

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Vliv sušení na antioxidační vlastnosti slupek z bobulí révy vinné
Tereza Hloušková

Bakalářská práce
2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Tereza Hloušková**
Osobní číslo: **C16060**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Vliv sušení na antioxidační vlastnosti slupek z bobulí révy vinné**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Definujte termíny hroznové víno, popř. pokrutiny s využitím platné legislativy. Na základě rešerše v odborných zahraničních nebo tuzemských periodikách uveďte základní složení bobulí révy vinné (pouze slupky, odrůdy bílé) včetně obsahu polyfenolických látek.
2. Popište, co se děje s polyfenolickými látkami během sušení v sušárně s nuceným oběhem vzduchu.
3. Experimentálně zjistěte, jaký vliv má teplota a doba sušení na antioxidační parametry slupek z bobulí révy vinné. Výsledky vyhodnoťte a diskutujte.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **5. února 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 23. 4. 2019

Tereza Hloušková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu své bakalářské práce doc. Ing. Liborovi Červenkovi, Ph.D. za cenné rady a vynaložený čas. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině a přátelům, kteří mě podporovali během celého studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá vlivem sušení na antioxidační vlastnosti slupek z bobulí révy vinné. V teoretické části je popsáno složení bobulí révy vinné, složení pokrutin z hlediska obsahu fenolických látek a jejich využití. Následně je popsán vliv antioxidantů na organismus a možné úpravy pokrutin. Na závěr teoretické části jsou uvedeny metody, které byly využity v části praktické. Praktická část se pak zabývá sušením pokrutin při zvolených teplotách a časech a následným stanovením celkové obsahu fenolických látek a antioxidační kapacity.

KLÍČOVÁ SLOVA

Réva vinná, pokrutiny hroznů, antioxidační aktivita, sušení

TITLE

Antioxidant properties of grape skin as affected by hot-air drying

ANNOTATION

This thesis examines the change of antioxidant properties of grape skin dried by hot air. The theoretical part describes the composition of grape berries, skin and their use. After that the effect of antioxidants on human health is described and various methods of grape skin treatment are specified. Analytical methods used in the practical part of thesis are characterized. The effect of drying temperature and time on total phenolic content and antioxidant capacity of dried grape skin is examined.

KEYWORDS

Grape berry, grape skin, grape peels, antioxidant activity, hot air drying

OBSAH

Seznam obrázků	9
Seznam tabulek	10
Seznam grafů	11
Seznam zkratk	12
ÚVOD	13
1 TEORETICKÁ ČÁST	14
1.1 Réva vinná	14
1.1.1 Pěstování	14
1.1.2 Morfologie a chemické složení	14
1.2 Pokrutiny	21
1.2.1 Vznik pokrutin	21
1.2.2 Fenolické složení pokrutin	21
1.2.3 Využití pokrutin	23
1.3 Účinky antioxidantů v organismu	25
1.3.1 Volné radikály	25
1.3.2 Antioxidanty	26
1.3.3 Oxidační stres	28
1.4 Úprava pokrutin	29
1.4.1 Lyofilizace	29
1.4.2 Sušení	30
1.4.3 Vakuové sušení	31
1.5 Použité metody	32
1.5.1 Extrakce	32
1.5.2 Spektrofotometrie	32
1.5.3 Stanovení antioxidační aktivity	34
1.5.4 Statistické zpracování	35

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
2.1 Přístroje	36
2.2 Chemikálie	36
2.3 Vzorky	37
2.3.1 Pokrutiny hroznů révy vinné	37
2.3.2 Zpracování pokrutin k analýze	37
2.4 Postupy jednotlivých analýz	37
2.4.1 Stanovení množství odpařené vody	37
2.4.2 Stanovení obsahu sušiny	38
2.4.3 Extrakční metody	38
2.4.4 Spektrofotometrické analýzy	38
3 VÝSLEDKY A DISKUZE	40
3.1 Stanovení množství odpařené vody	40
3.2 Stanovení obsahu sušiny	41
3.3 Spektrofotometrické analýzy	41
3.3.1 Stanovení celkového obsahu fenolických látek	41
3.3.2 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH	43
4 ZÁVĚR	45
Použitá literatura	46
Seznam příloh	52

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Obecná struktura hydroxybenzoových kyselin	16
Obrázek 2: Obecná struktura hydroxyskořicových kyselin	17
Obrázek 3: Struktura resveratrolu	17
Obrázek 4: Obecná struktura flavanolů	17
Obrázek 5: Obecná struktura flavonolů	18
Obrázek 6: Redukce molekulárního kyslíku na vodu	25
Obrázek 7: Schéma spektrofotometru	33
Obrázek 8: Schéma reakce	34
Obrázek 9: Pokrutiny po mletí	37
Obrázek 10: Pokrutiny po sušení	37
Obrázek 11: Extrakce ultrazvukem	38

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Základní obsahové látky ve 100 g bobulí révy vinné (zelená odrůda)	14
Tabulka 2: Základní rozdělení polyfenolických sloučenin v hroznech	16
Tabulka 3: Fenolické složení červených a bílých odrůd hroznů	18
Tabulka 4: Obsah minerálních látek ve 100 g bobulí révy vinné (zelená odrůda)	19
Tabulka 5: Obsah vitamínů ve 100 g bobulí révy vinné (zelená odrůda)	20
Tabulka 6: Obsah fenolických látek ve slupce a semenech	22
Tabulka 7: Obsah polyfenolů v čerstvých a lyofilizovaných vzorcích pokrutin	29

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Množství odpařené vody	40
Graf 2: Obsah sušiny	41
Graf 3: Celkový obsah fenolických látek pro jednotlivé vzorky	42
Graf 4: Antioxidační kapacita pro jednotlivé vzorky	43

SEZNAM ZKRATEK

ATP	adenosintrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-nitrofenyl)hydrazyl
FC	Folin-Ciocalteu
FR	free radicals (volné radikály)
RM	reactive metabolites (reaktivní metabolity)
RMN	reactive metabolites of nitrogen (reaktivní metabolity dusíku)
RMO	reactive metabolites of oxygen (reaktivní metabolity kyslíku)
rpm	revolutions per minute (otáčky za minutu)
SOD	superoxid dismutáza
TPC	total phenolic content (celkový obsah fenolických látek)
Trolox	kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboxylová

ÚVOD

V posledních desetiletích narůstají obavy z neustálého zvětšování objemů odpadů vytvořených v potravinářském průmyslu. Velké množství odpadů pak produkuje konkrétně průmysl vinařský. Zbytky, které zůstávají po lisování vína, označované jako pokrutiny tvoří asi 20 % hmotnosti zpracovaného hroznu. Ročně to představuje asi 10–15 milionů tun, a to pouze v Evropě.

Zde se nabízí otázka, jak naložit se vzniklým odpadem. Pokrutiny se často využívají jako hnojivo, což je při pohledu na jejich složení velká škoda. Pokrutiny jsou totiž bohaté na fenolické látky. Tyto látky se vyznačují svými antioxidačními účinky, díky kterým působí pozitivně na lidské zdraví. Tím se nabízí možnost využívat pokrutiny například jako složku funkčních potravin.

Problémem ale je, že výroba vína probíhá většinou ihned po sklizni hroznů, tedy naráz. Množství vzniklých pokrutin je tedy veliké a díky jejich vysokému obsahu vlhkosti, což je spojeno s rychlým kažením, je nutné je zpracovat ihned. Jako optimální metoda z hlediska finanční náročnosti a rychlosti provedení se nabízí sušení.

Cílem této práce bylo otestovat, jaký vliv mají zvolené teploty sušení v kombinaci s časem na množství fenolických látek a antioxidační kapacitě pokrutin. Pro vyhodnocení byla využita metoda s DPPH radikálem a dále stanovení celkového množství fenolických látek.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Réva vinná

Révou se pro účely zákona č. 321/2004 Sb., o vinohradnictví a vinařství a o změně některých souvisejících zákonů (zákon o vinohradnictví a vinařství) rozumí réva rodu *Vitis* [1].

1.1.1 Pěstování

Vinná réva je v celosvětovém měřítku ekonomicky velice významnou plodinou. V České republice spotřeba vína neustále narůstá, což je předpokladem pro další rozvoj vinohradnictví. Prozatím ale Česká republika patří stále mezi malé vinařské země. Česko se řadí mezi státy s tzv. vinohradnictvím chladného podnebí, což s sebou nenese pouze nižší průměrné teploty, ale především pozitivní vliv na zrání hroznů. Během zrání se u hroznů tvoří aromatické a fenolické látky [2]. V České republice se vinná réva pěstuje ve dvou vinařských oblastech: vinařská oblast Morava a vinařská oblast Čechy. Tyto oblasti se dělí dále na podoblasti: Mikulovsko, Velkopavlovicko, Znojemsko a Slovácko, patřící pod oblast Morava. Vinařská oblast Čechy má pak 2 podoblasti: Mělnicko a Litoměřicko [3].

1.1.2 Morfologie a chemické složení

Morfologicky se hrozný révy vinné skládají ze třapin se stopkami a bobulí. Bobule se pak dále skládají z dužiny, semen a slupek. Při výrobě vín je nutné třapiny a stopky odstranit, protože obsahují chuťově nepříznivé polyfenoly a dřevité látky.

Chemické složení hroznů má vliv na kvalitu vyráběného vína a je ovlivněno především okolními podmínkami během pěstování, mezi které patří: klimatické a půdní podmínky. Mezi nejdůležitější látky v bobulích hroznů patří voda, sacharidy a organické kyseliny. Dále pak dusíkaté, fenolové, minerální a aromatické látky, vitamíny, tuky a oleje [3]. Zastoupení těchto látek je vyobrazeno v následující Tabulce 1.

Tabulka 1: Základní obsahové látky ve 100 g bobulí révy vinné (zelená odrůda) [4]

Látky	g/100 g
voda	79,3
bílkoviny	0,6
tuky	stopové množství
cukry	16,1

1.1.2.1 Sacharidy

Mezi nejvýznamnější sacharidy v bobulích révy vinné patří glukóza a fruktóza, dále se pak v menších množstvích vyskytuje: rafinóza, maltóza, galaktóza, arabinóza a xylóza. Cukry se tvoří hlavně při fotosyntéze. Vznikají především na listech, proto je velká a zdravá listová plocha základem kvalitní cukernatosti hroznů. Nejdůležitějším transportním cukrem je v révovém keři sacharóza, která se enzymaticky štěpí na glukózu a fruktózu [5]. Její obsah je potom v samotných bobulích minimální. Cukry se během kvašení vína přeměňují na alkohol pomocí kvasinek. Senzoricky aktivní je ve víně zbytkový cukr. Vzniklá vína se pak dělí podle obsahu cukru na: suchá, polosuchá, polosladká, sladká [6].

1.1.2.2 Organické kyseliny

V bobulích révy vinné je obsažena nejvíce kyselina vinná a dále pak kyselina jablečná. Dohromady tvoří 70–90 % všech organických kyselin, které jsou v bobulích zastoupeny. Obsah kyseliny vinné je poměrně stabilní, změna ale může proběhnout naředěním obsahu bobulí při intenzivních srážkách v době zrání hroznů. Kyselina jablečná je pak méně stabilní. Změny jejího obsahu mohou být způsobeny například vlivem oslunění nebo obsahem draslíku. Dále se může v hroznech vyskytovat kyselina glukonová. Její přítomnost funguje jako indikátor, který poukazuje na napadení hroznů hnilobami, což je spojené také s aktivitou octových a mléčných bakterií a tvorbou kyseliny octové. V hroznech se vyskytují také kyselina jantarová a mléčná. Kyselina mléčná je produktem jablečno-mléčné fermentace, kterou způsobují mléčné bakterie. Výsledkem je přeměna méně příjemné chuti kyseliny jablečné na chuťově jemnější kyselinu mléčnou. Tohoto procesu se využívá u Ryzlinku rýnského, Ryzlinku vlašského, Rulandského bílého. Kyseliny mají tedy vliv především na senzorické vlastnosti vína. U bílých vín je vyšší obsah kyselin pozitivní, protože podporuje svěžest chuti a zvýrazňuje aromatický projev vína [5, 6].

1.1.2.3 Dusíkaté látky

Dusíkaté látky jsou v bobulích révy vinné zastoupeny v minerálních formách (NH_4 , NO_3 , NO_2) nebo v organických formách jako volné aminokyseliny, bílkoviny nebo některé vitamíny [5]. Bílkoviny jsou obsaženy především ve slupce (0,4–2,0 %) a v semenech (0,8–4,6 %). Menší procento je pak v dužině (0,1–0,4 %) [4]. Z pohledu výroby vína jsou důležité především amonné ionty a volné asimilovatelné aminokyseliny, protože slouží především jako výživa pro kvasinky. Tyto dvě sloučeniny dohromady představují tzv. asimilovatelný dusík v hroznech. Pokud je ve vínu nízký obsah asimilovatelného dusíku bude populace kvasinek nízká a kvašení bude mít tedy horší dynamiku. Při takových podmínkách se budou ve víně tvořit

látky sirnaté povahy a vyšší alkoholy, což s sebou nese nepříjemnou chuť vína a zároveň se také snižuje tvorba látek, které mají na chuť vína dobrý vliv [6].

1.1.2.4 Fenolické látky

Hrozny jsou důležitým zdrojem antioxidantů, tedy fenolických sloučenin (Tabulka 2). Jejich antioxidační aktivita je považována za vyšší, než mají například vitamíny. Polyfenoly jsou látky, které jsou tvořené benzenovým kruhem s jednou a více hydroxylových skupin. Syntéza těchto látek v rostlinné tkáni je ovlivněna řadou faktorů, jako je například sluneční záření, teplota a tloušťka slupky. Polyfenoly pak dělíme na flavonoidy a neflavonoidy. Flavonoidy se skládají hlavně z anthokyanů, flavonolů a flavan-3-olů. Mezi neflavonoidy patří kyseliny hydroxybenzoové a hydroxyskořicové [7, 8].

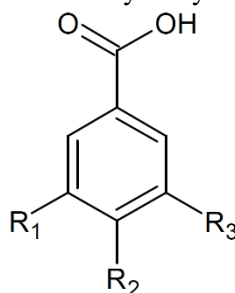
Tabulka 2: Základní rozdělení polyfenolických sloučenin v hroznech [5]

Neflavonoidní fenolické látky	hydroxybenzoové kyseliny	kyselina gallová, protokatechová, vanilová
	hydroxyskořicové kyseliny	kyselina kumarová, kávová, ferulová, kaftarová
	stilbeny	trans a cis-resveratrol, astringin
Flavonoidní fenolické látky	antokyany	malvidin-3-glukosid, cyanidin-3-glukosid, peonidin-3-glukosid, delphinidin-3-glukosid
	flavan-3-oly	katechin, epikatechin, gallokatechin
	flavonoly	kvercetin, myricetin, rutin, kaempferol

Neflavonoidní látky

Co se týká neflavonoidů, konkrétně derivátů kyseliny hydroxybenzoové (Obrázek 1), tak z větší části jsou v hroznech zastoupeny kyseliny gallová, ellagová, sorbová a vanilová. Bílé hrozny vykazují všeobecně nižší koncentrace fenolických látek než odrůdy červené. Například kyselina gallová je v červených hroznech zastoupena v rozmezí 1,846 mg/kg (odrůda Petit Verdot) až 0,635 mg/kg (odrůda Caladoc). U bílých hroznů se koncentrace pohybuje v rozmezí 0,780 mg/kg (Gros Meseng) až například 0,537 mg/kg (odrůda Vermentino).

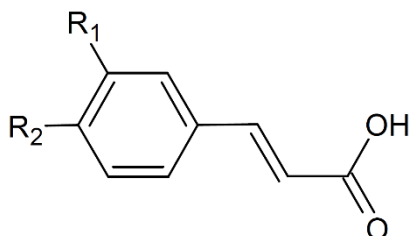
Obrázek 1: Obecná struktura hydroxybenzoových kyselin [9]



$R_1 = R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$: protokatechová kyselina; $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$: gallová kyselina

Jako deriváty kyseliny hydroxyskořicové se v hroznech vyskytují kyseliny kaftarová a p-kumarová (Obrázek 2). Koncentrace kyseliny kaftarové jsou opět vyšší u červených odrůd než u odrůd bílých. Koncentrace kyseliny p-kumarové jsou pak pro každou odrůdu různé, bez ohledu na její barvu.

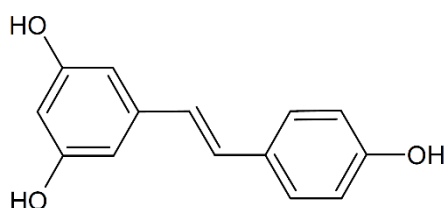
Obrázek 2: Obecná struktura hydroxyskořicových kyselin [9]



$R_1 = \text{OH}$: kumarová kyselina; $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{OH}$: ferulová kyselina

Dále mezi neflavonoidy patří stilbeny. Stilbeny jsou látky, které mají antifugální účinky. To znamená, že se uplatňují v boji proti patogenům. Mezi stilbeny patří resveratrol (Obrázek 3), který je obsažen především ve slupce hroznů. Jeho koncentrace je opět vyšší u červených odrůd.

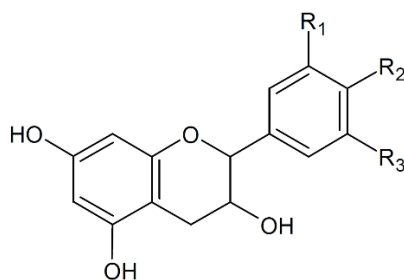
Obrázek 3: Struktura resveratrolu [9]



Flavonoidní látky

Flavonoidní fenolické látky mezi které patří flavanoly (Obrázek 4), konkrétně pak katechin a epikatechin, jsou jednou z hlavní tříd fenolických látek v hroznech. Tyto sloučeniny se vyskytují hlavně v hroznových semenech. Tudíž je jejich celková koncentrace v hroznech dána dvěma faktory. A to koncentrací těchto látek v semenech a velikostí semen.

Obrázek 4: Obecná struktura flavanolů [9]



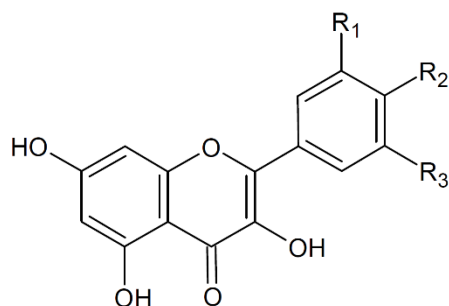
$R_1 = R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{H}$: katechin; $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$: gallokatechin

Jako zástupci flavonolů (Obrázek 5) se v hroznech vyskytují především kvercetin, rutin a kaempferol. Koncentrace těchto látek je pro červené a bílé odrůdy dosti variabilní, ale obecně opět převažuje vyšší koncentrace u odrůd červených. Nicméně obsah kaempferolu je u obou typů hroznů velmi malý. Pro přehlednost výskytu fenolických látek u jednotlivých odrůd je k dispozici Tabulka 3 [7].

Tabulka 3: Fenolické složení červených a bílých odrůd hroznů [7]

Neflavonoidy	Červené odrůdy			Zelené odrůdy		
	Cabernet Sauvignon	Petit Verdot	Caladoc	Gros Manseng	Vermantino	Muškát
Hydroxybenzoová kys. [mg/kg]						
Kyselina gallová	0,89	1,84	0,63	0,71	0,53	0,59
Kyselina ellagová	5,54	8,89	4,58	0,89	12,69	17,03
Kyselina sorbová	0,54	0,64	-	0,31	0,17	0,29
Kyselina vanilová	0,52	0,26	-	0,47	0,05	0,23
Hydroxyskořicová kys. [mg/kg]						
Kyselina kaftarová	0,86	9,10	4,35	0,98	4,67	6,69
Kyselina p-kumarová	0,52	0,73	1,21	0,53	0,22	0,28
Stilbeny [mg/kg]						
Resveratrol	0,55	0,55	0,58	0,11	0,11	0,34
Flavonoidy						
Flavanoly [mg/kg]						
Katechin	5,12	13,93	3,63	2,73	1,24	2,25
Epikatechin	3,53	7,44	0,91	2,88	0,93	1,79
Flavonoly [mg/kg]						
Kvercetin	3,72	8,85	5,60	1,94	4,02	3,45
Rutin	0,20	2,85	3,67	1,09	0,85	2,58
Kaempferol	0,02	0,00	0,24	0,23	0,08	0,25

Obrázek 5: Obecná struktura flavonolů [9]



$R_2 = \text{OH}$, $R_1 = R_3 = \text{H}$: kaempferol; $R_1 = R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{H}$: kvercetin

1.1.2.5 Minerální látky

Minerální látky, které jsou přítomné v celé rostlině, mají vliv na veškeré fyziologické děje, které se v ní odehrávají. Réva vinná tyto látky přijímá kořenovým systémem a částečně listovou plochou. Jejich množství v hroznech (Tabulka 4) je tedy ovlivněno půdou, počasím nebo i následným skladováním hroznů. Do bobulí se pak minerální látky dostávají pomocí xylému nebo floému [2, 4, 5].

Tabulka 4: Obsah minerálních látek ve 100 g bobulí révy vinné (zelená odrůda) [4]

Minerální látky	mg/100 g
sodík	2
draslík	250
vápník	19
hořčík	7
fosfor	22
železo	0,3
zinek	0,1

1.1.2.6 Aromatické látky

Obsah aromatických látek závisí na druhu hroznů a dále na půdních podmínkách a klimatu. Aroma můžeme dělit na primární, hroznové nebo odrůdové. Hrozny pak obsahují dva typy aromatických sloučenin: aromatické látky ve volné formě, které jsou typické pro odrůdu a aromatické prekurzory ve vázané formě, které jsou také typické pro odrůdu, ale projeví se až po kvašení moštu v mladém víně. Aromatické látky v bobulích můžeme dělit do několika skupin na: monoterpeny, norisoprenoidy a těkavé fenoly. Co se týká monoterpenů, ty se vyskytují například u odrůd Muškát moravský, Muškát Ottonel, Tramín atd. Norisoprenoidy vznikají při odbourávání karotenoidů. Karotenoidy jsou obsaženy v dužině, a především ve slupce. Obsah karotenoidů se snižuje během dozrávání hroznů, zatímco obsah norisoprenoidů se zvyšuje. Typickým zástupcem s obsahem norisoprenoidů je odrůda Chardonnay. Těkavé fenoly pak vznikají z hydroxyskořicových kyselin a jejich obsah v hroznech se vyznačuje jejich hnědnutím. V hroznech je za aroma ještě zodpovědný methoxypyrazin, jehož základním zástupcem je isobutylpyrazin. Methoxypyrazin je typický pro odrůdu Sauvignon [5, 6].

1.1.2.7 Vitamíny

Podobně jako ostatní druhy ovoce, obsahují i hrozny révy vinné velké množství vitamínů (Tabulka 5). V bobulích je obsaženo více vitamínů rozpustných ve vodě. Nejvýznamnější je vitamín C, díky jeho antioxidačním účinkům [4].

Tabulka 5: Obsah vitamínů ve 100 g bobulí révy vinné (zelená odrůda) [4]

Vitamíny	mg/100 g
vitamín C	4
vitamín B1	0,04
vitamín B2	0,02
vitamín B6	0,10
	µg/100 g
kyselina panthotenová	0,05
kyselina listová	6
biotin	0,3

1.2 Pokrutiny

1.2.1 Vznik pokrutin

Pokrutiny vznikají při výrobě vína. Nejprve se hrozny sklídí a dopraví k přejímce hroznů. Na tomto místě probíhá měření cukernatosti a na základě tohoto měření se určuje jakost. Jakost závisí ještě na zdravotním stavu a odrůdě. Dále se pak provádí odstopkování, mletí, odzrňování, provzdušnění, nakvašování, scezování a lisování. První operací je tedy odstopkování, což je oddělení třapin od bobulí. Tento proces probíhá v mlýnkoodzrňovačích a zároveň při něm dochází k drcení bobulí. Cílem je odstranit složky hroznů, které by měly negativní vliv na chuť výsledného vína. Další operací je mletí, kterým se rmut (rozemleté hrozny s třapinami) provzdušní. Na mletí se používají například válcové mlýnky. Při mletí je důležité, aby nedošlo k porušení semen a třapin. Třapiny se dále odstraňují odzrňováním, které se provádí na různých typech odstředivkových odzrňovačů. Rmut se se dále provzdušňuje a nakvašuje. Při tomto ději se z narušených bobulí vyluhují aromatické a barevné látky. Dále se provede scezování, čímž je oddělen nejkvalitnější mošt. Aby byl oddělen mošt dokonale, provádí se lisování. Právě při tomto procesu vznikají pokrutiny [3].

1.2.2 Fenolické složení pokrutin

Množství zbylých fenolických látek v pokrutinách závisí na technologických parametrech výroby vína. Mezi hlavní zástupce fenolických látek v pokrutinách patří antokyany, katechiny, flavonoly, glykosidy, fenolové kyseliny, alkoholy a stilbeny [10]. Pokrutiny vzniklé při výrobě bílého vína jsou z hlediska zastoupení polyfenolických látek zajímavější. Důvodem je to, že se výrobní procesy červeného a bílého vína liší. Při výrobě červeného vína probíhá jeho fermentace společně s hroznovými výlisky, tudíž určité množství polyfenolů do vína přechází. U bílého vína proces fermentace probíhá bez výlisků, a proto si téměř všechny své polyfenolické látky zachovávají [8]. Přesto hodnoty antioxidační aktivity pro pokrutiny vzniklé lisováním bílých hroznů jsou obecně nižší než u odrůd červených. Z hlediska morfologické stavby hroznů je pak nejvyšší antioxidační aktivita u semen. Na druhém místě jsou slupky, kdy s jejich tmavnoucí barvou antioxidační aktivita roste a na posledním místě je dužina, bez ohledu na barvu hroznů. Pro porovnání množství fenolických látek u slupek a semen je přiložena následující Tabulka 6 [11].

Tabulka 6: Obsah fenolických látek ve slupce a semenech [10]

	složka	slupka [mg/kg]	semena [mg/kg]	
Flavanoly	katechin	226,7	790,2	Ryzlink rýnský
	epikatechin	134,6	674,5	
Flavonoly	kvercetin	nd*	nd*	
	kvercetin 3-O-glukuronid	509,9	38,0	
	kaempferol	nd*	nd*	
	kaempferol 3-O-glukosid	247,6	20,0	
Stilbeny	trans-resveratrol	86,4	14,2	Merzling
Hydroxybenzoové kyseliny	gallová kyselina	15,0	106,5	
	protokatechová kyselina	42,8	102,8	
Hydroxyskořicové kyseliny	kaftarová kyselina	61,0	9,3	
	koutarová kyselina	54,5	30,2	
	fertarová kyselina	17,3	3,0	
	ferulová kyselina	2,6	3,9	

*nedetekováno

Jak již bylo řečeno, celkové množství fenolických látek závisí na mnoha faktorech, jako jsou enviromentální faktory, mezi které patří půdní podmínky nebo podnebí. Dále pak závisí na odrůdě. Vědci ale dále pracují na úpravě těchto faktorů a vyvíjejí další odrůdy s vyšší antioxidační kapacitou [11]. Současné studie také prokazují, že slupky u divoce rostoucích hroznů obsahují vyšší množství fenolických látek než *Vitis vinifera* [12].

Neflavonoidní látky

V pokrutinách se z neflavonoidních látek vyskytuje kyselina protokatechová patřící mezi hydroxybenzoové kyseliny. Jako další se vyskytují látky patřící mezi hydroxyskořicové kyseliny, a to kumarové, koutarové a ferulové kyseliny. Obecně pokrutiny vykazují vyšší množství trans-izomerů než cis-izomerů. V nejvyšších koncentracích se vyskytuje kyselina trans-kaftarová.

Obsah neflavonoidních látek v pokrutinách se pro různé odrůdy samozřejmě liší, ale jejich různý obsah není závislý pouze na odrůdě. Různý obsah je způsoben i tím, že tyto látky se mohou vyskytovat jak volné, tak jako konjugované formy, které pak jsou vázány například na jednu nebo více molekul cukru nebo na chinonové kyseliny.

Flavonoidní látky

Jako zástupce flavanolů se nejvíce vyskytuje katechin (10–20 mg/kg), následovaný epikatechinem (0–10 mg/kg), přičemž obsahy těchto látek jsou podobné i pro červené odrůdy.

Flavonoly se pak vyskytují jako kvercetin glukuronid a kaempferol glukosid. Dále pokrutiny obsahují prokyanidiny, které patří mezi kondenzované taniny. Ty jsou složeny z molekul katechinu a epikatechinu. Zastoupené jsou samozřejmě také antokyany [13, 14].

Znalost obsahu polyfenolických látek je důležitá pro jejich další budoucí využití.

1.2.3 Využití pokrutin

Pokrutiny jsou hlavním zbytkem vinařského průmyslu a ročně se jich generuje mnoho tun. V posledních desetiletích vznikají obavy z neustálého zvyšování objemů odpadů vytvořených v potravinářském průmyslu. Pokrutiny představují přibližně 20 % (hm.) zpracovaného hroznů a samotná vysušená slupka odpovídá 82 % sušiny. Většinou se pokrutiny využívají jako organické hnojivo nebo se přidávají zvířatům do krmiv. Pokrutiny jsou ale stále velmi bohaté na biologicky hodnotné složky především na fenolické sloučeniny. Proto představují alternativu pro získání produktů s vysokou přidanou hodnotou a lze je tedy využít jako přísady do potravin nebo z nich zbylé fenolické látky získat a tím vzniklý „odpad“ ještě nějakým způsobem zúročit [15, 16].

Zájem o přírodní antioxidanty z rostlin zejména z fenolů, jako je kvercetin, karnosin (rozmarýn), thymol (tymián), katechin a morin v posledních letech vzrostl. Především z důvodu jejich pozitivního vlivu na lidské zdraví, což bude dále popsáno u kapitoly: Účinky antioxidantů v organismu [11]. Dnes lze na trhu narazit na různé polyfenoly, které většinou pocházejí ze semínek hroznů (např. oligomerní prokyanidiny) nebo právě z pokrutin [8]. Samotné antokyany se využívají jako přírodní potravinářská barviva [10].

Využití je možné i z pohledu antimikrobiální účinnosti bílkovinných extraktů pokrutin. Tyto extrakty jsou odolné především vůči gramnegativním bakteriím (*Campylobacter* a *Salmonella*) [17].

Dále je možné využít samotná semínka z pokrutin, které se oddělí a následně se lisují. Produktem vylisování je hroznový olej, jehož produkce není moc rozvinutá. Vzniklý olej je pak bohatý na prokyanidiny a vitamín E. Obsah je vysoký i z toho důvodu, že je lisování prováděné za studena. Vzniklý olej se využívá v kosmetickém průmyslu, protože antioxidanty, které obsahuje zabraňují ucpávání pórů, ale i v medicíně k hojení otoků a při vaření, jak ke smažení, tak ve studené kuchyni. Další pokrutiny, které vznikají po vylisování oleje se využívají opět jako přísada do krmiv nebo je možné z nich připravit mouku, která neobsahuje lepek [18].

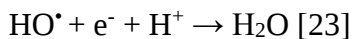
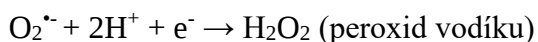
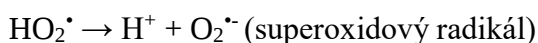
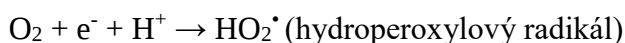
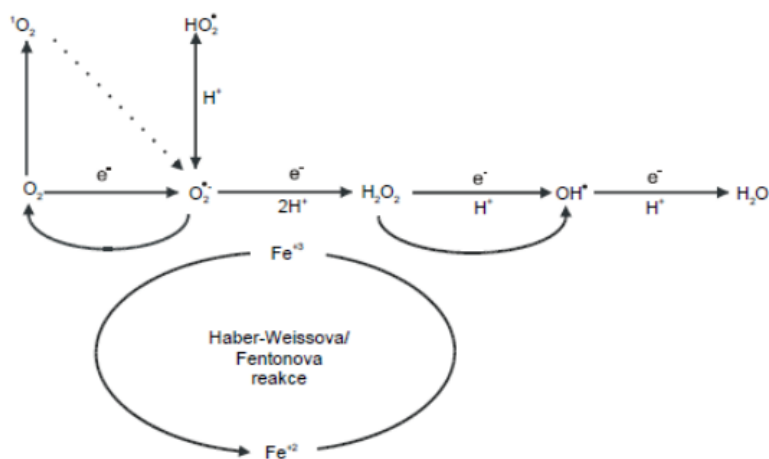
Co se týká využití čistě izolovaných látek z pokrutin, tak jeden ze článků se zabýval izolací inhibitorů polyfenol oxidázy, která je zodpovědná za vznik tmavě zbarvených pigmentů a degradaci fenolových sloučenin. Na zmírnění jejího účinku se ve vinařství využívají siřičitany. Tato studie se zabývala právě tím, který z možných inhibitorů vyskytující se ve slupce z hroznů by siřičitany mohl nahradit. Z výzkumu vyplynulo, že náhradou by mohl být kvercetin glukosid, který by byl určitě lepší možností z důvodu toxicity používaného oxidu siřičitého [19, 20].

Jeden z výzkumů se také věnoval možnému využití aromatických látek obsažených v pokrutinách ke zlepšení aroma vín, které jsou vyrobené z méně aromatických hroznů [21].

1.3 Účinky antioxidantů v organismu

Aerobní organismy ke svému životu využívají kyslík, který vzniká při fotosyntéze v zelených rostlinách. Kyslík je využíván v metabolických reakcích, při kterých vzniká energie. Ta je ukládána do molekul ATP. Mechanismy, při kterých vzniká ATP mají několik nebezpečných míst, při kterých může docházet k nekontrolovanému procesu redukce kyslíku a tvorby radikálů [22]. „Celková redukce molekulárního kyslíku na vodu (Obrázek 6) vyžaduje čtyři elektrony a je vždy doprovázena postupnou jedno až tří elektronovou redukcí, kdy dochází k tvorbě hydroperoxylového radikálu, superoxidového radikálu, peroxidu vodíku a hydroxylového radikálu [23].”

Obrázek 6: Redukce molekulárního kyslíku na vodu [23]



Dále pak volné radikály můžeme přijímat z vnějších zdrojů, jako je cigaretový kouř, znečišťující látky, chemikálie a toxiny z životního prostředí [24].

1.3.1 Volné radikály

Volné radikály jsou atomy, molekuly nebo jejich fragmenty s jedním nebo více nepárovými elektrony schopné samostatné existence na krátkou dobu. Mohou být buď elektroneutrální nebo mají kationtový, či aniontový charakter. Rozeznáváme různé druhy radikálů, přičemž

nejjednodušší radikál je vodík, který obsahuje pouze jeden nepárový elektron. Dále rozeznáváme volné radikály odvozené od kyslíku, dusíku nebo různých organických sloučenin.

Rozdělení volných radikálů

Mezi volné radikály, které pocházejí z kyslíku patří superoxidový aniont (superoxid) ($O_2^{\cdot-}$), hydroxylový radikál ($HO^{\cdot}$) a hydroperoxylový radikál ($HO_2^{\cdot}$). A mezi reaktivní metabolity kyslíku (RMO=reactive metabolites of oxygen) patří peroxid vodíku (H_2O_2), singletový kyslík (1O_2), ozon (O_3) a kyselina chlorná ($HOCl$), přičemž se jedná o látky neradikálové povahy. Radikály odvozené od dusíku rozdělujeme také do dvou skupin, a to na volné radikály a neradikálové reaktivní metabolity (RMN=reactive metabolites of nitrogen). Mezi volné radikály patří oxid dusnatý ($NO^{\cdot}$) a oxid dusičitý ($NO_2^{\cdot}$). Mezi ty neradikálové povahy pak patří peroxynitrit ($ONOO^-$). Mezi organické radikály patří peroxylový radikál ($ROO^{\cdot}$) a alkoxylový radikál ($RO^{\cdot}$).

Pojmy volné radikály (FR=free radicals) a reaktivní metabolity (RM) je třeba rozlišovat. Reaktivní metabolity obsahují molekulu kyslíku vždy a označení, jestli RM pocházejí z kyslíku nebo z dusíku je irelevantní a stačí termín reaktivní metabolit.

Volné radikály se vyznačují svojí vysokou reaktivitou a nazýváme je oxidanty. Důvodem je to, že mohou spárovat své vlastní nepárové elektrony s elektronem, který odeberou jiné sloučenině, čímž se oxidují. Díky své vysoké reaktivitě jsou schopny reagovat s biologicky důležitými molekulami, jako jsou lipidy, proteiny a nukleové kyseliny, čímž dochází k jejich poškození. Naštěstí existují i látky, které jsou schopny napravovat oxidací poškozené molekuly nebo eliminovat již vzniklé FR a RM. Volné radikály mohou být z organismu odstraňovány:

1. antioxidanty, které výrazně zpomalují radikálové reakce
2. jinými molekulami, které je zachytí a tím je zneškodní (quenching)
3. reakcí dvou volných radikálů, čímž zaniknou.

Účinky volných radikálů mohou být, ale jak negativní, tak i pozitivní. Pozitivní účinky vzniklých radikálů spočívají v jejich antimikrobiální ochraně organismu, kdy pomáhají usmrcovat mikroorganismy během fagocytózy [22, 25].

1.3.2 Antioxidanty

Antioxidanty jsou tedy látky, které mají právě schopnost eliminovat vzniklé FR a RM. Velikosti jejich molekul jsou různé, a proto je můžeme dělit na vysokomolekulární (enzym superoxid dismutáza (SOD), kataláza, glutathionperoxidáza atd. Mezi nízkomolekulární antioxidanty

patří vitamín C a E, glutathion nebo koenzym Q. A pak samozřejmě máme i přírodní antioxidanty, které do organismu vstupují přírodními složkami (ovoce).

Přírodní antioxidanty

Rozdělení fenolických látek bylo již představeno v oddílu věnovanému složení révy vinné. Teď něco k jejich účinkům. Flavonoidy se vyskytují v potravinách jako volné monomery (kvercetin, katechin), jako oligomery (prokyanidiny) nebo mohou být navázány na sacharidy jako glykosidy. Jejich redoxní potenciál je nízký, což jim umožňuje snadno poskytovat elektron volným radikálům a tím omezovat jejich výskyt. Fungují vlastně jako preventivní činidla. Spotřeba potravin bohatých na flavonoidy má tedy pozitivní vliv na naše zdraví, snižuje výskyt koronárních onemocnění, onemocnění srdce a infarktu, psychických nemocí a dalších, které jsou často způsobené oxidačním stresem. Díky jejich antimutagenním schopnostem mohou inhibovat karcinogenní vazbu sloučenin k DNA, tedy chránit organismus před vznikem rakoviny. Známý je také takzvaný „Francouzský paradox“, kdy tímto označením se popisuje skutečnost, že v určitém regionu ve Francii byl zjištěn výrazně nízký výskyt akutních srdečních příhod. Navzdory tomu, že život francouzského lidu obsahuje řadu rizikových faktorů, které by předpokládaly právě možnost vzniku tohoto onemocnění. Tato skutečnost se připisuje právě spotřebě červeného vína, které obsahuje vysoký obsah polyfenolů [22, 26].

1.3.2.1 Využití antioxidantů

Antioxidanty se přidávají běžně do potravin, aby zamezily žluknutí například tuků a olejů, čímž se prodlouží jejich trvanlivost. Ovšem množství, které se do potravin přidává je velmi malé (< 1 %) a používání antioxidantů je regulováno vyhláškou. Při výběru antioxidantů se musí brát v úvahu jejich účinek v nízkých koncentracích, jejich stabilita při skladování, chuťová neutrálnost, a hlavně nesmí být toxické pro spotřebitele [27].

Antioxidanty se používají i jako výživové doplňky. V těchto situacích byl prokázán pozitivní vliv na prevenci nebo zlepšení chronických střevních onemocnění. Občas ale může některé pozitivní účinky antioxidantů vyvrátit přítomnost jiné látky. Například vitamíny A, C a E se mohou stát v blízkosti iontů přechodných kovů také oxidanty, pokud jsou v nízkých koncentracích. Pak například resveratrol také v přítomnosti iontů přechodných kovů způsobuje degradaci DNA. Účinek antioxidantů závisí také na čase podání. Antioxidanty nejsou schopné léčit rakovinu trávicího traktu, ale mohou být schopny zabránit jejímu šíření. Zkrátka antioxidanty nabízí nové možnosti, jak řešit oxidační stres a odvrátit nemoci [26].

1.3.3 Oxidační stres

Pokud si ovšem organismus nedokáže s FR a RM poradit, stává se působení volných radikálů nekontrolovaným procesem a jeho důsledkem je oxidační stres. Oxidační stres může být způsoben snížením hladiny antioxidantů, což zapříčiní zvýšenou expozici toxinům. Dále může být důsledkem nedostatečného zásobování některých kovů, které jsou důležité pro funkci ochranných mechanismů. Jde tedy vlastně o nerovnováhu mezi oxidanty a antioxidanty, což vede k poškození molekul, buněk a orgánů, až ke smrti organismu.

Oxidační stres se objevuje také při některých virových onemocněních nebo během sportovních výkonů špičkových sportovců. Dále ovlivňuje také stárnutí [22].

1.4 Úprava pokrutin

Pokrutiny jsou velmi rychle kazícím se produktem, protože stále obsahují velké množství vody (75–80 %), což vytváří pro mikroorganismy ideální podmínky. Obrovské množství, které vzniká při sklizni není možné ihned spotřebovat. Proto je nutné přijít s metodou, která by byla vhodná pro jejich uchování. Vzhledem k jejich dalšímu využití, jako například zlepšujících složek potravin je nutné, aby nedocházelo ke ztrátám fenolických látek. Většina těchto výzkumů se orientuje pouze na červené odrůdy. Přitom jak již bylo řečeno bílé odrůdy si zachovávají rozmanitější zastoupení polyfenolických látek, protože jsou vyřazovány z výrobního procesu vína dříve [8, 21, 28]. Zmražení není vzhledem k velkému objemu proveditelné. Dobrou alternativou je tedy dehydratace [29].

1.4.1 Lyofilizace

Při sušení dochází ke ztrátám těkavých látek (aromatické látky). Naproti tomu lyofilizované pokrutiny si udržují svou barvu, aroma, živiny, fenolické látky a antioxidační kapacitu. Lyofilizace probíhá tak, že dochází nejprve ke zmražení potraviny a následně její dehydrataci sublimací. Jeden z výzkumů porovnával množství vybraných polyfenolů v čerstvých a lyofilizovaných pokrutinách odrůdy Muškát (Tabulka 7). Byly stanoveny deriváty kvercetinu a kaempferolu, přičemž kvercetin glukosid vykazoval dokonce vyšší množství v lyofilizovaných vzorcích. Dále byly stanoveny dvě hydroxyskořicové kyseliny: trans-kaftarová a trans-koutarová, kde nebyly pozorovány změny v koncentracích. Což poukazuje na výhody úprav pomocí lyofilizace [21, 30].

Tabulka 7: Obsah polyfenolů v čerstvých a lyofilizovaných vzorcích pokrutin [21]

složka	odrůda Muškát	
	čerstvé vzorky [mg/kg]	lyofilizované vzorky [mg/kg]
Flavonoly	11,58	12,75
Kvercetin glukosid	9,36	10,39
Kaempferol glukuronid	0,33	0,33
Kaempferol glukosid	3,83	4,32
Celkem	26,16	28,97
Hydroxyskořicové kyseliny		
trans-kaftarová kyselina	4,48	4,82
trans-koutarová kyselina	0,20	0,21
Celkem	13,23	13,95

Zajímavé pak je, že u červených odrůd došlo ke ztrátám flavonolů. Důvod proč se tomu tak stalo, by bylo možné vysvětlit tím, že flavonoly jsou uloženy v buněčných vakuolách a často také v jejich vnějších oblastech. To znamená, že pokud během lyofilizace dojde k poškození těchto složek, může dojít i degradaci flavonolů [21].

Problémem lyofilizace je její finanční náročnost [24]. Kromě těchto faktorů je nevýhodou i dlouhá doba schnutí [30]. Avšak v porovnání různých metod sušení, jako je: lyofilizace, vakuové mikrovlnné sušení, sušení vzduchem, měla lyofilizace nejlepší výsledky ohledně zachování polyfenolických látek [24].

1.4.2 Sušení

Sušení teplým vzduchem představuje levnější alternativu [24]. Ale je důležité správně zvolit teplotu [20].

Jeden ze článků popisoval případ, kdy byla zkoumána právě vhodná teplota k sušení pokrutin z červených hroznů. Byly testovány teploty 60, 100 a 140 °C, výsledky byly srovnávány s hodnotami pro lyofilizované vzorky. Bylo zjištěno, že množství extrahovatelných polyfenolů (fenolické kyseliny, antokyany, flavonoly, flavanoly) a kondenzovaných taninů se při teplotě 60 °C výrazně nezměnilo, ale u vzorků sušených při 100 a 140 °C došlo k poklesu extrahovatelných polyfenolů. Množství kondenzovaných taninů bylo u sušení při 140 °C také výrazně nižší. Ve srovnání s lyofilizovanými vzorky došlo u teplot 100 a 140 °C ke snížení extrahovatelných polyfenolů o 18,6 a 32,6 %. U kondenzovaných taninů nebyl pokles už tak výrazný, ale pouze 11,1 a 16,6 %, což poukazuje na to, že extrahovatelné polyfenoly jsou citlivější na vyšší teploty sušení. Vyšší odolnost kondenzovaných taninů je připisována jejich složitější chemické struktuře.

Snižování množství polyfenolických látek ve vzorcích při vysoké teplotě má tři možné mechanismy:

1. uvolnění vázaných fenolových sloučenin
2. částečná degradace ligninu, což by mohlo vést k uvolnění derivátu fenolové kyseliny
3. tepelná degradace fenolických sloučenin

V tomto případě se pravděpodobně jedná o tepelnou degradaci. Dále pak byly pozorovány i změny antioxidační kapacity, kdy bylo zjištěno, že při 100 a 140 °C došlo k jejímu snížení o 28 a 50 %. U teploty 60 °C se antioxidační kapacita nijak výrazně nelišila. Pokles

antioxidační kapacity u vzorků vysvětluje pravděpodobně to, že antioxidační aktivita je synergickým efektem směsi přírodních fenolických látek. Tudiž s poklesem jejich množství, klesá i antioxidační kapacita [31].

V dalším článku bylo sušení provedeno pro teploty 40, 50 a 60 °C. Sušení při 60 °C vykazovalo vyšší hodnoty než vzorky sušené při 40 a 50 °C. Což je v rozporu s předchozí studií o tom, že antioxidační kapacita se snižuje se zvýšenou teplotou sušení. Důvod může souviset s přítomností polyfenol oxidázy. Jak již bylo řečeno v oddíle o využití pokrutin, polyfenol oxidáza je enzym, který je zodpovědný za vznik tmavě zbarvených pigmentů a degradaci fenolových sloučenin. K jeho samotné degradaci dochází až při teplotě nad 55 °C.

Další možný vliv na obsah fenolických látek může mít aktivita vody [20]. Aktivita vody představuje tzv. dosažitelnou „volnou“ vodu pro mikroorganismy [32]. Kdy u vzorků sušených při 60 °C byly její hodnoty nejnižší. Což by mohlo znamenat, že i aktivita vody souvisí se stabilitou enzymů, které následně degradují fenolické sloučeniny. Například u vzorků manga bylo prokázáno, že enzym polyfenol oxidáza má při nižších vodních aktivitách také nižší aktivitu, což stěžuje oxidační reakce [20].

Jeden z výzkumů také odhalil to, že pro udržení většího množství fenolických látek je výhodné sušit pokrutiny s větší tloušťkou. Důvodem je to, že přenos tepla pak probíhá pomaleji a tím pádem se uchová větší množství fenolických látek [30].

Závěrem je možné konstatovat, že vysoké teploty v kombinaci s vysokou koncentrací kyslíku vedou k degradaci fenolických látek [24].

1.4.3 Vakuové sušení

Jeden ze článků porovnával také vakuové sušení s lyofilizací a se sušením pomocí proudové sušárny. Vakuové sušení se využívá pro sušení ovoce a bylinek. Nejlepší využití je připisováno sušení suspenzí. Tato práce poukázala na to, že vakuové sušení by bylo možné využít i k sušení pokrutin. Oproti lyofilizaci je vakuové sušení výrazně kratší (60–90 minut). Doba lyofilizace byla v této práci stanovena na 14–16 hodin. Dále pak hodnoty antioxidační aktivity a celkového obsahu fenolických látek byly vůči hodnotám pro lyofilizované vzorky srovnatelné. Oproti tomu hodnoty pro vzorky vysušené horkým vzduchem srovnatelné nebyly. Výhodou je tedy kratší doba sušení, nižší provozní náklady a také se jedná o nepřetržitý proces, tím pádem dostaneme více produktu v kratším čase [30].

1.5 Použité metody

1.5.1 Extrakce

Extrakce je separační technika, která se využívá za účelem oddělení analytu (stanovované složky) od původní matrice (vzorek). Extrakce se může na rozdíl od destilace, krystalizace a sublimace provádět za laboratorních teplot, a proto je výhodná pro izolaci tepelně nestálých složek.

Extrakce můžeme dělit podle způsobu provedení na jednostupňové, mnohostupňové a kontinuální extrakce. Obecně pak platí, že opakovaná extrakce s menšími dávkami rozpouštědla je účinnější než jedna extrakce s velkým množstvím rozpouštědla. Dále dělíme extrakce podle zúčastněných fází. A to na extrakce mezi plynem-kapalinou, kapalinou-kapalinou nebo jako v našem případě extrakci mezi kapalinou-pevnou látkou [33, 34].

Jako extrakční činidla se nejvíce využívají kapaliny jako je voda, methanol, aceton, diethylether, hexan nebo dichlormethan [35]. Výběr rozpouštědla pro extrakci vychází z jednoduchého pravidla a to že: sloučenina se rozpouští v takové látce, které je chemicky podobná. Například polární látka se bude rozpouštět v polárním rozpouštědle [36].

1.5.1.1 Extrakce ultrazvukem

Tato technika se využívá právě k extrakci bioaktivních sloučenin z ovoce. Ultrazvuková extrakce má vyšší účinnost než klasické extrakční metody. To je připisováno především jevu, kterému se říká kavitace. Tento jev zahrnuje vznik bublinek uvnitř i vně buněk, které vytváří vysoké tlaky. Díky těmto tlakům dochází k prasknutí buněčných stěn a uvolnění buněčného obsahu s analytem do rozpouštědla [15].

1.5.2 Spektrofotometrie

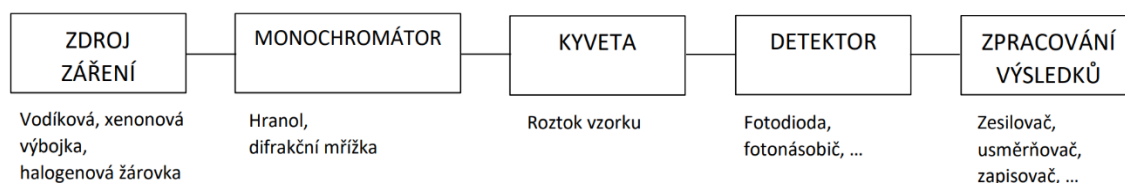
Tato metoda patří k nejstarším metodám analytické chemie. V současné době se řadí mezi instrumentální techniky. Využívá se ke stanovení koncentrace látek, kdy stanovení je založeno na měření absorpce elektromagnetického záření v ultrafialové (UV, 200–380 nm), viditelné (VIS, 380–780 nm) a blízké infračervené oblasti.

K analýze anorganických látek se využívá UV-VIS spektrofotometrie. Měření v UV oblasti se používá především k analýze organických sloučenin. Kromě využití u kvantitativních a kvalitativních stanovení se spektrofotometrická měření využívají například i ke stanovování disociačních konstant kyselin a zásad.

Spektrofotometrie je založená na existenci vztahů mezi polohou a intenzitou absorpčních pásem elektromagnetického záření a molekulární struktúře. Výsledkem absorpce v UV-VIS oblasti jsou elektronická spektra, která vyplývají ze změn energetických stavů elektronů. Jejich změny závisí na pravděpodobnosti elektronických přechodů mezi jednotlivými energetickými stavy molekuly. Tato pravděpodobnost pak závisí na přítomnosti více vazeb v molekule a jejich druhu, počtu a polohách substituentů. Ze vzniklých absorpčních spekter je pak možné na základě rozeznání druhů přechodů, určit strukturu molekuly.

Spektrofotometrická měření se provádějí v roztocích, které jsou umístěné v dráze paprsku monochromatického záření o zvolené vlnové délce. Schéma tohoto procesu je vyobrazeno na Obrázku 7 [37].

Obrázek 7: Schéma spektrofotometru [39]



U spektrofotometrů s jedním paprskem se nejprve provádí měření slepého vzorku, který obsahuje samotné rozpouštědlo a následně se měří rozpouštědlo se vzorkem [38]. Během průchodu záření roztokem se část absorbuje a část jím prochází. „Poměr intenzit záření prošlého roztokem (I) a dopadajícího záření (I_0) se nazývá transmittance (T) (Rovnice 1). Absorbance (A) se následně získá přepočtem z transmittance (Rovnice 2) [39].”

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

$$A = \log \frac{1}{T} \quad (2)$$

Vztah absorbance ke koncentraci pak popisuje Lambert-Beerův zákon, který říká, že absorbance (A) je přímo úměrná délce absorpční vrstvy (l) a koncentraci absorbující molekuly (c) (Rovnice 3).

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (3)$$

ε ...je molární absorpční koeficient [38]

1.5.3 Stanovení antioxidační aktivity

1.5.3.1 Celkový obsah fenolických látek

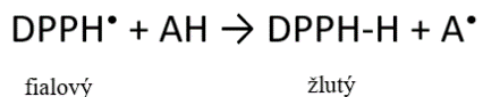
Test na celkový obsah fenolů (TPC) s využitím FC činidla je široce používaná metoda pro hodnocení množství antioxidantů ve vzorcích potravin a rostlinných výtažků. Tento test je založen na redukci FC činidla fenolovými sloučeninami v alkalickém prostředí. FC činidlo se skládá z komplexů kyseliny fosfowolframové a fosfomolybdenové, které jsou redukovány. Jejich redukcí vzniká modře zbarvený chromofor s maximální absorbancí při 765 nm. Místem redukce v komplexech je molybdenové centrum, kdy iont Mo^{6+} (molybdenový) je redukován na Mo^{5+} (molybdeničný) přijetím elektronu z fenolického antioxidantu. Jako srovnávací standard se většinou využívá kyselina gallová a výsledky TPC jsou pak vyjádřeny jako ekvivalenty této kyseliny. Příležitostně se využívá vyjádření jako ekvivalenty katechinu, kyseliny kávové, nebo ekvivalenty kyseliny ferulové.

Výhodou tohoto testu je jeho reprodukovatelnost a jednoduchost. Problémem ale mohou být nefenolická redukční činidla, která mohou toto stanovení rušit. Jedná se o redukující cukry nebo určité aminokyseliny. Možnou náhradou může být například měření pomocí biosenzoru, který detekuje fenolické látky tím, že jsou oxidovány na chinony tyrosinázou, což je spojené se spotřebou kyslíku. Spotřeba kyslíku se pak detekuje amperometricky [40].

1.5.3.2 DPPH radikál

Test s DPPH radikálem se využívá jak pro stanovení antioxidačních vlastností látek syntetických, tak látek přírodních. Je založen na barevné reakci (Obrázek 8), kdy dochází ke změně barvy z fialové na žlutou. Změna je způsobena redukcí alkoholového roztoku DPPH, který je fialový, s antioxidantem, který poskytuje vodík nebo elektron:

Obrázek 8: Schéma reakce



Se změnou barvy je spojena i změna maximální absorpance roztoku DPPH radikálu, která je při 517 nm.

Nevýhodou tohoto stanovení pak může být to, že některé barevné sloučeniny například karotenoidy nebo antokyany mají také silnou absorpaci při 515 nm a mohou ho tedy rušit [41, 42].

1.5.4 Statistické zpracování

Každý extrakt pokrutin byl proveden dvakrát a spektrofotometrické měření každého extraktu také ve dvou opakování (N=4). Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr se standardní odchylkou. Vliv teploty sušení (faktor A) a času sušení (faktor B) byl testován pomocí Kruskal-Wallis dvoufaktorové analýzy rozptylu (ANOVA). Párové porovnání mezi výsledky bylo provedeno pomocí Tukeyova testu. Všechny výpočty byly provedeny s hladinou významnosti $p=0,05$ (Statistica CZ, ver. 12, StatSoft CR, s. r. o., ČR)

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje

Analytické váhy KERN ABT 220-4 M	(Kern & Sohn, Balingen, Německo)
Analyzátor vlhkosti KERN MLB 50-3	(Kern & Sohn, Balingen, Německo)
Nožový mlýn GRINDOMIX GM 200	(Retsch, Haan, Německo)
Odstředivka Universal 320 nechlazená	(Hettich, Tuttlingen, Německo)
Spektrofotometr UV/VIS Beckmen DU 530	(Beckmen Coulter, Inc., Brea, USA)
Sterilizátor HS 62 A	(Chirana, Brno, Česká republika)
Ultrazvukový extraktor Sonopuls HD 3200	(Bandelin, Electronic, Berlin, Germany)
+ běžné laboratorní vybavení (automatické pipety, exsikátor, nerezové síto...)	

2.2 Chemikálie

Destilovaná voda	(Univerzita Pardubice, Česká republika)
DPPH radikál	(Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
FC činidlo	(Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
Kyselina gallová	(Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
Methanol $\geq 99,9\%$	(Honeywell, Morristown, USA)
Trolox	(Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
Uhličitan sodný	(J. T. Baker, Deventer, Holandsko)

2.3 Vzorky

2.3.1 Pokrutiny hroznů révy vinné

K analýze byly využity pokrutiny hroznů révy vinné produkované ve vinařském městě Bzenec na viniční trati Prostřední Hory. Jedná se o odrůdu Müller Thurgau. Producentem je malovinař pan Ing. Pekárek. Pokrutiny byly ihned po zpracování vakuově zabaleny a zmrazeny na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3.2 Zpracování pokrutin k analýze

Vzorek pokrutin určených k analýze byl nejprve rozmražen a následně byla provedena separace semínek a větviček s použitím nerezového síta. Takto připravený vzorek byl rozdělen na devět podílů. První tři podíly byly sušeny při teplotě $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, kdy jeden z podílů byl sušen po dobu 90 minut, druhý po dobu 135 minut a třetí 180 minut. Stejný postup byl proveden i u zbylých podílů, pouze s tím rozdílem, že teploty sušení byly $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Při volbě teplot a časů bylo vycházeno ze článku Planinić a kol (2015)¹. Po sušení byly vzorky ještě rozemlety pomocí nožového mlýnu GRINDOMIX GM 200. Mletí probíhalo po dobu 20 sekund a nastavení otáček bylo 5000 rpm. Výsledný vzhled po sušení ukazuje Obrázek 9 a po mletí Obrázek 10.

Obrázek 10: Pokrutiny po sušení



Obrázek 9: Pokrutiny po mletí



2.4 Postupy jednotlivých analýz

2.4.1 Stanovení množství odpařené vody

Před sušením byly z každého podílu pro danou teplotu a čas odděleny tři další části, které byly zváženy na analytických vahách v kádinkách. Kádinky byly následně společně se vzorky umístěny do sušárny. Po sušení byly vzorky na krátký čas v kádinkách umístěny do exsikátoru a po vychladnutí byly vzorky opět zváženy.

¹ PLANINIĆ, M. Influence of temperature and drying time on extraction yield of phenolic compounds from grape pomace variety "Portogizac". Chemical and Biochemical Engineering Quarterly [online]. 2015, 29(3), 343-350. DOI: 10.15255/CABEQ.2015.2278. ISSN 03529568.

2.4.2 Stanovení obsahu sušiny

Stanovení obsahu sušiny ve vzorcích bylo provedeno pomocí analyzátoru vlhkosti KERN MLB 50-3, kdy bylo na hliníkovou misku naváženo kolem 4–7 g každého vzorku. Sušení probíhalo vždy při 105 °C do konstantní hmotnosti.

2.4.3 Extrakční metody

Extrakce ultrazvukem byla provedena pomocí ultrazvukového extraktoru Sonopuls HD 3200 (Obrázek 10). Vždy bylo naváženo kolem 3,33 g vzorku a extrakce byla provedena 50% methanolem, po dobu 3 minut, při maximálním výkonu ultrazvuku (200 W). Při volbě navážky vzorku, extrakčního činidla, času extrakce a nastavení intenzity ultrazvuku bylo vycházeno ze článku Mazza a kol (2018)². Pro každý vzorek byly provedeny dvě extrakce. Po extrakci byly vzorky odstředěny pomocí centrifugy (10 minut, 5000 rpm) a po jejich odstředění byl oddělen extrakt od pevné fáze pomocí pipety. Vzorky byly následně doplněny na objem 50 ml do odměrných baněk.

Obrázek 11: Extrakce ultrazvukem



2.4.4 Spektrofotometrické analýzy

Pro stanovení obsahu antioxidantů v extraktech pokrutin byly zvoleny dvě spektrofotometrické analýzy. Byl stanoven celkový obsah fenolických látek (TPC) a celková antioxidační kapacita s využitím DPPH radikálu. Před samotnou analýzou byla provedena optimalizace metod.

² MAZZA, Karen E. L., Manuela C. P. A. SANTIAGO, Luzimar S. M. DO NASCIMENTO, Ronoel L. O. GODOY, Erika F. SOUZA, Ana Iraidy S. BRÍGIDA, Renata G. BORGUINI a Renata V. TONON. Syrah grape skin valorisation using ultrasound-assisted extraction: Phenolic compounds recovery, antioxidant capacity and phenolic profile. International Journal of Food Science and Technology [online]. 2018. DOI: 10.1111/ijfs.13883. ISSN 09505423.

Postupy byly převzaty z diplomové práce Kudrnáčové Marie (2018)³. Měření bylo provedeno pomocí spektrofotometru UV/VIS Beckmen DU 530 (Beckman Coulter, Inc., Brea, USA).

2.4.4.1 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Nejprve bylo provedeno měření jednotlivých vzorků, které bylo nutné naředit (50x). Po správném naředění byl pipetován 1 ml vzorku do zkumavky s víčkem. Potom bylo přidáno 5 ml destilované vody a 0,5 ml FC činidla. Takto připravený roztok byl ponechán 5 minut v klidu. Následně byl ke směsi přidán 1 ml 5% roztoku uhličitanu sodného. Vzniklý roztok byl ponechán 15 minut v temnu při laboratorní teplotě a po uplynulém čase byla změřena absorbance při vlnové délce 765 nm. Stejným způsobem byl proměřen slepý pokus, který místo vzorku obsahoval čisté extrakční činidlo-50% methanol.

Kalibrační řada byla připravena ze zásobního roztoku kyseliny gallové o koncentraci 400 µg/ml, který byl připraven navážením 0,02 g do 50 ml odměrné baňky. Z takto připraveného roztoku byly jeho ředěním připraveny kalibrační roztoky v rozmezí koncentrací 5–25 µg/ml. Roztoky byly dále zpracovány stejným způsobem jako vzorky ředěných extraktů [39].

2.4.4.2 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Pro stanovení bylo nejprve potřeba připravit methanolický roztok radikálu DPPH. Ten byl připraven navážením 12,5 mg činidla do 500 ml odměrné baňky, která byla doplněna methanolem. Pro stanovení bylo pipetováno 5 ml roztoku radikálu DPPH a přidáno 500 µl vzorku, který bylo opět nutné naředit (100x). Roztok byl ponechán 15 minut v temnu při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byla změřena absorbance při 517 nm. Stejným způsobem byl připraven a změřen slepý pokus, který místo vzorku obsahoval extrakční činidlo-50% methanol.

Kalibrační řada byla připravena ze zásobního roztoku troloxu. Zásobní roztok troloxu o koncentraci 500 µg/ml byl připraven navážením 0,05 g troloxu do 100 ml odměrné baňky a doplním methanolem po rysku. Z takto připraveného zásobního roztoku byly připraveny kalibrační roztoky v rozmezí koncentrací 0,5–15 µg/ml.

³ KUDRNÁČOVÁ, Marie. Vliv přidavku pokrutin z bobulí révy vinné na antioxidační vlastnosti taveného sýra [online]. Pardubice, 2018. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Libor Červenka.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Stanovení množství odpařené vody

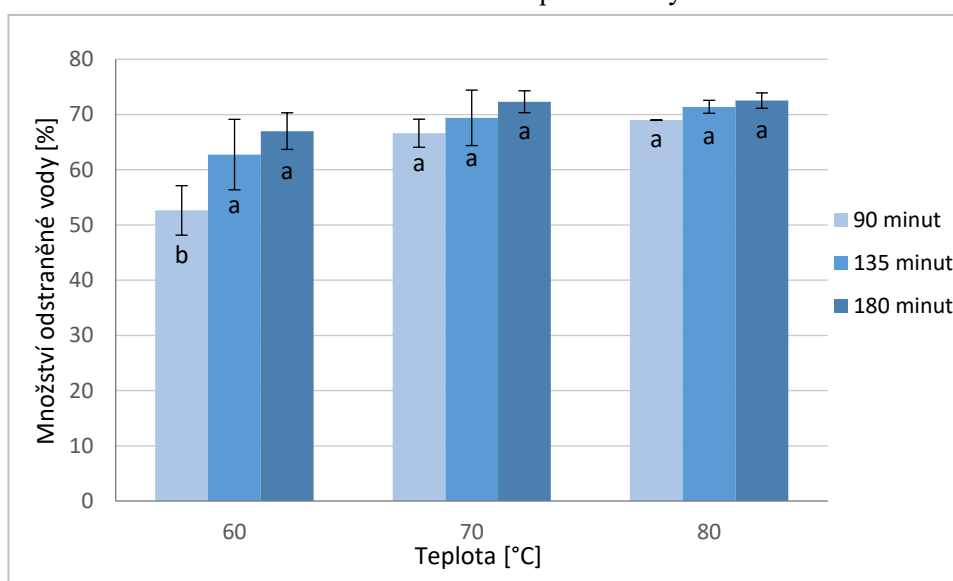
Množství odpařené vody bylo vypočítáno dle Rovnice 4:

$$w = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100 \quad (4)$$

m_1 ...hmotnost kádinky, m_2 ...hmotnost kádinky se vzorkem před sušením, m_3 ...hmotnost kádinky se vzorkem po sušení [39]

Na základě vypočteného procenta odstraněné vody byl sestaven Graf 1.

Graf 1: Množství odpařené vody

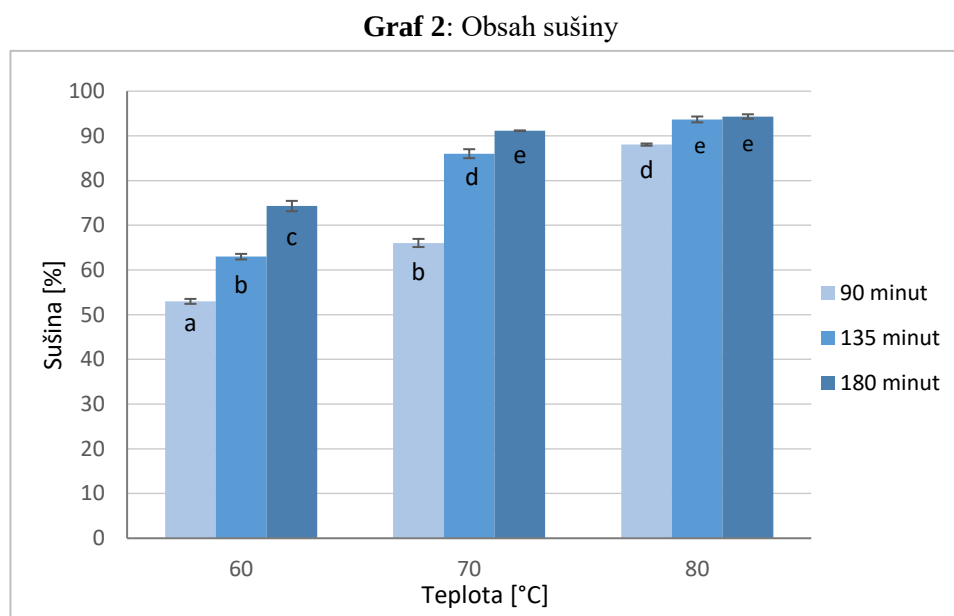


Aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (N=3), různá písmena označují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

Na Grafu 1 je vidět, že s rostoucí teplotou se množství odpařené vody zvyšovalo. Stejný jev je pozorovatelný i u prodlužujícího se času sušení. S využitím statistiky, ale je patrné pouze to, že během sušení při 60 °C došlo mezi 90. a 135. minutou sušení k významnému úbytku vlhkosti.

3.2 Stanovení obsahu sušiny

Sušina byla stanovena pro každý vzorek dvakrát (N=2). Na základě množství sušiny v jednotlivých vzorcích byl sestaven následující Graf 2.



Aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (N=2), různá písmena označují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

3.3 Spektrofotometrické analýzy

Obě analýzy, jak stanovení celkového obsahu fenolických látek, tak stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH byly provedeny pro každý extrakt dvakrát (tzn. čtyři měření pro každou teplotu a čas; N=4).

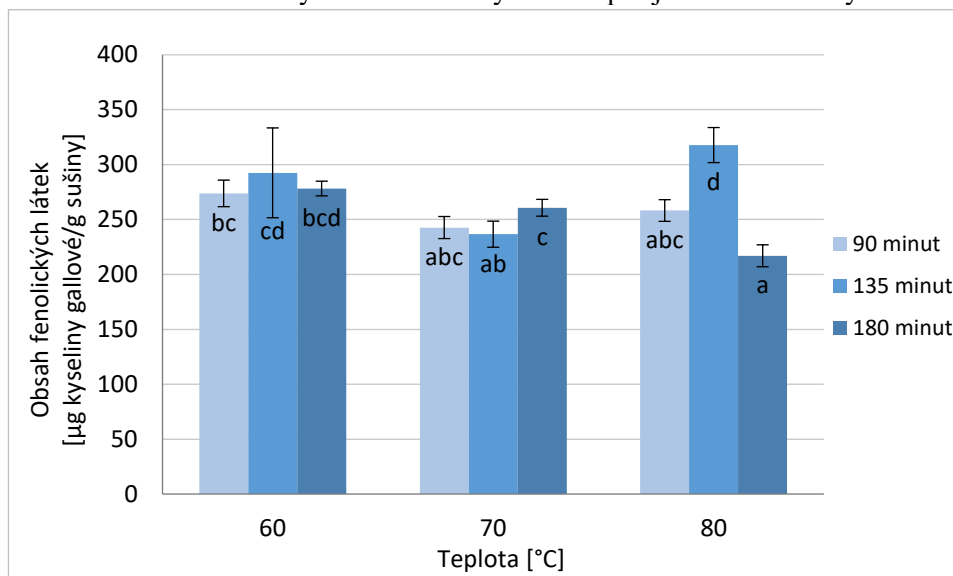
3.3.1 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Před samotným měřením byla provedena optimalizace metody, proměřením měnící se absorbance vzorku během 25 minut (Příloha 1). Na proměření byl použit extrakt vzorku sušeného při 70 °C, po dobu 180 minut. Na základě této optimalizace bylo stanoveno 15 minut, jako optimální doba, po které vždy proběhlo měření vzorku.

Celkový obsah fenolických látek byl vypočten na základě sestrojené kalibrační řady pro kyselinu gallovou (Příloha 2).

Po vypočtení celkového obsahu fenolických látek a přepočtu na obsah sušiny, byl sestaven Graf 3, který popisuje závislost obsahu fenolických látek na jednotlivých variantách sušení.

Graf 3: Celkový obsah fenolických látek pro jednotlivé vzorky



Aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (N=4), různá písmena označují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

Z výsledků analýzy rozptylu vyplývá, že množství fenolických látek ve vzorcích souvisí s teplotou sušení ($p < 0,05$), ale není zřejmý trend ohledně jejich zvyšování či poklesu, s rostoucí či klesající teplotou, protože jak už naznačuje graf, největší množství fenolických látek je ve vzorcích, které byly sušeny při teplotě 60 °C, dále pak 80 a 70 °C. Závislost na čase pak prokázána nebyla ($p > 0,05$).

Zvláštní pak je, že během sušení při 80 °C došlo k velkému zvýšení obsahu fenolických látek (až na 310,6 µg kyseliny gallové/g sušiny), ale po delší době sušení se jejich množství opět snížilo na nejnižší naměřené množství v porovnání se všemi výsledky (206,7 µg kyseliny gallové/g sušiny). Nejvyšší naměřené množství bylo u teploty 60 °C v 135. minutě sušení (333,5 µg kyseliny gallové/g sušiny).

V porovnání s jinými studiemi, které byly zmiňovány v teoretické části si výsledky trochu odporují. Nicméně články se i zmiňují o možném vlivu produktů Maillardových reakcí, které by mohly reagovat s FC činidlem a zasahovat tak do stanovení obsahu fenolických sloučenin [43].

3.3.2 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Před měřením byla opět provedena optimalizace metody proměřením měnící se absorbance vzorku během 25 minut (Příloha 3). Na proměření byl použit extrakt vzorku sušeného při 70 °C, po dobu 180 minut. Na základě této optimalizace bylo stanoveno 15 minut, jako optimální doba, po které vždy proběhlo měření vzorku.

Naměřené hodnoty absorbance pro jednotlivé vzorky byly přepočítány na procento inhibice pomocí následující Rovnice 5:

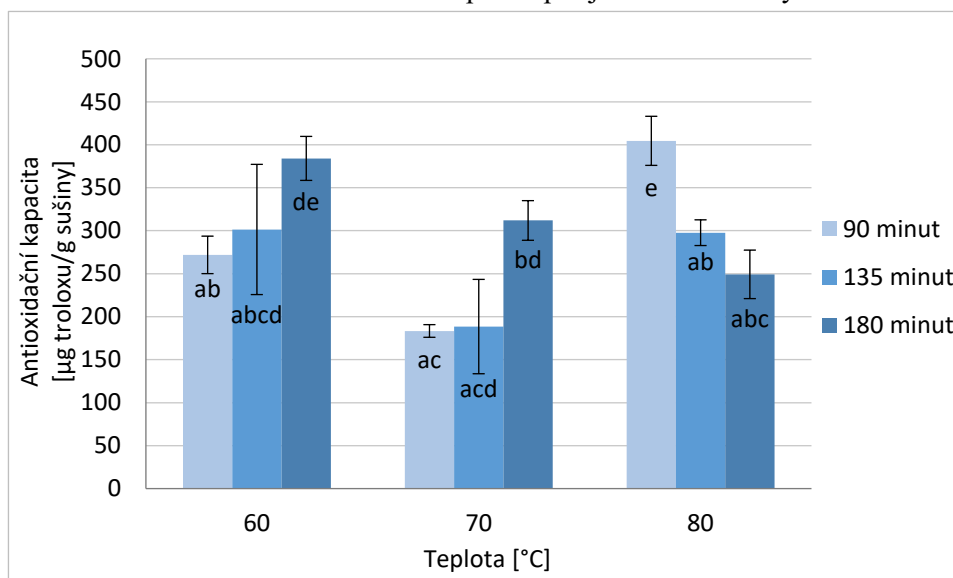
$$Inhibice [\%] = \frac{A_{sl} - A_{vz}}{A_{sl}} \times 100 \quad (5)$$

A_{sl} ...absorbance slepého pokusu, A_{vz} ...absorbance vzorku [39]

Pro výpočet koncentrace troloxu byla použita kalibrační řada závislosti inhibice na koncentraci troloxu (Příloha 4).

Po vypočtení antioxidační aktivity v jednotkách μg troloxu a přepočtu na obsah sušiny, byl sestaven Graf 4, který popisuje závislost antioxidační aktivity na jednotlivých variantách sušení.

Graf 4: Antioxidační kapacita pro jednotlivé vzorky



Aritmetický průměr $\pm$ směrodatná odchylka (N=4), různá písmena označují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

Antioxidační kapacita vzorků pokrutin révy vinné sušených při 60 a 70 °C stoupala s rostoucím časem sušení, ale klesala při teplotě 80 °C, přičemž nejvyšší hodnota byla naměřena

právě v 90. minutě sušení při 80 °C a to 434,56 µg troloxu/g sušiny. Nejnižší hodnota pak v 90. minutě při 70 °C (178,2 µg troloxu/g sušiny).

Z výsledků analýzy rozptylu pak vyplynulo, že teplota ani čas s hodnotami antioxidační kapacity nesouvisí ($p > 0,05$). U párového testu také nebyl prokázán vliv teploty, ani vliv doby sušení.

4 ZÁVĚR

Úkolem této bakalářské práce bylo stanovit, jaký vliv má sušení na antioxidační kapacitu slupek z bobulí révy vinné. Jednalo se o slupky pocházející z bílých hroznů odrůdy Müller Thurgau. Vzorky byly sušeny při teplotách 60, 70 a 80 °C, s různými časovými intervaly 90, 135 a 180 minut.

Vzorky byly po sušení extrahovány za pomoci ultrazvuku 50% methanolem a následně byl změřen celkový obsah fenolických látek a celková antioxidační kapacita s využitím DPPH radikálu.

Z výsledků vlivu sušení na obsah fenolických látek vyplynulo, že jejich množství souvisí s teplotou, ale nebyl zřejmý trend ohledně jejich zvyšování či poklesu, s rostoucí či klesající teplotou. Nejvyšší množství bylo zaznamenáno u vzorků sušených při 60 °C.

U testování antioxidační kapacity nebyl prokázán vliv teploty ani času. Nejvyšší hodnota byla naměřená po 90 minutách sušení při 80 °C a dále pak opět při teplotě 60 °C.

Na základě těchto výsledků a poznatků z jiných studií je teplota 60 °C nejlepší pro zachování obsahu fenolických látek a antioxidační kapacity.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] ČESKÁ REPUBLIKA. Zákon o vinohradnictví a vinařství a o změně některých souvisejících zákonů (zákon o vinohradnictví a vinařství). In: *Sbírka zákonů*. 2004, ročník 2004, částka 105, číslo 321, s. 6491. Dostupné také z: <https://www.psp.cz/sqw/sbirka.sqw?cz=321&r=2004>
- [2] PAVLOUŠEK, Pavel. *Pěstování révy vinné: moderní vinohradnictví*. 1.0. Praha: Grada, 2011, 336 s. ISBN 978-80-247-7069-7.
- [3] KADLEC, Pavel, Karel MELZUCH a Michal VOLDŘICH. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2012. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-145-0.
- [4] PAVLOUŠEK, Pavel. *Pěstujeme stolní odrůdy révy vinné*. 2., aktualizované a rozšířené vydání. Praha: Grada Publishing, 2017. Česká zahrada. ISBN 978-80-271-9904-4.
- [5] PAVLOUŠEK, Pavel. *Výroba vína u malovinařů*. 2., aktualiz. a rozš. vyd. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-3487-3.
- [6] PAVLOUŠEK, Pavel a Pavla BUREŠOVÁ. *Vše, co byste měli vědět o víně: --a nemáte se koho zeptat*. 1. vydání. Praha: Grada, 2015. ISBN 978-80-247-4351-6.
- [7] SOMKUWAR, R.G., M.A. BHANGE, D.P. OULKAR, A.K. SHARMA a T.P. AHAMMED SHABEER. Estimation of polyphenols by using HPLC–DAD in red and white wine grape varieties grown under tropical conditions of India. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2018, 55(12), 4994-5002. DOI: 10.1007/s13197-018-3438-x. ISSN 0022-1155.
- [8] LUO, Lanxin, Yan CUI, Shuting ZHANG, Lingxi LI, Yuanyuan LI, Peiyu ZHOU a Baoshan SUN. Preparative separation of grape skin polyphenols by high-speed counter-current chromatography. *Food Chemistry* [online]. 2016, 212, 712-72. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.06.009. ISSN 03088146.

- [9] MANACH, Claudine, Augustin SCALBERT, Christine MORAND, Christian RÉMÉSY a Liliana JIMÉNEZ. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2004, **79**(5), 727-747. DOI: 10.1093/ajcn/79.5.727. ISSN 0002-9165.
- [10] KAMMERER, Dietmar, Achim CLAUS, Reinhold CARLE a Andreas SCHIEBER. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2004, **52**(14), 4360-4367. DOI: 10.1021/jf049613b. ISSN 0021-8561.
- [11] YILMAZ, Yusuf, Zekiye GÖKSEL, Seçil ERDOĞAN, Aysun ÖZTÜRK, Arif ATAĞ a Cengiz ÖZER. Antioxidant activity and phenolic content of seed, skin and pulp parts of 22 grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars (4 common and 18 registered or candidate for registration). *Journal of Food Processing and Preservation* [online]. 2015, **39**(6), 1682-1691. DOI: 10.1111/jfpp.12399. ISSN 01458892.
- [12] POUDEL, Puspa, Hirotoshi TAMURA, Ikuo KATAOKA a Ryosuke MOCHIOKA. Phenolic compounds and antioxidant activities of skins and seeds of five wild grapes and two hybrids native to Japan. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2008, **21**(8), 622-625. DOI: 10.1016/j.jfca.2008.07.003. ISSN 08891575.
- [13] MONTEALEGRE, Rodriguez R., Romero PECES R., Chacón VOZMEDIANO J.L., Martínez GASCUENA J., Garcia ROMERO E. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2006, **19**(6-7), 687-693. DOI: 10.1016/j.jfca.2005.05.003. ISSN 08891575.
- [14] GARRIDO, Jorge a Fernanda BORGES. Wine and grape polyphenols — A chemical perspective. *Food Research International* [online]. 2013, **54**(2), 1844-1858. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.08.002. ISSN 09639969.
- [15] MAZZA, Karen, Manuela SANTIAGO, Luzimar DO NASCIMENTO, Ronoel GODOY, Erika SOUZA, Ana BRÍGIDA, Renata BORGUINI a Renata TONON. Syrah grape skin valorisation using ultrasound-assisted extraction: Phenolic compounds recovery, antioxidant capacity and phenolic profile. *International Journal of Food Science and Technology* [online]. 2018. DOI: 10.1111/ijfs.13883. ISSN 09505423.

- [16] CALDAS, Thais, Karen MAZZA, Aline TELES et al. Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. *Industrial Crops and Products* [online]. 2018, **111**, 86-91. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.10.012. ISSN 09266690.
- [17] KATALINIĆ, Višnja, Sonja MOŽINA, Danijela SKROZA et al. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry* [online]. 2010, **119**(2), 715-723. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.07.019. ISSN 03088146.
- [18] ŠKRÁBEK, Vladimír. *Možnost využití pokrutin získaných při lisování semen révy vinné pro přípravu alternativních produktů* [online]. Brno, 2018. Bakalářská práce. Mendelova univerzita v Brně, Fakulta zahradnická. Vedoucí práce Patrik Burg.
- [19] OKUDA, Tohru, Emiko KAWAI, Jun HARADA, Eri INOUE, Masashi HISAMOTO a Fumie WATANABE-SAITO. Inhibition of polyphenol oxidase by quercetin derivatives in grape skin. *American Journal of Enology and Viticulture* [online]. 2019, **70**(1), 109-113. DOI: 10.5344/ajev.2018.17115. ISSN 0002-9254.
- [20] TELES, Aline, Davy CHÁVEZ, Flávia GOMES, Lourdes CABRAL a Renata TONON. Effect of temperature on the degradation of bioactive compounds of Pinot Noir grape pomace during drying. *Brazilian Journal of Food Technology* [online]. 2017, **21**. DOI: 10.1590/1981-6723.5917. ISSN 1981-6723.
- [21] DE TORRES, C., R. SCHUMACHER, M.E. ALAÑÓN, M.S. PÉREZ-COELLO a M.C. DÍAZ-MAROTO. Freeze-dried grape skins by-products to enhance the quality of white wines from neutral grape varieties. *Food Research International* [online]. 2015, **69**, 97-105. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.12.016. ISSN 09639969.
- [22] GVOZDJÁKOVÁ, Anna, Zdenka ĎURAČKOVÁ, ed. Oxidants, Antioxidants and Oxidative Stress. GVOZDJÁKOVÁ, Anna. *Mitochondrial medicine: Mitochondrial metabolism, diseases, diagnosis and therapy* [online]. London: Springer, 2008, s. 19-54. DOI: 10.1007/978-1-4020-6714-3_2. ISBN 9781402067143.

- [23] KUBIŠTOVÁ, Vladimíra. *Studium antioxidační aktivity vína* [online]. Olomouc, 2012. Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce David Milde.
- [24] Fruits with High Antioxidant Activity as Functional Foods. SHI, John. *Functional food ingredients and nutraceuticals: processing and technologies (Functional Foods and Nutraceuticals)* [online]. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group, 2007, s. 371-415. ISBN 0-8493-2441-6.
- [25] HLÚBIK, Pavel, Hana STRÍTECKÁ a Jana FAJFROVÁ. *Praktické lékařství: Antioxidanty v klinické praxi* [online]. 2006, 2(6). ISSN 1803-5329.
- [26] YOUNG, Denise, Rong TSAO a Yoshinori MINE. Nutraceuticals and antioxidant function. *Functional Foods, Nutraceuticals, and Degenerative Disease Prevention* [online]. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2011, s. 75-112. DOI: 10.1002/9780470960844.ch4. ISBN 9780470960844.
- [27] Antioxidant. *Van Nostrand's Encyclopedia of Chemistry* [online]. 5th ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2005. DOI: 10.1002/9780471740032. ISBN 9780471740032.
- [28] DE TORRES, C., M.C. DÍAZ-MAROTO, I. HERMOSÍN-GUTIÉRREZ a M.S. PÉREZ-COELLO. Effect of freeze-drying and oven-drying on volatiles and phenolics composition of grape skin. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2010, 660(1-2), 177-182. DOI: 10.1016/j.aca.2009.10.005. ISSN 00032670.
- [29] CARMONA-JIMÉNEZ, Yolanda, M. GARCÍA-MORENO a Carmelo GARCÍA-BARROSO. Effect of drying on the phenolic content and antioxidant activity of red grape pomace. *Plant Foods for Human Nutrition* [online]. 2018, 73(1), 74-81. DOI: 10.1007/s11130-018-0658-1. ISSN 0921-9668.
- [30] VASHISTH, Tripti, Rakesh SINGH a Ronald PEGG. Effects of drying on the phenolics content and antioxidant activity of muscadine pomace. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2011, 44(7), 1649-1657. DOI: 10.1016/j.lwt.2011.02.011. ISSN 00236438.

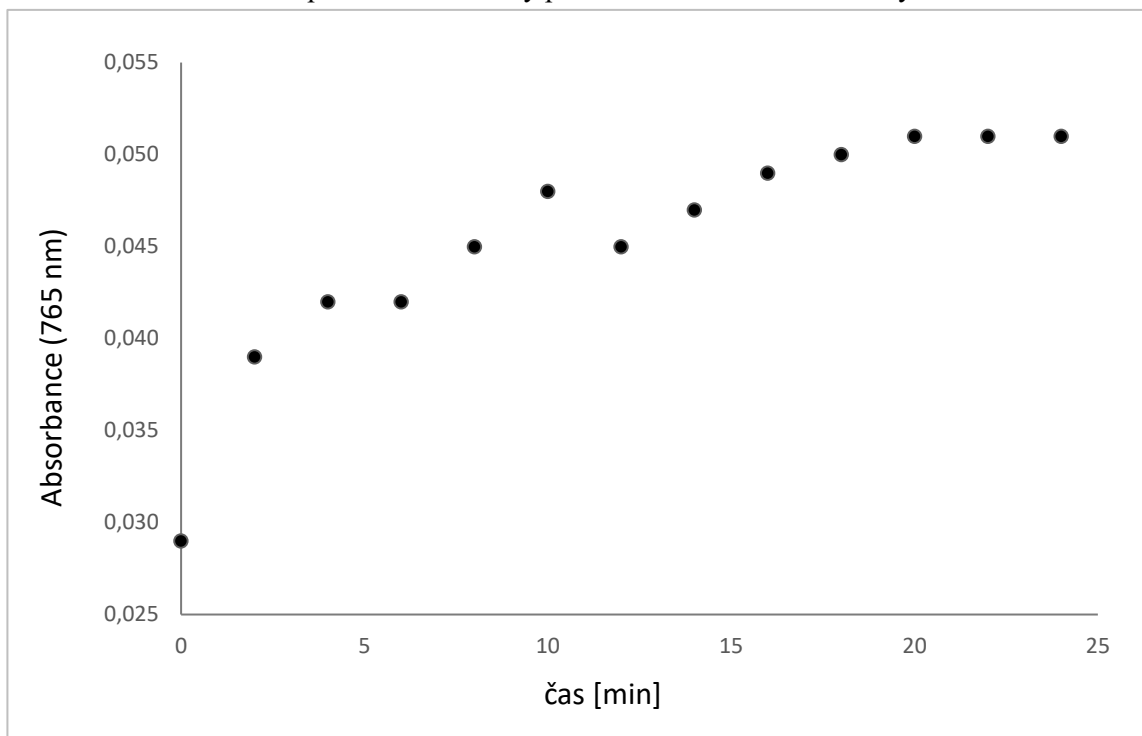
- [31] LARRAURI, José, Pilar RUPÉREZ a Fulgencio SAURA-CALIXTO. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1997, **45**(4), 1390-1393. DOI: 10.1021/jf960282f. ISSN 0021-8561.
- [32] Aktivita vody. *Bezpečnost potravin* [online]. b.r. [cit. 2019-03-18]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76457.aspx>
- [33] MAŇÁSKOVÁ, Věra. *Extrakce fenolových kyselin z rostlinných potravin pevného charakteru* [online]. Zlín, 2013. Diplomová práce. Univerzita Tomáši Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce Pavel Hanuštiak.
- [34] *Extrakce* [online]. In: . b.r. [cit. 2019-03-10]. Dostupné z: <http://www.ped.muni.cz/>
- [35] CONKLIN, Alfred. Extraction. *Introduction to Soil Chemistry* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2005, s. 127-146. DOI: 10.1002/0471728225.ch7. ISBN 9780471460565.
- [36] UDAYA SANKAR, K. Extraction Processes. *Conventional and Advanced Food Processing Technologies* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Inc., 2015, s. 129-158. DOI: 10.1002/9781118406281.ch7. ISBN 9781118406281.
- [37] MARCZENKO, Zygmunt a Maria BALCERZAK. Principles of Spectrophotometry. *Analytical Spectroscopy Library* [online]. Elsevier, 2000, s. 26-38. Analytical Spectroscopy Library. DOI: 10.1016/S0926-4345(00)80066-8. ISBN 9780444505248.
- [38] HARRISON, Roy. Ultraviolet-Visible (UV-Vis) Spectroscopy. *Organic spectroscopic analysis* [online]. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2004, s. 7-9. ISBN 978-0-85404-476-4.
- [39] KUDRNÁČOVÁ, Marie. *Vliv přídavku pokrutin z bobulí révy vinné na antioxidační vlastnosti taveného syra* [online]. Pardubice, 2018. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce: Libor Červenka

- [40] ZHONG, Y. a Fereidoon SHAHIDI. Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. FEREIDOON, Shahidi. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation: Total phenolic content* [online]. Waltham, MA, USA: Elsevier, 2015, s. 304-305. Woodhead Publishing in food science, technology, and nutrition, no. 276. DOI: 10.1016/B978-1-78242-089-7.00012-9. ISBN 9781782420897.
- [41] Mode of Antioxidant Action of Essential Oils. AMORATI, Riccardo a Mario C. FOTI. *Essential Oils in Food Processing - Chemistry, Safety and Applications: DPPH Test* [online]. John Wiley & Sons Ltd., 2018, s. 276-277. ISBN 978-1-5231-1843-4.
- [42] The Natural Antioxidant Ergothioneine. NGUYEN, The, Reigo NAGASAKA a Toshiaki OHSHIMA. *Lipid oxidation-challenges in food systems: Colorimetric DPPH Method* [online]. Urbana, Illinois: AOCS Press, 2013, s. 401-402. ISBN 978-0-9830791-6-3.
- [43] PLANINIĆ, M. Influence of temperature and drying time on extraction yield of phenolic compounds from grape pomace variety "Portogizac". *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* [online]. 2015, **29**(3), 343-350. DOI: 10.15255/CABEQ.2015.2278. ISSN 03529568.

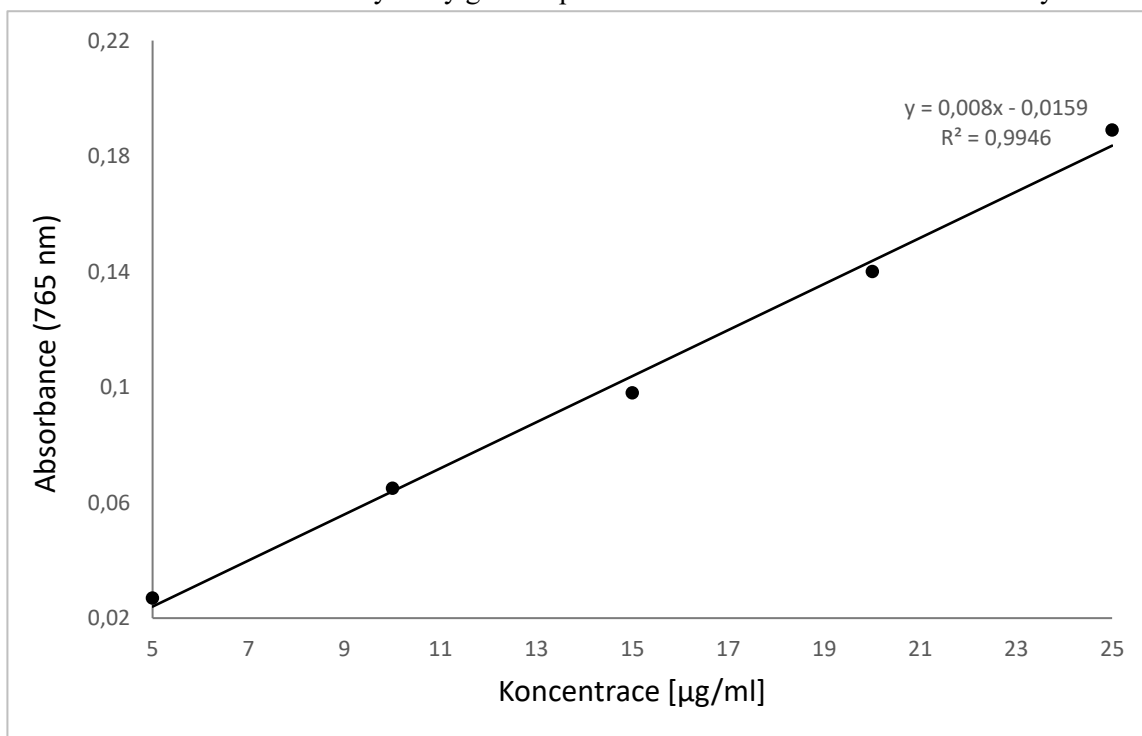
SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Optimalizace metody pro stanovení obsahu fenolických látek	53
Příloha 2: Kalibrační křivka kyseliny gallové pro stanovení celkového obsahu fenolických látek	53
Příloha 3: Optimalizace metody pro stanovení antioxidační aktivity	54
Příloha 4: Kalibrační křivka troloxu pro stanovení antioxidační aktivity DPPH radikálem ..	54

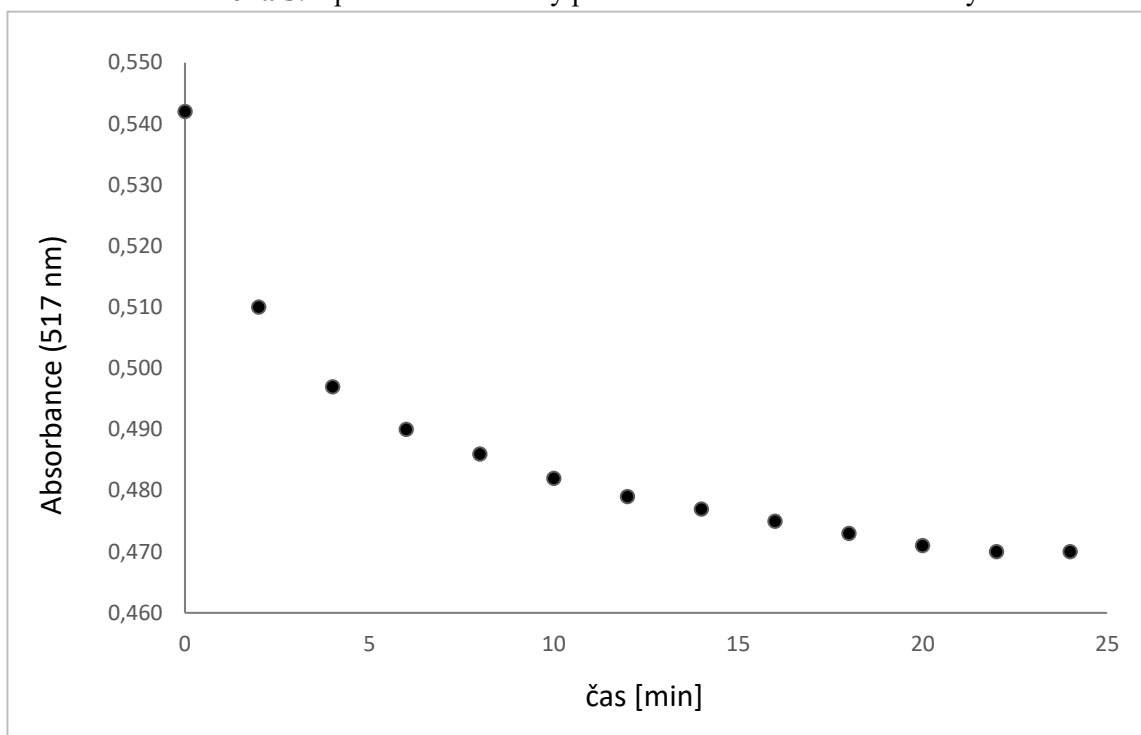
Příloha 1: Optimalizace metody pro stanovení obsahu fenolických látek



Příloha 2: Kalibrační křivka kyseliny gallové pro stanovení celkového obsahu fenolických látek



Příloha 3: Optimalizace metody pro stanovení antioxidační aktivity



Příloha 4: Kalibrační křivka troloxu pro stanovení antioxidační aktivity DPPH radikálem

