

Stanovení polyfenolů, flavonoidů a studie antioxidační aktivity u směsí mouk miličky habešské

Bc. Eva Kotásková

Diplomová práce
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Eva Kotásková**
Osobní číslo: **T12385**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Stanovení polyfenolů, flavonoidů a studie
antioxidační aktivity u směsí mouk milíčky habešské**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Stručně charakterizovat obiloviny používané v pekárenství s důrazem na pšenici.
2. Charakteristika chemického složení milíčky habešské v porovnání s pšenicí.
3. Obecný princip spektrofotometrie a stanovení flavonoidů.
4. Princip Folin-Ciocalteueho metody pro stanovení polyfenolů.
5. Principy antioxidačních metod ABTS a DPPH.

II. Praktická část

1. Vypracovat extrakční postup vzorků pro následné spektrofotometrické stanovení flavonoidů, polyfenolů a stanovení antioxidační aktivity.
2. Stanovit celkový obsah flavonoidů s $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ v prostředí etanolu s přídavkem NaNO_2 a NaOH .
3. Stanovit celkový obsah polyfenolických látek metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem.
4. Stanovit antioxidační aktivitu metodami ABTS a DPPH.
5. Vypracovat diskuzi a formulovat závěr.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] CICCO, N., LANORTE, M., T., PARAGGIO, M., VIGGIANO, M., LATTANZIO, V., A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical journal*. 2009, 91, 107 – 110.
- [2] NOIPA, T., SRIJARANAI, S., TUNTULANI, T., NGEONTAE, W., New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. *Food Research International*. 2011, 44, 798 – 806.
- [3] RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, K., Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999, 26, 1231 – 1237.
- [4] MENGISTU, K. D., The influence of soil water deficit imposed during various developmental phases on physiological processes of tef (*Eragrostis tef*). *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2009, 132, 283 – 289.
- [5] OICHA, T., CORNELIS, N. W., VERPLANCKE, H., NYSSSEN, J., GOVAERTS, B., BEHAILU, M., HAILE, M., DECKERS, J., Short-term effects of conservation agriculture on Vertisols under tef (*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter) in the northern Ethiopian highlands. *Soil & Tillage Research*, 2010, 106, 294 – 302.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Daniela Sumczynski, Ph.D.**
Ústav analýzy a chemie potravin

Datum zadání diplomové práce: **10. ledna 2014**

Termín odevzdání diplomové práce: **25. dubna 2014**

Ve Zlíně dne 3. února 2014


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno:Eva Kotásková.....

Obor: TPV.....

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně24. 4. 2014.....

.....Kotásková.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Cílem práce bylo stanovit vybrané chemické parametry miličky habešské a vybrané chemické parametry miličky ve směsi s pšeničnou moukou v daném poměru. V těchto vzorcích byly stanoveny následující parametry: celkový obsah polyfenolů, flavonoidů a antioxidační aktivita metodami ABTS a DPPH. Mimo to byly vypracovány příslušné extrakční postupy pro stanovení výše jmenovaných chemických charakteristik. Zatímco nejvyšší antioxidační aktivita byla stanovena u tmavého typu miličky importované z USA, nejnižší antioxidační aktivita byla naměřena v mouce z miličky pocházející z Bolívie. Nejnižší hodnoty antioxidačních aktivit byly naměřeny ve směsích miličky s pšeničnou moukou. Vysoké obsahy polyfenolů a flavonoidů byly naměřeny v tmavých druzích miličky, podobně jako antioxidační aktivita. Nezanedbatelné množství polyfenolů a flavonoidů bylo naměřeno také u světlé miličky z USA a některých směsí miličky a pšeničné mouky.

Klíčová slova: milička habešská, polyfenoly, flavonoidy, ABTS, DPPH

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate some chemical parameters in *Eragrostis tef* and in flour mixtures with *Eragrostis tef*. The total polyphenols and flavonoids content and antioxidant activity (using ABTS and DPPH methods) were determined in *Eragrostis tef* and in mixtures of tef and wheat flour in appropriate ratio. Instead of that, the optimal extraction processes were tested to determine characteristics mentioned above. While the best antioxidant activity was measured in dark type *Eragrostis tef* from USA import, low antioxidant activity was found in tef flour from Bolivia. The lowest antioxidant activity was measured in mixtures of flour. The higher total flavonoids and polyphenols content were determined in dark type of tef as well as antioxidant activity. Indispensable amounts of polyphenols and flavonoids were determined in white type of tef and in the some mixtures of flour too.

Keywords: *Eragrostis tef*, polyphenols, flavonoids, ABTS, DPPH

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí mé diplomové práce, Ing. Bc. Daniele Sumczynski, Ph.D. za odborné vedení, spolupráci, trpělivost a velmi cenné rady, které mi poskytovala v průběhu vypracování mé diplomové práce. Dále děkuji Ing. Lence Fojtíkové za pomoc při analytických stanoveních v laboratořích. Rovněž patří velké díky mé rodině za podporu během celého studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Datum: 24. 4. 2014



OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 OBILOVINY	13
1.1 VÝZNAM OBILOVIN PRO VÝŽIVU ČLOVĚKA	13
1.2 STAVBA OBILNÉHO ZRNA.....	14
1.2.1 Polysacharidy obilných zrn	18
1.2.2 Monosacharidy a oligosacharidy obilovin.....	19
1.2.3 Bílkoviny a aminokyseliny obilovin	20
1.2.4 Lipidy	21
1.2.5 Vitaminy a minerální látky obilovin	22
1.2.6 Barviva	26
1.2.7 Fenolové sloučeniny.....	28
1.2.7.1 Fenolické kyseliny	28
1.2.7.2 Flavonoidy	30
1.2.8 Produkce pšenice.....	31
2 MILIČKA HABEŠSKÁ	35
2.1 CHEMICKÉ SLOŽENÍ MILIČKY	36
2.1.1 Bílkoviny a aminokyseliny.....	37
2.1.2 Lipidy	39
2.1.3 Sacharidy	40
2.1.4 Minerální látky	41
2.1.5 Vitaminy.....	43
2.1.6 Fenolické látky v miliče habešské	44
2.1.7 Využití miličky jako obiloviny pro lidskou výživu.....	45
3 PRINCIPY METOD POUŽITÝCH V EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI	47
3.1 SPEKTROFOTOMETRIE.....	47
3.1.1 Základní části spektrofotometru.....	48
3.1.1.1 Spektrofotometr Lambda 25	48
3.2 STANOVENÍ POLYFENOLŮ FOLIN-CIOCALTEUOVOU METODOU	49
3.2.1 Folin-Ciocalteuovo činidlo.....	50
3.3 STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU FLAVONOIDŮ	51
3.4 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY	52
3.4.1 Metoda ABTS	53
3.4.2 Metoda DPPH	54
3.5 STATISTICKÁ ANALÝZA	55
II PRAKTICKÁ ČÁST	56
4 CÍL PRÁCE	57
5 METODIKA PRÁCE	58
5.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A POMŮCKY, PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	58
5.1.1 Chemikálie	58

5.1.2	Přístroje a zařízení	58
5.2	CHARAKTERISTIKA VZORKŮ	59
5.2.1	Vzorky miličky habešské	59
5.2.2	Vzorky pšeničných mouk	60
5.2.3	Směsi mouk s miličkou habešskou	61
5.3	EXTRAKCE VZORKŮ	61
5.3.1	Pilotní modelové extrakce vzorků	61
5.3.2	Výsledná extrakce vzorků pro následné stanovení polyfenolů a flavonoidů	61
5.3.3	Výsledná extrakce vzorků pro následné stanovení antioxidačních aktivit	62
5.4	STANOVENÍ POLYFENOLŮ FOLIN-CIICALTEUOVOU METODOU	62
5.4.1	Kalibrační křivka pro stanovení celkového obsahu polyfenolů	62
5.5	STANOVENÍ FLAVONOIDŮ	63
5.5.1	Kalibrační křivka pro stanovení celkového obsahu flavonoidů	63
5.6	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METODOU ABTS	63
5.6.1	Příprava radikálu ABTS	63
5.6.2	Příprava reakční směsi	64
5.6.3	Měření antioxidační aktivity vzorků metodou ABTS	64
5.6.4	Kalibrační křivka pro stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS	64
5.7	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METODOU DPPH	65
5.7.1	Příprava zásobního a pracovního roztoku DPPH	65
5.7.2	Vlastní měření antioxidační aktivity	65
5.7.3	Kalibrační křivka pro stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH	65
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	66
6.1	VÝSLEDKY OPTIMALIZACE EXTRAKCE VZORKŮ	66
6.2	VÝSLEDKY STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU POLYFENOLŮ	67
6.2.1	Výsledky stanovení obsahu polyfenolů u vzorků miličky	67
6.2.2	Výsledky stanovení obsahu polyfenolů u vzorků mouk	68
6.2.3	Výsledky stanovení obsahu polyfenolů u vzorků směsí mouk s miličkou	69
6.2.4	Výsledky měření kalibrační křivky pro stanovení obsahu polyfenolů	72
6.3	VÝSLEDKY STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU FLAVONOIDŮ	73
6.3.1	Výsledky stanovení obsahu flavonoidů u vzorků miličky	74
6.3.2	Výsledky stanovení obsahu flavonoidů u vzorků mouk	75
6.3.3	Výsledky stanovení obsahu flavonoidů u směsí mouk s miličkou	75
6.3.4	Výsledky měření kalibrační křivky pro stanovení obsahu flavonoidů	78
6.4	VÝSLEDKY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METODOU ABTS	79
6.4.1	Výsledky stanovení antioxidační aktivity u vzorků miličky metodou ABTS	80
6.4.2	Výsledky stanovení antioxidační aktivity u vzorků mouk	81
6.4.3	Výsledky stanovení antioxidační aktivity vzorků směsí mouk s miličkou	82

6.4.4	Výsledky měření kalibrační křivky pro stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS.....	84
6.5	VÝSLEDKY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METODOU DPPH.....	85
6.5.1	Výsledky stanovení antioxidační aktivity u vzorků miličky metodou DPPH.....	86
6.5.2	Výsledky stanovení antioxidační aktivity u vzorků mouk	87
6.5.3	Výsledky stanovení antioxidační aktivity vzorků směsí mouk s miličkou	87
6.5.4	Výsledky měření kalibrační křivky pro stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH.....	90
ZÁVĚR		91
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		94
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		102
SEZNAM OBRÁZKŮ		103
SEZNAM TABULEK.....		105
SEZNAM PŘÍLOH.....		108

ÚVOD

Pšenice je celosvětově nejvýznamnější obilovinou zajišťující výživu lidské populace. V současné době patří podle statistik FAO (Organizace pro výživu a zemědělství) a OSN (Organizace spojených národů) pšenice s rýží ke dvěma obilovinám s nejvyšším objemem produkce na světě. Představuje více jak 30 % světové produkce cereálií. Významnými producenty se staly už i státy Evropské unie, které díky svým vysokým požadavkům jsou nyní schopny produkovat kvalitní pšenici a pekařské výrobky.

V současné době se hledají různé alternativy jak obohatit potraviny z hlediska nutriční hodnoty. Milička habešská je vzhledem k výživové hodnotě semen oproti jiným běžným obilovinám považována za výživově hodnotnou surovinu. Je bohatá na sacharidy, vlákninu, obsahuje více železa, vápníku a zinku než jiné obiloviny, např. již zmiňovaná pšenice. V posledních letech se začínají objevovat studie, kdy se pomleté zrno miličky či její mouka přidává k pšenici v daném poměru. Ukazuje se, že milička by mohla být použita při výrobě nových směsí pekárenských mouk, pro vývoj nových typů cereálních výrobků apod. Tím, že je milička bezlepkovou obilovinou, nabízí se využití jejího potenciálu i pro celiaky.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 OBILOVINY

Obiloviny jsou strategickou a historicky nejvýznamnější plodinou. Archeologické výzkumy dokládají, že je začal člověk pěstovat již v dobách neolitu. Do Evropy se dostaly z oblastí jihozápadní Asie a Středomoří [1]. Obiloviny si udržely v průběhu tisíciletí výlučné postavení základní potraviny. Jejich hlavní druhy jsou především chlebové obiloviny, pšenice a žito, dále ječmen, kukuřice, rýže, oves a pohanka [2].

Obiloviny patří botanicky mezi traviny (*Gramineae*), téměř všechny patří do čeledi lipnicovité (*Poaceae*). Výjimku tvoří např. pohanka, patřící do čeledi rdesnovité (*Polygonaceae*). V posledních letech se také začala uplatňovat další semena, např. amarant, patřící do čeledi amarantovité (*Amaranthaceae*) [3].

Společný botanický původ obilovin čeledi lipnicovité předurčuje jejich značnou vzájemnou podobnost jak ve struktuře a tvorbě zrna, tak v jeho chemickém složení, tj. např. v uspořádání obalových a podobalových vrstev zrna, nebo v zastoupení jednotlivých aminokyselin v obilné bílkovině nebo mastných kyselin v tukových složkách. Vlivem různých klimatických podmínek a během staletí šlechtění a pěstování se však současně vytvořily odlišnosti mezi jednotlivými botanickými rody a druhy, mezi jednotlivými odrůdami téhož druhu. Možnosti a výsledky šlechtění posledních desetiletí rozčlenily v mnoha případech i odrůdy stejné obiloviny pro určitá speciální použití [4].

V České republice jsou obiloviny nejdůležitější zemědělskou plodinou, jsou základní surovinou pro řadu potravinářských výrob, pro krmivářský průmysl i průmyslovou surovinou. Ročně se vyrobí 6,8 – 7,1 mil. tun obilovin, z toho 2,1 mil. t se zpracovává na potraviny [1].

1.1 Význam obilovin pro výživu člověka

Obiloviny se uplatňují jako součást lidské výživy (především pšenice a rýže), jsou hlavní surovinou pro výrobu potravin, ale slouží i pro výživu hospodářských zvířat, malé množství se zpracovává technicky (na škrob a líh). Podle údajů FAO (Food and Agriculture Organization, Organizace pro výživu a zemědělství) dodávají obiloviny lidstvu téměř ½ energetické hodnoty ve stravě a ½ konzumovaných bílkovin. Jsou pro člověka zdrojem energie, převážně v podobě škrobu a bílkovin [1].

Obilná zrna mají významný přínos pro zlepšení kvality potravin, a to zejména prostřednictvím aplikací ve funkčních potravinách a doplňcích výživy [5]. V dnešní době je kladen důraz, aby rafinované potraviny (z bílé mouky nebo bílého cukru, tj. zbavené vlákniny) byly doplněny nebo nahrazeny výrobky s vyšším obsahem hrubé vlákniny. Cennými zdroji jsou právě cereální výrobky, zejména otruby (do kaší, polévek či těsta), celozrnné chleby a pečivo, obilné klíčky a vločky nebo těstoviny z celozrnných mouk. Pozitivní je, že obiloviny obsahují sacharidy převážně ve formě škrobu, a pokud se obilné zrno použije i včetně svých obalových vrstev a ne jen ve formě vymleté mouky, poté se škrob i pomaleji tráví a glukóza je pomaleji vstřebávána [1].

Obiloviny jsou vhodným zdrojem vlákniny, minerálních látek a vitaminů, především skupiny B. Obsah těchto látek závisí na stupni vymílání. Při výrobě mouky může být různě velký podíl povrchové vrstvy zrna odstraněn a převeden do otrub (stupeň vymílání). Stupeň vymílání se hodnotí podílem hmotnosti vyrobené mouky z hmotnosti zpracovaného zrna, a to v %. Mouka nízko vymílaná (na 75 % a méně) obsahuje jen součásti vnitřního endospermu. Mouky výše vymílané (tedy s menším odpadem) jsou tmavší, zabarvení je dáno příměsí povrchových vrstev zrna. Celozrnná mouka se vymílá na 95 %. Stupeň vymílání významně neovlivňuje energetickou hodnotu. V nízko vymílaných moukách se snižuje obsah bílkovin, ubývá vitaminů sk. B, minerálních látek a vlákniny. K výhodám bílé mouky oproti tmavé patří vedle sníženého obsahu kyseliny fytové především její lepší technologické vlastnosti [6,7]. Vláknina příznivě ovlivňuje fyziologické funkce trávicí soustavy. Udržuje zdravou funkci tlustého střeva, vytváří gelotvorné struktury, nabobtná a vyvolává dříve pocit nasycení, brzdí resorpci tuků a cholesterolu. Se zvyšováním cereální vlákniny, např. vysokou spotřebou otrub nebo ovesných vloček, se zvyšuje hladina kyseliny fytové a fytátů, které vážou do komplexů nevratně některé minerální prvky (Ca, Mg, Fe, aj.) a tím se snižuje utilizace převážně Ca a Fe [1].

1.2 Stavba obilného zrna

Semena obilovin a jejich přirozená funkce po vyzrání spočívá v roli uchování životaschopnosti zárodku nové rostliny. Splnění této úlohy umožňují složky, které jsou obsaženy v anatomických částech semene, které se svým chemickým složením výrazně liší [3]. Zrna se dále liší i tvarem, velikostí a podílem jednotlivých vrstev. Tvary zrna jsou od tenkých protáhlých až po téměř kulatá, zastoupení a pořadí jednotlivých vrstev je však

shodné.

Charakteristické pro jednotlivé obiloviny je to, zda má zrno pluchy nebo je nahé, a tvar zrna. Absolutní rozměry zrna se mohou poněkud lišit i pro stejný druh obiloviny v závislosti na odrůdě, klimatických podmínkách a lokalitě (především dešťové srážky, teplotní profil, nadmořská výška), kvalitě půdy a agrotechnice (především přihnojování a dodržování agrotechnických termínů). Pšenice, žito a kukuřice mají zrna nahá, tzn., že při mlácení zrna vypadává samotné zrno z obalů, které tvoří na jiných zrnech přirostlé pluchy. Pluchatá zrna se před dalším zpracováním loupají a obrušují a přitom se odstraňují pluchy a klíčky [4].

Každá obilka se skládá z obalových vrstev, endospermu a klíčku. Hmotnostní podíl jednotlivých částí zrna je rozdílný u jednotlivých obilovin a je proměnlivý [1]. Podélný řez pšeničným zrnem lze vidět na obrázku 1.

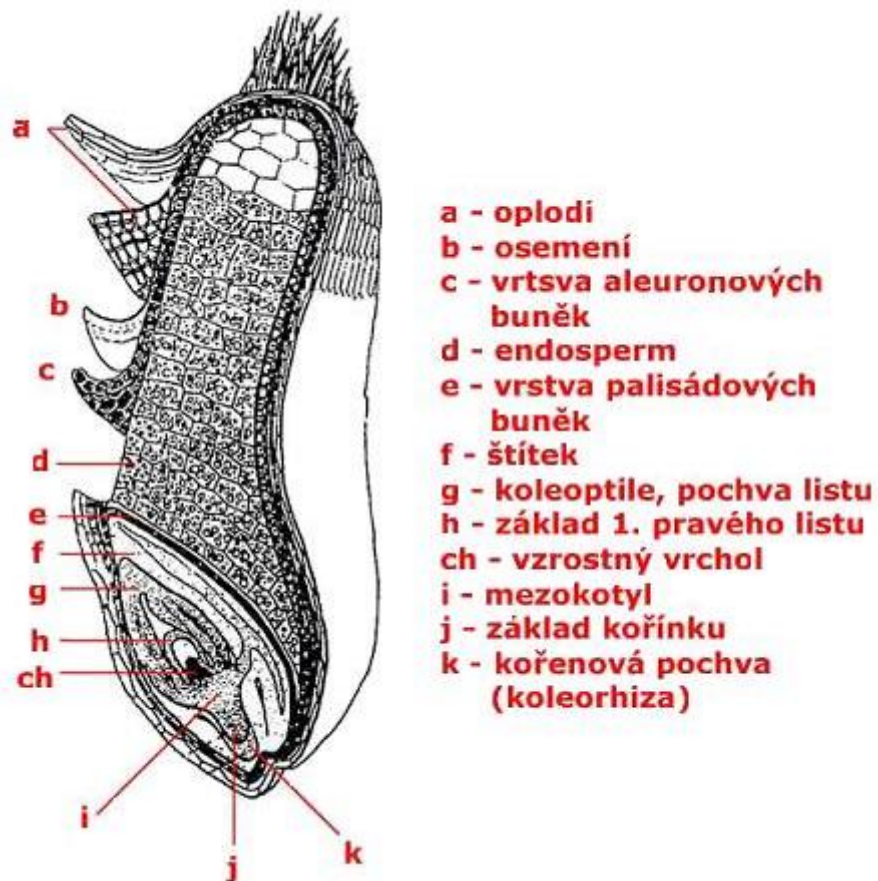
Obalové vrstvy tvoří cca 8 – 12,5 % hmotnosti zrna, chrání obilku před vnějšími vlivy, v mlýnské technologii je označujeme jako otruby. Vnější vrstvy jsou složeny převážně z nerozpustných polysacharidů typu celulózy s velkou mechanickou pevností. Podpovrchové obalové vrstvy jsou složeny rovněž z polysacharidů, které ale s vodou bobtnají nebo se částečně rozpouštějí a jsou schopny vodu velmi pevně vázat. Vnější obalové vrstvy mohou sloužit jako zdroj nestravitelné vlákniny, což může být využíváno z hlediska potřeb úpravy výživových hodnot výrobků, ale z hlediska pekárenské technologie mají tyto složky zhoršující účinek na kvalitu a zpracovatelnost těsta a často i na vzhled hotového výrobku [3]. Obalové vrstvy mají dvě hlavní části – plodí a osemení. Oplodí (perikarp) tvoří pokožka (epidermis), buňky podélné (epikarp), buňky příčné (mesokarp) a buňky hadicové (endokarp). Osemení je tvořeno vrstvou barevnou a hyalinní (skelnou) [1].

Na rozhraní mezi obalovými vrstvami a endospermem je měkká jednoduchá vrstva velkých buněk nazývaná aleuronová vrstva. Ta podle podmínek mletí může být vymleta společně s endospermem do mouk nebo jí část zůstává ulpělá na otrubách. Buňky aleuronové vrstvy obsahují vysoký podíl bílkoviny (cca 30 %), což je téměř trojnásobek jejich obsahu v endospermu. Tyto buňky mají také nejvyšší obsah minerálních látek, proto při vymílání aleuronové vrstvy se výrazně zvyšuje obsah minerálií (popela) v mouce a mírně se také zvýší obsah bílkovin, které však nedosahují tak velkých a strukturně uspořádaných makromolekul jako v endospermu. Jejich pekařská kvalita proto není rovnocenná.

Vzhledem k blízkosti endospermu a snadné vymílatelnosti aleuronové vrstvy se také někdy označuje jako vnější endosperm [4].

Endosperm (vnitřní obsah zrna) představuje největší podíl zrna (84 – 86 % hmotnosti zrna) a je technologicky nejvýznamnější částí. Je tvořen velkými hranolovitými buňkami a poměrně jemnou buněčnou blánou. Obsahuje hlavně škrob (téměř $\frac{3}{4}$), ale pro pekárenskou technologii je velmi významný obsah bílkovin (zaujímají cca 10 % obsahu endospermu). Obsah bílkovin a jejich rozdílná kvalita je určující pro pekárenskou zpracovatelskou kvalitu pšeničné mouky. Endosperm obsahuje zásobní látky (škrob, bílkoviny) i pro klíčící rostlinu. Pšeničná mouka je téměř čistý rozdrcený pšeničný endosperm, do žitné mouky se dostává více podobalových vrstev [1].

Klíček (embryo) tvoří nejmenší, avšak nejvíce kolísající podíl zrna. U pšenice 2,5 – 3,0 %, u kukuřice 12 – 15 % z hmotnosti zrna. Je vlastním zárodkem nové rostliny a nositelem genetických informací. Je cenným zdrojem lipidů, jednoduchých sacharidů, bílkovin, enzymů a vitaminů rozpustných v tucích. Významný je štítek, který obsahuje až 33 % bílkovin. Při mlýnském zpracování je klíček oddělován, má mimo jiné velmi krátkou stabilitu vzhledem k vysokému obsahu lipidů [1].



Obr. č.: 1 Podélný řez pšeničným zrnem se znázorněním morfoložických vrstev [4].

Důležitou složkou obilného zrna je voda, protože všechny biochemické a fyziologické procesy, probíhající během růstu, dozrávání a skladování probíhají za její účasti. Z technologického hlediska, podle obsahu vody, mluvíme o zrně mokré (nad 17 %), vlhkém (nad 15,5 %), středně suchém (nad 14 %) a suchém (do 14 %) [1]. Zastoupení jednotlivých chemických složek v různých částech obilky ukazuje tabulka č. 1.

Tabulka č.: 1 Rozdělení látkového složení v jednotlivých částech zrna v % sušiny [1].

Složka	Popel	Bílkoviny	Lipidy	Celková vláknina	Pentózany	Škrob
Oplodí a osemení	3,4	6,9	0,8	50,9	46,6	–
Aleuronová vrstva	10,9	31,7	9,1	11,9	28,3	–
Klíček	5,8	34,0	27,6	2,4	–	–
Endosperm	0,6	12,6	1,6	0,6	3,3	80,4

1.2.1 Polysacharidy obilných zrn

Zásobní polysacharidy, jejichž hlavním představitelem je v rostlinách škrob, jsou pro organizmy zdrojem energie. Jejich štěpením v rámci příslušných metabolických cyklů pokrývají živé systémy značnou část svých energetických potřeb v období začátku růstu nové rostliny [4].

Škrob je obsažen v zrnech obilovin v endospermu. Jeho obsah tvoří přibližně 60 – 75 % sušiny obilek a kolísá zhruba v uvedeném rozmezí podle druhů a odrůd. Jeho obsah v mouce, která je tvořena převážně endospermem, je ještě vyšší cca 80 %. Škrob není sám o sobě chemickým individuem, neboť se sestává ze dvou frakcí – amylozy a amylopektinu. Obě frakce jsou tvořeny základní stavební jednotkou maltózou, v případě amylopektinu je to ještě navíc izomaltóza. Existence těchto vazeb a struktur amylozy a amylopektinu má zásadní význam v pekárenské technologii při hydrolýze škrobu α - a β -amylázami. U většiny obilovin v původních odrůdách značně převažuje podíl amylopektinu. U našich tradičních obilovin se uvádí poměr cca 25 % amylozy a 75 % amylopektinu. Amylóza je rozpustná ve vodě, amylopektin pouze bobtná a není schopen vytvořit roztok. Celkově vytváří škrob s vodou za tepla gelovitý maz. Po ochlazení dojde k vytvoření pružného škrobového gelu, který je hlavním nositelem vláčnosti a obsažené vody ve stříde výrobků. V tom spočívá jeden ze dvou hlavních významů škrobu pro pekařský výrobek. Druhý význam představuje škrob jako zdroj zkvasitelných cukrů pro kvasinky při kypření těsta [3,7,8].

Neškrobovými polysacharidy jsou obecně nazývány rostlinné slizy a jedná se většinou o různě zesíťované makromolekuly polysacharidů na bázi pentóz – xylózy a arabinózy – čistých pentózanů, nebo příslušných glykoproteinů. Slizy jsou polyfunkční, tvoří jednak součást buněčných stěn, buněčného obsahu a zúčastňují se metabolismu (tzv. ve vodě rozpustné pentózany). Dále bylo zjištěno, že existují i pentózany nerozpustné ve vodě s podobnou strukturou jako slizy. Neškrobové polysacharidy nerozpustné ve vodě jsou řazeny mezi hemicelulózy, jejich obsah v pšeničné mouce je 2,3 % a v pšeničných otrubách 43 % [2,4].

1.2.2 Monosacharidy a oligosacharidy obilovin

Volné monosacharidy se vyskytují ve zralých obilných zrnech pouze v nepatrném množství, a to především v klíčku. Do mouky se jich dostává jen málo (max. 1 – 3 %). Nejdůležitější monosacharidy v obilovinách jsou: pentózy – arabinóza, xylóza, ribóza; hexózy – glukóza, fruktóza, galaktóza, manóza [3,4]. Zastoupení mono- a oligosacharidů ve vybraných moukách ukazuje tabulka č. 2.

Tabulka č.: 2 Obsahy sacharidů zjištěné různými autory v některých cereálních materiálech v % v sušině [4].

Sacharidové komponenty	Mouka <i>T. aestivum</i>	Mouka <i>T. durum</i>	Ječná mouka	Žitná mouka
Glukóza	0,01 – 0,01	0,02	0,05	0,02 – 0,05
Fruktóza	0,02	0,08	0,09	0,02 – 0,05
Maltóza	0,06 – 0,08	0,10	0,07	0,01 – 0,14
Sacharóza	0,10 – 0,25	0,26	1,00	0,07 – 0,41
Rafinóza	–	–	0,48	–
Oligosacharidy celkem	1,31	0,67	–	0,79 – 2,03
Sacharidy celkem	1,00 – 1,67	1,14	2,70	0,90 – 2,70

Monosacharidy vznikají v zelených rostlinách, v procesu zvaném fotosyntéza, kdy dochází k jejich syntéze z oxidu uhličitého a vody za současného uvolňování kyslíku. energii potřebnou pro tuto reakci poskytuje sluneční záření. Ve zralém, neporušeném a suchém zrně se oligosacharidy vyskytují ve velmi nízkých koncentracích. Nejvíce se v zrně nachází maltóza a sacharóza [3,4].

Potraviny s vysokým glykemickým indexem mají vysoký obsah jednoduchých sacharidů a neobsahují většinou vlákninu (bílé pečivo, bílá rýže, ...). Po jejich konzumaci nastane rychlý vzestup hladiny glukózy a nastane rychleji pocit hladu. Naopak po konzumaci potravin s obsahem vlákniny a složených sacharidů (zelenina, luštěniny, celozrnné pečivo, některé druhy ovoce) nastane vzestup glukózy pomaleji a pocit hladu se dostaví později. Dlouhodobá konzumace potravin s vysokým glykemickým indexem vede nejen ke vzniku nadváhy, ale také významně zvyšuje pravděpodobnost vzniku diabetu. Vzestup hladiny glukózy je vždy následován vzestupem uvolněného inzulínu [9].

1.2.3 Bílkoviny a aminokyseliny obilovin

Zralá zrna obsahují podle druhů a odrůd 9 – 18 % bílkovin. Většina bílkovin je uložena v endospermu a v aleuronové vrstvě. Základní stavební složkou jsou aminokyseliny. Zcela dominantní aminokyselinou v obilovinách je kyselina glutamová, která je přítomna i ve formě svého aminu – glutaminu. Představuje více než 1/3 z celkového obsahu aminokyselin. Druhou nejvíce obsaženou aminokyselinou je prolin (např. v pšeničné bílkovině je ho více než 10 %), který díky svému strukturnímu uspořádání dává předpoklady k vytvoření pružné prostorové bílkovinné struktury pšeničného těsta. Nízký je obsah lyzinu, treoninu a tryptofanu [1]. Aminokyselinové složení proteinů pšenice lze vidět v tabulce č. 3.

Tabulka č.: 3 Obsah AMK v bílkovině pšenice [10].

AMK	Glu	Pro	Leu	Asp	Phe	Ser	Arg	Val	Gly
Obsah v [%]	34,6	11,5	6,2	3,7	2,9	4,0	2,9	2,6	2,8
AMK	Ala	Thr	His	Cys	Lys	Tyr	Met	Trp	Ile
Obsah v [%]	2,0	2,3	2,0	2,3	1,9	1,1	1,6	1,0	3,1

Zvláštní postavení má zejména pšeničná bílkovina, která vytváří běžně s vodou pružný gel tzv. lepek, jehož fyzikální vlastnosti určují jakost pečiva. Obsah bílkovin v pšenici se pohybuje v rozmezí 10 – 16 %, u žita od 8 do 15 %. Pšenice s obsahem bílkovin nad 13 % se považují za velmi dobré, pod 12 % za střední až slabé [2]. Bílkoviny pšenice mají také největší technologický význam. Na základě rozpustnosti pšeničných bílkovin v různých rozpouštědlech se bílkoviny podle Osborna dělí do čtyř skupin: albuminy, globuliny, prolaminy (gliadiny) a gluteliny. Čtyři základní Osbornovy frakce (tabulka č. 4) se vyskytují, byť v různých poměrech, skoro ve všech obilných zrnech a podle druhů obilovin jim pak byly přisouzeny různé názvy většinou odvozené z latinských názvů jednotlivých obilovin. Prolaminy a gluteliny obecně nejsou rozpustné ve vodě. S přidáním vody však bobtnají a vytvářejí vysoce viskózní koloidní gely nebo roztoky (např. v pšenici lepek) [3].

Tabulka č.: 4 Základní proteiny obilovin [11].

Obilovina	Albumin	Globulin	Gliadin	Glutelin
Pšenice	leukosin	edestin	gliadin	glutenin
Žito			sekalin	sekalinin
Ječmen			hordein	hordenin
Oves		avenalin	gliadin	avenin
Rýže			oryzin	oryzenin
Kukuřice			zein	zeanin

1.2.4 Lipidy

Obilky patří k semenům s nejnižším obsahem tuků vůbec (1,5 – 2,5 %). Nejvíce tuků obsahuje klíček a aleuronová vrstva, převládají zde nepolární lipidy (podíl nepolárních lipidů je 72 – 85 %) s vázanými nenasycenými mastnými kyselinami. Pouze u ovsu, čiroku, prosa a kukuřice je obsah lipidů vyšší, cca 4 – 7 %. Část lipidů se váže na molekuly škrobu, bílkovin a kovových iontů a uplatňují se tak v biochemických procesech kynutí těsta. Lipidy zrna pšenice jsou tvořeny hlavně glycerolem esterifikovaným kyselinou linolovou a olejovou a fosfolipidy, které obsahují ve své molekule kyselinu fosforečnou a nejčastěji

nějakou dusíkatou bázi. Zastoupení vybraných mastných kyselin v obilovinách je uvedeno v tabulce č. 5. Fosfatidy jsou řazeny mezi tzv. polární lipidy (podíl polárních lipidů v klíčku a aleuronové vrstvě je 15 – 26 %). Typickým představitelem je fosfatidylcholin. I přes poměrně nízké kvantitativní zastoupení v celkové skladbě zrna nelze význam lipidů podceňovat. Jsou důležité pro skladování obilí a mouk. Štěpením fosfatidů se uvolňuje kyselina fosforečná a masné kyseliny, což má za následek zvyšování např. kyselosti mouky. Oxidační změny lipidů (oxidaci podléhá zejména kyselina linolová a linolenová) pak způsobují nežádoucí zhoršení sensorických vlastností – žluknutí [1,12,13].

Tabulka č.: 5 Zastoupení masných kyselin v lipidech různých obilovin v hm. % [11].

Obilovina	myristová	palmitová	stearová	olejová	linolová	linolenová
Pšenice	–	20	1,5	16	48	4
Žito	0,1	16	1,0	14	59	9
Ječmen	0,4	22	1,2	16	56	6
Oves	1,4	20	2,0	35	41	2
Kukuřice	–	14	2,0	30	50	3

1.2.5 Vitaminy a minerální látky obilovin

Vysoký obsah vitaminů je v obalových vrstvách a klíčku, zejména pak ve štítku a aleuronové vrstvě. Endosperm obilovin je na vitaminy chudý. Během mletí přecházejí podle stupně vymletí do konzumních mouk v průměru 2/3 původního obsahu vitaminů zrna [1]. Obiloviny je možno považovat za zdroj vitaminů skupiny B. V moukách zbývá podle stupně vymletí jen cca 10 – 40 % původního obsahu vitaminů skupiny B v zrna. Tiamin (vitamin B₁) a riboflavin (vitamin B₂) se vyskytují v obalových vrstvách většiny obilovin a v klíčcích. Kyselina nikotinová (vitamin B₃) je ve vyšších množstvích přítomna v pšenici a ječmeni [3]. Kyselina pantotenová (vitamin B₅) je obsažena v okrajových částech zrna. Pyridoxin (vitamin B₆) je lokalizován v aleuronové vrstvě a ve štítku. Dále obiloviny obsahují kyselinu listovou (vitamin B₉). Vitamin E (tokoferoly a tokotrienoly) se ve vysoké koncentraci vyskytuje v pšeničných klíčcích, z nichž se izoluje při výrobě vitaminových preparátů. Vitamin C (kyselina L-askorbová) se ve zralém obilí

nevyskytuje. Její obsah prudce vzrůstá ve vyklíčeném obilí [1,2]. Batifoulier a kol. [14] provedli extrakci a analýzu vitaminů B u mouk 49 odrůd pšenice pomocí HPLC (High Performance Liquid Chromatography, vysokoúčinné kapalinové chromatografie). Níže uvedená tabulka č. 6 obsahuje 10 vybraných odrůd pšenice a v nich analyzované množství tiaminu, riboflavinu a pyridoxinu [14].

Tabulka č.: 6 Koncentrace tiaminu, riboflavinu a pyridoxinu u vybraných mouk různých odrůd pšenice v mg.100 g⁻¹ [14].

Odrůda	Tiamin	Riboflavin	Pyridoxin
Virtuose	0,26 ± 0,14	0,06 ± 0,02	0,18 ± 0,01
Victo	0,30 ± 0,46	0,04 ± 0,05	0,20 ± 0,02
Magdanela	0,32 ± 0,42	0,06 ± 0,02	0,19 ± 0,09
Isengrain	0,30 ± 0,07	0,07 ± 0,01	0,27 ± 0,02
Supersoft	0,37 ± 0,37	0,08 ± 0,02	0,28 ± 0,24
Baltimore	0,42 ± 0,20	0,07 ± 0,02	0,21 ± 0,08
Levis	0,36 ± 0,21	0,09 ± 0,04	0,20 ± 0,05
Agridur (durum)	0,47 ± 0,16	0,07 ± 0,05	0,19 ± 0,06
Balmeg (špalda)	0,58 ± 0,06	0,07 ± 0,01	0,31 ± 0,04
Poeme (špalda)	0,61 ± 0,03	0,80 ± 0,01	0,31 ± 0,05

Studie Lebiezdinské a kol. [15], poskytuje informace o koncentraci vitaminů B (tiaminu, riboflavinu, pyridoxinu a niacinu) ve vybraných obilovinách a výrobců z nich. Výsledky ukázaly, že existují rozdíly v zastoupení vitaminů B v rámci analyzovaných produktů. Celozrnné výrobky a zrna, jsou lepším zdrojem vitaminů skupiny B, než technologicky zpracované produkty, a proto jsou více nutričně efektivní [15]. Množství vitaminů sk. B v různých obilných produktech ukazuje tabulka č. 7.

Tabulka č.: 7 Koncentrace vitaminů sk. B ve vybraných obilovinách a výrobcích z obilovin v mg.100 g⁻¹ [14].

Druh	Tiamin	Riboflavin	Pyridoxin	Niacin
Kukuřičná mouka	0,17 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,33 ± 0,01	1,50 ± 0,07
Kukuřičné vločky	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,15 ± 0,02	1,62 ± 0,03
Rýžová mouka	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,05	0,08 ± 0,01	0,89 ± 0,06
Rýže bílá basmati	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,09	0,10 ± 0,02	0,97 ± 0,06
Ječmen	0,35 ± 0,01	0,13 ± 0,03	0,26 ± 0,01	4,07 ± 0,15
Pohanková mouka	0,26 ± 0,01	0,21 ± 0,08	0,41 ± 0,03	4,22 ± 0,20
Pohankové kroupy	0,38 ± 0,01	0,13 ± 0,03	0,46 ± 0,03	4,89 ± 0,44
Proso	0,30 ± 0,01	0,07 ± 0,03	0,45 ± 0,02	4,29 ± 0,05
Sója	0,91 ± 0,02	0,32 ± 0,01	0,52 ± 0,04	2,16 ± 0,24
Sójová mouka	0,71 ± 0,015	0,39 ± 0,01	0,53 ± 0,05	1,86 ± 0,09
Amarant	0,02 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,56 ± 0,03	1,02 ± 0,06
Amarantová mouka	0,02 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,61 ± 0,02	1,14 ± 0,07

Minerální látky souhrnně označujeme jako „popel“, to znamená anorganický zbytek po spálení rostlinného materiálu. Obsah popela se v celých zrnech různých obilovin pohybuje v rozmezí cca 1,25 – 2,5 %, přičemž jeho obsah je nejvyšší v obalových vrstvách, klíčku a především v aleuronové vrstvě, nejnižší množství je v endospermu. Popel je tvořen převážně oxidem fosforečným, nejčastějšími prvky jsou hořčík, draslík, vápník a železo. Obsah popela je základem pro klasifikaci mouk a jejich označení typovým číslem, které je 1000násobkem průměrného obsahu popela (např. mouka T 530 obsahuje 0,53 % popela, přičemž se připouští vždy určité rozpětí obsahu, dále vyhláška 333/1997 Sb. udává, že pšeničná mouka hladká světlá obsahuje nejvýše 0,60 % popela, polosvětlá 0,75 % popela a chlebová 1,15 % popela. Pšeničná mouka polohrubá a hrubá obsahuje nejvýše 0,50 % popela [16]. Minerální látky mají tedy i technologický význam, poněvadž se mlýnsko-technologický proces řídí a mouky připravují i podle obsahu popela [1,2,3].

Kyselina fytová, která je přítomna v obilovinách ve formě fytátů hlavně v obalových vrstvách, má schopnost vázat na 1 svou molekulu 6 atomů vápníku, hořčíku nebo dvojmocného železa. Tyto sloučeniny nejsou v lidském organismu rozložitelné, proto takto vázané prvky nejsou již naším tělem využitelné [1].

Ayhan a kol. [17] stanovovali obsah minerálních látek u vzorků obilovin z východní části Turecka. Analyzoval např. obsah minerálních látek v pšenicích, pšenici špaldě, kukuřici, prosu, rýži apod. Výsledky jeho analýz jsou shrnuty v tabulkách č. 8 a 9 [17].

Tabulka č.: 8 Průměrný obsah minerálních látek u vzorků z Turecka v hm. % [17].

	K	Ca	Mg	N	P	S
Ječmen	2,5 ± 0,3	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	2,3 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1
Kukuřice	2,2 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	2,1 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,1
Proso	2,2 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	2,1 ± 0,3	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,1
Oves	1,8 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	2,4 ± 0,5	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1
Rýže	2,3 ± 0,3	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	1,9 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1
Žito	3,1 ± 0,6	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	2,4 ± 0,4	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1
Špalda	2,2 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	2,3 ± 0,3	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1
Pšenice jarní	2,3 ± 0,4	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	2,5 ± 0,3	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1
Pšenice ozimá	1,9 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	2,1 ± 0,3	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,1

Tabulka č.: 9 Průměrný obsah minerálních látek u vzorků z Turecka v mg.kg^{-1} [17].

	Zn	Cu	Fe	Mn	Mo	B
Ječmen	42,4 ± 3,8	21,4 ± 1,8	28,7 ± 2,5	29,6 ± 2,6	6,4 ± 0,7	8,7 ± 0,9
Kukuřice	17,0 ± 1,5	15,3 ± 1,8	24,2 ± 2,3	19,5 ± 2,3	5,3 ± 0,6	11,4 ± 1,2
Proso	18,5 ± 1,6	16,3 ± 1,9	25,0 ± 2,4	20,6 ± 2,5	4,9 ± 0,5	11,6 ± 1,2
Oves	26,4 ± 2,1	14,8 ± 1,3	26,4 ± 2,4	16,9 ± 1,7	3,6 ± 0,4	14,9 ± 2,6
Rýže	32,4 ± 2,8	18,7 ± 1,5	9,5 ± 0,8	11,6 ± 1,2	3,1 ± 0,4	10,8 ± 1,2
Žito	36,0 ± 3,1	18,4 ± 1,9	24,0 ± 2,3	15,1 ± 1,4	3,8 ± 0,5	11,3 ± 1,3
Špalda	18,1 ± 1,8	16,3 ± 1,6	46,8 ± 4,2	23,8 ± 2,4	5,1 ± 0,5	9,7 ± 1,2
Pšenice jarní	23,4 ± 2,0	7,4 ± 0,8	32,5 ± 3,0	45,8 ± 5,6	5,3 ± 0,6	11,0 ± 1,2
Pšenice ozimá	19,2 ± 1,9	6,8 ± 0,6	40,1 ± 4,3	42,8 ± 5,0	4,2 ± 0,5	9,3 ± 0,9

1.2.6 Barviva

Karotenoidy patří mezi bohatě zastoupené pigmenty v přírodě, které jsou zodpovědné za žluté, oranžové a červené barvy ovoce, zeleniny i obilného zrna [18]. Vyšší obsah karotenoidů má zejména pšenice *Triticum durum*. Pro mouky k pekařským účelům se žádají odrůdy s nízkým obsahem, pro výrobu těstovin naopak s vyšším obsahem pigmentů [2]. Hlavními karotenoidy v obilných zrnech jsou lutein a zeaxantin [19]. Lutein (dihydroxykarotenoid xantofylového typu), je hlavní složkou chlebové pšeničné mouky a tvoří její krémovou barvu i barvu mnoha konečných výrobků (Mareš a Campbell, 2001) [19]. Lutein a jeho estery v pšenici činí více než 90 % z celkového obsahu látek podílejících se na tvorbě žlutého pigmentu, ve srovnání s přibližně 1 % β -karotenu (Lepage a Sims, 1968) [18]. Lutein a zeaxantin jsou všeobecně ceněny pro své antioxidační vlastnosti (Gentili & Caretti, 2011) [18] a byly detekovány i v aleuronové vrstvě např. u ovsa. Obsah luteinu v různých odrůdách pšenice se pohybuje od 841 do 1340 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (Hidalgo a kol., 2006) [18]. Panfili a kol. [18] ve své studii uvádí obsah luteinu v pšenici ještě vyšší, a to 1310 až 2650 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, v ječmeni 860 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ a ovsu 230 $\mu\text{g.kg}^{-1}$

[18]. V pšenici, ječmeni a ovesných zrnech byl lutein označen za hlavní xantofyl (Luterotti & Kljak ,2010; Okarter a kol., 2010;. Panfili a kol., 2004) [18].

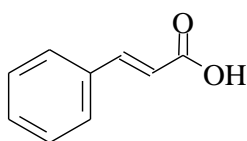
Antokyany, též nazývané antokyaniny, jsou jednou z podskupin flavonoidů, zároveň jsou nejrozšířenější a početně velice rozsáhlou skupinou rostlinných barviv. Tyto ve vodě rozpustné pigmenty jsou zodpovědné za fialové, modré a červené zbarvení. V potravinách rostlinného původu má význam následujících 6 antokyanů seřazených sestupně dle četnosti výskytu: kyanidin (fialový), pelargonidin (červený), peonidin (fialový), delphinidin (purpurově modrý), petunidin (purpurově modrý) a malvidin (purpurový). Abdel-Aal a kol. [20] studoval složení a stabilitu antokyanů v modré a purpurově zbarvené pšenici. Po jejich separaci technikou HPLC se ukázalo, že každá pšenice má zřetelný antokyaninový profil. V celozrnné pšenici stanovili celkový obsah antokyaninových barviv $93 - 152 \text{ mg.kg}^{-1}$ a v otrubách $236 - 453 \text{ mg.kg}^{-1}$ [20,21,22]. Degradace antokyanů probíhá za vysoké teploty, světla, přítomnosti kyslíku, rozpouštědel a některých enzymů. Jejich barevnost ovlivňuje pH nebo přítomnost kovů. Studie z poslední doby se zaměřují především na způsoby jejich stabilizace. Jedná se totiž o látky potenciálně využitelné v potravinářském průmyslu, neboť vykazují pozitivní účinky na lidské zdraví. Proto se uvažuje o jejich širším využití namísto umělých barviv (Castaneda-Ovando a kol., 2009) [23]. U obilných potravinářských surovin by vysoké množství antokyanů v zrně mohlo mít při pravidelné konzumaci ve formě základních potravin (jako např. chléb) značný výživový význam pro člověka a k tomu účelu je vhodné vyšlechtit příslušné odrůdy obilovin. Antokyany a fenolické látky jsou zastoupeny nejvíce v perikarpu a aleuronové vrstvě zrna, nižší množství je v endospermu (Naczka a Shahidi, 2006) [23]. Ve studii Bartl a kol.[23] provedli stanovení antokyanů v pšenicích s purpurově a modře zbarveným zrnem. V roce 2011 byla po tříletém zkoušení (2009 – 2011) v Rakousku zaregistrována odrůda ozimé pšenice Skorpion. Je zapsána v Evropském katalogu odrůd. Na rozdíl od běžných odrůd pšenice se vyznačuje modrým zbarvením zrna, které způsobuje šedomodré zbarvení šrotu i mouky [24]. Celkové množství antokyanů nalezených u pšenice s modrým zrnem bylo $8,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ a u pšenice s purpurovým zrnem bylo naměřeno $12,3 \text{ mg.kg}^{-1}$. Tyto hodnoty leží na spodní hranici rozmezí běžného obsahu antokyanů v obilovinách, které uvádí Abdel Aal a kol. [20]. Zjištěné hodnoty antokyanů nelze brát jako zcela absolutní a neměnné. Obsah antokyanů se v závislosti na podmínkách růstu a zrání obilovin mění, i v případě použití stejné odrůdy (Abdel-Aal a Hucl, 2003) [23,24].

1.2.7 Fenolové sloučeniny

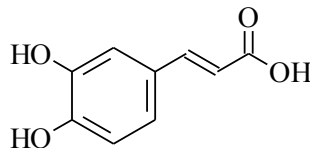
Jsou charakterizovány přítomností více než jedné fenolové jednotky v molekule [25]. Polyfenoly, které se nacházejí v rostlinných materiálech, se dělí do různých skupin označovaných jako fenolové kyseliny, flavonoidy, třísloviny a méně časté stilbeny a lignany. Nejvíce z nich jsou lidskému zdraví prospěšné flavonoidy, mezi které se řadí – katechiny (flavan-3-oly), leukoantokyanidiny (flavan-3,4-dioly), flavanony, flavanoly, flavony, flavonoly, antokyanidiny, izoflavony a chalkony. Projevují se často antioxidační aktivitou, která převyšuje celkovou antioxidační kapacitu vitamínu C a E a karotenoidů vyskytujících se v téže potravíně [21,25].

1.2.7.1 Fenolické kyseliny

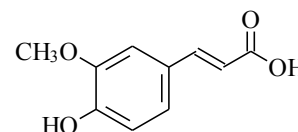
Fenolické kyseliny jsou přítomné v řadě potravin. V naší stravě jsou zastoupeny především hydroxyskořicovými kyselinami, převážně ve formě esterů. Nejčastěji je to kyselina kávová a její estery, dále pak kyselina ferulová.



kyselina skořicová



kyselina kávová



kyselina ferulová

Fenolické kyseliny jsou skupinou přírodních látek běžně se vyskytujících v mnoha obilných zrnech. Vyšší koncentrace těchto sloučenin se nachází ve vnějších vrstvách, které tvoří otruby (Baublis, Clydesdale, & Decker, 2000; Baublis, Lu, Clydesdale, & Decker, 2002; Onyeneho & Hettiarachchy, 1992, Saadi, Lempereur, Sharonov, Autran, a Manfait, 1998) [5]. Fenolické kyseliny existují v obilovinách ve volných a vázaných formách (Sosulski a kol., 1982) [26]. V mnoha dřívějších studiích byly testovány fenolické antioxidanty pšenice především ve své volné formě (Baublis a kol., 2000; Liu a Yao 2007) [26]. Volné fenolové kyseliny se nacházejí ve vnějších vrstvách jádra (oplodí, osemení), zatímco většina z fenolických kyselin v obilovinách se vyskytují především ve vázané formě, jako konjugáty se sacharidy, mastnými kyselinami nebo proteiny (Xing 1997) [26].

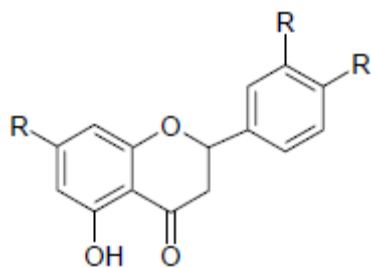
Tyto fenolové kyseliny se mohou lišit ve své struktuře v důsledku rozdílu v počtu a poloze hydroxylových skupin na aromatickém kruhu. Bylo zjištěno, že tyto přirozeně se vyskytující sloučeniny jsou silné antioxidanty (Andreasen, Kroon, Williamson, a Garcia-Conesou, 2001, Yu a kol., 2002, Yu, Perret, Harris Wilson a Haley, 2003) [5]. V otrubách obilovin jsou zejména dvě skupiny fenolických kyselin: deriváty kyseliny benzoové a skořicové. U ferulové kyseliny a hydroxyskořicové kyseliny (deriváty kyseliny kávové a *p*-kumarové) po jejich izolaci z obalových vrstev obilovin bylo zjištěno, že mají vysokou antioxidační aktivitu (Andreasen, Kroon, Williamson, a Garcia-Conesou, 2001; Emmons, Peterson, a Paul, 1999) [5]. Bylo zjištěno, že díky navázání COOH sk. do struktury $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ hydroxyskořicové kyseliny vykazuje tato vyšší antioxidační aktivitu, než když je navázána v molekule kyseliny hydroxybenzoové (White & Xing, 1997) [5]. Zhou a kol.[5] uvádí, že zrno pšenice, otruby a jednotlivé frakce měly různou antioxidační aktivitu a celkový obsah fenolických kyselin. Jejich studie také ukázala, že kyselina ferulová byla hlavní přispěvatelkou antioxidační aktivity. Zejména způsob hydrolyzy může mít vliv na výtěžek a profil fenolických kyselin v pšeničných otrubách, protože fenolové kyseliny existují v buněčných stěnách v esterifikované formě (Zhou, Lauxa, Yu, (2004), Saadi a kol., 1998) [5]. Obsah vybraných fenolických kyselin v pšeničných otrubách je uveden v tabulce č. 10.

Tabulka č.: 10 Obsah fenolických kyselin v pšeničných otrubách v $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ [5].

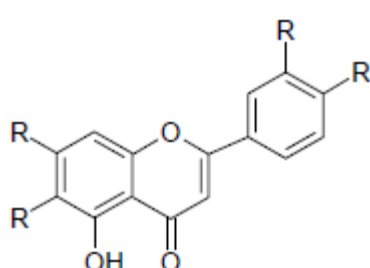
Fenolická kyselina	Otruby z červené pšenice	Otruby z bílé pšenice
Kyselina <i>p</i> -hydroxybenzoová	28,3 ± 0,9	45,5 ± 0,6
Kyselina vanilová	78,0 ± 0,3	80,8 ± 1,4
Kyselina kávová	1,78 ± 0,1	–
Kyselina syringová	182 ± 0,23	145 ± 0,16
Kyselina <i>p</i> -kumarová	46,6 ± 0,2	38,8 ± 0,1
Kyselina ferulová	2020,0 ± 0,9	1992,0 ± 5,8
Kyselina salicylová	1,88 ± 0,1	–

1.2.7.2 Flavonoidy

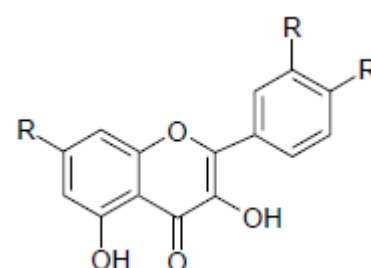
Nejčastěji se vyskytujícími polyfenoly v naší výživě jsou flavonoidy. Odhadovaný příjem flavonoidů ve výživě člověka je v rozmezí několika desítek až stovek gramů za den, v závislosti na výživových zvyklostech. Mezi hlavní skupiny flavonoidů ve výživě člověka patří flavanoly, flavanony, flavony, flavonoly, antokyanidiny, leukoantokyanidiny a izoflavonoidy. Velká část flavonoidů je v obilovinách glykosylována [25,27].



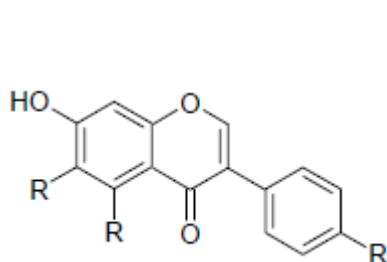
Flavanony



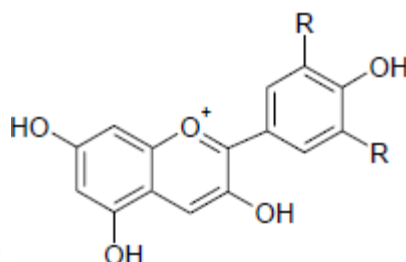
Flavony



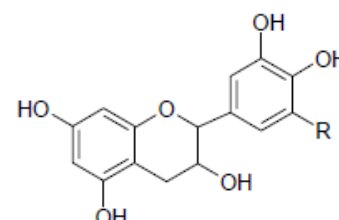
Flavonoly



Izoflavony



Antokyanidiny



Flavan-3-oly (catechiny)

Navázaným sacharidem bývá velmi často glukóza, ramnóza, méně často galaktóza, arabinóza, xylóza, glukuronová kyselina a další. Obvykle je navázána jedna sacharidová jednotka, ale mohou být i dvě, tři či více. Sacharidy mohou být dále substituovány např. malonylovou skupinou. Dominantní flavonoid ve výživě člověka je flavonol kvercetin. Kvercetin se nachází ve vysokých koncentracích v běžně přijímaných potravinách jako cibule (300 mg.kg^{-1} čerstvé váhy), jablka ($21 - 72 \text{ mg.kg}^{-1}$), kapusta (100 mg.kg^{-1}), červené víno ($4 - 16 \text{ mg.l}^{-1}$) a zelený a černý čaj ($10 - 25 \text{ mg.l}^{-1}$). V těchto zdrojích se nachází jednak ve formě volné, jednak vázán se sacharidovými jednotkami [25].

Flavonoidy se vyskytují v oplodí všech obilovin. Flavony apigenin a luteolin se vyskytují v prosu, ovsu a čiroku. V rýžových otrubách, prosu a pšenici se nacházejí nejběžněji C-glykosidy flavonů – vitelin a orientin [22]. Výsledky studie Žiliče a kol. [28] ukázaly,

že flavonoidy byly koncentrovány nejvíce v otrubách. Průměrný celkový obsah flavonoidů v otrubách pšenice seté byl zjištěn 213,04 mg.kg⁻¹ a pšenice tvrdé 259,31 mg.kg⁻¹ [28]. Obsah flavonoidů v zrnech quioni je 580 mg.kg⁻¹ a kaniwy 900 mg.kg⁻¹ [29].

I když se příjem flavonoidů potravou mezi geografickými regiony a kulturami značně liší, odhaduje se denní potřeba na 23 mg. Bylo také uvedeno, že vysoký příjem flavonoidů předpovídá nižší úmrtnost na ischemickou chorobu srdeční a nižší výskyt infarktu myokardu u starších mužů, a snižuje i riziko ischemické choroby srdeční o 38 %, u žen po menopauze [27].

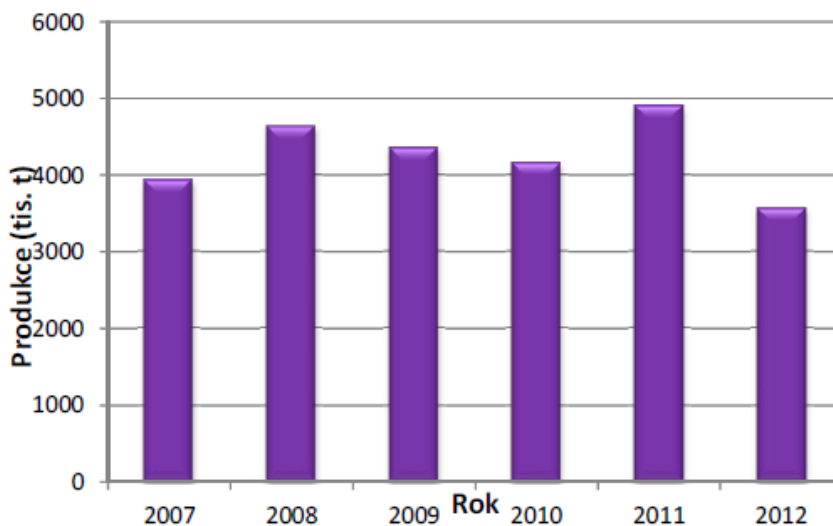
Mnoho flavonoidů bylo izolováno u čiroku, zejména antokyany. Ve studii Dykese a kol.[30] izolovali těchto šest antokyanů: kyanidin, delfinidin, malvidin, pelargonidin, petunidin a peonidin. Na rozdíl od těchto běžných antokyanů, v čiroku jsou antokyany unikátní, protože neobsahují hydroxylovou skupinu v poloze 3 C, a proto se nazývají 3- deoxyantokyany. Tato jedinečná vlastnost zvyšuje jejich stabilitu při vysoké hodnotě pH (Awika a kol., 2004; Gous, 1989; Mazza a Brouillard, 1987; Sweeney a Iacobucci, 1983) [30].

1.2.8 Produkce pšenice

Pšenice je celosvětově nejvýznamnější obilovinou zajišťující výživu lidské populace. V současné době patří podle statistik FAO a OSN (Organizace spojených národů) pšenice s rýží ke dvěma obilovinám s nejvyšším objemem produkce na světě. Z hlediska celkového objemu produkce obilovin je objem produkované pšenice přibližně stejný jako objem produkované rýže [4].

V celosvětovém měřítku jsou největšími tradičními producenty pšenice USA, Rusko, Kanada, Austrálie, Argentina a Čína. Významnými producenty se staly státy Evropské unie, které jsou nyní schopny produkovat kvalitní pšenici, která začala významně konkurovat tradičním exportérům na světovém trhu [4]. Podíl pšenice na produkci všech obilovin má dlouhodobě vzrůstající tendenci. Pšenice představuje více jak 30 % světové produkce cereálií. Vývoj celkové produkce pšenice v ČR od roku 2007 znázorňuje obrázek 2. Výrazný pokles v produkci pšenice v roce 2012 byl způsoben jednak vlivem nepříznivých povětrnostních podmínek v zimním období a dále pak vlivem sucha v jarním období. V roce 2008 vznikl velký přebytek vypěstované pšenice, což zapříčinilo prudký

pokles cen na trhu. V roce 2009 produkce výrazně poklesla, sklídilo se 4358,1 tis. tun (díky poklesu průměrného hektarového výnosu a poklesu osevních ploch jarní pšenice). I přesto zůstává pšenice dominantní plodinou, která tvoří 55,6 % nabídky všech obilovin [10].



Obr. č.:2 Vývoj celkové produkce jarní a ozimé pšenice v ČR od roku 2007 [10].

Pšenice má zcela mimořádnou kvalitu bílkovin, které jsou schopny vytvořit nakypřenější strukturu a vyšší klenbu pečeného výrobku než bílkoviny z kterýchkoliv jiných obilovin. Tato vlastnost byla příčinou značného rozšíření oblastí pěstování pšenice. Také v ČR se rozšířilo pěstování pšenice do vyšších nadmořských výšek v podhorských oblastech, kde dříve bývalo přirozenou obilovinou převážně žito a oves [3].

Pšenice (*Triticum*) zahrnuje několik druhů, hlavní jsou dva:

- pšenice obecná (*Triticum aestivum*), široce rozšířená, ze které bylo vyšlechtěno velké množství odrůd, používaných převážně v pekařské výrobě,
- pšenice tvrdá (*Triticum durum*), používaná k výrobě těstovin a pěstovaná jen v příznivých, převážně vnitrozemských oblastech [1,3].

další druhy jsou např.:

- pšenice špalda (*Triticum spelta*), má pluchaté zrno, využívána je jen místně, nyní hlavně v alternativním zemědělství pro speciální výrobky [1,3],

- pšenice nahloučená (*Triticum compactum*), je blízká pšenici obecné, klas má kompaktní,
- pšenice polská (*Triticum polonicum*), obilky nahé, velmi dlouhé, formy ozimé i jarní, hospodářsky nevýznamné,
- pšenice naduřelá (*Triticum turgidum*), obilky nahé, buclaté, oblé na průřezu a další [10].

V letech 2005 až 2011 byl sledován obsah příměsí a nečistot v rámci hodnocení sklizňové kvality potravinářské pšenice na základě rozborů 6 769 vzorků z výrobních oblastí celé České republiky. Parametr „obsah příměsí a nečistot“ nevyjadřuje přímo kvalitu zrna, ale popisuje míru znečištění zrna různými typy příměsí a nečistot. Přítomnost různých druhů příměsí a nečistot (tabulka č. 11) může snižovat výtěžnost mouky při mletí zrna nebo snižovat kvalitu získané mouky, a to jak kvalitu technologickou, tak také s ohledem na její zdravotní nezávadnost [31].

Tabulka č.: 11 Průměrný obsah příměsí a nečistot ve vzorcích potravinářské pšenice sklizené v letech 2005 – 2011 v ČR. Hodnocení podle ČSN 46 1100-2 [31].

Parametr/rok sklizně	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Příměsí a nečistoty celkem [%]	6,0	8,5	5,5	4,5	4,6	4,6	5,2
Zlomky zrn [%]	2,8	3,1	3,4	3,0	2,4	2,2	2,7
Zrnové příměsí [%]	2,0	1,6	1,5	1,2	1,2	1,2	0,7
Porostlá zrna [%]	0,6	3,1	0,0	0,0	0,0	0,6	0,6
Nečistoty [%]	0,6	0,8	0,6	0,3	1,0	0,6	1,2

Kvalita potravinářských obilovin sklizených v České republice je v laboratořích Agrotestu fyto, s.r.o. každoročně hodnocena u reprezentativního souboru vzorků pšenice a žita pocházejících ze všech pěstebních oblastí. Kvalita je hodnocena podle požadavků ČSN 46 1100-2 a ČSN 46 1100-4 kladených na zrno těchto obilovin pro potravinářské využití. Výsledky hodnocení kvality pšenice sklizně 2012 ukázaly celkově dobré hodnoty obsahu a kvality pšeničných bílkovin (13,7 – 14,1 %). Ze sklizně 2012 splnilo požadavky na jakost pekárenské pšenice ve čtyřech hodnocených parametrech (objemová hmotnost,

číslo poklesu, sedimentační index podle Zelenyho a obsah N-látek) 68 % vzorků sklizených v Čechách a 58 % vzorků sklizených na Moravě [32].

2 MILIČKA HABEŠSKÁ

Eragrostis tef (Zucc.) Trotter patří do čeledi *Poaceae*, podčeledi *Eragrostoideae*, kmene *Eragrosteae* a rodu *Eragrostis*. Rod obsahuje asi 300 druhů (Costanza 1974). Společný lidový název plodin v Etiopii je tef, který se rozšířil i do odborných publikací (např. studie Collara a Angioloniho) [33], ve kterých nahrazuje její latinský název *Eragrostis tef*, či používá termín teff flour (mouka z miličky) [33]. Pod názvem tef, někdy také teff, se milička habešská prodává i na českém trhu [33]. V rámci rodu *Eragrostis* se zdá, že 43 % druhů pochází z Afriky, 18 % z Jižní Ameriky, 12 % z Asie, 10 % z Austrálie, 9 % ze Střední Ameriky, 6 % ze Severní Ameriky a 2 % z Evropy (Costanza 1974) [34]. V rámci rodu *Eragrostis*, je *Eragrostis tef* jediný druh, který se pěstuje prvotně na produkci jako obilovina (hmotnost 100 zrn = 0,18 – 0,38 mg) pro lidskou spotřebu [35].

Několik volně rostoucích druhů rodu *Eragrostis* je využíváno v Africe dodnes. V západní Africe využívají *E. cilianensis*, *E. pilosa*, *E. gangetica*, *E. ciliaris* a *E. tremula* jako obiloviny, první druh pravidelně a ostatní v době nedostatku. Mnoho druhů z rodu *Eragrostis* jsou atraktivní i pro potravinářské provozy [34].

Etiopie není bohatá země na pěstování obilí. Tef je její přední obilovina a slouží jak pro lidskou výživu na přípravu pokrmů (průměrný výnos už v roce 1997 byl 900 kg.ha⁻¹), tak jako krmivo [36]. Vzhledem k tomu, že je po miličce vysoká poptávka a má vysokou tržní hodnotu, zemědělci vydělávají více z pěstování miličky než z pěstování jiných základních plodin. Hlavní překážka udržitelného zemědělství v Etiopii je sezónní nedostatek vody. V současných podmínkách, průměrný národní výnos miličky v suchých oblastech je nižší než 800 kg.ha⁻¹ (Teffer a kol., 2000; Balesh a kol., 2005) [37]. Tento nízký výnos je také přičítán nedostatku živin, především dusíku a fosforu (Balesh a kol., 2005). V této souvislosti je tef tradiční plodinou, která roste velmi dobře v různých stresových podmínkách, které jsou pro Etiopii typické (Boyer, 1982, Hatch, 1992) [17]. Průměrná účinnost hnojení miličky dusíkem se pohybuje v rozmezí 17 – 61 % (účinnost dusíku na růst miličky), v závislosti na typu půdy, zdroji N a klimatu (Balesh a kol., 2005) [39]. Pole pro miličku jsou navíc 3x až 6x zoraná před výsevem, v závislosti na typu půdy a klimatu (Aune a kol., 2001, Shiferaw, 1999) [40,71].

Milička představuje asi 22 % (1,68 mil. tun) hrubé produkce obilí v Etiopii a 31 % (2 110 000 ha) z celkové výměry všech hlavních obilovin pěstovaných v Etiopii (CSA, 2000) [41]. Milička zabírá v Etiopii 2,5 mil. ha, čímž se umístila jako první ze všech obilovin pěstovaných v zemi. Pěstuje se i jako zástupná záchranná obilovina v případě neúrodných let pro ostatní plodiny [35].

Milička je původní etiopský endemit a její hlavní druhová rozmanitost je k dispozici pouze v tomto státě. Nicméně, v posledních 20 letech mimořádně stoupá zájem o využití miličky mimo Etiopii, např. v Bolívii, odkud je milička dovážena také do ČR. Zároveň stoupá zájem o miličku i mimo africký kontinent. Komerční pěstování miličky začalo v několika oblastech USA, kde se pěstuje pšenice, Kanady a Austrálie, nově také v Evropě [34]. Potvrdilo se, že milička může být pěstována v mírném podnebí v severozápadní Evropě, například v Nizozemsku [38,39,40].

2.1 Chemické složení miličky

Vzhledem k výživové hodnotě semen miličky oproti jiným běžným obilovinám je milička považována za výživově hodnotnou surovinu (National Research Council, 1996) [42]. Milička je bohatá na sacharidy, vlákninu (National Research Council, 1996, USDA, 2007) [42] a obsahuje více železa, vápníku a zinku než jiné obiloviny, včetně pšenice, ječmene a čiroku (Abebe a kol., 2007.; Mengesha, 1966) [42]. Nutriční profil miličky naznačuje, že by mohla být použita při výrobě nových typů cereálních výrobků [42]. Fyzikálně-chemické vlastnosti miličky naznačují, že existuje velký potenciál pro její použití v širokém spektru aplikací potravin. Mouka z miličky má vysokou absorpční kapacitu pro vodu, která se vztahuje k vyššímu stupni bobtnání škrobů (Bultosa, 2007; Bultosa a kol., 2002) [42]. Škrob z miličky má pomalou tendenci k retrogradaci (Bultosa, Hall a kol., 2002) [42], a proto by mohl mít potenciálně pozitivní vliv na trvanlivost pečiva.

Milička je využívána pro výrobu etiopského chleba Injera [42]. Z mouky miličky, i přesto, že je bezlepková, se vyrábí tento vysoce kvalitní kvašený plochý chléb, který stárne mnohem pomaleji, nežli chléb z jiných obilovin, zejména čiroku (Taylor a Emmambux, 2008) [33]. Nahrazení až 30 % pšeničné mouky moukou z miličky v přítomnosti směsi amylolytických a jiných enzymů může vést k výrobě kvalitního chleba (Alaunyte a kol., 2012) [33].

2.1.1 Bílkoviny a aminokyseliny

Milička má vyšší množství esenciálních aminokyselin v porovnání s kukuřicí, pšenicí a čirokem (Jansen a kol., 1962) [34]. Obsah lyzinu v miličce je vyšší než u běžných obilovin, kromě rýže a ovsa. Isoleucinu, leucinu, fenylalaninu, treoninu, histidinu, argininu a metioninu je více než u ostatních běžných obilovin. Množství valinu je podobné jako u rýže. Obsah tryptofanu je obdobný jako u ovsa, rýže a čiroku [34]. Obsah aminokyselin v miličce v porovnání s jinými obilovinami je znázorněn v tabulce č. 12.

Gluteliny a albuminy jsou hlavními zásobními proteiny miličky. Obecně frakční složení proteinů miličky je následující: gluteliny 44,6 % > albuminy 36,6 % > prolaminy 11,8 % > globuliny 6,7 % (Mulugeta 1978) [34]. Milička patří mezi bezlepkové obiloviny. Pro celiaky je milička cennou složkou při výrobě výrobků bez lepku (Di Sabatino a CORAZZA, 2009) [34]. Z tohoto důvodu je zde stoupající zájem na pěstování miličky i mimo Etiopii.

Tabulka č.: 12 Obsah aminokyselin v miličce ($\text{g} \cdot 16 \text{ g}^{-1} \text{ N}$) ve srovnání s ostatními obilovinami [34].

Aminokyselina	Tef	Ječmen	Kukuřice	Oves	Rýže	Čirok	Pšenice
Lyz	3,68	3,46	2,67	3,71	3,79	2,02	2,08
Ile	4,00	3,58	3,68	3,78	3,81	3,92	3,68
Leu	8,53	6,67	12,5	7,26	8,22	13,3	7,04
Val	5,46	5,04	4,85	5,10	5,50	5,01	4,13
Phe	5,69	5,14	4,88	5,00	5,15	4,90	4,86
Tyr	3,84	3,10	3,82	3,30	3,49	2,67	2,32
Trp	1,30	1,54	0,70	1,26	1,25	1,22	1,07
Thr	4,32	3,31	3,60	3,31	3,90	3,02	2,69
His	3,21	2,11	2,72	2,10	2,50	2,14	2,08
Arg	5,15	4,72	4,19	6,29	8,26	3,07	3,54
Met	4,06	1,66	1,92	1,68	2,32	1,39	1,46
Cys	2,50	–	–	–	–	–	–

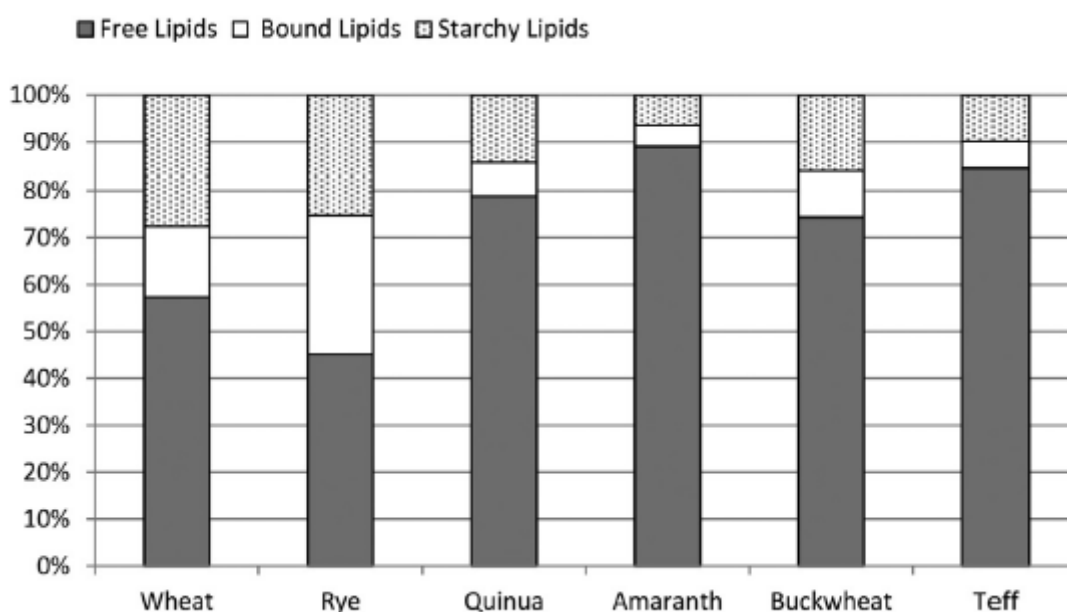
Níže uvedené hodnoty v tabulce č. 13 znázorňují množství aminokyselin v $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ v čerstvém znu miličky:

Tabulka č.: 13 Množství aminokyselin v $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ v čerstvém znu miličky [43].

Aminokyselina	His	Ile	Leu	Lyz	Met	Phe	Thr	Tyr
Obsah [$\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$]	0,301	0,497	1,067	0,373	0,424	0,694	0,507	0,455
Aminokyselina	Trp	Val	Arg	Ala	Gly	Pro	Ser	
Obsah [$\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$]	0,134	0,683	0,512	0,746	0,476	0,663	0,621	

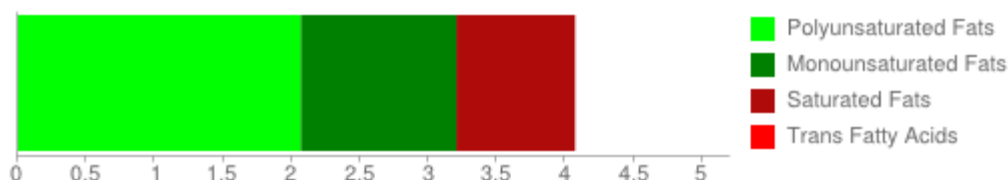
2.1.2 Lipidy

Pseudoobiloviny a mouka z miličky vykazují vyšší kvalitativní a kvantitativní profil lipidů než mouky pšeničné (Hager a kol., 2012) [33]. Obsah tuku byl zjištěn výrazně vyšší u pseudoobilovin, zejména u amarantu (5,08 %). U miličky byl zjištěn obsah tuku až kolem 4,46 %, v mouce žita pak např. 0,93 %, u pšenice 1,34 % [33]. Obsah lipidů v moukách různých obilovin je uveden na obrázku 3.



Obr. č.:3 Obsah lipidů v mouce (v %) [33].

Free lipids – volné lipidy, Bound lipids – vázané lipidy, Starchy lipids – lipidy vázané na škrobové frakce, Wheat – pšenice, Rye – žito, Quinoa – Quinoa, Amaranth – amarant, Buckwheat – pohanka, Teff – milička



Obr. č.: 4 Podíl jednotlivých forem lipidových frakcí v zrně miličky [43].

Polyunsaturated Fats – lipidy vážící polynenasycené mastné kyseliny, Monounsaturated Fats – lipidy vážící mononenasycené mastné kyseliny, Saturated Fats – nasycené mastné kyseliny, Trans Fatty Acids – *trans* mastné kyseliny, jednotky na ose x jsou uvedeny v g.100 g⁻¹

Níže uvedené hodnoty v tabulce č. 14 znázorňují obsah lipidů v g.100 g⁻¹ v čerstvém zrně miličky.

Tabulka č.: 14 Obsah mastných kyselin v g.100 g⁻¹ v čerstvém zrně miličky [43].

Mastné kyseliny	Obsah v [g.100 g ⁻¹]
Polynenasycené celkem	1,067
α-linolenová kyselina	0,134
linolová kyselina	0,932
Mononenasycené celkem	0,585
gadoleová kyselina	0,010
olejová kyselina	0,569
palmitolejová kyselina	0,003
Nasycené celkem	0,445
arachidová kyselina	0,015
behenová kyselina	0,005
palmitová kyselina	0,326
stearová kyselina	0,093

2.1.3 Sacharidy

Obsah stravitelných sacharidů v mouce z miličky se pohybuje kolem 56 – 59 %, u žitné mouky je to kolem 64 % a u pšeničné mouky pak (70 %) (Hager a kol., 2012) [33]. Ve 100 g miličky je obsaženo cca 73 g sacharidů. Tento obsah sacharidů je tvořen 8 g vlákniny, 36,6 g škrobu a 1,8 g nízkomolekulárních sacharidů, konkrétně 0,62 g sacharózy, 0,73 g glukózy, 0,47 g fruktózy a 0,005 g maltózy [43]. Ve studii Hagera a kol.[8] stanovovali obsah škrobu a vlákniny u miličky ve srovnání s jinými obilovinami, výsledky ukazuje tabulka č. 15 [8].

Tabulka č.: 15 Obsah škrobu a vlákniny ve srovnání s jinými obilovinami [8].

Obilovina	Celkový škrob [g.100 g ⁻¹]	Amylóza [% z celkového škrobu]	Celková vláknina [g.100 g ⁻¹]	Rozpustná vláknina [g.100 g ⁻¹]
Pšenice	68,06	21,10	3,44	1,34
Rýže	77,52	21,38	0,43	0,14
Oves	69,38	20,42	4,05	0,36
Quinoa	48,88	4,62	7,14	1,77
Pohanka	61,35	15,95	2,18	0,48
Čirok	73,20	18,18	4,51	0,72
Kukuřice	71,52	22,91	2,62	0,64
Milička	57,77	19,72	4,54	0,85

2.1.4 Minerální látky

U osiva miličky je podíl popela a minerálních látek vyšší v oplodí než v endospermu (Mulugeta 1978) [34]. Milička má zejména vyšší obsah Fe (Abraham a kol. (1980), Abebe a kol., 2007; Verdonschot a kol., 2008.) [34], obsahuje také o něco více vápníku, mědi, zinku, hliníku a baria oproti pšenici ozimé, ječmeni či čiroku (Melak Hail 1966) [34]. Obsah minerálních látek ve 100 g zrna miličky je kolem 2,42 g, z toho je 0,34 g vápníku, 0,01 g železa a manganu, 0,35 g hořčíku, 0,82 g fosforu a draslíku, 0,02 g sodíku, 0,007 g zinku, 0,001 g mědi a 0,008 g selenu [43]. Ve studii Hagera a kol.[8] stanovovali obsah minerálních látek miličky v porovnání s jinými obilovinami [8]. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 16.

Tabulka č.: 16 Obsah minerálních látek miličky ve srovnání s jinými obilovinami v mg.kg⁻¹ [8].

Prvek	Pšenice	Rýže	Oves	Quinoa	Pohanka	Čirok	Kukuřice	Tef
Vápník	1797,7	50,7	224,3	497,3	148,2	97,6	33,2	1543,0
Hořčík	244,0	338,0	392,7	2299,0	1736,0	849,7	315,7	1689,7
Sodík	38,1	15,1	16,7	37,0	10,8	4,9	4,8	59,8
Draslík	1520,3	973,7	1743,7	5537,7	4022,7	2581,0	1487,0	3827,7
Železo	13,4	6,0	16,4	53,5	28,5	26,7	9,1	85,3
Měď	1,5	2,2	2,7	7,7	5,1	1,8	0,9	9,3
Mangan	8,2	7,3	27,7	13,5	11,8	11,3	1,5	34,5
Zinek	7,5	17,8	11,3	32,7	18,8	10,0	6,6	41,5
Chlorid	825,6	350,6	670,0	433,8	144,0	401,8	484,2	481,0
Fosfor	908,7	954,7	1476,0	4415,7	2787,0	1631,0	813,7	3617,0

Fytáty vážou některé minerální látky a ty jsou pak naším tělem špatně stravitelné nebo je nelze vůbec vstřebat. Fytát chelatuje kovové ionty, zejména zinku, ale také železa a vápníku, které tvoří nerozpustné komplexy v gastrointestinálním traktu, které nemohou být tráveny a absorbovány u lidí z důvodu absence střevních fytázových enzymů (Iqbal a kol., 1994) [44]. Ve studii Abebeho a kol. [44] stanovovali obsah vápníku, zinku, železa a fytátu v tmavé červené a bílé miličce a v dalších vybraných obilovinách pěstovaných v jižní Etiopii [44]. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 17.

Tabulka č.: 17 Obsah zinku, železa, vápníku a fytátu v miličce a ve výrobcích z ní v mg.100 g⁻¹ [44].

	Zinek	Železo	Vápník	Fytát
Červený typ miličky	4,02	> 150,00	155,00	675,00
Bílý typ miličky	2,86	37,70	124,00	842,00
Směs červené a bílé miličky	3,86	> 150,00	147,00	528,00
Nekynuté těsto z miličky	1,38	6,80	65,00	139,00
Injera: kynuté těsto z bílé miličky	1,11	6,80	36,00	102,00
Injera: kynuté těsto ze směsi červené a bílé miličky	0,93	7,00	35,00	36,00
Injera: kynuté těsto z červené miličky	1,75	70,90	76,00	117,00

Jedním ze zajímavých zjištění této studie byl vysoký a variabilní obsah železa jak u samotné miličky, tak u Injery, kvašeného chleba připraveného z kynutého těsta miličky [44].

2.1.5 Vitaminy

Níže uvedená tabulka č. 18 ukazuje vybrané vitaminy a jejich obsah ve 100 g miličky. Nejvyšší zastoupení má vitamin B₃ (3,362 mg.100g⁻¹) a vitamin K (1,896 mg.100g⁻¹). Další obsah vitaminů jde v následujícím pořadí: vitamin B₅ > vitamin B₆ > vitamin B₁ > vitamin B₂ > vitamin E [43].

Tabulka č.: 18 Obsah vitaminů v miličce habešské v mg.100 g⁻¹ [43].

Vitamin	Obsah v mg.100 g ⁻¹
Vitamin E (α-tokoferol)	0,07
Vitamin K	1,89
Vitamin B ₁	0,38
Vitamin B ₂	0,26
Vitamin B ₃	3,36
Vitamin B ₅	0,93
Vitamin B ₆	0,48

2.1.6 Fenolické látky v miličce habešské

Jako antioxidanty mohou polyfenoly chránit buněčné složky před oxidačním poškozením a mohou omezit riziko vzniku různých degenerativních onemocnění spojených s oxidačním stresem. Z tohoto důvodu je větší zájem o zvýšení množství polyfenolů v potravinách (Alvarez-Jubete a kol., 2010) [8]. Pohanková mouka ukázala nejvyšší obsah polyfenolů a hned následuje milička. Ve studii Hagera a kol.[8] stanovovali celkový obsah polyfenolů mezi různými druhy obilovin. Celkový obsah polyfenolů byl významně vyšší u pohanky (465,47 mg.100 g⁻¹) a miličky (175,65 mg.100 g⁻¹) a v tomto pořadí se obsah snižoval: pohanka > milička > čirok > kukuřice > quinoa. Pšenice, rýže a oves měly podstatně nižší hodnoty (tabulka č. 19) [8].

Tabulka č.: 19 Obsah celkových polyfenolů v různých druzích obilovin v mg.100 g⁻¹[8].

	Pšenice	Rýže	Oves	Quinoa	Pohanka	Čirok	Kukuřice	Milička
Obsah polyfenolů	13,04	14,16	22,16	78,24	465,47	103,30	97,85	175,65

Proso obsahuje převážně volné a konjugované formy fenolických kyselin, které obsahují deriváty hydroxybenzoové a hydroxyskořicové kyseliny. Fenolické kyseliny a flavonoidy se nacházejí v různých částech zrna a obsah a složení se liší v závislosti na druhu prosa

(Chandrasekara a Shahidi, 2011, Shirley, 1998) [45]. Čirok a proso obsahují fenolické kyseliny, které se nacházejí v oplodí, aleuronové vrstvě a endospermu (Hahn a kol., 1984; McDonough a kol., 1986) [30]. Některé odrůdy prosa mají tmavě hnědou nebo červenou strukturu, která je s největší pravděpodobností pigmentem osemení, které obsahuje kondenzované taniny. Prosa s tmavě hnědou nebo červenou barvou mají vyšší obsah fenolů a taninů než bílé odrůdy (Ramachandra a kol., 1977) [30]. V miličce, která je velmi často nutričně srovnávaná s prosem, byly stanoveny taniny a různé barevné pigmenty, jejichž chemická struktura není ještě dodnes všechna známa.

2.1.7 Využití miličky jako obiloviny pro lidskou výživu

V Etiopii je milička tradičně pěstována jako obilovina. Zrno se mele na mouku, která se používá hlavně pro výrobu místního již zmiňovaného chleba „Injera“ a někdy i pro výrobu kaše. Chléb Injera je připraven z mouky z miličky. Dále lze mouku z miličky smíchat s jinými obilovinami jako je ječmen, pšenice, kukuřice nebo čirok. Zrno se také používá k výrobě místních alkoholických nápojů, tzv. tela a katicala. Sláma miličky se používá jako kompozit k vyztužení bahna a sádrové stěny, ze kterých se budují typické sklady s názvem Gotera [34].

Povědomí spotřebitelů o zdravotních výhodách zrn miličky vede k rostoucí poptávce po zdravějších výrobcích z obilovin, či je nastíněna myšlenka přidavku mouky z miličky pro prodloužení čerstvosti případného pečiva kvůli pomalejší retrogradaci škrobu. Začlenění celých zrn do chleba či hlavně mouky z miličky, je slibný způsob, jak produkovat nové potravinářské výrobky [42].

Začlenění miličky jako komponenty do chleba je náročný úkol pro technology. Zrna miličky neobsahují proteiny tvořící lepek, který je důležitý pro výrobu chleba s jemnou otevřenou strukturou. Kvůli vylepšení kynoucí technologie ke zlepšení vlastností chleba s přidavkem miličky byly použity různé enzymy (xylanázy, α -amyláza, glukózooxidázy, lipázy). Technologové využili tyto enzymy pro zlepšení těsta a kvalitativní parametry chleba jako je např. časový vývoj těsta, objem bochníku a pevnost pšeničných chlebů s přidavkem žitných otrub (Laurikainen a kol., 1998) [42]. Kombinací kvásku a vybraných enzymů bylo prokázáno, že mají pozitivní vliv na objem bochníku chleba a na jeho skladovatelnosti (Di Cagno a kol., 2003; Katina, Salmenkallio-Marttila a kol., 2006 ; Martinez-Anaya a kol., 1998) [42]. Obecně ale platilo, že vyšší přidavek mouky z miličky

(cca 20 – 30 %) měl na kvalitu těsta spíše negativní vliv (Ben - Fayed a kol., 2008 ; Mohammed a kol., 2009) [42]. Tyto chleby měly nižší specifické objemy a vyšší drobivost a vykazovaly i horší sensorické výsledky. Ovšem naopak přidavek mouky z miličky cca v rozmezí 5 – 10 % měl naopak výborný sensorický profil vzhledem k chlebu vyrobenému pouze z pšeničné mouky (Ben-Fayed a kol., (2008) a Mohammed a kol., (2009.) [42].

3 PRINCIPY METOD POUŽITÝCH V EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI

3.1 Spektrofotometrie

Absorpční spektrofotometrii řadíme mezi spektrální metody využívané především ke stanovení koncentrace látek v roztoku [46]. Absorbance vzorku se mění s vlnovou délkou záření a závisí i na počtu absorbujících částic v dráze paprsku, tedy na koncentraci částic a na tloušťce vrstvy, kterou paprsek prochází. Závislost T (transmitance), resp. A (absorbance) na vlnové délce při konstantní koncentraci látky a tloušťce vrstvy představuje absorpční spektrum látky, které je charakteristické pro tuto látku. Pro zjištění koncentrace je důležitý vztah mezi ní a tloušťkou vrstvy a hodnotou absorbance měřené při určité vlnové délce. Tento vztah matematicky popisuje Lambert-Beerův zákon:

$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot b \cdot c \quad (1)$$

kde A je absorbance roztoku dané látky při vlnové délce λ , ε_{λ} je molární absorpční koeficient látky při vlnové délce λ [$\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$], b je tloušťka absorpční vrstvy [cm] a c je látková koncentrace dané látky v roztoku [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$].

Molární absorpční koeficient závisí na vlnové délce, na druhu rozpouštědla a na přítomnosti dalších látek. Někdy závisí i na koncentraci samotné stanovované látky, např. když tato látka podléhá v analyzovaném roztoku rovnovážným reakcím (disociaci, asociaci, tvorbě komplexu s jinou látkou aj.), které vedou ke vzniku částic s odlišnými hodnotami ε_{λ} . V těchto případech Lambert-Beerův zákon neplatí a při kvantitativní analýze je třeba s uvedenými vlivy počítat [47].

Při spektrofotometrických stanoveních koncentrací analytů se vychází z kalibračního grafu, kdy se připraví standardní roztok a jeho ředěním řada kalibračních roztoků. Naměřené hodnoty např. absorbance se vynesou do grafu jako závislost absorbance kalibračních roztoků na jejich koncentraci. Závislost je lineární pro rozsah koncentrací, ve kterém platí Lambert-Beerův zákon [48]. Absorbance je bezrozměrná veličina lineárně závislá na látkové koncentraci absorbující látky. Veličina, vyjadřující frakci světla pohlceného v kyvetě poměrem intenzity světla I_0 , které vstupuje do kyvety a intenzity světla I vystupujícího, se nazývá transmitance. Vypočítá se ze vztahu [46]:

$$T = I / I_0 \quad (2)$$

Množství absorbovaného záření určité vlnové délky se vyjadřuje v jednotkách absorbance, což je záporně vzat logaritmus transmitance. Absorbance je definována vztahem:

$$A = -\log T = \log (I_0 / I) \quad (3)$$

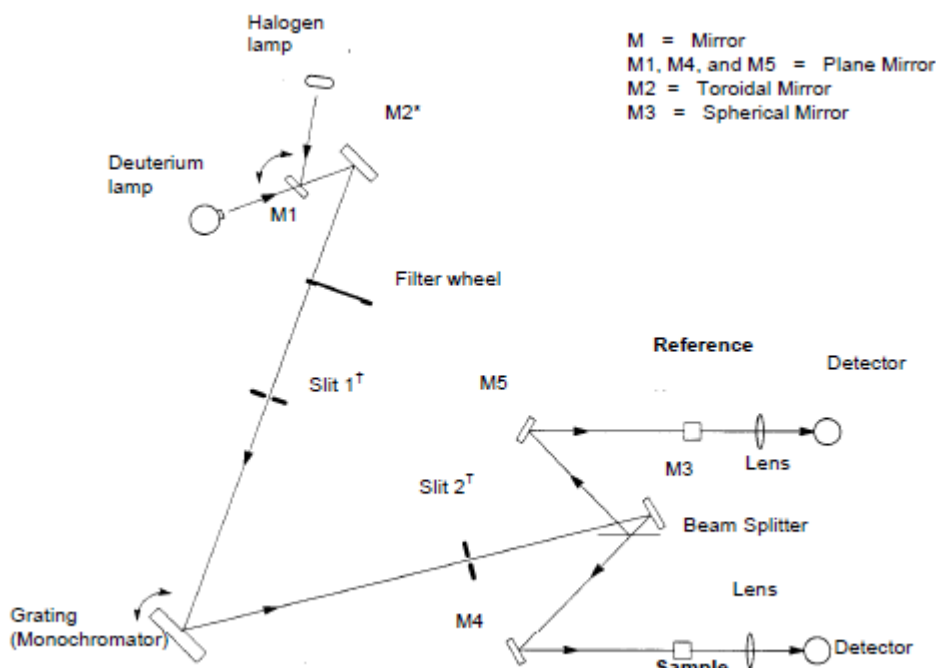
3.1.1 Základní části spektrofotometru

Absorpční spektrofotometr je tvořen čtyřmi základními částmi: zdrojem záření, monochromátorem, absorpčním prostředím a detekčním systémem. Zdrojem spojitého elektromagnetického záření pro viditelnou oblast je wolframová nebo halogenová žárovka. Monochromátor je tvořen vstupní a výstupní štěrbinou, rozkladným prvkem a zrcadlovou nebo čočkovou soustavou. Rozkladným prvkem může být hranol nebo reflexní mřížka. Absorpční prostředí tvoří kyveta s měrným, příp. srovnávacím roztokem. Materiál kyvet se řídí měřenou oblastí spektra. Pro viditelnou oblast jsou okénka kyvety ze skla. Absorpční prostředí tvoří většinou roztok látky ve vhodném rozpouštědle. Detekční systém je složen z detektoru záření a elektronického zařízení na zpracování jeho odezvy. Detektor převádí zářivý tok na elektrický signál. Pro detekci záření ve viditelné oblasti se používají fotonky nebo fotonásobiče, selenové hradlové fotočlánky, fotoodpory apod. [49].

3.1.1.1 Spektrofotometr Lambda 25

Lambda 25 je spektrofotometr pracující v ultrafialové a viditelné oblasti, je dvoupraprskový a vše odrážející systém. Je použitelný v široké škále aplikací. Jeho jednotlivé optické komponenty jsou potaženy oxidem křemičitým pro dlouhou životnost. Jako monochromátor je použita holografická mřížka. Jsou zde dva zdroje záření, deuteriová lampa a halogenová lampa, zrcadlo Z1 na obrázku (5) odráží záření z halogenové žárovky na zrcadlo Z2. Současně zrcadlo Z1 blokuje záření deuteriové žárovky. Pro provoz v ultrafialové oblasti je umožněno záření deuteriové lampy na zrcadlo Z2 zvýšením zrcadla Z1. Záření ze zdroje světla se odráží od zrcadla Z2 prostřednictvím optického filtru na filtrové kolo, poháněné krokovým motorem. Z optického filtru záření prochází vstupní štěrbinou (štěrba 1) monochromátoru. Rotační poloha mřížky účinně vybere segment spektra odrážející tento segment přes výstupní štěrbinu (štěrba 2) na zrcadlo Z3. Tato štěrba omezuje spektrum segmentu na téměř monochromatický svazek záření. Od zrcadla Z3 je záření odráženo na tzv. rozdělovač, díky němuž 50 % záření směřuje na rovinné zrcadlo Z4 a dalších 50 % na rovinné zrcadlo Z5. Od zrcadla Z4 je radiační paprsek zaměřen na kyvetu se vzorkem a následně prochází vypouklou čočkou na fotodiody

detektoru. Od zrcadla Z5 se paprsek odráží na referenční kyvetu a následně také projde vypouklou čočkou směrem na fotodiody detektoru [50].



Obr. č.: 5 Optická dráha spektrofotometru Lambda 25 [50]

Halogen lamp – halogenová žárovka, Deuterium lamp – deuteriová žárovka, Filter wheel – filtr, Grating (monochromátor) – mřížka (monochromátor), Detector – detektor, Lens – objektiv, Beam Splitter – dělič paprsku, Mirror – zrcadlo, Plane mirror – rovinné zrcadlo, Toroidal mirror – toroidní zrcadlo, Spherical mirror – kulaté zrcadlo

3.2 Stanovení polyfenolů Folin-Ciocalteuovou metodou

Stanovení polyfenolů Folin-Ciocalteuovým činidlem je spektrofotometrická metoda, při níž se měří absorbance jednotlivých vzorků s následným zjištěním koncentrace celkových polyfenolů. Kvantitativní stanovení fenolických sloučenin pomocí Folin-Ciocalteuova činidla je rozšířená a běžně používaná metoda. Při reakci dochází k oxidaci fenolických sloučenin v zásaditém prostředí a změně barvy ze žluté na modrou. Tyto modré pigmenty mají maximální absorpci v závislosti na kvalitativním a/nebo kvantitativním složení fenolových směsí a na pH roztoku, které se upravuje obvykle přidáním uhličitanu sodného. Přestože tato metoda se běžně používá, bývá různě modifikována (např. počáteční a konečnou koncentrací uhličitanu sodného, pořadím přidavku reakčních složek včetně jejich přidavkem v daném časovém intervalu, teplotou inkubace reakční směsi apod.)

[26,28,51,52,53,58,59]. Singleton a kol. [51] uvádí, že použití jiných rozpouštědel než je voda může negativně zasahovat do vzniku modrého pigmentu. Podle Singletona, se většinou provádí stanovení s konečnou koncentrací alkoholu, která není vyšší než 1 % a uhličitan sodný je v podobě 20% roztoku [51].

3.2.1 Folin-Ciocalteuovo činidlo

Fenoly (neselektivně mono- i polyfenoly) jsou v alkalickém prostředí oxidovány Folin-Ciocalteuovo činidlem. Toto činidlo je tvořeno směsí kyselin fosforečno-wolframové ($H_3PW_{12}O_{40}$) a kyseliny fosforečno-molybdenové ($H_3PMo_{12}O_{40}$), které se po oxidaci fenolů redukují na směs (polymerní komplex) modrých oxidů wolframu (W_8O_{23}) a molybdenu (Mo_8O_{23}). Folin-Ciocalteuovo činidlo nereaguje specificky jen s fenoly, ale i s většinou redukujících molekul (např. kyselinou askorbovou). TPC (Total Phenolic Content, Celkový obsah fenolů) je tedy výborně korelován s ostatními testy pro stanovení antioxidační aktivity. Vytvořené modré zbarvení silně absorbuje v oblasti $\lambda = 765$ nm a je úměrné celkovému množství původně přítomných fenolových sloučenin [46].

Jako standard se používá nejčastěji např. kyselina gallová a celkový obsah polyfenolů je vyjádřen nejčastěji v ekvivalentech mg kyseliny gallové na 1 kg vzorku. Vzorky obilovin se nejčastěji extrahují v metanolu, 70% acetonu nebo ve směsi metanol:voda:kyselina chlorovodíková [54,55].

Dále jsou i jiné možnosti a specifika stanovení. V experimentu Mikulajové a kol.[56] měřili celkové množství polyfenolů v pohance, kdy bylo pipetováno 0,5 ml roztoku vzorku, 0,5 ml Folin-Ciocalteuova činidla a po třech minutách bylo přidáno 1,5 ml 20% uhličitanu sodného. Nakonec byla přidána destilovaná voda do konečného objemu 10 ml. Smícháním došlo ke vzniku modrého zbarvení důsledkem reakce fenolových sloučenin s činidlem. Intenzita modrého zbarvení byla měřena po dvou hodinách při vlnové délce 765 nm. Jako standard zde byla použita také kyselina gallová [56]. Podobně tomu bylo v experimentu Lachmana a kol., kdy pomocí Folin-Ciocalteuovy metody stanovovali obsah polyfenolů v hlízách brambor. I zde byla použita kyselina gallová jako standard [57].

3.3 Stanovení celkového obsahu flavonoidů

Ke stanovení celkového obsahu flavonoidů spektrofotometricky se běžně používá 20% etanol, $0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$ NaNO_2 , $0,3 \text{ mol.dm}^{-3}$ $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 1 mol.dm^{-3} NaOH . Měřením absorbance jednotlivých vzorků a poté jednotlivých roztoků kalibrační řady se následně vypočítá koncentrace celkových flavonoidů. Jako standardů se nejčastěji používá rutin a katechin. V rámci stanovení celkového obsahu flavonoidů spektrofotometricky jsou možné i další modifikace metody, z nichž některé jsou níže uvedeny [28,52,53].

V práci Žilić a kol. [28] stanovovali spektrofotometricky celkový obsah flavonoidů v pěti genotypech pšenice seté a pšenice tvrdé. Celkový obsah flavonoidů byl stanoven v souladu se Zhishen a kol. [28]. 50 ml 5% NaNO_2 bylo smícháno se 100 ml extraktu. Po 6 minutách se přidalo 500 ml 10% roztoku AlCl_3 . Po 7 minutách se přidal 250 ml 1 mol.dm^{-3} roztoku NaOH a směs byla odstředěna po dobu 10 minut. Absorbance supernatantu byla měřena při 510 nm proti blanku. Celkový obsah flavonoidů byl vyjádřen v ekvivalentním množství katechinu v mg na kg vzorku [28].

Afify a kol. [52] zjišťovali celkový obsah flavonoidů ve třech bílých odrůdách čiroku. Celkový obsah flavonoidů byl stanoven podle metody Nabaviho a kol. [52]. K metanolovému extraktu vzorku byla přidána destilovaná voda a 5% NaNO_2 , po 5 minutách byl přidán 10% AlCl_3 , poté za 6 minut byl přidán 1 mol.dm^{-3} NaOH a celkový objem byl doplněn na 10 ml destilovanou vodou. Absorbance vzorku byla měřena při 510 nm proti blanku. Jako standard byl použit katechin [52].

Celkový obsah flavonoidů v rýži byl stanoven dle Shena a kol., [59] modifikací dle Baoa a kol. Alikvotní podíl vhodně zředěného extraktu se odpipetuje do kónické zkumavky obsahující destilovanou H_2O a smísí se s 5% NaNO_2 . Po 5 minutách se přidá 10% $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Reakční směs se nechá stát po dobu dalších 5 minut a pak se přidá 1 ml 1 mol.dm^{-3} NaOH . Reakční směs se dobře promíchá a nechá stát po dobu 15 minut. Absorbance byla měřena při 415 nm. Celkový obsah flavonoidů byl vypočten za použití kalibrační křivky, kdy jako standard byl použit rutin. Výsledný obsah flavonoidů byl vyjádřen jako ekvivalentní množství rutinu v mg rutinu na 100 g sušiny [59].

3.4 Stanovení antioxidační aktivity

Antioxidantům v potravě se dnes věnuje velká pozornost, a to jak z hlediska jejich biologické účinnosti, tak i z hlediska jejich výskytu v různých druzích potravin. Je tomu tak proto, že se považují za faktory eliminace nebo redukce oxidačních agens, látkových i enzymatických. Kromě endogenních nízkomolekulárních antioxidantů (glutathion, kyselina močová, koenzym Q atd.) jsou v centru pozornosti látky přírodního původu, přijímané potravou. V první řadě jsou to vitaminy C, E a karotenoidy (hlavně β -karoten), v poslední době je velký význam přikládán dalším, zejména polyfenolickým látkám, jejichž zdrojem jsou zelenina, ovoce, vláknina, čaje, vína, aromatické a léčivé rostliny.

V oblasti chemické analýzy a biologického hodnocení potravin byly v posledním desetiletí vypracovány početné metody, které umožňují stanovit tzv. celkovou antioxidační aktivitu vzorku (TAC, Total Antioxidant Capacity). Jsou principiálně značně navzájem odlišné a postupně se vyvíjejí jejich modifikace. Jejich základním smyslem je charakterizovat v podmínkách blízkých fyziologickému prostředí jejich antioxidační příp. redukční účinnost jako souhrnnou vlastnost potraviny [58]. Většinu přírodních antioxidantů přijímáme jako součást složitých směsí, jejichž složky mohou reagovat s různými radikály různými mechanismy a mohou vzájemně na sebe působit synergicky i inhibičně. Proto je snaha charakterizovat antioxidační aktivitu jako schopnost směsi látek inhibovat oxidační degradaci různých sloučenin.

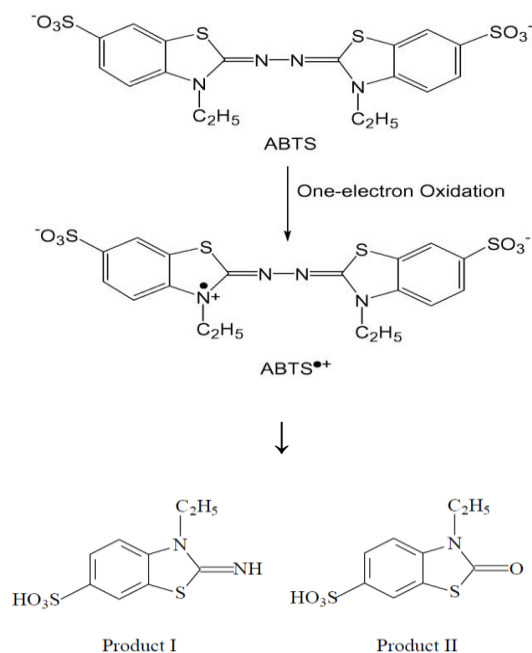
Metody stanovení mohou být kategorizovány do dvou skupin:

- metody hodnotící schopnost eliminovat radikály – sem řadíme např. metodu s využitím ABTS (2,2'-azinobis(3-etyl-2,3-dihydrobenzotiazol-6-sulfonová kyselina) a DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl). Hodnotí se eliminace syntetických stabilních radikálů.
- metody posuzující redoxní vlastnosti látek – např. FRAP (Ferric Reduction Antioxidant Power, metoda založena na redukci železitého komplexu), která odráží pouze schopnost redukovat iont Fe^{3+} a s celkovou antioxidační aktivitou nemusí korelovat. Dále může být použita např. metoda Orac (Oxygen Radical Absorbance Capacity, metoda, kdy dochází k vytvoření peroxylového radikálu β -fykoeritrinu).

Nejčastěji se antioxidační aktivita vyjadřuje jako hodnota TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, Antioxidační aktivita ekvivalentní troloxu), která udává antioxidační kapacitu vzorku ekvivalentní danému určenému množství standardu troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-dikarboxylové kyseliny) [60,61].

3.4.1 Metoda ABTS

Je jednou ze základních a nepoužívanějších metod pro stanovení celkové antioxidační aktivity. Metoda testuje schopnost vzorku zhaset kation-radikál ABTS (2,2'-azinobis (3-etyl-2,3-dihydrobenzotiazol-6-sulfonové kyseliny)). Je také označována jako metoda pro stanovení tzv. TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, Antioxidační aktivity se standardem troloxu) vzhledem k tomu, že výsledná antiradikálová aktivita vzorku je srovnávána s antiradikálovou aktivitou syntetické látky troloxu [28,52,53,59,60,62,63].



Obr. č.: 6 Generování radikálu ABTS a vznik degradačních produktů působením polyfenolů

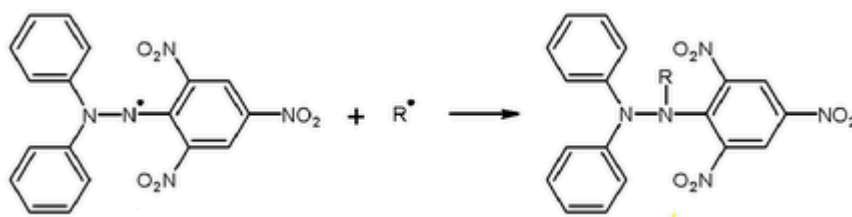
Zhášení radikálu ABTS antioxidanty, které se chovají jako donory vodíku, se sleduje spektrofotometricky na základě změn absorpčního spektra ABTS (nejčastěji se měří úbytek absorbance při $\lambda = 734$ nm). V reakční směsi se kation-radikál ABTS generuje oxidací ABTS různými sloučeninami, např. peroxodisíranem draselným, oxidem manganickým aj. Vzorek antioxidantu lze přidat do reakční směsi již pro generování radikálu, běžněji

je však přidáván k radikálu již vytvořenému. Při vlastním experimentálním měření se v této práci vychází ze studie Re a kol., kdy byl přidáván vzorek k již vytvořenému radikálu. Metoda stanovení antioxidační aktivity vzorků pomocí ABTS je jednoduchá, rychlá v provedení a má široké uplatnění, od hodnocení antioxidační aktivity látek různého původu až po směsné vzorky [60,62,64].

Nejvyužívanějšími rozpouštědly jsou voda, metanol, etanol a aceton, které jsou používány samostatně nebo v kombinaci. Jako standard se používá trolox, může být použita i kyselina askorbová nebo BHA (butylhydroxyanizol). Antioxidační aktivita se vyjadřuje jako ekvivalentní množství troloxu (vyjádřené v molárních či hmotnostních koncentracích) v 1 g či v 1 kg vzorku.

3.4.2 Metoda DPPH

Tato metoda je považována za jednu ze základních metodik pro posouzení antiradikálové aktivity čistých látek i různých směsných vzorků. Metoda spočívá v reakci testované látky s DPPH (stabilní volný radikál 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylu). V metanolovém roztoku je DPPH v radikálové formě a vykazuje silnou absorpci ve VIS spektru. Redukce DPPH antioxidantem se projevuje odbarvením roztoku. Reakce je nejčastěji sledována spektrofotometricky. Pokles absorbance při 515 nm se měří buď po uplynutí určitého konstantního času, nebo se pracuje v kinetickém režimu. Test lze provádět i na mikrotitračních destičkách [53,60,64].



Obr. č.: 7 Redukce radikálu DPPH

U směsných vzorků se radikálová aktivita někdy vyjadřuje v ekvivalentech kyseliny askorbové (např. u vzorků ovoce) nebo v jednotkách standardu troloxu [60]. Reakce radikálu DPPH musí být prováděna v organických rozpouštědlech (např. metanol a etanol), radikál ve vodném prostředí neposkytuje reprodukovatelné výsledky. Ve studii Noipa a kol. se pokusili vyvinout metodu DPPH pro hodnocení účinnosti antioxidantů ve vodném roztoku pomocí povrchových agregátů nebo micel (roztok složený z 2 mmol.dm⁻³

CTAB –cetyltrimetylamoniumbromidu) v $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ acetátovém pufru o pH 4,6. Prokázali, že takto upravené vodné prostředí může být použito pro stanovení antioxidační aktivity jak pro hydrofilní, tak pro hydrofobní antioxidanty s pomocí DPPH. Stanovení antioxidační aktivity ve vodném roztoku by mělo být přínosem pro testované biologické systémy, pro něž není vhodné prostředí alkoholu [65]. Radikálová aktivita vzorků se vyjadřuje jako ekvivalentní množství mg troloxu v 1 g či v 1 kg vzorku.

3.5 Statistická analýza

Naměřené výsledky byly podrobeny Dean-Dixonovu testu (Q-testu) pro vyloučení odlehlého výsledku. Dále byl pro statistické hodnocení využit parametrický test srovnávající střední hodnoty dvou nezávislých souborů (Studentův t-test). Pro vyhodnocení byl použit statistický program StatK25, hladina významnosti byla 95 % [66].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo vypracovat jednotlivé dílčí extrakční postupy i s optimalizací navážek vzorků a extrakčních činidel pro následné jednorázové spektrofotometrické stanovení polyfenolů, flavonoidů a antioxidačních aktivit metodami DPPH a ABTS. Extrakční postupy a optimalizace jednotlivých navážek vzorků bylo nutno vypracovat pro samotné vzorky miličky habešské, pro její směsi s pšeničnou moukou v daném poměru a pro samotné pšeničné mouky. Dále bylo úkolem u předložených vzorků nastavit zvýše zmíněné metody a následně stanovit obsah celkových polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteuova činidla za využití standardu kyseliny gallové, stanovit obsah flavonoidů spektrofotometricky za použití $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a standardu rutinu, dále u těchto vzorků stanovit antioxidační aktivitu pomocí metod s DPPH a ABTS, přičemž u metody generace radikálu ABTS využít techniku jeho úplného vygenerování a poté jeho reakce s extraktem vzorku. U metod pro stanovení antioxidační aktivity použít jako standardu trolox. Součástí zpracování experimentálních dat bylo jejich statistické zpracování, kdy se navzájem porovnají výsledky stanovení u jednotlivých vzorků miličky habešské, poté u pšeničných mouk a u směsí mouk s miličkou.

5 METODIKA PRÁCE

5.1 Použité chemikálie a pomůcky, přístrojové vybavení

5.1.1 Chemikálie

- Metanol (Ing. Petr Švec, Penta, Česká republika)
- 80% trichloroctová kyselina
- Carrez I + Carrez II (30% síran zinečnatý + 15% hexakynoželednatán draselný)
- Folin-Ciocalteuovo činidlo (Sigma Aldrich, Německo)
- 20% uhličitan sodný (Lachema, Česká republika)
- Destilovaná voda
- 20% etanol (Lachema, Česká republika)
- NaNO_2 ($0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, Česká republika)
- $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($0,3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) (Lachema, Česká republika)
- NaOH ($1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, Česká republika)
- ABTS (2,2'-azinobis(3-etyl-2,3-dihydrobenzotiazol-6-sulfonová kyselina), (Sigma Aldrich, Německo)
- DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl), (Sigma Aldrich, Německo)
- Standard troloxu (Sigma Aldrich, Německo)
- Standard rutinu (ROTICROM®~CHR)
- Standard kyseliny gallové (Acros Organics, Belgie)

5.1.2 Přístroje a zařízení

- Elektrický mlýnek a vločkovač Waldner Biotech Combi-Star (Waldner Biotech, Rakousko)
- Mikropipety s nastavitelným objemem
- Běžné laboratorní pomůcky a sklo

- Analytické váhy (Schoeller AFA-2102C, Česká republika)
- prosévačka Retsch, typ AS 200 basic
- Ultrazvuková lázeň PS 04000A (Notus – Powersonic s.r.o., Slovenská republika)
- Odstředivka (EBA 20, Hettich Zentrifugen, Německo)
- UV/VIS spektrofotometr Lambda 25 (Perkin Elmer, USA)



Obr. č.: 8 Ultrazvuková lázeň PS 04000A Obr. č.: 9 Odstředivka EBA 20

5.2 Charakteristika vzorků

5.2.1 Vzorky miličky habešské

Stanovení bylo prováděno u 4 vzorků miličky habešské, z nichž dva vzorky pocházely z Bolívie a dva z USA (státu Idaho). Vzorky miličky z Bolívie byly poskytnuty pekárnou, která se připravuje na vývoj nových pečárenských směsí. Pekárna poskytla jeden vzorek ve formě zrna, druhý ve formě mouky.



Obr. č.:10 Milička ve formě zrna (Bolívie) Obr. č.:11 Milička ve formě mouky (Bolívie)

Vzorky zrna miličky z USA byly doručeny přímo od pěstitele ze státu Idaho v deklarované bio-kvalitě, z toho jeden vzorek byl tmavý typ miličky a druhý bílý typ. Všechny vzorky byly poskytnuty v množství 2,5 – 3,5 kg.



Obr. č.: 12 Tmavý typ miličky (USA)



Obr. č.: 13 Bílý typ miličky (USA)

Vzorky zrn miličky byly rozemlety na obilném mlýnku Waldner Biotech, poté byly vzorky přesety přes síto o velikosti ok 0,25 mm (prosévačka Retsch, typ AS 200 basic), kdy propad byl cca 96 %. Poté byly vzorky nasypány do tmavých PET lahví a uzavřeny. Tyto byly skladovány v klimatizované laboratoři při 23 °C. Vzorky nebyly před vlastní chemickou analýzou skladovány déle než 3 týdny. Po tuto dobu byla monitorována vlhkost vzorků, v jejímž obsahu nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly [67].

5.2.2 Vzorky pšeničných mouk

Dále byly pekárnou poskytnuty dva vzorky pšeničných mouk. Jeden vzorek byl deklarován jako pšeničná mouka hladká původem z ČR. Druhá mouka byla deklarována jako pšeničná, hladká, původem z EU, ovšem vypěstovaná mimo ČR, bližší specifikace nebude záměrně uvedena. Množství poskytnutých vzorků bylo totožné jako u miličky, tzn. mezi 2,5 – 3,5 kg. Jednotlivé vzorky mouk byly vždy z jedné výrobní šarže. Při dodání k analýzám pekárna deklarovala, že vzorky pšenice nejsou pomlety na mouku déle než 10 dní. Bližší charakteristiky vzorků nebyly uvedeny.

5.2.3 Směsi mouk s miličkou habešskou

Dále byly testovány směsi rozemletého zrna miličky (kap. 5.2.1), příp. mouky z miličky s pšeničnými moukami poskytnutými pekárnou. Obsah miličky habešské v těchto směsích byl 5, 10, 15 a 20 hm. %, přičemž u některých stanovení byly koncentrace 5 a 15 hm. % vynechány na žádost zadavatele v průběhu analýz. Tyto směsi mouk by měly sloužit pro pilotní vývoj nových pekárenských výrobků. Směsi mouk nebyly skladovány déle než 3 týdny před samotnou analýzou. Také u směsí mouk s miličkou byla po dobu jejich skladování monitorována vlhkost vzorků, v jejím obsahu taktéž nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly [67].

5.3 Extrakce vzorků

5.3.1 Pilotní modelové extrakce vzorků

Při pilotních modelových extrakcích byla použita různá extrakční činidla jako např. metanol, 80% metanol, etanol, 80% etanol. Pak byla také použita směs metanolu a 0,1 mol.dm⁻³ HCl v poměru 99:1 [54,55,64,68].

Dále byly testovány možnosti extrakce s těmito rozpouštědly s využitím třepačky s vodní lázní, kdy teplota vodní lázně byla 40 °C a doba extrakce se pohybovala od 30 minut až do 2 hodin. Následně byly s těmito rozpouštědly provedeny extrakce za využití ultrazvukové lázně, kde se vzorky extrahovaly po dobu 30 minut a 1 hodiny.

Pro optimalizaci extrakce s následným stanovením byly také testovány různé navážky vzorků a objemy extrakčních činidel.

V pilotních modelových extrakcích bylo cílem optimalizovat navážku vzorku a objem extrakčního činidla pro danou metodu a co nejvíce zjednodušit samotné kroky úpravy získaného extraktu před vlastní analýzou (stanovením). Zároveň se vycházelo z poznatků Marešové [22].

5.3.2 Výsledná extrakce vzorků pro následné stanovení polyfenolů a flavonoidů

Pro stanovení polyfenolů a flavonoidů byla stanovena navážka vzorků miličky i směsí miličky s moukou 2,5 až 5 g s přesností na 0,1 mg. K tomuto množství vzorku bylo přidáno 10 ml metanolu. Tmavé skleněné lékovky byly poté uzavřeny a vloženy do ultrazvukové

lázně. Teplota vodní lázně byla 40 °C. Po uplynutí 1 hodiny byly lékovky vyjmuty a zchlazeny. Extrakty byly kvantitativně převedeny do centrifugačních zkumavek a umístěny do odstředivky. Odstředování probíhalo 45 minut při 3 421 g (6000 ot.min⁻¹). Pokud to bylo nutné, extrakty byly dále ředěny metanolem.

5.3.3 Výsledná extrakce vzorků pro následné stanovení antioxidačních aktivit

Pro stanovení antioxidační aktivity byla zvolena navážka miličky 1 g s přesností na 0,1 mg, u směsí mouk s miličkou pak 2 g s přesností na 0,1 mg. K těmto navážkám bylo přidáno 20 ml metanolu. Tmavé skleněné lékovky byly uzavřeny a vloženy do ultrazvukové lázně o teplotě 40 °C. Po uplynutí 1 hodiny byly lékovky vyjmuty a zchlazeny. K extraktům bylo přidáno 0,5 ml 80% trichloroctové kyseliny a 0,5 ml činidel Carrez I a Carrez II pro vyčiření vzorku. Extrakty byly kvantitativně převedeny do centrifugačních zkumavek a umístěny do odstředivky. Odstředování probíhalo 30 minut při 3 421 g (6000 ot.min⁻¹). Po odstředění byly extrakty použity pro následné spektrofotometrické stanovení. Pokud to bylo nutné, extrakty byly dále ředěny metanolem.

5.4 Stanovení polyfenolů Folin-Ciocalteuovou metodou

Do 10 ml odměrné baňky bylo pipetováno 5 ml destilované vody, k ní bylo přidáno 200 µl extraktu vzorku, 0,5 ml Folin-Ciocalteuova činidla. Poté bylo přidáno 1,5 ml 20% uhličitanu sodného a odměrná baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Následně byl vzorek promíchán a po uplynutí 30 minut bylo provedeno měření absorbance při vlnové délce 765 nm na spektrofotometru Lambda 25 oproti blanku. Z naměřených hodnot byl pomocí rovnice lineární regrese vypočítán celkový obsah polyfenolů ve vzorku, vyjádřený jako ekvivalentní množství mg kyseliny gallové v 1 kg vzorku.

5.4.1 Kalibrační křivka pro stanovení celkového obsahu polyfenolů

Jako standard byla použita kyselina gallová. Zásobní roztok byl vytvořen rozpuštěním standardu v metanolu na koncentraci 4 000 mg.l⁻¹. Ředěním byla vytvořena kalibrační řada o koncentracích 50, 100, 200, 400, 600 a 800 mg.l⁻¹.

Do 10 ml odměrné baňky bylo pipetováno 5 ml destilované vody, k ní bylo přidáno 200 µl standardu, 0,5 ml Folin-Ciocalteuova činidla. Poté bylo přidáno 1,5 ml 20% roztoku uhličitanu sodného a odměrná baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku.

Jednotlivé koncentrace byly měřeny na spektrofotometru Lambda 25 při vlnové délce 765 nm. Poté byla sestavena kalibrační křivka jako závislost absorbance (A) na koncentraci kyseliny gallové (mg.l^{-1}).

5.5 Stanovení flavonoidů

Do kádinky bylo pipetováno 8,5 ml 20% etanolu, 0,85 ml extraktu vzorku a 0,375 ml $0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$ NaNO_2 . Po 5 minutách bylo přidáno 0,375 ml $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Po dalších pěti minutách bylo přidáno 2,5 ml 1 mol.dm^{-3} NaOH . Poté byl vzorek přefiltrován přes nylonový filtr o velikosti pórů $0,45 \mu\text{m}$ a nechal se 10 minut stát. Po uplynutí 10 minut bylo provedeno měření absorbance při vlnové délce 506 nm oproti blanku. Z naměřených hodnot byl pomocí rovnice lineární regrese vypočítán celkový obsah flavonoidů ve vzorku, vyjádřený jako ekvivalentní množství mg rutinu v 1 kg vzorku.

5.5.1 Kalibrační křivka pro stanovení celkového obsahu flavonoidů

Jako standard byl použit rutin. Zásobní roztok byl vytvořen rozpuštěním standardu v metanolu na koncentraci 10 mg.l^{-1} . Ředěním byla vytvořena kalibrační řada o koncentracích 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,2 a $1,4 \text{ mg.l}^{-1}$. Jednotlivé koncentrace byly měřeny na spektrofotometru Lambda 25 při vlnové délce 506 nm. Poté byla sestavena kalibrační křivka jako závislost absorbance (A) na koncentraci rutinu (mg.l^{-1}).

5.6 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

5.6.1 Příprava radikálu ABTS

Radikál kationtu ABTS byl připraven reakcí ABTS s peroxodisíranem draselným. Do odměrné baňky o objemu 10 ml bylo naváženo 0,018 g ABTS a doplněno destilovanou vodou po rysku. K 10 ml roztoku ABTS bylo přidáno 0,2 ml roztoku peroxodisíranu draselného o koncentraci $0,06 \text{ mol.dm}^{-3}$. Ten byl připraven rozpuštěním 0,162 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ v 10 ml destilované vody. Takto připravená reakční směs byla ponechána po 16 hodin bez přístupu světla při laboratorní teplotě, s cílem vytvoření radikálu ABTS.

5.6.2 Příprava reakční směsi

Nejprve byl připraven octanový pufr smícháním 63,5 ml $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ CH_3COONa a 136,5 ml $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ CH_3COOH . Octanový pufr o pH 4,3 byl smíchán s již vytvořeným radikálem ABTS v poměru 39:1 (tj. 97,5 ml pufru a 2,5 ml roztoku ABTS). Takto připravená reakční směs byla spektrofotometricky proměřena při vlnové délce 734 nm. Jako blank byl použit octanový pufr o pH 4,3. Proměřením reakční směsi oproti tomuto blanku se získá její hodnota absorpance. Hodnota se použije pro vypočítání úbytku absorpance u jednotlivých vzorků.

5.6.3 Měření antioxidační aktivity vzorků metodou ABTS

Do kádinky bylo pipetováno 12 ml již vytvořené reakční směsi (kap. 5.6.2) a 150 μl extraktu vzorku. Směs se nechala reagovat po dobu 30 minut v temnu. Po uplynutí 30 minut byla změřena absorpance na spektrofotometru Lambda 25 při vlnové délce 734 nm. Úbytek absorpance vyjádřený v % byl pomocí rovnice lineární regrese vyjádřené z kalibrační křivky přepočten na ekvivalentní množství mmol troloxu na 1 kg vzorku.

$$A [\%] = \frac{A_0 - A_1}{A_0} * 100 \quad (4)$$

5.6.4 Kalibrační křivka pro stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Jako standard byl použit trolox. Zásobní roztok byl vytvořen rozpuštěním standardu v metanolu na koncentraci $0,04 \mu\text{mol} \cdot 25 \mu\text{l}^{-1}$. Ředěním byla vytvořena kalibrační řada o koncentracích 0,001, 0,005, 0,01, 0,015, 0,02, 0,025, 0,03 a $0,04 \mu\text{mol} \cdot 25 \mu\text{l}^{-1}$. Jednotlivé koncentrace byly přidávány ke 12 ml reakční směsi v množství 150 μl a měřeny po uplynutí 30 minut na spektrofotometru Lambda 25 při vlnové délce 734 nm. Poté ze změřených hodnot úbytků absorpance byla sestavena kalibrační křivka jako závislost absorpance na koncentraci troloxu. Následně z rovnice regrese byla vypočítána celková antioxidační aktivita vzorku vyjádřená jako ekvivalentní množství mmol troloxu na 1 kg vzorku.

5.7 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

5.7.1 Příprava zásobního a pracovního roztoku DPPH

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním 24 mg DPPH ve 100 ml metanolu. Z takto připraveného zásobního roztoku byl připraven roztok pracovní, kdy bylo smícháno 10 ml zásobního roztoku a 45 ml metanolu. Poté byl pracovní roztok spektrofotometricky proměřen proti metanolu jako blanku při vlnové délce 515 nm.

5.7.2 Vlastní měření antioxidační aktivity

Při vlastním měření vzorků bylo pipetováno do zkumavky vždy 8,55 ml pracovního roztoku DPPH a 450 μl extraktu vzorku. Vzorek byl poté ponechán 60 minut v temnu a následně byla spektrofotometricky proměřena absorbance při vlnové délce 515 nm. Úbytek absorbance byl pomocí rovnice lineární regrese přepočten na ekvivalentní množství g troloxu na 1 kg vzorku.

5.7.3 Kalibrační křivka pro stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Jako standard byl použit trolox. Zásobní roztok byl vytvořen rozpuštěním standardu v metanolu na koncentraci 800 mg.l^{-1} . Ředěním byla vytvořena kalibrační řada o koncentracích 40, 80, 120, 160 a 200 mg.l^{-1} . Jednotlivé koncentrace byly přidávány k 8,55 ml pracovního roztoku v množství $450 \mu\text{l}$ a měřeny po uplynutí 60 minut na spektrofotometru při vlnové délce 515 nm. Poté ze změřených hodnot úbytků absorbance byla sestavena kalibrační křivka jako závislost úbytku absorbance na koncentraci troloxu (mg.l^{-1}). Z rovnice lineární regrese byla vypočítána celková antioxidační aktivita vzorku jako ekvivalentní množství g troloxu v 1 kg vzorku.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Celkový obsah polyfenolů, flavonoidů a antioxidační aktivita byla měřena u vzorků miličky habešské, pšeničných mouk a jejich směsí. Měření absorbance či úbytku absorbance bylo provedeno spektrofotometricky na spektrofotometru Lambda 25. Z rovnic lineární regrese bylo následně vypočítáno množství celkových polyfenolů (vyjádřeno jako ekvivalentní množství mg kyseliny gallové v 1 kg vzorku), celkový obsah flavonoidů (vyjádřeno jako ekvivalentní množství mg rutinu v 1 kg vzorku) a celkové antioxidační aktivity (vyjádřené jako ekvivalentní množství g troloxu v 1 kg vzorku u DPPH, a v mmol troloxu v 1 kg vzorku u metody ABTS).

Vzorky byly skladované v tmavých PET lahvích v klimatizované laboratoři při 23 °C. Obsah vlhkosti skladovaných vzorků byl po celou dobu měření monitorován (ČSN ISO 712 (46 1014) a nebyly shledány statisticky významné rozdíly naměřených dat ani u jednoho se vzorků ($P \geq 0,05$) [67].

Výsledky stanovení jsou uvedeny v tabulkách, pro názornost byly ještě vybrané výsledky zpracovány graficky. Tyto je možno vidět na přílohách P II až P V .

6.1 Výsledky optimalizace extrakce vzorků

Na začátku optimalizace extrakčních postupů se vycházelo z poznatků Marešové [22]. Byla testována různá extrakční činidla a to: metanol, 80% metanol, etanol, 80% etanol a směs metanolu a $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HCl v poměru 99:1.

Navážka vzorku byla v daném extrakčním činidle extrahována vždy ve vodní lázni a také v ultrazvuku po danou dobu jako je popsáno v kapitole 5.3.1 při teplotě 40 °C. Co se týká extraktů s využitím 80% metanolu a 80% etanolu, tyto byly posléze z pilotních pokusů vyřazeny, protože vzorky se příliš kalily. U těchto vzorků bylo nutno využít jak kombinace čiření vzorků s Carezovými roztoky, tak filtraci a následné odstředění vzorků po dobu až 1 hodiny při 3 421 g. Poté byly tyto extrakty podrobeny analýzám pro stanovení polyfenolů a flavonoidů. Bohužel takto připravené extrakty se s příslušnými činidly opět kalily, tudíž nemohly být tyto extrakty pro daná stanovení použity. Při stanovení antioxidační aktivity se při metodě ABTS vytvořil také slabý zákal, což znemožnilo měřit absorbanci. Proto byla tato extrakční činidla vyřazena.

V další části optimalizace byly použity jako extrakční činidla metanol, etanol a směs metanolu a $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ HCl v poměru 99:1. Vzorky byly taktéž extrahovány po danou dobu v ultrazvuku a vodní lázni. Po extrakci bylo nutno vzorek extrahovaný ve směsi metanolu s HCl opět vyčeřit dle Careze a po dobu 1 hodiny odstředovat. Proto byla tato extrakční směs také vyloučena. Co se týkalo etanolového a metanolového extraktu, tak s těmi bylo dále pracováno. Jejich účinnost vzhledem ke způsobu extrakce (vodní lázeň, ultrazvuk), teplotě a navážce vzorku byla ověřena vždy metodou standardního přídatku.

Výsledkem optimalizace extrakce bylo použití postupů, které jsou uvedeny v metodické části v kapitolách 5.3.2 a 5.3.3.

6.2 Výsledky stanovení celkového obsahu polyfenolů

Extrakce vzorků pro stanovení celkového obsahu polyfenolů byla provedena postupem uvedeným v kapitole 5.3.2. Výsledný extrakt, popř. zředěný extrakt, byl použit k samotnému stanovení celkových polyfenolů, který byl proveden podle postupu uvedeného v kapitole 5.4. Absorbance vzorku byla měřena při 765 nm na spektrofotometru Lambda 25 oproti blanku. Výsledky stanovení jsou uvedeny v kapitolách 6.2.1, 6.2.2 a 6.2.3. Výsledky obsahu polyfenolů jsou vyjádřeny v ekvivalentních množstvích kyseliny gallové (GA) v mg na 1 kg vzorku čerstvé hmoty.

6.2.1 Výsledky stanovení obsahu polyfenolů u vzorků miličky

Výsledky stanovení obsahu polyfenolů u vzorků miličky jsou uvedeny v tabulce č. 20.

Tabulka č.:20 Výsledky stanovení obsahu polyfenolů ve vzorcích miličky

Vzorky z Bolívie:	Ø A	Koncentrace polyfenolů [mg GA.kg ⁻¹]	S.D.
Milička mouka	0,325	642,9 ^a	8,3
Milička zrno	0,687	1359,9 ^b	16,1
Vzorky z USA:			
Milička tmavá	0,441	921,2 ^c	10,4
Milička bílá	0,232	576,0 ^d	18,7

S.D. – Standard Deviation – směrodatná odchylka

Nejvyšší průměrnou koncentrací polyfenolů vykazovalo tmavé zrno miličky původem z Bolívie, a to $1359,9 \text{ mg.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$). Nejnižší průměrná koncentrace polyfenolů byla

naměřena u miličky bílé původem z USA, a to $576,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$). U tmavého zrna miličky z Bolívie a tmavé miličky z USA byly naměřeny vyšší koncentrace než u světlého typu, tj. bílé miličky z USA. V mouce z miličky, která byla původem z Bolívie, byl naměřen celkový obsah polyfenolů $642,9 \text{ mg.kg}^{-1}$. Vzhledem k tomu, že se jedná o mouku, u které nebyl deklarován případný stupeň vymletí, ani doba po kterou byla milička skladována již namletá, či podmínky, za jakých byla skladována, lze úbytek obsahu polyfenolů přičítat i kombinaci všech těchto faktorů, či některému z nich výrazněji.

Pokud bychom měli obsah polyfenolů porovnat s některými obilovinami, pak se nabízí např. studie Mikulajové a kol. [56] V tomto experimentu měřili celkové množství polyfenolů v pohance. Výsledné množství polyfenolů se pohybovalo v rozmezí 1 400 až 2 900 mg.kg^{-1} v sušině zrna, což při předpokládané obvyklé vlhkosti obilovin odpovídá přibližně rozmezí 1200 až 2 550 mg.kg^{-1} [56]. Z našich vzorků se těmto hodnotám nejvíce přibližuje tmavé zrno miličky z Bolívie. Ve studii Hagera a kol. [8] stanovovali celkový obsah polyfenolů mezi různými druhy obilovin. Celkový obsah polyfenolů byl významně vyšší opět u pohanky, a to $4 654,7 \text{ mg.kg}^{-1}$. Ihned po pohance následovala milička, u které byl naměřen obsah polyfenolů $1 756,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ a v tomto pořadí se obsah polyfenolů v analyzovaných obilovinách snižoval: pohanka > milička > čirok > kukuřice > quinoa. Z našich vzorků se výsledné hodnotě přibližuje opět tmavé zrno miličky z Bolívie [8].

6.2.2 Výsledky stanovení obsahu polyfenolů u vzorků mouk

Výsledky stanovení polyfenolů u vzorků pšeničných mouk jsou uvedeny v tabulce č. 21.

Tabulka č.:21 Výsledky stanovení obsahu polyfenolů ve vzorcích mouky

Vzorky mouk:	Ø A	Koncentrace polyfenolů [mg GA.kg ⁻¹]	S.D.
Pšeničná mouka z ČR	0,142	202,9 ^a	10,3
Pšeničná mouka z EU	0,197	263,5 ^b	10,6

S.D. – Standard Deviation – směrodatná odchylka

Nejvyšší průměrnou koncentraci polyfenolů vykazovala pšeničná mouka z EU, a to $263,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$). Nižší průměrnou koncentraci vykazovala pšeničná mouka z ČR, a to $202,9 \text{ mg.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$).

Ve studii Hagera a kol. [8] stanovovali celkový obsah polyfenolů mezi různými druhy obilovin. U vzorku pšenice stanovili obsah polyfenolů $130,40 \pm 0,23 \text{ mg.kg}^{-1}$ [8]. Studie Jubete-Alvarez a kol. udává obsah polyfenolů v zrna a klíčku pšenice a dalších obilovin. V zrna pšenice stanovili $531,0 \pm 2,8 \text{ mg.kg}^{-1}$ polyfenolů a v klíčku pak $1100 \pm 2,9 \text{ mg.kg}^{-1}$ [70]. Je samozřejmostí, že obsah polyfenolů v celém zrna bude vyšší, než ve vymleté mouce z tohoto zrna. Polyfenoly jsou totiž ponejvíce vázány v obalových vrstvách a v aleuronové vrstvě či těsně pod ní, nikoliv v endospermu zrna. Nicméně i přesto, námi stanovené množství polyfenolů odpovídá údajům z literatury, dokonce obsah polyfenolů v analyzovaných moukách je vyšší než u studie Hagera a kol. [8].

6.2.3 Výsledky stanovení obsahu polyfenolů u vzorků směsí mouk s miličkou

Výsledky stanovení obsahu polyfenolů jsou uvedeny v tabulkách č. 22, 23, 24 a 25. Obsah polyfenolů byl stanovován pouze u směsí s přítomností 5% a 15% podílu miličky pocházející z Bolívie. Milička původem z USA nebyla již testována v tomto procentuálním zastoupení. U vzorků z USA byl v rámci probíhání experimentálního měření změněn požadavek a měřila se pouze koncentrace, kdy obsah miličky ve směsích mouk byl 10 a 20 %.

Tabulka č.:22 Výsledky stanovení obsahu polyfenolů ve vzorcích směsí s 5% obsahem miličky

Vzorky z Bolívie:	Ø A	Koncentrace polyfenolů [mg GA.kg ⁻¹]	S.D.
5 % miličky mouky + mouka z ČR	0,225	230,0 ^a	8,4
5 % miličky mouky + mouka z EU	0,252	276,4 ^b	12,7
5 % zrno miličky + mouka z ČR	0,289	285,6 ^c	13,7
5 % zrno miličky + mouka z EU	0,320	330,3 ^d	11,7

S.D. – Standard Deviation – směrodatná odchylka

Nejvyšší průměrnou koncentraci polyfenolů vykazovala směs pomletého zrna miličky s pšeničnou moukou z EU, a to $330,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$) (tabulka č. 22). Nejnižší koncentraci polyfenolů vykazovala směs mouky miličky s pšeničnou moukou z ČR, a to $230,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$).

Tabulka č.: 23 Výsledky stanovení obsahu polyfenolů ve vzorcích směsí s 10% obsahem miličky

Vzorky z Bolívie:	Ø A	Koncentrace polyfenolů [mg GA.kg ⁻¹]	S.D.
10 % miličky mouky + mouka z ČR	0,229	244,5 ^a	5,9
10 % miličky mouky + mouka z EU	0,287	307,1 ^b	9,6
10 % zrno miličky + mouka z ČR	0,306	327,4 ^c	10,2
10 % zrno miličky + mouka z EU	0,355	382,2 ^d	11,9
Vzorky z USA:			
10 % milička tmavá + mouka z ČR	0,246	261,3 ^e	10,3
10 % milička tmavá + mouka z EU	0,310	335,6 ^{c,f}	10,3
10% milička bílá + mouka z ČR	0,220	234,6 ^a	10,1
10 % milička bílá + mouka z EU	0,283	301,4 ^{b,g}	11,1

S.D. – Standard Deviation – směrodatná odchylka

Nejvyšší průměrnou koncentraci polyfenolů vykazovala 10% směs pomletého zrna miličky z Bolívie s moukou z EU, a to 382 mg.kg⁻¹ ($P < 0,05$) (tabulka č. 23). Nejnižší průměrná koncentrace polyfenolů byla naměřena u 10% směsi bílé miličky z USA s moukou z ČR 234,6 mg.kg⁻¹ ($P < 0,05$) a také u 10% směsi miličky mouky smíchané s moukou z ČR (tabulka č. 23). Výsledek je v souladu i s nejnižším naměřeným obsahem polyfenolů v samotném zrnu bílého typu miličky z USA, jehož výsledek je uveden v tabulce č. 20 a také je v souladu s nízkým obsahem polyfenolů u mouky pocházející z ČR (tabulka č. 21).

10% směs mouky miličky z Bolívie s moukou z EU a 10% směs bílé miličky z USA s moukou z EU se od sebe v obsahu polyfenolů statisticky neliší ($P \geq 0,05$). Stejně tak i 10% směs pomletého zrna miličky z Bolívie s moukou z ČR a 10% směs bílé miličky z USA s moukou z EU se od sebe v obsahu polyfenolů statisticky neliší ($P \geq 0,05$) (tabulka č. 23). Dle získaných výsledků se od sebe také statisticky neliší 10% směs pomletého zrna miličky pocházejícího z Bolívie ve směsi s moukou z ČR a 10% směs tmavého zrna miličky po smíchání s moukou z EU ($P \geq 0,05$).

Tabulka č.: 24 Výsledky stanovení obsahu polyfenolů ve vzorcích směsí s 15% obsahem miličky

Vzorky z Bolívie:	Ø A	Koncentrace polyfenolů [mg GA.kg ⁻¹]	S.D.
15 % miličky mouky + mouka z ČR	0,272	275,2 ^a	10,6
15 % miličky mouky + mouka z EU	0,313	328,8 ^b	10,5
15 % zrno miličky + mouka z ČR	0,348	362,9 ^c	14,0
15 % zrno miličky + mouka z EU	0,399	416,8 ^d	14,5

S.D. – Standard Deviation – směrodatná odchylka

Nejvyšší průměrná koncentrace polyfenolů u 15% směsí byla naměřena u směsi pomletého zrna miličky s moukou z EU, a to 416,8 mg.kg⁻¹ ($P < 0,05$) (tabulka č. 24). Nejnižší průměrnou koncentraci vykazovala 15% směs mouky miličky s moukou z ČR, a to 275,2 mg.kg⁻¹ ($P < 0,05$) (tabulka č. 24). Jak je patrné z naměřených výsledků pro 15 a 10% směsí miličky původem z Bolívie (tabulky č. 23 a 24), pak vzestup obsahu polyfenolů je v těchto směsích úměrný obsahu přidávané miličky k pšeničné mouce. Tato úvaha samozřejmě vychází i z klasické bilanční rovnice pro míchání směsí, nicméně svědčí také o dobrém nastavení extrakčního postupu a vypracování samotné metodiky, což bylo hlavním úkolem experimentální části.

Tabulka č.: 25 Výsledky stanovení obsahu polyfenolů ve vzorcích směsí s 20% obsahem miličky

Vzorky z Bolívie:	Ø A	Koncentrace polyfenolů [mg GA.kg ⁻¹]	S.D.
20 % miličky mouky + mouka z ČR	0,281	280,2 ^a	10,2
20 % miličky mouky + mouka z EU	0,331	340,0 ^b	11,4
20 % zrno miličky + mouka z ČR	0,412	436,7 ^c	12,3
20 % zrno miličky + mouka z EU	0,482	496,6 ^d	12,8
Vzorky z USA:			
20 % milička tmavá + mouka z ČR	0,345	352,3 ^e	10,8
20 % milička tmavá + mouka z EU	0,406	415,8 ^{c,f}	13,6
20 % milička bílá + mouka z ČR	0,241	269,2 ^a	9,7
20 % milička bílá + mouka z EU	0,311	331,4 ^{b,g}	11,7

S.D. – Standard Deviation – směrodatná odchylka

Nejvyšší průměrnou koncentraci polyfenolů u 20% směsí vykazovala opět směs po-mletého zrna miličky z Bolívie s moukou z EU, a to 496,6 mg.kg⁻¹ ($P < 0,05$). Nejnižší

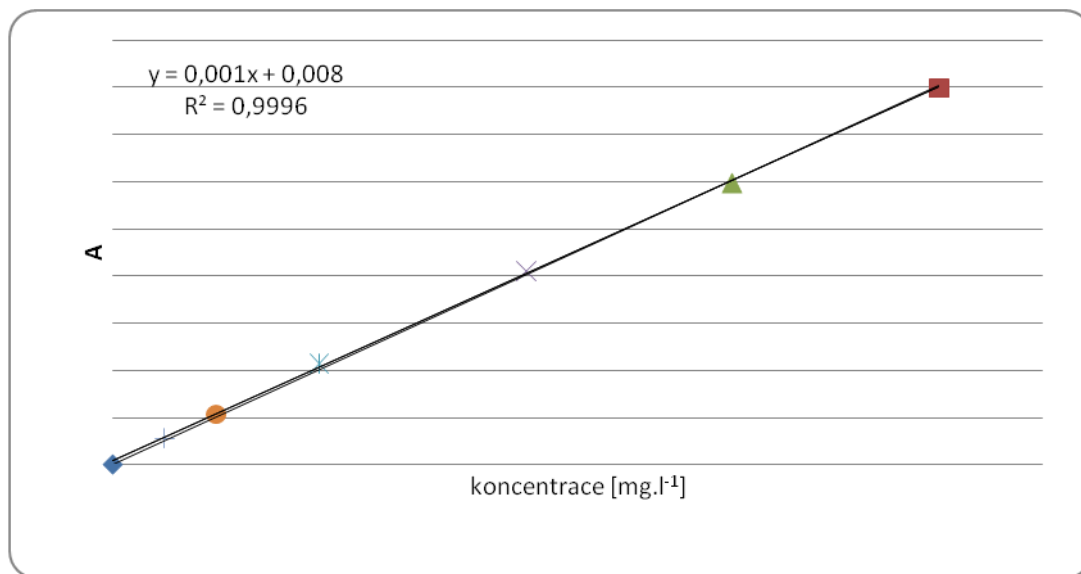
průměrnou koncentraci polyfenolů vykazovala 20% směs bílé miličky z USA s moukou z ČR, a to $269,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$) (tabulka č. 25). 20% směs mouky miličky z Bolívie s moukou z EU a 20% směs bílé miličky z USA s moukou z EU nevykazují navzájem statisticky významný rozdíl v obsahu polyfenolů ($P \geq 0,05$). Stejně tak je tomu u 20% směsi mouky z miličky smíchané s moukou z ČR a u 20% směsi složené z miličky bílé a mouky z ČR ($P \geq 0,05$). Dále, stejně jako tomu bylo u 10% směsí, tak se navzájem v obsahu polyfenolů neliší vzorky 20% směsi zrna miličky z Bolívie smíchané s pšeničnou moukou z ČR a 20% směsi tmavé miličky z USA ve směsi s moukou z EU ($P \geq 0,05$).

6.2.4 Výsledky měření kalibrační křivky pro stanovení obsahu polyfenolů

Jako standard byla použita kyselina gallová. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost absorbance na koncentraci kyseliny gallové (mg.l^{-1}) a byla sestrojena podle postupu uvedeného v kapitole 5.4.1. Hodnota spolehlivosti R^2 je 0,9992 a rovnice lineární regrese je $y = 0,001x + 0,008$. Mez detekce metody při použití standardu kyseliny gallové je za zachování podmínek uvedených v metodě 20 mg.l^{-1} .

Tabulka č.: 26 Naměřené hodnoty absorbance kyseliny gallové pro sestrojení kalibrační křivky

Koncentrace kyseliny gallové [mg.l^{-1}]	Průměrná absorbance A
0	0,000
50	0,056
100	0,107
200	0,215
400	0,411
600	0,595
800	0,798



Graf č.1 Kalibrační křivka vyjadřující závislost absorbance na koncentraci kyseliny gallové

6.3 Výsledky stanovení celkového obsahu flavonoidů

Extrakce vzorků pro stanovení celkového obsahu flavonoidů byla provedena postupem uvedeným v kapitole 5.3.2. Výsledný extrakt, popř. zředěný extrakt byl použit k samotnému stanovení celkových flavonoidů, který byl proveden podle postupu uvedeného v kapitole 5.5. Absorbance vzorku byla měřena při 506 nm na spektrofotometru Lambda 25 oproti blanku. Výsledky stanovení jsou uvedeny v kapitolách 6.3.1, 6.3.2 a 6.3.3. Výsledky obsahu flavonoidů jsou vyjádřeny v ekvivalentních množstvích rutinu v mg na 1 kg vzorku čerstvé hmoty.

6.3.1 Výsledky stanovení obsahu flavonoidů u vzorků miličky

Výsledky stanovení obsahu flavonoidů u vzorků miličky jsou uvedeny v tabulce č. 27.

Tabulka č.: 27 Výsledky stanovení obsahu flavonoidů ve vzorcích miličky

Vzorky z Bolívie:	Ø A	Koncentrace flavonoidů [mg rutinu.kg ⁻¹]	S.D.
Milička mouka	0,381	380,3 ^a	16,9
Milička zrno	0,494	491,6 ^b	22,5
Vzorky z USA:			
Milička tmavá	0,419	418,0 ^c	18,2
Milička bílá	0,275	281,3 ^d	13,9

S.D. – Standard Deviation – směrodatná odchylka

Nejvyšší průměrnou koncentraci flavonoidů vykazovalo zrno miličky z Bolívie, a to 491,6 mg.kg⁻¹ ($P < 0,05$). Nejnižší průměrnou koncentraci flavonoidů vykazovala bílá milička z USA, a to 281,3 mg.kg⁻¹ ($P < 0,05$) (tabulka č. 27). Tmavý typ miličky z USA měl obsah flavonoidů 418,0 mg.kg⁻¹, což byl druhý nejvyšší obsah.

Pokud bychom měli srovnat obsah flavonoidů v miličce s ostatními obilovinami, pak např. celkový obsah flavonoidů v barevných rýžích, stanovený dle Shena a kol. [59] pomocí kolorimetrické metody modifikované dle Baa a kol. [59], byl v rozmezí 886,0 – 2 863,0 mg.kg⁻¹. Konkrétněji průměrný obsah u červené rýže byl 1 472,0 mg.kg⁻¹ a u černé rýže 2 406,0 mg.kg⁻¹ [59]. V porovnání s miličkou jsou obsahy flavonoidů u barevných druhů rýží vyšší. Afify a kol. zjišťoval celkový obsah flavonoidů ve třech bílých odrůdách čiroku. Celkový obsah flavonoidů byl stanoven podle metod Nabaviho a kol. [52] Pomocí této studie byl zjištěn obsah flavonoidů cca mezi 450 až 600 mg.kg⁻¹. Dá se tedy říci, že obsah flavonoidů je řádově i číselně srovnatelný s obsahem flavonoidů v čiroku [52].

6.3.2 Výsledky stanovení obsahu flavonoidů u vzorků mouk

Výsledky stanovení obsahu flavonoidů u pšeničných mouk jsou uvedeny v tabulce č. 28.

Tabulka č.: 28 Výsledky stanovení obsahu flavonoidů u vzorků mouky

Vzorky mouk:	Ø A	Koncentrace flavonoidů [mg rutinu.kg ⁻¹]	S.D.
Pšeničná mouka z ČR	0,152	157,3 ^a	15,4
Pšeničná mouka z EU	0,199	203,7 ^b	28,1

S.D. – Standard Deviation – směrodatná odchylka

Nejvyšší průměrnou koncentraci flavonoidů vykazovala pšeničná mouka z EU, a to 203,7 mg.kg⁻¹ ($P < 0,05$). Statisticky nižší průměrnou koncentraci flavonoidů vykazovala pšeničná mouka z ČR, a to 157,3 mg.kg⁻¹ ($P < 0,05$) (tabulka č. 28).

Žilić a kol. [28] stanovovali spektrofotometricky celkový obsah flavonoidů v pěti genotypech pšenice seté a pšenice tvrdé. Výsledkem této studie bylo zjištěno, že v pšenici seté je 213,04 mg.kg⁻¹ flavonoidů a v pšenici tvrdé pak 259,31 mg.kg⁻¹ [28]. Obsah flavonoidů v mouce původem z EU by odpovídal naměřeným výsledkům uvedené studie, u mouky pocházející z ČR byl obsah flavonoidů naměřen výrazně nižší. Toto může být dáno také stupněm vymletí mouky či skladováním zrn pšenice před jejím mletím na mouku apod..

6.3.3 Výsledky stanovení obsahu flavonoidů u směsí mouk s miličkou

Výsledky stanovení obsahu flavonoidů u směsí miličky s pšeničnými moukami jsou uvedeny v tabulkách č. 29, 30, 31 a 32. Opět u 5% a 15% směsí byla použita pouze milička pocházející z Bolívie.

Tabulka č.: 29 Výsledky stanovení obsahu flavonoidů ve vzorcích směsí s 5% obsahem miličky

Vzorky z Bolívie:	Ø A	Koncentrace flavonoidů [mg rutinu.kg ⁻¹]	S.D.
5 % miličky mouky + mouka z ČR	0,152	162,4 ^a	5,6
5 % miličky mouky + mouka z EU	0,228	212,8 ^b	8,7
5 % zrno miličky + mouka z ČR	0,159	165,3 ^a	7,3
5 % zrno miličky + mouka z EU	0,259	220,8 ^c	7,4

S.D. – Standard Deviation – směrodatná odchylka

Nejvyšší průměrnou koncentraci flavonoidů u 5% směsí vykazovala směs pomletého zrna miličky s moukou z EU, a to 220,8 mg.kg⁻¹ ($P < 0,05$). Nejnižší průměrnou koncentraci flavonoidů vykazuje 5% směs mouky miličky s pšeničnou moukou z ČR, a to 162,4 mg.kg⁻¹, a dále také 5% směs pomletého zrna miličky ve směsi s pšeničnou moukou pocházející z ČR (tabulka č. 29) ($P \geq 0,05$).

Tabulka č.: 30 Výsledky stanovení obsahu flavonoidů ve vzorcích směsí s 10% obsahem miličky

Vzorky z Bolívie:	Ø A	Koncentrace flavonoidů [mg rutinu.kg ⁻¹]	S.D.
10 % miličky mouky + mouka z ČR	0,201	183,8 ^a	7,2
10 % miličky mouky + mouka z EU	0,220	215,7 ^b	8,3
10 % zrno miličky + mouka z ČR	0,187	190,4 ^a	7,9
10 % zrno miličky + mouka z EU	0,235	244,3 ^c	10,2
Vzorky z USA:			
10 % milička tmavá + mouka z ČR	0,209	201,2 ^d	9,7
10% milička tmavá + mouka z EU	0,240	231,6 ^e	8,5
10 % milička bílá + mouka z ČR	0,182	173,2 ^f	7,4
10 % milička bílá + mouka z EU	0,210	213,6 ^b	8,1

S.D. – Standard Deviation – směrodatná odchylka

Nejvyšší průměrnou koncentraci flavonoidů u 10% směsí vykazovala směs pomletého zrna miličky z Bolívie s moukou z EU, a to 244,3 mg.kg⁻¹ ($P < 0,05$). Nejnižší průměrná koncentrace flavonoidů byla naměřena u 10% směsi pomletého zrna bílé miličky z USA s moukou z ČR, a to 173,2 mg.kg⁻¹ ($P < 0,05$) (tabulka č. 30). 10% směs mouky miličky z Bolívie s moukou z ČR a 10% směs pomletého zrna miličky z Bolívie s moukou z ČR se od sebe statisticky neliší ($P \geq 0,05$). Dále 10% směs mouky miličky s moukou z EU a směs

pomleté bílé miličky z USA ve směsi taktéž s moukou z EU se od sebe také statisticky neliší ($P \geq 0,05$) (tabulka č. 30).

Tabulka č.: 31 Výsledky stanovení obsahu flavonoidů ve vzorcích směsí s 15% obsahem miličky

Vzorky z Bolívie:	Ø A	Koncentrace flavonoidů [mg rutinu.kg ⁻¹]	S.D.
15 % miličky mouky + mouka z ČR	0,218	210,2 ^a	9,6
15 % miličky mouky + mouka z EU	0,186	232,9 ^b	10,1
15 % zrno miličky + mouka z ČR	0,226	200,9 ^a	9,7
15 % zrno miličky + mouka z EU	0,273	258,4 ^c	10,9

S.D. – Standard Deviation – směrodatná odchylka

Nejvyšší průměrnou koncentraci flavonoidů vykazovala u 15% směsí opět směs složená ze zrna miličky s moukou z EU, a to 258,4 mg.kg⁻¹ ($P < 0,05$). Nejnižší průměrnou koncentraci flavonoidů vykazovala směs pomletého zrna miličky s moukou z ČR, a to 200,9 mg.kg⁻¹ a stejně tak směs mouky miličky s moukou pšeničnou z ČR, která měla obsah flavonoidů 210,2 mg.kg⁻¹ ($P \geq 0,05$) (tabulka č. 31). Výsledky jsou v korelaci s naměřenými daty, které jsou uvedeny v tabulce č. 29 u 5% směsí.

Tabulka č.: 32 Výsledky stanovení obsahu flavonoidů ve vzorcích směsí s 20% obsahem miličky

Vzorky z Bolívie:	Ø A	Koncentrace flavonoidů [mg rutinu.kg ⁻¹]	S.D.
20 % miličky mouky + mouka z ČR	0,219	208,3 ^a	10,2
20 % miličky mouky + mouka z EU	0,232	244,9 ^b	9,7
20 % zrno miličky + mouka z ČR	0,227	210,1 ^a	9,4
20 % zrno miličky + mouka z EU	0,269	274,0 ^c	7,8
Vzorky z USA:			
20 % milička tmavá + mouka z ČR	0,210	202,0 ^d	9,2
20 % milička tmavá + mouka z EU	0,264	251,7 ^e	10,1
20 % milička bílá + mouka z ČR	0,186	175,8 ^f	8,7
20 % milička bílá + mouka z EU	0,239	236,4 ^b	8,3

S.D. – Standard Deviation – směrodatná odchylka

Nejvyšší průměrnou koncentraci flavonoidů u 20% směsí mouk vykazovala směs pomletého zrna miličky z Bolívie s moukou z EU, a to 274,0 mg.kg⁻¹ ($P < 0,05$).

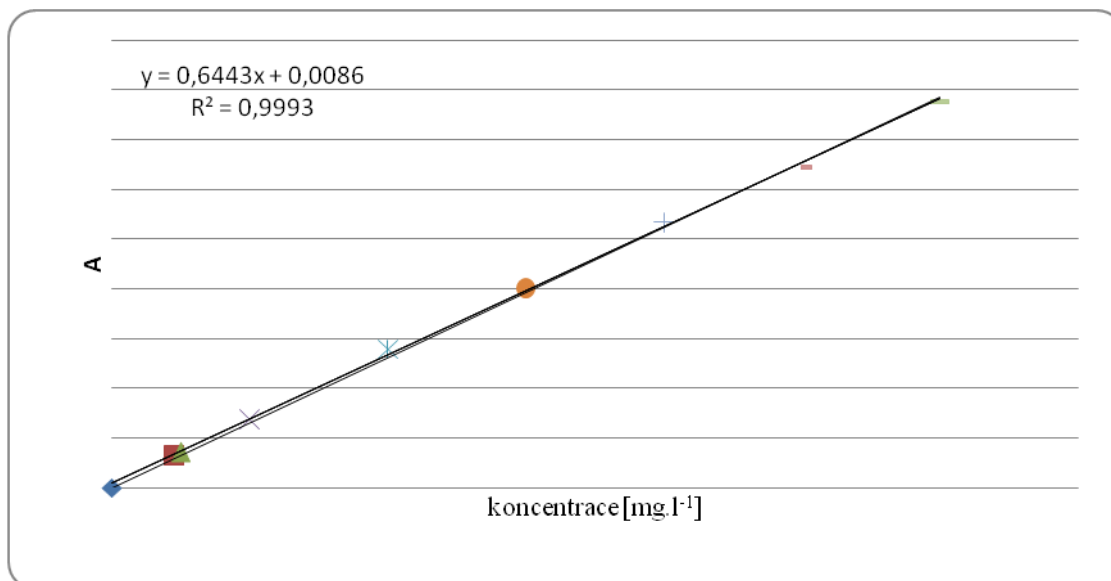
Nejnižší průměrnou koncentraci vykazovala směs pomleté bílé miličky z USA s moukou z ČR, a to $175,8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($P < 0,05$). Směs mouky miličky z Bolívie s moukou z ČR a směs pomleté miličky z Bolívie a mouky z ČR se statisticky navzájem neliší v obsahu flavonoidů ($P \geq 0,05$). Dále není statisticky významný rozdíl mezi 20% směsí mouky z miličky pocházející z Bolívie ve směsi s pšeničnou moukou z EU a také mezi 20% směsí tvořenou bílou miličkou a moukou z EU ($P \geq 0,05$). Výsledky jsou taktéž v korelaci s naměřenými daty uvedenými v tabulce č. 30.

6.3.4 Výsledky měření kalibrační křivky pro stanovení obsahu flavonoidů

Jako standard byl použit rutin. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost absorbance na koncentraci rutinu ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a byla sestrojena podle postupu uvedeného v kapitole 5.5.1. Hodnota spolehlivosti R^2 je 0,9994 a rovnice lineární regrese je $y = 0,6414x + 0,0099$. Mez detekce metody při použití standardu rutinu je za zachování podmínek uvedených v metodě $0,09 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Tabulka č.: 33 Naměřené hodnoty absorbance rutinu pro sestrojení kalibrační křivky

Koncentrace rutinu [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	Průměrná absorbance A
0	0,000
0,1	0,070
0,2	0,137
0,4	0,278
0,6	0,400
0,8	0,533
1,0	0,643
1,2	0,776
1,4	0,904



Graf č.2 Kalibrační křivka vyjadřující závislost absorbance na koncentraci rutinu

6.4 Výsledky stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Extrakce vzorků pro stanovení antioxidační aktivity byla provedena postupem uvedeným v kapitole 5.3.3. Výsledný extrakt, popř. zředěný extrakt byl použit k samotnému stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS, která byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 5.6. Nejprve byla proměřena reakční směs uvedená v kapitole 5.6.2 proti pufru. Poté byla absorbance vzorku měřena při 734 nm na spektrofotometru Lambda 25 proti pufru. Výsledky stanovení jsou uvedeny v kapitolách 6.4.1, 6.4.2 a 6.4.5. Úbytek absorbance vyjádřený v % byl pomocí rovnice lineární regrese vyjádřené z kalibrační křivky přepočten na ekvivalentní množství mmol troloxu na 1 kg vzorku.

6.4.1 Výsledky stanovení antioxidační aktivity u vzorků miličky metodou ABTS

Výsledky stanovení antioxidační aktivity u miličky jsou uvedeny v tabulce č. 34.

Tabulka č.:34 Výsledky stanovení antioxidační aktivity u miličky metodou ABTS

Vzorky z Bolívie:	Ø úbytek A [%]	TAA [mmol troloxu.kg ⁻¹]	S.D.
Milička mouka	14,86	6,26 ^a	0,21
Milička zrno	19,71	8,30 ^b	0,25
Vzorky z USA:			
Milička tmavá	24,87	10,46 ^c	0,31
Milička bílá	15,13	6,35 ^a	0,23

S.D. – Standard Deviation – směrodatná odchylka

TAA – Total Antioxidant Activity – celková antioxidační aktivita

Metodou ABTS byla u miličky tmavé z USA zjištěna nejvyšší celková antioxidační aktivita s průměrnou hodnotou 10,46 mmol.kg⁻¹ ($P < 0,05$). Naopak nejnižší celková antioxidační aktivita byla zjištěna u mouky miličky z Bolívie, a to 6,26 mmol.kg⁻¹ a také u vzorku bílé miličky pocházející z USA, kde hodnota antioxidační aktivity byla 6,35 mmol.kg⁻¹ ($P < 0,05$). U vzorku tmavé miličky z Bolívie byla zjištěna antioxidační aktivita 8,30 mmol.kg⁻¹. Obecně u tmavého zrna miliček byly naměřeny vyšší antioxidační aktivity než u bílého typu miličky. Toto je i v souladu s vyšším obsahem polyfenolů a flavonoidů u tmavých miliček v porovnání s miličkou s bílou obalovou vrstvou zrna. Polyfenoly a flavonoidy jsou totiž pokládány za skupiny látek s vysokými antioxidačními účinky. Nicméně jak lze pozorovat z naměřených výsledků, nejvyšší hodnoty polyfenolů a flavonoidů byly naměřeny vždy v tmavém zrna miličky, které pocházelo z Bolívie (tabulky č. 20 a 27). Dalo by se tudíž logicky předpokládat, že také zrno miličky pocházející právě z Bolívie bude vykazovat nejvyšší hodnotu antioxidační aktivity, což se tady nepotvrdilo (tabulka č. 34). Lze tudíž předpokládat, že milička pocházející z USA, která má sice nižší obsah polyfenolů a flavonoidů, s velkou pravděpodobností obsahuje jinou skupinu antioxidantů, které se podílejí na příslušné antioxidační aktivitě. Mohou sem patřit např. karotenová či xantofylová barviva, vyšší obsahy minerálních látek jako je např. Zn, Se apod., které se právě v obilovinách pocházejících z USA či Kanady hojně vyskytují. Zároveň také nejsou blíže známy podmínky skladování a technologického ošetření zrn miliček, které může mít také významný vliv na hodnotu antioxidační aktivity.

Ve studii Ragaeho a kol. [63] se zaměřili na stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS a DPPH u pšeničné mouky a celých zrn obilovin jako ječmen, proso, žito a čirok. U obilovin byla metodou ABTS naměřena v této studii tato antioxidační aktivita: ječmen 14,9 mmol.kg⁻¹, proso 21,4 mmol.kg⁻¹, žito 13,0 mmol.kg⁻¹ a čirok 51,7 mmol.kg⁻¹ [63]. Námi naměřená antioxidační aktivita miličky je nižší než hodnoty antioxidačních aktivit zjištěné v této studii. Na první pohled by se dala milička porovnat s antioxidační aktivitou v žitu. Nicméně je nutno konstatovat, že srovnávání jednotlivých výsledků u metody ABTS je velmi problematické, záleží totiž striktně na podmínkách metody. Mění se totiž obvykle doba, po kterou reaguje vzorek s vytvořeným radikálem ABTS, je různý způsob generace radikálu ABTS, používají se různé standardy apod. [28,52,59,63].

6.4.2 Výsledky stanovení antioxidační aktivity u vzorků mouk

Výsledky stanovení antioxidační aktivity u vzorků pšeničných mouk jsou uvedeny v tabulce č. 35.

Tabulka č.:35 Výsledky stanovení antioxidační aktivity u mouk metodou ABTS

Vzorky mouk:	Ø úbytek A [%]	TAA [mmol troloxu.kg ⁻¹]	S.D.
Pšeničná mouka z ČR	0,54	0,11 ^a	0,01
Pšeničná mouka z EU	10,93	2,30 ^b	0,08

S.D. – Standard Deviation – směrodatná odchylka

TAA – Total Antioxidant Activity – celková antioxidační aktivita

Metodou ABTS byla u pšeničné mouky z EU zjištěna nejvyšší celková antioxidační aktivita s průměrnou hodnotou 2,30 mmol.kg⁻¹ ($P < 0,05$). Naopak statisticky nejnižší celková antioxidační aktivita byla zjištěna u pšeničné mouky z ČR, a to 0,11 mmol.kg⁻¹ ($P < 0,05$). U vzorků pšeničných mouk je již na první pohled patrný velký rozdíl v hodnotách antioxidačních aktivit. Toto je s velkou pravděpodobností způsobeno výskytem karotenoidních a xantofylových barviv v endospermu pšenice pocházející z EU. Již na první pohled byla tato mouka nažloutlá, kdežto mouka pocházející z ČR byla bílá.

Ve studii Ragaeho a kol. [63] měřili antioxidační aktivity metodami ABTS a DPPH u pšeničné mouky a celých zrn obilovin. U pšeničné mouky byla metodou ABTS naměřena tato antioxidační aktivita: mouka z tvrdé pšenice 4,33 mmol.kg⁻¹ a mouka z klasické pšenice měla antioxidační aktivitu 4,17 mmol.kg⁻¹ [63]. Opět by se dalo říci, že naměřená

antioxidační aktivita u mouky z EU je cca poloviční, kdežto antioxidační aktivita mouky pocházející z ČR je prakticky nulová. Opět je ale problematické tyto výsledky navzájem srovnávat ze stejného důvodu, jako je uvedeno v diskuzi u kapitoly 6.4.1. V další studii Shena a kol. [59] měřili antioxidační aktivitu u červené, černé a bílé rýže. Tato studie u nich zjistila vysoké hodnoty antioxidační aktivity. U červené rýže $17,05 \text{ mmol.kg}^{-1}$, černé rýže $44,8 \text{ mmol.kg}^{-1}$ a bílé rýže $1,96 \text{ mmol.kg}^{-1}$ [59]. Naše naměřená antioxidační aktivita mouky z EU, by se dala srovnat se jištěnou hodnotou antioxidační aktivity bílé rýže [59].

6.4.3 Výsledky stanovení antioxidační aktivity vzorků směsí mouk s miličkou

Výsledky ukazující na antioxidační aktivitu směsi mouk s miličkou v daném poměru jsou uvedeny v tabulkách č. 36, 37, 38 a 39. Antioxidační aktivita u vzorků pocházejících z USA byla měřena pouze v 10 a 20% směsích, stejně jako u stanovení polyfenolů a flavonoidů.

Tabulka č.: 36 Výsledky stanovení antioxidační aktivity u vzorků směsí s 5 % miličky metodou ABTS

Vzorky z Bolívie:	Ø úbytek A [%]	TAA [mmol troloxu.kg ⁻¹]	S.D.
5 % miličky mouky + mouka z ČR	0,88	0,28 ^a	0,01
5 % miličky mouky + mouka z EU	8,09	2,20 ^b	0,11
5 % zrno miličky + mouka z ČR	3,12	0,55 ^c	0,02
5 % zrno miličky + mouka z EU	11,26	2,57 ^d	0,10

S.D. – Standard Deviation – směrodatná odchylka

TAA – Total Antioxidant Activity – celková antioxidační aktivita

Metodou ABTS byla u 5% směsi zrna miličky z Bolívie s moukou z EU zjištěna nejvyšší celková antioxidační aktivita s hodnotou $2,57 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$). Naopak nejnižší celková antioxidační aktivita byla zjištěna u 5% směsi mouky miličky s moukou z ČR, a to $0,28 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$). U 5% směsi zrna miličky z Bolívie s moukou z EU a moukou miličky z Bolívie s moukou z EU byly naměřeny vyšší antioxidační aktivity než u směsi s moukou z ČR. Výsledky jsou v korelaci s velmi nízkou antioxidační aktivitou pšeničné mouky pocházející z ČR.

Tabulka č.:37 Výsledky stanovení antioxidační aktivity u vzorků směsí s 10 % miličky metodou ABTS

Vzorky z Bolívie:	Ø úbytek A [%]	TAA [mmol troloxu.kg ⁻¹]	S.D.
10 % miličky mouky + mouka z ČR	2,34	0,69 ^a	0,01
10 % miličky mouky + mouka z EU	11,13	2,64 ^b	0,07
10 % zrno miličky + mouka z ČR	3,21	0,87 ^c	0,02
10 % zrno miličky + mouka z EU	11,83	2,99 ^d	0,11
Vzorky z USA:			
10 % milička tmavá + mouka z ČR	4,56	1,10 ^e	0,02
10 % milička tmavá + mouka z EU	9,34	3,20 ^f	0,09
10 % milička bílá + mouka z ČR	2,64	0,68 ^a	0,02
10 % milička bílá + mouka z EU	12,03	2,62 ^{b,g}	0,11

S.D. – Standard Deviation – směrodatná odchylka

TAA – Total Antioxidant Activity – celková antioxidační aktivita

Metodou ABTS byla u 10% směsi tmavé miličky z USA s moukou z EU zjištěna nejvyšší celková antioxidační aktivita s průměrnou hodnotou 3,20 mmol.kg⁻¹ ($P < 0,05$). Naopak nejnižší hodnotu antioxidační aktivity vykazoval vzorek 10% směsi bílé miličky z USA a mouky z ČR (0,68 mmol.kg⁻¹) a také vzorek 10% směsi mouky miličky z Bolívie v kombinaci s moukou z ČR (0,69 mmol.kg⁻¹) ($P < 0,05$) (tabulka č. 37). Dále se statisticky nelišily antioxidační aktivity stanovené u 10% směsi bolívijské mouky z miličky smíchané s moukou z EU a 10% směsi tvořené bílou miličkou v kombinaci s moukou z EU. Toto je i v korelaci s hodnotami antioxidačních aktivit bílé miličky z USA a mouky z bolívijské miličky (tabulka č. 34).

Tabulka č.: 38 Výsledky stanovení antioxidační aktivity u vzorků směsí s 15 % miličky metodou ABTS

Vzorky z Bolívie:	Ø úbytek A [%]	TAA [mmol troloxu.kg ⁻¹]	S.D.
15 % miličky mouky + mouka z ČR	4,76	1,04 ^a	0,02
15 % miličky mouky + mouka z EU	11,53	2,93 ^b	0,08
15 % zrno miličky + mouka z ČR	5,21	1,25 ^c	0,03
15 % zrno miličky + mouka z EU	11,97	3,22 ^d	0,11

S.D. – Standard Deviation – směrodatná odchylka

TAA – Total Antioxidant Activity – celková antioxidační aktivita

Metodou ABTS byla u 15% směsi zrna miličky pocházející z Bolívie s moukou z EU zjištěna nejvyšší celková antioxidační aktivita s průměrnou hodnotou $3,22 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$). Naopak nejnižší celková antioxidační aktivita byla zjištěna u 15% směsi mouky miličky s moukou z ČR, a to $1,04 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$).

Tabulka č.: 39 Výsledky stanovení antioxidační aktivity u vzorků směsí s 20 % miličky metodou ABTS

Vzorky z Bolívie:	Ø úbytek A [%]	TAA [mmol troloxu.kg ⁻¹]	S.D.
20 % miličky mouky + mouka z ČR	4,59	1,26 ^a	0,03
20 % miličky mouky + mouka z EU	11,48	3,20 ^b	0,08
20 % zrno miličky + mouka z ČR	6,63	1,81 ^c	0,04
20 % zrno miličky + mouka z EU	9,64	3,70 ^d	0,07
Vzorky z USA:			
20 % milička tmavá + mouka z ČR	8,23	2,31 ^e	0,09
20 % milička tmavá + mouka z EU	14,05	3,95 ^f	0,11
20 % milička bílá + mouka z ČR	4,71	1,32 ^a	0,04
20% milička bílá + mouka z EU	11,82	3,22 ^{b,g}	0,09

S.D. – Standard Deviation – směrodatná odchylka

TAA – Total Antioxidant Activity – celková antioxidační aktivita

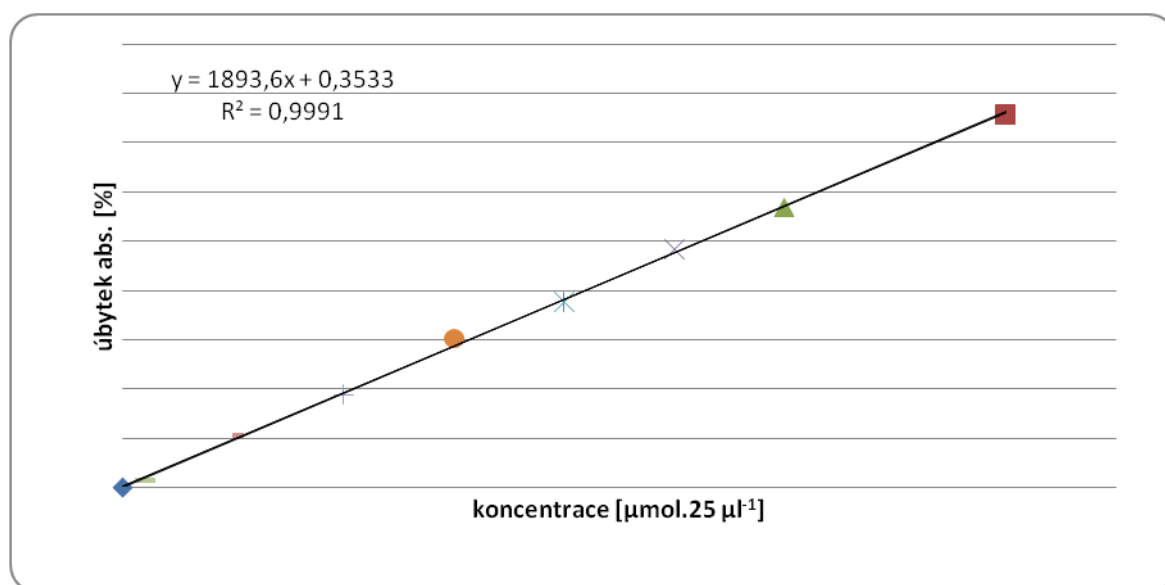
Metodou ABTS byla u 20% směsi tmavé miličky z USA s moukou z EU hodnota antioxidační aktivity $3,95 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$). Naopak nejnižší celková antioxidační aktivita byla zjištěna u směsi mouky miličky z Bolívie s moukou z ČR, a to $1,26 \text{ mmol.kg}^{-1}$ stejně jako u 20% směsi bílé miličky z USA ve směsi s moukou z ČR, kde byla naměřena hodnota antioxidační aktivity $1,32 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ($P \geq 0,05$). 20% směs mouky miličky z Bolívie s moukou z EU a 20% směs bílé miličky s moukou z EU se od sebe statisticky neliší ($P \geq 0,05$). Výsledky jsou taktéž v korelaci s 10% směsmi (tabulka č. 37).

6.4.4 Výsledky měření kalibrační křivky pro stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Jako standard byl použit trolox. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost úbytku absorbance v % na koncentraci troloxu v $\mu\text{mol.25 } \mu\text{l}^{-1}$ a byla sestrojena podle postupu uvedeného v kapitole 5.6.4. Hodnota spolehlivosti R^2 je 0,9991 a rovnice lineární regrese je $y = 1893,6x + 0,3533$. Celková antioxidační aktivita stanovovaná pomocí ABTS byla vyjádřena jako ekvivalentní množství mmol troloxu na 1 kg vzorku.

Tabulka č.: 40 Naměřené hodnoty úbytku absorbance v závislosti na koncentraci troloxu

Průměrný úbytek absorbance A [%]	Koncentrace troloxu [$\mu\text{mol.}25 \mu\text{l}^{-1}$]
0,00	0
1,37	0,001
10,63	0,005
18,86	0,010
30,27	0,015
37,60	0,020
48,28	0,025
56,94	0,030
75,66	0,040



Graf č. 3 Kalibrační křivka vyjadřující závislost úbytku absorbance na koncentraci troloxu metodou ABTS

6.5 Výsledky stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Extrakce vzorků pro stanovení antioxidační aktivity byla provedena postupem uvedeným v kapitole 5.3.3. Výsledný extrakt, popř. zředěný extrakt byl použit k samotnému stanovení antioxidační aktivity, který byl proveden podle postupu uvedeného v kapitole 5.7. Nejprve byl proměřen pracovní roztok uvedený v kapitole 5.7.3 proti metanolu. Poté byl úbytek absorbance vzorku měřen při 515 nm na spektrofotometru Lambda 25 oproti metanolu.

Výsledky stanovení jsou uvedeny v kapitolách 6.5.1, 6.5.2 a 6.5.3. Úbytek absorbance vyjádřený v % byl pomocí rovnice lineární regrese vyjádřené z kalibrační křivky přepočten na ekvivalentní množství g troloxu na 1 kg vzorku.

6.5.1 Výsledky stanovení antioxidační aktivity u vzorků miličky metodou DPPH

Výsledky stanovení antioxidační aktivity měřené metodou DPPH jsou uvedeny v tabulce č. 41.

Tabulka č.:41 Výsledky stanovení antioxidační aktivity u miličky metodou DPPH

Vzorky z Bolívie:	Ø úbytek A [%]	TAA [g troloxu.kg ⁻¹]	S.D.
Milička mouka	42,89	2,00 ^a	0,05
Milička zrno	44,19	2,06 ^a	0,05
Vzorky z USA:			
Milička tmavá	47,90	2,23 ^b	0,05
Milička bílá	43,61	2,03 ^a	0,04

S.D. – Standard Deviation – směrodatná odchylka

TAA – Total Antioxidant Activity – celková antioxidační aktivita

Metodou DPPH byla u miličky tmavé z USA zjištěna nejvyšší celková antioxidační aktivita 2,23 g.kg⁻¹ ($P < 0,05$). Další vzorky miliček mezi sebou nevykazovaly statisticky významný rozdíl v hodnotách antioxidační aktivity ($P \geq 0,05$). Nejvyšší hodnota antioxidační aktivity u tmavé miličky z USA metodou DPPH je v souladu se stanovením nejvyšší antioxidační aktivity metodou ABTS (tabulka č. 34). Rozdíl v hodnotách antioxidačních aktivit se statisticky u ostatních vzorků miliček stanovených metodou DPPH neprojevil, u metody ABTS byly naopak zjištěny statisticky významné rozdíly mezi tmavou miličkou a mezi moukou z miličky z Bolívie a bílou miličkou z USA (tabulka č. 34). To může být dáno vyšší citlivostí metody ABTS.

V diplomové práci Mrázové byla stanovována antioxidační aktivita metodou DPPH u cereálií. U kamutu byla stanovena antioxidační aktivita 0,688 g.kg⁻¹, u zelených zrn špaldy 0,56 g.kg⁻¹ a špaldového kernotta 0,55 g.kg⁻¹ [69]. Jak je z výsledků uvedených v tabulce č. 41 patrné, vzorky miliček vykazují vyšší antioxidační aktivitu než tyto obiloviny.

6.5.2 Výsledky stanovení antioxidační aktivity u vzorků mouk

Výsledky stanovení antioxidační aktivity u vzorků pšeničných mouk jsou uvedeny v tabulce č. 42.

Tabulka č.:42 Výsledky stanovení antioxidační aktivity u mouk metodou DPPH

Vzorky mouk:	Ø úbytek A [%]	TAA [g troloxu.kg ⁻¹]	S.D.
Pšeničná mouka z ČR	17,41	0,81 ^a	0,02
Pšeničná mouka z EU	22,59	1,05 ^b	0,02

S.D. – Standard Deviation – směrodatná odchylka

TAA – Total Antioxidant Activity – celková antioxidační aktivita

Metodou DPPH byla u pšeničné mouky z EU zjištěna nejvyšší celková antioxidační aktivita 1,05 g.kg⁻¹ ($P < 0,05$). Naopak nejnižší celková antioxidační aktivita byla zjištěna u pšeničné mouky z ČR, a to 0,81 g.kg⁻¹ ($P < 0,05$).

V diplomové práci Mrázové [69] byla stanovována antioxidační aktivita metodou DPPH u pšenice ozimé (0,67 g.kg⁻¹) a pšenice špaldy (0,72 g.kg⁻¹). Antioxidační aktivita měřených vzorků pšeničných mouk je tedy o něco vyšší.

6.5.3 Výsledky stanovení antioxidační aktivity vzorků směsí mouk s miličkou

Výsledky ukazující na antioxidační aktivitu směsí mouk s miličkou v daném poměru jsou uvedeny v tabulkách č. 43, 44, 45 a 46.

Tabulka č.: 43 Výsledky stanovení antioxidační aktivity ve vzorcích směsí s 5% obsahem miličky metodou DPPH

Vzorky z Bolívie:	Ø úbytek A [%]	TAA [g troloxu.kg ⁻¹]	S.D.
5 % miličky mouky + mouka z ČR	35,23	0,82 ^a	0,01
5 % miličky mouky + mouka z EU	43,43	1,01 ^b	0,01
5 % zrno miličky + mouka z ČR	37,63	0,87 ^c	0,01
5 % zrno miličky + mouka z EU	50,39	1,17 ^d	0,02

S.D. – Standard Deviation – směrodatná odchylka

TAA – Total Antioxidant Activity – celková antioxidační aktivita

Metodou DPPH byla zjištěna nejvyšší celková antioxidační aktivita u vzorku 5% směsi zrno bolivijské miličky s moukou z EU, a to 1,17 g.kg⁻¹ ($P < 0,05$). Naopak nejnižší

celková antioxidační aktivita byla zjištěna u 5% směsi mouky bolivijské miličky ve směsi s pšeničnou moukou z ČR, a to $0,82 \text{ g.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$). Se vzorky miličky importované z USA byly proměřeny pouze její 10 a 20% směsi s pšeničnými moukami.

Tabulka č.: 44 Výsledky stanovení antioxidační aktivity ve vzorcích směsí s 10% obsahem miličky metodou DPPH

Vzorky z Bolívie:	Ø úbytek A [%]	TAA [g troloxu.kg ⁻¹]	S.D.
10 % miličky mouky + mouka z ČR	36,57	0,90 ^a	0,02
10 % miličky mouky + mouka z EU	43,19	1,12 ^b	0,02
10 % zrno miličky + mouka z ČR	37,87	0,98 ^{c,e}	0,03
10 % zrno miličky + mouka z EU	47,28	1,22 ^{d,f}	0,04
Vzorky z USA:			
10 % milička tmavá + mouka z ČR	35,42	0,98 ^e	0,02
10 % milička tmavá + mouka z EU	46,70	1,21 ^f	0,03
10 % milička bílá + mouka z ČR	36,20	0,91 ^a	0,03
10 % milička bílá + mouka z EU	40,12	1,04 ^g	0,03

S.D. – Standard Deviation – směrodatná odchylka

TAA – Total Antioxidant Activity – celková antioxidační aktivita

Metodou DPPH byla naměřena nejvyšší antioxidační aktivita u dvou vzorků, a to: u 10% směsi zrna miličky z Bolívie smíchané s moukou z EU ($1,22 \text{ g.kg}^{-1}$) a u 10% směsi tmavé miličky z USA v kombinaci s pšeničnou moukou z EU ($1,21 \text{ g.kg}^{-1}$) ($P < 0,05$). Naopak nejnižší hodnoty celkové antioxidační aktivity byly naměřeny u 10% směsi mouky z bolivijské miličky a pšeničné mouky z ČR ($0,90 \text{ g.kg}^{-1}$) a zároveň u 10% směsi bílé miličky s moukou z ČR ($0,91 \text{ g.kg}^{-1}$) ($P < 0,05$).

Tabulka č.: 45 Výsledky stanovení antioxidační aktivity ve vzorcích směsí s 15% obsahem miličky metodou DPPH

Vzorky z Bolívie:	Ø úbytek A [%]	TAA [g troloxu.kg ⁻¹]	S.D.
15 % miličky mouky + mouka z ČR	41,07	0,96 ^a	0,03
15 % miličky mouky + mouka z EU	47,18	1,20 ^b	0,02
15 % zrno miličky + mouka z ČR	42,96	1,02 ^c	0,02
15 % zrno miličky + mouka z EU	52,92	1,24 ^d	0,03

S.D. – Standard Deviation – směrodatná odchylka

TAA – Total Antioxidant Activity – celková antioxidační aktivita

Metodou DPPH byla u 15% směsi zrna bolivijské miličky s moukou z EU zjištěna nejvyšší celková antioxidační aktivita s průměrnou hodnotou $1,24 \text{ g.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$). Naopak nejnižší celková antioxidační aktivita byla zjištěna u směsi mouky bolivijské miličky s moukou z ČR, a to $0,96 \text{ g.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$). Výsledky jsou v korelaci s údaji prezentovanými v tabulce č. 43.

Tabulka č.: 46 Výsledky stanovení antioxidační aktivity ve vzorcích směsí s 20% obsahem miličky metodou DPPH

Vzorky z Bolívie:	Ø úbytek A [%]	TAA [g troloxu.kg ⁻¹]	S.D.
20 % miličky mouky + mouka z ČR	48,04	1,00 ^a	0,02
20 % miličky mouky + mouka z EU	58,42	1,31 ^b	0,03
20 % zrno miličky + mouka z ČR	50,34	1,12 ^{c,e}	0,03
20 % zrno miličky + mouka z EU	57,75	1,39 ^{d,f}	0,02
Vzorky z USA:			
20 % milička tmavá + mouka z ČR	37,17	1,12 ^e	0,02
20 % milička tmavá + mouka z EU	43,85	1,36 ^f	0,02
20 % milička bílá + mouka z ČR	38,04	1,02 ^a	0,02
20 % milička bílá + mouka z EU	42,73	1,27 ^g	0,02

S.D. – Standard Deviation – směrodatná odchylka

TAA – Total Antioxidant Activity – celková antioxidační aktivita

Metodou DPPH byla u 20% směsi tmavé miličky z USA s moukou z EU stanovena antioxidační aktivita $1,36 \text{ g.kg}^{-1}$ a u 20% směsi zrna miličky z Bolívie a moukou z EU pak byla stanovena antioxidační aktivita $1,39 \text{ g.kg}^{-1}$. Jednalo se o vzorky, které vykazovaly nejvyšší antioxidační aktivitu v porovnání s ostatními vzorky ($P < 0,05$). Naproti tomu nejnižší antioxidační aktivitu vykazovaly vzorky 20% směsi mouky z miličky s pšeničnou moukou z ČR ($1,00 \text{ g.kg}^{-1}$) a 20% směs bílé miličky s moukou z ČR ($1,02 \text{ g.kg}^{-1}$) ($P < 0,05$). Dále se od sebe statisticky neliší ani 20% vzorky, které jsou tvořeny z 80 % moukou z ČR a pak buď 20 % tmavé miličky z Bolívie, nebo z USA.

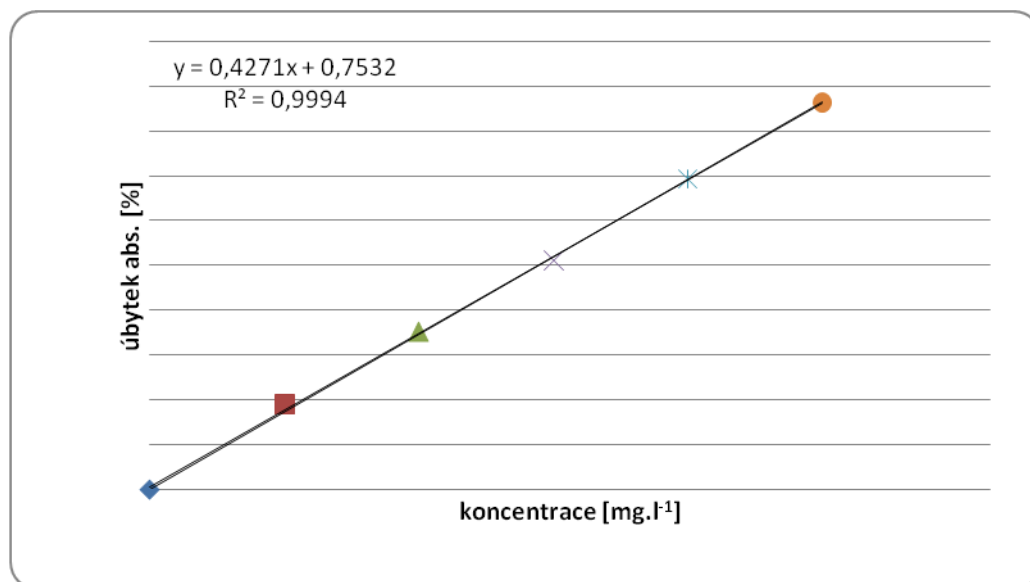
Jak je patrné z naměřených výsledků antioxidační aktivity metodou DPPH, tak po smíchání miličky původem z Bolívie a původem z USA ve směsi s moukou z EU se metodou DPPH neprokázal statisticky významný rozdíl mezi těmito vzorky. To může být obecně způsobeno nižší citlivostí vyššího obsahu antioxidantů hlavně miličky zhaset radikál DPPH. Obecně za citlivější je považována metoda ABTS [52,53,59,60,62,63,64].

6.5.4 Výsledky měření kalibrační křivky pro stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Jako standard byl použit trolox. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost úbytku absorbance v % na koncentraci troloxu v mg.l^{-1} a byla sestrojena podle postupu uvedeného v kapitole 5.7.3. Hodnota spolehlivosti R^2 je 0,9994 a rovnice lineární regrese je $y = 0,4271x + 0,7532$. Celková antioxidační aktivita stanovovaná pomocí DPPH byla vyjádřena jako ekvivalentní množství g troloxu na 1 kg vzorku.

Tabulka č.:47 Naměřené hodnoty úbytku absorbance troloxu

Průměrný úbytek absorbance A [%]	Koncentrace troloxu [mg.l^{-1}]
0,00	0
19,04	40
35,13	80
51,07	120
69,24	160
86,27	200



Graf č.4 Kalibrační křivka vyjadřující závislost absorbance na koncentraci troloxu metodou DPPH

ZÁVĚR

V teoretické části této diplomové práce byl popsán význam obilovin pro výživu člověka. Dále byla popsána stavba obilného zrna, jeho chemické složení, tj. polysacharidy, mono- a oligosacharidy, bílkoviny a aminokyseliny, lipidy, vitaminy a minerální látky, barviva a fenolové sloučeniny. Dále byla charakterizována milička habešská, její chemické složení a její využití jako obiloviny pro lidskou výživu. Dále byl popsán princip spektrofotometrie a jednotlivé metody stanovení.

Hlavním cílem praktické části diplomové práce byla optimalizace extrakce a nastavení metodiky pro stanovení polyfenolů, flavonoidů a antioxidační aktivity ve vzorcích miličky habešské a jejích směsí s pšeničnou moukou. Stanovení polyfenolů bylo provedeno pomocí Folin-Ciocalteuovy metody, stanovení flavonoidů s použitím $\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ v prostředí etanolu s přídavkem NaNO_2 a NaOH . Dále probíhalo stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS a DPPH.

Při stanovení polyfenolů vykazovalo nejvyšší průměrnou koncentraci polyfenolů tmavé zrna miličky původem z Bolívie, a to $1359,9 \text{ mg.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$). Nejnižší průměrná koncentrace polyfenolů byla naměřena u miličky bílé původem z USA, a to $576,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$). U vzorků pšeničných mouk vykazovala nejvyšší průměrnou koncentraci polyfenolů pšeničná mouka z EU, a to $263,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$). Nižší průměrnou koncentraci vykazovala pšeničná mouka z ČR, a to $202,9 \text{ mg.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$). Při analýzách směsí pšeničných mouk s daným % podílem miličky lze tedy jednoznačně konstatovat, že co do obsahu polyfenolů, měla směs tmavého zrna miličky z Bolívie v kombinaci s moukou z EU nejvyšší obsah polyfenolů. Zároveň na namíchaných pekárenských směsích se stoupajícím podílem miličky byla ověřena metodika samotného stanovení polyfenolů. Zároveň lze říci, že obsah polyfenolů byl obecně nižší u bílého typu miličky, a to dokonce statisticky nižší než u mouky z miličky pocházející z Bolívie, kde se předpokládá její daný stupeň vymoření, který má významný vliv právě na snížení obsahu polyfenolů ($P < 0,05$).

Při stanovení flavonoidů byla naměřena nejvyšší průměrná koncentrace flavonoidů u zrna miličky z Bolívie, a to $491,6 \text{ mg.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$). Nejnižší průměrnou koncentraci flavonoidů vykazovala bílá milička z USA, a to $281,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$). U vzorků pšeničných mouk vykazovala nejvyšší průměrnou koncentraci flavonoidů pšeničná mouka z EU, a to $203,7 \text{ mg.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$). Statisticky nižší průměrnou koncentraci flavonoidů

vykazovala pšeničná mouka z ČR, a to $157,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$). Ve směsích pšeničné mouky s daným % podílem miličky, bylo dosaženo srovnatelných výsledků, jako tomu bylo u stanovení polyfenolů, tudíž nejvyšších hodnot obsahu flavonoidů bylo dosaženo smícháním pomletého zrna miličky pocházejícího z Bolívie v kombinaci s moukou z EU. Taktéž obsah flavonoidů u bílého typu miličky byl statisticky významně nižší, než u mouky miličky pocházející z Bolívie, stejně jako tomu bylo u obsahu polyfenolů.

Antioxidační aktivita byla stanovována metodami ABTS a DPPH. Při stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS byla u miličky tmavé z USA zjištěna nejvyšší celková antioxidační aktivita s průměrnou hodnotou $10,46 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$). Naopak nejnížší celková antioxidační aktivita byla zjištěna u mouky miličky z Bolívie, a to $6,26 \text{ mmol.kg}^{-1}$ a také u vzorku bílé miličky pocházející z USA, kde hodnota antioxidační aktivity byla $6,35 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$). U vzorků pšeničných mouk byla metodou ABTS u pšeničné mouky z EU zjištěna nejvyšší celková antioxidační aktivita s průměrnou hodnotou $2,30 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$). Naopak statisticky nejnížší celková antioxidační aktivita byla zjištěna u pšeničné mouky z ČR, a to $0,11 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$). I když milička pocházející původem z Bolívie měla nejvyšší hodnoty obsahu polyfenolů a flavonoidů, i přesto měla nižší antioxidační aktivitu, než tomu bylo u zrna miličky tmavé z USA. Je tedy možno se domnívat, že milička původem z USA obsahuje významné množství dalších antioxidantů, než jsou právě fenolické látky, v porovnání s miličkou z Bolívie. Může se jednat o vyšší obsah xantofylových či karotenoidních barviv, vitamínu E apod. U vzorků směsí tak nejvyšší antioxidační aktivitu měla směs mouky z EU a tmavé miličky pocházející z USA.

Při stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH byla u miličky tmavé z USA zjištěna nejvyšší celková antioxidační aktivita $2,23 \text{ g.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$). Další vzorky miliček mezi sebou nevykazovaly statisticky významný rozdíl v hodnotách antioxidační aktivity ($P \geq 0,05$). To může být způsobeno obecně menší citlivostí antioxidantů k radikálu DPPH. Nejvyšší hodnota antioxidační aktivity u tmavé miličky z USA metodou DPPH je v souladu i se stanovením nejvyšší antioxidační aktivity metodou ABTS. U vzorků pšeničných mouk byla u pšeničné mouky z EU zjištěna nejvyšší celková antioxidační aktivita, a to $1,05 \text{ g.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$). Naopak nižší celková antioxidační aktivita byla zjištěna u pšeničné mouky z ČR, a to $0,81 \text{ g.kg}^{-1}$ ($P < 0,05$). Ve vzorcích směsí potom nejvyšších hodnot antioxidačních aktivit vykazovaly směsi miličky tmavé z USA a miličky

z Bolívie vždy ve směsi s moukou z EU. Mezi nimi nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ($P \geq 0,05$).

Závěrem lze shrnout, že byly vypracovány extrakční postupy a nastaveny metodiky pro stanovení obsahu polyfenolů, flavonoidů a antioxidačních aktivit metodami DPPH a ABTS pro pekárenské směsi mouk obsahující miličku. Také je nutno doporučit výrobci, aby provedl s pekárenskými směsmi skladovací pokusy a monitoroval kromě ostatních parametrů i obsah vlhkosti. Škrobová zrna miličky mají dle dostupných literárních údajů větší schopnost pohlcovat vlhkost, která se u našich vzorků sice neprojevila, ale delší dobou skladování a za jiných podmínek (př. vyšší relativní vlhkost vzduchu apod.) může dojít ke statisticky významnému nárůstu vlhkosti.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KUČEROVÁ, J., *Technologie cereálií*, Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2008. ISBN 978-80-7157-811-6.
- [2] HRABĚ, J., BUŇKA, F., HOZA, I., *Technologie výroby potravin rostlinného původu*, Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007. ISBN 978-80-7318-520-6.
- [3] KADLEC, P., A KOLEKTIV, *Technologie potravin I*, Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2007. ISBN 80-7080-509-9.
- [4] PŘÍHODA, J., SKŘIVAN, P., HRUŠKOVÁ, M., *Cereální chemie a technologie I*, Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2003. ISBN 80-7080-530-7.
- [5] KYUNG-HEE, K., RONG, T., YANG, R., CUI, W. A., *Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions*, Food Chemistry, 2006, vol. 35, pp. 466 – 473.
- [6] ČERMÁK, B., A KOLEKTIV, *Výživa člověka*, České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2002. ISBN 80-7040-576-7.
- [7] ARENDT, E., ZANNINI, E., *Cereal grains for the food and beverage industries*, 2013, ISBN 978-0-85709-413-1.
- [8] HAGER, A. S., WOLKER, A., JACOB, F., ZANNINI, E., ARENDT, E. K., *Nutritional properties and ultra-structure of commercial gluten free flours from different botanical sources compared to wheat flours*, Journal of Cereal Science, 2012, vol. 56, pp. 239 – 247.
- [9] BHARATH, S., PRABHASANKAR, P., *Low glycemic index ingredients and modified barches in wheat based food processing: A review*, Trends ind Food Science & Technology, 2014, vol. 35, pp. 32 – 41.
- [10] NENUŤILOVÁ, LENKA, *Aminokyselinový a bílkovinný profil odrůd potravinářské pšenice pěstované v ČR*, Zlín, 2013. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav technologie potravin.
- [11] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., *Potravinářská biochemie I*, Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005. ISBN 80-7318-295-5.
- [12] PRUGAR, J., *Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí*, Praha: VÚPS, 2008. ISBN 978-80-86576-28-2.

- [13] PELIKÁN, M., SÁKOVÁ, L., *Jakost a zpracování rostlinných produktů*, České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2001. ISBN 80-7040-502-3.
- [14] BATIFOULIER, F., VERNY, M. A., CHANLIAUD, E., RÉMÉSY, C., DEMIGNÉ, C., *Variability of B vitamin concentrations in wheat grain, milling fractions and bread products*, European Journal of Agronomy, 2006, vol. 25, pp. 163 – 169.
- [15] LEBIEDZINKA, A., SZEFER, P., *Vitamins B in grain and cereal-grain food, soy-products and seeds*, Food Chemistry, 2006, vol. 95, pp. 116 – 122.
- [16] ČESKO. Vyhláška č. 333/1997 Sb., kterou se provádí § 18 písm. a), d), h), i), j) a k) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích, pro mlýnské obilné výrobky a cukrářské výrobky a těsta. Dostupná také z:
<http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1007478&docType=ART&nid=11816>
[cit. 2014-04-07].
- [17] DEMIRBAS, A., *β -Glucan and mineral nutrient contents of cereals grown in Turkey*, Food Chemistry, 2005, vol. 90, pp. 773 – 777.
- [18] NDOLO, U. A., BETA, T., *Distribution of carotenoids in endosperm, germ, and aleurone fractions of cereal grain kernels*, Food Chemistry, 2013, vol. 139, pp. 663 – 671.
- [19] AHMAD, T. F., ASENSTORFER, E. R., SORIANO, R. I., MARES, J. D., *Effect of temperature on lutein esterification and lutein stability in wheat grain*, Journal of Cereal Science, 2013, vol. 58, pp. 408 – 413.
- [20] ABDEL, A. E.-S.M., HUCL, P. *Composition and Stability of Anthocyanins in Blue-Grained Wheat*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, vol. 51, pp. 2174 – 2180.
- [21] VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J., *Chemie potravin I.*, Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [22] MAREŠOVÁ, PAVLÍNA, *Stanovení flavonoidů v obilovinách spektrofotometricky*, Zlín, 2013. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav analýzy a chemie potravin.

- [23] BARTL, P., TREMLOVÁ, B., OŠŤÁDALOVÁ, M., ČÁSLAVKOVÁ, P., ELIÁŠOVÁ, M., ŽĎÁRSKÝ, M., *Stanovení antokyanů v pšenících s purpurově a modře zabarveným zrnem*, Obilnářské listy, 2013, č. 3 – 4, str. 75 – 77.
- [24] MARTÍNEK, P., ŠKORPÍK, M., CHRPOVÁ, J., FUČÍK, P., *Skorpion – odrůda ozimé pšenice s modrým zrnem*, Obilnářské listy, 2012, č. 3, str. 78 – 79.
- [25] TRNA, J., TÁBORSKÁ, E., *Přírodní polyfenolické antioxidanty*. Dostupné na: <http://www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf>.
- [26] REVANAPPA, S. B., PARAMAHANS, V. S., *Phenolic acid profiles and antioxidant activities of different wheat (Triticum aktivum L.) varieties*, Journal of Food Biochemistry, 2011, vol. 35, pp. 759 – 775.
- [27] HEIM, K. E., TAGLIAFERRO, A. R., BOBILYA, D. J., *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship*, Journal of Nutritional Biochemistry, 2002, vol. 13, pp. 572 – 584.
- [28] ŽILIC, S., SERPEN, A., AKILLIOGLU, G., JANKOVIC, M., GOKMEN, V., *Distributions of phenolic compounds, yellow pigments and oxidative enzymes in wheat grains and their relation to antioxidant capacity of bran and debranned flour*, Journal of Cereal Science, 2012, vol. 56, pp. 652 – 658.
- [29] RITVA, R. C. V., HELLSTROM, J. K., PIHLAVA, J. M., MATTILA, P. H., *Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (Chenopodium Quita), kaniwa (Chenopodium pallidicaule) and kiwicha (Amaranthus caudatus)*, Food Chemistry, 2010, vol. 120, pp. 128 – 133.
- [30] DYKES, L., ROONEY, W. L., *Sorghum and millet phenols and antioxidant*, Journal of Cereal Science, 2006, vol. 44, pp. 236 – 251.
- [31] SEDLÁČKOVÁ, I., POLIŠENSKÁ, I., *Příměsi a nečistoty v potravinářské pšenici*, Obilnářské listy, 2012, č. 1, str. 29 – 31.
- [32] JIRSA, O., POLIŠENSKÁ, I., PALÍK, S., SEDLÁČKOVÁ, I., *Kvalita potravinářských obilovin 2012*, Obilnářské listy, 2013, č. 2, str. 35 – 39.

- [33] COLLAR, C., ANGIOLONI, A., *Pseudocereals and teff in komplex breadmaking matrices: Impact on lipid dynamics*, Journal of Cereal Science, 2014, vol. 59, pp. 145 – 154.
- [34] KETEMA, S., *Tef: Eragrostis tef (Zucc.) Trotter*, Itálie: International Plant Genetic Resources Institute, 1997. ISBN 92-9043-304-3.
- [35] ZEID, M., ASSEFA, K., HADDIS, A., CHANYALEW, S., SORRELLS, M. E., *Genetic diverzity in tef (Eragrostis tef) germplasm using SSR markers*, Field Crops Research, 2012, vol. 127, pp. 64 – 70.
- [36] MERKBIB, F., MANTELL, H. S., BUCHAMAN-WOLLASTON, V., *Callus induction and In vitro regeneration of Tef (Eragrostis tef (Zucc.)Trotter) from Leaf*, Journal of plant physiology, 1997.
- [37] ARAYA, A., KEESSTRA, S. D., STROOSNIJDER, L., *Simulating Seld response to water of Teff (Eragrostis tef) with FAO's AquaCrop model*, Field Crops Research, 2010, vol. 116, pp. 196 – 204.
- [38] VAN DELDEN, H. S., VOS, J., STOMPH, T., BROUWER, G., STRUIK, C. P., *Photoperiodism in Eragrostis tef: Analysis of ontogeny and morphology in response to photoperiod*, European Journal of Agronomy, 2012, vol. 37, pp. 105 – 114.
- [39] HABTEGEBRIAL, K., SINGH, B. R., HAILE, M., *Impact of tillage and nitrogen fertilization on yield, nitrogen use efficiency of tef (Eragrostis tef (Zucc.) Trotter) and soil properties*, Soil & Tillage Research, 2007, vol. 94, pp. 55 – 63.
- [40] TULEMA, B., AUNE, J. B., JOHNSEN, F. H., VANLAUWE, B., *The prospects of reduced tillage in tef (Eragrostis tef Zucca) in Gare Arera, West Shawa Zone of Oromiya, Ethiopia*, Soil & Tillage Research, 2008, vol. 99, pp. 58 – 65.
- [41] MENGISTU, K. D., *The influence of soil water, deficit imposed during variol developmental phases on physiological processes of tef (Eragrostis tef)*, Agriculture Ecosystems and Environment, 2009, vol. 132, pp. 283 – 289.

- [42] ALAUNYTE, I., STOJCESKA, V., PLUNKETT, A., AINSWORTH, P., DERBYSHIRE, E., *Improving the quality of nutrient-rich Teff (Eragrostis tef) breads by combination of enzymes in straight dough and sourdough breadmaking*, Journal of Cereal Science, 2012, vol. 55, pp. 22 – 30.
- [43] Nutritional Info: Nutritional data for Teff. Dostupné na: <http://skipthepie.org/cereal-grains-and-pasta/teff-uncooked/#calories> [cit. 2014-04-07].
- [44] ABEBE, Y., BOGALE, A., HAMBIDGE, K. M., STOECKER, B. J., BAILEY, K., GIBSON, R. S., *Phytate, zinc, iron and calcium content of selected raw and prepared fous consumed in rural Sidama, Southern Ethiopia, and implications for bioavailability*, Journal of Food Composition and Analysis, 2007, vol. 20, pp. 161 – 168.
- [45] SHAHIDI, F., CHANDRASEKARA, A., *Millet grain phenolics and their role in disease risk reduction and health promotion: A review*, Journal of Functional Foods, 2013, vol. 5, pp. 570 – 581.
- [46] GRYGARČÍKOVÁ, JANA, *Stanovení polyfenolů v netradičních obilovinách Folin-Ciocalteuovou metodou*, Zlín, 2013. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav technologie potravin.
- [47] LAŠTUVIČKA, PETR, *Měření koncentrací roztoků spektrofotometrem*, Pardubice, 2009. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice, Fakulta elektrotechniky a informatiky, Katedra elektrotechniky.
- [48] Studijní materiál: *Spektrofotometrie*. Dostupné na: <http://www.unium.cz/materialy/vut/fekt/3-cviceni-abch-10-m28667-p3.html>
- [49] SINICA, A., *Spektrofotometrie ve viditelné oblasti spektra*. Dostupné na: http://www.vscht.cz/anl/lach1/5_Foto.pdf
- [50] Naše přístroje: *UV/Vis spektrofotometr Lambda 25*. [vtpup.cz](http://www.vtpup.cz) [online]. Dostupné na: http://www.vtpup.cz/common/manual/LF_umikrob_PerkinElmer_Lambda25_manual_EN.pdf
- [51] CICCIO, N., LANORTE, T. M., PARAGGIO, M., VIGGIANO, M., LATTANZIO, V., *A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant metanol extracts*, Mikrochemical Journal, 2009, vol. 91, pp. 107 – 110.

- [52] AFIFY, A., EL-BELTAGI, H. S., EL-SALAM, S. M., OMRAN, A. A., *Biochemical changes in phenols, flavonoids, tannins, vitamin E, β -carotene and antioxidant activity during soaking of free white sorghum varieties*, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012, vol.2, pp. 203 – 209.
- [53] FERRO, M., GIANOTTI, A., TASSONI, A., *Optimisation of assai conditions for the determination of antioxidant capacity and polyphenols in cereal food components*, Journal of Food Composition and Analysis, 2013, pp. 1 – 28.
- [54] CICCIO, N., LANORTE, T. M., PARAGGIO, M., VIGGIANO, M., LATTANZIO, V., *A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant metanol extracts*, Mikrochemical Journal, 2009, vol. 91, pp. 107 – 110.
- [55] WOOTTON-BEARD, P. C., MORAN, A., RYAN, L., *Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods*, Food Research International, 2011, vol. 44, pp. 217 – 224.
- [56] MIKULAJOVÁ, A., TAKÁCSOVÁ, M., ALEXY, P., BRINDZOVÁ, L., *Optimalizácia extrakcie fenolových zlomok z pohánky na základe výsledkov plánovaného experimentu*, Chemické listy, 2007, č.101, str. 563 – 568.
- [57] LACHMAN, J., HAMOUZ, K., ČEPL, J., PIVEC, V., ŠULC, M., DVOŘÁK, P., *Vliv vybraných faktorů na obsah polyfenolů a antioxidační aktivitu hlíz brambor*, Chemické listy, 2006, č. 100, str. 522 – 527.
- [58] ZLOCH, Z., ČELAKOVSKÝ, J., AUJEZDSKÁ, A., *Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu*. Dostupné na: <http://www.institut-danone.cz/data/studie/pridelene-granty/2004-03.pdf>
- [59] SHEN, Y., JIN, L., XIAO, P., LU, Y., BAO, J., *Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight*, Journal of Cereal Science, 2009, vol. 49, pp. 106 – 111.
- [60] PAULOVÁ, H., BOCHOŘÁKOVÁ, H., TÁBORSKÁ, E., *Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro*, Chemické listy, 2004, vol. 98, pp. 174 – 179.

- [61] KUFOVÁ, GABRIELA, *Možnosti využití ABTS metody v oblasti cereálních technologií*, Zlín, 2011. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav technologie a mikrobiologie potravin.
- [62] RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C., *Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay*, *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, vol. 26, pp. 1231 – 1237.
- [63] RAGAEI, S., ABDEL-AAL, E. M., NOAMAN, M., *Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use*, *Food Chemistry*, 2006, vol. 98, pp. 32 – 38.
- [64] FLOEGEL, A., KIM, D., CHUNG, S., KOO, S., CHUN, O., *Comparison of ABTS/DPPH assay to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods*, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2011, vol. 24, pp. 1043 – 1048.
- [65] NOIPA, T., SRIJARANAI, S., TUNTULANI, T., NGEONTAE, W., *New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems*, *Food Research International*, 2011, vol. 44, pp. 798 – 806.
- [66] BUŇKA, F., KŘÍŽ, O., HRABĚ, J., Program pro statistické vyhodnocování dat *Stadvyd, verze 2.0 beta*
- [67] ČSN ISO 712 (461014). Obiloviny a výrobky z obilovin – stanovení vlhkosti – praktická referenční metoda, 12 stran.
- [68] MAGALHAES, M. L., BARREIROS, L., REIS, S., SEGUNDO, A.M., *Kinetic matching approach applied to ABTS assay for high-throughput determination of total antioxidant capacity of food products*, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2014, vol. 33, pp. 187 – 194.
- [69] MRÁZOVÁ, EVA, *Stanovení fenolických látek a antioxidační aktivity u cereálií*, Zlín, 2011. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav biochemie a analýzy potravin.
- [70] ALVAREZ-JUBETE, L., WIJNGAARD, H., ARENDT, E.K., GALLAGHER, E., *Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa, buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking*, *Food Chemistry*, 2010, vol. 119, pp. 770 – 778.

[71] OICHA, T., CORNELIS, N. W., VERPLANCKE, H., NYSSSEN, J., GOVAERTS, B., BEHAILU, M., HAILE, M., DECKER, J., *Short-term effects of conservation agriculture on Vertisols under tef (Eragrostis tef (Zucc.) Trotter) in the northern Ethiopian highlands*, Soil & Tillage Research, 2010, vol. 106, pp. 294 – 302.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABTS	2,2'-azinobis(3-etyl-2,3-dihydrobenzotiazol-6-sulfonová kyselina)
CTBA	cetyltrimetyllamoniumbromid
ČR	Česká republika
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
EU	Evropská unie
FAO	Food and Agriculture Organization – Organizace pro výživu a zemědělství
FRAP	Ferric Reduction Antioxidant Power – metoda založená na redukci železitého komplexu
HPLC	High Performance Liquid Chromatography – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity – metoda, kdy dochází k vytvoření peroxylového radikálu β -fykoeritrinu
OSN	United Nations – Organizace spojených národů
S.D.	Standard Deviation – směrodatná odchylka
TAA	Total Antioxidant Activity – celková antioxidační aktivita
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity – Antioxidační aktivita ekvivalentní troloxu
TPC	Total Phenolic Content – Celkový obsah fenolů

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. č.: 1 Podélný řez pšeničným zrnem se znázorněním morfologických vrstev

Obr. č.: 2 Vývoj celkové produkce jarní a ozimé pšenice v ČR od roku 2007

Obr. č.: 3 Obsah lipidů v mouce (v %)

Obr. č.: 4 Podíl jednotlivých forem lipidových frakcí v zrně miličky

Obr. č.: 5 Optická dráha spektrofotometru Lambda 25

Obr. č.: 6 Generování radikálu ABTS a vznik degradačních produktů působením polyfenolů

Obr. č.: 7 Redukce radikálu DPPH

Obr. č.: 8 Ultrazvuková lázeň PS 04000A

Obr. č.: 9 Odstředivka EBA 20

Obr. č.: 10 Milička ve formě zrna (Bolívie)

Obr. č.: 11 Milička ve formě mouky (Bolívie)

Obr. č.: 12 Tmavý typ miličky (USA)

Obr. č.: 13 Bílý typ miličky (USA)

SEZNAM GRAFŮ

Graf č.1 Kalibrační křivka vyjadřující závislost absorbance na koncentraci kyseliny gallové

Graf č.2 Kalibrační křivka vyjadřující závislost absorbance na koncentraci rutinu

Graf č. 3 Kalibrační křivka vyjadřující závislost úbytku absorbance na koncentraci troloxu metodou ABTS

Graf č.4 Kalibrační křivka vyjadřující závislost absorbance na koncentraci troloxu metodou DPPH

SEZNAM TABULEK

Tabulka č.: 1 Rozdělení látkového složení v jednotlivých částech zrna v % sušiny

(Pomeanz, 1971)

Tabulka č.: 2 Obsahy sacharidů zjištěné různými autory v některých cereálních materiálech v % v sušině

Tabulka č.: 3 Obsah AMK v bílkovině pšenice

Tabulka č.: 4 Základní proteiny obilovin

Tabulka č.: 5 Zastoupení masných kyselin v lipidech různých obilovin v hm. %

Tabulka č.: 6 Koncentrace tiaminu, riboflavinu a pyridoxinu u vybraných mouk odrůd pšenice v mg.100 g⁻¹

Tabulka č.: 7 Koncentrace vitaminů sk. B ve vybraných obilovinách a výrobcích z obilovin v mg.100 g⁻¹

Tabulka č.: 8 Průměrný obsah minerálních látek u vzorků z Turecka v hm. %

Tabulka č.: 9 Průměrný obsah minerálních látek u vzorků z Turecka v mg.kg⁻¹

Tabulka č.: 10 Obsah fenolických kyselin v pšeničných otrubách v mg.kg⁻¹

Tabulka č.: 11 Průměrný obsah příměsí a nečistot ve vzorcích potravinářské pšenice

sklizené v letech 2005 – 2011 v ČR. Hodnocení podle ČSN 46 1100-2

Tabulka č.: 12 Obsah aminokyselin v miličce (g.16 g⁻¹ N) ve srovnání s ostatními obilovinami

Tabulka č.:13 Množství aminokyselin v g.100 g⁻¹ v čerstvém zrně miličky

Tabulka č.:14 Obsah mastných kyselin v g.100 g⁻¹ v čerstvém zrně miličky

Tabulka č.:15 Obsah škrobu a vlákniny ve srovnání s jinými obilovinami

Tabulka č.: 16 Obsah minerálních látek miličky ve srovnání s jinými obilovinami v mg.kg⁻¹

Tabulka č.: 17 Obsah zinku, železa, vápníku a fytátu v miličce a ve výrobcích z ní v mg.100 g⁻¹

Tabulka č.:18 Obsah vitaminů v miličce habešské v mg.100 g⁻¹

Tabulka č.:19 Obsah celkových polyfenolů v různých druzích obilovin v mg.100 g⁻¹

Tabulka č.:20 Výsledky stanovení obsahu polyfenolů ve vzorcích miličky

Tabulka č.:21 Výsledky stanovení obsahu polyfenolů ve vzorcích mouky

Tabulka č.:22 Výsledky stanovení obsahu polyfenolů ve vzorcích směsí s 5% obsahem miličky

Tabulka č.: 23 Výsledky stanovení obsahu polyfenolů ve vzorcích směsí s 10% obsahem miličky

Tabulka č.: 24 Výsledky stanovení obsahu polyfenolů ve vzorcích směsí s 15% obsahem miličky

Tabulka č.: 25 Výsledky stanovení obsahu polyfenolů ve vzorcích směsí s 20% obsahem miličky

Tabulka č.: 26 Naměřené hodnoty absorbance kyseliny gallové pro sestavení kalibrační křivky

Tabulka č.: 27 Výsledky stanovení obsahu flavonoidů ve vzorcích miličky

Tabulka č.: 28 Výsledky stanovení obsahu flavonoidů u vzorků mouky

Tabulka č.: 29 Výsledky stanovení obsahu flavonoidů ve vzorcích směsí s 5% obsahem miličky

Tabulka č.: 30 Výsledky stanovení obsahu flavonoidů ve vzorcích směsí s 10% obsahem miličky

Tabulka č.: 31 Výsledky stanovení obsahu flavonoidů ve vzorcích směsí s 15% obsahem miličky

Tabulka č.: 32 Výsledky stanovení obsahu flavonoidů ve vzorcích směsí s 20% obsahem miličky

Tabulka č.: 33 Naměřené hodnoty absorbance rutinu pro sestavení kalibrační křivky

Tabulka č.:34 Výsledky stanovení antioxidační aktivity u miličky metodou ABTS

Tabulka č.:35 Výsledky stanovení antioxidační aktivity u mouk metodou ABTS

Tabulka č.: 36 Výsledky stanovení antioxidační aktivity u vzorků směsí s 5 % miličky metodou ABTS

Tabulka č.:37 Výsledky stanovení antioxidační aktivity u vzorků směsí s 10 % miličky metodou ABTS

Tabulka č.: 38 Výsledky stanovení antioxidační aktivity u vzorků směsí s 15 % miličky metodou ABTS

Tabulka č.: 39 Výsledky stanovení antioxidační aktivity u vzorků směsí s 20 % miličky metodou ABTS

Tabulka č.: 40 Naměřené hodnoty úbytku absorbance v závislosti na koncentraci troloxu

Tabulka č.:41 Výsledky stanovení antioxidační aktivity u miličky metodou DPPH

Tabulka č.:42 Výsledky stanovení antioxidační aktivity u mouk metodou DPPH

Tabulka č.: 43 Výsledky stanovení antioxidační aktivity ve vzorcích směsí s 5% obsahem miličky metodou DPPH

Tabulka č.: 44 Výsledky stanovení antioxidační aktivity ve vzorcích směsí s 10% obsahem miličky metodou DPPH

Tabulka č.: 45 Výsledky stanovení antioxidační aktivity ve vzorcích směsí s 15% obsahem miličky metodou DPPH

Tabulka č.: 46 Výsledky stanovení antioxidační aktivity ve vzorcích směsí s 20% obsahem miličky metodou DPPH

Tabulka č.:47 Naměřené hodnoty úbytku absorbance troloxu

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA I: Eragrostis tef (Zucc.) Trotter

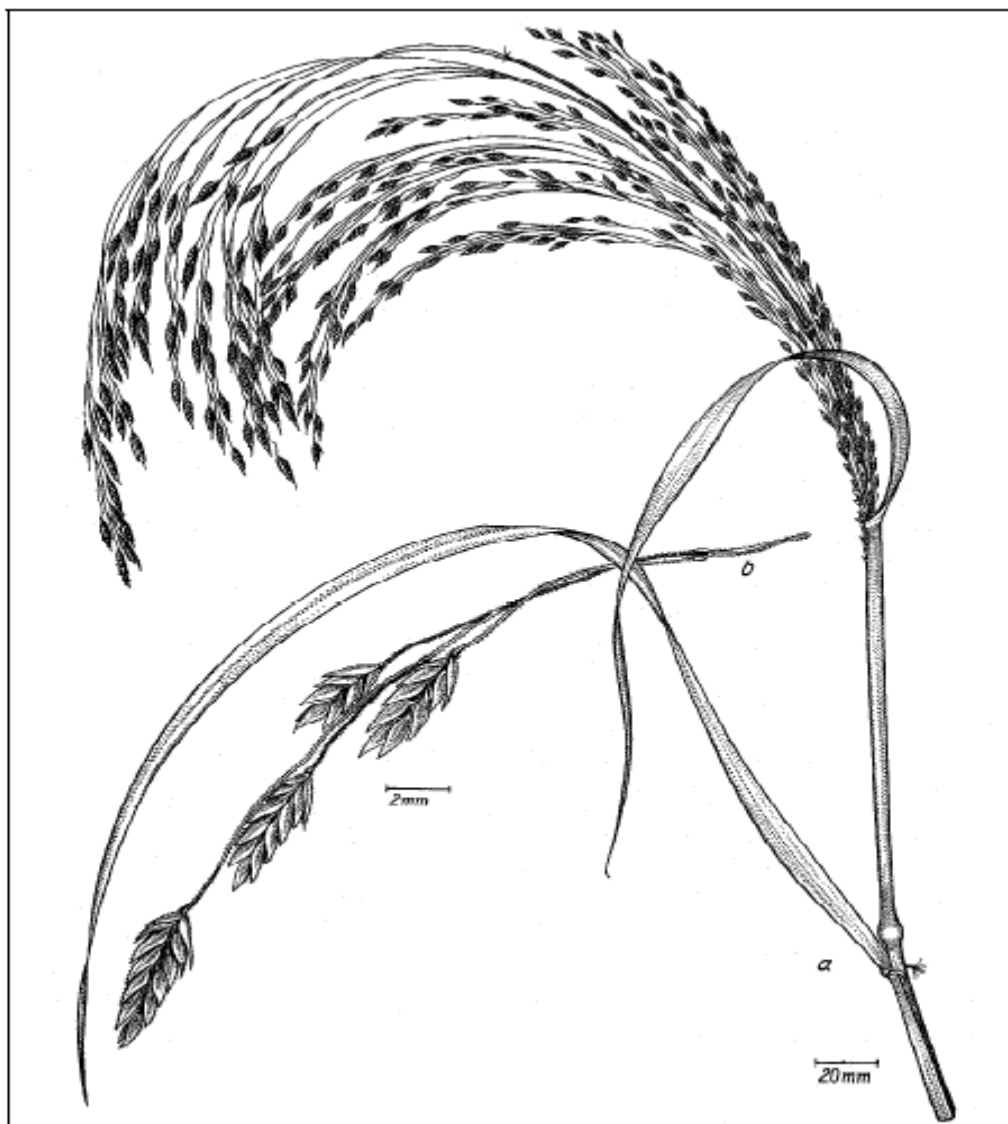
PŘÍLOHA II: Grafy polyfenoly

PŘÍLOHA III: Grafy flavonoidy

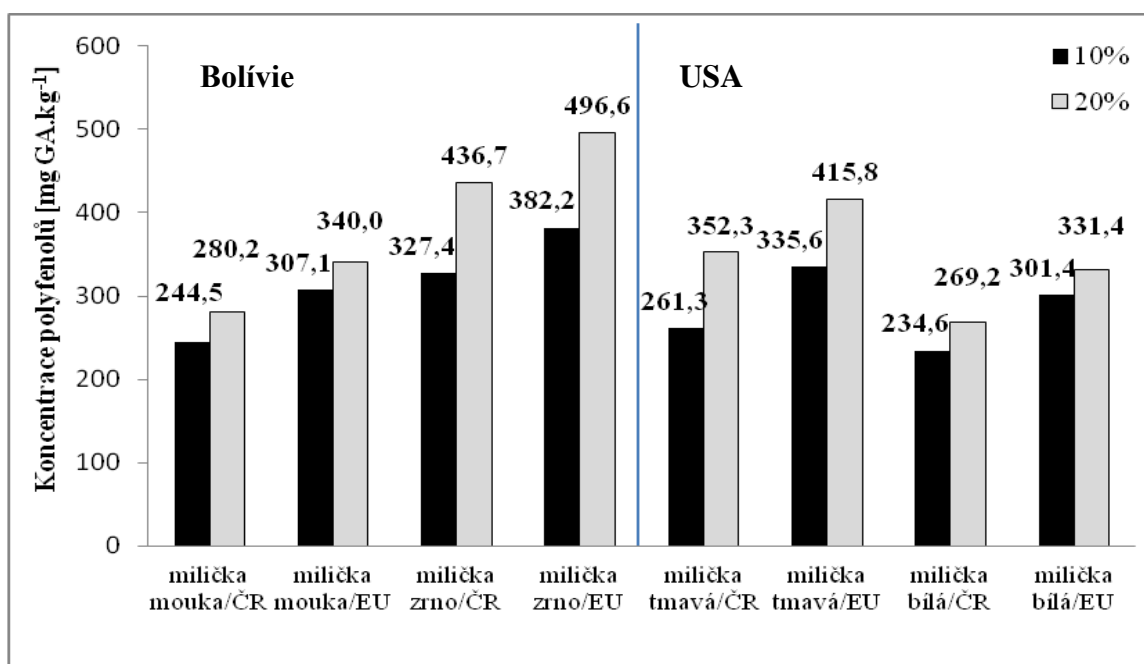
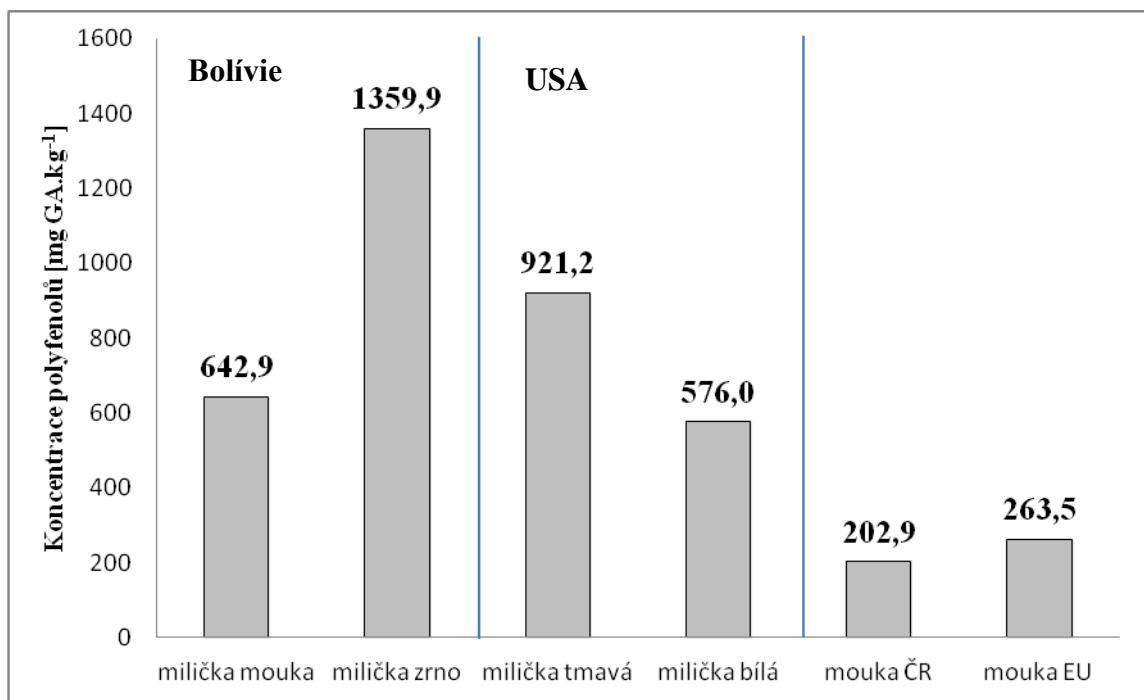
PŘÍLOHA IV: Grafy ABTS

PŘÍLOHA V: Grafy DPPH

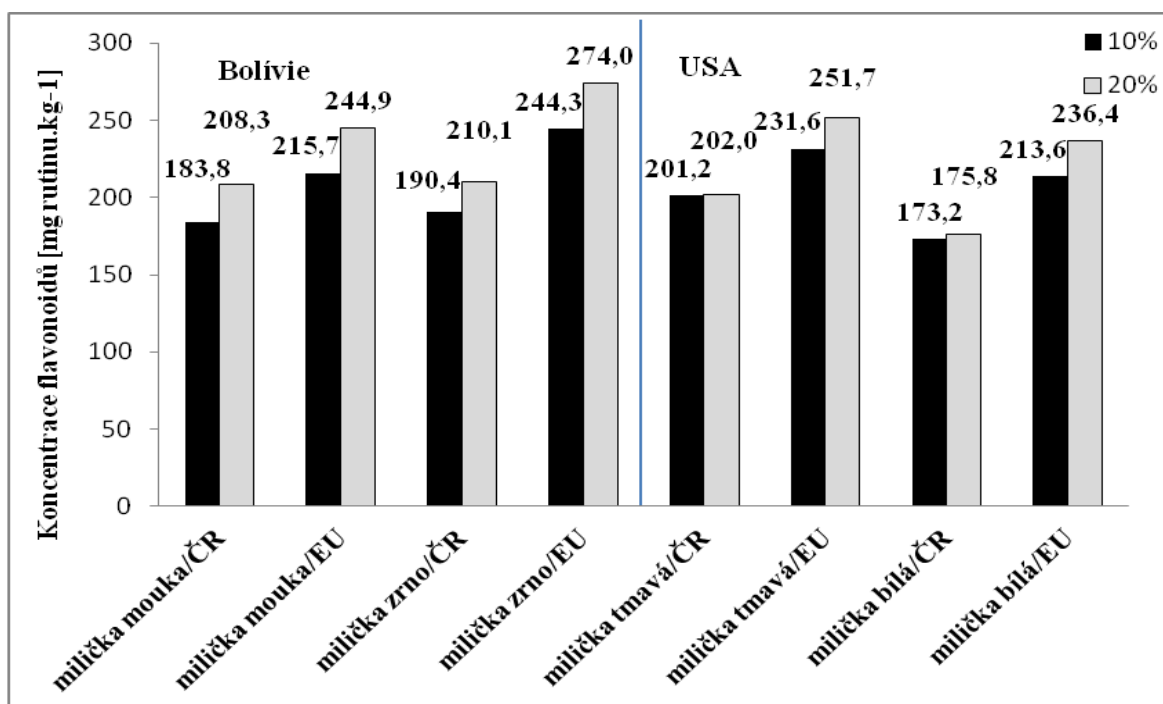
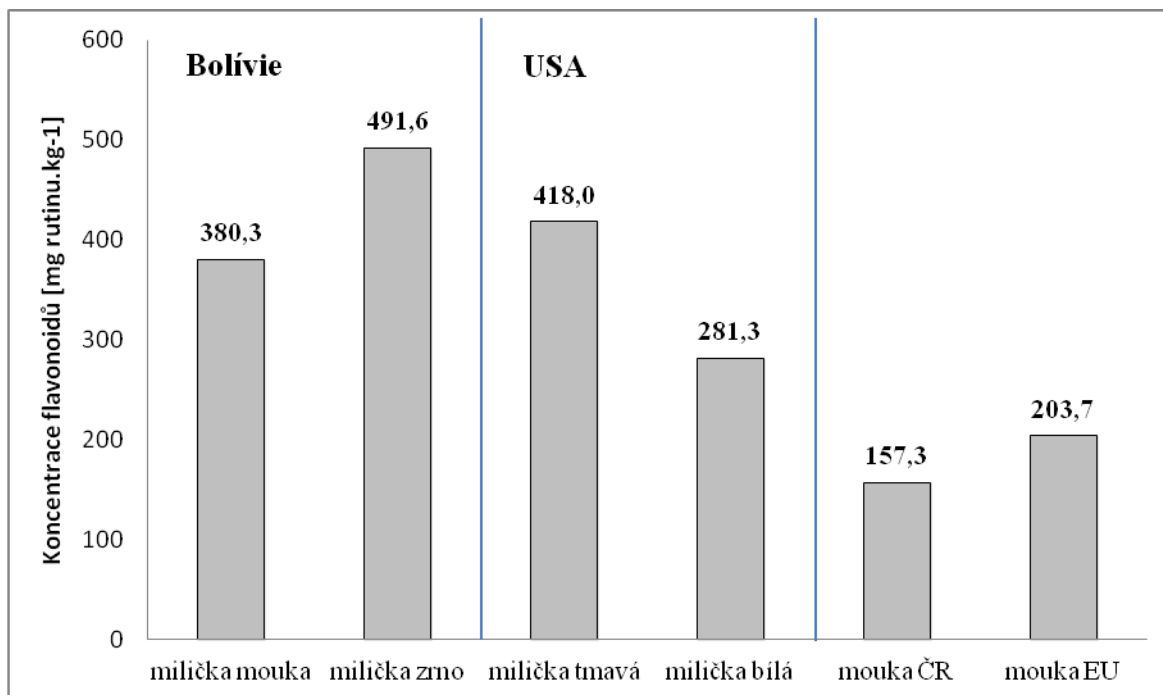
PŘÍLOHA P I: ERAGROSTIS TEF (ZUCC.) TROTTER [34].



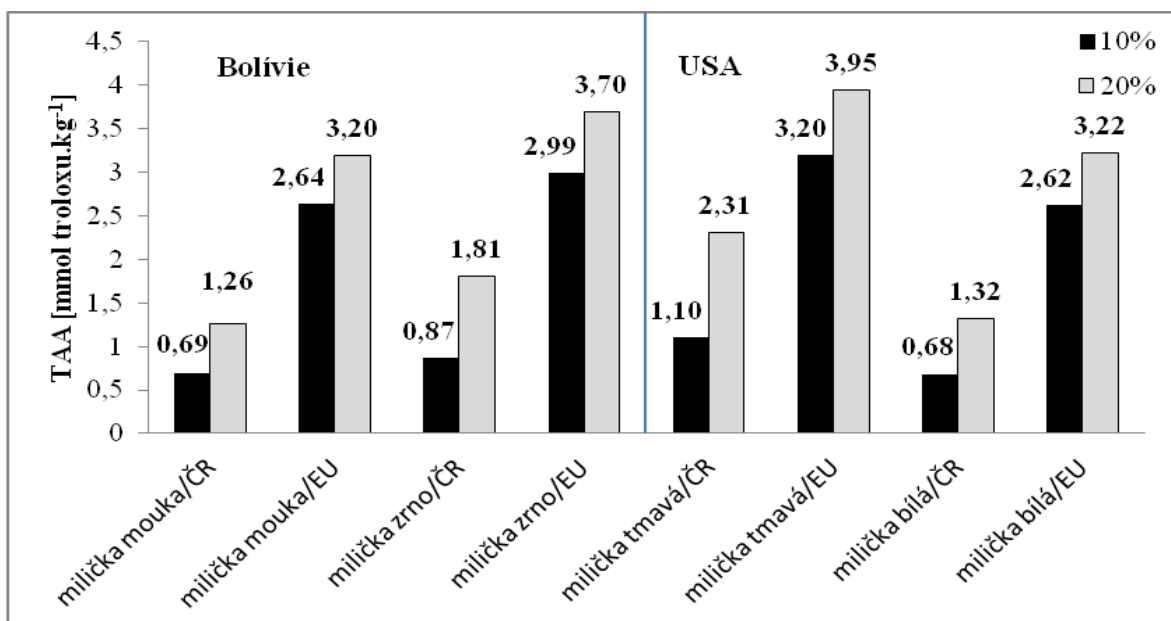
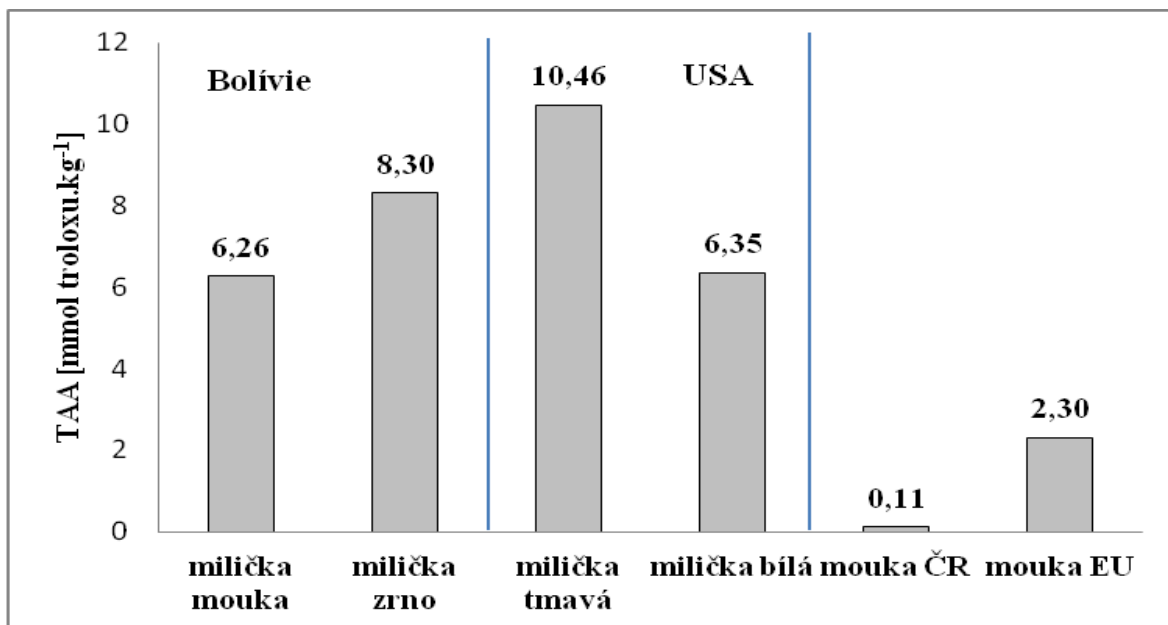
PŘÍLOHA P II: GRAFY POLYFENOLY



PŘÍLOHA PII: GRAFY FLAVONOIDY



PŘÍLOHA P IV: GRAFY ABTS



PŘÍLOHA P V: GRAFY DPPH

