa-6-fosfát. Následuje reakce fosfoglukosaisomerasy (EC 5.3.1.9) za vzniku glukosa-6-fosfátu, která může být transformována fosfoglukomutasou (EC 5.4.2.2) na glukosa-1-fosfát.

Metabolicky aktivní formy sacharidů vznikají reakcí s nukleosidtrifosfáty. Příkladem je reakce ADP-glukosapyrofosforylasy (EC 2.7.7.27), kdy glukosa-1-fosfát reaguje

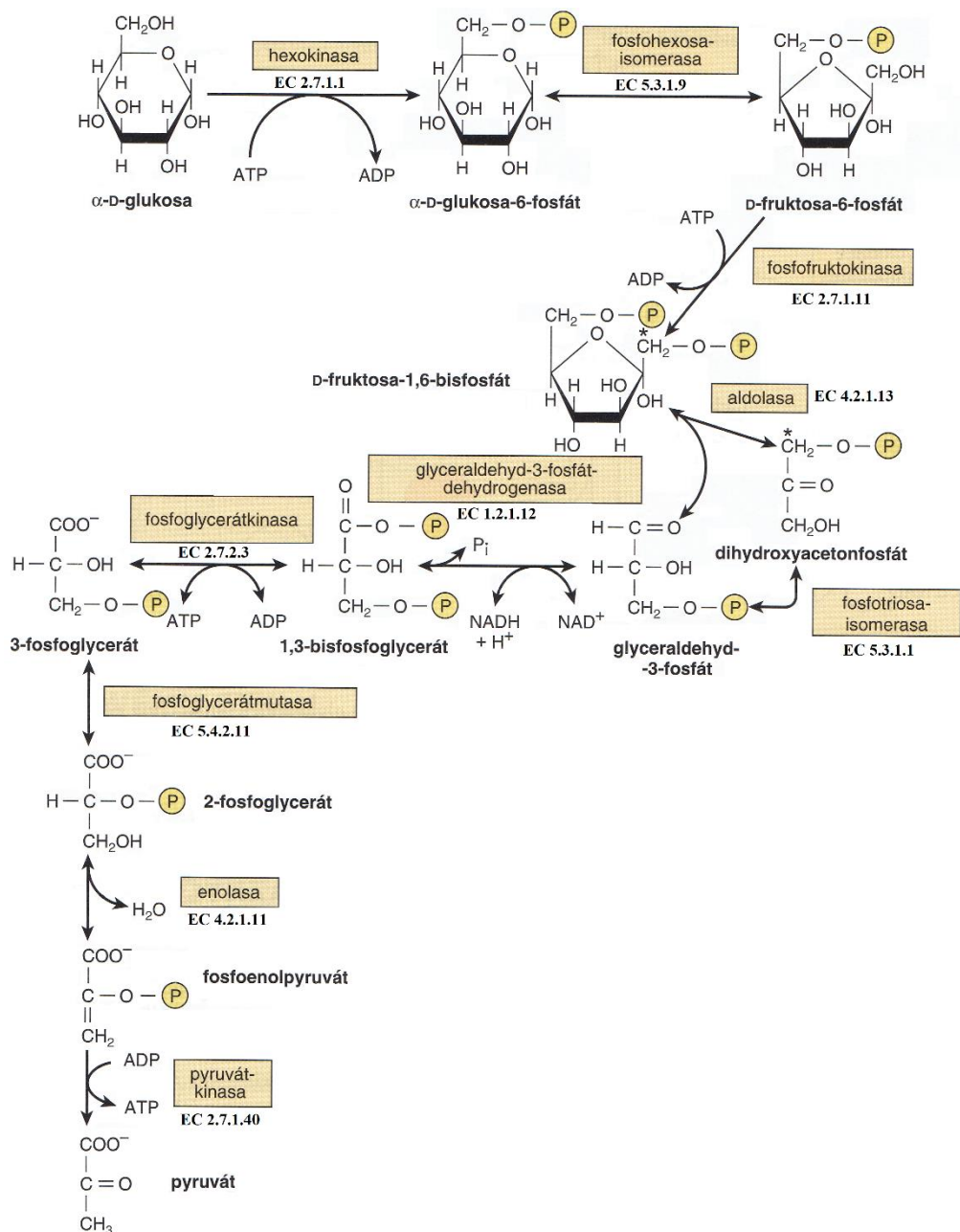
s ATP za vzniku ADP-glukosy. Reakcí škrobsynthasy (EC 2.4.1.21) a škrob větvičního enzymu (amylo-(1→4),(1→6)-transglykosylasa; EC 2.4.1.18) se syntetizuje škrob, který je uskladněn v plastidech. V případě energetické potřeby je škrob hydrolyzován skupinou enzymů za produkce glukosy nebo glukosa-1-fosfátu. Hydrolýza lineárních řetězců je katalyzována primárně β -amylasou (EC 3.2.1.2), která uvolňuje maltosu z neredukujícího konce. Naopak α -amylasa (EC 3.2.1.1.) štěpí vazby $\alpha(1\rightarrow4)$ uvnitř řetězce. D-enzym (EC 2.4.1.25) je transferasa přenášející maltosový zbytek z maltotriosy na jiný glukan. Odvětřující enzym tzv. R-enzym (amylopektin-1,6-glukosidasa; EC 3.2.1.142) štěpí glykosidické vazby $\alpha(1\rightarrow6)$. Nakonec α -glukosidasa (EC 3.2.1.3) štěpí maltosu na dvě molekuly glukosy (Velíšek a Cejpek; 2005; Zeeman *et al.*, 2010; Gleason a Chollet, 2012b).

Při syntéze sacharosy nejdříve vzniká UDP-glukosa UDP-glukosapyrofosforylasou (EC 2.7.7.9). Následuje reakce sacharosafosfátsynthasy (EC 2.4.1.14), kdy UDP-glukosa kondenzuje s fruktosa-6-fosfátem a vzniká sacharosa-6-fosfát. Syntézu sacharosy ukončuje hydrolytická reakce enzymu sacharosafosfátfosfatasy, která odštěpuje fosfátové skupiny (EC 3.1.3.24; Winter a Huber, 2000).

2.3.2.2 Degradace

Degradace sacharosy může být katalyzována invertasou (EC 3.2.1.26) za vzniku fruktosy a glukosy nebo sacharosynthasou (EC 2.4.1.13) na fruktosu a UDP-glukosu. Invertasy patří do skupiny β -fruktosidas, které se liší pH optimem enzymové aktivity, lokalizací a rozpustností. Na základě těchto parametrů se invertasy dělí do 4 skupin: rozpustná cytoplazmatická s neutrálním až bazickým pH optimem, rozpustná vakuolární s kyselým pH optimem, rozpustná apoplastická a nerozpustná invertasa buněčné stěny s kyselým pH optimem (Winter a Huber, 2000).

Hlavní dráha degradace glukosy a fruktosy je glykolýza následována citrátovým cyklem. V cytosolu glykolýza oxiduje glukosu sérií 10 enzymatických reakcí, která končí produkcí dvou molekul pyruvátu, dvou molekul ATP a dvou molekul NADH. Obr. 11 zobrazuje průběh glykolýzy a zapojené enzymy. Pyruvátdehydrogenasový komplex katalyzuje přeměnu pyruvátu na acetyl-CoA, který vstupuje do citrátového cyklu lokalizovaného v mitochondriích. Při citrátovém cyklu je acetyl-CoA oxidován a dochází k redukci koenzymů, které jsou reoxidovány v dýchacím řetězci spojeném s tvorbou ATP (Murray *et al.*, 2012b).



Obr. 11 Metabolická dráha glykolýzy (upraveno a převzato z Murray *et al.*, 2012b).

2.3.3 Biologická aktivita v rostlinách

Sacharidy jsou nezbytné pro základní procesy potřebné pro růst rostlin. Jsou distribuovány po celém rostlinném těle a představují bohatý zdroj uhlíku a energie. Sacharosa je typickým zásobním a transportním sacharidem (Winter a Huber, 2000).

Sacharidové molekuly vystupují nejen jako živiny, ale také jako signální molekuly a regulátory genové exprese související s rostlinným metabolismem, stresovou tolerancí, růstem a vývojem. Glukosa a fruktosa jsou aktivně zapojeny do buněčného dělení, sacharosa naopak do diferenciaci a zrání (Sami *et al.*, 2016).

Salinitní stres omezuje fotosyntézu, asimilaci dusíku, buněčné dělení až nakonec i rostlinný růst. Sucho také významně inhibuje fotosyntézu (Sami *et al.*, 2016). Akumulace malých sacharidů je spojena s působením abiotických stresů, která napomáhá rostlinám přežít nepříznivé podmínky. Sacharidy se řadí mezi tzv. osmolity, které zajišťují osmotickou homeostázi, a tím udržují buněčný turgor (Singh *et al.*, 2015). Za fyziologických podmínek molekuly vody vytváří vodíkové můstky mezi hydrofilními doménami fosfolipidů, čímž napomáhají udržet membránovou celistvost a správnou funkci lipidové dvojvrstvy (Milhaud, 2004). Mráz tvorbou ledových krystalů snižuje obsah vody v buňce a způsobuje dehydrataci. V důsledku je membrána náchylná k fázovým změnám z původní fluidní na rigidní gelovitou konzistenci a poškození membrány. Během dehydratace sacharidy zabraňují membránové fúzi přímou interakcí s polárními skupinami fosfolipidů (Valluru a Van den Ende, 2008; Livingston *et al.*, 2009).

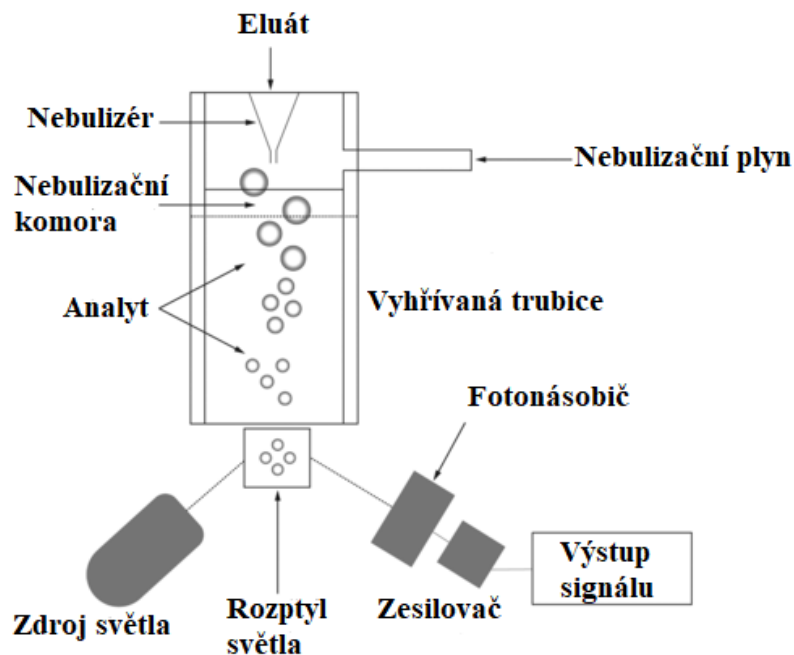
2.3.4 Metody stanovení malých sacharidů

Sacharidy jsou extrahovány vodou nebo vodnými roztoky organických rozpouštědel, obvykle ethanolu nebo methanolu, při laboratorní teplotě, za horka, případně pod refluxem (Davis *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008).

GC analýza mono a disacharidů vyžaduje chemickou derivatizaci, kdy nejjednodušší a nejrychlejší je silylace za vzniku trimethylsilyl (TMS) derivátů. Rojas-Escudero *et al.* (2004) v prvním kroku vytvořili oximy reakcí s hydroxylamin-hydrochloridem v přítomnosti anilinu. Následovala formace TMS-oximů silylačním činidlem *N,O*-bis(trimethyl)trifluoroacetamidem (BSTFA). Produkty identifikovali GC ve spojení s plamenoionizačním detektorem (FID, flame ionization detection).

Nicméně nejlepších výsledků separace sacharidů bylo dosaženo pomocí různých typů HPLC včetně ionexové, reverzní fáze a hydrofilní (Dvořáčková *et al.*, 2014). Běžně se využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie na měničích aniontů (HPAEC, high performance anion exchange chromatography). Separace je založena na slabých kyselých vlastnostech sacharidových molekul v zásaditém prostředí, kde jsou negativně nabitě, na stacionární fázi obsahující kladně nabitě kvartérní amoniové skupiny. Mobilní fázi je gradient hydroxidu sodného a alkalického octanu sodného (Cataldi *et al.*, 2000). Dalším typem chromatografie je ligandová výměna, kdy stacionární fázi jsou sulfonované zesíťované kopolymery styrenu a divinylbenzenu s navázanými kovovými ionty (Ca^{2+} , Ag^+ a Pb^{2+}), se kterými sacharidy vytváří komplexy. Na separaci se také podílí efekt

velikosti molekul a mobilní fázi je voda (Stefansson a Westerlund, 1996). Chromatografie na reverzních fázích nebo hydrofilní interakční chromatografie (HILIC, hydrophilic interaction liquid chromatography) využívá kolony, které obsahují aminopropylové skupiny navázané na silikagel. HILIC je komplementární k tradiční chromatografii na reverzních fázích. Lze ji charakterizovat jako metodu, která využívá stacionární fáze normálních fází v kombinaci s mobilní fází obsahující více jak 50 % organického rozpouštědla ve vodě, nejčastěji acetonitrilu. Ve výsledku zajišťuje dostatečnou retenci velmi polárních látek (Jandera, 2011; Zakharova *et al.*, 2013). Pulsní amperometrický detektor (PAD), odpařovací detektor rozptylu světla (ELSD, evaporative light scattering detector) nebo MS patří mezi běžně využívané detektory v analýze sacharidů. HPAEC je spojena nejčastěji s PAD, který je univerzální a má vysokou citlivost. Detekce zahrnuje zlatou pracovní elektrodu, kdy je její povrch schopen při vysokém pH katalyzovat oxidaci sacharidů a generovat elektrický proud. Online detekce MS je vyžadována pro rychlejší a spolehlivější identifikaci analytů na základě m/z (poměr hmotnosti a náboje). Alkalická mobilní fáze HPAEC není kompatibilní s MS. Bruggink *et al.* zavedli odsolovací zařízení mezi kolonu a MS, které přemění hydroxid a acetát na vodu a kyselinu octovou (Bruggink *et al.*, 2005). ELSD se obecně využívá pro sloučeniny bez silného chromoforu a umožňuje detekovat analyty, které jsou méně těkavé než mobilní fáze. Princip ELSD (Obr. 12) lze rozdělit do tří kroků: nebulizace eluátu, evaporace mobilní fáze a měření rozptýleného světla částečně nebo zcela netěkavých analytů. Nebulizace znamená transformaci eluátu do kapek, které jsou vysušeny nebulizačním plynem (vzduch nebo dusík). Vzniklé suspendované částice prochází vyhřátou trubicí, kde je mobilní fáze zcela odpařena a částice analytu jsou nasměrovány ke světelnému paprsku. Rozptýlené světlo způsobuje oscilaci elektronů, která produkuje záření dopadající na fotonásobič (Raessler, 2011; Dvořáčková *et al.*, 2014).



Obr. 12 Schéma odpařovacího detektoru rozptylu světla (ELSD, upraveno a převzato z Dvořáčková *et al.*, 2014).

Pro rychlé analýzy cukrů například v ovoci byly vyvinuty různé typy biosenzorů. Biosenzory se skládají z bioreceptoru, který rozpoznává cílový analyt, a z převodníku, který přeměňuje rozpoznanou informaci na měřený elektrický signál. Rozpoznávacím systémem jsou nejčastěji enzymy. Převodníky jsou založené na amperometrickém měření peroxidu vodíku nebo kyslíku, fotometrii využívající optická vlákna nebo potenciometrickém měření pH. Enzymatické stanovení glukosy spočívá v přítomnosti glukosaoxidasy (GOD; EC 1.1.3.4), fruktosa je rozpoznána fruktosadehydrogenasou (FDH; EC 1.1.99.11). Biosenzory stanovení sacharosy obsahují invertasu, mutarotasu (EC 5.1.3.3.), GOD a FDH. Mutarotasa katalyzuje přeměnu α -D-glukosy na β -D-glukosu, pro kterou má GOD vyšší specifitu (Monosik *et al.*, 2012).

Celkové sacharidy lze stanovit řadou kolorimetrických reakcí. Metoda PAHBAH (4-hydroxybenzhydrazid; viz kapitola 2.4.4), neokuproinová a 3,5-dinitrosalicylové kyseliny (viz kapitola 2.5.4) se využívají k určení redukujících sacharidů. Metoda podle Duboise je vhodná pro kvantifikaci neutrálních sacharidů, oligosacharidů, glykoproteinů nebo glykolipidů. Princip spočívá v přeměně sacharidů na deriváty furfuralu zahříváním s kyselinou sírovou a následnou formací barevného komplexu s fenolem (Dubois *et al.*, 1956). Samostatná stanovení glukosy, fruktosy a sacharosy využívají stejných enzymů jako v případě biosenzorů anebo enzymových reakcí popsanych v kapitole 2.5.4.

2.4 Fruktooligosacharidy a fruktany

Fruktany jsou definovány jako sloučeniny, kde většinu spojení tvoří vazba β -fruktofuranosyl-fruktosa. To znamená, že pojem fruktan zahrnuje polysacharidy, oligosacharidy ale i disacharidy. Fruktany mohou ale také nemusí mít ve své struktuře molekulu glukosy (Lewis, 1993). Fruktany s nízkým stupněm polymerace (DP, degree of polymerization) se často označují jako fruktooligosacharidy (FOS) a s vysokým DP jako fruktany. Nicméně hranice mezi FOS a fruktany není přesně definovaná. Někteří vědci označují FOS s délkou řetězce 1-12 fruktosových podjednotek, další skupina upřednostňuje DP 2-20. Avšak podle terminologie IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) je hraniční bod mezi oligo a polysacharidy 10 podjednotek (Benkeblia, 2013).

2.4.1 Výskyt, chemická struktura a vlastnosti

Fruktany jsou typické pro rostliny, ale také je produkuje řada bakterií a hub (Anwar *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2010). Fruktany se vyskytují u 15 % kvetoucích rostlin (Hendry, 1993).

Chemická struktura rostlinných fruktanů je velmi rozmanitá a závislá na druhu rostliny a lokalizaci v rostlinném těle. Fruktany se liší uspořádáním fruktosových podjednotek, typy vazeb a molekulovou hmotností (počtem podjednotek). Výchozím substrátem syntézy je sacharosa, na kterou se vážou další fruktosové podjednotky. Základní struktura fruktanů se tedy zapisuje $(\beta\text{-D-fruktofuranosyl})_n\text{sacharosa}$, kde se n nejčastěji pohybuje v rozmezí 30-50, ale může se objevit i DP vyšší jak 200. Například v bázi stonku bojínku lučního (*Phleum pratense*) bylo stanoveno DP 260 (Grotelueschen a Smith, 1968). Naopak bakterie mohou syntetizovat fruktany o délce přesahující 100000 fruktosových jednotek (Vijn a Smeekens, 1999). Dle typu glykosidové vazby jsou fruktany klasifikovány do pěti hlavních skupin: inulin, levan, větvené, neosérie inulinu a levanu.

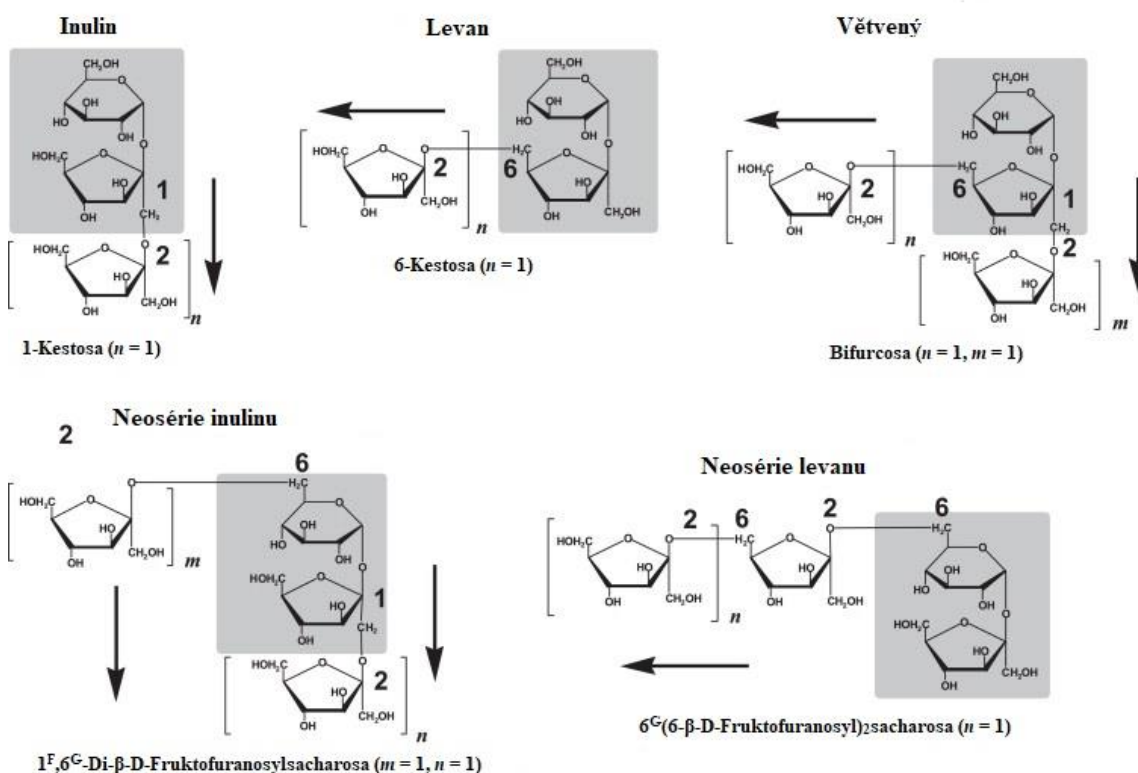
Fruktany jsou polydisperzní polymery rozpustné ve vodě, naopak jsou nestabilní v kyselém prostředí. Fruktofuranosové podjednotky spojené -O-CH₂- vazbou jsou mnohem flexibilnější než glukopyranosy spojené -O- vazbou ve škrobu. Další stupeň flexibility je dán tvorbou volného helixu, kde na jednu otočku vychází čtyři až pět fruktosových jednotek (Phelps, 1965).

2.4.1.1 Inulin a neosérie inulinu

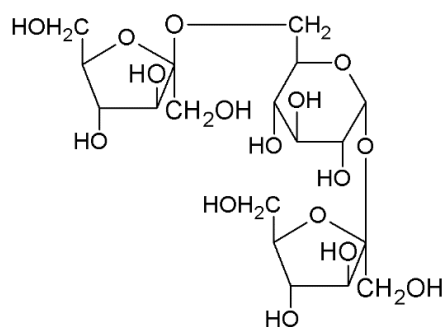
Inulin přirozeně vytváří směs polysacharidů o různých délkách lineárních řetězců s terminální glukosou. Nejkratším inulinem je trisacharid 1-kestosa (β -D-fruktofuranosyl-(2 \rightarrow 1)- α -D-glukopyranosyl- β -D-fruktofuranosid). Fruktosové podjednotky v inulinu jsou spojené výhradně nebo převážně vazbou β (2 \rightarrow 1) (Obr. 13; Lewis, 1993).

Inulin se vyskytuje převážně v kořenech a hlízách dvouděložných rostlin. Mezi nejvýznamnější představitele patří řád hvězdnicotvaré (*Asterales*) se slunečnicí topinambur (*Helianthus tuberosus*) a čekankou obecnou (*Cichorium intybus*; Bonnet *et al.*, 1994).

U některých jednoděložných rostlin především rodu chřestu (*Asparagus*) a česneku byla objevena neosérie inulinu. Jedná se o dva lineární fruktosové řetězce s vazbou β (2 \rightarrow 1) navázané na výchozí sacharosu (Obr. 13). Neosérie tedy obsahuje glukosu uvnitř řetězce. Jeden řetězec je připojen na C1 fruktosového zbytku (stejně i v případě inulinu), zatímco druhý je navázán na C6 glukosového zbytku. Základním trisacharidem je neokestosa (β -D-fruktofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glukopyranosyl- β -D-fruktofuranosid; Obr. 14; Shiomi *et al.*, 1976; Ernst *et al.*, 1998).



Obr. 13 Chemické struktury fruktanů. Šipka zobrazuje směr vázání dalších podjednotek fruktosy. Šedé rámečky zvyrazňují výchozí sacharosu (upraveno a převzato z Benkeblia, 2013).



Obr. 14 Strukturní vzorec neokestosy.

2.4.1.2 Levan a neosérie levanu

Levan tvoří lineární řetězce, kde jsou jednotlivé fruktosy spojené vazbou $\beta(2\rightarrow6)$. Výchozím substrátem syntézy je opět sacharosa, kdy se řetězec prodlužuje vazbou fruktosové podjednotky na C6 fruktosové části v sacharose. Nejmenší FOS je 6-kestosa (β -D-fruktofuranosyl-(2 \rightarrow 6)- α -D-glukopyranosyl- β -D-fruktofuranosid; Obr. 13; Lewis, 1993).

Levan je ve srovnání s inulinem zastoupen v menším měřítku (Benkeblia, 2013). Obecně je typický pro bakterie a trávy (*Poaceae*), kde pouze levan byl stanoven například v *Poa secunda* (Chatterton a Harrison, 1997).

Neosérie levanu stejně jako neosérie inulinu obsahuje glukosu uvnitř řetězce. Základním trisacharidem je také neokestosa, kdy se fruktosové jednotky vážou na glukosový zbytek sacharosy vazbou $\beta(2\rightarrow6)$ (Obr. 13). Neosérie levanu se vyskytuje u pár rostlinných druhů spadajících do řádu lipnicotvaré (*Poales*), např. oves setý (*Avena sativa*; Livingston *et al.*, 1993).

2.4.1.3 Větvený fruktan

Větvený fruktan je kombinací inulinu a levanu. Příklad struktury je ukázán na Obr. 13, kdy nejmenší FOS je tetrasacharid zvaný bifurkosa (β -D-fruktofuranosyl-(2 \rightarrow 1)-[β -D-fruktofuranosyl-(2 \rightarrow 6)]- α -D-glukopyranosyl- β -D-fruktofuranosid; Lewis, 1993).

Tento typ fruktanu je specifický pro většinu rostlinných druhů řádu lipnicotvaré. Typickými příklady jsou pšenice setá (*Triticum aestivum*) a rod ječmen (*Hordeum*; Bancal *et al.*, 1992; Bonnett *et al.*, 1997).

2.4.2 Biologická aktivita v rostlinách

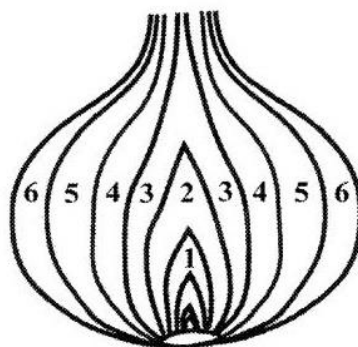
Rostliny obvykle nemohou využít všechny uhlíkaté skelety pocházející z fotosyntézy, proto si je ukládají ve formě krátkodobých nebo dlouhodobých zásobních sacharidů. Ve srovnání se škrobem a sacharosou jsou fruktany méně známé sacharidové rezervy. Syntézu fruktanů reguluje koncentrace sacharosy ve vakuole, kdy při vysoké koncentraci sacharosy vzroste aktivita biosyntézy fruktanů. Fruktany jsou akumulovány jako dlouhodobá energetická rezerva v podzemních zásobních orgánech typu kořenů, hlíz a cibulí. Na jaře jsou využity pro klíčení, kdy jejich hydrolýza často předchází samotný růst. Fruktan se od škrobu liší chemickým složením (fruktosa versus glukosa), buněčnou lokalizací (vakuola versus plastid) a fyzickým stavem (rozpuštěný versus precipitovaný; Vijn a Smeekens, 1999; Noël a Pontis, 2000; Van Laere a Van den Ende, 2002; Valluru a Van den Ende, 2008).

Fruktany mají významný podíl v toleranci rostlin na salinitu, sucho a mráz. Jejich výhodou je vyšší rozpustnost ve vodě, což je účinná obrana proti poškození způsobené krystalizující membránou při nulových teplotách. Fruktany jsou schopné vmezeřit část polysacharidového řetězce mezi hydrofilní domény lipidové dvouvrstvy, a tím zpevňovat membránu. Fruktany mají další funkce při působení abiotických stresů, avšak jejich aktivita je pravděpodobně komplexní a nebyla zcela objasněna. Bylo ukázáno, že fruktany vykazovaly antioxidační vlastnosti vůči ROS. Je také možné, že vystupují jako signální molekuly v drahách spojených se stresovou tolerancí (Valluru a Van den Ende, 2008; Livingston *et al.*, 2009; Van den Ende a Valluru, 2009).

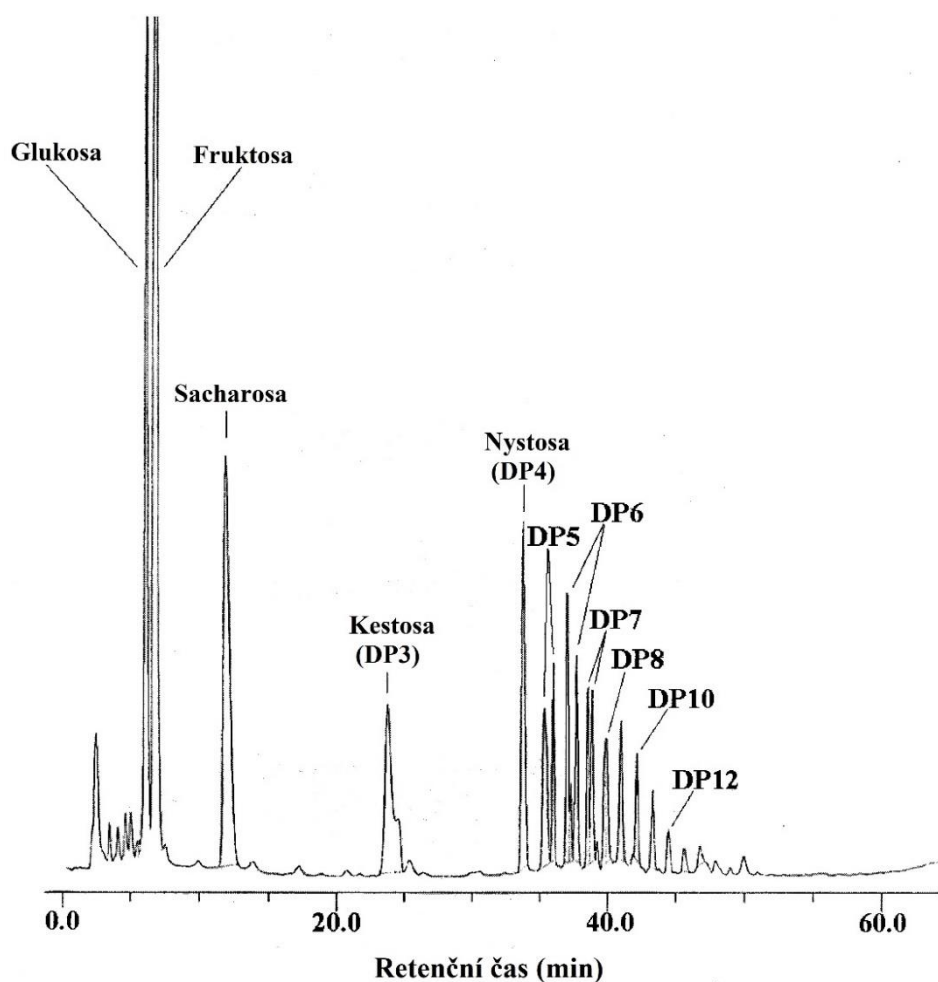
2.4.3 Nestrukturní sacharidy v cibuli kuchyňské

Cibule kuchyňská akumuluje z nestrukturních sacharidů sacharosu, glukosu, fruktosu, FOS a fruktany. Stanovení jejich distribuce ukázalo, že nejstarší suknicice (číslo 6; Obr. 15) obsahuje nejnižší koncentrace FOS a fruktanů a směrem dovnitř se jejich množství zvyšuje. Distribuce FOS tak naznačuje, že ve vnějších suknicích jsou tyto sloučeniny hydrolyzovány na fruktosu, aby došlo k osmoticky řízenému příjmu vody a zvětšování objemu cibule. Tomu odpovídá i fakt, že obsah vody a fruktosy byl vyšší ve vnějších suknicích. Darbyshire a Henry (1978) stanovili prakticky neměnnou koncentraci glukosy a sacharosy ve všech suknicích. Naopak Slimstad a Vågen (2009) pozorovali, že množství sacharosy roste směrem k vnitřním suknicím. Obecně platí, že s rostoucím DP klesá koncentrace fruktanů (Obr. 16). V šalotce byl ve srovnání s cibulí kuchyňskou

stanoven vyšší obsah FOS a nižší obsah malých sacharidů. Muir *et al.* (2007) určili, že obsah fruktanů v šalotce byl přibližně pětikrát vyšší jak v bílé cibuli (Darbyshire a Henry, 1978; Darbyshire a Henry, 1979; Wang *et al.*, 1999; Kaack *et al.*, 2004; Muir *et al.*, 2007; Slimestad a Vågen, 2009).



Obr. 15 Schématické rozložení suknic cibule kuchyňské (převzato z Shiomi *et al.*, 2005).



Obr. 16 Chromatogram separace fruktooligosacharidů z cibule šalotky (převzato z Wang *et al.*, 1999).

2.4.4 Metody stanovení fruktooligosacharidů a fruktanů

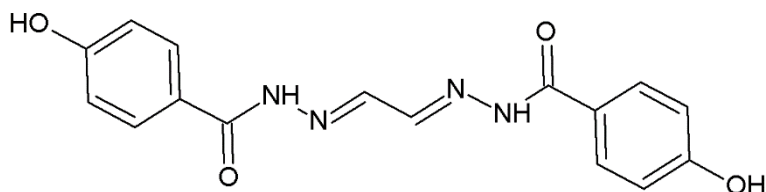
Rozmanitá chemická struktura FOS a fruktanů výrazně komplikuje jejich strukturní analýzu, identifikaci a kvantifikaci (Benkeblia, 2013).

Fruktany a FOS jsou extrahovány buď horkým 80% ethanolem a následně horkou vodou (Lopez *et al.*, 2003) anebo pouze horkou vodou (Ernst *et al.*, 1998). Při strukturních analýzách následuje extrakci purifikace a frakcionace fruktanů kombinací metod precipitace, TLC a řady chromatografických metod, např. gelovou permeační, reverzními fázemi, iontoměničem nebo kolonou naplněnou aktivním uhlím. NMR se využívá pro stanovení konformace molekul, GC-MS naopak umožňuje určit typ vazeb v polymerech. Je nutná kyselá hydrolyza, derivatizace polárních hydroxylových skupin sacharidů za vzniku částečně methylovaných acetylovaných alditolů (Shiomi *et al.*, 1976; Sims *et al.*, 2001; Lopez *et al.*, 2003). Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight) zatím vykazuje nejlepší výsledky určení molekulové hmotnosti a DP. Názorným příkladem je určení molekulárních struktur fruktanů kombinací výše zmíněných technik v *Agave tequilana*, kde bylo stanoveno DP 3-29 (Lopez *et al.*, 2003).

Kapalinová chromatografie je nejčastěji využívána pro identifikaci a kvantifikaci FOS, kdy mnohostupňovou nebo kontinuální extrakci následuje enzymová nebo kyselá hydrolyza. Pomocí opakované HPLC se kvantifikuje obsah volné fruktosy a glukosy před a po hydrolyze. Analýza fruktanů s vysokým DP je nemalým problémem, díky obtížné separaci dlouhých polymerů, jejich izomerů a nízkému rozlišení. Značnou překážkou je i absence příslušných komerčních standardů. Ve výsledku má kvantifikace FOS o vyšším DP semikvantitativní charakter (Muir *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2011). Z metod kapalinové chromatografie se nejčastěji využívá HPAEC-PAD. Separace je zajištěna na základě interakce indukovaného dipólu v rámci fruktanových molekul s nabitými skupinami na povrchu stacionární fáze kolon. Využívají se tři přístupy HPAEC-PAD, kdy prvním způsobem je přímá detekce krátkých FOS srovnáním s retenčním časem standardu. Avšak komerční standardy lze pořídit pouze inulinu s maximálním DP 9 od firmy Carbosynth (VB; Pöhlner *et al.*, 2017). Při druhém přístupu se pro identifikaci využívá částečné hydrolyzy dlouhých fruktanů, analýza jejich produktů a porovnání chromatografických spekter před a po hydrolyze. Hydrolyzovat je možné enzymově, např. inulinasou (EC 3.2.1.7; 1-β-D-fruktanfruktanhydrolasa) z *Aspergillus niger*, anebo se využívá kyselá

hydrolýzy (Ernst *et al.*, 1998; Pöhl *et al.*, 2017). Třetím tzv. nepřímým přístupem se zjišťuje celková suma fruktanů po absolutní hydrolýze až na volnou glukosu a fruktosu. Nicméně přesná kvantifikace je závislá na stanovení nebo odstranění volných monosacharidů před samotnou hydrolýzou fruktanů (Monti *et al.*, 2005; Muir *et al.*, 2007).

Ve srovnání s HPLC je spektrofotometrie mnohem jednodušší, rychlejší a levnější na přístrojové vybavení. McCleary a Blakeney (1999) vyvinuli spektrofotometrickou metodu stanovení celkové sumy fruktanů, která je nyní považována za oficiální metodu AOAC (Association of Official Analytical Chemists) pod označením 999.03 a je dostupná ve formě kitu vyráběného irskou firmou Megazyme. Fruktany jsou extrahovány horkou destilovanou vodou. Následuje odstranění sacharosy, škrobu a redukujících cukrů specifickými enzymy. Sacharosa je hydrolyzována invertasou, která nevykazuje žádnou aktivitu vůči FOS s nízkým DP typu 1-kestosa. Škrob je hydrolyzován β -amylasou a pullulanasou (EC 3.2.1.41) na maltosu a maltotriosu, které jsou dále štěpeny až na D-glukosu maltasou (EC 3.2.1.20). Vzniklé D-glukosa a D-fruktosa jsou následně redukovány tetrahydroboritanem sodným na alkoholové cukry D-sorbitol a D-mannitol. Po odstranění interferujících látek jsou fruktany hydrolyzovány směsí rekombinantních enzymů exoinuliny (EC 3.2.1.80) a endoinuliny (EC 3.2.1.7). D-fruktosa a D-glukosa jsou stanoveny kolorimetrickou metodou redukujících sacharidů PAHBAH (4-hydroxybenzhydrazid). Reakce probíhá za horka v alkalickém prostředí a přítomnosti vápenatých iontů, kde dochází k degradaci sacharidů a jejich reakci s PAHBAH. Formují se vápenaté cheláty aniontů bis(4-hydroxybenzoyl)hydrazonů glyoxalu (Obr. 17) a methyl nebo dimethylglyoxalu, které mají intenzivně žluté zbarvení a absorpční maximum při 410 nm (Lever, 1973; Hartmann *et al.*, 1994; McCleary *et al.*, 2000).



Obr. 17 Bis(4-hydroxybenzoyl)hydrazon glyoxalu.

2.5 Rostlinný metabolismus fruktooligosacharidů a fruktanů

Glykosidasy hydrolyzující O- a S-glykosyly (GH; EC 3.2.1.-) štěpí glykosidovou vazbu mezi dvěma monosacharidy anebo mezi sacharidem a aglykonem. Klasifikace těchto enzymů je založena na podobnosti aminokyselinové sekvence. Glykosidasy se dále dělí do rodin, kde rodina GH32 mimo invertasy a fruktanexohydrolas (FEH) obsahuje i fruktosyltransferasy (FT; EC 2.4.1.-; Carbohydrate-Active enZYMes Database). Syntéza i degradace fruktanů probíhá ve vakuolách (Frehner *et al.*, 1984).

2.5.1 Enzymy syntézy

Syntéza strukturně komplexních fruktanů je dosažena kooperací enzymů fruktosyltransferasy. Dráha začíná dvěma molekulami sacharosy, kdy jedna vystupuje jako substrát a druhá jako donor fruktosy. První transferasová reakce enzymu sacharosa:sacharosa-1-fruktosyltransferasa (1-SST; EC 2.4.1.99) produkuje 1-kestosu. Enzym fruktan:fruktan-1-fruktosyltransferasa (1-FFT; EC 2.4.1.100) dále prodlužuje řetězec tak, že využívá 1-kestosu nebo fruktany o vyšším DP jako fruktosové donory a fruktany o různé délce řetězců nebo sacharosu jako akceptory. Enzymy 1-SST a 1-FFT jsou dostačující pro syntézu nejjednoduššího fruktanu inulinu (Henry a Darbyshire, 1980).

Syntéza levanu zahrnuje aktivitu enzymů sacharosa:sacharosa-6-fruktosyltransferasa (6-SST; EC 2.4.1.-) a sacharosa:fruktan-6-fruktosyltransferasa (6-SFT; EC 2.4.1.10) s produktem 6-kestosa. Biosyntéza bifurkosy, nejjednoduššího větveného fruktanu, je katalyzována 6-SFT, kde 1-kestosa vystupuje jako substrát (Duchateau *et al.*, 1995).

Enzym fruktan:fruktan-6G-fruktosyltransferasa (6G-FFT; EC 2.4.1.243) produkuje neokestosu, která je prekurzorem neosérií (Shiomi, 1989).

2.5.2 Enzymy degradace

Katalýza fruktanexohydrolas (FEH) je založena na hydrolýze terminální fruktosy z fruktanového řetězce, kdy akceptorem je molekula vody. Aktivita FEH je spojena s funkcí fruktanů a FOS v rostlinách (viz kapitola 2.4.2), tzn. dodávají energii během rostlinného růstu, udržují osmotický tlak ve vakuolách a modulují množství oligofruktanů při oxidativním a mrazovém stresu (Asega *et al.*, 2011).

Kyselá invertasy (kapitola 2.3.2.2) mohou kromě sacharosy štěpit i 1-kestosu, neokestosu nebo dokonce vykazují reziduální aktivitu vůči inulinu a levanu. I když jsou

FEH lokalizovány ve vakuolách, mají největší strukturní podobnost s invertasou buněčné stěny. Avšak všechny dosud purifikované rostlinné FEH nejsou schopné hydrolyzy sacharosy (Van den Ende *et al.*, 2002; De Coninck *et al.*, 2005).

FEH se dělí na základě toho, jaký typ vazby štěpí. Fruktan- β -(2,1)-fruktosidasa (1-FEH, 1-fructan exohydrolase; EC 3.2.1.153) hydrolyzuje inuliny s vazbou β (2 \rightarrow 1) (De Roover *et al.*, 1999). Fruktan- β -(2,6)-fruktosidasa (6-FEH, 6-fructan exohydrolase; EC 3.2.1.154) se vyznačuje preferenční hydrolyzou levanových vazeb β (2 \rightarrow 6) (Van Riet *et al.*, 2006). V pšenici seté byla identifikována exohydrolasa s extrémní substrátovou specifitou pro 6-kestosu (6-KEH, 6-kestose exohydrolase; Van den Ende *et al.*, 2005). Dále byla v pšenici objevena exohydrolasa schopná hydrolyzy obou typů vazeb (1&6-FEH), kdy nejlepším substrátem byla bifurkosa (Kawakami *et al.*, 2005).

Překvapivě 6-FEH a 1&6-FEH byly purifikovány a klonovány i z rostlin, u kterých nebyla prokázána přítomnost fruktanů, např. *Arabidopsis thaliana*. Klonované a purifikované enzymy hydrolyzovaly fruktany ale ne sacharosu (De Coninck *et al.*, 2005). Jejich funkce ještě nebyla zcela objasněna. Je možné, že mají roli v regulaci vývojových procesů, metabolismu škrobu nebo nepřímé aktivaci invertasy buněčné stěny (Le Roy *et al.*, 2013).

2.5.3 Posklizňový metabolismus cibule kuchyňské

Účelem růstu zásobního orgánu cibule je přežití zimního období ve stavu dormance, která je charakterizována jako období klidu, při kterém cibule neroste. Dormantní cibule jsou metabolicky aktivní na velmi nízké hladině. Dormanci lze rozdělit na endodormanci závislou na vnitřním stavu cibule a ekodormanci závislou na vnějších environmentálních faktorech. Teplota má výrazný efekt na délku dormance, kdy je obecně klíčení inhibováno jak nízkými, tak vysokými teplotami. Délka dormance je odlišná mezi jednotlivými roky i kultivary, kdy její konec je spojen s vnitřními změnami a následným klíčením a obnoveným růstem listů (Chope *et al.*, 2006; Chope *et al.*, 2012).

Mnoho fyziologických a biochemických vlastností se mění během skladování cibule, např. pevnost cibule, obsah vody, koncentrace chuťových látek, sacharidů a rostlinných růstových regulátorů. Zmíněné změny jsou pravděpodobně spojeny s respirací a remobilizací sacharidů potřebných k růstu výhonku. Fluktuační klíčových metabolitů by mohla být využita k predikci počátku klíčení. Momentálně neexistuje biochemická nebo molekulární esej přesné predikce klíčení, přestože byla navržena řada parametrů či metod stanovení markerů konce dormance, např. poměr koncentrací

monosacharidů/disacharidů, koncentrace zeatin-ribosidu, snížení koncentrace sacharosy, zvýšení respirace a exohydrolasové aktivity nebo využití diagnostického DNA čipu (Chope *et al.*, 2006; Abrameto *et al.*, 2010; Chope *et al.*, 2012).

Cibule ukládá sacharidy převážně ve formě FOS, k jejichž akumulaci dochází během růstu zásobního orgánu. Během skladování jsou FOS postupně katabolizovány a zvětšuje se zastoupení malých sacharidů. V klíčích cibulích byla pozorována výraznější degradace fruktanů na glukosu a fruktosu, které mají funkci osmoregulatorů a energie nutné pro klíčení (Ernst *et al.*, 1998). Na druhou stranu Chope *et al.* (2006) pozorovali během uskladnění i vzrůst obsahu fruktanů. Rozdíl v obsahu je možný díky odlišné reakci každého kultivaru na vnější podmínky. FOS jsou hlavní složkou cibule a jsou považovány za dobrý index predikce trvanlivosti, konce dormance a kontroly kvality. Odrůdy s vysokou koncentrací redukujících cukrů jsou obvykle sladší a distribuují se čerstvé na trh. Naopak cibule s vysokým obsahem sušiny jsou vhodné k dehydratování nebo dlouhodobému skladování (Benkeblia *et al.*, 2005a; Revanna *et al.*, 2013).

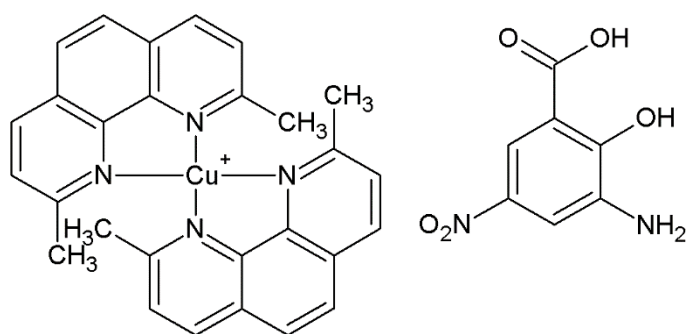
Průběh posklizňového metabolismu sacharidů v cibuli z hlediska enzymové regulace je v literatuře dosud málo popsán. Benkeblia *et al.* (2005a) zaznamenali nízkou aktivitu 1-FEH, která se na dva týdny prudce zvedla, a následně poklesla na hladiny pozorované v prvních týdnech dormance. Tento vzrůst aktivity může být spojen s koncem dormance před pozorovaným klíčením. Benkeblia *et al.* (2005b) porovnávali aktivitu katabolických (1-FEH a aktivita hydrolýzy 1-kestosy) i anabolických (1-FFT, 6G-FFT) enzymů během skladování. Rovnováha aktivit enzymů zapojených jak do biosyntézy, tak i degradace hraje významnou roli ve výsledném zastoupení sacharidů. Poměr aktivit enzymů degradace a syntézy ukázal, že se během 12. týdne skladování rovnováha výrazně posunula směrem k hydrolytickým enzymům. Výsledky byly v souladu s Benkeblia *et al.* (2005a).

2.5.4 Metody měření enzymové aktivity fruktan- β -(2,1)-fruktosidasy

Purifikace 1-FEH je založena na extrakci acetátovým (Krivorotova a Sereikaite, 2014) anebo citrát-fosfátovým puforem (Benkeblia *et al.*, 2005b). Precipitace síranem amonným je nejčastěji následována afinitní chromatografií na Konkanavalinu A a iontoměničovou chromatografií na Mono Q koloně (De Roover *et al.*, 1999; Van den Ende *et al.*, 2003). Krivorotova a Sereikaite (2014) stanovovali exohydrolasovou aktivitu v surových extraktech. Extrakty jsou obvykle dále dialyzovány (Gasperl *et al.*, 2015) nebo zakoncentrovány použitím centrifugačních filtrů (Benkeblia *et al.*, 2005b).

Měření enzymové aktivity 1-FEH je založeno na stanovení uvolněné fruktosy případně glukosy. Většina popsaných esejí využívají HPLC metody nejčastěji HPAEC-PAD (Van den Ende *et al.*, 2003; Benkeblia *et al.*, 2005b; Verspreet *et al.*, 2013).

Ve srovnání s HPLC jsou spektrofotometrické metody stanovení aktivity mnohem jednodušší. Neokuproinová metoda stanovení redukujících sacharidů je založena na redukci Cu^{2+} redukujícími sacharidy a tvorbě barveného komplexu Cu^+ -neokuproin (Obr. 18), jehož absorpance je měřena při 450 nm. Dalším způsobem stanovení redukujících sacharidů je metoda 3,5-dinitrosalicylové kyseliny (DNS). DNS metoda spočívá v oxidaci aldehydové skupiny na karboxylovou kyselinu redukujících sacharidů a redukci DNS na barevnou sloučeninu 3-amino-5-nitrosalicylovou kyselinu (540 nm, Obr. 18). Enzymové stanovení fruktosy využívá sledu enzymových reakcí, kdy v prvním kroku je fruktosa fosforylována hexokinasou (HXK; EC 2.7.1.1), následuje přeměna reakčního produktu fruktosa-6-fosfátu na glukosa-6-fosfát fosfoglukoisomerasou (PGI; EC 5.3.1.9). V dalším kroku je glukosa-6-fosfát oxidována na glukonát-6-fosfát v přítomnosti NADP^+ glukosa-6-fosfátdehydrogenasou (G6PDH; EC 1.1.1.49). Absorbance vzniklého NADPH je měřena při 340 nm (Lothier *et al.*, 2010). Při standardním měření aktivity 1-FEH nejdříve proběhne enzymová reakce a následně se stanoví množství uvolněné fruktosy. Gasperl *et al.* (2015) vyvinuli kinetické měření aktivity v rostlinných extraktech na mikrotitrační destičce. Stanovení bylo založeno na enzymové metodě, kterou popsali Lothier *et al.* (2010).



Obr. 18 Strukturální vzorce komplexu Cu^+ -neokuproin (vlevo) a 3-amino-5-nitrosalicylové kyseliny (vpravo).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

4-Hydroxybenzhydrazid (PAHBAH; Sigma-Aldrich, USA)

Acetonitril (Lach-Ner, Česká republika)

Citronan sodný dihydrát (VWR International, USA)

D-Fruktosa (Lach-Ner, Česká republika)

D-Glukosa monohydrát (Lach-Ner, Česká republika)

Fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; Sigma-Aldrich, USA)

Glycin (Lach-Ner, Česká republika)

Hydroxid sodný (Lach-Ner, Česká republika)

Chlorid vápenatý hexahydrát (Lach-Ner, Česká republika)

Inulin (Megazyme, Irsko)

Kit pro stanovení D-fruktosy a D-glukosy (Megazyme, Irsko)

Kit pro stanovení fruktanů (Megazyme, Irsko)

Kvercetin dihydrát (Extrasynthese, Francie)

Kvercetin-3,4'-O-diglukosid (Extrasynthese, Francie)

Kvercetin-4'-O-glukosid (Extrasynthese, Francie)

Kyselina 3,5-dinitrosalicylová (DNS; Sigma-Aldrich, USA)

Kyselina ethylendiamintetraoctová disodná sůl dihydrát (Chelaton III; Lach-Ner, Česká republika)

Kyselina chlorovodíková 35 % (Lach-Ner, Česká republika)

Kyselina maleinová (Sigma-Aldrich, USA)

Kyselina mravenčí 98-100 % (Merck KGaA, Německo)

Kyselina octová 99 % (Lach-Ner, Česká republika)

Ledová kyselina octová pro HPLC (VWR International, USA)

Methanol (Sigma-Aldrich, USA)

Mili-Q voda (laboratoř Centra regionu Haná)

Neokuproin hydrochlorid monohydrát (Sigma-Aldrich, USA)

Octan sodný trihydrát (Lach-Ner, Česká republika)

Sacharosa (Lach-Ner, Česká republika)

Síran měďnatý pentahydrát (PENTA, Česká republika)

Tetrahydroboritan sodný (Sigma-Aldrich, USA)

Uhličitan sodný (Lach-Ner, Česká republika)

Vinan sodno-draselný (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.2 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy XA 110/2X (Radwag, Polsko)

Centrifuga 5804 R (Eppendorf, Německo)

Centrifuga Microspin 12 (Biosan, Litva)

Centrifugační koncentrátor CentriVap (Labconco, USA)

Destičky s těsnící fólií WebSeal (96 jamek; Thermo Fisher Scientific, USA)

ELSD detektor 3300 (Alltech, USA)

Chromatografická kolona Kinetex EVO C18 s předkolonou (150 x 2,1 mm, 2,6 μm; Phenomenex, USA)

Chromatografická kolona Rezex RCM monosacharide Ca²⁺ (8 %) s předkolonou (100 x 7,8 mm, 8 μm; Phenomenex, USA)

Injekční stříkačka 2 ml (B. Braun, Německo)

Kapalinový chromatograf Dionex UltiMate 3000 s detektorem diodového pole (Thermo Fisher Scientific, USA)

Kapalinový chromatograf Smartline (Knauer, Německo)

Lyofilizátor BETA 1-8 LD plus (Pragolab, Česká republika)

Magnetická míchačka s ohřevem MSH-300 (Biosan, Litva)

Míchaná vodní lázeň WB-4MS (Biosan, Litva)

Mikrocentrifuga Prism chlazená vzduchem (Labnet International, USA)

Orbitální třepačka s inkubací ES-20 (Biosan, Litva)

Oscilační mlýn MM 400 (Retsch, Německo)

Parafilm (Sigma-Aldrich, USA)

pH-metr CX505 (Elmetron, Polsko)

Pipety (Eppendorf, Německo)

Skleněné zkumavky (12 x 75 mm; Fisherbrand, USA)

Software Clarity verze 6.1 (DataApex, Česká republika)

Software Thermo Xcalibur verze 3.1 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Spektrofotometr S-20 (Biotech, Česká republika)

Statistický software STATISTICA verze 13.3 (TIBCO Software, USA)

Stříkačkové filtry CHS 0,22 µm (Filter Pure Systems, USA)

Termostat HPLC CROCO-CIL (Ercatech AG, Švýcarsko)

Tyčový mixér DG3 Spiraglio (Moulinex, Francie)

Ultrazvuková čistička Sonorex Digitec (Bandelin, Německo)

Vortex V-1 plus (Biosan, Litva)

3.1.3 Biologický materiál

Tab. 2 Kultivary cibule šalotky (*Allium cepa* var. *aggregatum* L.)

Polní číslo	Název*	Evidenční číslo*	Země původu*
3000	Gazda	09H0200017	Maďarsko
3001	Milka 61-100is - selection	09H0200311	Československo
3002	Milka 31 - 60is	09H0200001	Česko
3003	Cervena (Milka x Karmen, r)	09H0200016	Česko
3004	landrace (Chodska 1)	09H0200304	Československo
3005	landrace (ROM 1)	09H0200018	Rumunsko
3006	landrace (Sandra)	09H0200278	Norsko
3007	Schalotte (AUT 1)	09H0200009	Rakousko
3008	landrace (Minnesund)	09H0200276	Norsko
3009	landrace (Stend 1)	09H0200265	Norsko
3012	Milka R 61 - 100is	09H0200002	Česko
3013	Milka (orig.)	09H0200004	Česko
3014	landrace (Fjeberg)	09H0200280	Norsko
3015	Jermor	09H0200912	Francie
3018	Zluta	09H0200008	Česko
3019	Auddorpse Bruine	09H0200178	Nizozemsko
3020	landrace (V870231)	09H0200598	Finsko
3021	landrace (Ulefoss)	09H0200310	Norsko
3022	landrace (V840351)	09H0200603	Finsko
3023	Schalotte Gelbe	09H0200006	Rakousko
3024	Noordhollandse Strogele	09H0200179	Nizozemsko
3025	Milka (orig. II)	09H0200011	Česko
3026	landrace (Vestnes 1)	09H0200195	Norsko
3027	Dunn's Giant	09H0200010	Velká Británie
3028	Thuringer (DDR 1)	09H0200014	Německo
3029	Schalotte (AUT 2)	09H0200012	Rakousko
3030	landrace (Volbu)	09H0200279	Norsko
3031	landrace (Orskog 3)	09H0200309	Norsko
3032	Gelbe Osterreichische	09H0200007	Rakousko
3033	landrace (Chodska 2)	09H0200572	Československo
3034	landrace (Sumperska)	09H0200180	Československo
3035	landrace (Flesberg)	09H0200282	Norsko
3036	landrace (V871111)	09H0200665	Finsko
3037	landrace (Kvaloysletta)	09H0200201	Norsko
3040	landrace (Borkenes)	09H0200199	Norsko
3041	landrace (Sondre Akershus)	09H0200430	Norsko
3042	landrace (Vestnes 2)	09H0200306	Norsko
3043	landrace (Hordaland)	09H0200432	Norsko
3044	landrace (A840351)	09H0200604	Finsko
3052	landrace (V850721)	09H0200627	Finsko

Tab. 2 Kultivary cibule šalotky (*Allium cepa* var. *aggregatum* L.) (pokračování)

Polní číslo	Název*	Evidenční číslo*	Země původu*
3055	landrace (V891171)	09H0200865	Finsko
3089	Frog's Legs Shalotts	09H0200303	USA
3090	landrace (Thuringer)	09H0200998	Německo
3092	D-7-126 nsl	09H0201957	Postsovětské republiky
3093	landrace (Chodska)	09H0201958	Česko
3095	landrace (Sumenep)	09H0201960	Indonésie
3097	landrace	09H0200963	Postsovětské republiky
3098	Sibirskij Zoltyj	09H0201955	Postsovětské republiky
3099	Sibirskii Zoltyj	09H0200962	Postsovětské republiky
3100	D-7-126 nsl	09H0200964	Postsovětské republiky
3101	D-7-126 nsl	09H0200965	Postsovětské republiky
3102	D-7-126 nsl	09H0200966	Postsovětské republiky
3103	D-7-126 nsl	09H0200967	Postsovětské republiky
3104	landrace (Chodska)	09H0200968	Česko
3105	landrace (Chodska)	09H0200969	Česko
3107	landrace (Chodska)	09H0200971	Česko
3108	landrace (Chodska)	09H0200972	Česko
3109	landrace (Thuringer)	09H0200973	Německo
3110	landrace (Thuringer)	09H0200974	Německo
3111	landrace (Thuringer)	09H0200975	Německo
3113	landrace (Thuringer)	09H0200977	Německo
3114	Milka	09H0200978	Česko
3115	Milka	09H0200979	Česko
3116	Milka	09H0200980	Česko
3117	Milka	09H0200981	Česko
3118	Milka	09H0200982	Česko
3119	landrace	09H0200983	Indonésie
3120	landrace	09H0200984	Indonésie
3121	landrace	09H0200985	Indonésie
3122	landrace	09H0200986	Indonésie
3123	landrace	09H0200987	Indonésie
3124	landrace	09H0200988	Indonésie
3125	landrace	09H0200989	Indonésie
3126	landrace	09H0200990	Indonésie
3127	landrace	09H0200991	Indonésie
3128	landrace	09H0200992	Indonésie
3130	landrace (Cvek)	09H0200994	Česko
3131	landrace (Stencel)	09H0200995	Česko
3132	landrace (Dostalek)	09H0200996	Slovensko
3133	landrace (POLKIE99 20 44)	09H0200997	Polsko
3134	landrace (Starosvetska)	09H0201962	Česko
3137	landrace Penzesgyor	09H0201965	Maďarsko
3138	landrace Penzesgyor 1	09H0201966	Maďarsko
3139	landrace Penzesgyor 2	09H0201967	Maďarsko
3140	landrace Zalavar	09H0201968	Maďarsko
-	Prisma F1	-	-
-	Ambition F1	-	-

* Název, evidenční číslo kultivaru a země původu jsou uvedeny v informačním systému genetických zdrojů rostlin České republiky GRIN Czech 1.9.1.

Tab. 3 Kultivary cibule kuchyňské (*Allium cepa*)

Název	Evidenční číslo*	Země původu*
Albienka	-	-
Karmen	09H0200083	Česko
Všetana	09H0200812	Československo

* Evidenční číslo a země původu jsou v informačním systému genetických zdrojů rostlin České republiky GRIN Czech 1.9.1.

Rostlinný materiál pocházel z genetických zdrojů zelenin Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i. v Olomouci. Pro stanovení enzymové aktivity byla cibule šalotka „Gourmet“ zakoupena v Makru.

3.2 Metody

3.2.1 Zpracování rostlinného materiálu

Reprezentativní vzorek byl z rostlinného materiálu získán výběrem pěti cibulí, které byly zbaveny vnějších suchých suknic, nakrájeny na malé kousky a 72 hodin lyofilizovány do konstantní hmotnosti. Materiál byl homogenizován oscilačním mlýnem za použití patron a kuliček po dobu 3 min při 25 Hz a skladován při laboratorní teplotě. Lyofilizovaný prášek byl využit pro screening glukosidů kvercetinu, malých sacharidů a fruktanů.

3.2.2 Analýza glukosidů kvercetinu HPLC-UV

Glukosidy kvercetinu byly extrahovány 0,5 ml 70% methanolu z 10 mg homogenizovaného rostlinného materiálu. Po přidavku rozpouštědla byla směs zvortexována, 15 minut sonifikována a centrifugována (10 min, 21200 g, 20 °C). Supernatant byl desetkrát zředěn 70% methanolem do 96-jamkové destičky. Následovala analýza na kapalinovém chromatografu Dionex UltiMate 3000 s UV detekcí.

Analyty byly separovány na koloně Kinetex EVO C18 (150 x 2,1 mm, 2,6 µm) vyhřívané na 25 °C a chráněné předkolonou C18. Dávkováno bylo 10 µl vzorku. Mobilní fáze A byl 0,1% vodný roztok kyseliny mravenčí a mobilní fáze B byla 0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu. Průtok mobilní fáze byl 0,3 ml·min⁻¹ s gradientovou elucí, kdy v čase 0-8 min byla mobilní fáze složena z 5 % B, v čase 8-8,1 min 61,5 % B, 8,1-10,2 min 100 % B a 10,2-15 min 5 % B. Spektra byla snímána při vlnových délkách 255 a 270 nm a vyhodnocena v modulu Quan Browser softwaru Xcalibur (verze 3.1).

$$LOD = \frac{3 \cdot \sigma}{\phi}$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot \sigma}{\phi}$$

Obr. 19 Matematické vzorce výpočtu meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ; σ – směrodatná odchylka posunu, ϕ – průměr směrnice).

Kvercetin-3,4'-O-diglukosid (QDG), kvercetin-4'-O-glukosid (QMG) a aglykon kvercetinu (Q) byly identifikovány na základě retenčního času standardu. Kvantifikace byla provedena metodou externí kalibrační přímky s body 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1, 5, 10 a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Body kalibrační přímky byly získány zředěním zásobního roztoku standardů o koncentraci 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 70% methanolem. Každé měření bylo třikrát zopakováno.

Mez detekce (LOD; limit of detection) a mez stanovitelnosti (LOQ; limit of quantification) byly určeny pomocí směrodatné odchylky posunu (σ) a průměru směrnice (ϕ) z rovnice lineární regrese kalibrační přímky podle Araujo (2009). Vzorce výpočtu LOD a LOQ jsou na Obr. 19.

3.2.3 Optimalizace odezvy detektoru ELSD

Průtok plynu (dusíku) a teplota detektoru byly parametry optimalizace odezvy detektoru ELSD 3300. Pro stanovení byl použit bod kalibrační přímky o koncentraci 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Separace sacharosy, glukosy a fruktosy na koloně Rezex RCM monosacharide Ca^{2+} byla provedena podle postupu popsaneho v kapitole 3.2.4.

Optimalizace byla provedena tak, že byl postupně měněn jeden parametr, zatímco druhý byl konstantní (tj. teplota 80 °C, průtok plynu 2 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$). Teplota detektoru byla nastavena na 90, 80, 70, 60, 50, 40 a 30 °C. Pro stanovení vhodného průtoku plynu byly zvoleny průtoky 1,5; 2,0 a 2,5 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Každé měření bylo zopakováno třikrát a pro analýzu sacharidů byly zvoleny hodnoty průtoku a teploty na základě velikosti ploch píků a šumu.

3.2.4 Analýza malých sacharidů HPLC-ELSD

Malé sacharidy byly extrahovány pomocí ultrazvuku z 10 mg rostlinného materiálu 1 ml 62,5% methanolu po dobu 15 minut. Vzorky byly následně centrifugovány (10 min, 21200 g, 20 °C). Supernatant o objemu 500 μl byl odpipetován a vakuově odpařen na centrifugačním koncentrátoru při 40 °C. Před HPLC analýzou byly vzorky rozpuštěny

ve stejném objemu Mili-Q vody, zvortexovány, 5 min sonifikovány a zfiltrány do vialek za použití injekčních stříkaček a filtrů o porozitě 0,22 μm .

Sacharidy byly separovány chromatografickým systémem Smartline na koloně Rezex RCM monosacharide Ca^{2+} (8 %, 100 x 7,8 mm, 8 μm), která byla vyhřívána na 80 °C. Kolona byla chráněna předkolonou (50 x 7,8 mm) se stejnou stacionární fází. Mobilní fází byla Mili-Q voda o průtoku 0,6 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Délka analýzy byla 20 min a bylo dávkováno 10 μl vzorku. Detekce ELSD byla provedena za optimalizovaných podmínek průtoku plynu 2 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ a teplotě detektoru 80 °C (kapitola 3.2.3).

Každý kultivar byl analyzován v triplicátu a výsledné chromatogramy byly vyhodnoceny v programu Clarity (verze 6.1). Sacharidy byly identifikovány na základě retenčních časů standardů a kvantifikovány pomocí rovnic externí kalibrace. Kalibrační řada byla připravena naředěním zásobního roztoku sacharosy, D-glukosy a D-fruktosy o koncentraci 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ Mili-Q vodou na kalibrační body 5; 2,5; 1; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05; 0,025 a 0,01 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Každý bod kalibrační přímky byl změřen třikrát.

Lineární dynamický rozsah byl stanoven na základě rovnice lineární regrese a koeficientu determinace R^2 . Mez detekce a mez stanovitelnosti byly určeny pomocí výběrové směrodatné odchylky posunu a průměru směrnice podle vzorců na Obr. 19.

3.2.5 Validace spektrofotometrického měření fruktanů

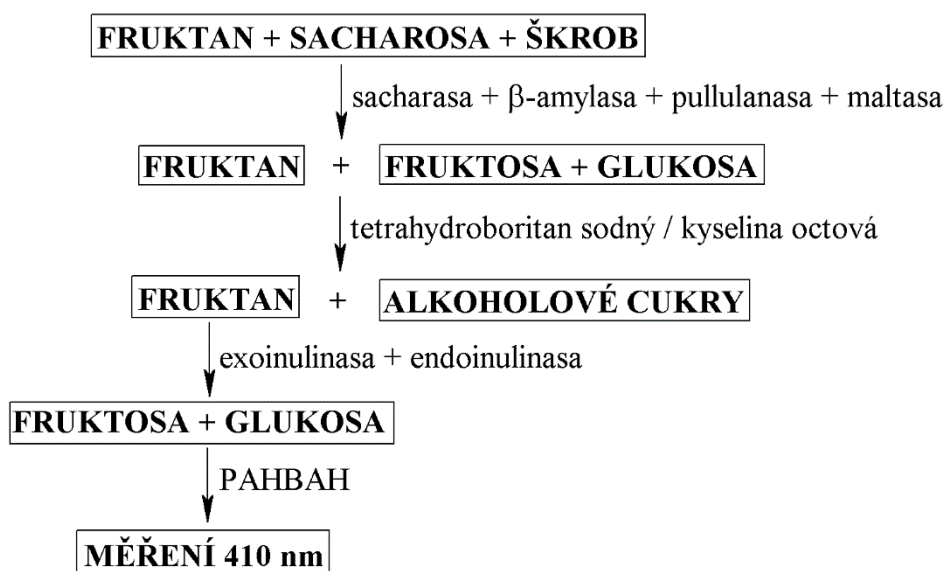
Fruktany byly stanoveny pomocí kitu firmy Megazyme. Validace metody byla provedena určením vychýlení měření (bias), opakovatelnosti, linearity, LOD a LOQ. Vychýlení měření bylo stanoveno opakovaným měřením standardu (šestkrát) o deklarovaném množství fruktanů 27,5 % (w/w). Opakovatelnost metody byla zjištěna měřením vzorku 3009 z roku 2016. Měření bylo zopakováno osmkrát v rozpětí dvou týdnů. Spektrofotometrické stanovení fruktanů bylo provedeno podle návodu výrobce, kde pro měření reálných vzorků bylo měřítko testu zmenšeno na 20 %. Parametry vychýlení měření a opakovatelnost byly testovány v původní i zmenšené podobě.

Lineární dynamický rozsah byl určen na základě kalibrační řady 0,5; 2, 10, 20, 40, 60 a 80 μg D-fruktosy a R^2 . Jednotlivé kalibrační body o výsledném objemu 300 μl byly připraveny smísením standardu D-fruktosy o koncentraci 1,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ v 0,2% (w/v) kyselině benzoové a acetátového pufru (100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 4,5; ledová kyselina octová a hydroxid sodný). Kalibrační řada byla připravena v pěti opakováních. LOD a LOQ byly vypočítány dle Araujo (2009), kde σ bylo nahrazeno výběrovou směrodatnou odchylkou opakovaného měření reakčního blanku (Obr. 19). Reakční blank byl připraven v pěti

opakováních napipetováním 300 μl acetátového pufru (100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 4,5). K bodům kalibrační řady i k reakčním blankům bylo následně přidáno 5 ml 4-hydroxybenzhydrazidu (PAHBAH) a vzorky byly inkubovány 5 minut při 100 °C. Po ochlazení byla změřena absorbance při 410 nm. Standardy fruktanu i D-fruktosy byly součástí kitu.

3.2.6 Spektrofotometrické měření fruktanů

Fruktany byly spektrofotometricky stanoveny podle kitu ve zmenšeném měřítku. Součástí kitu byly enzymové směsi ve formě lyofilizovaného prášku. Enzymová směs značená A obsahovala enzymy sacharasy, β -amylasu, pullulanasu a maltasu. Enzymy byly rozpuštěny v maleátovém pufru (100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 6,5; kyselina maleinová a hydroxid sodný). Enzymová směs B obsahovala exoinulinasu a endoinulinasu. Enzymy byly rozpuštěny acetátovým pufrem (100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 4,5). Ke stanovení redukujících sacharidů bylo využito činidlo PAHBAH, které bylo před měřením nachystáno smísením roztoků A a B v poměru 1 : 9. Roztok A byl připraven rozpuštěním 10 g PAHBAH v 60 ml destilované vody a 10 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Objem roztoku byl následně destilovanou vodou doplněn na 200 ml. Roztok B byl připraven rozpuštěním 12,5 g dihydrátu citronanu sodného a 1,6 g hexahydrátu chloridu vápenatého a 20 g hydroxidu sodného ve výsledném objemu 1 l destilované vody.



Obr. 20 Schéma spektrofotometrického měření fruktanů.

K naváženým 20 mg rostlinného materiálu bylo přidáno přibližně 7 ml horké destilované vody (80 °C). Fruktany byly extrahovány při 80 °C po dobu 15 min pomocí ultrazvuku. Extrakty byly ponechány stát při laboratorní teplotě. Po vychladnutí byly vzorky doplněny destilovanou vodou na 10 ml a alikvoty o objemu 1 ml byly centrifugovány (10 min, 12400 g, 20 °C). V čistých mikrozkušavkách bylo smíšeno 40 µl extraktu a 40 µl enzymové směsi A. Vzorky byly inkubovány 30 min při 40 °C na vodní lázni. V dalším kroku bylo ke vzorkům přidáno 40 µl tetrahydroboritanu sodného o koncentraci 10 mg·ml⁻¹ v hydroxidu sodném (50 mmol·l⁻¹). Reakční směs byla zvortexována a inkubována na vodní lázni (40 °C, 30 min). Po skončení inkubace bylo ke vzorkům přidáno 100 µl kyseliny octové (200 mmol·l⁻¹). Tato směs byla označena jako roztok S. Vzorky byly zvortexovány a rozpipetovány po 40 µl do tří skleněných zkumavek. Do jedné zkumavky bylo napipetováno 20 µl acetátového pufru (100 mmol·l⁻¹, pH 4,5; tzv. blank vzorku) a do zbývajících bylo přidáno 20 µl enzymové směsi B. Zkumavky byly zakryty parafilmem a inkubovány 30 min na vodní lázni při 40 °C. Nakonec byl ke vzorkům přidán 1 ml činidla PAHBAH, reakce byla inkubována 72 s na vařící vodní lázni. Po inkubaci byly vzorky vloženy na 5 minut do studené vody. Absorbance na spektrofotometru byla změřena při 410 nm. Obr. 20 znázorňuje schéma stanovení fruktanů.

Paralelně se vzorky byl připraven reakční blank (60 µl acetátového pufru) a standard D-fruktosy, kdy bylo 40 µl standardu D-fruktosy o koncentraci 1,5 mg·ml⁻¹ smíšeno s 180 µl acetátového pufru (100 mmol·l⁻¹, pH 4,5). Do tří zkumavek byly rozpipetovány alikvoty o objemu 40 µl (tj. 10,9 µg D-fruktosy), ke kterým bylo přidáno 20 µl acetátového pufru (100 mmol·l⁻¹, pH 4,5). K blanku i standardu D-fruktosy byl napipetován 1 ml PAHBAH.

$$\begin{aligned}
 \text{Fruktan (mg} \cdot 100 \text{ mg}^{-1} \text{ DW)} &= \Delta A \cdot F \cdot 25 \cdot V \cdot \frac{0,22}{0,04} \cdot \frac{100}{W} \cdot \frac{1}{1000} \cdot \frac{162}{180} \\
 &= \Delta A \cdot F \cdot \frac{V}{W} \cdot 12,38
 \end{aligned}$$

Obr. 21 Vzorec výpočtu sumy fruktanů (DW – sušina, ΔA = absorbance vzorku – absorbance blanku vzorku, F = 10,9 µg D-fruktosy / absorbance 10,9 µg D-fruktosy, V – objem extraktu, W – hmotnost navážky).

Suma fruktanů byla vypočítána podle vzorce na Obr. 21, kde ΔA znamená rozdíl absorbance vzorku a blanku vzorku, F je faktor přepočtu absorbance na μg D-fruktosy, 25 je přepočet odebraných 40 μl extraktu na 1 ml, V je celkový objem extraktu ($V = 10 \text{ ml}$), 0,22/0,04 je přepočet alikvotu o objemu 40 μl na 220 μl roztoku S, W znamená hmotnost navážky v mg, 100/W vyjadřuje množství fruktanů jako procenta hmotnosti navážky, 1/1000 konvertuje μg na mg, 162/180 přepočítává volnou D-fruktosu (D-glukosu) na anhydrofruktosu (anhydroglukosu) vyskytující se ve fruktanu.

3.2.7 Měření enzymové aktivity fruktan- β -(2,1)-fruktosidasy

3.2.7.1 Příprava enzymového extraktu

Enzymová aktivita byla stanovena v čerstvé šalotce „Gourmet“, která byla skladována při 2 °C. Cibule byly zbaveny vnějších suchých suknic a nakrájeny na menší kousky. Extrakce a další manipulace byly provedeny za současného chlazení ledem. Enzymový extrakt byl připraven homogenizací tyčovým mixérem 40 g čerstvé cibule s 40 ml vychlazeného acetátového pufru (0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 4,5; octan sodný a kyselina octová), který obsahoval 1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PMSF a 5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ chelatonu III. Homogenát byl zfiltrován přes tkaninu a alikvoty filtrátu byly centrifugovány (15 min, 20000 g, 4 °C). Supernatant byl dále využit pro enzymové eseje.

3.2.7.2 Enzymová esej

V mikrokumavkách bylo smíšeno 0,2 ml enzymového extraktu s 0,8 ml 3% (w/v) inulinu v acetátovém pufru (0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 4,5) nebo s 0,8 ml acetátového pufru (blank). Směsi byly inkubovány 3 h při 30 °C. Reakce byla ukončena pětiminutovou inkubací při 95 °C. Uvolněná fruktosa, respektive glukosa byly stanoveny pomocí čtyř metod: DNS, neokuproinová, HPLC-ELSD a komerčním kitem pro stanovení D-fruktosy a D-glukosy. Enzymová aktivita byla měřena ze tří samostatných izolací, kdy každé izolaci příslušely dva vzorky a jeden blank.

3.2.7.3 Kalibrační přímky D-fruktosy

Pro DNS metodu a kit byly z vodného roztoku D-fruktosy o koncentraci 6 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ připraveny kalibrační body 0, 0,1; 0,2; 0,4; 1, 2, 3 a 4 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. V případě neokuproinové metody byly body kalibrační přímky 0, 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 a 0,8 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Stejným způsobem byly připraveny i kalibrační přímky v 20% rostlinném extraktu. Rostlinný extrakt byl získán homogenizací 7,5 g nakrájené cibule s 25 ml vody. Homogenát byl ponechán 15 min při 80 °C a alikvoty byly centrifugovány (10 min, 12400 g, 20 °C).

Kalibrační přímky byly ve všech případech připraveny ve třech opakováních. Lineární dynamický rozsah, LOD a LOQ byly stanoveny stejným způsobem jako v případě malých sacharidů a glykosidů kvercetinu.

3.2.7.4 Metoda 3,5-dinitrosalicylové kyseliny (DNS)

DNS činidlo bylo připraveno rozpuštěním 0,5 g DNS a 15 g vinanu sodno-draselného ve 40 ml hydroxidu sodného o koncentraci 0,5 mol·l⁻¹. Roztok byl ponechán při 45 °C do úplného rozpuštění reagensů. Následně bylo činidlo ochlazené na laboratorní teplotu a doplněno destilovanou vodou do 50 ml.

Pro stanovení redukujících sacharidů bylo 0,2 ml vzorku přidáno k 0,8 ml DNS činidla. Směs byla zvortexována a inkubována 10 min při 95 °C. Po ochlazení mikrozkušavek byla změřena absorbance při 540 nm. Kvantifikace uvolněných sacharidů byla provedena podle kalibrační přímky (kapitola 3.2.7.3).

3.2.7.5 Neokuproinová metoda

Neokuproinová metoda byla založena na smísení dvou roztoků v poměru 1 : 1 před vlastním měřením. Roztok A byl připraven postupným rozpouštěním 1 g uhličitanu sodného, 0,4 g glycinu a 11,3 mg pentahydrátu síranu měďnatého ve 25 ml destilované vody. Roztok B byl nachystán rozpuštěním 30 mg monohydrátu neokuproin hydrochloridu ve 25 ml destilované vody.

Redukující sacharidy byly stanoveny patnáctiminutovou inkubací na vařící vodní lázni 0,4 ml činidla s 30 μl vzorku. Po inkubaci byla reakce zředěna 0,65 ml destilované vody a absorbance byla změřena při 450 nm. Kvantifikace uvolněných sacharidů byla provedena podle kalibrační přímky (kapitola 3.2.7.3).

3.2.7.6 Kit pro stanovení D-fruktosy a D-glukosy

Stanovení D-fruktosy a D-glukosy bylo provedeno podle kitu firmy Megazyme. Absorbance byly odečteny při 340 nm proti destilované vodě. Reagencie s výjimkou NADP⁺ / ATP byly použity tak, jak je dodal výrobce. Roztok NADP⁺ / ATP byl připraven rozpuštěním kofaktorů ve 12 ml destilované vody.

$$c = \frac{V \cdot \Delta A_{D\text{-glukosa}}}{\varepsilon \cdot d \cdot v} = \frac{2,32 \cdot \Delta A_{D\text{-glukosa}}}{6300 \cdot 1 \cdot 0,1}$$

Obr. 22 Vzorec výpočtu koncentrace glukosy ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; V – celkový objem reakce, ε – molární extinkční koeficient NADPH, d – dráha světelného paprsku v – objem vzorku).

Do plastové kyvety bylo napipetováno 2,1 ml destilované vody (blank) nebo 2 ml destilované vody a 0,1 ml vzorku. Další postup byl pro blank i vzorek stejný, kdy 0,1 ml pufru (pH 7,6) a 0,1 ml roztoku kofaktorů bylo napipetováno k reakční směsi, která byla promíchána a po 3 min byla změřena absorbance (A_1). Následně bylo přidáno 20 μl suspenze glukosa-6-fosfátdehydrogenasy a hexokinasy, reakce byla promíchána a po 5 min byla změřena absorbance (A_2). Nakonec ke směsi bylo napipetováno 20 μl suspenze fosfoglukoisomerasy a absorbance byla změřena po 10 min (A_3).

Pro výpočet koncentrace analytů byl nejdříve stanoven rozdíl A_2-A_1 pro blank i vzorek a rozdíl absorbance blanku byl odečten od rozdílu absorbance vzorku, tím byla získána $\Delta A_{D\text{-glukosa}}$. Stejným způsobem byl proveden výpočet A_3-A_2 a zjištění $\Delta A_{D\text{-fruktosa}}$. Uvolněná glukosa byla vypočítána podle vzorce na Obr. 22, kde V je celkový objem reakce ($V = 2,32 \text{ ml}$), ε je molární extinkční koeficient NADPH při 340 nm ($\varepsilon = 6300 \text{ l}^1\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), d odpovídá délce dráhy světelného paprsku ($d = 1 \text{ cm}$) a v je objem vzorku ($v = 0,1 \text{ ml}$). Uvolněná fruktosa byla stanovena metodou externí kalibrační přímky (kapitola 3.2.7.3).

3.2.7.7 Metoda HPLC-ELSD

Vzorky byly zfiltrány pomocí injekčních stříkaček a filtrů o porozitě 0,22 μm do 96-jamkové destičky. Uvolněná fruktosa a glukosa byly stanoveny metodou HPLC-ELSD tak, jak je popsáno v kapitole 3.2.4.

3.2.8 Statistické vyhodnocení

Data byla statisticky vyhodnocena pomocí softwaru STATISTICA (verze 13.3) a Microsoft Excel 2016. Byly využity nástroje popisné statistiky a tvorby grafů. Korelace byla vyjádřena na základě Pearsonova korelačního koeficientu. Pro hodnocení souborů dat mezi dvěma roky byl použit dvouvýběrový párový t-test. Variabilita dat byla zobrazena formou krabicového grafu na základě mediánu. Normalita dat byla stanovena pomocí histogramu a Shapirova-Wilkova testu normality. Mannův-Whitneyův U test byl využit k porovnání hladin metabolitů v šalotce s cibulí.

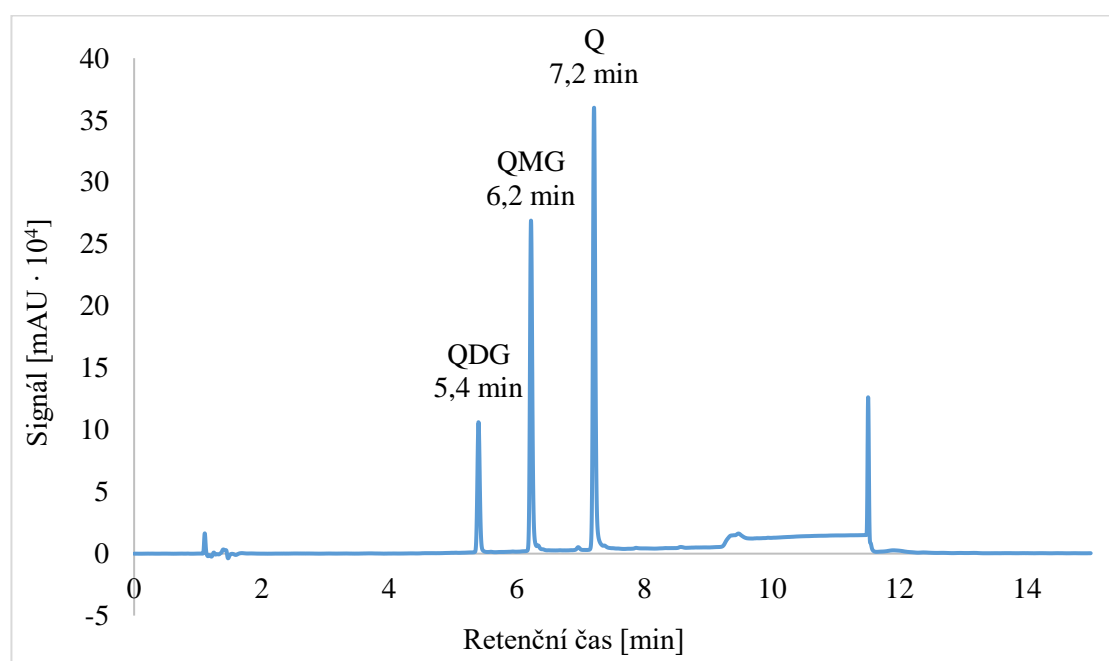
4 VÝSLEDKY

4.1 Metoda HPLC-UV stanovení glukosidů kvercetinu

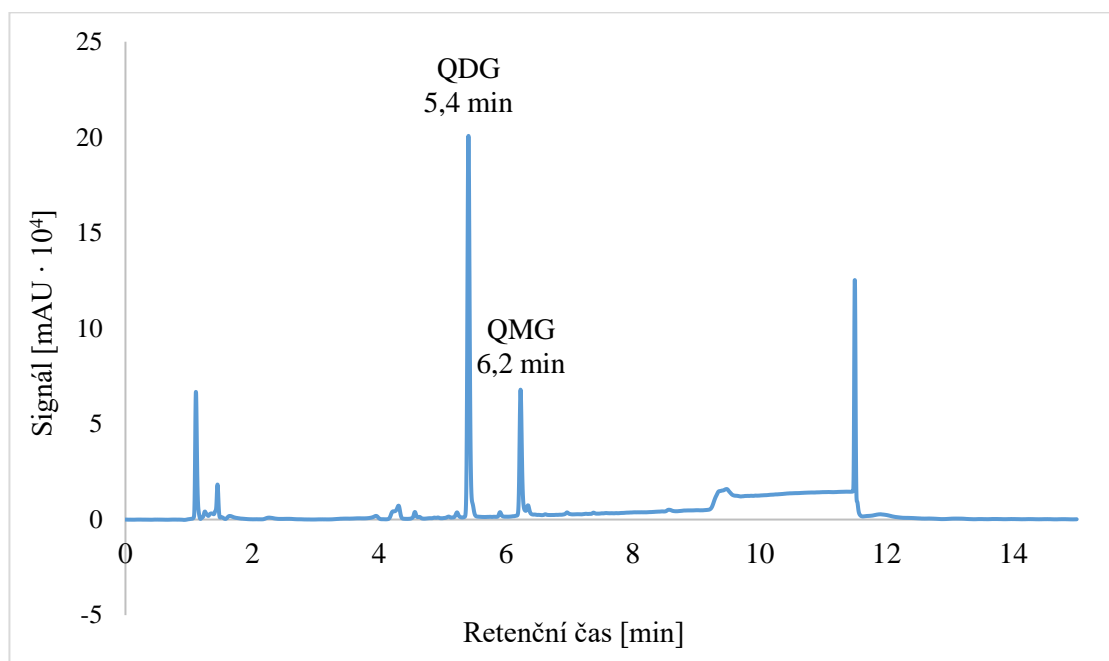
Metoda stanovení glukosidů kvercetinu vycházela z práce Caridi *et al.* (2007). Glukosidy byly extrahovány vodným roztokem methanolu a separovány na koloně C18 kapalinovou chromatografií s UV detekcí při vlnové délce 255 nm.

Na základě retenčních časů standardů byl identifikován kvercetin-3,4'-O-diglukosid (QDG) v čase 5,4 min, kvercetin-4'-O-glukosid (QMG) s retenčním časem 6,2 min a aglykon kvercetinu (Q) v čase 7,2 min. Chromatogramy separace směsi standardů o koncentraci $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a vzorku 3109 z roku 2017 jsou na Obr. 23 a Obr. 24.

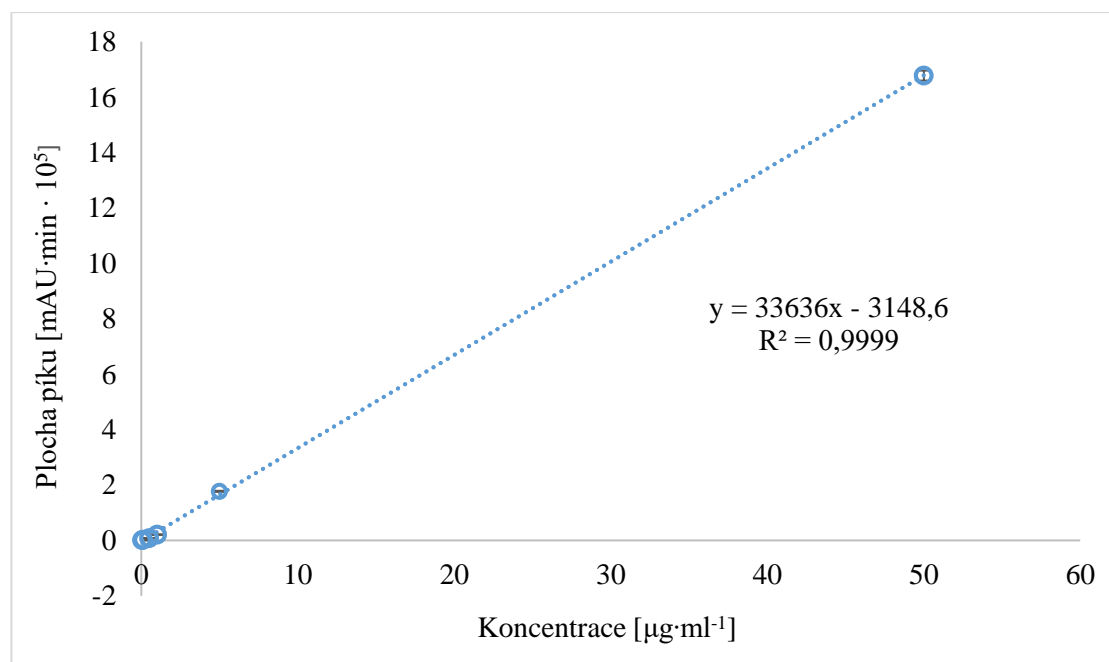
Glukosidy kvercetinu byly kvantifikovány metodou externí kalibrační přímky. Linearita byla pozorována v intervalu $0,05\text{-}50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u QDG a QMG, naopak v případě aglykonu kvercetinu byla závislost lineární v rozmezí $0,01\text{-}50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Obr. 25 zobrazuje kalibrační přímku QDG s rovnicí lineární regrese $y = 33636x - 3148,6$ a $R^2 = 0,9999$. QMG byl kvantifikován podle rovnice $y = 82514,9x - 11059,8$ ($R^2 = 0,9998$). Aglykon kvercetinu ($y = 115978x - 19352,8$; $R^2 = 0,9999$) nebyl detekován u žádného reálného vzorku. LOD a LOQ analytů byly stanoveny podle Araujo (2009) z rovnic lineární regrese. LOD pro QDG, QMG a aglykon kvercetinu byly 0,02; 0,01 a $0,08 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a LOQ byly stanoveny na 0,07; 0,03 a $0,24 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.



Obr. 23 Chromatogram separace směsi standardů o koncentraci $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (QDG – kvercetin-3,4'-O-diglukosid, QMG – kvercetin-4'-O-glukosid, Q – aglykon kvercetinu).



Obr. 24 Chromatogram separace vzorku 3109 z roku 2017 (QDG – kvercetin-3,4'-O-diglukosid, QMG – kvercetin-4'-O-glukosid).



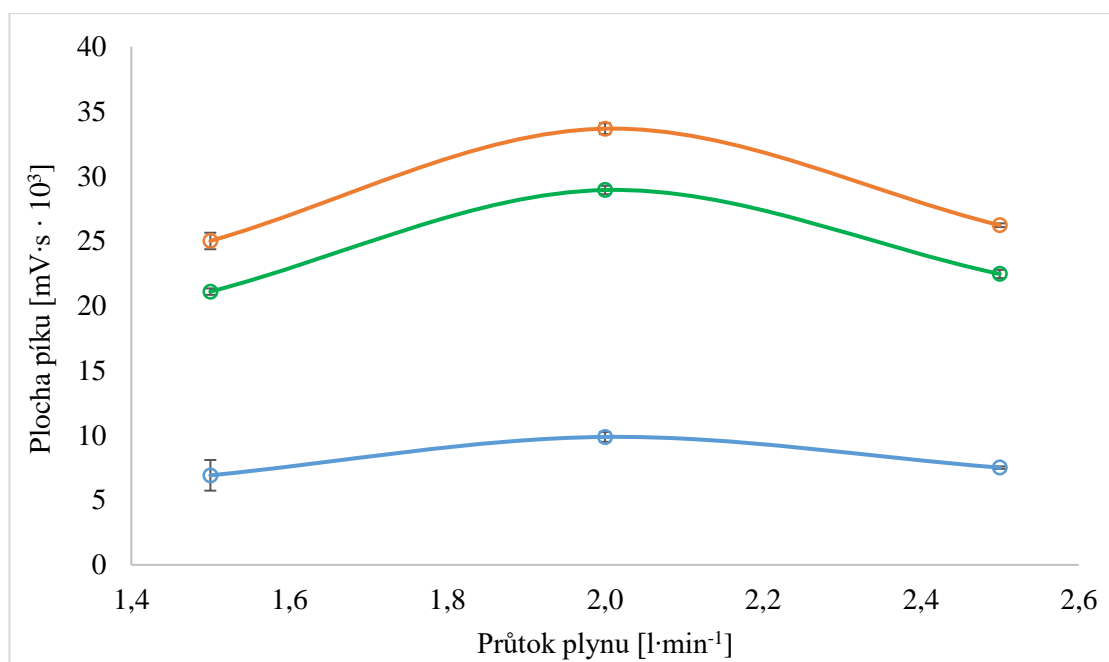
Obr. 25 Kalibrační přímka kvercetin-3,4'-O-diglukosidu (0,05-50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Chybové úsečky vyznačují směrodatnou odchylku ze tří měření.

4.2 Optimalizace odezvy ELSD

Průtok dusíku a teplota detektoru byly parametry optimalizace ELSD, která byla provedena na základě velikostí ploch pík sacharosy, glukosy a fruktosy kalibračního bodu $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Pro stanovení optimální teploty detektoru byly vybrány teploty 90, 80, 70, 60, 50, 40 a 30 °C. V případě glukosy a fruktosy se plocha píku s klesající teplotou mírně zvyšovala, naopak u sacharosy se výrazně nelišila. Avšak při teplotě 30 °C byl pozorován výrazný šum a nelineární odezva, kdy se mobilní fáze o průtoku $0,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ již dostatečně neodpařovala. Na základě míry šumu a velikosti signálu byla při screeningu sacharidů nastavena teplota detektoru 80 °C.

Průtok plynu byl testován při 1,5; 2,0 a 2,5 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Na Obr. 26 je zobrazena závislost velikosti píku na průtoku plynu, kdy nejvíce analytu bylo detekováno při průtoku 2 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$.



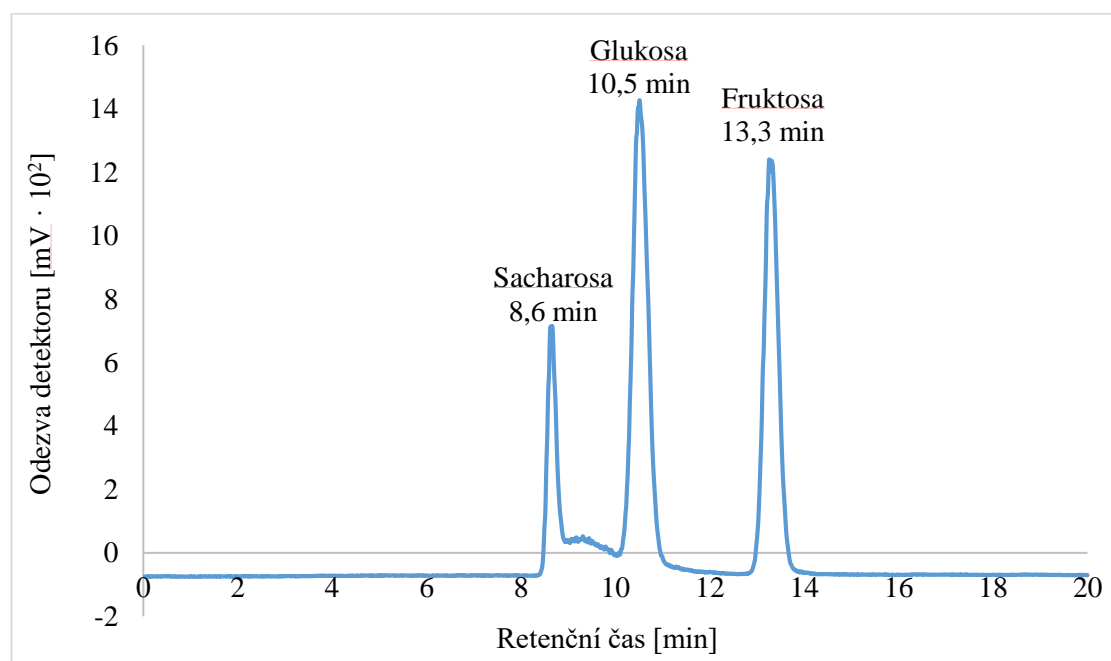
Obr. 26 Optimalizace průtoku plynu (dusíku). Chybové úsečky vyznačují směrodatnou odchylku ze tří měření (oranžová – glukosa, zelená – fruktosa, modrá – sacharosa).

4.3 Metoda HPLC-ELSD stanovení malých sacharidů

Analýza malých sacharidů byla založena na extrakci vodným roztokem methanolu a chromatografické separaci sacharidů mechanismem iontového vylučování a interakce s vápenatými ionty. Sacharosa, glukosa a fruktosa byly detekovány odpařovacím detektorem rozptylu světla. Metoda HPLC-ELSD byla převzata od autorů O'Donoghue *et al.* (2004).

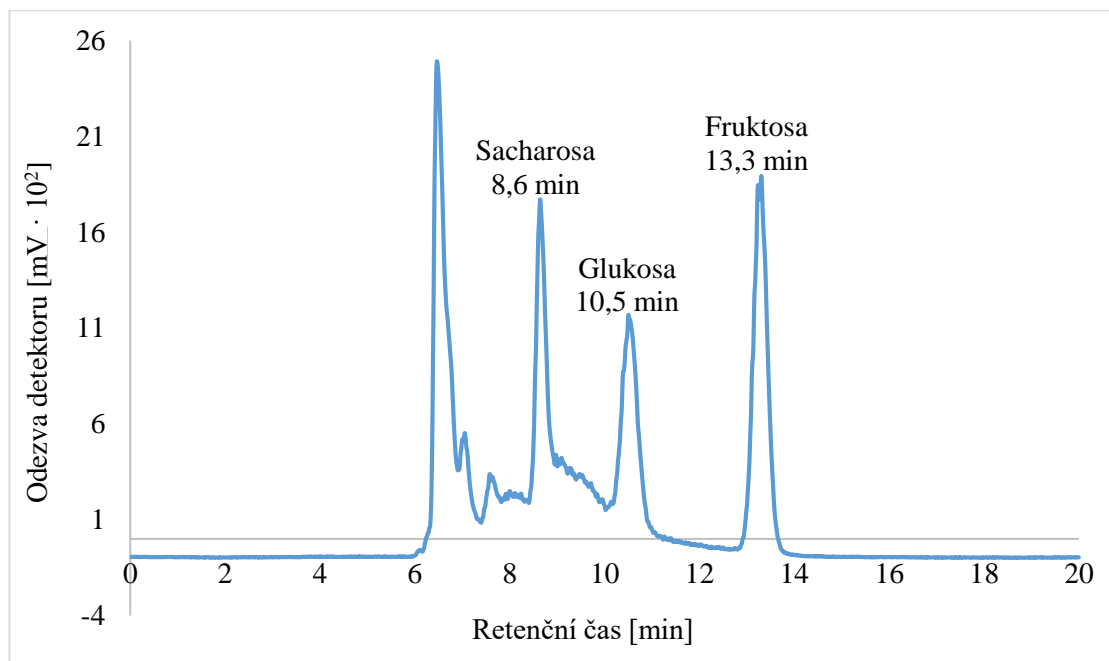
Sacharidy byly identifikovány na základě retenčních časů standardů, kdy separace proběhla v pořadí sacharosa, glukosa a fruktosa s retenčními časy 8,6; 10,5 a 13,3 min. Chromatogramy separace směsi standardů o koncentraci $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a vzorku 3108 (rok 2016) jsou na Obr. 27 a Obr. 28. V reálných vzorcích byl pozorován neznámý analyt v čase okolo 6,5 min.

Sacharidy byly kvantifikovány externí kalibrací na základě rovnic lineární regrese (sacharosa: $y = 1,3559x + 3,9698$, $R^2 = 0,9994$; glukosa: $y = 1,4105x + 4,5283$, $R^2 = 0,9996$, Obr. 29; fruktosa: $y = 1,3858x + 4,0127$, $R^2 = 0,9996$), kdy plochy píků i koncentrace sacharidů byly zlogaritmovány.

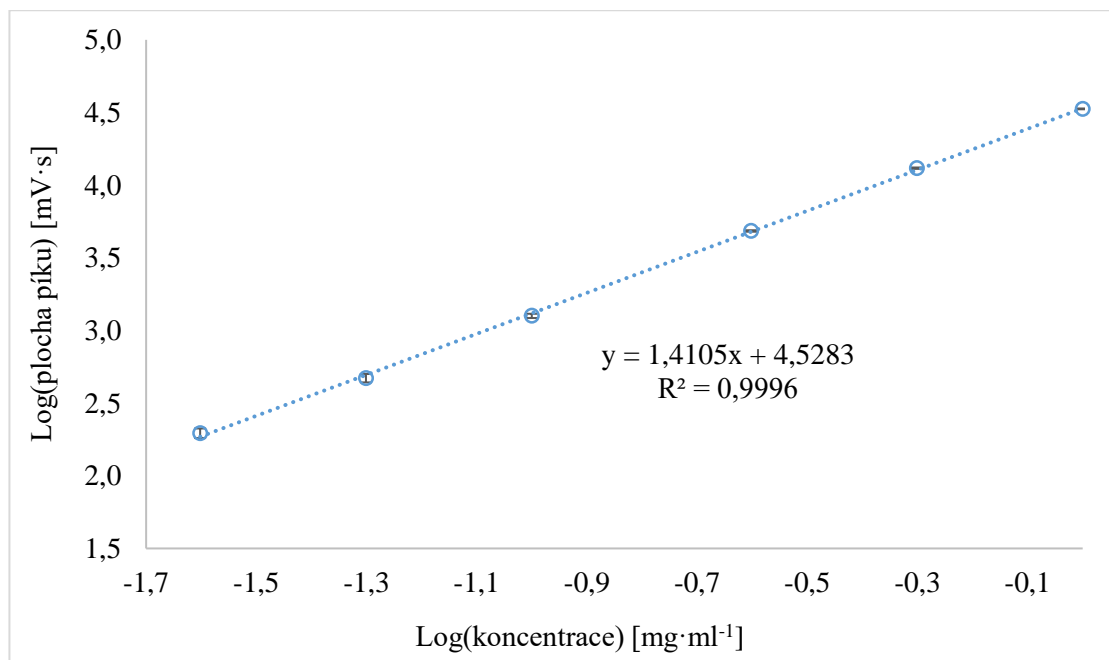


Obr. 27 Chromatogram separace směsi standardů o koncentraci $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Odezva detektoru ELSD byla lineární v úzkém koncentračním rozsahu (sacharosa 0,25-2,5 mg·ml⁻¹, glukosa a fruktosa 0,1-1 mg·ml⁻¹). Logaritmičká transformace zvýšila lineární dynamický rozsah sacharosy na 0,025-2,5 mg·ml⁻¹, glukosy a fruktosy na 0,025-1,0 mg·ml⁻¹. LOD pro sacharosu, glukosu a fruktosu byly 9,4; 5,9; a 1,9 µg·ml⁻¹, LOQ byly 28,5; 18,0 a 5,8 µg·ml⁻¹.



Obr. 28 Chromatogram separace vzorku 3108 z roku 2016.

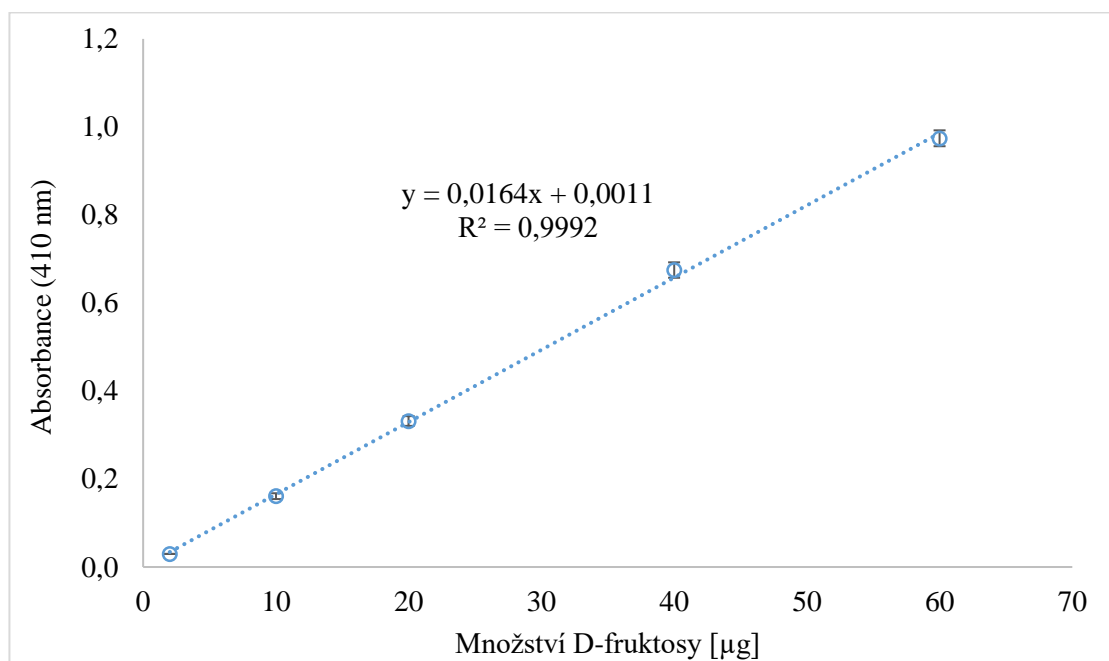


Obr. 29 Kalibrační přímka glukosy (0,025-1,0 mg·ml⁻¹). Chybové úsečky vyznačují směrodatnou odchylku ze tří měření.

4.4 Spektrofotometrická metoda stanovení fruktanů

Suma fruktanů byla určena podle původní metody autorů McCleary a Blakeney (1999), která je dostupná ve formě kitu. Principem analýzy byla enzymatická hydrolyza sacharosy a škrobu v prvním kroku, kterou následovala chemická redukce uvolněných monosacharidů na alkoholové cukry. Fruktany byly nakonec enzymaticky hydrolyzovány a uvolněná glukosa a fruktosa byly stanoveny kolorimetrickou reakcí. Suma fruktanů byla vypočítána podle vzorce na Obr. 21.

Vychýlení měření (bias) spektrofotometrické metody analýzy fruktanů bylo stanoveno opakovaným měřením standardu o deklarovaném množství fruktanů 27,5 % (w/w). Průměrná hodnota z šesti měření byla 27,3 % (w/w) se směrodatnou odchylkou $\pm 0,6$ % (w/w), z čehož vyplývala relativní chyba měření 0,8 %. Opakovatelnost metody byla stanovena opakovanou analýzou vzorku 3009 (rok 2016). Průměrné množství fruktanů z osmi měření bylo 42,9 % (w/w) s relativní směrodatnou odchylkou 2,7 %. Metrologická terminologie byla použita podle Plzák a Milde (2012). Na základě kalibrační přímky a R^2 byl stanoven lineární dynamický rozsah 2-60 μg D-fruktosy (Obr. 30). Podle rovnice lineární regrese a směrodatné odchylky reakčního blanku byl stanoven LOD 0,3 μg a LOQ 0,9 μg D-fruktosy.



Obr. 30 Kalibrační přímka D-fruktosy (2-60 μg). Chybové úsečky vyznačují výběrovou směrodatnou odchylku z pěti měření.

4.5 Screening metabolitů v rostlinném materiálu

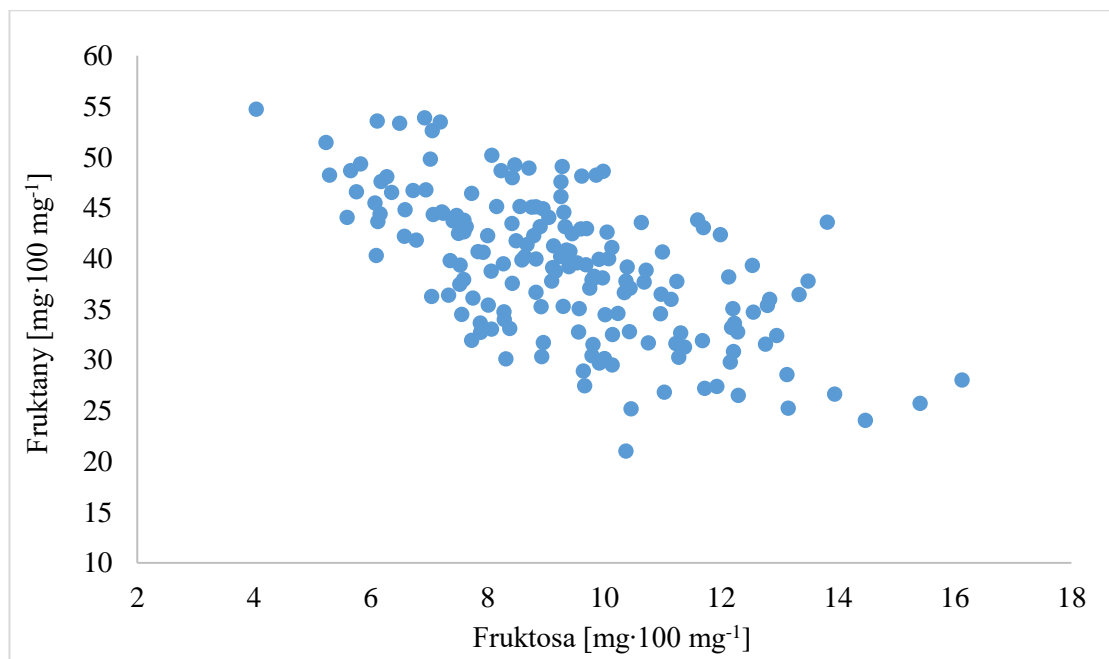
Screening metabolitů (glukosidy kvercetinu, malé sacharidy, fruktany) byl proveden v 87 kultivarech cibule šalotky a 3 kultivarech cibule kuchyňské ze dvou sklizní (rok 2016 a 2017). Výsledky byly vyjádřeny ve formě procent ($\text{mg} \cdot 100 \text{ mg}^{-1}$) sušiny (DW; dry weight) nebo v případě kvercetinu v $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ DW.

4.5.1 Obsahové látky v cibuli šalotce

V cibuli šalotce bylo stanoveno množství kvercetin-3,4'-O-diglukosidu (QDG) a kvercetin-4'-O-glukosidu (QMG). V roce 2016 byla průměrná hladina QDG $556,7 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ DW, QMG $148,5 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ DW, takže množství QDG bylo v každém kultivaru 2-6x vyšší. Obsah QDG byl stanoven v rozmezí $303,5\text{-}948,3 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ DW a QMG $83,1\text{-}252,7 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ DW. Ve srovnání, v roce 2017 bylo průměrné množství QDG $526,7 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ DW a QMG $130,1 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ DW. Obdobně roku 2016 bylo množství QDG 2-9x vyšší. Zjištěné hladiny analytů byly v případě QDG v rozmezí $217,6\text{-}860,5 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ DW a QMG $44,5\text{-}217,9 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ DW. Velikosti rozdílů mezi vegetačními obdobími byly na úrovni jednotlivých kultivarů variabilní, kdy rozdíl menší než $3 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ QDG byl pozorován u kultivarů 3004, 3026, 3126 a 3140. V případě QMG se jednalo o kultivary 3013, 3121, 3125, 3128 a 3131. Na druhou stranu v roce 2016 byla koncentrace QDG minimálně 1,7x vyšší u kultivarů 3107 a 3133 a stejný rozdíl QMG byl pozorován u kultivarů 3040, 3092, 3101, 3104, 3107, 3110, 3133 a 3139. Po spojení výsledků z obou let vyplynulo, že hladina QDG byla nejvyšší u kultivarů 3125, 3127, 3130 a 3132 a nejnižší u 3037, 3041, 3099, 3101 a 3113. Nejvyšší obsah QMG byl stanoven v případě 3003, 3005, 3006 a 3019 a naopak nejnižší u kultivarů 3110, 3111 a 3113. Příloha 1 obsahuje veškerá naměřená data z obou let.

V cibuli šalotce dále bylo hodnoceno množství sacharosy, glukosy, fruktosy a fruktanů, jejichž průměrné zastoupení bylo v roce 2016 v poměru 8 : 1 : 5 : 27. Střední hodnoty sacharidů byly $12,2 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mg}^{-1}$ DW sacharosy, $1,6 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mg}^{-1}$ DW glukosy, $8,7 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mg}^{-1}$ DW fruktosy a $43,1 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mg}^{-1}$ DW sumy fruktanů. Stanovené koncentrace metabolitů se pohybovaly v intervalu $8,3\text{-}17,8 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mg}^{-1}$ DW sacharosy, pod limitem detekce až $7,6 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mg}^{-1}$ DW glukosy, $4,0\text{-}13,8 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mg}^{-1}$ DW fruktosy a $31,5\text{-}54,7 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mg}^{-1}$ DW fruktanů. V roce 2017 byly sacharidy průměrně distribuovány v poměru 7 : 1 : 6 : 19. Hladiny analytů byly v případě sacharosy $8,5\text{-}15,8 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mg}^{-1}$ DW, glukosy pod limitem detekce až $10,4 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mg}^{-1}$ DW,

fruktosy 5,2-16,1 mg·100 mg⁻¹ DW a fruktanů 21,0-53,6 mg·100 mg⁻¹ DW. Mezi dvěma roky byl ve většině případů malých sacharidů na úrovni kultivarů rozdíl menší jak 3 mg·100 mg⁻¹. Naopak v roce 2017 byl obsah glukosy u kultivarů 3001, 3007, 3015, 3055, 3095, 3098, 3105, Prisma a fruktosy u kultivarů 3105 a 3137 téměř dvojnásobný. V kultivaru Ambition byla naopak koncentrace glukosy v roce 2017 dvakrát nižší. Mezi dvěma roky bylo zjištěno výraznější kolísání obsahu fruktanů, kdy difference menší jak 3 mg·100 mg⁻¹ byla zjištěna u 14 kultivarů (tj. 3007, 3008, 3012, 3032, 3033, 3035, 3036, 3092, 3093, 3099, 3101, 3110, 3111, 3121). Naopak kultivary 3037, 3124, 3138 obsahovaly v roce 2016 téměř dvojnásobné množství fruktanů. Na základě výsledků z obou let bylo zjištěno, že kultivary 3021, 3023, 3025, 3026, 3089 a 3108 obsahovaly nejvyšší hladiny sacharosy, kultivary 3006, 3020, 3108, 3126, 3139 a 3140 glukosy, nejvyšší obsah fruktosy byl v kultivarech 3113 a 3123 a nejvyšší hladiny fruktanů byly stanoveny v kultivarech 3008, 3100, 3110, 3118 a 3127. Nejnižší koncentrace sacharosy byly stanoveny v kultivarech 3006, 3008, 3100 a 3115, glukosy v kultivarech 3028, 3031, 3042 a 3114, fruktosy v kultivarech 3015, 3101, 3114 a 3127 a nejméně fruktanů bylo detekováno v kultivarech 3108 a 3140. Mezi obsahem fruktanů a fruktosy byla pozorována mírná negativní korelace ($r = -0,630$), kde s rostoucím množstvím fruktosy klesal obsah fruktanů (Obr. 31). Příloha 2 a Příloha 3 obsahují veškeré naměřené hodnoty malých sacharidů a fruktanů.



Obr. 31 Korelační závislost obsahu fruktanů na fruktose.

Tab. 4 Shapirův-Wilkův test normality rozdílů ($\Delta = 2016 - 2017$)

Rozdíl	Pravděpodobnost p
Δ Kvercetin-3,4'-O-diglukosid	$p > 0,05$
Δ Kvercetin-4'-O-glukosid	$p > 0,05$
Δ Sacharosa	$p > 0,05$
Δ Glukosa	$p < 0,05$
Δ Fruktosa	$p > 0,05$
Δ Fruktany	$p > 0,05$

Tab. 5 Dvouvýběrový párový t-test

Analyt	Stupeň volnosti*	Pravděpodobnost p
Kvercetin-3,4'-O-diglukosid	86	$p < 0,05$
Kvercetin-4'-O-glukosid	86	$p < 0,05$
Sacharosa	86	$p > 0,05$
Log(glukosa)	79	$p < 0,05$
Fruktosa	86	$p < 0,05$
Fruktany	86	$p < 0,05$

* Stupeň volnosti znamená počet pozorování zmenšený o jedna.

Hladiny obsahových látek mezi dvěma roky byly srovnány dvouvýběrovým párovým t-testem, který je závislý na normálním rozdělení rozdílů Δ mezi párovými daty. Nejprve byl stanoven rozdíl Δ odečtením hodnot z roku 2017 od roku 2016. Pomocí Shapirova-Wilkova testu (Tab. 4) byla testována normalita zjištěných rozdílů Δ . Pokud byla normalita zamítnuta ($p < 0,05$), byla data logaritmičtě transformována. Pouze množství sacharosy se mezi lety statisticky nelišilo ($p > 0,05$; Tab. 5). Hladiny ostatních analytů byly signifikantně odlišné ($p < 0,05$; Tab. 5). V roce 2017 byly průměrně stanoveny nižší koncentrace fruktanů a glukosidů kvercetinu, naopak hladiny monosacharidů byly vyšší.

4.5.2 Obsahové látky v cibuli kuchyňské

V cibuli kuchyňské byly stejně jako v cibuli šalotce stanoveny glukosidy kvercetinu, malé sacharidy a fruktany z vegetačních období, 2016 a 2017 (Tab. 6 a Tab. 7). Analyzovány byly tři běžné kultivary cibule kuchyňské (Albienka, Karmen, Všetana), které sloužily k porovnání obsahových látek s šalotkou.

V obou letech bylo stanoveno nejvyšší množství glukosidů kvercetinu v Karmen. Naopak v kultivaru Albienka bylo množství kvercetinu v roce 2016 pod limitem detekce a v roce 2017 byly stanoveny velmi nízké koncentrace. Mezi dvěma roky se podobně jako glukosidy kvercetinu hladiny sacharosy a glukosy výrazně nelišily. Kultivar Karmen byl nejbohatší na zmíněné sacharidy. Ve srovnání Albienka obsahovala nejméně sacharosy

a Všetana nejméně glukosy. V roce 2017 bylo množství fruktosy u všech kultivarů vyšší, kde nejvýraznější rozdíl byl pozorován u kultivaru Všetana s dvojnásobně zvýšenou hladinou. Fruktany vykazovaly opačný trend, kdy u kultivaru Karmen bylo v roce 2017 stanoveno poloviční množství.

Variabilita obsahových látek byla znázorněna krabicovým grafem na základě mediánu. Interkvartilové rozpětí Q bylo dáno rozdílem mezi 75. a 25. percentilem. Odlehle a extrémní hodnoty byly vyjádřeny jako 1,5Q a 3Q. Hladiny analytů cibule byly srovnány s šalotkou pomocí Mannova-Whitneyova U testu (Obr. 32 a Obr. 33). Koncentrace metabolitů v testovaném souboru především v případě šalotek vykazovala širokou variabilitu, která byla dána velikostí souboru. V šalotkách byly stanoveny vyšší koncentrace QDG (Obr. 32), naopak menší koncentrace sacharosy a glukosy (Obr. 33). Hladiny QMG, fruktosy a fruktanů se významně nelišily ($p > 0,05$).

Tab. 6 Metabolity v cibuli kuchyňské ze sklizně 2016

Metabolit	Albienka	Karmen	Všetana
Kvercetin-3,4'-O-diglukosid [mg·100 g ⁻¹ DW*]	ned. [†]	368,4 ± 6,2	305,4 ± 5,0
Kvercetin-4'-O-glukosid [mg·100 g ⁻¹ DW*]	ned.	138,2 ± 2,5	100,7 ± 2,6
Sacharosa [mg·100 mg ⁻¹ DW*]	11,3 ± 0,2	19,1 ± 0,1	17,5 ± 0,2
Glukosa [mg·100 mg ⁻¹ DW*]	10,0 ± 0,1	15,2 ± 0,1	7,1 ± 0,0
Fruktosa [mg·100 mg ⁻¹ DW*]	7,6 ± 0,0	3,8 ± 0,1	5,3 ± 0,1
Fruktany [mg·100 mg ⁻¹ DW [‡]]	42,6 ± 0,0	37,5 ± 0,1	45,0 ± 0,8

* Výsledky jsou vyjádřeny ve formě aritmetický průměr ze tří měření ± směrodatná odchylka.

[†] Ned. vyjadřuje hodnotu pod mezí detekce metody HPLC-UV.

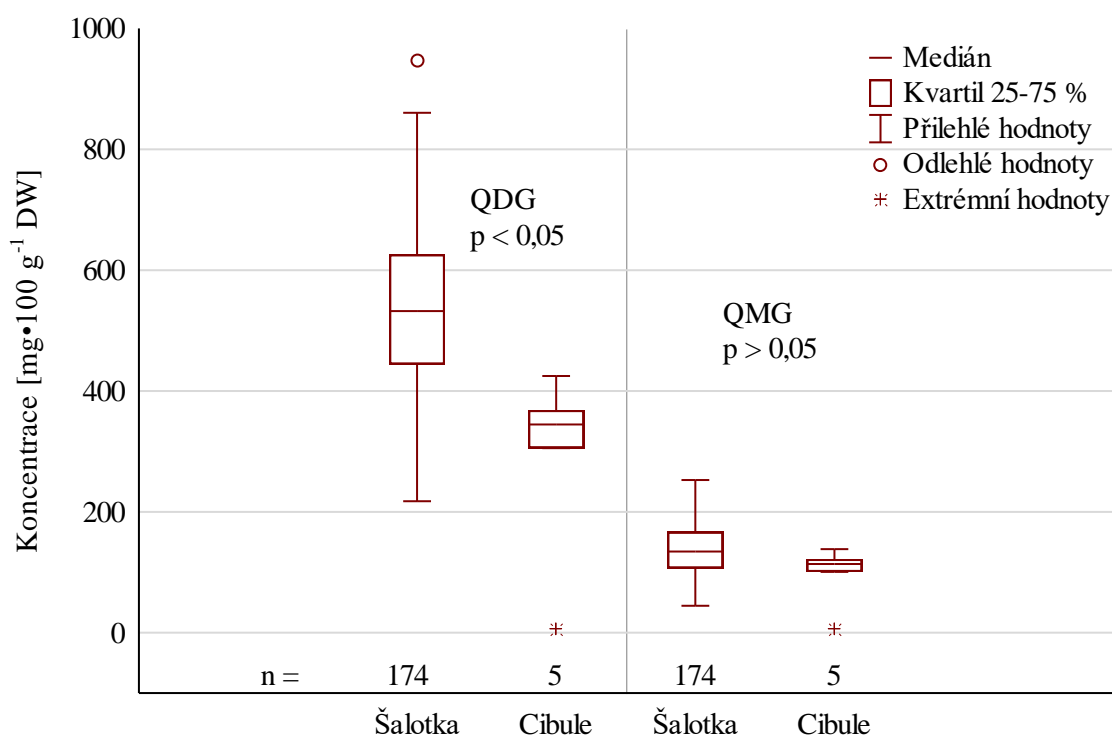
[‡] Výsledky jsou vyjádřeny ve formě aritmetický průměr z duplikátu ± směrodatná odchylka.

Tab. 7 Metabolity v cibuli kuchyňské ze sklizně 2017

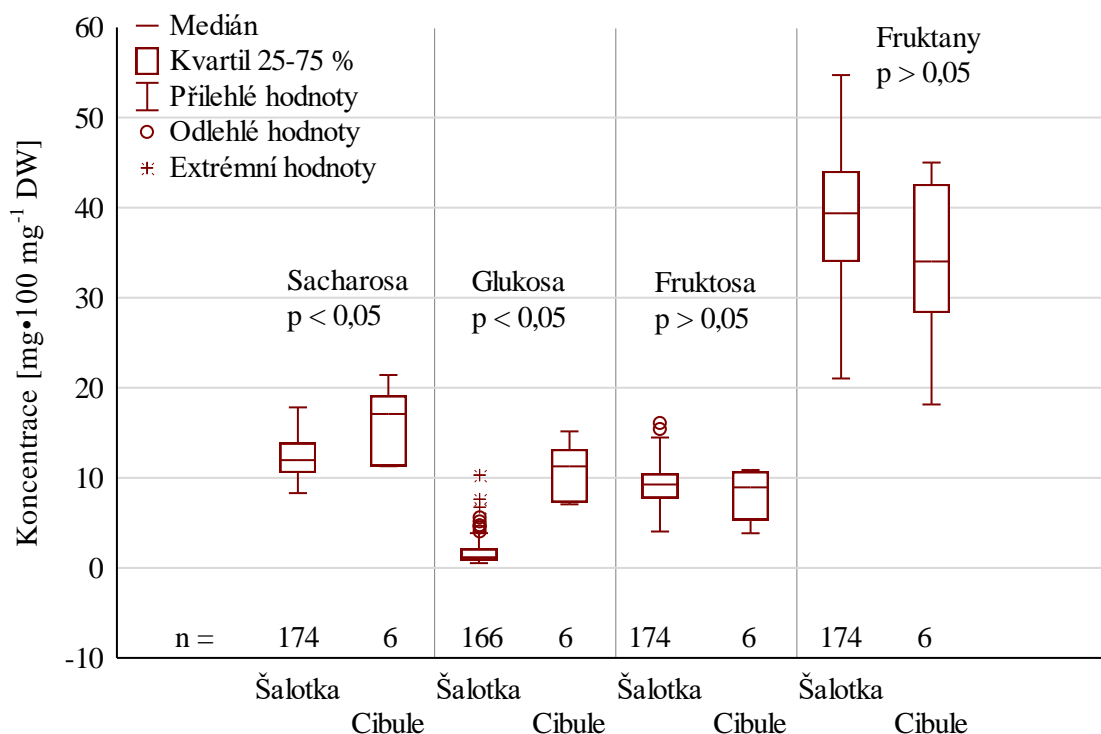
Metabolit	Albienka	Karmen	Všetana
Kvercetin-3,4'-O-diglukosid [mg·100 g ⁻¹ DW*]	5,3 ± 0,1	424,9 ± 18,8	344,6 ± 10,6
Kvercetin-4'-O-glukosid [mg·100 g ⁻¹ DW*]	8,1 ± 0,3	121,8 ± 6,7	113,7 ± 3,1
Sacharosa [mg·100 mg ⁻¹ DW*]	11,3 ± 1,7	21,4 ± 0,2	16,7 ± 0,4
Glukosa [mg·100 mg ⁻¹ DW*]	12,5 ± 0,9	13,2 ± 0,4	7,3 ± 0,1
Fruktosa [mg·100 mg ⁻¹ DW*]	10,9 ± 0,3	10,3 ± 0,2	10,7 ± 0,0
Fruktany [mg·100 mg ⁻¹ DW†]	30,5 ± 0,8	18,2 ± 0,6	28,3 ± 0,4

* Výsledky jsou vyjádřeny ve formě aritmetický průměr ze tří měření ± směrodatná odchylka.

† Výsledky jsou vyjádřeny ve formě aritmetický průměr z duplikátu ± směrodatná odchylka.



Obr. 32 Srovnání koncentrací glukosidů kvercetinu mezi cibulí šalotkou a cibulí kuchyňskou (QDG – kvercetin-3,4'-O-diglukosid, QMG – kvercetin-4'-O-glukosid, n – velikost souboru, p – Mannův-Whitneyův U test).



Obr. 33 Srovnání koncentrací sacharidů mezi cibulí šalotkou a cibulí kuchyňskou (n – velikost souboru, p – Mannův-Whitneyův U test).

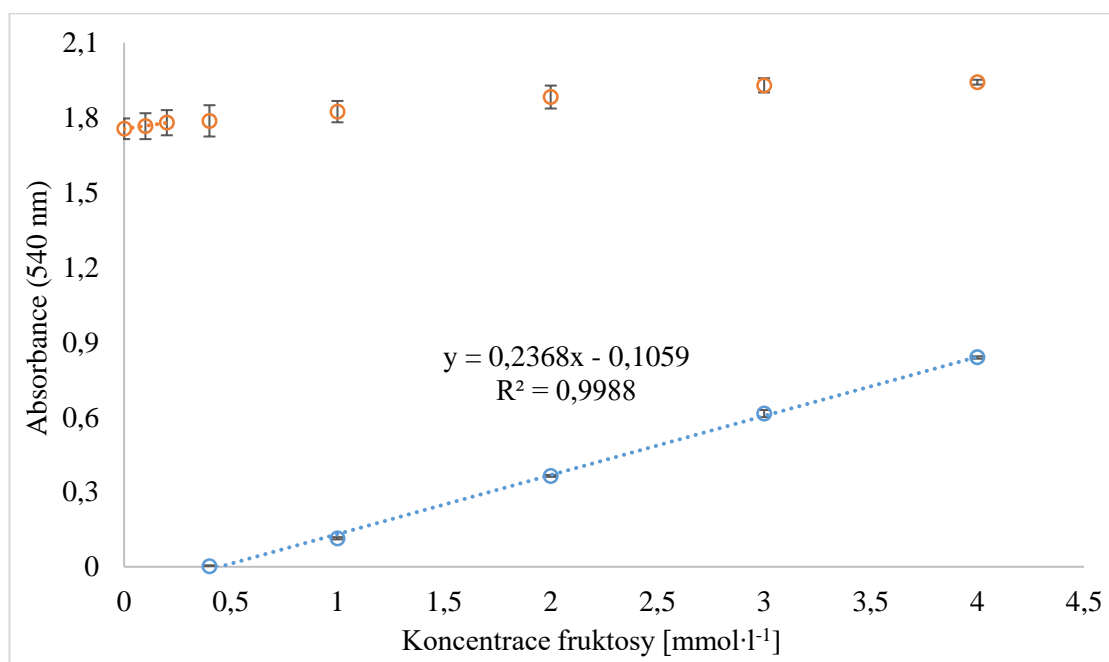
4.6 Enzymová aktivita fruktan- β -(2,1)-fruktosidasy

Enzymový extrakt byl připraven homogenizací cibule šalotky „Gourmet“ s acetátovým pufrem podle Krivorotova a Sereikaite (2014). Substrátem enzymové reakce byl inulin, což je směs polymerů fruktosy o různých délkách řetězců zakončených glukosou. Uvolněná fruktosa, glukosa nebo případně redukující sacharidy byly kvantifikovány externí kalibrační přímkou pomocí čtyř metod. Na základě metody DNS a nekuproinové metody byly stanoveny redukující sacharidy, naopak kitem a HPLC byla specificky určena uvolněná glukosa a fruktosa. U spektrofotometrických metod byla testována interference sloučenin extraktu na linearitu tak, že druhá kalibrační řada byla připravena ve 20% vodném rostlinném extraktu. Enzymové reakce byly doprovázeny blankem (enzymový extrakt s acetátovým pufrem), aby bylo odečteno pozadí reakce. Jelikož pozadí reakce bylo vysoké, bylo nutné všechny vzorky desetkrát zředit. Enzymová aktivita byla vyjádřena jako produkce 1 mol fruktosy (glukosy) za 1 s vztahovaná na 1 g čerstvé hmoty (FW; fresh weight).

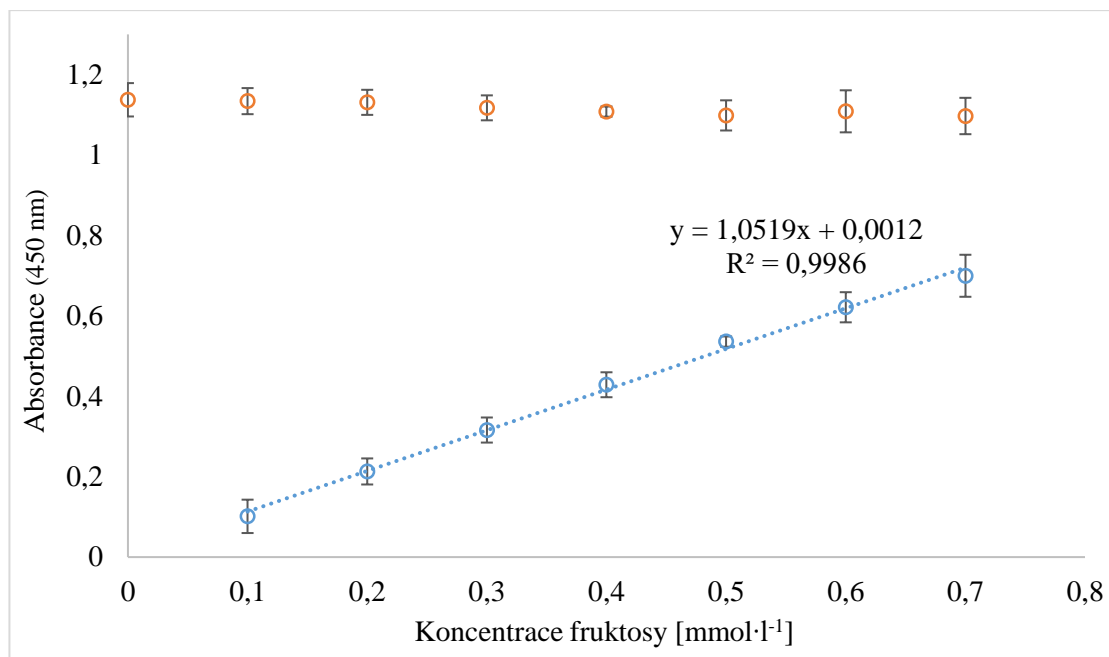
Metoda DNS byla provedena podle Saqib a Whitney (2011), kde redukující sacharidy byly oxidovány a DNS redukována za vzniku barevné sloučeniny 3-amino-5-nitrosalicylové kyseliny, jejíž absorbance byla změřena při 540 nm. Metoda

byla lineární v koncentračním rozmezí 0,4-4,0 mmol·l⁻¹ ($R^2 = 0,9988$). Produkty byly stanoveny rovnicí lineární regrese D-fruktosy: $y = 0,2368x - 0,1059$ (Obr. 34), ze které LOD bylo 0,09 mmol·l⁻¹ a LOQ 0,29 mmol·l⁻¹. Jelikož DNS metoda slouží pro analýzu redukujících sacharidů, byla enzymová aktivita vyjádřena v ekvivalentech D-fruktosy. V přítomnosti rostlinného extraktu byla pozorována interference, kdy byl rapidně snížen lineární rozsah na 0-0,2 mmol·l⁻¹ a změněna směrnice přímky (Obr. 34).

Neokuproinová metoda, která spočívala v redukci Cu²⁺ a vzniku barveného komplexu Cu⁺-neokuproin, byla provedena podle Dygert *et al.* (1965). Absorbance barevného produktu byla stanovena při 450 nm. Z rovnice lineární regrese D-fruktosy ($y = 1,0519x + 0,0012$) a koeficientu determinace ($R^2 = 0,9986$) byl určen lineární dynamický rozsah 0,1-0,7 mmol·l⁻¹ (Obr. 35), LOD 0,01 mmol·l⁻¹ a LOQ 0,03 mmol·l⁻¹. Při měření kalibračních bodů připravených ve 20% rostlinném extraktu byla pozorována značná odchylka od linearitu (Obr. 35). Stejně jako metoda DNS Cu⁺-neokuproinový komplex vzniká v přítomnosti redukujících sacharidů, proto byla enzymová aktivita rovněž vyjádřena jako ekvivalenty D-fruktosy.



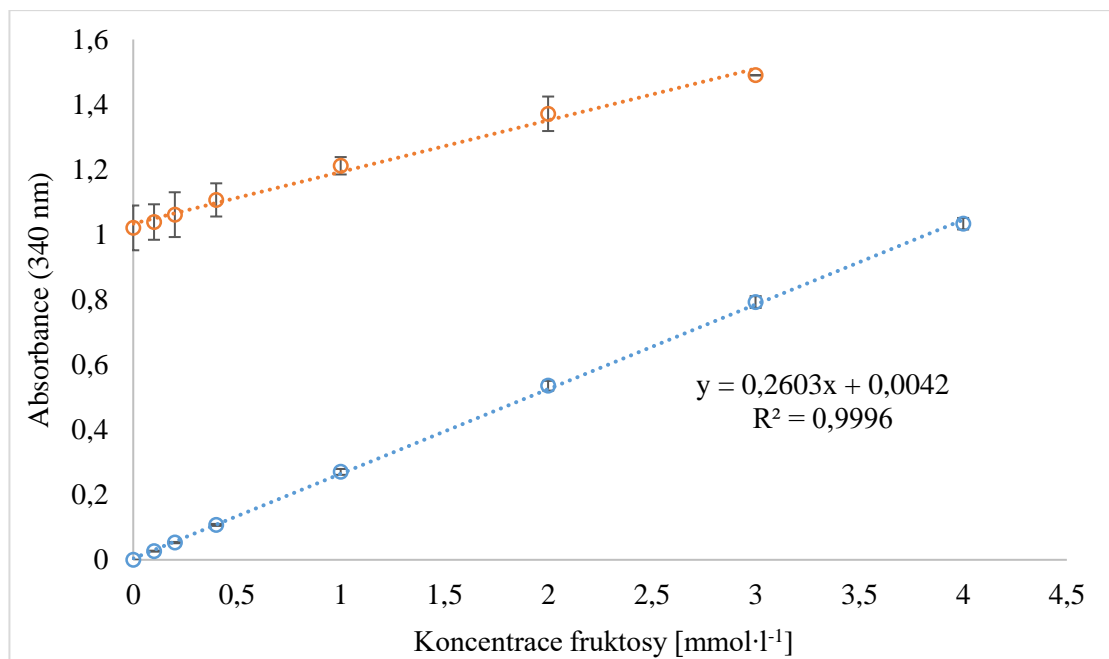
Obr. 34 Kalibrační přímky metody 3,5-dinitrosalicylové kyseliny (oranžová – D-fruktosa v přítomnosti 20% rostlinného extraktu). Chybové úsečky vyznačují směrodatnou odchylku ze tří měření.



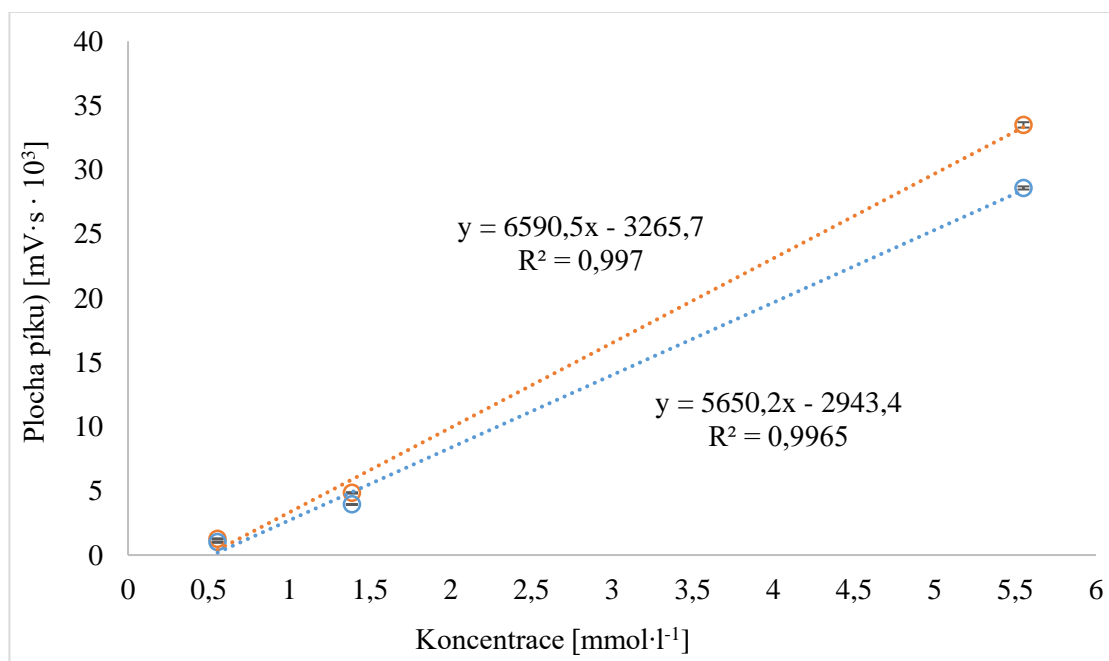
Obr. 35 Kalibrační přímky neokuproinové metody (oranžová – D-fruktosa v přítomnosti 20% rostlinného extraktu). Chybové úsečky vyznačují směrodatnou odchylku ze tří měření.

Uvolněná fruktosa a glukosa byly stanoveny kitem, jehož princip popisuje Lothier *et al.* (2010). V prvním kroku byla fruktosa fosforylována hexokinasou. Vzniklý produkt byl fosfoglukosaisomerasou přeměněn na glukosa-6-fosfát a následovala jeho oxidace na glukonát-6-fosfát za přítomnosti NADP^+ a glukosa-6-fosfátdehydrogenasy. Vzniklý NADPH byl změřen při 340 nm. Na Obr. 36 je znázorněna kalibrační přímka D-fruktosy s rovnicí lineární regrese $y = 0,2603x + 0,0042$ a R^2 0,9996. Lineární dynamický rozsah byl 0,1-4,0 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, LOD a LOQ byly stanoveny na 0,02 a 0,05 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Kalibrační přímka D-fruktosy v rostlinném extraktu byla posunuta na ose y a zároveň byla i mírně změněna směrnice přímky. Fruktosa byla kvantifikována podle výše zmíněné rovnice lineární regrese, glukosa naopak podle vzorce na Obr. 22.

Poslední metodou byly sacharidy stanoveny způsobem, který je uveden v kapitole Analýza malých sacharidů HPLC-ELSD (3.2.4). Jediným rozdílem bylo použití 96-jamkové destičky místo klasických vialek. Glukosa i fruktosa byly kvantifikovány na základě rovnic lineární regrese (kapitola 4.3). Na Obr. 37 jsou pro srovnání vyobrazeny kalibrační přímky glukosy a fruktosy v nelogaritmované podobě a koncentrace ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) byly přepočteny na molární koncentrace, kdy lineární dynamický rozsah byl 0,6-5,6 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, LOD 0,01 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a LOQ 0,03 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Enzymová aktivita byla stejně jako při stanovení pomocí kitu vyjádřena součtem uvolněné glukosy a fruktosy.



Obr. 36 Kalibrační přímka kitu (oranžová – D-fruktosa v přítomnosti 20% rostlinného extraktu). Chybové úsečky vyznačují směrodatnou odchylku ze tří měření.



Obr. 37 Kalibrační přímky fruktosy (modrá) a glukosy (oranžová) metody HPLC-ELSD. Chybové úsečky vyznačují směrodatnou odchylku ze tří měření.

Výsledky měření enzymové aktivity fruktan- β -(2,1)-fruktosidasy jsou zobrazeny v Tab. 8. Srovnáním jednotlivých výsledků lze určit, že HPLC a kitem byla stanovena totožná aktivita ($0,24 \text{ nkat}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FW}$). Naopak při použití DNS metody byla aktivita 2x vyšší a v případě neokuproinové metody byla o řád nižší.

Tab. 8 Stanovená enzymové aktivity fruktan- β -(2,1)-fruktosidasy

Metoda	Enzymová aktivita [$\text{nkat}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FW}$]
Kit	$0,24 \pm 0,11^*$
3,5-Dinitrosalicylová kyselina	$0,45 \pm 0,17^\dagger$
Neokuproinová	$0,02 \pm 0,01^\dagger$
HPLC-ELSD	$0,24 \pm 0,12^*$

* Aktivita je vyjádřena součtem uvolněné glukosy a fruktosy. Výsledky jsou vyjádřeny ve formě aritmetický průměr ze tří měření \pm směrodatná odchylka.

† Aktivita je vyjádřena v ekvivalentech D-fruktosy. Výsledky jsou vyjádřeny ve formě aritmetický průměr ze tří měření \pm směrodatná odchylka.

5 DISKUZE

Cibule šalotka (*Allium cepa* var. *aggregatum* L.) je oblíbená především v některých asijských a afrických státech pro svou chuť a řadu zdraví prospěšných vlastností. Nicméně jednotlivé kultivary se mohou odlišovat nejen morfologií a fyziologií, ale i obsahem bioaktivních látek a jejich biologickou aktivitou. Tato diplomová práce byla zaměřena na studium diversity glukosidů kvercetinů, malých sacharidů a fruktanů v 87 kultivarech šalotky.

Analýza glukosidů kvercetinů v šalotce a cibuli byla založena na práci autorů Caridi *et al.* (2007). Provedení extrakce bylo zjednodušeno tak, že byla pouze jedнокroková za použití menšího objemu rozpouštědla a nižší navážky. Vzorky byly desetkrát zředěny a bylo možné vynechat filtrační krok. Rovněž doba analýzy HPLC-UV byla kratší, tj. 15 min ve srovnání s 35 min. V šalotce byl detekován kvercetin-3,4'-O-diglukosid (QDG) a kvercetin-4'-O-glukosid (QMG), které patří mezi hlavní flavonoly cibule. Stanovené koncentrace jsou řádově shodné s publikací Vu *et al.* (2013), kteří hodnotili 27 kultivarů šalotek HPLC-UV pocházejících převážně z Vietnamu a dalších asijských států. Autoři také detekovali aglykon kvercetin (18-228 mg·100 g⁻¹ DW), avšak zde je důležité zmínit, že během přípravy vzorku nebo analýzy mohlo dojít k hydrolyze. Bonaccorsi *et al.* (2008) stanovili metodou HPLC-DAD-ESI-MS-MS v kultivaru francouzské šalotky přibližně 340 mg·100 g⁻¹ DW QDG a 300 mg·100 g⁻¹ DW QMG. Pro srovnání, v této diplomové práci byl analyzován kultivar 3015 pocházející z Francie, který obsahoval v průměru 440 mg·100 g⁻¹ DW QDG a 160 mg·100 g⁻¹ DW QMG. Množství kvercetinů v šalotce ovlivňuje chuť cibulí (hořkost), odolnost kultivaru proti patogenům nebo UV záření. Kvercetin je také významný pro své výrazné antioxidační vlastnosti spojené s prevencí například kardiovaskulárních chorob (Egert *et al.*, 2009).

Metoda HPLC-ELSD analýzy malých sacharidů byla provedena podle článku O'Donoghue *et al.* (2004). Naopak suma fruktanů byla stanovena spektrofotometrickou metodou založenou na reakci monosacharidů vzniklých enzymovou hydrolyzou fruktanů s PAHBAH (McCleary a Blakeney; 1999). Nestrukturní sacharidy mohou tvořit až 80 % sušiny (Darbyshire a Henry, 1979). V námi studovaném materiálu se procenta nestrukturních sacharidů pohybovala v rozmezí 47-73 %. Obecně platí, že cibule s vysokým obsahem sušiny akumulují sacharidy především ve formě fruktanů. V této diplomové práci byly ze sacharidů nejvíce zastoupeny fruktany (21-55 mg·100 mg⁻¹ DW), následovala sacharosa (8-18 mg·100 mg⁻¹ DW), fruktosa (4-16 mg·100 mg⁻¹ DW)

a glukosa (pod mezí detekce až $10 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mg}^{-1} \text{ DW}$). Byla prokázána negativní korelace mezi obsahem fruktanů a volné fruktosy. Stanovené hodnoty sacharidů a jejich distribuce odpovídají dříve publikovaným výsledkům (Muir *et al.*, 2007; Moongngarm *et al.*, 2011; Ariyanti *et al.*, 2018). Obsah fruktanů závisí mimo jiné na zeměpisné šířce pěstování. Příkladem je publikace Ariyanti *et al.* (2018), ve které byly srovnány hladiny sacharidů v šalotkách pěstovaných v tropickém pásmu. Naměřené koncentrace fruktanů (maximálně $9 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mg}^{-1} \text{ DW}$) byly výrazně nižší než v této diplomové práci ($21\text{-}55 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mg}^{-1} \text{ DW}$). Množství sacharidů vyjadřuje odolnost kultivaru vůči abiotickým stresům a slouží jako faktor hodnocení kvality cibule. Cibule s nižším obsahem fruktanů jsou sladší, a proto vhodnější pro přímou konzumaci (např. kultivary 3108, 3123, Prisma). Naopak cibule s vysokým obsahem fruktanů jsou vhodné k dlouhodobému skladování (např. kultivary 3008, 3110, 3118). Fruktany také podporují prebiotický efekt a jsou spojené se snižováním rizika rakoviny tlustého střeva (Allsopp *et al.*, 2013).

Párový t-test se používá k porovnání středních hodnot dvou populací, přičemž vzorky z jednoho pozorování jsou spárovány se vzorky z druhého pozorování. Předpokladem je, že rozdíly pocházejí z normálního rozdělení (Krzywinski a Altman, 2014). V letech 2016 a 2017 byly hodnoceny hladiny výše zmíněných analytů, které téměř ve všech případech byly signifikantně odlišné ($p < 0,05$). V roce 2017 byly stanoveny vyšší hladiny glukosy, fruktosy a nižší hladiny glukosidů kvercetinu a fruktanů. Obsah sacharidů nebo kvercetinu závisí na genotypu, množství sušiny, environmentálních podmínkách, způsobu kultivace nebo skladování (Wurr *et al.*, 1998; Galmarini *et al.*, 2001; Ombódi *et al.*, 2016). Rozdíly metabolitů tedy pravděpodobně souvisí s rozdílnou teplotou vzduchu a množstvím srážek mezi dvěma roky, případně jednotlivé kultivary mohly odlišně reagovat na abiotický či biotický stres. Tato interpretace výsledků není součástí této diplomové práce, ale bude zahrnuta do původní vědecké publikace, která se připravuje.

Mannův-Whitneyův U test je neparametrickou obdobou dvouvýběrového t-testu. Je testována nulová hypotéza, že oba výběry pocházejí ze stejného rozdělení (Lepš a Šmilauer, 2016). Na základě krabicových grafů a Mannova-Whitneyova U testu byl srovnán obsah látek v šalotce se třemi běžnými kultivary cibule kuchyňské, tj. Albienska, Karmen a Všetana. Uvádí se, že šalotka je bohatší na flavonoly (Bonaccorsi *et al.*, 2008) a malé sacharidy (Moongngarm *et al.*, 2011). Výsledky naší práce potvrzují vyšší obsah flavonolů, ale stejně jako v publikaci Judprasong *et al.* (2011) a Ariyanti *et al.* (2018) byly stanoveny ve srovnání s cibulí nižší koncentrace malých sacharidů. Krabicové grafy

zobrazují rozptýlenost dat, zešikmení a přítomnost odlehlých hodnot. V případě kvercetinu byly pozorovány extrémní hodnoty obou glukosidů u kultivaru Albienka (bílá odrůda). Obecně bylo stanoveno nejvíce kvercetinu v červených odrůdách a pouze stopová množství v bílých. Výsledek odpovídá tomu, že kvercetin je součástí pigmentů (Slimestad *et al.*, 2007).

Cibule během růstu ukládá sacharidy ve formě fruktanů. Aktivita enzymu fruktan- β -(2,1)-fruktosidasy spočívá v uvolnění terminální fruktosy z inulinového řetězce při energetické potřebě nebo regulaci osmotického tlaku. V klíčících cibulích byla pozorována výraznější degradace fruktanů. Je proto možné, že enzymová aktivita 1-FEH by mohla být využita k predikci konce dormance (Benkeblia *et al.*, 2005a). Většina publikovaných metod stanovení aktivity 1-FEH je založená na stanovení uvolněné fruktosy po ukončení enzymové reakce HPAEC-PAD, která se vyznačuje vysokou citlivostí a širokým lineárním dynamickým rozsahem (Van den Ende *et al.*, 2003; Benkeblia *et al.*, 2005b; Verspreet *et al.*, 2013). Cílem diplomové práce bylo porovnání tří spektrofotometrických metod a HPLC-ELSD analýzy malých sacharidů. Měření enzymové aktivity a charakterizování spektrofotometrických metod bylo provedeno podle Krivorotova a Sereikaite (2014) s výjimkou použití čerstvého rostlinného materiálu. Přednosti ELSD jsou univerzálnost a stabilní základní linie. Na druhou stranu odezva detektoru je lineární ve velmi úzkém rozsahu. Výhodou HPLC-ELSD oproti HPAEC-PAD byla jednoduchost metody, kratší doba analýzy a elučním činidlem byla pouze voda. Příprava vzorku byla také urychlena použitím 96-jamkové destičky. Spektrofotometrické metody jsou obvykle rychlejší, jednodušší, avšak citlivější na interference. Metoda 3,5-dinitrosalicylové kyseliny (DNS) a neokuproinová metoda byly založeny na redukujících vlastnostech aldehydové skupiny sacharidů. Naopak pomocí komerčního kitem byly glukosa a fruktosa specificky stanoveny sledem spřažených enzymových reakcí a měřením změny absorbance NADPH. Nejširší dynamický lineární rozsah D-fruktosy byl stanoven kitem, naopak nejužší byl v případě neokuproinové metody. Nejcitlivějšími metodami byly HPLC a neokuproinová. Ve srovnání s komerčním kitem byla linearita neokuproinové a DNS metody dramaticky ovlivněna složením rostlinného extraktu. Interference byla pravděpodobně způsobena přítomností fenolových látek, které jsou v cibuli zastoupeny ve vysokých koncentracích. Başkan *et al.* (2016) odstranili tato redukční činidla SPE. Při stanovení sacharidů kitem měla kalibrační přímka mírně změněnou směrnici a byla posunuta na ose y, kdy důvodem je přítomnost fruktosy v rostlinném extraktu. Krivorotova a Sereikaite (2014) při použití

stejného postupu pozorovali při měření kitem pouze posun na ose y. V této diplomové práci byla enzymová aktivita 1-FEH měřena v jiném rostlinném materiálu a absorbance bodů kalibrační přímky v rostlinném extraktu byla vyšší jak jedna, což mohlo snížit přesnost měření a ovlivnit směrnici. Pomocí kitu a HPLC-ELSD byla stanovena stejná enzymová aktivita 1-FEH ($0,24 \text{ nkat}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FW}$), přičemž literární údaje uvádí, že v průběhu skladování cibule kuchyňské se hodnoty aktivity pohybovaly v rozsahu $0,03\text{-}1,69 \text{ nkat}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FW}$ (Benkeblia *et al.*, 2005b). Výhodou HPLC-ELSD je rychlá příprava vzorku, ale metoda je náročná na přístrojové vybavení a délku analýzy. Spektrofotometrická metoda (kit) je jednoduchá, umožňuje rychlejší stanovení větší sady vzorků, ale je nutné dokupovat reagenty. Pro naši laboratoř je ve výsledku vhodnější HPLC-ELSD. Enzymová aktivita byla měřitelná v hrubém extraktu, ale v důsledku vysokého pozadí bylo nutné vzorky naředit, což může zavést další chyby měření. Verhaest *et al.* (2007) stanovili, že 1-FEH byla inhibována sacharosou a fruktosou. Z těchto důvodů, by bylo vhodné zavést další purifikační krok, např. dialýzu nebo vysolování. HPLC-ELSD metoda bude v dalším kroku využita pro pravidelná měření enzymové aktivity v uskladněné šalotce, aby bylo ověřeno, zda je možné určit konec dormance na základě vzrůstu aktivity 1-FEH.

6 ZÁVĚR

Diplomová práce byla věnována metabolitům v cibuli šalotce a cibuli kuchyňské, respektive flavonolům, malým sacharidům a fruktanům. Součástí byla i problematika posklizňového metabolismu a měření enzymové aktivity fruktan- β -(2,1)-fruktosidasy.

V 87 kultivarech cibule šalotky z genofondu Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i. byla pozorována vysoká variabilita koncentrací glukosidů kvercetinu, malých sacharidů a fruktanů. Nejvyšší hladiny kvercetinu byly v kultivarech 3125, 3127 a 3130. Kultivary 3108, 3123 a Prisma byly nejsladší, a tudíž nejvhodnější k okamžité konzumaci, na straně druhé kultivary 3008, 3110 a 3118 byly nejbohatší na obsah fruktanů a jsou tudíž nejvhodnější pro dlouhodobé skladování.

Zastoupení metabolitů bylo mezi vegetačními obdobími 2016 a 2017 s výjimkou sacharosy odlišné. V roce 2017 byly zjištěny vyšší koncentrace glukosy, fruktosy a nižší koncentrace fruktanů a glukosidů kvercetinu.

V cibuli šalotce byl ve srovnání s cibulí kuchyňskou průměrně stanoven vyšší obsah kvercetin-3,4'-O-diglukosidu. Naopak hladina malých sacharidů byla vyšší v cibuli kuchyňské.

Enzymová aktivita fruktan- β -(2,1)-fruktosidasy byla vyjádřena jako množství uvolněné fruktosy (glukosy) po proběhnutí enzymové reakce. Na základě provedení, přístrojového vybavení a analytických parametrů nejvhodnější metodou stanovení enzymové aktivity fruktan- β -(2,1)-fruktosidasy byla HPLC-ELSD metoda. Druhou možností bylo měření uvolněných monosacharidů komerčním kitem pro stanovení D-fruktosy a D-glukosy od firmy Megazyme.

Data budou dále doplněna o hospodářské parametry (výnos a kvalita) a odolnost vůči chorobám a společně s nutričními hodnotami podrobena vícerozměrné analýze s cílem selekce výchozího materiálu pro další šlechtění.

7 LITERATURA

- Abrameto M.A., Ardizzi C.M.P., Gil M.I., Molina L.M. (2010): Analysis of methodologies for the study of composition and biochemical carbohydrate changes in harvest and postharvest onion bulbs. *Phyton, International Journal of Experimental Botany* **79**, 123-132.
- Aherne S.A., O'Brien N.M. (2002): Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* **18**, 75-81.
- Allsopp P., Possemiers S., Campbell D., Oyarzábal I.S., Gill C., Rowland I. (2013): An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from *Agave angustifolia* and the associated anticancer activity. *Anaerobe* **22**, 38-44.
- Anwar M.A., Kralj S., Piqué A.V., Leemhuis H., van der Maarel M.J.E.C., Dijkhuizen L. (2010): Inulin and levan synthesis by probiotic *Lactobacillus gasseri* strains: characterization of three novel fructansucrase enzymes and their fructan products. *Microbiology* **156**, 1264-1274.
- Araujo P. (2009): Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B* **877**, 2224-2234.
- Ariyanti N.A., Torikai K., Kirana R.P., Hirata S., Sulistyaningsih E., Ito S., Yamauchi N., Kobayashi N., Shigyo M. (2018): Comparative study on phytochemical variations in Japanese F₁ varieties of bulb onions and South-East Asian shallot landraces. *The Horticulture Journal* **87**, 63-72.
- Asega A.F., do Nascimento J.R.O., Carvalho M.A.M. (2011): Increased expression of fructan 1-exohydrolase in rhizophores of *Vernonia herbacea* during sprouting and exposure to low temperature. *Journal of Plant Physiology* **168**, 558-565.
- Bancal P., Carpita N.C., Gaudillère J.P. (1992): Differences in fructan accumulated in induced and field-grown wheat plants: an elongation-trimming pathway for their synthesis. *New Phytologist* **120**, 313-321.
- Başkan K.S., Tütem E., Akyüz E., Özen S., Apak R. (2016): Spectrophotometric total reducing sugars assay based on cupric reduction. *Talanta* **147**, 162-168.
- Beesk N., Perner H., Schwarz D., George E., Kroh L.W., Rohn S. (2010): Distribution of quercetin-3,4'-O-diglucoside, quercetin-4'-O-mono-glucoside, and quercetin in different parts of the onion bulb (*Allium cepa* L.) influenced by genotype. *Food Chemistry* **122**, 566-571.
- Benkeblia N. (2013): Fructooligosaccharides and fructans analysis in plants and food crops. *Journal of Chromatography A* **1313**, 54-61.
- Benkeblia N., Onodera S., Shiomi N. (2005a): Variation in 1-fructo-exohydrolase (1-FEH) and 1-kestose-hydrolysing (1-KH) activities and fructo-oligosaccharide (FOS) status in onion bulbs. Influence of temperature and storage time. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **85**, 227-234.
- Benkeblia N., Ueno K., Onodera S., Shiomi N. (2005b): Variation of fructooligosaccharides and their metabolizing enzymes in onion bulbs (*Allium cepa* L. cv. Tenshin) during long-term storage. *Journal of Food Science* **70**, S208-S214.
- Beretta H.V., Bannoud F., Insani M., Berli F., Hirschegger P., Galmarini C.R., Cavagnaro P.F. (2017): Relationships between bioactive compound content and the antiplatelet and antioxidant activities of six *Allium* species. *Food Technology and Biotechnology* **55**, 266-275.
- Bird A.E., Marshall A.C. (1969): Structure of chlorflavonin. *Journal of the Chemical Society C-organic*, 2418-2420.
- Block E. (1992): The organosulfur chemistry of the genus *Allium* – implications for the organic chemistry of sulfur. *Angewandte Chemie International Edition in English* **31**, 1135-1178.
- Bonaccorsi P., Caristi C., Gargiulli C., Leuzzi U. (2008): Flavonol glucosides in *Allium* species: a comparative study by means of HPLC-DAD-ESI-MS-MS. *Food Chemistry* **107**, 1668-1673.
- Bonnet G.D., Sims I.M., St. John J.A., Simpson R.J. (1994): Purification and characterization of fructans with β -2,1- and β -2,6-glycosidic linkages suitable for enzyme studies. *New Phytologist* **127**, 261-269.
- Bonnett G.D., Sims I.M., Simpson R.J., Cairns A.J. (1997): Structural diversity of fructan in relation to the taxonomy of the Poaceae. *New Phytologist* **136**, 11-17.

- Briet F., Achour L., Flourie B., Beaugerie L., Pellier P., Franchisseur C., Bornet F., Rambaud J.C. (1995): Symptomatic response to varying levels of fructo-oligosaccharides consumed occasionally or regularly. *European Journal of Clinical Nutrition* **49**, 501-507.
- Brighenti F. (2007): Dietary fructans and serum triacylglycerols: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The Journal of Nutrition* **137**, 2552S-2556S.
- Britsch L., Grisebach H. (1986): Purification and characterization of (2S)-flavanone 3-hydroxylase from *Petunia hybrida*. *European Journal of Biochemistry* **156**, 569-577.
- Brown D.E., Rashotte A.M., Murphy A.S., Normanly J., Tague B.W., Peer W.A., Taiz L., Munday G.K. (2001): Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **126**, 524-535.
- Bruggink C., Maurer R., Herrmann H., Cavalli S., Hoefler F. (2005): Analysis of carbohydrates by anion exchange chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1085**, 104-109.
- Buško M., Góral T., Ostrowska A., Matysiak A., Walentyn-Góral D., Petrowski J. (2014): The effect of *Fusarium* inoculation and fungicide application on concentrations of flavonoids (apigenin, kaempferol, luteolin, naringenin, quercetin, rutin, vitexin) in winter wheat cultivars. *American Journal of Plant Sciences* **5**, 3727-3736.
- Carbohydrate-Active enZYMes: <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html> (13. 2. 2018).
- Caridi D., Trenerry V.C., Rochfort S., Duong S., Laughler D., Jones R. (2007): Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry* **105**, 691-699.
- Cataldi T.R.I., Campa C., De Benedetto G.E. (2000): Carbohydrate analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: The potential is still growing. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **368**, 739-758.
- Chase M.W., Reveal J.S., Fay M. (2009): A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**, 132-136.
- Chatterton N.J., Harrison P.A. (1997): Fructan oligomers in *Poa ampla*. *New Phytologist* **136**, 3-10.
- Chope G.A., Cools K., Hammond J.P., Thompson A.J. Terry L.A. (2012): Physiological, biochemical and transcriptional analysis of onion bulbs during storage. *Annals of Botany* **109**, 819-831.
- Chope G.A., Terry L.A., White P.J. (2006): Effect of controlled atmosphere storage on abscisic acid concentration and other biochemical attributes of onion bulbs. *Postharvest Biology and Technology* **39**, 233-242.
- Cook N.C., Samman S. (1996): Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry* **7**, 66-76.
- Corea G., Fattorusso E., Lanzotti V., Capasso R., Izzo A.A. (2005): Antispasmodic saponins from bulbs of red onion, *Allium cepa* L. var. Tropea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 935-940.
- Corzo-Martínez M., Corzo N., Villamiel M. (2007): Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology* **18**, 609-625.
- Crowther T., Collin H.A., Smith B., Tomsett A.B., O'Connor D., Jones M.G. (2005): Assessment of the flavour of fresh uncooked onions by taste-panels and analysis of flavour precursors, pyruvate and sugars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **85**, 112-120.
- Crozier A., Jaganath I.B., Clifford M.N. (2009): Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* **26**, 965-1096.
- Darbyshire B., Henry R.J. (1978): The distribution of fructans in onions. *New Phytologist* **81**, 29-34.
- Darbyshire B., Henry R.J. (1979): The association of fructans with high percentage dry weight in onion cultivars suitable for dehydrating. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **30**, 1035-1038.
- Davis F., Terry L.A., Chope G.A., Faul C.F.J. (2007): Effect of extraction procedure on measured sugar concentrations in onion (*Allium cepa* L.) bulbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 4299-4306.

- De Coninck B., Le Roy K., Francis I., Clerens S., Vergauwen R., Halliday A.M., Smith S.M., Van Laere A., Van den Ende W. (2005): Arabidopsis AtcwINV3 and 6 are not invertases but are fructan exohydrolases (FEHs) with different substrate specificities. *Plant, Cell and Environment* **28**, 432-443.
- De Roover J., Van Laere A., De Winter M., Timmermans J.M., Van den Ende W. (1999): Purification and properties of a second fructan exohydrolase from the roots of *Cichorium intybus*. *Physiologia Plantarum* **106**, 28-34.
- de Villiers A., Venter P., Pash H. (2016): Recent advances and trends in the liquid-chromatography-mass spectrometry analysis of flavonoids. *Journal of Chromatography A* **1430**, 16-78.
- Deng F., Zito S.W. (2003): Development and validation of a gas chromatographic–mass spectrometric method for simultaneous identification and quantification of marker compounds including bilobalide, ginkgolides and flavonoids in *Ginkgo biloba* L. extract and pharmaceutical preparations. *Journal of Chromatography A* **986**, 121-127.
- Dixon R.A., Achnine L., Kota P., Liu C.J., Reddy M.S.S., Wang L. (2002): The phenylpropanoid pathway and plant defence – a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* **3**, 371-390.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956): Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **28**, 350-356.
- Duchateau N., Bortlik K., Simmen U., Wiemken A., Bancal P. (1995): Sucrose:fructan 6-fructosyltransferase, a key enzyme for diverting carbon from sucrose to fructan in barley leaves. *Plant Physiology* **107**, 1249-1255.
- Dvořáčková E., Šnóblková M., Hrdlička P. (2014): Carbohydrate analysis: from sample preparation to HPLC on different stationary phases coupled with evaporative light-scattering detection. *Journal of Separation Science* **37**, 323-337.
- Dyrgert S., Li L.H., Florida D., Thoma J.A. (1965): Determination of reducing sugar improved precision. *Analytical Biochemistry* **13**, 367-374.
- Egert S., Bosy-Westphal A., Seiberl J., Kürbitz C., Settler U., Plachta-Danielzik S., Wagner A.E., Frank J., Schrezenmeir J., Rimbach G., Wolfram S., Müller M.J. (2009): Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study. *British Journal of Nutrition* **102**, 1065-1074.
- Elnima E.I., Ahmed S.A., Mekkawi A.G., Mossa J.S. (1983): The anti-microbial activity of garlic and onion extracts. *Pharmazie* **38**, 747-748.
- Ernst M.K., Chatterton N.J., Harrison P.A., Matitschka G. (1998): Characterization of fructan oligomers from species of the genus *Allium* L.. *Journal of Plant Physiology* **153**, 53-60.
- Ferrer J.L., Jez J.M., Bowman M.E., Dixon R.A., Noel J.P. (1999): Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nature Structural Biology* **6**, 775-784.
- Feucht W., Dithmar H., Polster J. (2007): Variation of the nuclear, subnuclear and chromosomal flavanol deposition in hemlock and rye. *International Journal of Molecular Sciences* **8**, 635-650.
- Ford C.M., Boss P.K., Høj P.B. (1998): Cloning and characterization of *Vitis vinifera* UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase, a homologue of the enzyme encoded by the maize *bronze-1* locus that may primarily serve to glucosylate anthocyanidins *in vivo*. *The Journal of Biological Chemistry* **15**, 9224-9233.
- Fossen T., Andersen Ø.M., Øvstedal D.O., Pedersen A.T., Raknes Å. (1996): Characteristic anthocyanin pattern from onions and other *Allium* spp. *Journal of Food Science* **61**, 703-706.
- Frehner M., Keller F., Wiemken A. (1984): Localization of fructan metabolism in the vacuoles isolated from protoplasts of Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus* L.). *Journal of Plant Physiology* **116**, 197-208.
- Friesen N., Fritsch R.M., Blattner F.R. (2006): Phylogeny and new intrageneric classification of *Allium* (Alliaceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany* **22**, 372-395.
- Fritsch R., Keusgen M. (2006): Occurrence and taxonomic significance of cysteine sulphoxides in the genus *Allium* L. *Phytochemistry* **67**, 1127-1135.

- Galmarini C.R., Goldman I.L., Havey M.J. (2001): Genetic analyses of correlated solids, flavor, and health-enhancing traits in onion (*Allium cepa* L.). *Molecular Genetics and Genomics* **265**, 543-551.
- Gasperl A., Morvan-Bertrand A., Prud'homme M.P., van der Graaff E., Roitsch T. (2015): A simple and fast kinetic assay for the determination of fructan exohydrolase activity in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Frontiers in Plant Science* **6**, 1154, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.01154/full>.
- Gerhardt K.E., Lampi M.A., Greenberg B.M. (2008): The effect of far-red light on plant growth and flavonoid accumulation in *Brassica napus* in the presence of ultraviolet B radiation. *Photochemistry and Photobiology* **84**, 1445-1454.
- Gibson G.R., Beatty E.R., Wang X., Cummings J.H. (1995): Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology* **108**, 975-982.
- Gleason F.K., Chollet R. (2012a): Storage and utilization of fixed carbon. In: *Plant biochemistry*. 1st ed., (Steinbach M., Turner M.R.), Jones & Bartlett Learning, Sudbury, USA, 36-51.
- Gleason F.K., Chollet R. (2012b): Carbon dioxide fixation. In: *Plant biochemistry*. 1st ed., (Steinbach M., Turner M.R.), Jones & Bartlett Learning, Sudbury, USA, 23-35.
- Gough C., Galera C., Vasse J., Webster G., Cocking E.C., Dénerié J. (1997): Specific flavonoids promote intercellular root colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Azorhizobium caulinodans* ORS571. *Molecular Plant-Microbe interactions* **10**, 560-570.
- Griffiths G., Trueman L., Crowther T., Thomas B., Smith B. (2002): Onions – a global benefit to health. *Phytotherapy Research* **16**, 603-615.
- GRIN Czech 1.9.1: <https://grinczech.vurv.cz/gringlobal/search.aspx> (27. 2. 2018).
- Grotelueschen R.D., Smith D. (1968): Carbohydrates in grasses. III. Estimations of degree of polymerization of the fructosans in the stem bases of timothy and brome grass near seed maturity. *Crop Science* **8**, 210-212.
- Haghi G., Hatami A. (2010): Simultaneous quantification of flavonoids and phenolic acids in plant materials by a newly developed isocratic high-performance liquid chromatography approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 10812-10816.
- Hagmann M.L., Heller W., Grisebach H. (1983): Induction and characterization of a microsomal flavonoid 3'-hydroxylase from parsley cell cultures. *European Journal of Biochemistry* **134**, 547-554.
- Halbwirth H. (2010): The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway. *International Journal of Molecular Sciences* **11**, 595-621.
- Harborne J.B., Williams C.A. (2000): Advance in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481-504.
- Hartmann P., Haswell S.J., Grasserbauer M. (1994): Monitoring of reducing sugars by flow-injection analysis using *p*-hydroxybenzoic acid hydrazide. *Analytica Chimica Acta* **285**, 1-8.
- Hendry G. (1993): Evolutionary origins and natural functions of fructans - a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytologist* **123**, 3-14.
- Henry R.J., Darbyshire B. (1980): Sucrose:sucrose fructosyltransferase and fructan:fructan fructosyltransferase from *Allium cepa*. *Phytochemistry* **19**, 1017-1020.
- Herrmann K.M., Weaver L.M. (1999): The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 473-503.
- Hutzler P., Fischbach R., Heller W., Jungblut T.P., Reuber S., Schmitz R., Veit M., Weissenböck G., Schnitzler J.P. (1998): Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Experimental Botany* **49**, 953-965.
- Hýbl M., Kopecký P., Doležalová I., Petrželová I., Smékalová K., Dušková E., Stavělíková H., Dušek K. (2016): *Semena a plody vybraných druhů zeleniny, léčivých rostlin a speciálních plodin, 1. část – zeleniny*. 1. vyd., Agriprint, s.r.o., Olomouc, 232 stran.
- Iwashina T. (2000): The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research* **133**, 287-299.
- Jandera P. (2011): Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Analytica Chimica Acta* **692**, 1-25.
- Jenkins G.I. (2009): Signal transduction in responses to UV-B radiation. *Annual Review of Plant Biology* **60**, 407-431.

- Jez J.M., Bowman M.E., Dixon R.A., Noel J.P. (2000): Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase. *Nature Structural Biology* **7**, 786-791.
- Jez J.M., Ferrer J.L., Bowman M.E., Austin M.B., Schröder J., Dixon R.A., Noel J.P. (2001): Structure and mechanism of chalcone synthase-like polyketide synthases. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **27**, 393-398.
- Judprasong K., Tanjor S., Puwastien P., Sungpuag P. (2011): Investigation of Thai plants for potential sources of inulin-type fructans. *Journal of Food Composition and Analysis* **24**, 642-649.
- Jung E., Zamir L.O., Jensen R.A. (1986): Chloroplasts of higher plants synthesize L-phenylalanine via L-arogenate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 7231-7235.
- Kaack K., Christensen L.P., Hansen S.L., Grevsen K. (2004): Non-structural carbohydrates in processed soft fried onion (*Allium cepa* L.). *European Food Research and Technology* **218**, 372-379.
- Kawakami A., Yoshida M., Van den Ende W. (2005): Molecular cloning and functional analysis of a novel 6&1-FEH from wheat (*Triticum aestivum* L.) preferentially degrading small graminans like bifurcose. *Gene* **358**, 93-101.
- Konishi T., Sasaki Y. (1994): Compartmentalization of two forms of acetyl-CoA carboxylase in plants and the origin of their tolerance toward herbicides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 3598-3601.
- Krivorotova T., Sereikaite J. (2014): Determination of fructan exohydrolase activity in the crude extracts of plants. *Electronic Journal of Biotechnology* **17**, 329-333.
- Krzywinski M., Altman N. (2014): Points of significance comparing samples – part I. *Nature Methods* **11**, 215-216.
- Kumar S., Pandey A.K. (2013): Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal* **2013**, 162750, <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/162750/>.
- Lancaster J.E., Collin H.A. (1981): Presence of alliinase in isolated vacuoles and of alkyl cysteine sulfoxides in the cytoplasm of bulbs of onion (*Allium cepa*). *Plant Science Letters* **22**, 169-176.
- Le Roy K., Vergauwen R., Struyf T., Yuan S., Lammens W., Mátrai J., De Maeyer M., Van den Ende W. (2013): Understanding the role of defective invertases in plants: tobacco Nin88 fails to degrade sucrose. *Plant Physiology* **161**, 1670-1681.
- Leopoldini M., Russo N., Chiodo S., Toscano M. (2006): Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 6343-6351.
- Lepš J., Šmilauer P. (2016): *Biostatistika*. 1. vyd., Episteme, České Budějovice, 438 stran.
- Lever M. (1973): Colorimetric and fluorometric carbohydrate determination with *p*-hydroxybenzoic acid hydrazide. *Biochemical Medicine* **7**, 274-281.
- Lewis D.H. (1993): Nomenclature and diagrammatic representation of oligomeric fructans – a paper for discussion. *New Phytologist* **124**, 583-594.
- Li H., Song F., Zheng Z., Liu Z., Liu S. (2008): Characterization of saccharides and phenolic acids in the Chinese herb Tanshen by ESI-FT-ICR-MS and HPLC. *Journal of Mass Spectrometry* **43**, 1545-1552.
- Li Q.Q., Zhou S.D., He X.J., Yu Y., Zhang Y.C., Wei X.Q. (2010): Phylogeny and biogeography of *Allium* (Amaryllidaceae: Allieae) based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast *rps16* sequences, focusing on the inclusion of species endemic to China. *Annals of Botany* **106**, 709-733.
- Lin M.C., Tsai M.J., Wen K.C. (1999): Supercritical fluid extraction of flavonoids from *Scutellariae radix*. *Journal of Chromatography A* **830**, 387-395.
- Liu Z., Mouradov A., Smith K.F., Spangenberg G. (2011): An improved method for quantitative analysis of total fructans in plant tissues. *Analytical Biochemistry* **418**, 253-259.
- Livingston D.P., Chatterton N.J., Harrison P.A. (1993): Structure and quantity of fructan oligomers in oat (*Avena* spp.). *New Phytologist* **123**, 725-734.
- Livingston D.P., Hinch D.K., Heyer A.G. (2009): Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**, 2007-2023.

- Lopez M.G., Mancilla-Margalli N.A., Mendoza-Diaz G. (2003): Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. *azul*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 7835-7840.
- Lothier J., Lasseur B., Prud'Homme M.P., Morvan-Bertrand A. (2010): Hexokinase-dependent sugar signalling represses fructan exohydrolase activity in *Lolium perenne*. *Functional Plant Biology* **37**, 1151-1160.
- Malý I., Bartoš J., Hlušek J., Kopec K., Petříková K., Rod J., Spitz P. (1998): *Polní zelinářství*. 1. vyd., Agrospoj, Praha, 196 stran.
- Markham K.R., Ternai B., Stanley R., Geiger H., Mabry T.J. (1978): Carbon-13 NMR studies of flavonoids-III: Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron* **34**, 1389-1397.
- Markham K.R., Viotto E.S. (1988): Extended flavonoid biosynthetic capability in the aquatic fern genus *Pilularia*. *Phytochemistry* **27**, 307-308.
- McAnlis G.T., McEneny J., Pearce J., Young I.S. (1999): Absorption and antioxidant effects of quercetin from onions, in man. *European Journal of Clinical Nutrition* **53**, 92-96.
- McCleary B.V., Blakeney A.B. (1999): Measurement of inulin and oligofructan. *Cereal Foods World* **44**, 398-406.
- McCleary B.V., Murphy A., Mugford D.C. (2000): Measurement of total fructan in foods by enzymatic/spectrophotometric method: collaborative study. *Journal of AOAC International* **83**, 356-364.
- McMurry J. (2007): Biomolekuly: Sacharidy. In: *Organická chemie*. 1. vyd., (Svoboda J.), VŠCHT Praha, 942-984.
- Merken H.M., Beecher G.R. (2000): Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 577-599.
- Milhaud J. (2004): New insights into water-phospholipid model membrane interactions. *Biochimica et Biophysica Acta* **1663**, 19-51.
- Mo Y., Nagel C., Taylor L.P. (1992): Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 7213-7217.
- Mohammadi-Motlagh H.R., Mostafaie A., Mansouri K. (2011): Anticancer and anti-inflammatory activities of shallot (*Allium ascalonicum*) extract. *Archives of Medical Science* **7**, 38-44.
- Monosik R., Stredansky M., Tkac J., Sturdik E. (2012): Application of enzyme biosensors in analysis of food and beverages. *Food Analytical Methods* **5**, 40-53.
- Monti A., Amaducci M.T., Pritoni G., Venturi G. (2005): Growth, fructan yield, and quality of chicory (*Cichorium intybus* L.) as related to photosynthetic capacity, harvest time, and water regime. *Journal of Experimental Botany* **56**, 1389-1395.
- Moon C.H., Jung Y.S., Kim M.H., Lee S.H., Baik E.J., Park S.W. (2000): Mechanism for antiplatelet effect of onion: AA release inhibition, thromboxane A₂ synthase inhibition and TXA₂/PGH₂ receptor blockade. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **62**, 277-283.
- Moongnarm A., Trachoo N., Sirigungwan N. (2011): Low molecular weight carbohydrates, prebiotic content, and prebiotic activity of selected food plants in Thailand. *Advance Journal of Food Science and Technology* **3**, 269-274.
- Muir J.G., Shepherd S.J., Rosella O., Rose R., Barrett J.S., Gibson P.R. (2007): Fructan and free fructose content of common Australian vegetables and fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 6619-6627.
- Murray R.K., Bender D.A., Botham K., Kennely P., Rodwell V.W., Weil P.A. (2012a): Fyziologicky významné sacharidy. In: *Harperova ilustrovaná biochemie*. 5. vyd., (Houdek L.), Galén, Praha, 125-132.
- Murray R.K., Bender D.A., Botham K., Kennely P., Rodwell V.W., Weil P.A. (2012b): Glykolýza a oxidace pyruvátu. In: *Harperova ilustrovaná biochemie*. 5. vyd., (Houdek L.), Galén, Praha, 163-170.
- Noël G.M., Pontis H.G. (2000): Involvement of sucrose synthase in sucrose synthesis during mobilization of fructans in dormant Jerusalem artichoke tubers. *Plant Science* **159**, 191-195.

- Nuutila A.M., Puupponen-Pimiä R., Aarni M., Oksman-Caldentey K.M. (2003): Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chemistry* **81**, 485-493.
- O'Donoghue E.M., Somerfield S.D., Shaw M., Bendall M., Hedderly D., Eason J., Sims I. (2004): Evaluation of carbohydrates in Pukehoke Longkeeper and Grano cultivars of *Allium cepa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 5383-5390.
- Ombódi A., Lugasi A., Daood H.G., Berki M., Helyes L. (2016): Water supply and temperature effects on some nutritive constituents of direct sown onion. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* **44**, 245-249.
- Patil B.S., Pike L.M., Yoo K.S. (1995): Variation in the quercetin content in different colored onions (*Allium cepa* L.). *Journal of the American Society for Horticultural Science* **120**, 909-913.
- Percival M. (1998): Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights* **31**, 1-4.
- Phelps C.F. (1965): The physical properties of inulin solutions. *Biochemical Journal* **95**, 41-47.
- Phuong P.T.M., Isshiki S., Tashiro Y. (2006): Comparative study on shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum Group) from Vietnam and surrounding countries. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **75**, 306-311.
- Plzák Z., Milde D. (2012): Názvosloví v oblasti metrologie a zabezpečování kvality. *Chemické listy* **106**, 41-44.
- Pöhl T., Böttcher Ch., Schulz H., Stürtz M., Widder S., Carle R., Schweiggert R.M. (2017): Comparison of high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) and ultra-high performance liquid chromatography with evaporative light scattering (UHPLC-ELSD) for the analyses of fructooligosaccharides in onion (*Allium cepa* L.). *Journal of Food Composition and Analysis* **63**, 148-156.
- Pollastri S., Tattini M. (2011): Flavonols: old compounds for old roles. *Annals of Botany* **108**, 1225-1233.
- Prior R.L., Wu X., Schaich K. (2005): Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 4290-4302.
- Puizina J. (2013): Shallots in Croatia – genetics, morphology and nomenclature. *Acta Botanica Croatica* **72**, 387-398.
- Pykett I.L., Newhouse J.H., Buonanno F.S., Brady T.J., Goldman M.R., Kistler J.P., Pohost G.M. (1982): Principles of nuclear magnetic-resonance imaging. *Radiology* **143**, 157-168.
- Raessler M. (2011): Sample preparation and current applications of liquid chromatography for the determination of non-structural carbohydrates in plants. *Trends in Analytical Chemistry* **30**, 1833-1843.
- Revanna R., Turnbull M.H., Shaw M.L., Wright K.M., Butler R.C., Jameson P.E., McCallum J.A. (2013): Measurement of the distribution of non-structural carbohydrate composition in onion populations by a high-throughput microplate enzymatic assay. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **93**, 2470-2477.
- Rivlin R.S. (2001): Historical perspective on the use of garlic. *Journal of Nutrition* **131**, 951S-945S.
- Rojas-Escudero E., Alarcón-Jiménez A.L., Elizalde-Galván P., Rojo-Callejas F. (2004): Optimization of carbohydrate silylation for gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **1027**, 117-120.
- Rostagno M.A., Palma M., Barroso C.G. (2005): Solid-phase extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A* **1076**, 110-117.
- Rumessen J.J., Bode S., Hamberg O., Gudmand-Høyer E. (1990): Fructans of Jerusalem artichokes: intestinal transport, absorption, fermentation, and influence on blood glucose, insulin, and C-peptide responses in healthy subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* **52**, 675-681.
- Sami F, Yusuf M., Faizan M., Faraz A., Hayat S. (2016): Role of sugars under abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **109**, 54-61.

- Sance M.M., González R.E., Soto V.C., Galmarini C.R. (2008): Relationships between antiplatelet activity, dry matter content and flavour in onion cultivars. *Journal of Food, Agriculture & Environment* **6**, 41-46.
- Sánchez O.F., Rodríguez A.M., Silva E., Caicedo L.A. (2010): Sucrose biotransformation to fructooligosaccharides by *Aspergillus* sp. N74 free cells. *Food and Bioprocess Technology* **3**, 662-673.
- Saqib A.A.N., Whitney P.J. (2011): Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars. *Biomass and Bioenergy* **35**, 4748-4750.
- Scholz-Ahrens K.E., Schrezenmeir J. (2007): Inulin and oligofructose and mineral metabolism: the evidence from animal trials. *The Journal of Nutrition* **137**, 2513S-2523S.
- Schreiner M., Huyskens-Keil S. (2006): Phytochemicals in fruit and vegetables: health promotion and postharvest elicitors. *Critical Reviews in Plant Sciences* **25**, 267-287.
- Shams-Ghahfarokhi M., Shokoohamiri M.R., Amirrajab N., Moghadasi B., Ghajari A., Zeini F., Sadeghi G., Razzaghi-Abyaneh M. (2006): In vitro antifungal activities of *Allium cepa*, *Allium sativum* and ketoconazole against some pathogenic yeasts and dermatophytes. *Fitoterapia* **77**, 321-323.
- Shiomi N. (1989): Properties of fructosyltransferases involved in the synthesis of fructan in Liliaceous plants. *Journal of Plant Physiology* **134**, 151-155.
- Shiomi N., Benkeblia N., Onodera S. (2005): The metabolism of the fructooligosaccharides in onion bulbs: a comprehensive review. *The Japanese Society of Applied Glycoscience* **52**, 121-127.
- Shiomi N., Yamada J., Izawa M. (1976): Isolation and identification of fructo-oligosaccharides in roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Agricultural and Biological Chemistry* **40**, 567-575.
- Sims I.M., Cairns A.J., Furneaux R.H. (2001): Structure of fructans from excised leaves of New Zealand flax. *Phytochemistry* **57**, 661-668.
- Singh M., Kumar J., Singh S., Singh V.P., Prasad S.M. (2015): Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **14**, 407-426.
- Slimestad R., Fossen T., Vågen I.M. (2007): Onions: a source of unique dietary flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 10067-10080.
- Slimestad R., Vågen I.M. (2009): Distribution of non-structural carbohydrates, sugars, flavonols and pyruvate in scales of onions, *Allium cepa* L.. *Journal of Food, Agriculture & Environment* **7**, 289-294.
- Sobotníková J., Bosáková Z., Čabala R., Coufal P., Pacáková V., Štulík K. (2010): Historie, současnost a perspektivy analytických separačních metod na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. *Chemické listy* **104**, 1226-1231.
- Stalikas C.D. (2007): Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science* **30**, 3268-3295.
- Stefansson M., Westerlund D. (1996): Ligand-exchange chromatography of carbohydrates and glycoconjugates. *Journal of Chromatography A* **720**, 127-136.
- Tattini M., Gravano E., Pinelli P., Mulinacci N., Romani A. (2000): Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar radiation. *New Phytologist* **148**, 69-77.
- Teshima Y., Ikeda T., Imada K., Sasaki K., El-Sayed M.A., Shigyo M., Tanaka S., Ito S. (2013): Identification and biological activity of antifungal saponins from shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum group). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**, 7440-7445.
- Tshushida T., Suzuki M. (1995): Isolation of flavonoid-glycosides in onion and identification by chemical synthesis of the glycosides. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* **42**, 100-108.
- Valluru R., Van den Ende W. (2008): Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. *Journal of Experimental Botany* **59**, 2905-2916.
- Van den Ende W., Clerens S., Vergauwen R., Van Riet L., Ven Laere A., Yoshida M., Kawakami A. (2003): Fructan 1-exohydrolases. β -(2,1)-trimmers during graminan biosynthesis in stems

- of wheat? Purification, characterization, mass mapping, and cloning of two fructan 1-exohydrolase isoforms. *Plant Physiology* **131**, 621-631.
- Van den Ende W., Michiels A., De Roover J., Van Laere A. (2002): Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of fructan genes throughout chicory development. *The Scientific World Journal* **2**, 1281-1295.
- Van den Ende W., Valluru R. (2009): Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging?. *Journal of Experimental Botany* **60**, 9-18.
- Van den Ende W., Yoshida M., Clerens S., Vergauwen R., Kawakami A. (2005): Cloning, characterization and functional analysis of novel 6-kestose exohydrolase (6-KEHs) from wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytologist* **166**, 917-932.
- Van Laere A., Van den Ende W. (2002): Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. *Plant, Cell and Environment* **25**, 803-813.
- Van Riet L., Nagaraj V., Van den Ende W., Clerens S., Wiemken A., Van Laere A. (2006): Purification, cloning and functional characterization of a fructan 6-exohydrolase from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany* **57**, 213-223.
- Velišek J., Cejpek K. (2005): Biosynthesis of food constituents: saccharides. 1. monosaccharides, oligosaccharides, and related compounds – a review. *Czech Journal of Food Sciences* **23**, 129-144.
- Verhaest M., Lammens W., Le Roy K., De Ranter C.J., Van Laere A., Rabijns A., Van den Ende W. (2007): Insights into the fine architecture of the active site of chicory fructan 1-exohydrolase: 1-kestose as substrate vs sucrose as inhibitor. *New Phytologist* **174**, 90-100.
- Verspreet J., Cimini S., Vergauwen R., Dornez E., Locato V., Le Roy K., De Gara L., Van den Ende W., Delcour J.A., Courtin C.M. (2013): Fructan metabolism in developing wheat (*Triticum aestivum* L.) kernels. *Plant Cell Physiology* **54**, 2047-2057.
- Vidal S., Francis L., Noble A., Kwiatkowski M., Cheynier V., Waters E. (2004): Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Analytica Chimica Acta* **513**, 57-65.
- Vijn I., Smeekens S. (1999): Fructan: more than a reserve carbohydrate?. *Plant Physiology* **120**, 351-359.
- Vinter V., Macháčková P. (2013): *Přehled morfologie cévnatých rostlin*. 1. vyd., Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, 198 stran.
- Vogt L., Ramasamy U., Meyer D., Pullens G., Venema K., Faas M.M., Schols H.A., de Vos P. (2013): Immune modulation by different types of β 2 \rightarrow 1-fructans is toll-like receptor dependent. *PLOS ONE* **8**, e68367, <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0068367>.
- Vu Q.H., Hang T.T.M., Yaguchi S., Ono Y., Pham T.M.P., Yamauchi N., Shigyo M. (2013): Assessment of biochemical and antioxidant diversities in a shallot germplasm collection from Vietnam and its surrounding countries. *Genetic Resources and Crop Evolution* **60**, 1297-1312.
- Wagner H., Dorsch W., Bayer T., Breu W., Willer F. (1990): Antiasthmatic effects of onions: inhibition of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase in vitro by thiosulfinates and “Cepaenes”. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **39**, 59-62.
- Wang J., Sporns P., Low N.H. (1999): Analysis of food oligosaccharides using MALDI-MS: quantification of fructooligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 1549-1557.
- Webby R.F., Markham K.R., Smith R.I. (1996): Chemotypes of the Antarctic moss *Bryum algens* delineated by their flavonoid constituents. *Biochemical Systematics and Ecology* **24**, 469-475.
- Wheeler E.J., Mashayekhi S., McNeal D., Columbus J.T., Pires J.C. (2013): Molecular systematics of *Allium* subgenus *Amerallium* (Amaryllidaceae) in North America. *American Journal of Botany* **100**, 701-711.
- Winkel-Shirley B. (1999): Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. *Physiologia Plantarum* **107**, 142-149.
- Winter H., Huber S.C. (2000): Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **35**, 253-289.

- Yoshitama K, Ishikura N., Fuleki T., Nakamura S. (1992): Effect of anthocyanin, flavonol copigmentation and pH on the color of the berries of *Ampelopsis brevipedunculata*. *Journal of Plant Physiology* **139**, 513-518.
- Zakharova A.M., Grinshtein I.L., Kartsova L.A. (2013): Determination of carbohydrates and sweeteners in foods and biologically active additives by high-performance liquid chromatography. *Journal of Analytical Chemistry* **68**, 1081-1084.
- Zeeman S.C., Kossmann J., Smith A.M. (2010): Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 209-234.
- Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W. (1999): The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* **64**, 555-559.
- Zhou Y., Zhuang W., Hu W., Liu G.J., Wu T.X., Wu X.T. (2011): Consumption of large amounts of *Allium* vegetables reduces risk for gastric cancer in a meta-analysis. *Gastroenterology* **141**, 80-89.
- Zhu H., Wang Y., Liu Y., Xia Y., Tang T. (2010): Analysis of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-VIS spectrophotometry with comparative study on different extraction technologies. *Food Analytical Methods* **3**, 90-97.

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

1-FEH	Fruktan- β -(2,1)-fruktosidasa
DAD	Detektor diodového pole
DNS	Kyselina 3,5-dinitrosalicylová
DW	Sušina
ELSD	Odpařovací detektor rozptylu světla
ESI	Ionizace elektrosprejem
FW	Čerstvá hmota
HPAEC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na měničích aniontů
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez kvantifikace
PAD	Pulsní amperometrický detektor
PAHBAH	4-Hydroxybenzhydrazid
PMSF	Fenylmethylsulfonylfluorid
QDG	Kvercetin-3,4'-O-diglukosid
QMG	Kvercetin-4'-O-glukosid
r	Pearsonův korelační koeficient
R ²	Koeficient determinace
SPE	Extrakce na pevné fázi
σ	Směrodatná odchylka posunu rovnice lineární regrese
ϕ	Průměr směrnice rovnice lineární regrese

9 PŘÍLOHY

Příloha 1 Glukosidy kvercetinu v cibuli šalotce ze sklizní 2016 a 2017

Polní číslo	Kvercetin-3,4'-O-diglukosid [mg·100 g ⁻¹ DW*]		Kvercetin-4'-O-glukosid [mg·100 g ⁻¹ DW*]	
	2016	2017	2016	2017
3000	666,3 ± 22,3	827,2 ± 14,4	152,7 ± 3,6	186,3 ± 2,8
3001	662,8 ± 5,5	835,0 ± 26,4	139,6 ± 1,1	171,1 ± 5,5
3002	499,8 ± 22,2	693,2 ± 14,1	127,0 ± 3,8	143,8 ± 2,3
3003	524,7 ± 21,4	531,8 ± 10,5	228,9 ± 8,4	189,4 ± 4,6
3004	468,4 ± 26,4	465,5 ± 28,1	202,8 ± 9,4	190,7 ± 12,7
3005	542,1 ± 14,3	509,8 ± 9,6	219,7 ± 4,2	212,4 ± 2,9
3006	591,4 ± 3,2	543,5 ± 18,1	223,7 ± 1,8	191,7 ± 3,4
3007	609,7 ± 33,1	818,5 ± 19,1	139,2 ± 6,1	173,8 ± 5,9
3008	559,7 ± 15,5	567,9 ± 10,9	148,3 ± 4,3	129 ± 4,3
3009	468,0 ± 10,6	462,8 ± 15,3	114,7 ± 1,1	99,3 ± 3,3
3012	444,1 ± 9,7	496,5 ± 6,0	117,1 ± 2,9	123,9 ± 2,2
3013	576,7 ± 7,2	670,3 ± 22,8	146,2 ± 3,6	148 ± 4,1
3014	638,1 ± 20,5	684,4 ± 7,4	158,6 ± 2,0	146,5 ± 3,1
3015	500,9 ± 36,0	386,4 ± 8,8	182,3 ± 12,1	141,2 ± 2,7
3018	561,8 ± 27,5	504,5 ± 5,6	152,8 ± 6,8	124,3 ± 1,3
3019	451,8 ± 19,9	572,1 ± 39,1	107,3 ± 4,5	131 ± 8,9
3020	588,8 ± 36,1	539,8 ± 23,4	223,2 ± 9,8	217,9 ± 8,4
3021	645,6 ± 24,6	474,4 ± 8,1	132,1 ± 3,1	99,4 ± 0,9
3022	641,8 ± 17,2	450,0 ± 7,3	252,7 ± 7,8	185,8 ± 4,6
3023	448,9 ± 6,7	436,4 ± 11,2	96,6 ± 1,0	89,2 ± 2,6
3024	395,2 ± 13,3	404 ± 28,4	98,0 ± 1,6	92,2 ± 7,1
3025	488,6 ± 5,3	370,6 ± 9,5	117,7 ± 2,7	73,5 ± 2,8
3026	496,4 ± 25,7	498,4 ± 8	117,3 ± 1,3	100,1 ± 2,5
3027	626,1 ± 5,1	607,2 ± 23,1	142,8 ± 2,7	128,2 ± 3,4
3028	590,2 ± 3,4	856,5 ± 11,1	127,4 ± 0,7	198,7 ± 1,2
3029	437,3 ± 13,9	514,9 ± 41,2	106,4 ± 1,2	130 ± 8,3
3030	750,7 ± 22,8	711,7 ± 3,3	182,2 ± 5,1	163,1 ± 1,2
3031	555,7 ± 58,1	598,5 ± 12,7	122,5 ± 12,1	160,3 ± 4,4
3032	432,8 ± 46,1	652,1 ± 50,4	120,4 ± 9,5	165,9 ± 9,6
3033	535,8 ± 48,5	498,8 ± 19,6	207,7 ± 24,8	212,8 ± 11
3034	581,9 ± 19,1	614,6 ± 34,1	141,2 ± 6,1	150,7 ± 7,5
3035	630,6 ± 32,5	574,9 ± 22,5	134,7 ± 4,6	119,2 ± 3,9
3036	601,7 ± 31,5	751,1 ± 39,5	138,8 ± 5,4	159,3 ± 6,9
3037	387,1 ± 11,2	369,9 ± 16,8	98,7 ± 1,2	81,9 ± 3,1
3040	725,2 ± 19,8	430,7 ± 17,8	165,2 ± 4,2	93,8 ± 4,3
3041	364,4 ± 18,3	331,1 ± 16,8	104,3 ± 3,7	88 ± 4,6
3042	640,8 ± 21,4	473,8 ± 50,5	131,2 ± 2,4	102,3 ± 11
3043	516,2 ± 18,8	686,9 ± 6,3	113,6 ± 2,1	173,1 ± 2
3044	527,1 ± 9,9	498,7 ± 15	187,0 ± 1,0	186 ± 6,1

Příloha 1 Glukosidy kvercetinu v cibuli šalotce ze sklizní 2016 a 2017 (*pokračování*)

Polní číslo	Kvercetin-3,4'-O-diglukosid [mg·100 g ⁻¹ DW]		Kvercetin-4'-O-glukosid [mg·100 g ⁻¹ DW]	
	2016	2017	2016	2017
3052	573,9 ± 22,7	434,9 ± 43,6	239,4 ± 8,5	179 ± 15,3
3055	511,7 ± 21,1	452,9 ± 17,6	124,7 ± 3,5	99,8 ± 4,8
3089	623,3 ± 17,0	491,6 ± 48,5	141,1 ± 3,8	123,5 ± 10,3
3090	557,6 ± 9,7	395,1 ± 31,5	117,6 ± 1,8	76,4 ± 5,3
3092	474,4 ± 7,2	330,6 ± 24,8	133,7 ± 1,7	70,6 ± 5,8
3093	659,8 ± 14,5	545,4 ± 57,5	137,4 ± 1,0	104,9 ± 10,3
3095	534,0 ± 6,8	428 ± 42,9	204,8 ± 3,1	153,6 ± 15,6
3097	470,0 ± 5,2	409,8 ± 30,1	163,1 ± 1,6	102 ± 8,4
3098	562,3 ± 16,2	458 ± 79,6	118,4 ± 4,6	96,6 ± 16,8
3099	303,5 ± 6,8	381,1 ± 6,5	91,5 ± 1,7	87,3 ± 1,2
3100	370,0 ± 12,2	387,3 ± 30,9	106,6 ± 2,9	77,5 ± 7,4
3101	322,4 ± 104,2	305,7 ± 12,4	110,0 ± 35,5	62,8 ± 2,7
3102	370,0 ± 17,5	448,7 ± 11,3	126,1 ± 3,1	79,7 ± 0,7
3103	405,5 ± 59,1	461,7 ± 19,9	109,6 ± 10,6	83,5 ± 3,5
3104	719,2 ± 12,3	460,8 ± 15,8	176,5 ± 5,9	87,6 ± 3
3105	384,5 ± 54,4	420,3 ± 16,3	126,4 ± 4,8	110,9 ± 4,7
3107	796,2 ± 54,5	413,2 ± 13,6	226,4 ± 18,4	100,9 ± 3,1
3108	477,7 ± 18,9	414,9 ± 8,7	139,1 ± 5,0	91,1 ± 1,9
3109	550,4 ± 5,1	730,8 ± 22,1	107,2 ± 2,2	110,7 ± 5
3110	456,3 ± 6,9	399,4 ± 0,3	84,0 ± 1,6	44,5 ± 0,3
3111	509,5 ± 11,4	536,9 ± 3,3	97,4 ± 2,9	74,4 ± 1
3113	351,4 ± 15,2	360,5 ± 9,2	83,1 ± 2,0	60,6 ± 0,5
3114	395,6 ± 13,1	521,2 ± 40,9	119,2 ± 4,5	123,4 ± 9,9
3115	532,7 ± 19,4	626,2 ± 21,1	128,3 ± 3,6	150,1 ± 6,1
3116	572,4 ± 12,9	537,4 ± 2,6	150,7 ± 3,6	134,2 ± 1,2
3117	450,9 ± 9,4	309,7 ± 11,6	120,3 ± 2,6	76 ± 1,5
3118	589,6 ± 40,3	437,9 ± 13,4	151,3 ± 7,6	99,1 ± 3,7
3119	796,5 ± 115,7	547,3 ± 7,2	215,5 ± 26,7	142,7 ± 0,9
3120	672,7 ± 10,7	547,3 ± 23,6	165,2 ± 3,7	138,9 ± 8
3121	632,6 ± 60,4	597,5 ± 23,7	166,8 ± 14,3	167 ± 6,4
3122	574,0 ± 21,5	545,6 ± 9,1	154,1 ± 4,8	157,9 ± 1,7
3123	461,1 ± 15,4	403,2 ± 7,1	124,1 ± 2,3	103,6 ± 1,4
3124	676,9 ± 38,3	593,8 ± 18,7	222,5 ± 13,3	169 ± 2,7
3125	761,9 ± 19,3	812,4 ± 31,1	165,9 ± 4,4	168 ± 7,3
3126	567,9 ± 23,2	567 ± 18,9	190,2 ± 4,9	170,2 ± 5,8
3127	948,3 ± 35,0	860,5 ± 13,9	217,4 ± 3,9	176,3 ± 1,7
3128	720,6 ± 70,5	711,4 ± 17,2	149,6 ± 11,1	151,7 ± 3,5
3130	793,1 ± 38,6	773,3 ± 17,5	131,5 ± 5,8	143,1 ± 2,7
3131	717,0 ± 7,9	563 ± 33,8	120,6 ± 1,0	118,6 ± 8,5
3132	765,7 ± 40,7	739,3 ± 61,5	125,6 ± 4,6	139 ± 11
3133	430,6 ± 16,4	217,6 ± 9,3	117,8 ± 4,3	48 ± 1,6
3134	668,1 ± 23,5	526,7 ± 25,5	147,7 ± 2,8	102,5 ± 4,4

Příloha 1 Glukosidy kvercetin v cibuli šalotce ze sklizní 2016 a 2017 (pokračování)

Polní číslo	Kvercetin-3,4'-O-diglukosid [mg·100 g ⁻¹ DW]		Kvercetin-4'-O-glukosid [mg·100 g ⁻¹ DW]	
	2016	2017	2016	2017
	3137	516,4 ± 13,5	436,2 ± 8,1	210,6 ± 4,4
3138	674,9 ± 13,0	570,7 ± 5,4	196,1 ± 3,0	154,8 ± 0,3
3139	790,4 ± 23,6	509,2 ± 9,1	215,9 ± 5,0	124,7 ± 1,5
3140	424,3 ± 4,5	425,1 ± 13,5	170,1 ± 1,9	198,1 ± 5,8
Ambition	599,6 ± 15,0	524,1 ± 47,2	169,5 ± 2,2	154,8 ± 13
Prisma	337,0 ± 3,4	336,9 ± 14,9	88,9 ± 0,5	100,7 ± 4,7

* Výsledky jsou vyjádřeny ve formě aritmetický průměr ze tří měření ± směrodatná odchylka.

Příloha 2 Malé sacharidy v cibuli šalotce ze sklizní 2016 a 2017

Polní číslo	Sacharosa [mg·100 mg ⁻¹ DW*]		Glukosa [mg·100 mg ⁻¹ DW*]		Fruktosa [mg·100 mg ⁻¹ DW*]	
	2016	2017	2016	2017	2016	2017
	3000	10,9 ± 0,0	9,8 ± 0,2	0,7 ± 0,0	1,2 ± 0,1	8,3 ± 0,1
3001	10,1 ± 0,3	9,7 ± 0,1	0,5 ± 0,0	1,0 ± 0,0	8,4 ± 0,0	9,0 ± 0,2
3002	15,4 ± 0,3	13,3 ± 0,3	1,2 ± 0,1	1,7 ± 0,1	10,0 ± 0,2	11,3 ± 0,2
3003	10,7 ± 0,2	9,4 ± 0,1	3,2 ± 0,1	2,8 ± 0,0	8,2 ± 0,1	7,7 ± 0,2
3004	10,6 ± 0,2	10,8 ± 0,2	2,9 ± 0,1	3,0 ± 0,1	8,3 ± 0,2	9,7 ± 0,2
3005	9,9 ± 0,2	10,6 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,9 ± 0,1	7,6 ± 0,1	9,9 ± 0,0
3006	8,9 ± 0,1	9,5 ± 0,3	3,0 ± 0,0	3,8 ± 0,1	6,1 ± 0,0	8,4 ± 0,2
3007	16,5 ± 0,2	12,1 ± 0,2	1,2 ± 0,0	2,1 ± 0,1	9,8 ± 0,1	10,0 ± 0,4
3008	9,1 ± 0,2	8,5 ± 0,3	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,0	8,1 ± 0,1	5,2 ± 0,1
3009	14,3 ± 0,3	14,8 ± 0,2	1,1 ± 0,0	1,7 ± 0,0	9,6 ± 0,1	10,8 ± 0,1
3012	11,3 ± 0,3	11,3 ± 0,5	1,0 ± 0,0	1,2 ± 0,0	8,9 ± 0,1	10,6 ± 0,4
3013	9,8 ± 0,2	11,3 ± 0,2	1,0 ± 0,0	1,1 ± 0,0	9,6 ± 0,1	9,7 ± 0,5
3014	11,8 ± 0,3	10,7 ± 0,2	1,0 ± 0,0	1,2 ± 0,0	8,4 ± 0,1	9,4 ± 0,1
3015	13,3 ± 0,1	12,3 ± 0,1	0,9 ± 0,0	1,9 ± 0,0	5,8 ± 0,1	7,0 ± 0,2
3018	10,6 ± 0,4	10,4 ± 0,2	0,9 ± 0,0	1,0 ± 0,0	7,1 ± 0,1	8,4 ± 0,1
3019	14,2 ± 0,2	13,0 ± 0,1	0,9 ± 0,0	1,6 ± 0,1	8,6 ± 0,1	10,1 ± 0,1
3020	10,6 ± 0,2	10,4 ± 0,3	4,1 ± 0,2	3,8 ± 0,1	9,9 ± 0,2	13,0 ± 0,3
3021	16,4 ± 0,4	15,2 ± 0,3	1,4 ± 0,0	1,2 ± 0,0	8,0 ± 0,2	11,0 ± 0,1
3022	9,1 ± 0,3	13,4 ± 0,5	2,5 ± 0,1	3,2 ± 0,1	6,6 ± 0,2	9,6 ± 0,3
3023	15,6 ± 0,2	15,0 ± 0,6	1,1 ± 0,0	1,5 ± 0,1	9,4 ± 0,2	11,7 ± 0,4
3024	16,2 ± 0,2	14,1 ± 0,2	0,7 ± 0,0	1,1 ± 0,0	9,3 ± 0,1	9,8 ± 0,1
3025	17,8 ± 0,1	14,6 ± 0,4	0,8 ± 0,0	1,2 ± 0,0	11,0 ± 0,1	11,7 ± 0,2
3026	15,6 ± 0,5	14,9 ± 0,5	0,9 ± 0,0	1,0 ± 0,0	10,3 ± 0,5	11,2 ± 0,1
3027	11,8 ± 0,3	10,1 ± 0,3	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,0	8,9 ± 0,2	7,4 ± 0,3
3028	12,3 ± 0,5	11,5 ± 0,4	ned.†	0,8 ± 0,0	6,1 ± 0,1	7,9 ± 0,2
3029	12,0 ± 0,4	10,7 ± 0,4	0,7 ± 0,0	0,9 ± 0,0	9,0 ± 0,1	10,4 ± 0,2
3030	11,0 ± 0,4	10,4 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,9 ± 0,0	7,2 ± 0,1	7,6 ± 0,1
3031	10,3 ± 0,1	10,9 ± 0,1	ned.	0,8 ± 0,0	7,4 ± 0,2	7,3 ± 0,1
3032	11,1 ± 0,1	10,7 ± 0,4	0,7 ± 0,0	0,9 ± 0,0	8,6 ± 0,0	7,5 ± 0,0

Příloha 2 Malé sacharidy v cibuli šalotce ze sklizní 2016 a 2017 (pokračování)

Polní číslo	Sacharosa		Glukosa		Fruktosa	
	[mg·100 mg ⁻¹ DW]		[mg·100 mg ⁻¹ DW]		[mg·100 mg ⁻¹ DW]	
	2016	2017	2016	2017	2016	2017
3033	9,8 ± 0,0	10,7 ± 0,2	2,8 ± 0,0	3,0 ± 0,1	7,9 ± 0,0	11,0 ± 0,1
3034	14,4 ± 0,6	12,5 ± 0,2	0,8 ± 0,0	1,4 ± 0,1	9,8 ± 0,1	8,3 ± 0,2
3035	10,1 ± 0,2	10,8 ± 0,1	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0	9,3 ± 0,0	8,7 ± 0,1
3036	14,5 ± 0,5	13,1 ± 0,4	1,0 ± 0,0	1,5 ± 0,0	10,2 ± 0,1	8,8 ± 0,1
3037	14,0 ± 0,1	14,4 ± 0,2	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0	12,0 ± 0,1	10,4 ± 0,2
3040	10,8 ± 0,4	11,4 ± 0,2	0,6 ± 0,0	1,1 ± 0,0	6,1 ± 0,0	7,9 ± 0,2
3041	10,1 ± 0,3	10,1 ± 0,2	0,7 ± 0,0	1,2 ± 0,0	9,3 ± 0,2	8,9 ± 0,3
3042	9,3 ± 0,3	10,7 ± 0,4	ned.	0,7 ± 0,0	6,7 ± 0,1	10,1 ± 0,2
3043	12,7 ± 0,1	14,1 ± 0,6	ned.	1,5 ± 0,0	9,7 ± 0,1	10,4 ± 0,3
3044	9,9 ± 0,1	10,9 ± 0,2	2,9 ± 0,0	2,8 ± 0,1	8,5 ± 0,1	12,8 ± 0,3
3052	10,8 ± 0,3	12,2 ± 0,3	3,9 ± 0,1	2,6 ± 0,1	10,4 ± 0,1	13,1 ± 0,1
3055	14,1 ± 0,3	13,3 ± 0,1	0,6 ± 0,0	1,3 ± 0,0	10,1 ± 0,2	10,0 ± 0,1
3089	16,7 ± 0,2	15,1 ± 0,3	1,8 ± 0,0	2,1 ± 0,0	7,1 ± 0,1	7,6 ± 0,1
3090	10,7 ± 0,2	12,3 ± 0,1	0,9 ± 0,0	1,3 ± 0,0	9,3 ± 0,0	12,2 ± 0,3
3092	15,5 ± 0,3	13,4 ± 0,3	1,2 ± 0,0	1,6 ± 0,1	8,8 ± 0,1	7,5 ± 0,2
3093	12,8 ± 0,4	11,4 ± 0,2	0,8 ± 0,0	1,1 ± 0,1	10,7 ± 0,3	9,8 ± 0,1
3095	13,8 ± 0,2	13,5 ± 0,1	0,6 ± 0,0	1,6 ± 0,1	6,9 ± 0,1	7,5 ± 0,1
3097	10,1 ± 0,2	9,4 ± 0,1	0,7 ± 0,0	1,1 ± 0,1	6,9 ± 0,1	9,1 ± 0,1
3098	10,4 ± 0,1	10,0 ± 0,3	0,6 ± 0,0	1,5 ± 0,0	7,5 ± 0,1	9,3 ± 0,2
3099	14,2 ± 0,1	11,0 ± 0,0	ned.	1,2 ± 0,0	10,4 ± 0,1	7,8 ± 0,2
3100	9,3 ± 0,1	9,5 ± 0,4	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	7,2 ± 0,2	7,6 ± 0,3
3101	12,5 ± 0,4	10,2 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,9 ± 0,0	6,2 ± 0,1	5,7 ± 0,3
3102	14,1 ± 0,2	13,2 ± 0,2	0,9 ± 0,0	1,2 ± 0,0	8,5 ± 0,1	8,1 ± 0,1
3103	14,6 ± 0,0	12,5 ± 0,6	0,8 ± 0,0	0,9 ± 0,0	8,6 ± 0,1	7,7 ± 0,1
3104	10,2 ± 0,1	10,2 ± 0,3	1,6 ± 0,1	1,8 ± 0,0	11,7 ± 0,0	12,5 ± 0,4
3105	13,8 ± 0,3	13,4 ± 0,3	1,0 ± 0,0	2,4 ± 0,1	5,8 ± 0,0	11,1 ± 0,1
3107	13,3 ± 0,2	13,7 ± 0,5	2,0 ± 0,0	1,4 ± 0,0	10,0 ± 0,1	8,0 ± 0,2
3108	16,7 ± 0,1	15,1 ± 0,5	7,6 ± 0,0	10,4 ± 0,2	12,5 ± 0,1	12,3 ± 0,3
3109	10,6 ± 0,1	11,6 ± 0,3	0,8 ± 0,0	0,9 ± 0,0	11,6 ± 0,3	10,7 ± 0,3
3110	12,9 ± 0,1	10,3 ± 0,1	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0	8,7 ± 0,2	7,7 ± 0,0
3111	11,9 ± 0,0	9,7 ± 0,2	1,4 ± 0,0	1,0 ± 0,0	12,8 ± 0,0	12,2 ± 0,4
3113	11,3 ± 0,3	11,5 ± 0,2	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,0	13,8 ± 0,1	13,5 ± 0,2
3114	13,7 ± 0,3	12,1 ± 0,2	ned.	ned.	6,3 ± 0,1	6,8 ± 0,1
3115	8,3 ± 0,3	9,3 ± 0,2	1,2 ± 0,0	1,0 ± 0,0	8,2 ± 0,2	9,1 ± 0,3
3116	9,8 ± 0,0	11,3 ± 0,5	1,4 ± 0,0	1,6 ± 0,0	6,5 ± 0,1	8,1 ± 0,3
3117	14,8 ± 0,2	13,1 ± 0,6	0,8 ± 0,0	1,0 ± 0,0	8,8 ± 0,1	9,2 ± 0,1
3118	11,2 ± 0,1	9,4 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,0	7,0 ± 0,1	6,1 ± 0,1
3119	10,6 ± 0,2	12,5 ± 0,6	2,5 ± 0,0	2,6 ± 0,1	8,8 ± 0,0	11,4 ± 0,3
3120	10,9 ± 0,2	11,8 ± 0,5	1,7 ± 0,0	1,5 ± 0,0	7,2 ± 0,1	9,5 ± 0,2
3121	11,9 ± 0,1	14,3 ± 0,3	2,8 ± 0,0	3,1 ± 0,1	9,6 ± 0,1	12,2 ± 0,1
3122	12,0 ± 0,2	14,3 ± 0,4	2,4 ± 0,1	2,1 ± 0,1	9,4 ± 0,1	12,3 ± 0,3
3123	14,1 ± 0,1	15,8 ± 0,4	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,1	11,2 ± 0,4	13,2 ± 0,3

Příloha 2 Malé sacharidy v cibuli šalotce ze sklizní 2016 a 2017 (pokračování)

Polní číslo	Sacharosa		Glukosa		Fruktosa	
	[mg·100 mg ⁻¹ DW]		[mg·100 mg ⁻¹ DW]		[mg·100 mg ⁻¹ DW]	
	2016	2017	2016	2017	2016	2017
3124	13,2 ± 0,1	14,4 ± 0,5	ned.	1,1 ± 0,0	6,4 ± 0,0	10,5 ± 0,1
3125	12,1 ± 0,4	12,7 ± 0,3	1,6 ± 0,1	1,8 ± 0,1	5,3 ± 0,1	6,6 ± 0,1
3126	10,6 ± 0,3	14,0 ± 0,2	4,8 ± 0,0	6,7 ± 0,1	8,9 ± 0,1	13,9 ± 0,3
3127	10,5 ± 0,2	9,2 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,8 ± 0,0	4,0 ± 0,0	6,2 ± 0,1
3128	13,9 ± 0,2	14,3 ± 0,5	1,2 ± 0,0	1,7 ± 0,1	5,6 ± 0,0	8,3 ± 0,2
3130	8,9 ± 0,2	12,6 ± 0,5	0,8 ± 0,0	1,1 ± 0,0	10,0 ± 0,1	12,2 ± 0,2
3131	9,3 ± 0,2	12,4 ± 0,4	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0	9,9 ± 0,1	13,3 ± 0,2
3132	9,8 ± 0,2	12,1 ± 0,2	1,2 ± 0,0	0,9 ± 0,0	8,8 ± 0,1	12,2 ± 0,2
3133	12,0 ± 0,3	11,1 ± 0,2	1,5 ± 0,1	1,0 ± 0,0	12,1 ± 0,1	11,3 ± 0,1
3134	10,1 ± 0,2	11,3 ± 0,2	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,0	9,3 ± 0,1	11,0 ± 0,1
3137	12,0 ± 0,0	13,9 ± 0,5	2,3 ± 0,0	2,8 ± 0,1	9,1 ± 0,1	16,1 ± 0,4
3138	13,4 ± 0,4	15,8 ± 0,5	2,5 ± 0,0	2,6 ± 0,1	9,4 ± 0,1	14,5 ± 0,0
3139	12,8 ± 0,2	14,5 ± 0,2	3,3 ± 0,1	3,5 ± 0,1	9,2 ± 0,1	12,8 ± 0,1
3140	11,3 ± 0,2	13,9 ± 0,3	4,5 ± 0,0	5,1 ± 0,2	9,7 ± 0,0	15,4 ± 0,2
Prisma	15,1 ± 0,3	13,6 ± 0,3	2,5 ± 0,0	4,7 ± 0,1	10,1 ± 0,1	11,9 ± 0,3
Ambition	17,5 ± 0,2	12,8 ± 0,1	5,6 ± 0,1	2,8 ± 0,1	7,6 ± 0,1	9,6 ± 0,1

* Výsledky jsou vyjádřeny ve formě aritmetický průměr ze tří měření ± směrodatná odchylka.

† Ned. vyjadřuje hodnotu pod mezí detekce metody HPLC-ELSD.

Příloha 3 Fruktany v cibuli šalotce ze sklizní 2016 a 2017

Polní číslo	[mg·100 mg ⁻¹ DW]	
	2016	2017
3000	39,5 ± 0,9	35,3 ± 1,6
3001	43,5 ± 0,3	31,7 ± 0,8
3002	38,1 ± 0,1	30,3 ± 0,7
3003	45,1 ± 0,5	36,1 ± 0,8
3004	34,7 ± 0,1	27,5 ± 0,8
3005	43,2 ± 0,1	29,7 ± 1,1
3006	45,5 ± 0,9	33,1 ± 0,7
3007	31,5 ± 3,1	30,1 ± 1,0
3008	50,2 ± 0,3	51,5 ± 2,0
3009	42,9 ± 1,2	31,7 ± 0,5
3012	44,9 ± 0,1	43,6 ± 2,2
3013	48,1 ± 0,3	43,0 ± 0,7
3014	48,0 ± 0,6	40,7 ± 0,2
3015	49,3 ± 0,5	36,3 ± 0,9
3018	52,6 ± 0,3	37,6 ± 0,1
3019	40,2 ± 2,6	32,5 ± 0,5
3020	39,9 ± 0,3	32,4 ± 0,6
3021	42,3 ± 0,3	26,8 ± 0,6
3022	44,8 ± 0,1	28,9 ± 0,8

Příloha 3 Fruktany v cibuli šalotce ze sklizní 2016 a 2017 (pokračování)

Polní číslo	[mg·100 mg ⁻¹ DW]	
	2016	2017
3023	39,2 ± 1,5	27,2 ± 1,0
3024	43,2 ± 0,4	30,4 ± 0,5
3025	36,5 ± 1,5	31,9 ± 0,8
3026	36,7 ± 0,3	31,6 ± 0,8
3027	35,3 ± 0,2	39,8 ± 0,5
3028	43,7 ± 1,0	33,6 ± 0,1
3029	44,1 ± 0,3	37,1 ± 1,5
3030	44,6 ± 0,9	38,0 ± 1,2
3031	43,7 ± 0,6	36,4 ± 0,0
3032	45,1 ± 0,4	42,5 ± 0,2
3033	40,6 ± 0,3	40,7 ± 1,2
3034	38,2 ± 1,3	34,0 ± 0,8
3035	40,8 ± 1,0	41,4 ± 0,8
3036	34,6 ± 0,3	36,7 ± 0,7
3037	42,4 ± 0,2	21,0 ± 1,0
3040	40,3 ± 0,1	32,7 ± 0,3
3041	47,6 ± 0,2	30,3 ± 0,9
3042	46,7 ± 0,7	29,5 ± 0,1
3043	39,4 ± 0,3	32,8 ± 0,9
3044	49,2 ± 0,7	36,0 ± 0,1
3052	37,8 ± 0,7	28,6 ± 0,7
3055	40,0 ± 0,7	34,5 ± 0,4
3089	44,3 ± 0,1	34,5 ± 0,1
3090	44,6 ± 0,3	33,6 ± 0,3
3092	40,0 ± 0,2	37,5 ± 0,9
3093	38,8 ± 0,3	37,9 ± 1,5
3095	46,8 ± 0,8	39,4 ± 0,2
3097	53,9 ± 0,3	39,1 ± 0,1
3098	44,3 ± 0,2	49,1 ± 0,0
3099	39,2 ± 0,7	40,7 ± 0,7
3100	53,5 ± 0,7	43,8 ± 0,9
3101	47,6 ± 0,7	48,7 ± 0,1
3102	41,8 ± 1,0	33,1 ± 0,0
3103	39,9 ± 0,1	31,9 ± 1,0
3104	43,1 ± 0,5	39,3 ± 0,7
3105	46,6 ± 0,3	36,0 ± 0,8
3107	42,6 ± 0,7	35,4 ± 0,1
3108	34,7 ± 1,0	26,5 ± 0,3
3109	43,8 ± 0,6	37,7 ± 0,1
3110	48,9 ± 0,0	46,4 ± 0,6
3111	35,4 ± 1,7	33,2 ± 0,3
3113	43,6 ± 0,2	37,8 ± 1,0

Příloha 3 Fruktany v cibuli šalotce ze sklizní 2016 a 2017 (pokračování)

Polní číslo	[mg·100 mg ⁻¹ DW]	
	2016	2017
3114	48,1 ± 0,8	41,8 ± 0,1
3115	48,7 ± 0,1	41,2 ± 1,7
3116	53,3 ± 0,1	38,8 ± 0,2
3117	45,1 ± 0,1	38,8 ± 0,6
3118	49,8 ± 1,0	53,6 ± 0,5
3119	42,3 ± 0,1	31,3 ± 0,3
3120	44,5 ± 0,9	39,6 ± 0,2
3121	32,8 ± 1,2	35,1 ± 0,7
3122	39,7 ± 0,8	32,8 ± 1,1
3123	37,8 ± 0,3	25,2 ± 0,8
3124	46,5 ± 0,0	25,2 ± 1,1
3125	48,2 ± 0,6	42,2 ± 0,7
3126	43,1 ± 0,5	26,7 ± 0,6
3127	54,7 ± 1,7	44,4 ± 0,5
3128	44,1 ± 1,2	30,1 ± 1,3
3130	48,6 ± 0,5	30,8 ± 0,6
3131	48,2 ± 1,3	36,5 ± 0,1
3132	45,1 ± 0,5	29,8 ± 0,7
3133	38,2 ± 0,7	32,7 ± 1,0
3134	46,1 ± 0,4	34,6 ± 1,5
3137	37,8 ± 0,2	28,0 ± 0,4
3138	42,4 ± 0,9	24,1 ± 0,3
3139	40,2 ± 0,4	31,6 ± 1,3
3140	37,1 ± 0,9	25,7 ± 1,0
Prisma	41,1 ± 0,2	27,4 ± 0,2
Ambition	42,6 ± 0,9	35,1 ± 0,7

* Výsledky jsou vyjádřeny ve formě aritmetický průměr z duplikátu ± směrodatná odchylka.