

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**  
**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Ing. Štěpánka Horníčková**

katedra: Chemie.

**Zastoupení biologicky aktivních látek v semenech révy vinné  
(*Vitis vinifera L.*)**

**Representation of biologically active substances in the grape seeds (*Vitis vinifera L.*)  
autoreferát doktorské disertační práce**

Studijní program: P4 106 Zemědělská specializace

Studijní obor: 4106V017 Zemědělská chemie

Školitel: **Doc. Ing. Alena Hejtmánková, CSc.**

katedra chemie

Oponenti: prof. Ing. Vlastimil Fic, DrSc.

doc. Ing. Pavel Pavloušek, Ph.D.

Ing. Radomíra Střalková, Ph.D.

Obhajoba doktorské disertační práce se koná dne: 15.9.2015  
ve 13 hod. na: Fakultě agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů ČZU v  
Praze

S doktorskou disertační prací je možno se seznámit na děkanátě FAPPZ ČZU  
v Praze.

**P r a h a 2 0 1 5**

## Obsah

1	Úvod .....	3
2	Cíl práce .....	4
3	Materiál a metody .....	5
3.1	Naměřený soubor dat.....	5
3.2	Stanovení obsahu celkových polyfenolických látek v semenech révy vinné .....	5
3.3	Stanovení vitamínu E v semnech.....	5
3.4	Stanovení obsahu fosforu.....	6
3.5	Stanovení obsahu prvků (Zn, Cu, Fe, Mn, K, Ca, Mg a Na) metodou AAS .....	6
3.6	Použité metody zpracování dat .....	
3.6.1	Statistická analýza .....	6
3.6.2	Metody strojového učení .....	
4	Výsledky.....	7
4.1	Obsah celkových polyfenolických látek.....	7
4.2	Obsah tokoferolů a tokotrienolů.....	7
4.3	Obsah vybraných esenciálních makroelementů .....	9
4.4	Obsah vybraných esenciálních mikroelementů (Zn, Cu, Fe, Mn) .....	11
4.5	Vliv lokality pěstování na obsah biologicky aktivních látek.....	
5	Diskuze a závěry .....	
6	Seznam použité literatury .....	13
7	Seznam publikací .....	14
7.1	Seznam vědeckých publikací vztahujících se k problematice disertační práce.....	14
7.2	Seznam ostatních vědeckých publikací .....	14
7.3	Skripta.....	15
8	Summary.....	15

# 1 Úvod

Odpady zemědělské produkce představují do značné míry dosud téměř opomíjený surovinový zdroj s vysokou přídatnou hodnotou biologicky aktivních látek (*Rayne et al., 2008*). Velké množství cenného odpadu vzniká i při výrobě vína a vinného moštu z révy vinné. Réva vinná vykazuje široké spektrum biologicky aktivních látek, především s antioxidantními účinky, a tím významně ovlivňuje lidské zdraví. Působí preventivně proti šedému zákalu, má antihyperglykemické účinky a protizánětlivé účinky. Dále byl prokázán pozitivní vliv ochranných účinků révy vinné proti poškození buněk mozku myši (*Guo et al., 2007*).

Světová roční produkce vinných hroznů je 69 milionů tun (*FAOSTAT, 2010*), asi 80 % této produkce se využívá k výrobě vína. Při tomto procesu vzniká 10 milionů tun odpadních výlisků – matolin, které se skládají ze semen, slupek a třapin. Semena představují přibližně 38 – 52 % sušiny matolin a jsou cenným zdrojem fenolických látek a různých forem vitamínu E.

Semena révy vinné představují nejvýznamnější zdroj polyfenolických látek v hroznu (*Anastasiadi et al., 2010*). Polyfenolické látky mají významný vliv na lidské zdraví. Polyfenolické látky zabraňují vzniku rakovinového bujení a v případě jeho vzniku jej potlačují. Ve studiích in vitro bylo zjištěno, že extract ze semen révy vinné může zabraňovat růstu maligních buněk, především pak v nádorech prsu, žaludku, střev, prostaty a plic (*Choi et al., 2009*).

Ze semen je možné lisováním vyrábět vinný olej. V poslední době roste zájem o vinný olej, jako o funkční potravinu, neboť bylo prokázáno, že vedle vysokého množství vitamínu E, obsahuje ve velké míře i nenasycené mastné kyseliny, zejména esenciální linolovou kyselinu a fytoosteroly.

Vinný olej je bohatý na esenciální linolovou kyselinu, jejíž obsah se pohybuje mezi 67,15 – 69,58 % (*Kim et al., 2008*). Tím se stává velmi hodnotným z výživového hlediska. Z mastných kyselin jsou dále zastoupeny: olejová kyselina, jejíž obsah byl mezi 13,9 a 21,9 %, stearová kyselina (2 – 4 %) a palmitová kyselina (okolo 7 %) (*Lutterdot et al., 2011*).

Vinný olej má také vysoký obsah tokotrienolů a celkový obsah vitamínu E je vyšší než v olivovém oleji, který je podobně jako sojový olej, bohatý na tokoferoly (*Kim et al. 2008*).

Tokotrienoly mohou vykazovat mnohonásobně vyšší antioxidační kapacitu ve srovnání s tokoferoly, které představují často jedinou složku zastupující vitamin E v ostatních rostlinných olejích. Vitamin E je však světlocitlivý a jeho stabilita je omezená (*Kim et al., 2008*).

Ve světě se začínají rozvíjet krmné směsi obohacené o semena révy vinné, která díky vysokému obsahu biologicky aktivních látek představují potenciální zdroj nutričně významných látek pro hospodářská zvířata. Biologicky aktivní látky zlepšují konzervaci krmiva, očekává se zlešení kvality masa prasat, drůbeže, mléka a vajec.

Legislativní rámec EU a stále se zpřísnující národní předpisy v oblasti odpadového hospodářství směřují prioritně k hledání nových bezodpadových technologií, které zabezpečí účelné a efektivní využití odpadních produktů. V podmínkách moderních vinařských provozů je proto věnována stále větší pozornost problematice využití matolin, které vznikají při zpracování hroznů (*Burg, 2014*).

Využití semen révy vinné, jako odpadního produktu vinařské produkce, povede kromě využití cenných biologicky aktivních látek zároveň ke snížení zátěže vinic obtížně rozložitelnou organickou hmotou.

## 2 Cíl práce

Na základě provedené literární rešerše byly stanoveny následující hypotézy a cíl práce:

- Obsah biologicky aktivních látek v semenech révy vinné je odrůdově závislý.
- Obsah biologicky aktivních látek v semenech révy vinné je závislý na oblasti pěstování vinné révy.
- Obsah biologicky aktivních látek v semenech révy vinné je závislý na ročníku sklizně.

Cílem disertační práce je stanovení vybraných biologicky aktivních látek – celkového obsahu polyfenolických látek, vitaminu E a minerálních látek v semenech jako součástí matolin, vznikajících jako odpad při lisování vína z vybraných odrůd révy vinné.

Dílčím cílem je sledování dalších významných faktorů, tj. lokality a ročníku pěstování, ovlivňujících obsah BAL v matolinách.

### **3 Materiál a metody**

#### **3.1 Naměřený soubor dat**

Vybrané biologicky aktivní látky byly analyzovány ve 164 vzorcích semen révy vinné vybraných odrůd pěstovaných v různých lokalitách České republiky (moravské a české oblasti). Vzorky k analýze byly pravidelně dodávány v letech 2012 až 2014 Výzkumnou stanicí vinařskou Karlštejn.

#### **3.2 Stanovení obsahu celkových polyfenolických látek v semenech révy vinné**

0,5 g namletého vzorku bylo extrahováno 10 ml 80% methanolu a ponecháno po dobu 10 minut v ultrazvukové lázni (za občasného promíchání tyčinkou). Extrakt byl odstředěn a supernatant byl převeden do 25ml odměrné baňky. Extrakce byla ještě jednou opakována. Spojené supernatanty byly doplněny na 25 ml 80% methanolem a pečlivě promíchány. Na vlastní zkoušku byl odeberán 1 ml (100  $\mu$ l) připraveného roztoku do 50ml baňky. Roztok byl naředěn cca 5 ml destilované vody. Dále bylo přidáno 2,5 ml Folin – Ciocalteova činidla; 7,5 ml 20% vodného roztoku  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a vše doplněno po rysku destilovanou vodou. Směs byla promíchána a po 2 hodinách byla proměřena absorbance roztoku při 765 nm proti slepému pokusu.

#### **3.3 Stanovení vitamínu E v semnech**

0,5 g namletého vzorku bylo extrahováno 10 ml methanolu po dobu 10 minut v ultrazvukové lázni (za občasného promíchání tyčinkou). Poté byl extrakt odstředěn a supernatant byl převeden do 50ml odpařovací baňky. Extrakce byla opakována s dalšími 10 ml metanolu. Spojené methanolicke extrakty byly odpařeny na rotační vakuové odparce do sucha a znovu rozpuštěny v 1 ml methanolu a přes nylonový mikrofiltr PVDF (0,45  $\mu$ m) převedeny do vialky. Následovala HPLC-FLD analýza.

### 3.4 Stanovení obsahu fosforu

Do 25ml odměrné baňky bylo odpipetováno 0,5 - 2,0 ml mineralizovaného vzorku dle obsahu fosforu a doplněno po rysku činidlem na fosfor (0,22 metavanadičnanu amonného + 4,4 g molybdenum amonného bylo rozpuštěno ve 200 ml redestilované vody, přidáno se 15 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  p.a.;  $\rho=1,84 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  a vše doplněno na 1000 ml). Po promíchání byl vzorek nechán minimálně 30 minut vybarvovat. Absorbance byla měřena proti slepému pokusu (0,5 – 2 ml HCl doplněno po rysku činidlem na P) na spektrofotometru Heλios Y při  $\lambda= 400 \text{ nm}$ .

### 3.5 Stanovení obsahu prvků (Zn, Cu, Fe, Mn, K, Ca, Mg a Na) metodou AAS

Ke zmineralizovanému vzorku byl přidán 1 ml koncentrované  $\text{HNO}_3$  a cca 10 ml 1,5%  $\text{HNO}_3$  a popel byl loužen cca 15 minut. Poté byly kádinky přeneseny do ultrazvukové lázně, kde bylo rozpuštění popela během 5 minut urychleno. Získaný mineralizát byl kvantitativně přenesen do kalibrovaných zkumavek, které byly doplněny 1,5%  $\text{HNO}_3$  na objem 25 ml. Minerální látky byly stanoveny atomovou absorpční spektroskopií na přístroji Varian SpectrAA 110 (Varian , CA, USA) v plameni vzduch/acetylen při vlnové délce 422.7 nm (Ca), 285.2 nm (Mg), 589.0 nm (Na), 766.5 nm (K), 248.3 nm (Fe), 324.7 nm (Cu), 213.9 nm (Zn), and 279.5 nm (Mn). Šířka spektrálního intervalu byla 1 nm (Zn, K a Na), 0,5 nm (Cu, Ca a Mg) a 0,2 nm (Fe a Mn). Korekce pozadí byla provedena pomocí deuteriové lampy.

### 3.6 Statistická analýza

Byla použita statistická analýza rozptylu ANOVA a korelační analýza RapidMiner Studio 6.

## 4 Výsledky

### 4.1 Obsah celkových polyfenolických látek

Obsah polyfenolických látek byl detekován v roce 2011 ve 32 vzorcích. Bílé odrůdy sklizené v roce 2011 obsahovaly vyšší hladiny CP v semenech (průměrně  $5811 \pm 1758 \text{ mg.kg}^{-1}$  sušiny) ve srovnání s modrými odrůdami ( $3550 \pm 1739 \text{ mg.kg}^{-1}$  sušiny). Z bílých odrůd (tab. 1) nejvyšší obsah CP byl detekován v odrůdě Siegerrebe ( $8025 \text{ mg.kg}^{-1}$  sušiny, Karlštejn). Z modrých odrůd dosáhla nejvyšších hodnot CP odrůda Mlynářka ( $8068 \text{ mg.kg}^{-1}$  sušiny, Karlštejn). Bílé odrůdy révy vinné sklizené v roce 2012 obsahovaly take vyšší hodnoty celkových polyfenolických látek ( $7338 \pm 1792 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině) oproti modrým odrůdám, které průměrně obsahovaly  $6704 \pm 2796 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině. Nejvyšší obsah celkových polyfenolických látek byl detekován v bílé odrůdě Rulandské šedé ( $10942 \text{ mg.kg}^{-1}$ ; Karlštejn). V modrých odrůdách, sklizených v roce 2012, byl nejvyšší obsah CP detekován v odrůdě Rulandské modré ( $11630 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině, Karlštejn). Obsah celkových polyfenolických látek byl stanoven v 89 vzorcích sklizených v roce 2013. Semena révy vinné obsahovala průměrně  $91564 \pm 17784 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině v bílých odrůdách a  $84450 \pm 25156 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině v modrých odrůd. Vysoké hodnoty CP u sklizně z roku 2013 jsou ovlivněné tím, že semena révy vinné neprošla technologickým zpracováním při výrobě vína. Bílá odrůda (tab. 1) Ryzlink rýnský z moravské vinařské oblasti obsahovala nejvíce CP ( $140062 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině, Příkladky). Z modrých odrůd byl nejvyšší obsah celkových polyfenolických látek detekován u odrůdy Rulandské modré ( $126543 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině, Karlštejn).

### 4.2 Obsah tokoferolů a tokotrienolů

V semenech révy vinné byli stanoveny tři formy tokotrienolů ( $\alpha$ -tct,  $\gamma$ -tct a  $\delta$ -tct) a dvě formy tokoferolů ( $\alpha$ -tcph a  $\gamma$ -tcph).

V semenech révy vinné sklizených v roce 2011  $\gamma$ -tokotrienol se vyskytuje v nejvyšším množství ( $43,64 \pm 13,37 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině), druhý nejvyšší obsah vykazoval  $\alpha$ -tokotrienol ( $19,41 \pm 7,81 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině), a dále následoval  $\alpha$ -tokoferol ( $12,09 \pm 4,85 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině).

V menším množství byl detekován  $\gamma$ -tokoferol ( $4,2 \pm 1,83 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině) a  $\delta$ -tokotrienol ( $0,66 \pm 0,20 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině). Námi zjištěné množství v hroznových semenech po vinifikaci bylo 15krát nižší než v oleji z hroznových semen, kde byl v malých nebo stopových množstvích detekován i  $\beta$ -tokotrienol a  $\delta$ -tokoferol (Fernandez et al., 2013). Crews et al. (2006) ve své studii také prokázal nejvyšší obsah  $\gamma$ -tokotrienolu, což odpovídá našemu stanovení. Nejvyšší obsah celkových tokotrienolů a tokolů, byl stanoven v bílé moštové odrůdě (tab. 1) Müller Thurgau ( $125,68 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině). Z modrých moštových odrůd byl nejvyšší obsah tokotrienolů a tokolů v odrůdě Zweigeltrebe ( $99,39 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině), pěstované v české oblasti – podoblasti Karlštejn.

BAL		2011			2012			2013		
		rozmezí	$\emptyset$	smd.	rozmezí	$\emptyset$	smd.	Rozmezí	$\emptyset$	smd.
CP	1	2810-9270	5811	1758	3181-10924	7338	1792	55700-140062	91564	17784
	2	1531-8068	3550	1739	2704-11630	6704	2796	41576-126543	84450	25156
$\alpha$ -tcph	1	3,6 - 20,5	12,35	4,6	6,8 – 18,3	10,1	2,9	5,1 – 48,9	17,7	9,4
	2	5,1 – 22,8	11,8	4,2	7,5 – 22,3	11,4	3,4	7,7 – 39,2	17,2	6,4
$\gamma$ -tcph	1	1,9 – 6,4	4,2	1,2	2,4 – 8,0	4,5	1,4	0,7 – 11,3	5,1	2,3
	2	2,1 – 11,6	4,4	2,2	2,7 – 7,6	5,3	1,6	1,7 – 12,3	5,5	2,6
$\alpha$ -tct	1	10,4– 38,4	21,7	7,8	7,9 – 25,5	15,1	4,6	1,7 – 35,6	20,3	7,3
	2	8,6 – 24,8	16,6	4,7	6,9 – 19,7	12,6	3,6	0,8 – 30,5	15,2	8,1
$\gamma$ -tct	1	18,5- 74,9	42,9	21,7	11,8- 71,3	30,9	13,9	1,1 – 91,6	41,1	17,3
	2	26,3- 62,8	44,5	9,7	17,8- 54,3	34	11,1	0,6 – 78,3	34,4	16,7
$\delta$ -tct	1	0,3 – 1,3	0,7	0,3	0,4 – 1,6	0,7	0,8	0,1 – 3,0	0,7	0,5
	2	0,4 – 0,8	0,6	0,1	0,5 – 1,0	0,7	0,2	0,1 – 0,9	0,5	0,2
E	1	44,2-125,8	81,9	21	33,3-98,7	61,3	16,1	12,6-141,4	84,9	22,1
	2	49,7-99,4	77,9	15,1	43,5-88,1	64	13,2	23,9-107,9	72,8	20,2

Tab. 1: Obsah CP, tokolů a tokotrienolů (1-bílé odrůdy; 2-modré odrůdy)

Semena révy vinné sklizená v roce 2012 obsahovala v průměru nejvíce  $\gamma$ -tct ( $31,71 \pm 1,92 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině), druhý nejvyšší obsah byl nalezen u  $\alpha$ -tct ( $14,09 \pm 1,06 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině) následovaný  $\alpha$ -tcph ( $10,58 \pm 0,30 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině),  $\gamma$ -tokoferolem ( $4,71 \pm 0,245 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině). Nejmenší průměrný obsah byl i v roce 2012 nalezen u  $\delta$ -tct ( $0,71 \pm 0,03 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině). Modré moštové odrůdy obsahovaly průměrně  $64,04 \pm 13,24 \text{ mg.kg}^{-1}$  tokolů a tokotrienolů v sušině. Bílé moštové odrůdy obsahovaly o něco méně tokolů a tokotrienolů ( $61,29 \pm 16,07 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině). Nejvyšší obsah tokolů a tokotrienolů (tab. 1) byl nalezen u bílé moštové odrůdy Muškát moravský ( $98,72 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině) z vinařské podoblasti Karlštejn.



Semena révy vinné sklizená v roce 2013 obsahovala průměrně  $80,85 \pm 1,24 \text{ mg.kg}^{-1}$  tokolů a tokotrienolů v sušině. Nejvyšší množství průměrně vykazoval  $\gamma$ -tct ( $38,80 \pm 2,06 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině), dále  $\alpha$ -tct ( $18,45 \pm 0,99 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině) a  $\alpha$ -tcph ( $17,71 \pm 1,02 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině). V menším množství byl detekován  $\gamma$ -tcph ( $5,26 \pm 0,34 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině) a v nejnižším množství  $\delta$ -tct ( $0,62 \pm 0,06 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině). Bílé moštové odrůdy obsahovaly průměrně  $84,89 \pm 22,14 \text{ mg.kg}^{-1}$  tokolů a tokotrienolů v sušině. V modrých moštových odrůdách byl průměrný obsah tokolů a tokotrienolů nižší ( $72,83 \pm 20,17 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině). Nejvyšší obsah tokolů a tokotrienolů byl nalezen ve třech bílých moštových odrůd pěstovaných v Mělnické vinařské podoblasti Karlštejn Muškát Dezertnyj ( $141,36 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině).

### 4.3 Obsah vybraných esenciálních makroelementů

V semenech hroznů révy vinné vybraných odrůd sklizených v roce 2011 (tab. 2) byly stanoveny nutričně významné makroprvky (K, Ca, Mg, Na a P). Hroznová semena obsahovala v průměru  $5796,86 \pm 1432 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině K,  $5002,97 \pm 793 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině Ca,  $1371,06 \pm 209 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině Mg,  $195,94 \pm 87 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině Na a  $117,11 \pm 654 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině P. Bílé odrůdy révy vinné obsahovaly v průměru vyšší koncentraci makroelementů K, Mg a P ( $5927,23 \pm 1900,77 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině K,  $1437,08 \pm 695,73 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině Mg,  $130,10 \pm 63,87 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině P) ve srovnání s modrými odrůdami ( $5640,41 \pm 1105,54 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině K,  $1291,82 \pm 158,62 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině Mg,  $101,53 \pm 43,11 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině P). Naopak modré odrůdy révy vinné mají v průměru vyšší obsah makroelementů Ca a Na ( $5175,06 \pm 1068 \text{ mg.kg}^{-1}$  Ca v sušině,  $206,36 \pm 66,61 \text{ mg.kg}^{-1}$  Na v sušině) ve srovnání s bílými odrůdami révy vinné ( $4859,57 \pm 906,60 \text{ mg.kg}^{-1}$  Ca v sušině,  $187,25 \pm 91,86 \text{ mg.kg}^{-1}$  Na v sušině). Semena révy vinné sklizená v roce 2012 obsahovala průměrně  $4379,75 \pm 1460 \text{ mg.kg}^{-1}$  K v sušině,  $4802,95 \pm 1377 \text{ mg.kg}^{-1}$  Ca v sušině,  $1843,34 \pm 253,70 \text{ mg.kg}^{-1}$  Mg v sušině,  $130,55 \pm 48,36 \text{ mg.kg}^{-1}$  Na v sušině a  $131,49 \pm 41,14 \text{ mg.kg}^{-1}$  P v sušině. Modré odrůdy révy vinné obsahovaly průměrně více K ( $4615,23 \pm 1391,43 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině) a P ( $140,68 \pm 44,94 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině) než bílé odrůdy révy vinné ( $4215,88 \pm 1580,46 \text{ mg.kg}^{-1}$  K v sušině;  $128,44 \pm 33,98 \text{ mg.kg}^{-1}$  P v sušině). Naopak semena bílých odrůd révy vinné měla vyšší koncentraci Ca ( $4986,47 \pm 1281,83 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině), Mg ( $2170,14 \pm 272,76 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině) a Na ( $143,68 \pm 47,05 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině).

Modré odrůdy obsahovaly nižší koncentrace Ca ( $4492,74 \pm 1107,89 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině), Mg ( $1422,34 \pm 221,35 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině) a Na ( $116,36 \pm 51,95 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině). Semena révy vinné sklizená v roce 2013 obsahovala v průměru  $3755,86 \pm 2077,98 \text{ mg.kg}^{-1}$  K v sušině,  $3722,93 \pm 2044,28 \text{ mg.kg}^{-1}$  Ca v sušině,  $1110,23 \pm 904,89 \text{ mg.kg}^{-1}$  Mg v sušině,  $129,42 \pm 78,40 \text{ mg.kg}^{-1}$  Na v sušině a  $156,67 \pm 40,91 \text{ mg.kg}^{-1}$  P v sušině. Bílé odrůdy révy vinné obsahovaly průměrně více K ( $3805,15 \pm 1887,61 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině), Ca ( $3831,25 \pm 2184,3 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině), Na ( $132,45 \pm 83,85 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině) a P ( $162,45 \pm 33,55 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině) než semena modrých odrůd révy vinné ( $3668,05 \pm 2377,13 \text{ mg.kg}^{-1}$  K v sušině;  $3529,98 \pm 1751,08 \text{ mg.kg}^{-1}$  Ca v sušině;  $124,03 \pm 67,26 \text{ mg.kg}^{-1}$  Na v sušině;  $146,10 \pm 49,78 \text{ mg.kg}^{-1}$  P v sušině). Naopak v semenech modrých odrůd révy vinné byl detekován vyšší obsah Mg ( $1207,17 \pm 1235,84 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině).

BAL		2011			2012			2013		
		rozmezí	Ø	smd.	rozmezí	Ø	smd.	Rozmezí	Ø	smd.
K	1	3641-11021	5927	1900	1737-7289	4215	1580	264-9076	3805	1887
	2	3561-7247	5640	1105	593-6854	4615	1391	565-9888	3668	2377
Ca	1	2699-6418	4859	960	2789-6644	4986	1281	167-11312	3831	2184
	2	3412-6291	5175	1068	1690-7800	4492	1107	765-6597	3529	1751
Mg	1	720 -3898	1437	695	849-2049	2170	272	17,1-2606	1055	642
	2	958-1453	1291	158	1045-1860	1422	221	136 -3653	1207	1235
Na	1	42,8 - 361	187	91,8	25,4 - 187	143	47,1	20,6 – 388	132	83,8
	2	86,5 - 322	206	66,6	26,4 - 208	116	51,2	24,6 – 264	124	67,3
P	1	57,1 - 255	130	63	86,9 - 193	128	33,9	57,3 – 233	162	33,5
	2	64,5 - 231	101	43	78,5 - 234	140	44,9	34,4 – 238	146	49,8

Tab. 2: Obsah esenciálních makroelementů (1-bílé odrůdy; 2-modré odrůdy)

BA L		2011			2012			2013		
		rozmezí	prům	smd.	rozmezí	prům	smd.	rozmezí	prům	smd.
Zn	1	6,9 – 21,2	11,2	3,4	8,5 - 21,2	13,4	2,6	2,1 – 22,5	12,7	5,5
	2	9,2 – 24,6	11,6	3,6	10,4 – 19,7	13,4	2,6	4,0 – 30,9	14,5	5,4
Cu	1	2,3 – 12,7	7,3	2,4	7,3 – 17,4	10,4	2,2	3,1 – 15,9	9,9	2,5
	2	5,8 – 10,2	8	1,2	7,8 – 17,4	10,9	2,2	3,9 – 23,5	10,8	3,3
Fe	1	24,5 – 178	46,3	35,8	14,9 – 79,6	34	19	1,4 – 192	27,6	9,3
	2	21,1– 88,3	54,2	20,9	18,3 – 147	43,5	36,2	7,4 – 45,5	23,7	9,4
Mn	1	7,0 – 34,6	16,6	7,1	5,5 – 28,4	15,9	5,5	0,9 – 33,8	10,9	5,9
	2	11,5 – 19,0	15,2	2,4	4,2 – 29,2	13,9	6,2	3,8 – 29,9	13,2	5,9

Tab. 3: Obsah esenciálních mikroelementů (1-bílé odrůdy; 2-modré odrůdy)

#### **4.4 Obsah vybraných esenciálních mikroelementů (Zn, Cu, Fe, Mn)**

V semenech révy vinné byly stanoveny nutričně významné mikroprvky (Zn, Cu, Fe a Mn) uvedené v tab. 3. Semena révy vinné sklizená v roce 2011 obsahovala v průměru  $11,37 \pm 5,70 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Zn v sušině,  $7,61 \pm 1,46 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Cu v sušině,  $49,87 \pm 17,56 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Fe v sušině a  $15,94 \pm 5,71 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Mn v sušině. V semenech sklizených v roce 2012 byl průměrný obsah esenciálních mikroelementů na podobných hladinách jako v roce 2011. Průměrný obsah mikroelementů byl  $11,37 \pm 0,57 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Zn v sušině,  $7,62 \pm 0,23 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Cu v sušině,  $49,88 \pm 5,78 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Fe v sušině a  $15,95 \pm 0,11 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Mn v sušině. Semena révy vinné sklizená v roce 2013 obsahovala průměrně  $13,42 \pm 0,05 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Zn v sušině,  $10,28 \pm 0,14 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Cu v sušině,  $26,09 \pm 7,21 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Fe v sušině a  $11,72 \pm 0,48 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Mn v sušině.

#### **4.5 Obsah biologicky aktivních látek v semenech révy vinné je odrůdově závislý**

Analýza rozptylu ( $p < 0,05$ ) v celém souboru dat prokázala, že odrůda statisticky významně ovlivňuje obsah  $\gamma$  – tct a  $\delta$  – tct a dále prokázala, že barva odrůdy má statisticky významný vliv na obsah  $\alpha$ -tct. Analýza rozptylu ve vybraném souboru dat potvrdila statisticky významný vliv ( $p < 0,05$ ) odrůdy na obsah  $\gamma$  – tct. Dále analýza prokázala, že barva odrůdy má statisticky významný vliv na obsah  $\alpha$  – tct. Odrůda má statisticky významný vliv na obsah vápníku.

#### **4.6 Obsah biologicky aktivních látek je ovlivněn lokalitou způsobem pěstování**

Analýza rozptylu ( $p < 0,05$ ) v celém souboru dat prokázala, že lokalita pěstování má statisticky významný vliv na obsah fosforu, celkových polyfenolických látek a  $\alpha$  – tct. Statistická analýza rozptylu ve vybraném souboru dat, neprokázala statisticky významný vliv lokality pěstování na biologicky aktivní látky.

#### 4.7 Obsah biologicky aktivních látek je ovlivněn ročníkem sklizně

Analýza rozptylu ( $p < 0,05$ ) v celém souboru dat prokázala, že ročník sklizně má statisticky významný vliv na obsah celkových polyfenolických látek, dále na obsah fosforu, železa, mědi a  $\alpha$ -tchp. Analýza rozptylu ve vybraném souboru dat potvrdila statisticky významný vliv ročníku sklizně na obsah celkových polyfenolických látek a dále analýza rozptylu prokázala statisticky významný vliv ( $p < 0,05$ ) ročníku na obsah železa a mědi.

### 5 Závěr

Cílem disertační práce bylo stanovení biologicky aktivních látek v semenech révy vinné. Vzorky semen révy vinné byly analyzovány jednotnou metodologií, opírající se o HPLC, AAS a UV/VIS molekulovou spektroskopií. Na základě souboru 164 vzorků révy vinné dodávaných VSV Karlštejn (63 odrůd, z toho 41 bílých odrůd a 22 modrých odrůd) z toho 133 vzorků bylo sklizeno v české vinařské oblasti a 31 vzorků bylo sklizeno v moravské vinařské oblasti, z toho v roce 2011 bylo analyzováno 33 vzorků, v roce 2012 bylo analyzováno 42 vzorků a v roce 2013 bylo analyzováno 89 vzorků semene révy vinné, byl vytvořen rozsáhlý soubor 164 datových vektorů o 21 položkách (16 datových údajů a 5 faktografických údajů). Tento soubor byl zpracován několika způsoby. Nejprve byla data hodnocena z hlediska obsahu biologicky aktivních látek, následně byla vytvořena analýza korelačních matic a analýza rozptylu ANOVA.

Nejbohatší zdrojem celkových polyfenolických látek, oproti očekávání, byla semena bílých odrůd révy vinné. Modré odrůdy mají vyšší obsah celkových polyfenolických látek ve slupce a dužnině než bílé odrůdy révy vinné. Semena révy vinné sklizená roce 2013 obsahovala 10 krát vyšší koncentraci celkových polyfenolických látek pravděpodobně neprošla vinifikací. Vyšší obsah těchto látek byl nalezen v české vinařské oblasti, kde byly z hlediska počasí méně příznivé podmínky. Lze konstatovat, že rostlina zvýšila produkci celkových polyfenolických látek jako antioxidantů chránící ji před nepříznivými vnějšími vlivy. Vzhledem k nižším teplotám a vyššímu úhrnu srážek v české vinařské oblasti, celkové polyfenolické látky zvýšily ochranu proti houbovým chorobám a stresovým faktorům. Obsah celkových polyfenolických látek byl statisticky významně ovlivněn také oblastí pěstování révy vinné.

Nejvíce zastoupený tokol byl  $\gamma$ -tokotrienol. Obsah tokotrienolů byl nejvyšší v semenech révy vinné sklizených v roce 2011, což může být ovlivněno počasím, které bylo v roce 2011 bohaté na sluneční svit a s vyšší teplotou než v ostatních ročnících. Obsah tokoferolů byl nejvyšší v semenech révy vinné sklizených v roce 2013, který byl z hlediska počasí nejhorším ročníkem, především díky povodním. Roční sklizně měl statisticky významný vliv na obsah  $\alpha$ -tokoferolu. Z tokotrienolů byl nalezen statisticky významný vliv odrůdy na obsah  $\alpha$ -tokotrienol. Z esenciálních makroprvků byl nejvyšší obsah detekován u K, Ca, Mg, Na a P v tomto pořadí. Obsah fosforu byl vyšší v české oblasti pěstování, kde lze uvažovat vliv různého způsobu hnojení v české a moravské oblasti. Z esenciálních mikroprvků byl nejvyšší obsah nalezen u Fe, dále Mn, Zn a nejnižší obsah byl nalezen v obsahu Cu.

Semena révy vinné jako velmi cenný zdroj biologicky aktivních látek, vykazují pozitivní vliv nejen na lidské zdraví, ale i jako nutričně hodnotý doplněk krmné dávky hospodářských zvířat.

## 6 Seznam použité literatury

Anastasiadi, M., Pratsinis, H., Kletsas, D., Skaltsounis, A.-L., Haroutounian, S.A. 2010. Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. *Food Research International*. 43. 805-813.

Burg, P. 2014. Studium biologicky aktivních látek v semenech a letorostech révy vinné a možnosti získávání oleje ze semen. *Folia*. 7 (7). 1 – 93.

Choi, Y., Lee, J. 2009. Antioxidant and antiproliferative properties of  $\alpha$ -tocotrienol-rich fraction. *Food Chemistry*. 114. 1386-1390.

FAOSTAT, 2010. <http://faostat.fao.org>

Guo, L.; Wang, L.H.; Sun, B. 2007. Direct in vivo evidence of protective effects of grape seed procyanidin fractions and other antioxidants against ethanol-induced oxidative DNA damage in mouse brain cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55 (14). 5881 – 5891.

Kim, H., Kim, S.G., Choi, Y., Jeong, H.S., Lee, J. 2008. Changes in tocopherols, tocotrienols, and fatty acid contents. *Journal of American Oil Chemistry Society*. 85, 487-489.

Lutterodt, H., Salvin, M., Whent, M., Turner, E., Yu, L. 2011. Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours. *Food Chemistry*. 128 (2). 391 – 399.

Rayne, S, Karacabey, E., Mazza, G. 2008. Grape cane waste as a source of trans-resveratrol and trans-viniferin: High-value phytochemicals with medicinal and anti-phytopathogenic applications. *Industrial Crops and Products*, 27(3). 335 – 340.

## 7 Seznam publikací

### 7.1 Seznam vědeckých publikací vztahujících se k problematice disertační práce

Lachman, J., Hejtmánková, A., Hejtmánková, K., **Horníčková, Š.**, Skala, O., Dědina, M., Příbyl, J. 2013. Towards complex utilisation of winemaking residues: Characterisation of grape seeds by total phenols, tocopherols and essential elements content as a by-product of winemaking. *Industrial crops and products*. 49. 445 – 453.

**Horníčková, Š.**, Michlová, T., Hejtmánková, A., Kotek, M. 2013. Determination of Polyphenolic Compounds and Copper in Grape Seeds (*Vitis vinifera*) cultivated in Czech Republic. Proceedings of the sixth international scientific conference Rural Development 2013. Aleksandras Stulginskis University Akademija. Kaunas district. Lithuania. Akademija. 98 – 100. ISSN 2345-0916

Skala, O., Táborský, J., Pivec, V., **Horníčková, Š.**, Hejtmánková, A. 2014. Potential of grapevine cultivars grown in the Czech Republic for grapeseed oil production. In Proceedings of the 1st International Symposium on Fruit Culture and Its Traditional Knowledge along Silk Road Countries, *Acta Horticulturae* No. 1032 (2014) 04.11.2013. Yerevan. Armenia. Leuven. Belgium: International Society for Horticultural Science. Leuven. Belgium. 2014. 63 – 68.

### 7.2 Seznam ostatních vědeckých publikací

**Horníčková, Š.**, Dragounová, H., Hejtmánková, K., Michlová, T., Hejtmánková, A. 2014. Production of benzoic acid in fermented goat's and sheep's milk. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 4. 247-253. ISSN: 1211 – 3174.

Hönig, V., Smrčka, L., **Horníčková, Š.** The Application of Discriminant Analysis in Monitoring the Wear Particles in the Engine Oil. 2014. *Manufacturing Technology*.14(3). 322-326. ISSN: 1213 – 2489.

Hönig, V., **Horníčková, Š.**, Hromádka, J. 2014. Analysis of the Distillation Curves of Mixtures of BioButanol with Gasoline. In *Advanced Materials Research* 30.07.2014. Čína. Kunming. 25 – 28.

Hönig, V., **Horníčková, Š.**, Orsák, M. 2014. Monitoring of Wear Particles During Running-in Diesel Engines of Tractors. In 2nd International Conference on Materials. Transportation and Environmental Engineering. CMTEE 2014 30.07.2014. Čína. Kunming. Trans Tech Publications Ltd. 1206 – 1209.

Hönig, V., Orsák, M., **Horníčková, Š.** Analysis of the Effects of BioButanol and BioEthanol on the Vapour Pressure Gasoline. In 2nd International Conference on Materials. Transportation and Environmental Engineering. CMTEE 2014 30.07. Čína. Kunming. Trans Tech Publications Ltd. 1411 – 1414.

Michlová, T., **Horníčková, Š.**, Dragounová, H., Hejtmánková, A. 2014. Quantitation of vitamin A and vitamin E in raw sheep's milk during lactation period. *Agronomy Research*. 12(3) 737 – 744.

Michlová, T., Dragounová, H., **Horníčková, Š.**, Hejtmánková, A. 2015. Factors influencing the content of vitamins A and E in sheep and goat milk. *Czech Journal of Food Science*. 33. 58 – 65.

Čedík, J., Pexa, M., Mařík, J., Hönig, V., **Horníčková, Š.**, Kubín K. 2015. Influence of butanol and fame blends on operational characteristics of compression ignition engine. *Agronomy Research*. 13(2). 541 – 549.

Pexa, M., Čedík, J., Mařík, J., Hönig, V., **Horníčková, Š.**, Kubín, K. 2015. Comparison of the operating characteristics of the internal combustion engine using rapeseed oil methyl ester and hydrogenated oil. *Agronomy Research*. 13(2). 613 – 620.

Müller, M., **Horníčková, Š.**, Hrabě, P., Mařík, J. 16/2014. Analysis of physical, mechanical and chemical properties of seeds and kernels of *Jatropha curcas*. *Research of Agricultural Engineering*. IN PRESS.

### 7.3 Skripta

Hönig, V., **Horníčková, Š.** 2014. Podtyp: Skripta. Cvičení z chemie. ČZU v Praze. 84 s. ISBN: 978-80-213-2510-4.

## 8 Summary

Seeds of 41 white and 22 vine varieties cultivated on six vine-growing areas were assessed as a by-product after winemaking on the contents of total polyphenols (TP) and phosphorus (P) spectrophotometrically, total tocopherols (TC) by HPLC–FLD, and metals (Ca, Mg, Na, K, Fe, Zn, Cu, Mn) by FAAS. Remaining TP and TC levels were mainly affected by the variety, while levels of microelements (Cu, Mn, Zn) and P or K by the vine-growing area. The highest TC and TP levels were found in the seeds of white varieties. Varieties of grape seeds have significant impact on the  $\gamma$  - tocotrienol content. The Colour of grape varieties have significant impact on the  $\alpha$  – tocotrienol content. Conversely, grape seeds cultivated on the Czech growing area contained higher levels of macroelements except P, however no significant differences between growing areas have been found. The crop year has significant influence on TP, Fe and Cu content. Results herein revealed the considerable potential of grape seeds, a by-product of the vinification process, as a valuable inexpensive source of high added value of nutritionally beneficial compounds – polyphenol and tocol antioxidants and macro- and microelements for use as feed additives in animal nutrition.

**Keywords:** grape seeds as a by-product; total polyphenolic content; tocopherols; macro- and microelements; vine varieties; vine-growing area