

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra Chemie



Fenolické kyseliny v pšenicích s netradiční barvou zrna

Diplomová práce

Autorka práce: Bc. Barbora Burešová

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Zora Kotíková, PhD.

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Fenolické kyseliny v pšenících s netradiční barvou zrna" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13.4.2018 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Zoře Kotíkové, PhD., za odborné vedení a cenné rady a Ing. Luboši Paznochtovi, za nepostradatelnou pomoc a čas, který mi při psaní diplomové práce věnoval.

Fenolické kyseliny v pšenicích s netradiční barvou zrna

Souhrn

Pšenice je významnou obilovinou a jednou z hlavních komponent lidské výživy. V teoretické části diplomové práce je uvedena stavba a chemické složení pšeničného zrna. Barevné odrůdy pšenic se vyznačují vyšším obsahem biologicky aktivních látek, jako jsou fenolické kyseliny, rostlinná barviva a další nutričně významné látky. Tyto látky jsou charakteristické svými antioxidačními vlastnostmi, proto se část práce zabývá problematikou antioxidačních látek, volných radikálů a jejich působením v organismu. V další části literárního přehledu je uvedena klasifikace fenolických sloučenin, zvláštní pozornost je věnována především fenolickým kyselinám (FK), jejich významu pro rostliny, biosyntéze, biologické dostupnosti a zdravotní prospěšnosti pro člověka, jakožto konzumenta.

Pro analýzu byla použita zrna osmi vybraných odrůd pšenice (*T.aestivum* L.). Byly sledovány rozdíly mezi čtyřmi různými typy zbarvení zrn. V jednotlivých odrůdách byl sledován celkový obsah FK, dále zastoupení volných, konjugovaných a vázaných forem a profily odrůd z hlediska zastoupení FK. Obsah fenolických kyselin byl stanoven pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detektorem diodového pole (HPLC/DAD).

Největší podíl z celkového obsahu FK představují vázané formy (91,1 %), které jsou pevně spojeny s různými komponentami buněčných stěn. V menším množství se zde nachází formy konjugované (8,5 %) a volné (0,4 %). Ze všech FK obsažených v pšeničném zrnu je nejhojněji zastoupena ferulová kyselina, která byla převládající kyselinou ve formách vázaných (83,4 %) a volných (46,7 %). V konjugovaných formách měla majoritní zastoupení sinapová kyselina (47,7 %).

Průměrný celkový obsah FK v modrých pšenicích činil $763 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš., zatímco množství FK v purpurových ($715 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.) a žlutých ($714 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.) pšenicích bylo srovnatelné se standardními červenými pšenicemi ($702 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.). Z naměřených výsledků vyplývá, že největší tendenci syntetizovat a ukládat FK mají pšenice s modrým aleuronem, tato skutečnost však nebyla statisticky průkazná. V ozimých pšenicích bylo ve srovnání s jarními formami naměřeno větší celkové množství FK (732 oproti $697 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.), přesto ani tento rozdíl nebyl statisticky významný.

Klíčová slova: pšenice jarní, pšenice ozimá, purpurový perikarp, modrý aleuron, žlutý endosperm, standardní barva zrna, volné fenolické kyseliny, vázané fenolické kyseliny, HPLC-DAD

Phenolic acids in coloured wheat grain

Summary

Wheat is considered to be one of the most important crops in human nutrition. Theoretical part of this work deals with the structure and chemical composition of wheat kernel. Non traditional pigmented types of wheat are studied due to their contents of biologically active compounds such as phenolic acids and natural pigments. Phenolic acids (PA) come under very rife group of phenolic compounds that are well known for their antioxidant properties, that is why antioxidants, free radicals and their mechanisms of actuation in organism are discussed in this work. Further attention is aimed at the classification of PA their importance for plants, biosynthesis, bioavailability and health benefits for humans as consumers.

The total content and profile of PA in four different coloured wheat varieties was analysed using high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC/DAD). Bound, conjugated and free PA were identified in wheat grains. The major fraction (91.1%) was represented by the insoluble PA that are bound to the structural parts of plant cell walls. Amounts of soluble conjugated (8.5%) and free (0.4%) PA were significantly lower. The most abundant PA of bound (83.4%) and free forms (46.7%) was ferulic acid. Conjugated form was predominantly represented by sinapic acid (47.7%).

The average total content of PA in wheat varieties with blue aleurone was 763 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry matter (DM) whereas the amount of PA in purple (715 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DM) and yellow (714 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DM) wheat was comparable to standard red wheat (702 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DM). The measured results show that the greatest tendency to synthesize and store PA have pigmented blue wheat varieties, but this fact was not statistically conclusive.

Winter wheat had higher total content of PA compared to spring form (732 vs. 697 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DM), although this difference was not statistically significant.

Keywords: spring wheat, winter wheat, purple pericarp, blue aleurone, yellow endosperm, conventional grain colour, free phenolic acids, bound phenolic acids, HPLC/DAD

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíl práce	2
3 Literární rešerše.....	3
3.1 Význam obilovin.....	3
3.1.1 Pšenice setá (<i>Triticum aestivum</i> L.)	3
3.1.2 Stavba obilného zrna	3
3.1.3 Chemické složení pšeničného zrna	5
3.1.3.1 Sacharidy	5
3.1.3.2 Proteiny.....	6
3.1.3.3 Lipidy	8
3.1.3.4 Vitaminy	8
3.1.3.5 Minerální látky.....	9
3.1.3.6 Biologicky aktivní látky pšenice	9
3.2 Barevné odrůdy pšenice	10
3.2.1 Červené a bílé zbarvení	10
3.2.2 Žluté zbarvení	11
3.2.3 Modré zbarvení	11
3.2.4 Purpurové zbarvení	12
3.3 Antioxidační aktivita.....	14
3.3.1 Oxidační stres	15
3.3.2 Volné radikály.....	16
3.4 Fenolické sloučeniny.....	17
3.4.1 Rozdělení fenolických sloučenin	18
3.4.2 Flavonoidy	19
3.4.3 Fenolické kyseliny	20
3.4.3.1 Rozdělení fenolických kyselin.....	21
3.4.3.2 Význam pro rostliny	22
3.4.3.3 Současné poznání v obilovinách	23
3.4.3.4 Ferulová kyselina	23
3.4.3.5 Biosyntéza	25
3.4.3.6 Biologická dostupnost a degradace	28
3.4.3.7 Zdravotní prospěšnost	29
4 Materiál a metody	31
4.1 Analyzované vzorky	31
4.1.1 Charakteristika stanoviště.....	31

4.2	Použité chemikálie.....	32
4.3	Přístroje a vybavení.....	32
4.4	Příprava vzorků k analýze.....	33
4.4.1	Příprava vzorku pro stanovení volných fenolických kyselin.....	33
4.4.2	Příprava vzorku pro stanovení konjugovaných fenolických kyselin	33
4.4.3	Příprava vzorku pro stanovení vázaných fenolických kyselin	34
4.5	Chromatografická separace fenolických kyselin metodou HPLC/DAD ...	34
4.5.1	Stanovení <i>trans</i> -forem fenolických kyselin.....	35
4.5.2	Stanovení <i>cis</i> -forem fenolických kyselin	35
4.6	Statistické zhodnocení naměřených dat	35
5	Výsledky	36
5.1	Profily fenolických kyselin	38
5.2	Volné	38
5.3	Konjugované.....	38
5.4	Vázané	39
5.5	Vliv barvy zrna na obsah fenolických kyselin	41
5.6	Vliv pěstební formy na obsah fenolických kyselin	41
6	Diskuse	43
7	Závěr	46
8	Seznam literatury	47
9	Seznam zkratk.....	56
10	Přílohy	57
11	Seznam příloh	60

1 Úvod

Obiloviny provázejí člověka prakticky po celou dobu jeho historického vývoje na planetě Zemi a jsou řazeny mezi nejstarší kulturní plodiny pěstované lidskou společností. Patříčně zpracované obiloviny jsou považovány za jeden z nejvýznamnějších zdrojů energie ve formě sacharidů, zejména kvůli jejich vysoké spotřebě (67 kg/os./rok). S celosvětovou roční produkcí 754,8 milionů tun, odhadovanou pro rok 2017 (FAO, 2017), patří pšenice mezi nejdůležitější a nejvíce kultivované plodiny na světě. Kromě využití pro lidskou výživu je také významným krmivem hospodářských zvířat.

Běžné pšenice mají nejčastěji červenou, nebo bílou barvu zrna. Vyjma těchto tradičních odrůd existují i pšenice žluté, modré a purpurové, které se odlišují typem a místem uložení rostlinných pigmentů. Žlutá barva obilky je způsobena karotenoidy, zabarvení modrých a purpurových pšenic je tvořeno anthokyany. Barevné pšenice jsou pro člověka, mimo základních živin, také potenciálně významným zdrojem široké škály biologicky aktivních látek (fenolických kyselin, anthokyanů, karotenoidů a mnoha dalších skupin nutrientů). Tyto sloučeniny se vyznačují zejména vysokou antioxidační aktivitou, proto se dostávají do popředí zájmu vědců, šlechtitelů i výrobců potravin.

Antioxidačním látkám jsou přičítány účinky jako zpomalení procesu stárnutí organismu, snižování rizika vzniku nádorových onemocnění a zánětů, celkové posílení imunitního systému a mnoho dalších účinků. Jelikož jsou schopny snižovat úroveň vzniku volných radikálů nebo je převádět na méně reaktivní či nereaktivní formy, chrání lidský organismus před oxidačním poškozením. Vlivem stresu, kouření a nedostatku pohybu, v kombinaci s nedostatečnou konzumací ovoce a zeleniny nestačí kapacita antioxidantů v lidském těle na regulaci volných radikálů, proto je třeba přijímat antioxidanty také z jiných potravních zdrojů.

Vysoká prevalence civilizačních chorob v populacích vyspělých států společně s moderními výživovými doporučeními vede k rostoucí poptávce po nutričně hodnotných potravinách, včetně celozrnných pečárenských výrobků ze starobylých neprošlechtěných odrůd (jednozrnka, dvouzrnka, aj.), ale i moderních "tradičních" i "netradičních", čímž se otvírá prostor pro uplatnění barevných odrůd pšenic.

2 Cíl práce

Hypotézy:

1. Většina fenolických kyselin se v zrnech vyskytuje v nerozpustné vázané formě
2. Obsahy a složení fenolických kyselin v pšenicích jsou závislé na odrůdě
3. Barevné odrůdy pšenice obsahují více fenolických kyselin ve srovnání s odrůdami konvenčními
4. Ozimé pšenice obsahují více fenolických kyselin ve srovnání s pšenicemi jarními

Cíle:

1. Optimalizovat metodu extrakce volných a vázaných forem fenolických kyselin obsažených v zrnech pšenice
2. Stanovit obsah a zastoupení různých forem fenolických kyselin ve vybraných odrůdách pšenice
3. Porovnat obsahy fenolických kyselin v pšenicích s netradiční barvou zrna s pšenicemi konvenčními
4. Porovnat obsahy fenolických kyselin v pšenicích jarních s pšenicemi ozimými

3 Literární rešerše

3.1 Význam obilovin

Z botanického hlediska jsou obiloviny řazeny mezi jednoděložné cévnaté rostliny. Většina známých obilovin patří do čeledi *Poaceae* (lipnicovité), výjimkou jsou například pohanka z čeledi *Polygonaceae* (rdesnovité) nebo amarant z čeledi *Amaranthaceae* (laskavcovité), které jsou řazeny mezi pseudocereálie (Příhoda et al., 2004). Ze všech rostlinných zdrojů využívaných pro lidskou výživu, jsou obiloviny zastoupeny nejvíce. Konkrétně pšenice, kukuřice a rýže tvoří zhruba 75 % světové produkce obilovin. Obiloviny jsou kromě energie, ve formě škrobu a proteinů, zdrojem vitaminů a minerálních látek. Pro lidskou výživu se z obilovin využívá plod, kterému se říká zrna nebo také obilka (Koehler et Wieser, 2013).

3.1.1 Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.)

Pšenice patří mezi jednu z nejstarších kulturních plodin. Začátky pěstování pšenice sahají daleko do historie a jsou spojeny se vznikem zemědělství (Kent, 1994). Archeologické nálezy, týkající se pěstování původních odrůd pšenice - jednozrnky a dvouzrnky, pochází z doby kolem 8 000 let př. n.l. (Tichá et Vyzínová, 2006). Nejrozšířenějším druhem ve světě i u nás je pšenice setá (*Triticum aestivum* L.), která se začala pěstovat asi v 6. století př. n.l. (Gajdošová et Šturdík, 2004). V současnosti je známo několik tisíc různých druhů a kulturních odrůd rodu *Triticum* (Kent, 1994). Podle počtu sad chromozomů rozlišujeme 3 podskupiny – diploidní, tetraploidní a hexaploidní. Mezi diploidní pšenice patří planá i kulturní forma pšenice jednozrnky (*T. boeoticum* L., *T. monoccocum* L.). Do skupiny tetraploidních pšenic náleží pšenice tvrdé (*T. durum* Desf.). Zásadní je skupina hexaploidních pšenic, kam je řazena pšenice setá (*T. aestivum* L.) a také pšenice špalda (*T. spelta* L.) (Zimolka et al., 2005). Z botanického hlediska se druh *T. aestivum* dělí na čtyři variety podle osinatosti klasu (osinatý a bezosinný) a podle barvy (červená a bílá). Podle doby výsevu rozlišujeme pšenice jarní a ozimé (Tichá et Vyzínová, 2006).

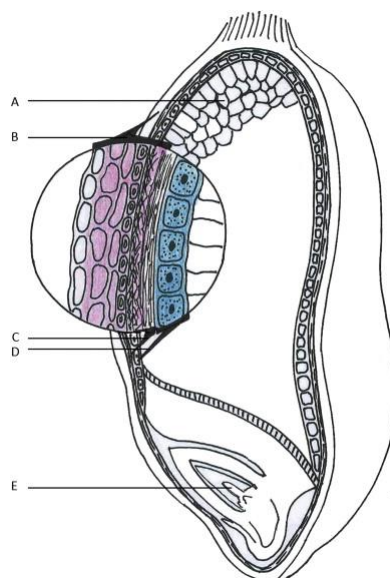
3.1.2 Stavba obilného zrna

Morfologická stavba zrna různých druhů obilovin je téměř jednotná. Obilky se liší hlavně velikostí, tvarem a podílem dílčích vrstev, zastoupení a pořadí daných vrstev je ale stejné. Každé zrna sestává z obalových vrstev, endospermu a klíčku, hmotnostní poměr

těchto složek je u jednotlivých obilovin různý, v závislosti na vnitřních, ale hlavně vnějších faktorech, jako jsou klimatické podmínky, kvalita půdy, způsob hnojení a podobně.

Hmotnost obilky je z 8-14 % tvořena obalovými vrstvami, které zrno chrání před mechanickým poškozením, krátkodobým působením škodlivých látek a mikroorganismů a pomáhají udržovat rovnováhu vlhkosti zrna. Obalové vrstvy sestávají z oplodí (perikarpu) a osemení (testy). Jsou nepropustné pro většinu organických sloučenin, propustné jsou pro vodu a za určitých podmínek také pro kyslík. Obalové vrstvy zrna jsou tvořeny hlavně z celulosy, pentosanů a minerálních látek. Některé obsahují ve svých buňkách barviva, čímž určují barevný vzhled obilky. Mezi obalovými vrstvami a endospermem se nachází jednoduchá měkčí aleuronová vrstva (Obrázek 1), obsahující asi 30 % bílkovin, tuky, vitaminy a minerální látky (Příhoda et al., 2004).

Až 85 % hmotnosti obilky tvoří endosperm, který obsahuje více než 70 % škrobu a až 15 % bílkovin, ze kterých, v případě pšenice a dalších druhů obilovin, vzniká při výrobě těsta lepek (Belderok et al., 2000). Obsah bílkovin je zde nižší než v klíčcích a obalových vrstvách, dále je zde malý podíl lipidů a minerálních látek (Eliasson et al., 1993). Endosperm zajišťuje přísun živin pro vývoj klíčku (Belderok et al., 2000) a při zpracování obilných zrn představuje převážnou část finálního produktu, např. mouky. Klíček reprezentuje nejmenší část obilky, u obilky pšenice tvoří pouze 3 % hmotnosti. Kromě jednoduchých cukrů obsahuje bílkoviny, vitaminy rozpustné ve vodě (zejména vitamin B1) a vitamin E. Dále je zde zastoupen vysoký obsah tuků, což je příčinou rychlé oxidace a nežádoucích enzymatických změn, které zhoršují sensorické vlastnosti výrobků z obilovin, proto je při mlýnském zpracování klíček ze zrna odstraňován (Příhoda et al., 2004).



Obrázek 1. Podélný řez pšeničným zrnem. A – endosperm, B – perikarp (oploď), C – testa (osemení), D – aleuronová vrstva, E – klíček (Trojan et al., 2014b).

3.1.3 Chemické složení pšeničného zrna

Celkové složení různých druhů obilovin je charakteristické vysokým obsahem sacharidů a nízkým obsahem bílkovin. Obiloviny obsahují 12-14 % vody, 65-75 % sacharidů, 7-12 % bílkovin a 2-6 % lipidů. Různé kultivary jednotlivých druhů obilovin vykazují variabilitu složení (Eliasson et al., 1993). Tyto rozdíly významně ovlivňují kvalitu výrobků z obilných zrn (Koehler et Wieser, 2013).

3.1.3.1 Sacharidy

Autoři Goesaert et al. (2005) a Zeeman et al. (2010) uvádějí, že zrna obilovin obsahují 66-76 % sacharidů, což z nich dělá nejhojněji zastoupenou složku. Největší podíl sacharidů tvoří škrob, u pšenice činí průměrně 59,6 %. Nejméně škrobu obsahují zrna ovsa (55,7 %), nejvíce rýže (74,1 %) (Belitz et al., 2009). Dále jsou zastoupeny arabinoxylany (1,5-8 %), β -glukany (0,5-7 %), jednoduché cukry (~3 %), celuloza (~2,5 %) a glukofruktany (~1 %). Škrob, hlavní zásobní polysacharid obilovin, je důležitou součástí lidské stravy, jeho specifické vlastnosti jsou zásadní pro strukturu mnoha potravin (Koehler et Wieser, 2013; Goesaert et al., 2005; Zeeman et al., 2010). Škrob se vyskytuje pouze v endospermu, kde je přítomen v granulované formě. Obilné škroby obvykle obsahují 25-28 % amylosy a 72-75 % amylopektinu (Koehler et Wieser, 2013). Při zahřevu na určitou teplotu, škrobová zrna ve vodě bobtnají a v důsledku rozpadu vodíkových můstků mezi molekulami amylopektinu

a amylosy vytváří škrobový maz. Snížením teploty dochází k opětovnému formování vodíkových můstků, což způsobuje přechod škrobového gelu v krystalickou strukturu. Tento děj, nazývaný jako retrogradace zásadně ovlivňuje texturu pekárenských produktů (Primo-Martin et al., 2007).

Neškrobové polysacharidy neboli vláknina se nacházejí především v buněčných stěnách vnějších částí obalových vrstev obilných zrn (Blackwood et al., 2000). Obsah vlákniny se zde pohybuje v rozmezí 2-13 %. V zrnech pšenice je vláknina zastoupena z 13,3 %, podobně je tomu také u ječmene (13,2 %). Nejmenší obsah vlákniny je v zrnech rýžových, kde zastupuje průměrně pouze 2,2 % (Belitz et al., 2009). Nejvýznamnější součástí neškrobových polysacharidů jsou hemicelulosa, pšeničné hemicelulosa jsou tvořeny převážně arabinoxylany. Dále jsou zastoupeny glukofruktany, celuloza a lignin. V souvislosti s lidskou výživou je vláknině přisuzován pozitivní vliv na lidské zdraví, je spojována se snížením rizika chronických onemocnění, jako jsou kardiovaskulární onemocnění, diabetes mellitus druhého typu a nádory gastrointestinálního traktu (Blackwood et al., 2000).

3.1.3.2 Proteiny

Průměrný obsah bílkovin obilných zrn se pohybuje v relativně úzkém rozmezí 7-11 %, existují však rozdíly mezi jednotlivými druhy i kultivary. Zrna pšenice mohou obsahovat méně než 6 %, ale i více než 20 % bílkovin, v závislosti na genotypu a pěstitelských podmínkách. Obsah bílkovin pšeničných obilek se nejčastěji pohybuje mezi 10-18 % celkového obsahu sušiny (Belderok et al., 2000). Proteiny jsou zastoupeny ve všech částech obilky, jejich koncentrace v každé z těchto částí se však liší. Klíček a aleuronová vrstva mohou obsahovat více než 30 % bílkovin, endosperm zhruba 13 % a obalové vrstvy kolem 7 % (Belitz et al., 2009). S ohledem na velikost jednotlivých oddílů je většina bílkovin uložena v endospermu, který je zdrojem bílých mouk, získaných při mletí a prosívání obilných zrn.

Zastoupení aminokyselin v bílých moukách vyrobených z různých obilovin je odlišné, avšak pro všechny je typický vysoký obsah kyseliny glutamové, převážně ve formě glutaminu (15-31 %). V obilkách pšenice, žita a ječmene je hojně přítomen také prolin (12-14 %). Mezi další významné aminokyseliny obilných zrn patří leucin (7-14 %) a alanin (4-11 %). Proteiny obsažené v obilovinách však nedosahují nutriční hodnoty živočišných bílkovin, především kvůli nízkému obsahu některých esenciálních aminokyselin, zejména lysinu (1,4-3,3 %), tryptofanu (0,2-1 %), methioninu (1,3-2,9 %) a histidinu (1,8-2,2 %). Z tohoto důvodu jsou

vyvíjeny snahy o zvýšení obsahu těchto aminokyselin úpravou pěstitelských podmínek, pomocí klasického šlechtění a genetického inženýrství (Koehler et Wieser, 2013).

Pšeničné proteiny jsou klasifikovány, dle studie T. D. Osborna z roku 1907, na základě jejich rozpustnosti v různých rozpouštědlech na albuminy (rozpuštěné ve vodě), globuliny (rozpuštěné v solných roztocích), prolaminy (rozpuštěné v 70% etanolu) a gluteliny (částečně rozpustné ve zředěných roztocích kyselin nebo zásad) (Příhoda et al., 2004; Belderok et al., 2000).

Albuminy jsou velikostně nejmenší pšeničné bílkoviny, následují globuliny, naopak prolaminy a gluteliny jsou složité bílkoviny o velké molekulové hmotnosti. Většina fyziologicky aktivních proteinů pšeničných zrn patří do skupiny albuminů nebo globulinů, které jsou soustředěny převážně v obalových vrstvách, aleuronu a klíčku. Nižší koncentrace se nacházejí ve škrobovitém endospermu (Belderok et al., 2000). Albuminové a globulinové bílkoviny mají specifické funkce, jako je enzymová aktivita, dále slouží i jako inhibitory některých enzymů a jsou zásadní pro strukturální elongaci bílkovin (Kucek et al., 2015). Albuminové a globulinové frakce pokrývají přibližně 25 % z celkového obsahu bílkovin pšeničného zrna. Zbylých 75 % tvoří prolaminové a glutelinové frakce nacházející se zejména v endospermu, jsou to zásobní proteiny, které rostlina využívá při klíčení. Nemají žádnou enzymatickou aktivitu, ale mají zásadní funkci při pekárenském zpracování pšeničných mouk, v pšeničném zrnu jsou zastoupeny přibližně v poměru 2 : 3 (Belderok et al., 2000).

Prolaminové bílkoviny pšeničných zrn, nazývané gliadiny, jsou bohaté, co do obsahu aminokyselin prolinu a glutaminu. Gluteniny jsou glutelinové polymerní proteiny, které zajišťují pružnost a pevnost těsta, tím umožňují pečivu držet tvar. Gliadiny a gluteniny obsažené v pšeničných zrnech mají schopnost vytvářet specifický gel, nazývaný lepek. Lepek není obsažen v nativním zrnu ani v mouce, vzniká až reakcí gliadinů a gluteninů při hnětení mouky s vodou a za přítomnosti vzdušného kyslíku. V průběhu trávení potravy v gastrointestinálním traktu, dochází ke štěpení jednotlivých pšeničných proteinů na širokou škálu různě dlouhých peptidů. Některé typy těchto peptidů, vzniklých při rozkladu lepku a zvláště pak lepku s vysokým obsahem prolinu, vytváří pevné, kompaktní struktury, které mohou být těžko stravitelné a u predisponovaných osob mohou vyvolat nežádoucí imunitní reakce (Arentz-Hansen et al., 2002).

3.1.3.3 Lipidy

Lipidy tvoří velkou a různorodou skupinu organických sloučenin. Jejich charakteristickou vlastností je nerozpustnost, nebo pouze omezená rozpustnost ve vodě. Naproti tomu v organických rozpouštědlech, jako je hexan, chloroform, aceton, benzen nebo toluen jsou rozpustné velmi dobře. Do skupiny lipidů jsou řazeny tuky a oleje neboli tzv. neutrální lipidy, další podskupinou jsou polární lipidy zastoupené hlavně fosfolipidy, dále sem patří vosky, steroidy, lipofilní pigmenty a některé vitaminy. Kromě již zmíněných, se v obilovinách vyskytují také lipidy vázané na jiné složky, např. glykolipidy a lipoproteiny.

Neutrální lipidy jsou z chemického hlediska estery glycerolu a vyšších mastných kyselin, v přírodě jsou zastoupeny především triacylglyceroly. Rostlinné oleje jsou tvořeny převážně z nenasycených mastných kyselin, které snadno podléhají oxidačnímu žluknutí, na rozdíl od tuků živočišných, ve kterých se vyskytují převážně nasycené mastné kyseliny (Příhoda et al., 2004).

V závislosti na druhu obilovin a extrakční metodě se průměrný obsah lipidů pohybuje od 1,7 do 7 %. Ovesné vločky vykazují, ve srovnání s pšenicí a žitem, jejichž zrna mají pouze kolem 2 %, vysoký obsah, tj. kolem 6-8 % lipidů. Lipidy obilných zrn jsou uloženy především v klíčcích, v menší míře pak v aleuronové vrstvě a velmi malé množství se vyskytuje také v endospermu. V klíčku a aleuronové vrstvě jsou obsaženy hlavně triacylglyceroly, v endospermu zejména fosfolipidy a glykolipidy. Lipidy obilných zrn mají podobné složení mastných kyselin, s největším zastoupením kyselin linolové (39-69 %), olejové (11-36 %) a palmitové (18-28 %). Pšeničná mouka obsahuje, v závislosti na míře extrakce, 0,5-3 % lipidů, z toho 65-78 % tvoří neutrální lipidy, 15-26 % fosfolipidy a 7-13 % galaktolipidy (Hoseney, 1994). Podstatná část lipidů je během hnětení vázána do struktury pšeničného lepku, proto zřejmě mají i přes poměrně nízké kvantitativní zastoupení v celkové skladbě zrna, důležitou roli při tvorbě těsta (Příhoda et al., 2004).

3.1.3.4 Vitaminy

Vitaminy jsou pestrou skupinou organických látek, nezbytných pro správné fungování lidského organismu, který si je (až na výjimky) není schopen syntetizovat. Obiloviny jsou dobrým zdrojem vitaminů skupiny B, zejména vitamínu B1 (thiaminu) a vitamínu B2 (riboflavinu). V pšenicí je poměrně hojně zastoupena také nikotinová kyselina a její amid. Vitaminy, stejně tak i minerální látky, se vyskytují zejména v klíčku a obalových vrstvách obilných zrn, naproti tomu endosperm je, co do jejich obsahu, poměrně chudý. V závislosti na

stupni vymletí při výrobě mouky, může dojít k úbytku některých vitaminů o více než polovinu původního obsahu v obilce. V bílých moukách zůstává podle stupně vymletí pouze zhruba 10-20 % počátečního obsahu B vitaminů obilného zrna (Příhoda et al., 2004). Ze statistik vyplývá, že u průměrného konzumenta kryjí obiloviny denní potřebu vitaminu B1 z 30 %, vitaminu B2 z 16 % a nikotinové kyseliny a nikotinamidu z 25 % (Prugar et al., 2008). V pšeničných klíčcích je zastoupen také vitamin E (tokoferol), patřící do skupiny lipofilních vitaminů (Příhoda et al., 2004).

3.1.3.5 Minerální látky

Minerální látky označujeme souhrnně jako popel, což je anorganický zůstatek po spálení organického materiálu. Obsah minerálií v obilných zrnech se pohybuje přibližně od 1 do 2,5 %. Stejně jako u vitaminů, je největší podíl minerálních látek koncentrován v obalových vrstvách, aleuronové vrstvě a klíčku, nejméně jich je v endospermu. Největší část popela tvoří oxid fosforečný, nejhojněji zastoupenými kovy jsou vápník, hořčík a železo, mohou se zde objevovat i minerální kontaminanty, hlavně těžké kovy (Příhoda et al., 2004; Koehler et Wieser, 2013).

3.1.3.6 Biologicky aktivní látky pšenice

Výsledky řady studií prokázaly, že zdravotní prospěšnost celozrnných výrobků může být připisována zejména obsahu biologicky aktivních látek obsažených v otrubách a aleuronové vrstvě obilných zrn. Mezi biologicky aktivní látky pšeničných zrn jsou řazeny nestravitelné polysacharidy, neboli vláknina a fytochemikálie, jako jsou fenolické sloučeniny, kterým je díky silným antioxidačním vlastnostem v současné době věnována velká pozornost. Nejrozšířenější formou fenolů obsažených v pšeničných zrnech jsou fenolické kyseliny a flavonoidy (Žilić, 2016). V pšenici jsou dále obsaženy karotenoidy, fytosteroly, lignany a tokoferol (Zuchowski et al., 2011).

3.2 Barevné odrůdy pšenice

Různé druhy rostlin syntetizují v jednotlivých fázích vývoje řadu látek, které způsobují charakteristické zbarvení rostlinných pletiv, což platí i pro obiloviny a jejich zrna. Většina běžně pěstovaných odrůd pšenice má červenou barvu zrna, méně časté je zbarvení bílé. Kromě těchto typů zbarvení existují i tzv. barevné odrůdy pšenice, mezi které patří pšenice se žlutým endospermem, purpurovým perikarpem a modrým aleuronem (Obrázek 2) (Martinek et al., 2006). Žluté zbarvení způsobují karotenoidy, které jsou shromažďovány v endospermu. Modré a purpurové zbarvení zrna je způsobeno anthokyany, které se kumulují v oplodí a aleuronové vrstvě (Lachman et al., 2017).

Barevné odrůdy se vyznačují vyšším obsahem přírodních pigmentů než tradiční červené a bílé odrůdy pšenice. Tyto pigmenty, karotenoidy i anthokyany jsou charakteristické svými antioxidačními vlastnostmi (Lachman et al., 2017; Martinek et al., 2006). Některé studie zabývající se složením zrna netradičně zbarvených odrůd pšenice potvrdily zvýšenou koncentraci biologicky aktivních látek ze skupiny fenolických sloučenin (Heim et al., 2002; Zhang et al., 2018).



Obrázek 2. Barvy zrna vybraných vzorků pšenice: a – červené zrna (odrůda Bohemia), b – bílé zrna (odrůda Novosibirskaya 67), c – zrna se žlutým endospermem (odrůda Citrus), d – zrna se žlutým endospermem (odrůda Bona Vita), e – zrna s purpurovým perikarpem (odrůda Purple Feed), f – zrna s purpurovým perikarpem (odrůda Purple), g – zrna s modrým aleuronem (odrůda UC66049), h – zrna s modrým aleuronem (odrůda Thatcher Blue), i – zrna s modrým aleuronem (odrůda Skorpion) (Lachman et al., 2017).

3.2.1 Červené a bílé zbarvení

Červené zbarvení obilky je podmíněno alespoň jednou ze tří dominantních alel tří dominantních genů *R-1*, lokalizovaných na chromozomech 3A, 3B a 3D (respektive *R-A1*, *R-B1* a *R-D1*). Tyto alely jsou označovány *R-A1b*, *R-B1b*, *R-D1b*. Jediný lokus s exprimující dominantní alelou postačuje pro červené zbarvení. Míra červeného zbarvení je dána počtem dominantních alel. Bílé zbarvení je řízeno recesivními alelami *R-A1a*, *R-B1a* a *R-D1a*,

přítomnými ve všech třech lokusech. Červený pigment je tvořen deriváty katechinu, katechantaninu a protoanthokyanidiny, které vznikají v procesu biosyntézy flavonoidů (Himi et Noda, 2005; Lachman et al., 2017). Výskyt těchto látek je spojován s vyšším zastoupením fenolických sloučenin, především taninů, které způsobují hořkou chuť, lepší odolnost zrna červených pšenic k porůstání a v neposlední řadě mají silné antioxidační vlastnosti. Odrůdy pšenice s bílým zbarvením uvedené látky neobsahují, což je důvodem přirozené sladkosti bílých zrn (Mares et al., 2005; Martinek et al., 2006).

3.2.2 Žluté zbarvení

Barva obilek vybraných odrůd pšenice je ovlivněna přítomností karotenoidů (Martinek et al., 2006). Žlutou barvu endospermu mají obvykle tvrdé tetraploidní pšenice, výrazně žluté jsou také diploidní pšenice (jednozrnky), méně výrazné zbarvení mají i některé hexaploidní pšenice. Žluté zbarvení je řízeno dvěma lokusy *Psy1* a *Psy2*, které jsou lokalizovány na 5. a 7. skupině homologních chromozomů (Lachman et al., 2017).

Karotenoidy jsou žluté, oranžové, méně často také žlutozelené nebo červené pigmenty, které patří do skupiny tetraterpenoidů a lze je dělit do dvou hlavních skupin, na karoteny a xanthofyly. Xanthofyly na rozdíl od karotenů obsahují ve své molekule kyslík. Mezi xanthofyly řadíme mimo jiné lutein a zeaxanthin, což jsou nejhojněji se vyskytující karotenoidy v obilkách pšenice se žlutým zbarvením. Tyto pigmenty jsou obsaženy zejména v endospermu, který se vymílá do mouky, proto ovlivňují i zbarvení hotových pekárenských výrobků (Howitt et Pogson, 2006).

3.2.3 Modré zbarvení

Křížením pšenice s příbuznými planými druhy *Thinopyrum ponticum* a *Triticum monococcum* byla v první polovině 20. století vyšlechtěna pšenice setá s modrými obilkami. Linie modrých pšenic mají do chromatinu vnesené geny *Ba1* a *Ba2*, lokalizované na chromozomech 4A a 4B. Modrá barva je způsobena přítomností anthokyanů, jejichž biosyntéza je těmito geny řízena. Anthokyanová barviva jsou u modrých pšenic lokalizována v aleuronové vrstvě (Obrázek 3) (Burešová et al., 2015; Lachman et al., 2017).

U modrých pšenic byly pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) detekovány anthokyany delfinidin-3-glukosid, kyanidin-3-glukosid, delfinidin-3-rutinosid a kyanidin-3-rutinosid. Bylo zjištěno, že největší zastoupení má delfinidin-3-glukosid, který u modrých pšenic zaujímá přibližně 69 % z celkového podílu anthokyanů. Následuje

kyanidin-3-glukosid, jenž se na celkovém obsahu podílí z 24 % (Abdel-Aal et Rabalski, 2008). Oproti běžné pšenici, vykazují linie s modrým aleuronem výrazně vyšší hladiny anthokyanů (Burešová et al., 2015). V porovnání s purpurovými odrůdami je stabilita pigmentů modrých pšenic, v důsledku jejich umístění v aleuronové vrstvě lepší, neboť je chráněna vrstvami obalovými (Garg et al., 2016).

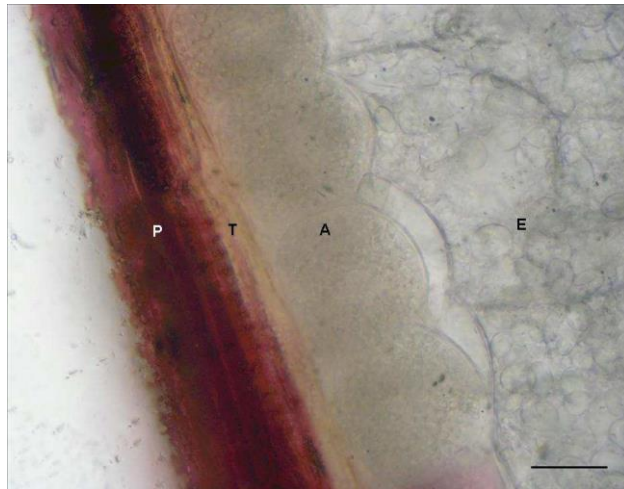


Obrázek 3. Příčný řez obilkou s modrým aleuronem (genotyp Tschermaks Blaukörniger Sommerwiezen), měřítko 200 μm . P - perikarp, T - testa, A - aleuronová vrstva, E - endosperm (Trojan et al., 2014a).

3.2.4 Purpurové zbarvení

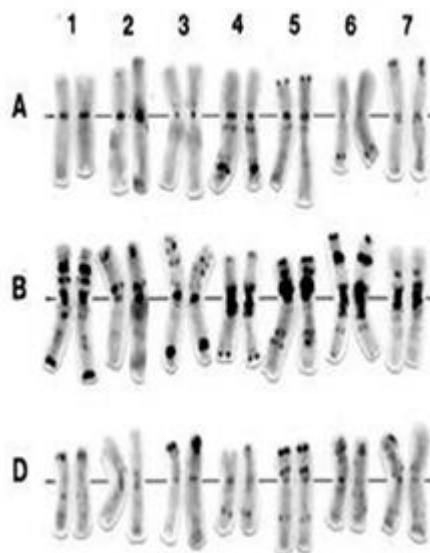
Purpurové zbarvení obilek je řízeno geny *Pp*, které byly do hexaploidních odrůd pšenic (*Triticum aestivum* L.) přeneseny z fialových tetraploidních pšenic pocházejících z několika oblastí východní Afriky (Martinek et al., 2006). Pigmenty způsobující purpurovou barvu se nacházejí v povrchových vrstvách zrna, konkrétně v perikarpu (Obrázek 4).

Pro tyto odrůdy je charakteristický vysoký obsah anthokyanů, které se zde vyskytují především ve formě kyanidin-3-glukosidu, kyanidin-3-rutinosidu a kyanidin-sukcinylglukosidu. Převládajícím anthokyanem je kyanidin-3-glukosid (Kniewel et al., 2009). Fialové zbarvení může mít různou intenzitu od světlejší hnědo purpurové až po sytě purpurovou, která může vypadat téměř jako černá. Rozdíly v intenzitě barev mohou být ovlivněny genetickými faktory, ale také podmínkami vnějšího prostředí, zejména teplotou a světlem (Zeven, 1991; Trojan et al., 2014a).



Obrázek 4. Příčný řez obilkou s purpurovým perikarpem (genotyp ANK – 28B), měřítko 200 μm . P - perikarp, T - testa, A - aleuronová vrstva, E - endosperm (Trojan et al., 2014a).

Geny, lokalizované na chromozomech (Obrázek 5; Tabulka 1), podmiňují zbarvení různých odrůd, které je způsobeno přítomností látek s antioxidační aktivitou. Kombinováním genotypů, lze vytvářet odrůdy s vyšším antioxidačním účinkem (Martinek et al., 2006). Lze předpokládat, že dlouhodobější zkrmování těchto odrůd hospodářskými zvířaty, by mohlo mít pozitivní vliv na jejich zdraví i na zdraví lidí (Knievel et al., 2009). Výzkumy prováděné na laboratorních potkanech, prokázaly vyšší hodnoty antioxidační aktivity v játrech potkanů krmených purpurovou pšenicí ve srovnání s kontrolní skupinou, která byla krmena běžnou pšenicí (Karásek et al., 2014).



Obrázek 5. Chromozomy hexaploidní pšenice (Trojan, 2014).

Tabulka 1. Geny odpovědné za zbarvení obilek a jejich umístění a aktuální značení (upraveno dle Trojan, 2014).

CHROMOZOM	OZNAČENÍ GENU
Červená barva	
3AL	<i>R-A1</i>
3BL	<i>R-B1</i>
3DL	<i>R-D1</i>
Purpurová barva	
2A	<i>Pp3a, Pp3b</i>
6A	<i>Pp2</i>
7D	<i>Pp-D1</i>
Modrá barva	
4A	<i>Ba2</i>
4BS	<i>Ba1</i>
Žlutá barva	
5A	<i>Psy2-A1</i>
5B	<i>Psy2-B2</i>
7AL	<i>Psy1-A1</i>
7BL	<i>Psy1-B1</i>
7DL	<i>Psy1-D1</i>

3.3 Antioxidační aktivita

Antioxidanty mohou být definovány jako látky, které pokud jsou přítomny v nízkých koncentracích ve srovnání s oxidovatelným substrátem, výrazně zpomalují nebo inhibují oxidaci tohoto substrátu (Antolovich et al., 2002; Halliwell et al., 1995; Sies, 1997). Antioxidační aktivita těchto látek spočívá v ochraně struktur a funkcí řady chemických sloučenin vyskytujících se v živých organismech, jako jsou polynenasycené mastné kyseliny lipoproteinů buněčných membrán, některé nukleové kyseliny a další, dále v udržování fyziologické rovnováhy mezi původci oxidačních změn a antioxidanty a ve stimulaci tvorby a aktivity vnitřních antioxidantů (Zloch et al., 2004).

Buňky jsou chráněny proti oxidačnímu stresu systémem vzájemně působících antioxidačních enzymů (Davies, 1995), ale také neenzymatickými substráty. Mezi neenzymatické substráty jsou řazeny endogenní antioxidanty, např. lipoová a močová kyselina, glutathion a koenzym Q, dále přírodní látky s antioxidačními účinky, jako jsou fenolické kyseliny, flavonoidy, karotenoidy, askorbová kyselina (vitamin C), retinol

(vitamin A) a tokoferoly (vitaminy skupiny E). Antioxidační vlastnosti mají také některé biomolekuly, jako feritin a transferin. Díky své schopnosti vázat ionty železa předchází zahájení radikálové řetězové reakce (Sies, 1997).

Na základě chemické struktury mohou být antioxidační látky řazeny mezi fenolické sloučeniny (fenolkarboxylové kyseliny, flavonoidy, anthokyany a kumariny), karotenoidy (prekursory vitaminu A dělí se na karoteny a xanthofyly) a tokoferoly. Dalšími látkami se silnou antioxidační aktivitou jsou vitamin C a selen (Lachman et al., 2000; Lachman et al., 2005).

Výskytu antioxidačních látek v potravinách a jejich biologické účinnosti je v současné době věnována velká pozornost (Zloch et al., 2004). Bylo prokázáno, že antioxidační látky zabraňují, nebo alespoň zpomalují peroxidaci lipidů, což je jedna z hlavních příčin zhoršování kvality potravin a farmaceutických produktů v průběhu jejich zpracování a skladování (Gülçin, 2012). Výsledky řady studií prokazují, že dostatečně velký, pestrý a pravidelný příjem antioxidantů přímo souvisí s větší odolností organismu proti řadě chronických onemocnění (Adom et al., 2003; Gülçin, 2012; Halliwell, 1996; Liu, 2007; Thompson, 1994; Zloch et al., 2004).

3.3.1 Oxidační stres

Oxidace je reakce, při které dochází k přenosu elektronů z jednoho atomu na jiný, je nezbytnou součástí látkové výměny v lidském organismu a celého aerobního života. Kyslík je konečným akceptorem elektronů v elektronovém transportním řetězci, při kterém dochází k tvorbě energie ve formě adenosintrifosfátu (Racek et Holeček, 1999), proto je tvorba kyslíkových radikálů v průběhu aerobního metabolismu nevyhnutelná (Pláteník, 2009). Jako oxidační stres je označován stav, kdy je v organismu narušena rovnováha oxidačních a antioxidačních agens, ve prospěch činitelů oxidačních (Sies, 1997).

Životaschopnost buněk ve velké míře závisí na oxidačním metabolismu, při kterém mohou vznikat, jako vedlejší produkty, volné radikály a další reaktivní formy kyslíku, způsobující oxidační změny. Při nadbytku volných radikálů vzniklých v organismu, může docházet k přetížení enzymů antioxidační ochrany a k destruktivním buněčným dějům (např. apoptóze) prostřednictvím oxidace lipidů buněčných membrán, buněčných bílkovin, DNA (deoxyribonukleové kyseliny) a enzymů podílejících se na buněčném dýchání, čímž může dojít k jeho zástavě (Antolovich et al., 2002).

Volným radikálům, zejména jejich vlivu na rozvoj řady onemocnění, je věnována velká pozornost. V současné době roste počet civilizačních chorob souvisejících s působením volných radikálů (Paulová et al., 2004). Oxidační poškození biomolekul, jako jsou bílkoviny, DNA a membránové lipidy je jedním z důvodů patogeneze mnoha zánětlivých a degenerativních onemocnění, jako je ateroskleróza, rakovina, kardiovaskulární choroby a nemoci dýchacích cest (Pláteník, 2009; Zhou et Yu, 2004). Oxidace je také jednou z hlavních příčin chemického znehodnocení potravin, následkem čehož dochází ke žluknutí tuků anebo zhoršení kvality výživové hodnoty, barvy, chuti, textury a zdravotní nezávadnosti potravin (Shahidi et al., 1992).

3.3.2 Volné radikály

Volnými radikály jsou nazývány atomy, molekuly nebo ionty, které mají ve svém elektronovém obalu jeden nebo více nepárových elektronů a jsou schopny, alespoň krátkodobé, samostatné existence (Racek et Holeček, 1999; Gülçin, 2012). Z molekul, jejichž orbitály jsou obsazené dvěma elektrony, mohou volné radikály vznikat oxidací, při které dochází ke ztrátě jednoho elektronu, redukcí, kdy je elektron naopak přidán, nebo homolytickým štěpením kovalentní vazby, za dodání velkého množství energie, při kterém každý ze vzniklých fragmentů získá jeden nepárový elektron. Pokud je počet protonů obsažených v atomových jádrech radikálu ve shodě s počtem elektronů v orbitalech, je radikál neutrální, převažuje-li počet protonů či elektronů, je radikál kladně nebo záporně nabitý ion (Štípek, 2000).

Volné radikály jsou velmi reaktivní a nestabilní, mají totiž tendenci získat chybějící elektron buď vazbou na jinou strukturu, nebo odebráním či dodáním elektronu jiné molekule. Mohou reagovat s jinými volnými radikály, nebo také s intaktními molekulami, čímž dochází ke vzniku dalších volných radikálů, tento proces pak pokračuje jako řetězová reakce. Řetězové reakce volných radikálů následně vedou ke změnám ve struktuře buněk, což může mít za následek závažné poškození tkání nebo i celých orgánů (Racek et Holeček, 1999; Paulová et al., 2004). Ukončení radikálové reakce může nastat tehdy, dojde-li k reakci dvou radikálů, jejich nepárové elektrony se pak spojí, čímž vznikne molekula se stabilní elektronovou konfigurací, tento děj je označován jako terminace radikálové reakce. Některé volné radikály se v organismu objevují fyziologicky v průběhu metabolických přeměn, jiné vznikají nebo se zvyšuje jejich množství při vystavení organismu psychické nebo fyzické

zátěži, např. stresu, nemoci, kouření atd. (Štípek, 2000). Organismy mohou volné radikály využívat i ve svůj prospěch, např. při protizánětlivých reakcích v procesu fagocytosy.

Nejvýznamnější jsou volné radikály kyslíku a dusíku, ze kterých mohou dále vznikat jiné reaktivní látky, které však již nepárový elektron nemají (peroxid vodíku, kyselina chlorná). Tyto látky a volné radikály se společně označují jako reaktivní formy kyslíku nebo dusíku (Gülçin, 2012; Paulová et al., 2004; Racek et Holeček, 1999).

Mechanismy obrany organismu proti nežádoucím změnám, které jsou způsobeny volnými radikály, jsou zajišťovány působením antioxidačních látek (Antolovich et al., 2002; Racek et Holeček, 1999; Paulová et al., 2004). Strategie antioxidační ochrany může být formulována jako přeměna reaktivních forem na méně škodlivé produkty, čímž dochází ke snížení rizika poškození organismu (Sies, 1997). K eliminaci negativních účinků volných radikálů může napomáhat vyšší příjem exogenních antioxidantů, což může být důvodem pro vzrůstající tendenci hodnocení antioxidačních vlastností přírodních látek a rostlinných extraktů (Paulová et al., 2004). Výsledky řady studií prokázaly, že pšeničná zrna obsahují vysoké koncentrace antioxidantů (Beta et al., 2005; Liyana-Pathirana et Shahidi, 2007; Zhang et al., 2018; Zhou et Yu, 2004).

3.4 Fenolické sloučeniny

Fenolické sloučeniny patří, společně s alkaloidy a isoprenoidy, mezi sekundární metabolity rostlin. Vznikají v průběhu vývoje rostlin, v důsledku jejich interakce s vnějším prostředím (Gülçin, 2012; Stalikas, 2007). Koncentrace fenolických sloučenin v jednotlivých částech rostlin se výrazně liší. Tyto látky v rostlinném organismu zastávají řadu specifických funkcí, např. strukturální a ochranné. Rostlinné fenoly mohou plnit funkci signálních molekul či elektronových přenašečů, dále se mohou podílet na lákání opylovačů nebo chránit rostlinu před UV zářením a dalšími vlivy vnějšího prostředí (Mandal et al., 2010; Stalikas, 2007).

Jako součást většiny rostlinných materiálů včetně potravinářských produktů rostlinného původu, jsou považovány za nedílnou složku potravy lidí i zvířat (Gülçin, 2012; Robbins, 2003; Shahidi et Naczek, 2003). Je známo asi 8 000 přirozeně se vyskytujících fenolických látek (Croteau et al., 2000), všechny mají společný základní strukturální rys, kterým je aromatický cyklus s navázanou alespoň jednou hydroxylovou skupinou, tzv. fenol (Balasundram et al., 2006; Croteau et al., 2000; Scalbert et al., 2002).

3.4.1 Rozdělení fenolických sloučenin

Chemická struktura fenolických sloučenin se různí, existují jako jednoduché molekuly i jako komplexní polymery. V závislosti na počtu fenolových subjednotek, přítomných v chemické struktuře, mohou být fenolické látky klasifikovány na jednoduché fenoly, obsahující pouze jeden aromatický kruh a polyfenoly (Clifford, 2001). Polyfenoly obsahují alespoň dvě aromatická jádra s navázanými hydroxylovými skupinami, řadí se mezi ně flavonoidy se dvěma a taniny, které mají tři a více fenolových podjednotek (Robbins, 2003). Strukturální rozmanitost je důvodem rozdílného stupně biologické dostupnosti těchto látek. Jednoduché fenolické látky, jako např. kyseliny ferulová, kávová, gallová a další, jsou mnohem snáze vstřebávány skrz střevní stěnu, na rozdíl od složitějších molekul, jako jsou protoanthokyany, nebo strukturální polymery (např. lignin a kutin), které lze vstřebat velmi obtížně (Brandolini et al., 2013; Scalbert et al., 2002). Fenolické sloučeniny zahrnují širokou škálu molekul, které mohou být podle stavby uhlíkatého řetězce (počtu uhlíků a jejich vzájemných vazeb), děleny do několika skupin (Tabulka 2) (Balasundram et al., 2006; D'Archivio et al., 2007). Za nejvýznamnější fenolické sloučeniny vyskytující se v lidské stravě jsou považovány fenolické kyseliny, flavonoidy a taniny (King et Young, 1999).

Tabulka 2. Dělení fenolických látek rostlin dle chemické struktury (upraveno dle Balasundram et al., 2006).

skupina	základní struktura
jednoduché fenoly, benzochinony	C_6
fenolické (hydroxybenzoové) kyseliny	C_6-C_1
acetofenony, fenyloctové kyseliny	C_6-C_2
fenolické (hydroxyskořicové) kyseliny, fenylylpropanoidy (kumariny, isokumariny, chromony, chromeny)	C_6-C_3
naftochinony	C_6-C_4
xanthyony	$C_6-C_1-C_6$
stilbeny, antrachinony	$C_6-C_2-C_6$
flavonoidy, isoflavonoidy	$C_6-C_3-C_6$
lignany, neolignany	$(C_6-C_3)_2$
biflavonoidy	$(C_6-C_3-C_6)_2$
ligniny	$(C_6-C_3)_n$
kondenzované taniny (protoanthokyanidiny)	$(C_6-C_3-C_6)_n$

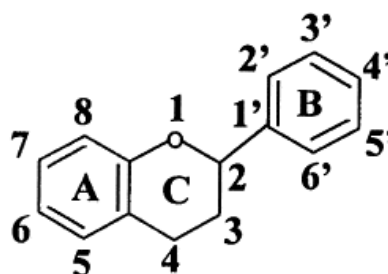
3.4.2 Flavonoidy

Flavonoidy představují nejrozsáhlejší skupinu přirozeně se vyskytujících rostlinných fenolických látek, v současné době je známo zhruba 6 000 flavonoidních sloučenin (Balasundram et al., 2006; King et Young, 1999; Wang et al., 2017). Základní strukturu flavonoidů tvoří flavanové jádro neboli flavan. Flavan je tvořen patnácti atomy uhlíku uspořádanými do třech kruhů, které jsou označovány písmeny A, B a C (Obrázek 6) (Gülçin, 2012). Tato struktura, odvozená od difenylpropanu, je tvořena dvěma benzenovými kruhy (A a B), které jsou spojeny tříuhlíkatým alifatickým řetězcem, uspořádaným nejčastěji do formy pyranového kruhu (C). Většina přirozeně se vyskytujících flavonoidních látek se vyskytuje ve formě O-glykosidů. Ve své molekule obsahují sacharidovou složku (glykon), kterou je často D-glukosa, může být však zastoupena L-rhamnosou, galaktosou, arabinosou, nebo polyfenolem ligninem. Na cukernou složku je pomocí kyslíkového můstku (glykosidickou vazbou) vázán aglykon (Havsteen, 1983).

Podle hydroxylových a ketonických skupin substituovaných na základní strukturu jsou flavonoidy děleny do několika podskupin, tato klasifikace se však u jednotlivých autorů různí (Cook et Samman, 1996; Dai et Mumper, 2010; D'Archivio et al., 2007; Halbwirth, 2010; Heim et al., 2002). King et Young (1999) dělí flavonoidy na anthokyanidiny a anthoxanthiny. Anthoxanthiny zahrnují flavony (např. apigenin a luteolin), flavonoly (např. kvercetin, myricetin a rutin), flavanony (např. hesperidin a naringenin), flavanonoly, isoflavony, flavan-3-oly (katechiny), flavan-3,4-dioly (leukoanthokyanidiny) a jsou to bezbarvé, bílé či slabě žlutě zbarvené látky. Anthokyanidiny jsou aglykony anthokyanových barviv, které způsobují červené, modré a purpurové zbarvení některých odrůd obilovin, stejně jako mnoha druhů ovoce a zeleniny. U barevných odrůd pšenice, bývá nejčastějším aglykonem kyanidin, delfinidin, dále pelargonidin a malvidin (Havrlentová et al., 2014).

V rostlinných organismech jsou flavonoidy syntetizovány fenyylpropanoidovou dráhou. Jejich biosyntéza vychází z fenyllalaninu, který je pomocí šikimátové metabolické dráhy transformován přes skořicovou kyselinu na *p*-kumarovou kyselinu. *P*-kumarová kyselina následně působí jako iniciační kyselina pro kondenzaci octové kyseliny, což vede ke vzniku polyketidu, poté dochází k navazujícím přeměnám vzniklé struktury. Reakcí *p*-kumaryl-CoA (koenzymu A) se třemi molekulami malonyl-CoA a působením enzymu chalkon synthasy vzniká meziproduct biosyntézy flavonoidů – chalkon. Následným působením enzymu chalkon isomerasy přechází tento meziproduct na flavanon, jenž tvoří základ nezbytný pro syntézu řady flavonoidů (Gülçin, 2012; Wang et al., 2017).

Jejich antioxidační aktivita spočívá ve schopnosti reagovat s volnými radikály, přičemž flavonoidy působí jako donoři vodíku. V závislosti na chemické struktuře flavonoidů, zejména na pozici a počtu hydroxylových skupin, se liší i jejich antioxidační schopnosti, čím více jsou hydroxylovány, tím více vodíkových atomů mohou poskytnout volným radikálům a tím je jejich antioxidační aktivita větší (Zhang et al., 2017). Hlavním zdrojem flavonoidů pro člověka jsou obiloviny, ovoce a zelenina (Wang et al., 2017).



Obrázek 6. Základní struktura flavonoidů (Cook et Samman, 1996).

3.4.3 Fenolické kyseliny

Mezi fenolické kyseliny jsou řazeny fenolické látky, které ve své struktuře obsahují fenolický kruh a alespoň jednu karboxylovou funkční skupinu (Goleniowski et al., 2013; Robbins, 2003). Fenolické kyseliny jsou přítomny téměř ve všech potravinách rostlinného původu, které představují značnou část lidské stravy. Zastupují téměř jednu třetinu fenolů vyskytujících se v potravinách a jsou spojovány s organoleptickými, nutričními a antioxidačními vlastnostmi potravin (Shahidi et al., 1992).

Fenolické kyseliny se v rostlinách mohou vyskytovat ve třech formách:

- volné, rozpustné,
- konjugované s nízkomolekulárními sloučeninami, rozpustné,
- vázané na polymery obsažené v buněčných stěnách, nerozpustné (Gao et al., 2017; Goleniowski et al., 2013; Laddomada et al., 2015; Stalikas 2007; Zhang et al., 2018).

Většina fenolických kyselin je vázána prostřednictvím esterových, etherových nebo acetalových (glykosidických) vazeb ke strukturálním součástem rostlin (celulose, proteinům, ligninu) nebo ke složitějším polyfenolickým sloučeninám (flavonoidům). Fenolické kyseliny konjugované s menšími organickými molekulami mohou být sdruženy např. s cukry (glukosou), organickými kyselinami (maleinovou, chinovou, nebo tartarovou kyselinou),

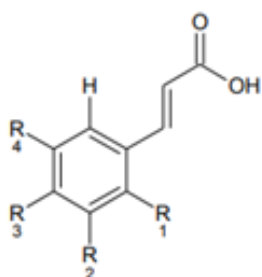
či s jinými přírodními látkami (např. terpeny, steroly). Pouze minoritní podíl rostlinných fenolických kyselin existuje ve volné formě. Volné fenolické kyseliny mohou být u obilných zrn nalezeny ve vnější vrstvě perikarpu (Gao et al., 2017; Kim et al. 2006; Zhang et al., 2018).

3.4.3.1 Rozdělení fenolických kyselin

Základem chemické struktury těchto sloučenin je aromatický kruh, v němž je alespoň jeden vodík substituován hydroxylovou skupinou (Heleno et al., 2015; Rice-Evans et al., 1996). V závislosti na počtu uhlíků v postranním řetězci navázaném na fenolický kruh, mohou být fenolické kyseliny děleny do třech skupin. Nejvýznamnější jsou kyseliny náležící do skupiny se základní strukturou C₆-C₃ (deriváty hydroxyskořicové kyseliny; Obrázek 7) a C₆-C₁ (deriváty hydroxybenzoové kyseliny; Obrázek 8). Třetí skupinu tvoří fenyloctové kyseliny se základní strukturou C₆-C₂. Přestože základní uhlíkatý řetězec zůstává stejný, liší se jednotlivé fenolické kyseliny počtem a umístěním hydroxylových skupin na aromatickém kruhu (Goleniowski et al., 2013).

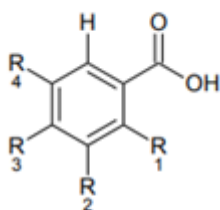
Deriváty hydroxybenzoové kyseliny jsou v lidské stravě zastoupeny velmi málo, řadíme k nim kyseliny *p*-hydroxybenzoovou, gallovou, ellagovou, syringovou, protokatechovou a vanilovou (D'Archivio et al., 2007; Goleniowski et al., 2013; Laddomada et al., 2015). Největší význam mají kyseliny gallová, nacházející se ve víně a čajových lístcích a ellagová, která je obsažena v bobulovitém ovoci, jako jsou jahody a maliny (King et Young, 1999).

Fenolické kyseliny odvozené od hydroxyskořicové kyseliny jsou v potravinách běžnější, největší koncentrace se vyskytují ve vnějších vrstvách zralého ovoce, dále v zelenině a obilovinách. Patří mezi ně kyseliny kávová, chlorogenová, sinapová, *p*-kumarová a ferulová (D'Archivio et al., 2007; Goleniowski et al., 2013; Robbins, 2003). Deriváty hydroxyskořicové kyseliny se vyskytují převážně glykosylované nebo jako estery organických kyselin, jako jsou kyseliny chinová, šikimová a tartarová (Shahidi et Naczki, 2003). Dále mohou být esterovou vazbou spojeny s mono- nebo disacharidy, či různými polymery. Mohou se také vyskytovat jako amidy (vazané na aminokyseliny nebo aminy). Nejčastěji přirozeně se vyskytujícími hydroxyskořicovými kyselinami jsou kyseliny kávová a chlorogenová (Goleniowski et al., 2013). Chlorogenová kyselina je nízkomolekulární rozpustný ester kyselin kávové a chinové, ve vysokých koncentracích se vyskytuje v kávě a různých druzích ovoce (Heleno et al., 2015).



<u>Hydroxyskořicové kyseliny</u>				
Název	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
o-kumarová	OH	H	H	H
m-kumarová	H	OH	H	H
p-kumarová	H	H	OH	H
Ferulová	H	OCH ₃	OH	H
Sinapová	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Kávoová	H	OH	OH	H

Obrázek 7. Struktura některých hydroxyskořicových kyselin (upraveno dle Li et al.,2008).



<u>Hydroxybenzoové kyseliny</u>				
Název	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Benzoová	H	H	H	H
p-hydroxybenzoová	H	H	OH	H
Vanilová	H	OCH ₃	OH	H
Gallová	H	OH	OH	OH
Protocatechová	H	OH	OH	H
Syringová	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Salicylová	OH	H	H	H

Obrázek 8. Struktura některých hydroxybenzoových kyselin (upraveno dle Li et al., 2008).

3.4.3.2 Význam pro rostliny

Fenolické kyseliny vznikají během růstu rostlin, které jejich tvorbou reagují na stresové podmínky. V přírodě jsou syntetizovány rostlinami a houbami z důvodu ochrany před vnějšími vlivy - UV zářením, hmyzem, viry a bakteriemi, působí jako fungicidy a bakteriostatika (Brandolini et al., 2013; Goleniowski et al., 2013; Heleno et al., 2015; Mandal et al., 2010; Robbins, 2003; Zhang et al., 2018). Význam fenolických kyselin je spojován s mnoha rozličnými funkcemi, zahrnujícími příjem živin, syntézu bílkovin, enzymatickou aktivitu, fotosyntézu či strukturní a ochranné funkce (Goleniowski et al., 2013; Shahidi et Naczka, 2003). Některé druhy rostlin využívají fenolické kyseliny k inhibici růstu kompetičních druhů rostlin v jejich okolí (alelopatie), tyto účinky mají například kyseliny

ferulová a kávová (Heleno et al., 2015). Je pravděpodobné, že alelopatické schopnosti těchto fenolických kyselin nevykazují druhovou specifitu, ale fungují jako širokospektré preemergentní herbicidy postihující okolní semena, nikoli však mateřskou rostlinu. Jednoduché fenolické kyseliny slouží jako signální molekuly a účastní se tak řady interakcí mezi rostlinou a různými druhy mikroorganismů (Goleniowski et al., 2013; Mandal et al., 2010).

3.4.3.3 Současné poznání v obilovinách

Fenolické kyseliny jsou nejrozšířenějšími fenoly, které se vyskytují v obilných zrnech (Kandil et al., 2012). Tyto látky se v průběhu ontogeneze mohou hromadit v různých rostlinných tkáních a buňkách v závislosti na faktorech vnějšího prostředí (Boz, 2015). V obilných zrnech jsou fenolické kyseliny uloženy především v aleuronové vrstvě a vnějších obalových vrstvách, které obsahují široké spektrum fenolických látek (Adom et al., 2003; Beta et al., 2005; Kandil et al., 2012).

Největší podíl má ferulová kyselina a dehydrodimery ferulové kyseliny, dále kyseliny sinapová a *p*-kumarová. Pšeničné otruby také obsahují trimer ferulové kyseliny, konkrétně 4-O-8',5'-5"-dehydrotriferulovou kyselinu, která je nejvíce koncentrována v perikarpu. Naproti tomu kyselina *p*-kumarová je nejvíce koncentrována v aleuronové vrstvě (Laddomada et al., 2015). Koncentrace fenolických kyselin je rozdílná u jednotlivých druhů a kultivarů rostliny, dále je ovlivněna stupněm zralosti, podmínkami a dobou skladování dané plodiny (Robbins, 2003).

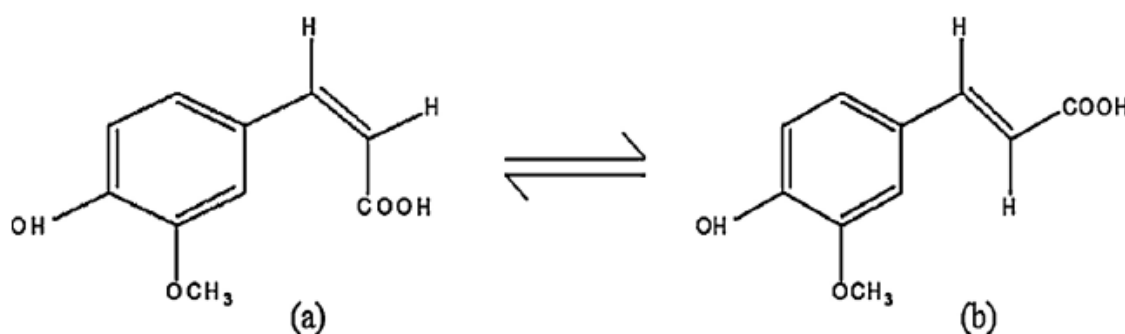
3.4.3.4 Ferulová kyselina

Ferulová kyselina (4-hydroxy-3-methoxyskořicová kyselina) je obsažena v plodech, listech a semenech velkého počtu rostlin, zejména obilnin. Nejvíce ferulové kyseliny lze nalézt v kukuřici, následně pšenici, ovsu a rýži (Gani et al., 2012), kde představuje více než 90 % z celkového fenolického obsahu, což v případě pšenice činí zhruba 0,8-2 g.kg⁻¹ v sušině (Ndolo et al., 2013). Z tohoto důvodu je ferulová kyselina používána jako marker dalších antioxidačních látek obsažených v pšenici (Gani et al., 2012).

Ferulová kyselina je obvykle nejvíce koncentrována ve vnějších obalových vrstvách obilných zrn, zatímco nejnižší množství se nachází v endospermu (Ndolo et al. 2013). V obilovinách je obsaženo pouze kolem 0,1-0,5 % volné ferulové kyseliny (Zhao et Moghadasian, 2008). Převážná část se vyskytuje ve formě esterů, kde je kovalentně vázána

s mono- a disacharidy, polysacharidy, glykoproteiny, ligninem, a dalšími biopolymery buněčných stěn (Kim et al., 2006; Zhang et al., 2018). Díky přítomnosti dvojné vazby v postranním řetězci existuje ferulová kyselina ve dvou geometrických isomerech (Obrázek 9): *cis* (žlutá olejovitá kapalina) a *trans* (bílá krystalická látka) (Kumar et Pruthi, 2014). U rostlin je 90 % ferulové kyseliny ve formě *trans*- isomeru (Graf, 1992).

V obilných otrubách je obsaženo značné množství ferulové kyseliny a produktů vzniklých jejím oxidativním spojením, které nazýváme jako diferulové kyseliny nebo dehydrodimery ferulové kyseliny. Diferulové kyseliny vznikají pomocí mikrobiální esterázy během procesu trávení ferulové kyseliny. Redukované dimery diferulových kyselin mohou být formovány na základě mikrobiálních hydrogenačních reakcí. Pšeničné otruby obsahují značné množství těchto sloučenin. Nejvyšší obsah diferulové kyseliny má ze všech druhů obilí kukuřice, následně žito, ječmen, oves a pšenice (hodnoty se pohybují od 250 do 475 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ mouky) (Boz, 2015).



Obrázek 9. Schematické znázornění dvou isomerních forem ferulové kyseliny (a) *cis*-ferulová kyselina, (b) *trans*-ferulová kyselina (Kumar et Pruthi, 2014).

3.4.3.4.1 Antimikrobiální účinky

Kyseliny ferulová, kávová, *p*-hydroxyskořicová, *p*-hydroxybenzoová, syringová, protokatechová, *p*-kumarová, vanilová a další, izolované z různých rostlinných zdrojů, vykazovaly antibakteriální aktivitu. Mechanismus jejich antibakteriálního účinku je označován jako nespecifický, způsobující změny cytoplasmatické membrány (Fernandez et al., 1992). Ferulová kyselina působí antimikrobiálně proti gramnegativním i grampozitivním bakteriím a kvasinkám. Prokazuje silný inhibiční účinek proti mikroflóře zažívacího traktu lidí, jako jsou *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter koseri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori* a *Shigella sonnei* (Lo et Chung 1999; Ou et Kwok, 2004). Mathew et Abraham (2004) zdůrazňují antimikrobiální aktivitu, kterou

ferulová kyselina prokázala proti bakteriím *Bacillus subtilis* a *Streptococcus pneumoniae*. Ferulová kyselina dále vykazuje silné antimykotické účinky proti *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria sp.*, *Botrytis cinerea* a *Penicillium digitatum* (Boz, 2015; Ou et Kwok, 2004).

3.4.3.5 Biosyntéza

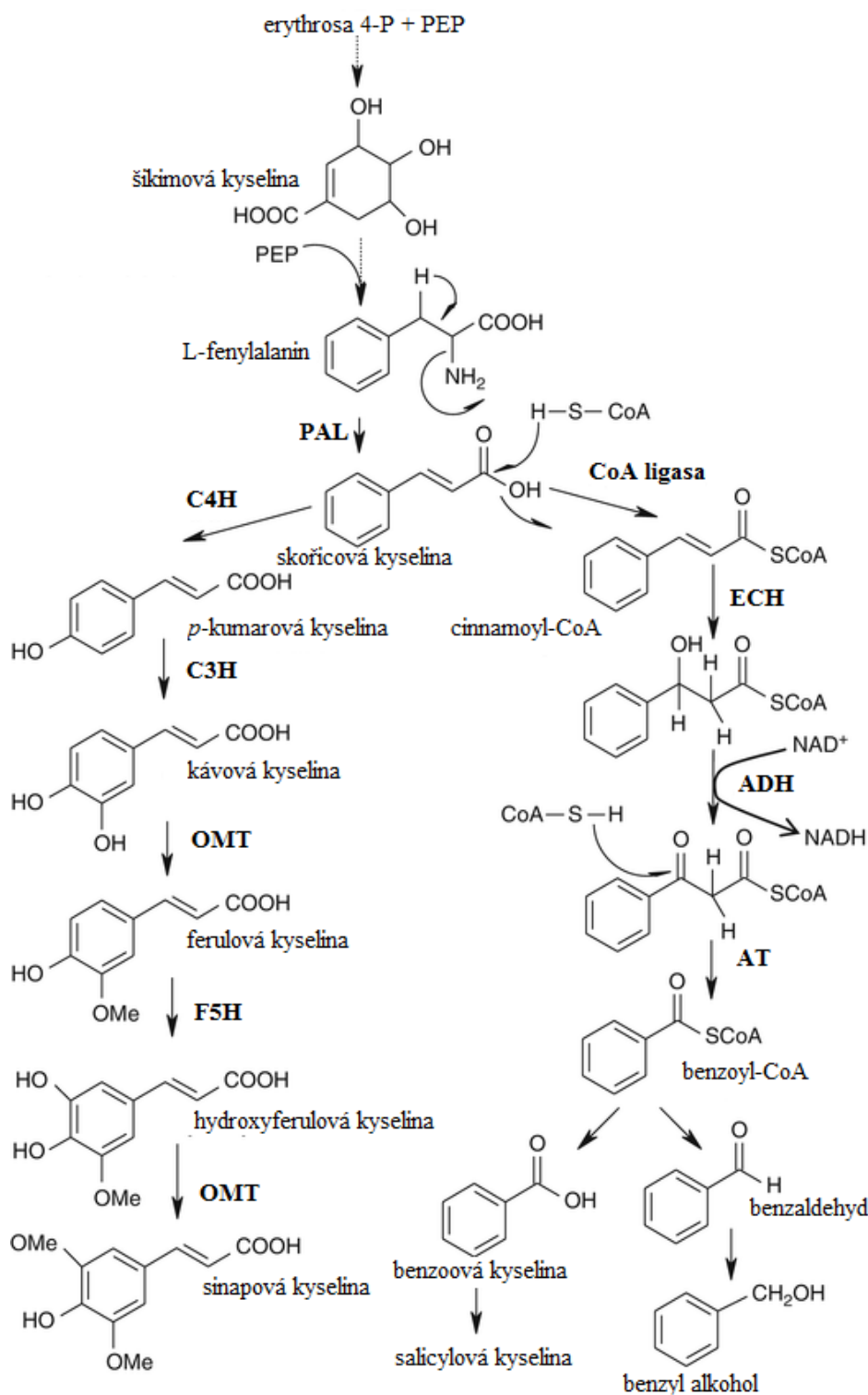
Biosyntéza fenolických kyselin vychází z šikimátové metabolické dráhy. Výchozími látkami šikimátové dráhy jsou erythro-4-fosfát (E4P) a fosfoenolpyruvát (PEP), vznikající při metabolismu sacharidů. Kondenzací těchto látek vzniká, jako meziprodukt, kyselina šikimová (šikimát), podle které je tato metabolická cesta pojmenována. Další enzymatické reakce šikimátové dráhy vedou ke vzniku chorismové kyseliny (chorismátu), společného prekurzoru pro syntézu aromatických aminokyselin tryptofanu, fenylalaninu a tyrosinu. Pro syntézu fenolických kyselin jsou zásadní aminokyseliny fenylalanin a tyrosin, které vznikají z chorismátu působením enzymu chorismát mutasy (Maeda et Dudareva, 2012).

Prostřednictvím enzymu fenylalaninamoniak lyasy (PAL), jež katalyzuje deaminaci fenylalaninu, dochází ke vzniku *trans*-skořicové kyseliny (Robbins, 2003; Shahidi et Naczki, 2003). Uvolněný amoniak je využit pro syntézu glutaminu nebo glutamátu. Jako součást glutamátu může amino skupina přejít na p-fenylalanin za vzniku arogenátu, prekurzoru fenylalaninu i tyrosinu. Tento proces koloběhu dusíku zajišťuje stálou dodávku aromatických aminokyselin, z nichž jsou odvozeny fenolické sloučeniny (Croteau et al., 2000).

Přenosem hydroxylové skupiny do pozice *para*- na aromatickém cyklu fenylskořicové kyseliny vzniká *p*-kumarová kyselina (4-hydroxyskořicová kyselina). Tato reakce je katalyzována enzymem *trans*-cinamát-4-monooxygenasou (C4H), za využití cytochromu P450, jako místa pro navázání kyslíku. U některých rostlin vzniká *p*-kumarová kyselina z tyrosinu působením enzymu tyrosinamoniak lyasy.

Dále může *p*-kumarová kyselina, za přítomnosti hydroxylas, podléhat hydroxylaci na pozici 3 a 5 v aromatickém cyklu. Navázané hydroxylové skupiny mohou být následně methylovány působením O-methyl transferas (OMT), přičemž účinkuje S-adenosylmethionin, jako donor methylové skupiny. Tímto způsobem dochází k biosyntéze dalších fenolických kyselin, konkrétně kyseliny kávové (3,4-dihydroxyskořicové), ferulové (3-methoxy-4-hydroxyskořicové) a sinapové (3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicové). Tyto sloučeniny obsahují fenolový kruh (C6) s navázaným tříuhlíkatým řetězcem (C3) a jsou společně nazývány jako fenylypropanoidy.

Fenylpropanoidy jsou prekurzory pro syntézu ligninu a mnoha dalších sloučenin. Deriváty benzoové kyseliny (fenyلكarboxylové kyseliny) vznikají z fenylpropanoidů odštěpením dvou uhlíků z vedlejšího řetězce a následnými modifikacemi této struktury. Vznik benzoové kyseliny může být výsledkem degradace bočního řetězce skořicové kyseliny. Hydroxylací a methylací aromatických kruhů benzoových kyselin dochází k tvorbě odpovídajících derivátů, kterými jsou kyseliny *p*-hydroxybenzoová (4-hydroxybenzoová), protokatechová (3,4-dihydroxybenzoová), vanilová (4-hydroxy-3-methoxybenzoová) a syringová (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoová). Některé hydroxybenzoové kyseliny, např. salicylová kyselina (2-hydroxybenzoová kyselina), mohou být syntetizovány z meziprojektu šikimátové dráhy (3-dehydrošikimátu) prostřednictvím řady enzymatických reakcí. Deaminace, hydroxylace a methylace jsou tři hlavní reakce, účastníci se tvorby fenolických kyselin (Robbins, 2003; Shahidi et Naczk, 2003).



Obrázek 10. Schéma biosyntézy fenolických kyselin a dalších fenolických látek. ADH alkoholdehydrogenasa, AT acetyltransferasa, C3H *p*-kumarát 3-hydroxylasa, C4H *trans*-cinamátmonooxygenasa, ECH enoyl-CoA-hydratasa, E4P erythrosa 4-fosfát, F5H ferulát-5-hydroxylasa, OMT *o*-methyl-transferasa, PAL fenylalaninamoniak lyasa, PEP fosfoenolpyruvát (upraveno dle Goleniowski et al., 2013).

3.4.3.6 Biologická dostupnost a degradace

Většina fenolických kyselin obsažených v potravě je esterově vázána na polymery buněčných stěn a nemůže být v této komplexní formě vstřebána. Výjimkou je kávová kyselina, která je v potravinách obvykle přítomna jako součást nízkomolekulárního rozpustného esteru, kterým je chlorogenová kyselina (Andreasen et al., 2001).

Pro vstřebání a další přeměny fenolických kyselin v organismu, je nutná aktivita enzymů schopných štěpit esterické vazby (např. cinnamoyl esterasy jsou hydrolasy, které katalyzují hydrolýzu hydroxyskořicových kyselin z jejich estericky vázaných forem). Bylo prokázáno, že esterasy schopné hydrolyzovat tyto vazby jsou distribuovány po celé délce tenkého a tlustého střeva potkanů a lidí. Většina těchto enzymů je mikrobiálního původu, ale mohou být také původu epiteliálního (Mukdsi et al., 2016). Biologická dostupnost fenolických kyselin je významně ovlivněna koncentrací a místem působení těchto enzymů. Prostřednictvím střevních mikrobiálních esteras mohou být z pšeničných otrub uvolňovány vázané kyseliny ferulová, sinapová a *p*-kumarová, za vzniku jejich volných forem, které mohou být následně vstřebány do oběhového systému. V tlustém střevě může být hydrolýza hydroxyskořicových kyselin podpořena dalšími enzymy, jejichž činností dochází k přeměně polymerů buněčných stěn na menší molekuly, což usnadňuje přístup esterasy (Andreasen et al., 2001).

Výsledky některých studií nasvědčují tomu, že fenolické kyseliny jsou v lidském těle metabolizovány velmi rychle (Rechner et al., 2002; Scalbert et al., 2002). Po vstřebání skrz sliznici gastrointestinálního traktu, podléhají fenolické kyseliny konjugačním reakcím (methylaci, sulfataci, glukuronidaci), jež způsobují četné změny jejich výchozích struktur. Tyto reakce jsou katalyzovány specifickými enzymy, které vykazují nejvyšší aktivitu v játrech a ledvinách. Zastoupení a četnost reakcí závisí na charakteru daných fenolických látek a na přijaté dávce (Heleno et al., 2015). Uvedené změny chemických struktur mohou mít za následek nárůst nebo pokles biologické aktivity výchozích látek (Piazzon et al., 2012).

Existuje řada studií, které se zabývají transformací jednotlivých fenolických látek a indentifikací mikroorganismů podílejících se na jejich fermentaci v zažívacím traktu (Andreasen et al., 2001; Mukdsi et al., 2016; Piazzon et al., 2012; Selma et al., 2009). Metabolity nejčastěji produkované střevní mikrobiotou z kyseliny ferulové jsou vanilová kyselina a 3-(4-hydroxyfenyl)-propionová kyselina. Mezi nejvýznamnější metabolity kávové kyseliny patří kyseliny benzoová a 3-(3-hydroxyfenyl)-propionová, tyto také vznikají při metabolismu chlorogenové kyseliny. (Heleno et al., 2015). Podrobné znalosti konjugačních

a metabolických přeměn a výsledných koncentrací fenolických kyselin v krevní plasmě po strávení potravy s vysokým obsahem fenolických látek, jsou zásadní pro pochopení mechanismu jejich bioaktivní funkce (Rechner et al., 2002).

3.4.3.7 Zdravotní prospěšnost

Lidský organismus je velmi náchylný k volným radikálům a reaktivním formám kyslíku, tyto způsobují u člověka závažná onemocnění, jako aterosklerózu a rakovinu (Young et Woodside 2001; Ou et Kwok, 2004). Přestože je převážná část fenolických kyselin estericky vázána k polymerům buněčných stěn rostlin, střevní mikroflóra je schopna tyto vazby štěpit, fenolické kyseliny jsou tak uvolňovány z původních vazeb a stávají se nutričně dostupnými (Verma et al., 2008). Protože mají fenolické kyseliny antimikrobiální účinky, mohou interagovat se střevními mikroorganismy a měnit mikrobiální osídlení zažívacího traktu. Odlišné zdravotní účinky u různých jedinců jsou způsobeny interindividuálními rozdíly ve složení střevní mikrobioty, což ovlivňuje vstřebávání fenolických látek (Selma et al., 2009).

Konzumace stravy bohaté, co do obsahu fenolických kyselin, je spojována s prevencí mnoha chorob, jako je rakovina a kardiovaskulární onemocnění především díky jejich významné antioxidační aktivitě (Abdel-Aal et Rabalski, 2008; Beta et al., 2005; Dykes et Rooney, 2007; Guo et Beta, 2013; Kim et al., 2006; Selma et al., 2009; Verma et al. 2008; Zhang et al., 2018). Hydroxyskořicové kyseliny vykazují *in vitro* chemoprotektivní a antioxidační vlastnosti a je pravděpodobné, že jsou jednou z hlavních příčin příznivých zdravotních účinků stravy s vysokým obsahem vlákniny. Tyto látky mají schopnost zabraňovat oxidačním změnám nízkodenzitních lipoproteinů. Deriváty hydroxyskořicové kyseliny dále vykazují inhibiční účinky proti růstu nádorů a jsou schopny blokovat vznik mutagenních sloučenin, jako jsou nitrosaminy (Andreasen et al., 2001).

Bylo zjištěno, že ferulová kyselina má celou řadu fyziologických funkcí, z nichž nejvýznamnější jsou antioxidační, antimikrobiální, protizánětlivé a protirakovinné účinky (Graf, 1992; Guo et Beta, 2013; Rice-Evans et al., 1996). Jedním z nejlépe prozkoumaných biologických účinků ferulové kyseliny je její antioxidační aktivita. Ferulová kyselina je schopna neutralizovat volné radikály za vzniku relativně stabilních fenoxylových radikálů (Graf, 1992; Verma et al., 2008; Zhao et Moghadasian, 2008). Dokáže tedy pohltit volné radikály bez vzniku dalších oxidačních reakcí (Abdel-Aal et Rabalski, 2013). Ferulová kyselina také zvyšuje aktivitu enzymů antioxidační ochrany a naopak inhibuje aktivitu

enzymů katalyzujících vznik volných radikálů (Ou et Kwok, 2004). Díky těmto účinkům zabraňuje oxidačnímu poškození důležitých biomolekul, jako jsou proteiny, lipidy a DNA. Ferulová kyselina má příznivé účinky pro prevenci či léčbu mnoha onemocnění způsobených oxidačním stresem, jako je Alzheimerova choroba, cukrovka, rakovina, vysoký krevní tlak a ateroskleróza. Podobně jako jiné antioxidační látky snižuje ferulová kyselina koncentraci velmi nízkodenzitního a nízkodenzitního cholesterolu a zvyšuje koncentraci vysokodenzitního cholesterolu v krevní plasmě, čímž snižuje riziko vzniku srdečních onemocnění (Boz, 2015; Kim et al., 2006; Ou et Kwok, 2004).

4 Materiál a metody

4.1 Analyzované vzorky

Pokus byl proveden na osmi vybraných genotypech pšenice (*T.aestivum* L.). Zastoupeny byly čtyři barvy pšeničných zrn (standardní červená, žlutá, purpurová a modrá), od každé barvy byly vybrány dvě různé odrůdy/ šlechtitelské linie (Tabulka 3).

Tabulka 3. Specifikace vybraných genotypů pšenice (*Triticum aestivum* L.).

Odrůda	Forma	Země původu	Status odrůdy	Barva zrna
Bohemia	ozimá	CZE	uznaná odrůda	červená (standardní)
Annie	ozimá	CZE	uznaná odrůda	červená (standardní)
Citrus	ozimá	DEU	uznaná odrůda	žlutý endosperm
Bona Vita	ozimá	SVK	uznaná odrůda	žlutý endosperm
AF Jumiko	ozimá	CZE	uznaná odrůda	purpurový perikarp
Konini	jarní	NZL	uznaná odrůda	purpurový perikarp
V1 131-15	ozimá	CZE	šlechtitelská linie	modrý aleuron
UC 66049	jarní	USA	genetický zdroj	modrý aleuron

4.1.1 Charakteristika stanoviště

Všechny odrůdy byly vypěstovány v roce 2015, v Zemědělském výzkumném ústavu v Kroměříži (firma Agrotest fyto, s.r.o.), v České republice. Odrůdy byly pěstovány na malých experimentálních pozemcích o rozloze 10 m², pomocí konvenčních pěstitelských technik. Parametry experimentálního pole byly následující:

geografická poloha: 284 m n.m., 49° 17' 6,42" s.š., 17° 21' 52,66" v.d.,

půdní typ: černozem,

půdní druh: hlinitá půda

průměrná roční teplota vzduchu: 9,2 °C,

průměrný roční úhrn srážek: 576 mm.

4.2 Použité chemikálie

- demineralizovaná voda, vlastní výroba Simplicity UV (MerckMillipore, KGaA, Darmstadt, Německo)
- methanol (p.a.),
- hydroxid sodný (p.a.),
- chlorovodíková kyselina 35% (p.a.),
- ethylester octové kyseliny (p.a.) od Lachner s.r.o. Neratovice, Česká republika.
- acetonitril (HPLC) a octová kyselina (HPLC) od Lachner s.r.o. Neratovice, Česká republika

4.3 Přístroje a vybavení

- mlýnek IKA A 11 basic Analytical mill (Janke & Kunkel Co., Staufen, Německo)
- analytické váhy s přesností na 3 a 4 desetinná místa (Kern&Sohn GmbH, Německo)
- vortex IKA Basic 3, KG, (Staufen, Německo)
- ultrazvuková lázeň PS 04, (Powersonic-Notus, Ltd., Vrāble, Slovensko)
- centrifuga 5810R, (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- vakuová odparka Rotavapor R-200, (BüchiLabortechnik, AG, Flawil, Švýcarsko)
- třepačka GFL 3006 (Burgwedel, Německo)
- chromatografický systém HPLC, Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
 - vysokotlaká kvartérní pumpa Ultimate 3000
 - autosampler Ultimate 3000
 - detektor diodového pole (DAD) Ultimate 3000
 - termostat kolon Ultimate 3000
- jednorázové plastové kyvety 45 ml, Plastibrand (GmbH, Německo)

- nylonový mikrofiltr (0,45 μm) (SISw, Česká republika)
- pipety Socorex Acura (Švýcarsko)
- běžné laboratorní sklo

4.4 Příprava vzorků k analýze

Extrakce a separace fenolických kyselin byla provedena mírně modifikovanou metodou publikovanou autory Martini et al. (2015).

4.4.1 Příprava vzorku pro stanovení volných fenolických kyselin

Do plastových uzavíratelných kyvet byl navážen cca 1 g homogenizovaného vzorku. Ke vzorku bylo přidáno 10 ml 80% methanolu. Vzorek byl promíchán na vortexu a poté vložen na 10 min do ultrazvukové lázně. Následovalo odstředění vzorku po dobu 10 min při 8000 rpm. Supernatant byl převeden do 25ml odměrné baňky. Proces extrakce byl proveden ještě jednou s dalšími 10 ml 80% methanolu. Spojený extrakt byl doplněn rozpouštědlem po rysku a byl využit pro analýzu volných a konjugovaných fenolických kyselin. Pro stanovení volných fenolických kyselin byla část extraktu přímo přefiltrována přes 0,45 μm nylonový mikrofiltr do skleněných vialek a následně podrobena HPLC/DAD analýze. Zbylý sediment byl použit pro stanovení vázaných fenolických kyselin.

4.4.2 Příprava vzorku pro stanovení konjugovaných fenolických kyselin

Pro stanovení konjugovaných fenolických kyselin bylo odebráno 10 ml extraktu připraveného výše uvedeným způsobem. K extraktu bylo přidáno 10 ml 2 M vodného roztoku hydroxidu sodného. Extrakt byl poté hydrolyzován při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny na třepačce. Po alkalické hydrolyze bylo ke vzorku přidáno 5 ml 4 M kyseliny chlorovodíkové, čímž došlo k okyselení vzorku (pH 1-2) a k zamezení deprotonace molekul fenolických kyselin. Z hydrolyzátu byly odebrány 2 ml do malých 8ml skleněných vialek. Ke 2 ml hydrolyzátu byly přidány 2 ml ethylacetátu, vytvořila se dvoufázová směs. K podpoře přechodu fenolických kyselin do ethylacetátové fáze byly vialky umístěny na 15 min na třepačku. Po následujícím 10 min odstředění (5000 rpm) byla horní ethylacetátová fáze pomocí pipety převedena do nové skleněné vialky. Ke zbylému hydrolyzátu byly přidány další 2 ml ethylacetátu, proces extrakce mezi dvě fáze byl ještě jednou zopakován. Spojený ethylacetátový extrakt byl odpařen pod dusíkem. Suchý extrakt

byl rekonstituován do 1 ml 70% methanolu, přefiltrován přes 0,45 nylonový mikrofiltr do skleněných vialek a ihned analyzován na HPLC/DAD.

4.4.3 Příprava vzorku pro stanovení vázaných fenolických kyselin

Pro stanovení vázaných fenolických kyselin byl sediment, zbylý po extrakci volných a konjugovaných kyselin, sušen při 45 °C do konstantní hmotnosti (7-8 h). Ze suchého residua (rozmělněného v kádince skleněnou tyčinkou) bylo naváženo 0,250 g do plastových uzavíratelných kyvet. Ke vzorku bylo přidáno 14 ml 2 M vodného roztoku hydroxidu sodného. Vzorek byl promíchán na vortexu a poté byl vložen na 10 min do ultrazvukové lázně. Následovala hydrolyza vzorku při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny na třepače. Po alkalické hydrolyze bylo ke vzorku přidáno 7 ml 4 M kyseliny chlorovodíkové do kyselé reakce (pH 1-2). Následovalo odstředění hydrolyzátu po dobu 15 min při 5000 rpm. Ze supernatantu byly odebrány 2 ml do malých 8ml skleněných vialek. Ke 2 ml hydrolyzátu byly přidány 2 ml ethylacetátu, vytvořila se dvoufázová směs. Postup extrakce mezi dvě fáze a příprava vzorku k analýze byly provedeny shodným způsobem jako v případě stanovení konjugovaných fenolických kyselin.

4.5 Chromatografická separace fenolických kyselin metodou HPLC/DAD

Analyty byly separovány pomocí gradientové eluce na koloně Omnispher C18 (250 × 4,6 mm; velikost částic 5 µm; Agilent, Inc., Santa Clara, CA, USA) s použitou předkolonou Microsorb C18, 300A (4,6 × 10 mm, 5 µm; Agilent, Inc., Santa Clara, CA, USA).

- Průtok 0,8 ml/min, teplota kolony 25 °C, teplota autosampleru 10 °C, objem nástřiku 10 µl, detekce při 280 a 325 nm, doba analýzy 36 min.
- Mobilní fáze A: voda s 0,1 % kyseliny octové.
- Mobilní fáze B: acetonitril s 0,1 % kyseliny octové.
- Gradientová eluce: počáteční podmínky: 90 % A 10 % B do 5. minuty, dále do 7. minuty nárůst na 20 % B (80 % A), do 25. minuty nárůst na 75 % B (25 % A), stejné

složení do 30. minuty, do 32. minuty pokles na 10 % B (90 % A), reekvilibrace kolony 4 minuty.

4.5.1 Stanovení *trans*-forem fenolických kyselin

Identifikace *trans*-forem fenolických kyselin byla provedena porovnáním retenčních časů a absorpčních spekter se zakoupenými standardy. Kvantifikace jednotlivých fenolických kyselin byla provedena metodou externí kalibrace (osmi-bodová kalibrace, v koncentračním rozmezí 0,01-20,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Vzorky byly analyzovány vždy ve třech opakováních, naměřené hodnoty jsou vyjádřeny v $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suchého vzorku.

4.5.2 Stanovení *cis*-forem fenolických kyselin

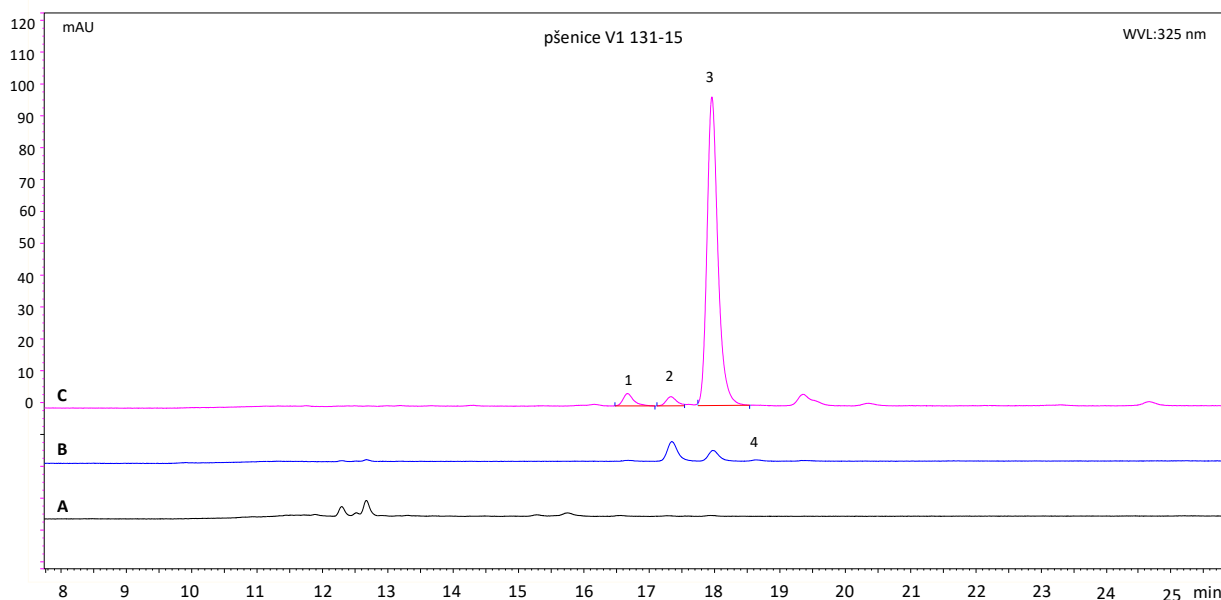
Část kalibračního roztoku použitého pro kvantifikaci *trans*-forem FK byla umístěna pod UV lampu ($\lambda=365$ nm). Po 30 minutách expozice bylo 55 % z celkového množství *trans*-forem převedeno na *cis*-formy daných FK. Pokusem bylo zjištěno, že další expozicí UV záření se již koncentrace *cis*-forem v roztoku nezvyšovala. Z tohoto roztoku byla vytvořena alternativní kalibrační sada pro *cis*-formy FK, přičemž jejich přesná koncentrace byla vypočítána z poklesu ploch chromatografických píků příslušných *trans*-forem FK.

4.6 Statistické zhodnocení naměřených dat

Naměřená data byla zpracována pomocí programů Chromeleon (ThermoFisherScientific, Inc., Waltham, MA, USA) a Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA). V programu Statistica (ver. 12; StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) bylo provedeno statistické zhodnocení metodou analýzy rozptylu jednoduchého třídění, na hladině významnosti $\alpha=0,05$. K podrobnějšímu vyhodnocení byl zvolen Tukeyův test.

5 Výsledky

Pro analýzu byla použita zrna osmi vybraných genotypů pšenice (*T. aestivum* L.). V jednotlivých odrůdách byl sledován obsah celkových fenolických kyselin a zastoupení jednotlivých frakcí FK rozpustných volných, rozpustných konjugovaných a nerozpustných vázaných forem. Dále byly hodnoceny profily analyzovaných genotypů z hlediska zastoupení jednotlivých FK. Fenolické kyseliny byly měřeny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie sespektrofotometrickou detekcí (HPLC/DAD). Na obrázku 11 je uveden příklad chromatogramu šlechtitelské linie V1 131-15. Naměřené výsledky jsou vyjádřeny jako průměrné hodnoty stanovené ze třech opakování. Na obrázcích 13 a 14 jsou zobrazeny směrodatné odchylky formou chybových úseček. Písmena v tabulce 4 a na obrázcích 13 a 14 označující průkazné diference se vztahují k hodnocení vlivu odrůdy (Přílohy 1-4), barvy (Příloha 5) a pěstební formy (Příloha 6) na obsah FK.



Obrázek 11. Chromatogram šlechtitelské linie V1-131-15 zaznamenaný detektorem s diodovým polem (DAD) při vlnové délce 325 nm.

A. volné FK, B. konjugované FK, C. vázané FK,

1. *p*-kumarová k. 16,7 min., 2. *trans*-sinapová k. 17,4 min., 3. *trans*-ferulová k. 17,9 min., 4. *cis*-sinapová k. 18,6 min. Píky odpovídající ostatním stanoveným fenolickým kyselinám nejsou v chromatogramu označeny, jelikož byly detekovány při jiné vlnové délce (280 nm), jsou to: vanilová k. 13,4min., *cis*-ferulová k. 19,4 min. a 4-*h*- benzoová k. 12,7 min.

Celkový průměrný obsah fenolických kyselin v rámci všech analyzovaných genotypů ze sklizně 2015 činil $723 \pm 45,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny. Nejvyšší celkový obsah FK byl naměřen ve šlechtitelské linii V1 131-15 s modrým aleuronem ($825 \pm 17,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.). Vysoké koncentrace celkových FK byly dále zjištěny také v pšenících AF Jumiko ($734 \pm 12,8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.), Citrus ($732 \pm 43,6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.), Bohemia ($726 \pm 28,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.) a UC 66049 ($700 \pm 28,7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.). Naopak nejnižším celkovým obsahem FK se vyznačovala odrůda Annie s červeným zrnem ($677 \pm 19,4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.). Majoritní podíl z celkového obsahu FK 88,5 % (Bohemia) až 93,2 % (UC 66049) představovala frakce nerozpustných vázaných kyselin, průměrně pak činila 91,1 %. Podstatně nižšího zastoupení dosáhly konjugované a volné kyseliny, jež představovaly pouze 8,5 % a 0,4 % z celku. (Tabulka 4).

Tabulka 4. Obsah fenolických kyselin v jednotlivých genotypch.

	volné FK ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	% z celku	konjugované FK ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	% z celku	vázané FK ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	% z celku	celkové FK ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
Bohemia	$1,38 \pm 0,22^d$	0,2	$82,3 \pm 1,15^a$	11,3	$643 \pm 27,5^{ab}$	88,5	$726 \pm 28,3^{ab}$
Annie	$1,68 \pm 0,16^d$	0,2	$54,2 \pm 0,79^{de}$	8,0	$621 \pm 18,7^b$	91,7	$677 \pm 19,4^b$
Citrus	$2,78 \pm 0,30^c$	0,4	$61,5 \pm 3,15^{cd}$	8,4	$668 \pm 46,9^{ab}$	91,2	$732 \pm 43,6^{ab}$
Bona Vita	$1,65 \pm 0,18^d$	0,2	$62,2 \pm 2,15^c$	8,9	635 ± 103^{ab}	90,9	699 ± 105^b
AF Jumiko	$4,00 \pm 0,03^b$	0,5	$67,7 \pm 2,44^{bc}$	9,2	$662 \pm 10,5^{ab}$	90,2	$734 \pm 12,8^{ab}$
Konini	$1,84 \pm 0,03^d$	0,3	$52,7 \pm 4,81^e$	7,6	$639 \pm 27,1^{ab}$	92,1	$693 \pm 22,3^b$
V1131-15	$3,64 \pm 0,24^b$	0,4	$70,3 \pm 2,05^b$	8,5	$751 \pm 16,8^a$	91,0	$825 \pm 17,3^a$
UC 66049	$5,46 \pm 0,36^a$	0,8	$42,1 \pm 0,94^f$	6,0	$652 \pm 28,4^{ab}$	93,2	$700 \pm 28,7^{ab}$
průměr	$2,80 \pm 1,45$	0,4	$61,6 \pm 12,3$	8,5	$658 \pm 40,1$	91,1	$723 \pm 45,9$

Nejvyšší obsahy vázaných FK byly naměřeny u vzorků V1 131-15 ($751 \pm 16,8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.), Citrus ($668 \pm 46,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.), AF Jumiko ($662 \pm 10,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.) a UC 66049 ($652 \pm 28,4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.). Statisticky významný rozdíl v obsahu vázaných FK byl zjištěn pouze mezi odrůdami V1 131-15 a Annie, mezi ostatními odrůdami prokázán nebyl (Příloha 2).

Průměrné množství konjugovaných FK činilo $61,6 \pm 12,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš., významně vyšší obsah byl zjištěn v červené pšenici Bohemia ($82,3 \pm 1,15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.). Naproti tomu podstatně nižších hodnot dosáhla modrá pšenice UC 66049 ($42,1 \pm 0,94 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.).

Nejvyšší obsah volných FK byl zaznamenán v modrých pšenících UC 66049 ($5,46 \pm 0,36 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.) a V1 131-15 ($3,64 \pm 0,24 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.). Naopak nejnižší množství

volných FK bylo stanoveno v pšenících s červeným zrnem Annie ($1,68 \pm 0,16 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.) a Bohemia ($1,38 \pm 0,22 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.) či ve žluté pšenici Bona Vita ($1,65 \pm 0,18 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.).

5.1 Profily fenolických kyselin

Zastoupení jednotlivých fenolických kyselin testovaných odrůd je pomocí výsečových grafů zobrazeno na obrázku 12.

5.2 Volné

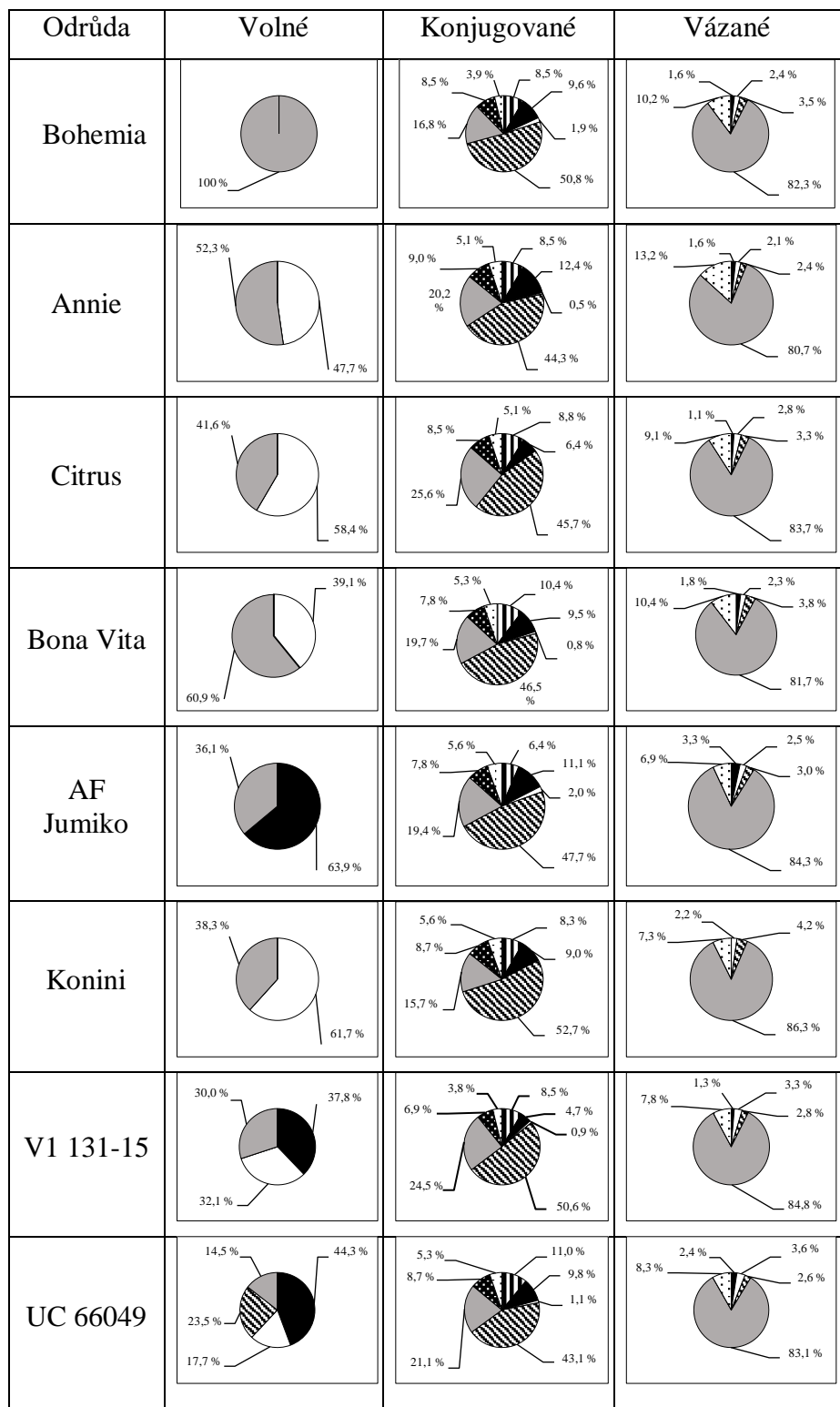
Z volných FK byla nejhojněji zastoupena ferulová kyselina (46,7 %; $0,71 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.). Kromě odrůd Bohemia a AF Jumiko byla ve všech genotypech identifikována také *p*-kumarová kyselina (42,8 %; $1,14 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.). V pšenících AF Jumiko, V1 131-15 a UC 66049 byly naměřeny vyšší hodnoty vanilové kyseliny ($1,38 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.; $2,41 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš. a $2,46 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.). V odrůdě AF Jumiko tvořila vanilová kyselina majoritní podíl (63,1 %), ferulová kyselina 36,1 %. Ve vzorku UC 66049 byla zastoupena také sinapová kyselina (23,5 %; $1,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.). Nejvíce rozmanitý profil volných FK byl nalezen u pšenice UC 66049, kde byly identifikovány kyseliny ferulová, *p*-kumarová, vanilová a sinapová. Ve většině testovaných odrůd byl profil volných FK složen z kyselin ferulové a *p*-kumarové. Výjimkou byla odrůda Bohemia, ve které byla detekována pouze ferulová kyselina.

5.3 Konjugované

Z konjugovaných FK bylav největším množství přítomna sinapová kyselina (47,7 %), která byla doprovázena významným podílem ferulové kyseliny (20,4 %). Dále byly v menší míře zastoupeny kyseliny: vanilová (9,1 %), *p*-hydroxybenzoová (8,8 %), *cis*-sinapová (8,2 %), *cis*-ferulová (5,0 %) a *p*-kumarová (0,9 %). Nejvyšší obsahy sinapové kyseliny byly zjištěny ve vzorcích Bohemia ($41,8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.), V1 131-15 ($35,6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.) a AF Jumiko ($32,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.), naproti tomu nejnižší hodnoty byly naměřeny v pšenici UC 66049 ($18,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.). Ferulová kyselina, v rámci konjugovaných kyselin druhá nejhojněji zastoupená kyselina, byla v největším množství nalezena v obilkách pšenic V1 131-15 ($17,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.) a Citrus ($15,7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.), v nejmenším množství naopak v odrůdě Konini ($8,25 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.).

5.4 Vázané

Majoritní podíl vázaných FK byl ve všech analyzovaných odrůdách tvořen ferulovou kyselinou, jejíž průměrná hodnota byla stanovena na 83,4 % (549 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.). Největší koncentrace vázané ferulové kyseliny byla naměřena v pšenici V1 131-15 (638 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.). Dále byly ve všech pšenicích identifikovány kyseliny *cis*-ferulová, *p*-kumarová, sinapová a vanilová, z nichž nejvíce zastoupena byla *cis*-ferulová kyselina, přítomna v průměrném množství 60 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš. (9,2 %). Kyseliny sinapová a *p*-kumarová byly obsaženy ve srovnatelném množství (kolem 3 %), s mírnou převahou sinapové kyseliny ve většině odrůd. Výjimku tvořily pšenice V1 131-15 a UC 66049, ve kterých byl ve srovnání se sinapovou kyselinou stanoven větší podíl *p*-kumarové kyseliny. Ze všech sledovaných vázaných FK bylo nejmenší procentické zastoupení všech odrůd tvořeno vanilovou kyselinou (0,9 %), přičemž odrůda Konini vůbec vanilovu kyselinu ve vázané formě neobsahovala.

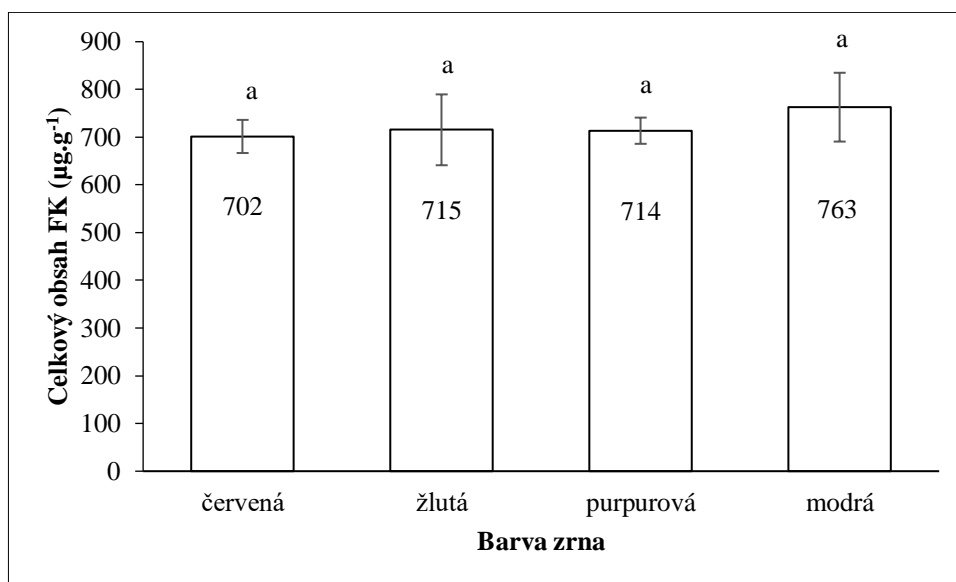


▨ 4-h-benzoová ■ vanilová □ p-kumarová ▩ sinapová ◻ ferulová ▨ cis-sinapová ▧ cis-ferulová

Obrázek 12. Profily fenolických kyselin v jednotlivých genotypech.

5.5 Vliv barvy zrna na obsah fenolických kyselin

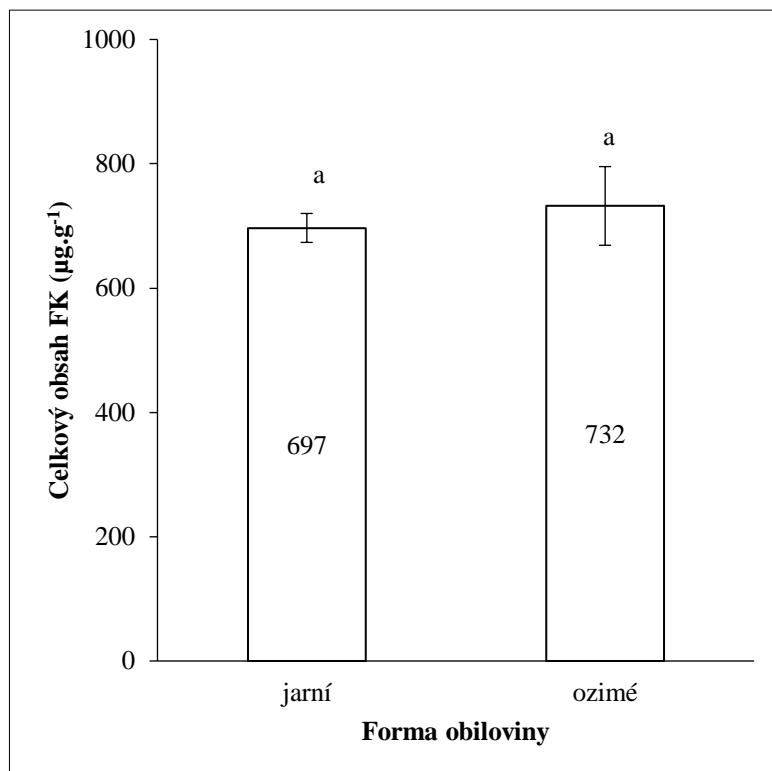
V rámci pokusu byly sledovány rozdíly v obsahu fenolických kyselin mezi čtyřmi typy pšenice s různým zbarvením zrna. Každá barva byla zastoupena dvěma odrůdami, standardní červené pšenice (Bohemia, Annie), pšenice se žlutým endospermem (Citrus, Bona Vita), s purpurovým perikarpem (AF Jumiko, Konini) a modrým aleuronem (V1 131-15, UC 66049). Nejvyšší schopnost syntetizovat fenolické kyseliny vykazovaly modré odrůdy, purpurové odrůdy byly srovnatelné se žlutými. Nejnižší celkový obsah FK byl stanoven u standardních červených odrůd. Významný vliv barvy zrna na obsah fenolických kyselin však nebyl statisticky prokázán (Obrázek 13; Příloha 5).



Obrázek 13. Celkový obsah fenolických kyselin dle barvy zrna.

5.6 Vliv pěstební formy na obsah fenolických kyselin

Do pokusu byly zařazeny dvě jarní odrůdy pšenice (Konini, UC 66049), zbylých šest odrůd byly formy ozimé. Ozimé formy vykazovaly vyšší obsah celkových FK, který ale nebyl vyhodnocen jako statisticky průkazný (Obrázek 14; Příloha 6).



Obrázek 14. Celkový obsah fenolických kyselin dle formy obiloviny.

6 Diskuse

V analyzovaných vzorcích pšeníc (dohromady 8 genotypů čtyř různých barev zrna) bylo identifikováno celkem pět typů fenolických kyselin. Z kyselin odvozených od hydroxybenzoové kyseliny jsou to 4-hydroxy-benzoová a vanilová kyselina, dále pak fenolické kyseliny, které jsou deriváty hydroxyskořicové kyseliny: *p*-kumarová, sinapová a ferulová kyselina. Ve vzorcích byly identifikovány také *cis*-formy kyselin sinapové a ferulové.

Celkový obsah fenolických kyselin v zrně byl stanoven jako součet jednotlivých stanovovaných frakcí (rozpuštěné volné, rozpuštěné konjugované a nerozpuštěné vázané). Průměrný celkový obsah fenolických kyselin napříč zkoumanými genotypy činil 723 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny.

Tradiční červené pšenice dosáhly celkového průměrného obsahu fenolických kyselin 702 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš., což je téměř o 30 % více ve srovnání s výsledky, jež publikovali například Zuchowski et al. (2011), průměrně 547 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny. Srovnatelné hodnoty uvádí Li et al. (2008), průměrně 676 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny. Autoři Fernandez-Orozco et al. (2010) dospěli k poněkud vyšším hodnotám v rozmezí 728-900 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny.

Relativně vyšším celkovým obsahem fenolických kyselin se dle našich výsledků vyznačují pšenice s modrým aleuronem (763 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.), zatímco pšenice s purpurovým perikarpem (714 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.) či žlutým endospermem (715 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.) dosáhly hodnot srovnatelných s klasickými červenými pšenicemi. Rozdíly v celkovém obsahu fenolických kyselin mezi sledovanými barevnými typy pšeníc nebyly po vyhodnocení shledány statisticky průkaznými, což bylo pravděpodobně zapříčiněno malým počtem sledovaných genotypů. V dostupné vědecké literatuře nebylo nalezeno dostatečné množství informací o fenolických kyselinách obsažených v ostatních typech pšeníc (s netradiční barvou zrna), které by byly porovnatelné s našimi výsledky. Tyto pšenice byly doposud studovány zejména pro svůj obsah anthokyanových barviv, která jsou zodpovědná za modré a purpurové zbarvení obalových vrstev zrna (Zhang et al., 2018). Publikovány byly pouze výsledky analýz jednotlivých částí zrna: otruby, aleuronová vrstva, perikarp či endosperm (Li et al., 2005; Ndolo et al., 2013; Ma et al., 2016; Zhang et al., 2018).

Na celkovém obsahu fenolických kyselin v pšeničném zrně se podílejí tři odlišné frakce. Jsou to rozpuštěné volné, rozpuštěné konjugované a nerozpuštěné vázané fenolické kyseliny. Volné a konjugované kyseliny jsou extrahovatelné do polárních rozpouštědel, přičemž konjugáty lze působením hydroxidů hydrolyzovat a docílit tak uvolnění samotné

fenolické kyseliny. Pro uvolnění nerozpustných vázaných fenolických kyselin je třeba hydrolyzační činidlo aplikovat přímo na obilnou matici.

Průměrný obsah vázaných FK činil $658 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš., což se velmi dobře shoduje s výsledky studií autorů Zhanga et al. (2012) ($662 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.) i Wanga et al. (2013) ($657 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.). Nižší hodnoty pak uvádí Yilmaz et al. (2015) ($483 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.). Naopak podstatně vyšší obsahy zjistili Ma et al. (2016) u pšenice s purpurovým zrnem ($911 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.), což námi analyzované purpurové pšenice převyšuje o čtvrtinu ($714 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.).

Konjugované FK byly nalezeny v průměrném množství $61,6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš., čímž převyšovaly hodnoty autorů Yilmaze et al. (2015) ($50,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.) a Brandolini et al. (2013) ($42,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.). Až trojnásobně vyšší obsah konjugovaných FK ($173,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.) zaznamenali autoři Li et al. (2008).

Celkový obsah volných fenolických kyselin činil průměrně $2,80 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš., což je výrazně méně v porovnání s průměrnými hodnotami ozimé pšenice $16,65 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš. a $11,00 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš., které uvádějí autoři Zhang et al. (2012) a Li et al. (2008).

Z hlediska celkového obsahu fenolických kyselin byl sledován rozdíl mezi ozimými a jarními formami pšenice (analyzováno bylo 6 vzorků pšenice ozimých a 2 vzorky pšenice jarní). Výsledky našich analýz ukazují, že ozimé formy dosahují průměrně o 5 % vyšších hodnot obsahu fenolických kyselin oproti formám jarním (732 oproti $697 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.). To svými výsledky potvrdili také autoři Adom et al. (2003) (418 oproti $398 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.). O 8 % vyšší průměrný obsah fenolických kyselin v ozimých pšenicích v porovnání s jarními (665 proti $697 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.) zaznamenali také autoři Li et al. (2008). Naproti tomu Zuchowski et al. (2011) uvádí průměrný obsah fenolických kyselin v jarních formách o 6 % vyšší v porovnání s ozimými (582 oproti $547 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.).

Vázané FK představovaly průměrně 91,1 % z celkového obsahu, podstatně menší množství fenolických kyselin se v zrně nacházelo ve formě různých konjugátů (8,5 %) a jen velmi nepatrný podíl tvořily kyseliny volné (0,4 %). Tím se naše výsledky dobře shodují s hodnotami, které uvádějí například Martini et al. (2015) (vázané FK 86,1 %, konjugované 13,5 % a volné 0,4 %). Poněkud vyšší podíl konjugovaných fenolických kyselin pak uvádí Li et al. (2008) (vázané 77 %, konjugované 22 % a volné 1 %) nebo Fernandez-Orozco et al. (2010) (vázané 79,3 %, konjugované 19,2 % a volné 0,5 %).

Vázané FK jsou esterovými, etherovými či acetalovými vazbami poutány na celulosu, lignin nebo další vysokomolekulární látky např. proteiny a flavonoidy (Gao et al., 2017). V obilovinách se v takovéto podobě nejvíce vyskytuje ferulová kyselina. Dle našich analýz

představovala průměrně 83,4 %. Následovala *cis*-ferulová kyselina s průměrným zastoupením 9,2 %. Zcela dominantní postavení ferulové kyseliny v rámci vázaných fenolických kyselin potvrzují svými výsledky i mnozí jiní autoři. Dle Martini et al. (2015) a Zuchowskiho et al. (2011) představuje ferulová kyselina 89,7 % a 87,6 % z celkového obsahu vázaných FK. Brandolini et al. (2013) uvádí zastoupení ferulové kyseliny dokonce až 94,9 %.

V menší míře zastoupené konjugované FK představují skupinu fenolických kyselin vázaných s cukry, jinými organickými kyselinami nebo steroly či terpeny (Kim et al., 2006). Ve frakci konjugovaných FK převažovala sinapová kyselina, jež tvořila téměř polovinu z celkového obsahu (průměrně 47,7 %). Sinapová kyselina byla doprovázena ferulovou kyselinou (20,4 %). Tento profil je v těsné shodě s výsledky autorů Fernandez-Orozca et al. (2010), kde sinapová a ferulová kyselina představovaly průměrně 49,9 % a 20,7 %. K podobným výsledkům došli taktéž Martini et al. (2015), podle kterých kyseliny sinapová a ferulová představovaly 64,2 % a 20,9 %.

Volné FK, které představují pouze minoritní podíl rostlinných fenolických kyselin, byly zastoupeny zejména ferulovou (46,7 %) a *p*-kumarovou kyselinou (32,1 %). V menším množství pak byla obsažena vanilová kyselina (18,3 %). Docela odlišný profil volných FK v tvrdé pšenici uvádí autoři Martini et al. (2015), kteří v této frakci vyhodnotili jako dominantní vanilovou kyselinu (34,1 %), jež byla doprovázena ferulovou kyselinou (32,5 %).

7 Závěr

V rámci praktické části diplomové práce, byla optimalizována metoda extrakce pro stanovení třech frakcí fenolických kyselin přítomných v obilovinách: volných, konjugovaných a vázaných (cíl č. 1). Následně byla optimalizována metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie se spektrofotometrickou detekcí (HPLC/DAD) pro separaci a identifikaci jednotlivých fenolických kyselin. S pomocí těchto metod, byl proveden podrobný screening fenolických kyselin v různých genotypech standardních červených i netradičně zbarvených pšenic (žlutých, modrých a purpurových).

V analyzovaných genotypech byl zjištěn obsah a zastoupení jednotlivých forem FK (cíl č. 2). Nerozpustné vázané formy představují majoritní podíl z celkového obsahu FK (91,1 %; hypotéza č. 1). Většina sledovaných genotypů nebyla, co do celkového obsahu FK, vzájemně statisticky odlišná. Výjimku tvořila pouze pšenice V1 131-15 s modrým aleuronem, jež dosáhla významně vyšších hodnot (825 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.) (hypotéza č. 2; cíl č. 3).

Modré odrůdy vykazovaly největší schopnost syntetizovat fenolické kyseliny (763 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.), purpurové odrůdy (715 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.) byly srovnatelné se žlutými (714 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.). Ve standardních červených pšenicích byl stanoven nejnižší celkový obsah FK (702 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suš.). Významný vliv barvy zrna na obsah fenolických kyselin však nebyl statisticky prokázán (hypotéza č. 3).

Ozimé formy pšenic se vyznačují mírně vyššími celkovými obsahy FK oproti formám jarním (o cca 5 %), avšak ani tento rozdíl nebyl statisticky průkazný (hypotéza č. 4; cíl č. 4).

8 Seznam literatury

- Abdel-Aal, E. S. M., Rabalski, I. 2008. Bioactive compounds and their antioxidant capacity in selected primitive and modern wheat species. *Open Agriculture Journal*, 2, 7-14.
- Abdel-Aal, E. S. M., Rabalski, I. 2013. Effect of baking on free and bound phenolic acids in wholegrain bakery products. *Journal of Cereal science*, 57(3), 312-318.
- Adom, K. K., Sorrells, M. E., Liu, R. H. 2003. Phytochemical profiles and antioxidant activity of wheat varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26), 7825-7834.
- Andreasen, M. F., Kroon, P. A., Williamson, G., Garcia-Conesa, M. T. 2001. Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5679-5684.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183-198.
- Arentz-Hansen, H., Mcadam, S. N., Molberg, Ø., Fleckenstein, B., Lundin, K. E., Jørgensen, T. J., Sollid, L. M. 2002. Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology*, 123(3), 803-809.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191-203.
- Belderok, B., Mesdag, J., Donner, D. A. 2000. Bread-making quality of wheat: a century of breeding in Europe. Springer US, 416 s., ISBN: 978-94-017-0950-7.
- Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P. 2009. Cereals and cereal products In: *Food Chemistry*. Springer US, 745s., ISBN: 978-3-540-669934-7.
- Beta, T., Nam, S., Dexter, J. E., Sapirstein, H. D. 2005. Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal Chemistry*, 82(4), 390-393.
- Blackwood, A. D., Salter, J., Dettmar, P. W., Chaplin, M. F. 2000. Dietary fibre, physicochemical properties and their relationship to health. *The journal of the Royal Society for the Promotion of Health*, 120(4), 242-247.
- Boz, H. 2015. Ferulic Acid in Cereals -a Review. *Czech Journal of Food Science*, 33(1), 1-7.
- Brandolini, A., Castoldi, P., Plizzari, L., Hidalgo, A. 2013. Phenolic acids composition, total polyphenols content and antioxidant activity of *Triticum monococcum*, *Triticum*

- turgidum* and *Triticum aestivum*: a two-years evaluation. *Journal of Cereal Science*, 58(1), 123-131.
- Burešová, V., Kopecký, D., Bartoš, J., Martinek, P., Watanabe, N., Vyhnánek, T., Doležel, J. 2015. Variation in genome composition of blue-aleurone wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(2), 273-282.
- Clifford, M. 2001. Appendix 1: A nomenclature for phenols with special reference to tea. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 41(5), 393-397.
- Cook, N. C., Samman, S. 1996. Flavonoids - chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(2), 66-76.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N. G. 2000. Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 24, 1250-1319.
- Dai, J., Mumper, R. J. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- D'Archivio, M., Filesì, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., Masella, R. 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali Istituto Superiore di Sanità*, 43(4), 348-361.
- Davies, K. J. 1995. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. In *Biochemical Society Symposia*, 61, 1-31.
- Dykes, L., Rooney, L.W. 2007. Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. *Cereal Foods World*, 52(3), 105-111
- Eliasson, A. C., Eliasson, K. C., Larsson, K., Quaglia, G. N. A. 1993. Cereals in breadmaking: a molecular colloidal approach. *Food Science and Technology*, 664(6), 363-370.
- FAO. World food situation: FAO cereal supply and demand brief [online]. Food and Agriculture Organization. 2017 [cit. 2017-12-15]. Dostupné z <<http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/>>.
- Fernandez de Simon, B., Perez-Illarbe, J., Hernandez, T., Gomez-Cordoves, C., Estrella, I. 1992. Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(9), 1531-1535.
- Fernandez-Orozco, R., Li, L., Harflett, C., Shewry, P. R., Ward, J. L. 2010. Effects of environment and genotype on phenolic acids in wheat in the HEALTHGRAIN diversity screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9341-9352.
- Gajdošová, A., Šturdík, E. 2004. Biologické, chemické a nutrično-zdravotné charakteristiky pekářských cereálií. *Nova Biotechnologica*, 4(1), 133-154.

- Gani, A., Wani, S. M., Masoodi, F. A., Hameed, G. 2012. Whole-grain cereal bioactive compounds and their health benefits: a review. *Journal of Food Processing and Technology*, 3(3), 146-56.
- Gao, Y., Ma, S., Wang, M., Feng, X. Y. 2017. Characterization of free, conjugated, and bound phenolic acids in seven commonly consumed vegetables. *Molecules*, 22(11), 1878.
- Garg, M., Chawla, M., Chunduri, V., Kumar, R., Sharma, S., Sharma, N. K., Singh, S. P. 2016. Transfer of grain colors to elite wheat cultivars and their characterization. *Journal of Cereal Science*, 71, 138-144.
- Goesaert, H., Brijs, K., Veraverbeke, W. S., Courtin, C. M., Gebruers, K., Delcour, J. A. 2005. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science and Technology*, 16(1), 12-30.
- Goleniowski, M., Bonfill, M., Cusido, R., Palazón, J. 2013. Phenolic acids. In *Natural Products*. Springer Berlin Heidelberg, s. 1951-1973, ISBN: 978-3-642-22144-6
- Gülçin, I. 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86(3), 345-391.
- Guo, W., Beta, T. 2013. Phenolic acid composition and antioxidant potential of insoluble and soluble dietary fibre extracts derived from select whole-grain cereals. *Food Research International*, 51(2), 518-525.
- Graf, E. 1992. Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 13(4), 435-448.
- Halbwirth, H. 2010. The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2), 595-621.
- Halliwel, B., Murcia, M. A., Chirico, S., Aruoma, O. I. 1995. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(1-2), 7-20.
- Halliwel, B. 1996. Commentary oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free radical research*, 25(1), 57-74.
- Havrlentová, M., Pšenáková, I., Žofajová, A., Rückschloss, L., Kraic, J. 2014. Anthocyanins in wheat seed - A mini review. *Nova Biotechnologica et Chimica*, 13(1), 1-12.
- Havsteen, B. 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical pharmacology*, 32(7), 1141-1148.

- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572-584.
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R., Ferreira, I. C. 2015. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food chemistry*, 173, 501-513.
- Himi, E., Noda, K. 2005. Red grain colour gene (R) of wheat is a Myb-type transcription factor. *Euphytica*, 143(3), 239-242.
- Hoseney, R. C. 1994. Principles of cereal science and technology. Second Edition. American Association of Cereal Chemists (AACC). 378 s., ISBN: 0913250791.
- Howitt, C. A., Pogson, B. J. 2006. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, cell and environment*, 29(3), 435-445.
- Kandil, A., Li, J., Vasanthan, T., Bressler, D. C. 2012. Phenolic acids in some cereal grains and their inhibitory effect on starch liquefaction and saccharification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(34), 8444-8449.
- Karásek, F., Mrkvicová, E., Šťastník, O., Trojan, V., Vyhnánek, T., Hřivna, L., Mrázková, E. 2014. The influence of colored wheat Konini feeding on antioxidant activity parameters in rats. In *Proceeding of the International PhD Student Conference MendelNet2014*. Brno: Mendel University in Brno, 160-162.
- Kent, N. L. 1994. *Kent's Technology of Cereals: An introduction for students of food science and agriculture*. Elsevier, 334 s., ISBN: 008029801X.
- Kim, K. H., Tsao, R., Yang, R., Cui, S. W. 2006. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*, 95(3), 466-473.
- King, A. M. Y., Young, G. 1999. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, 99(2), 213-218.
- Kniewel, D. C., Abdel-Aal, E. S., Rabalski, I., Nakamura, T., Hucl, P. 2009. Grain color development and the inheritance of high anthocyanin blue aleurone and purple pericarp in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Cereal Science*, 50(1), 113-120.
- Koehler, P., Wieser, H. 2013. Chemistry of cereal grains. In: *Handbook on sourdough biotechnology*. Springer US, s. 11-45, ISBN: 978-1-4614-5425-0.
- Kucek, L. K., Veenstra, L. D., Amnuaycheewa, P., Sorrells, M. E. 2015. A grounded guide to gluten: how modern genotypes and processing impact wheat sensitivity. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(3), 285-302.

- Kumar, N., Pruthi, V. 2014. Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*, 4, 86-93.
- Laddomada, B., Caretto, S., Mita, G. 2015. Wheat bran phenolic acids: Bioavailability and stability in whole wheat-based foods. *Molecules*, 20(9), 15666-15685.
- Lachman, J., Orsák, M., Pivec, V. 2000. Antioxidant contents and composition in some vegetables and their role in human nutrition. *Zahradnictví (Horticultural Science)*, 27(2), 65-78.
- Lachman, J., Hamouz, K., Orsák, M. 2005. Červeně a modře zbarvené brambory: Významný zdroj antioxidantů v lidské výživě. *Chemické listy*, 99(7), 474-482.
- Lachman, J., Martinek, P., Kotíková, Z., Orsák, M., Šulc, M. 2017. Genetics and chemistry of pigments in wheat grain - A review. *Journal of Cereal Science*, 74, 145-154.
- Li, W., Shan, F., Sun, S., Corke, H., Beta, T. 2005. Free radical scavenging properties and phenolic content of Chinese black-grained wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8533–8536.
- Li, L., Shewry, P. R., Ward, J. L. 2008. Phenolic acids in wheat varieties in the HEALTHGRAIN diversity screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9732-9739.
- Liu, R. H. 2007. Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, 46(3), 207-219.
- Liyana-Pathirana, C. M., Shahidi, F. 2007. The antioxidant potential of milling fractions from breadwheat and durum. *Journal of Cereal Science*, 45(3), 238-247.
- Lo, H. H., Chung, J. G. 1999. The effects of plant phenolics, caffeic acid, chlorogenic acid and ferulic acid on arylamine N-acetyltransferase activities in human gastrointestinal microflora. *Anticancer research*, 19(1A), 133-139.
- Ma, D., Li, Y., Zhang, J., Wang, C., Qin, H., Ding, H., Xie, Y., Guo, T. 2016. Accumulation of phenolic compounds and expression profiles of phenolic acid biosynthesis-related genes in developing grains of white, purple, and red wheat. *Frontiers in Plant Science*, 7, 528.
- Maeda, H., Dudareva, N. 2012. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annual review of Plant Biology*, 63, 73-105.
- Mandal, S. M., Chakraborty, D., Dey, S. 2010. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signaling and Behavior*, 5(4), 359-368.

- Mares, D., Mrva, K., Cheong, J., Williams, K., Watson, B., Storlie, E., Zou, Y. 2005. A QTL located on chromosome 4A associated with dormancy in white-and red-grained wheats of diverse origin. *Theoretical and Applied Genetics*, 111(7), 1357-1364.
- Martinek, P., Coufalová, O., Kurečka, R., Nováková, E., Mikulcová, J. 2006. Netradiční barva obiliek pšenice (*Triticum aestivum*, L.), její genetická podmíněnost a možnost využití v potravinářství. Nové poznatky z genetiky a šlechtění polnohospodářských rostlin, 13, 95-98.
- Martini, D., Taddei, F., Ciccoritti, R., Pasquini, M., Nicoletti, I., Corradini, D., D'Egidio, M. G. 2015. Variation of total antioxidant activity and of phenolic acid, total phenolics and yellow coloured pigments in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) as a function of genotype, crop year and growing area. *Journal of Cereal Science*, (65), 175-185.
- Mathew, S., Abraham, T. E. 2004. Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 24(2-3), 59-83.
- Mukdsi, M. A., Argañaraz Martínez, E., Chaia, A. P., Medina, R. B. 2016. Feruloyl esterase activity is influenced by bile, probiotic intestinal adhesion and milk fat. *Beneficial microbes*, 7(4), 597-607.
- Ndolo, V. U., Beta, T., Fulcher, R. G. 2013. Ferulic acid fluorescence intensity profiles and concentration measured by HPLC in pigmented and non-pigmented cereals. *Food Research International*, 52(1), 109-118.
- Ou, S., Kwok, K. C. 2004. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(11), 1261-1269.
- Paulová, H., Bochořáková, H., Táborská, A. 2004. Metody stanovení antioxidantní aktivity přírodních latek in vitro. *Chemické listy*, 98(4), 174-179.
- Piazzon, A., Vrhovsek, U., Masuero, D., Mattivi, F., Mandoj, F., Nardini, M. 2012. Antioxidant activity of phenolic acids and their metabolites: synthesis and antioxidant properties of the sulfate derivatives of ferulic and caffeic acids and of the acyl glucuronide of ferulic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(50), 12312-12323.
- Pláteník, J. 2009. Volné radikály, antioxidanty a stárnutí. *Interní medicína pro praxi*, 11(1), 30-33.

- Primo-Martin, C., Van Nieuwenhuijzen, N. H., Hamer, R. J., Van Vliet, T. 2007. Crystallinity changes in wheat starch during the bread-making process: starch crystallinity in the bread crust. *Journal of Cereal Science*, 45(2), 219-226.
- Prugar, J., Polišenská, I., Dostálová, J., Hajšlová, J., Hrubý, J., Kalač, P., Vaculová, P. 2008. Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. Tisíciletí. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský ve spolupráci s Komisí jakosti rostlinných produktů ČZV, 327 s., ISBN 978-80-86576-28-2.
- Příhoda, J., Skřivan, P., Hrušková, M. 2004. Cereální chemie a technologie I: cereální chemie, mlýnská technologie, technologie výroby těstovin. Praha: VŠCHT, 203 s., ISBN 80-7080-530-7.
- Racek, J., Holeček, V. 1999. Enzymy a volné radikály. *Chemické listy*, 93, 774-780.
- Rechner, A. R., Kuhnle, G., Bremner, P., Hubbard, G. P., Moore, K. P., Rice-Evans, C. A. 2002. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(2), 220-235.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.
- Robbins, R. J. 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2866-2887.
- Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., Rémésy, C. 2002. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 56(6), 276-282.
- Selma, M. V., Espin, J. C., Tomas-Barberan, F. A. 2009. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 6485-6501.
- Shahidi, F., Janitha, P. K., Wanasundara, P. D. 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32(1), 67-103.
- Shahidi, F., Naczk, M. 2003. Phenolics in food and nutraceuticals. CRC press. 558 s., ISBN: 1587161389.
- Sies, H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2), 291-295.
- Stalikas, C. D. 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30(18), 3268-3295.

- Štípek, S. 2000. Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. Praha: Grada, 314 s., ISBN 80-716-9704-4.
- Thompson, L. U. 1994. Antioxidants and hormone-mediated health benefits of whole grains. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34(5-6), 473-497.
- Tichá, M., Vyzínová, P. 2006. *Polní plodiny*. Brno: VFU, 41, 37-48.
- Trojan, V. 2014. Vyhledávání a charakteristika genů zodpovědných za purpurové zbarvení pšenice seté (*Triticum aestivum* L.). Disertační práce. Mendelova univerzita v Brně. Agronomická fakulta. Brno. 100 s.
- Trojan, V., Musilová, M., Vyhnánek, T., Havel, L. 2014a. Storage of anthokyanins in caryopses of common wheat (*Triticum aestivum* L.). [online], [cit. 2017-11-02]. Dostupné z: < http://web2.mendelu.cz/af_291_mendelnet/mendelnet2011/articles/27_trojan_485.pdf >.
- Trojan, V., Musilová, M., Vyhnánek, T., Klejdus, B., Hanáček, P., Havel, L. 2014b. Chalcone synthase expression and pigments deposition in wheat with purple and blue colored caryopsis. *Journal of Cereal Science*, 59(1), 48-55.
- Verma, B., Hucl, P., Chibbar, R. N. 2008. Phenolic content and antioxidant properties of bran in 51 wheat cultivars. *Cereal Chemistry*, 85(4), 544-549.
- Wang, L., Yao, Y., He, Z., Wang, D., Liu, A., Zhang, Y. 2013. Determination of phenolic acid concentrations in wheat flours produced at different extraction rates. *Journal of Cereal Science*, 57. 67–72.
- Wang, S., Yang, C., Tu, H., Zhou, J., Liu, X., Cheng, Y., Xu, J. 2017. Characterization and metabolic diversity of flavonoids in citrus species. *Scientific Reports*, 7(1), 10549.
- Yilmaz, V. A., Brandolini, A., Hidalgo, A. 2015. Phenolic acids and antioxidant activity of wild, feral and domesticated diploid wheats. *Journal of Cereal Science*, 64. 168-175.
- Young, I. S., Woodside, J. V. 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54(3), 176-186.
- 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.
- Zeven, A. C. 1991. Wheats with purple and blue grains: a review. *Euphytica*, 56(3), 243-258.
- Zhang, Y., Wang, L., Yao, Y., Yan, J., He, Z. 2012. Phenolic acid profiles of Chinese wheat cultivars. *Journal of Cereal Science*, 56. 629–635.

- Zhang, Q., Liu, M., Ruan, J. 2017. Metabolomics analysis reveals the metabolic and functional roles of flavonoids in light-sensitive tea leaves. *BMC Plant Biology*, 17(1), 64.
- Zhang, J., Ding, Y., Dong, H., Hou, H., Zhang, X. 2018. Distribution of phenolic acids and antioxidant activities of different bran fractions from three pigmented wheat varieties. *Journal of Chemistry*. 2018, 1-9.
- Zhao, Z., Moghadasian, M. H. 2008. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chemistry*, 109(4), 691-702.
- Zhou, K., Yu, L. 2004. Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. *LWT-Food Science and Technology*, 37(7), 717-721.
- Zimolka, J. a kol. 2005. Pšenice, pěstování, hodnocení a užití zrna. Nakladatelství Profi Press, sro Praha, 180 s., ISBN: 80-86726-09-680-8672.
- Zloch, Z., Čelakovský, J., Aujezdská, A. 2004. Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu. Ústav hygieny Lékařské fakulty UK, Plzeň. [online], [cit. 2017-12-04]. Dostupné z: < https://www.researchgate.net/profile/Zdenk_Zloch/publication/268049143_Stanoveni_obsahu_polyfenolu_a_celkove_antioxidacni_kapacity_v_potravinach_rostlinneho_puvodu/links/551bc5700cf2fe6cbf75e6ae/Stanoveni-obsahu-polyfenolu-a-celkove-antioxidacni-kapacity-v-potravinach-rostlinneho-puvodu.pdf>.
- Zuchowski, J., Jonczyk, K., Pecio, L., Oleszek, W. 2011. Phenolic acid concentrations in organically and conventionally cultivated spring and winter wheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(6), 1089-1095.
- Žilić, S. 2016. Phenolic compounds of wheat. Their content, antioxidant capacity and bioaccessibility. *MOJ Food Processing and Technology*, 2(3), 00037.

9 Seznam zkratek

ADH alkoholdehydrogenasa

AT acetyltransferasa

CoA koenzym A

C3H *p*-kumarát 3-hydroxylasa

C4H *trans*-cinamátmonooxygenasa

DAD detektor diodového pole

DM dry matter

DNA deoxyribonukleová kyselina

ECH enoyl-CoA-hydratasa

E4P erythrosa 4-fosfát

FK fenolické kyseliny

F5H ferulát-5-hydroxylasa

HPLC vysokoúčinná kapalinová chromatografie

OMT o-methyl-transferasa

PA phenolic acids

PAL fenyľalaninamoniak lyasa

PEP fosfoenolpyruvát

10 Přílohy

Příloha 1. Statistické hodnocení vlivu odrůdy na celkový obsah FK.

Tukeyův HSD test; proměnná Vázané FK (ug/g) (Tabulka1) Homogenní skupiny, alfa = .05000 Chyba: meziskup. PČ = 1981.1, sv = 16.000				
Č. buňky	Odrůda	Vázané FK (ug/g) Průměr	1	2
3	Annie	620,8899	****	
5	Bona Vita	634,8889	****	****
7	Konini	639,0757	****	****
2	Bohemia	642,5360	****	****
8	UC 66049	652,4428	****	****
6	AF Jumiko	661,7765	****	****
4	Citrus	667,8637	****	****
1	V1 131-15	751,8111		****

Příloha 2. Statistické hodnocení vlivu odrůdy na obsah vázaných FK.

Tukeyův HSD test; proměnná Vázané FK (ug/g) (Tabulka1) Homogenní skupiny, alfa = .05000 Chyba: meziskup. PČ = 1981.1, sv = 16.000				
Č. buňky	Odrůda	Vázané FK (ug/g) Průměr	1	2
3	Annie	620,8899	****	
5	Bona Vita	634,8889	****	****
7	Konini	639,0757	****	****
2	Bohemia	642,5360	****	****
8	UC 66049	652,4428	****	****
6	AF Jumiko	661,7765	****	****
4	Citrus	667,8637	****	****
1	V1 131-15	751,8111		****

Příloha 3. Statistické hodnocení vlivu odrůdy na obsah konjugovaných FK.

Tukeyův HSD test; proměnná Konjugované FK (ug/g) (Tabulka 1) Homogenní skupiny, alfa = .05000 Chyba: meziskup. PČ = 6.3337, sv = 16.000								
Č. buňky	Odrůda	Konjugované FK (ug/g) Průměr	1	2	3	4	5	6
8	UC 66049	42,04824	****					
7	Konini	52,13492		****				
3	Annie	54,18786		****	****			
4	Citrus	61,01634			****	****		
5	Bona Vita	62,18623				****		
6	AF Jumiko	67,67582				****	****	
1	V1 131-15	70,29106					****	
2	Bohemia	82,30849						****

Příloha 4. Statistické hodnocení vlivu odrůdy na obsah volných FK.

Tukeyův HSD test; proměnná Volné FK (ug/g) (Tabulka 1) Homogenní skupiny, alfa = .05000 Chyba: meziskup. PČ = .04745, sv = 16.000						
Č. buňky	Odrůda	Volné FK (ug/g) Průměr	1	2	3	4
2	Bohemia	1,381418	****			
5	Bona Vita	1,648809	****			
3	Annie	1,676370	****			
7	Konini	1,820446	****			
4	Citrus	2,777439		****		
1	V1 131-15	3,637926			****	
6	AF Jumiko	4,001326			****	
8	UC 66049	5,459756				****

Příloha 5. Statistické hodnocení vlivu barvy zrna na celkový obsah FK.

Tukeyův HSD test; proměnná Celkové FK (ug/g) (Tabulka 1) Homogenní skupiny, alfa = .05000 Chyba: meziskup. PČ = 3165.8, sv = 20.000			
Č. buňky	Barva zrna	Celkové FK (ug/g) Průměr	1
2	červená	701,4900	****
4	purpurová	713,2424	****
3	žlutá	715,1907	****
1	modrá	762,8454	****

Příloha 6. Statistické hodnocení vlivu pěstební formy na celkový obsah FK.

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná Celkové FK (ug/g) (Tabulka 1) Homogenní skupiny, alfa = .05000 Chyba: meziskup. PC = 3220.5, sv = 22.000		
	Forma pěstování	Celkové FK (ug/g) Průměr	1
2	jarní	696,4909	****
1	ozimá	732,0925	****

11 Seznam příloh

Příloha 1. Statistické hodnocení vlivu odrůdy na celkový obsah FK.

Příloha 2. Statistické hodnocení vlivu odrůdy na obsah vázanýchFK.

Příloha 3. Statistické hodnocení vlivu odrůdy na obsah konjugovaných FK.

Příloha 4. Statistické hodnocení vlivu odrůdy na obsah volných FK.

Příloha 5. Statistické hodnocení vlivu barvy zrna na celkový obsah FK.

Příloha 6. Statistické hodnocení vlivu formy pěstování na celkový obsah FK.