



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**VÝVOJ A OPTIMALIZACE METODY PRO EXTRAKCI
Kyseliny ferulové z pšeničných otrub**

DEVELOPEMENT AND OPTIMIZATION OF THE METHOD FOR THE EXTRACTION OF FERULIC ACID FROM
WHEAT BRAN

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Klára Hubáčová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1290/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Klára Hubáčová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název bakalářské práce:

Vývoj a optimalizace metody pro extrakci kyseliny ferulové z pšeničných otrub

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracování literární rešerše na dané téma
2. Vývoj a optimalizace postupu extrakce kyseliny ferulové z pšeničných otrub s cílem maximalizovat extrakční výtěžek.
3. Zhodnocení experimentálních dat

Termín odevzdání bakalářské práce: 21.5.2018

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Klára Hubáčová
student(ka)

Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá využitím pšeničných otrub jako suroviny pro extrakci kyseliny ferulové. Pšeničné otruby jsou vedlejším produktem při velkoobjemovém zpracovávání obilovin, pšenice, na mouku v mlynářenském průmyslu. Tento produkt o velmi nízké ceně je tradičně používán ke krmným účelům hospodářských zvířat. Jeho každoročně vyprodukované velké množství, avšak nižší spotřeba jako krmiva, je iniciativou pro další potenciální využití. Prostudováním složení otrub bylo zjištěno mimo jiné značné zastoupení fenolických kyselin, z nichž největší podíl tvoří kyselina ferulová. Tato kyselina je vázána v buněčné stěně na přítomné polysacharidy. Pomocí alkalické hydrolýzy jako extrakční metody se naruší vazby mezi kyselinou ferulovou a polysacharidy. Následným vysrážením ethanolem a filtrací se získá filtrát obsahující požadovanou kyselinu ferulovou. Kyselina ferulová má blahodárné účinky na lidské zdraví, mezi které patří např. účinky antioxidační, protizánětlivé, antimikrobiální, antikarcinogenní a další. Významnou roli hraje také jako filtr proti UV záření, čehož se využívá v kosmetice.

KLÍČOVÁ SLOVA

Pšeničné otruby, fenolické kyseliny, kyselina ferulová, extrakce, alkalická hydrolýza, HPLC, ANOVA.

ABSTRACT

Bachelor thesis is considering usage of wheat bran for an extraction of ferulic acid. Wheat bran is a large-scale by-product of milling industry which is produced during milling of cereals (wheat) into flour. This low-cost product is usually used as a livestock feed. An initiative is raised for some other potential applications, because too large quantity produced every year can not be consumed just as a feed. There is a significant amount of phenolic acids from which ferulic acid is the most abundant one. It was found out after examination of structure of the wheat bran. This acid is connected with polysaccharides of a cell wall. The alkaline hydrolysis was used to disrupt a linkage between ferulic acid and polysaccharides. Then ethanol was added to precipitate the polysaccharides and the mixture was filtered. The filtrate contains ferulic acid which has great health benefits such as anti-inflammatory, antioxidant, anti-carcinogenic, antimicrobial effect etc. It plays an important role as an agent against UV radiation in the cosmetic products.

KEY WORDS

Wheat bran, phenolic acids, ferulic acid, extraction, alkaline hydrolysis, HPLC, ANOVA.

HUBAČOVÁ, K. *Vývoj a optimalizace metody pro extrakci kyseliny ferulové z pšeničných otrub*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 45 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studentky

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Jaromíru Pořízkovi, Ph.D. za odborné vedení, věnovaný čas, poskytnutí cenných rad a připomínek. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za obrovskou toleranci, podporu a pomoc v průběhu mého celého studia.

OBSAH

ABSTRAKT	3
KLÍČOVÁ SLOVA	3
ABSTRACT	3
KEY WORDS	3
PROHLÁŠENÍ	4
PODĚKOVÁNÍ	4
OBSAH	5
1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Obilniny a jejich části	9
2.1.1 Složky zrna a jejich význam	9
2.1.1.1 Otruby	10
2.1.1.2 Aleuronová vrstva	10
2.1.1.3 Endosperm	10
2.1.1.4 Klíček (embryo)	10
2.2 Chemické složení otrub	10
2.2.1 Polysacharidy a lignin	11
2.2.1.1 Celulóza	11
2.2.1.2 Hemicelulózy	12
2.2.1.3 Lignin	13
2.2.2 Fenolické sloučeniny	14
2.2.2.1 Polyfenolické sloučeniny	14
Flavonoidy	15
2.2.2.2 Fenolické kyseliny	16
Kyselina ferulová	17
Kyselina kávová	17
Kyselina p-kumarová	18
Kyselina sinapová	18
Kyselina vanilová	19
Kyselina gallová	19
Kyselina p-hydroxybenzoová	19
Kyselina protokatechová	20

Kyselina syringová	20
2.2.3 Minerální látky	21
2.3 Valorizace mlynářského odpadu	21
2.4 Metody extrakce fenolických látek	21
2.4.1 Macerace	21
2.4.2 Soxhletova extrakce	21
2.4.3 Ultrazvuková extrakce.....	22
2.4.4 Mikrovlnná extrakce.....	22
2.4.5 Superkritická fluidní extrakce	22
2.4.6 Subkritická vodní extrakce	22
2.4.7 Kyselá hydrolýza	22
2.4.8 Alkalická hydrolýza	23
2.4.9 Enzymatická hydrolýza	23
2.5 Analýza fenolických kyselin pomocí HPLC	23
2.5.1 Zásobní lahve	23
2.5.2 Dávkovací systém mobilní fáze	23
2.5.3 Dávkovací zařízení vzorku	24
2.5.4 Kolona	24
2.5.5 UV/VIS detektor	24
2.6 Analýza rozptylu	25
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1 Materiály a zařízení	26
3.1.1 Pomůcky.....	26
3.1.2 Chemikálie	26
3.1.3 Pšeničné otruby	26
3.1.4 Přístroje	26
3.2 Optimalizace extrakčního procesu	26
3.2.1 Výchozí parametry	26
3.2.2 Optimalizace navážky pšeničných otrub	27
3.2.3 Optimalizace koncentrace hydroxidu sodného	27
3.2.4 Optimalizace teploty hydrolýzy	27
3.2.5 Optimalizace doby hydrolýzy	27
3.2.6 Optimalizace objemu rozpouštědla	28

3.2.7	Optimalizace výběru rozpouštědla	28
3.2.8	Analýza kyseliny ferulové pomocí HPLC.....	28
3.2.9	Statistická metoda ANOVA.....	30
4	DISKUZE A VÝSLEDKY	30
4.1	Výsledky optimalizace navážky pšeničných otrub	30
4.2	Výsledky optimalizace koncentrace hydroxidu sodného	32
4.3	Výsledky optimalizace teploty hydrolýzy	33
4.4	Výsledky optimalizace doby hydrolýzy	34
4.5	Výsledky optimalizace objemu rozpouštědla.....	35
4.6	Výsledky optimalizace výběru rozpouštědla.....	36
4.7	Optimalizované parametry	37
5	ZÁVĚR.....	38
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	39
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	45

1 ÚVOD

V mlynářském průmyslu vzniká v dnešní době velké množství pšeničných otrub jako vedlejšího produktu při mletí pšenice na mouku. Otruby při mletí vznikají po oddělení endospermu ze zrna během posledních šrotů. Velké mlýny produkují významná množství tohoto materiálu (až desítky tun denně). V současnosti se otruby dále využívají jako krmivo pro hospodářská zvířata. Jejich využitím i jinou cestou lze tato velká množství značně zredukovat. Pšeničné otruby jsou tvořeny několika vrstvami polysacharidů, na které je navázána celá řada různých látek. Jednou z těchto látek je právě i kyselina ferulová, která patří do skupiny fenolických kyselin. Tyto kyseliny jsou v buněčné stěně navázány na polysacharidy mimo jiné přes esterové vazby. Kyselina ferulová se stává zajímavou díky svým antioxidačním, protizánětlivým, antikarcinogenním vlastnostem, dále pak díky své funkci působit jako antitrombotikum a jako filtr proti UV záření, což je využitelné v kosmetických přípravcích. Tyto účinky jsou velmi důležité pro lidské zdraví a jeho ochranu. Tento fakt dává podnět pro alternativní využití otrub jinak než jen jako krmivo nebo palivo. Vedle kyseliny ferulové, která je v otrubách zastoupena v koncentraci 20-1500 mg/100 g, jsou zde přítomné i další fenolické kyseliny, mezi něž patří např. kyselina kávová, vanilová, syringová, p-kumarová, gallová aj. Tyto kyseliny jsou však přítomny v mnohem nižších koncentracích, tudíž nejsou tak významným předmětem valorizace tohoto odpadního produktu. Díky velkému potenciálu kyseliny ferulové z hlediska ochrany lidského zdraví lze uvažovat o jejím průmyslovém využití.

Existuje celá řada postupů pro extrakci a purifikaci kyseliny ferulové z otrub. Převážně se využívá alkalická hydrolýza, enzymatická hydrolýza, macerace, Soxhletova extrakce, mikrovlnná extrakce, ultrazvuková extrakce a další. Cílem této bakalářské práce byla optimalizace postupu extrakce kyseliny ferulové z otrub na bázi alkalické hydrolýzy. Optimalizace byla zaměřena na maximalizaci extrakčních výtěžků kyseliny ferulové se snahou minimalizovat technologické vstupy (chemikálie, energie). Studovanými parametry byla navážka pšeničných otrub, koncentrace hydroxidu, teplota a doba hydrolýzy, výběr a objem rozpouštědla. Účinnost extrakce byla stanovena pomocí analýzy extraktů na HPLC.

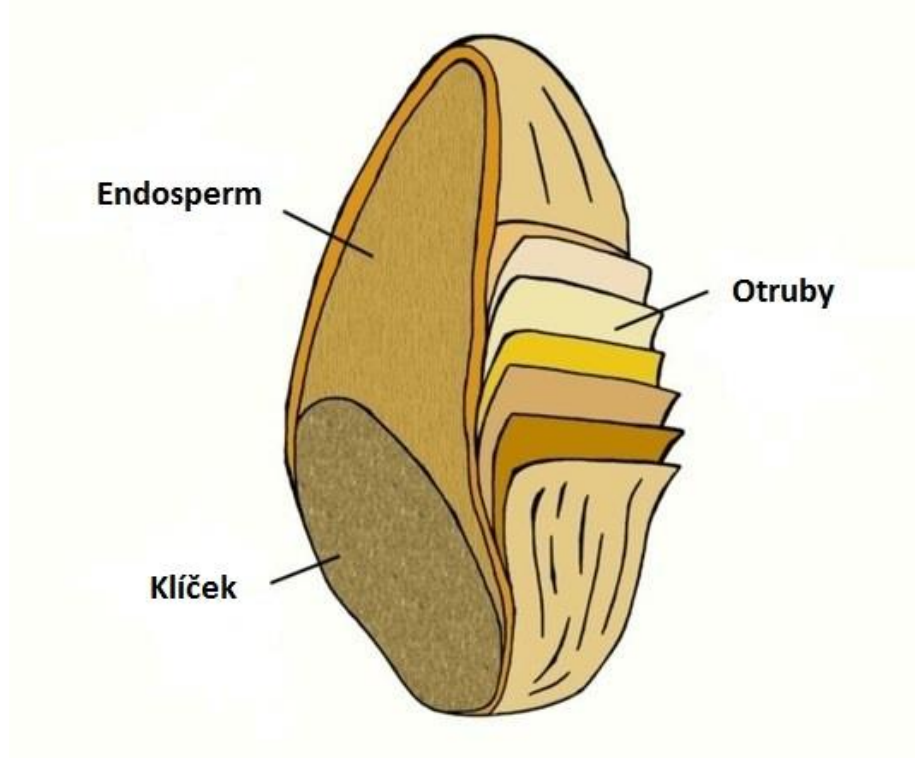
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Obilniny a jejich části

Obilniny jsou v potravinářství považovány za nejvýznamnější plodiny. Tento titul získaly díky svému bohatému složení, vysoké přizpůsobivosti klimatickým podmínkám, malé pracnosti pěstování, vysokým výnosům konzumních částí a dlouhodobému skladování. Jako obilninu označujeme kompletní pěstovanou rostlinu. Cereálií nebo také obilovinou nazýváme vymláčené obilné zrna. Obiloviny patří mezi základní složky lidské stravy, ve vyspělých zemích tvoří 30-40 % celkové spotřeby energie v potravě, v rozvojových zemích až 90 %. Obilniny jsou bohaté na bílkoviny, 20-60 % z celkového příjmu bílkovin zkonsumovaných člověkem pochází právě z nich. I když je obsah bílkovin vysoký, nelze spoléhat pouze na obiloviny. V porovnání s živočišnými bílkovinami jsou nutriční hodnoty obilovin nedostačující. Obsah aminokyselin se totiž liší, nejzávažnějším nedostatkem je nižší množství lyzinu. Obiloviny nám poskytují také minerální látky a cenné vitaminy, např. vitamin B-1 (thiamin) a B-6 (pyridoxin). Jak z pohledu struktury, tak i z pohledu chemického složení jsou si různá obilná zrna velmi podobná. Přesto jsou pro nás drobné rozdíly v jejich vlastnostech velmi zásadní zejména při zpracovávání a také ve výživě [1,2].

2.1.1 Složky zrna a jejich význam

Semena obilovin se nazývají obilky, po vyzrání je jejich přirozenou funkcí uchování životaschopnosti zárodku nové rostliny. Tato funkce je umožněna díky složkám, jež jsou obsaženy v anatomických částech obilky s výrazně rozlišným chemickým složením. Povrch obilky je tvořen otrubami skládajícími se z několika vrstev. Největší částí zrna je vnitřní bílek (endosperm). U pšenice je kvantitativní zastoupení asi takové: 80-83 % endosperm, otruby 14-16 % a klíček 1,6-3,6 % [1,2].



Obrázek 1: Schéma pšeničného zrna [3].

2.1.1.1 Otruby

Otruby neboli obalové vrstvy mají za úkol chránit obilku před vnějšími vlivy. Jsou tvořeny několikavrstevným oplodím (perikarp), pod ním se nachází jednovrstevné osemení (testa) a jedna tenká vrstva vnějšího bílku (perisperm). Co se jejich chemického složení týká, hlavní složku vnější vrstvy, nazývanou též oplodí, tvoří nerozpustné polysacharidy s velkou mechanickou pevností (např. celulóza). Podpovrchové obalové vrstvy, zvané osemení, se skládají z polysacharidů, které velmi pevně vážou vodu a bobtnají v ní nebo se v ní částečně rozpouští. Vnější obalové vrstvy obsahují vyšší množství vlákniny, čehož se využívá pro úpravu výživových hodnot výrobků, avšak má to negativní vliv na kvalitu, zpracovatelnost a často i vzhled těsta či výrobku [1,2].

2.1.1.2 Aleuronová vrstva

Aleuronová vrstva se ve struktuře obilky nachází mezi otrubami a endospermem. Tvoří ji velké aleuronové buňky krychlovitého nebo kvádrovitého tvaru v jedné vrstvě (pšenice) nebo ve více vrstvách (ječmen). Nalezneme zde drobné krystaloidy bílkovin, jež řadíme do skupiny enzymů. Tyto enzymy štěpí zásobní polysacharidy a tím zajišťují výživu zárodku. Při výrobě bílé mouky bývá aleuronová vrstva zpravidla oddělována společně s otrubami, do tmavé mouky se však přidává [2].

2.1.1.3 Endosperm

Endospermem nazýváme vnitřní obsah zrna. Tvoří největší podíl zrna a z technologického hlediska je jeho nejvýznamnější složkou, např. téměř čistý rozdrcený pšeničný endosperm je vlastně pšeničná mouka. Endosperm se skládá z několika látek, mezi hlavní složky patří polysacharidy, zejména škrob tvořící 60-75 % endospermu, a bílkoviny (cca 10 %). Dále zde najdeme lipidy, minerální látky a ve stopových množstvích také vitaminy, barviva a velký počet látek, které mají různé růstové regulační a genetické funkce [1].

2.1.1.4 Klíček (embryo)

Klíček je vlastní zárodek nově vzniklé rostliny, který nese její genetickou informaci. Obsahuje některé významné složky lidské výživy, ale vzhledem k jeho špatné stabilitě na vzduchu se při mlynářském zpracování odděluje. Tato nestabilita je zapříčiněna vysokým množstvím tuků [1].

2.2 Chemické složení otrub

Obiloviny se nejčastěji využívají v mlynářském průmyslu. Výše zmíněné čtyři hlavní složky zrna se nejprve oddělují a poté se s každou z nich pracuje jinak. Na klasickou bílou mouku se používá pouze endosperm. Na celozrnné mouky však endosperm nestačí, tudíž zde nalezneme výrazný podíl otrub, případně klíčku. Jejich nutriční hodnota je mnohem vyšší, protože obsahují vlákninu, tuky, bílkoviny, škrob, antioxidanty, minerály, vitaminy, lignany a fenolické sloučeniny pozitivně působící na zdraví člověka. Z tohoto důvodu se v poslední době klade důraz na konzumaci celozrnných potravin. V pekárenském průmyslu se vyskytuje problém, protože zakomponování otrub do těsta snižuje viskoelastické vlastnosti a objem výrobku. Chuť je ořechová, zrnitá až hořká. Látky v otrubách narušují síťovitou strukturu lepku, což negativně ovlivňuje tvorbu textury při fermentaci a pečení. Vláknina konkuruje ostatním polymerům při vázání vody, v důsledku toho se snižuje viskoelasticita výrobku [4].

2.2.1 Polysacharidy a lignin

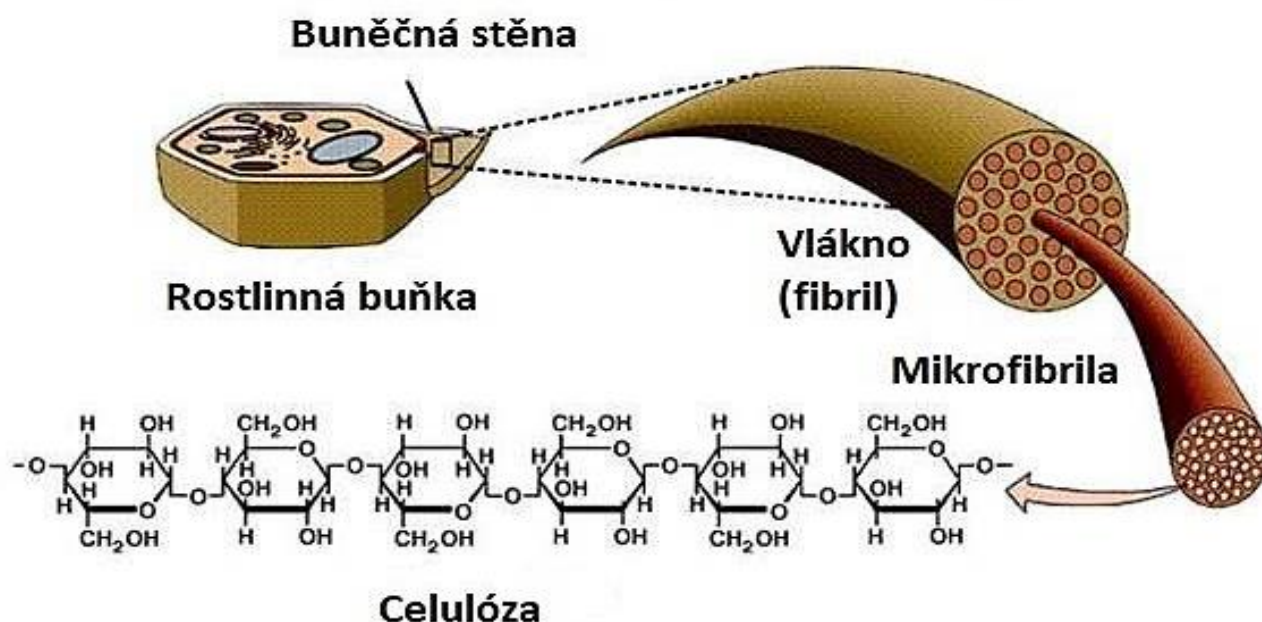
Obilná sláma je složena převážně ze tří skupin organických sloučenin, mezi něž patří celulóza, hemicelulózy a lignin. Tyto látky tvoří v případě pšenice, ovesa a ječmene více než 80 % suché hmoty. Kromě těchto výše vyjmenovaných sloučenin obilná sláma obsahuje i jiné organické látky včetně malého množství proteinů, vosků, cukrů a solí. Složení obilovin je také závislé na stupni zralosti obiloviny, typu půdy a používaných hnojivech [5].

V přírodě se vyskytuje zhruba 100 různých druhů monosacharidů. Pouze 10 z nich kvantitativně dominuje ve skladbě buněčných stěn vyšších rostlin. Z řad pentóz to jsou: arabinóza a xylóza, z hexóz: glukóza, galaktóza a manóza, z 6-deoxyhexóz: rhamnóza a fukóza, z hexuronových kyselin: galakturonová, glukuronová a 4-O-methylglukuronová kyselina. Tyto monosacharidy mohou vytvořit obrovské množství různých polysacharidů, což má za následek dělení polysacharidů do skupin podle jejich fyzikálních, chemických a biologických vlastností [5].

2.2.1.1 Celulóza

Celulóza jako nejrozšířenější přírodní polysacharid na světě je přítomna ve všech suchozemských rostlinách a také v některých vodních druzích, např. v řasách. Vyskytuje se ve všech řádech rostlin, ať už se jedná o vysoké stromy nebo o primitivní organismy, třeba bakterie. Dokonce ji můžeme najít i v říši zvířat [5].

Celulóza je lineární homopolymer obsahující D-anhydroglukopyranosylové jednotky propojené β -1,4 vazbami. Vyskytuje se převážně v krystalické formě organizované do vláken. Tyto celulózové vláknité struktury tvoří kostru buněčných stěn. Počet glukózových jednotek na jednu molekulu se pohybuje od 15 až do 15 000. Tyto molekuly jsou v antiparalelním uspořádání, shlukují se v úzké svazky zvané mikrofibrily. Uvnitř mikrofibril jsou lineární molekuly bočně vázány vodíkovými můstky. Takovéto vodíkové vazby jsou velmi pevné. Lze je přerušit pouze silným aprotickým rozpouštědlem a též silnými kyselinami nebo zásadami. Na molekulární úrovni je jádro krystalické celulózy mikrofibril vysoce resistantní vůči chemické a biologické hydrolýze díky své precizně uspořádané struktuře buněčných dextrinů. Celulózové molekuly se mezi sebou vážou hydrofobními vazbami, což má za následek resistenci ke kyselé hydrolýze. Ta totiž přispívá k tvorbě husté vrstvy vody v blízkosti hydratovaného povrchu celulózy. Aby se zvýšila náchylnost celulózy k hydrolýze, je nutné ji rozemlít, rozmělnit. Tím dojde ke zvětšení jejího povrchu. Následným působením páry nebo alkalického činidla se získá méně krystalická celulóza a přístupnost k ostatním přidruženým látkám, např. k ligninu. Žádnou izolační metodou nelze dostat celulózu v čistém stavu [5].



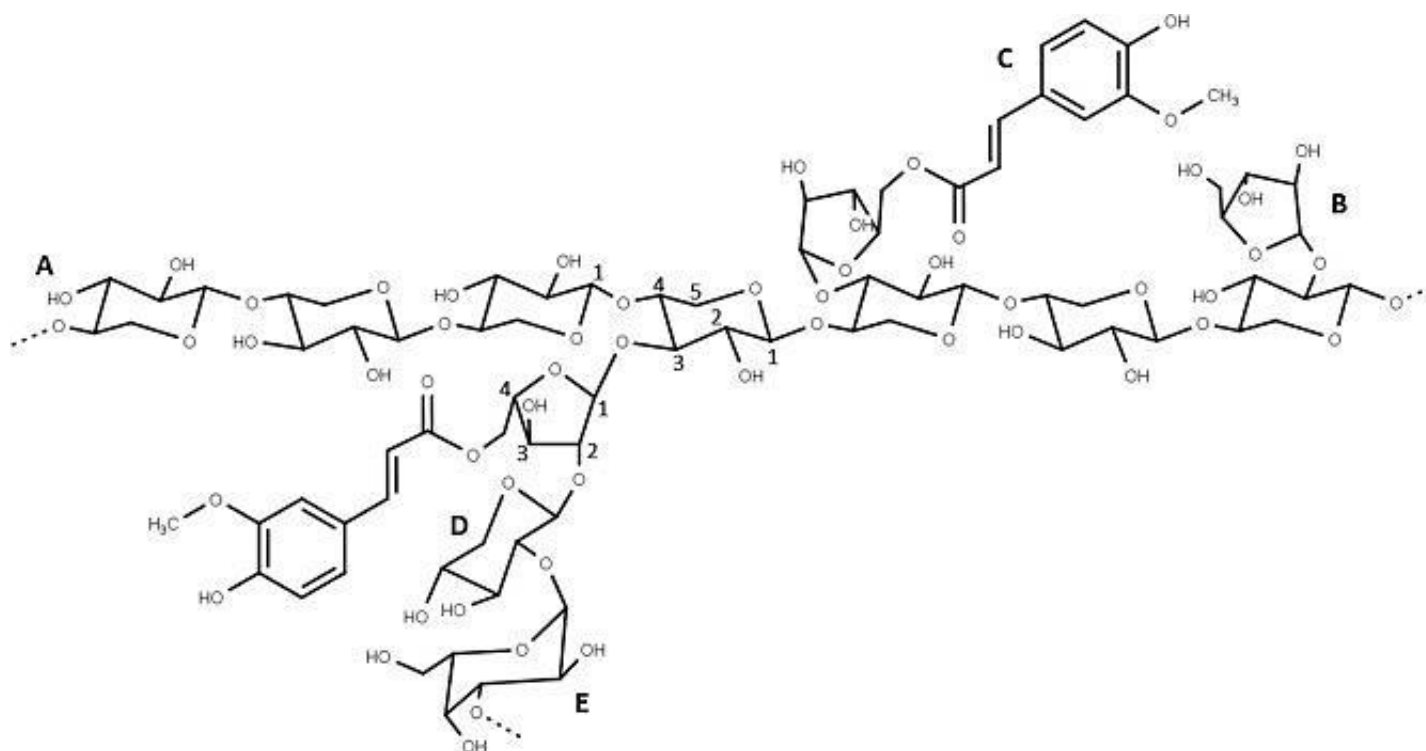
Obrázek 2: Celulóza v buněčné stěně rostlin [6].

2.2.1.2 Hemicelulózy

Hemicelulózy patří hned po celulóze mezi nejhojněji zastoupené látky v obilninách. Tvoří asi čtvrtinu až třetinu většiny rostlinných materiálů. Toto množství je různé podle druhu rostliny. Na rozdíl od celulózy, což je unikátní molekula lišící se pouze stupněm polymerace a krystalizace, hemicelulózy jsou nekystalické heteropolysacharidy, které jsou charakteristické svou rozpustností v alkalických roztocích po odstranění pektinů. Hemicelulózy jsou nejkomplexnějšími látkami buněčné stěny obilnin a trav. Vodíkovými můstky se vážou k celulóze, kovalentními vazbami k ligninu a esterovými vazbami k acetylovým skupinám a hydroxyskořicovým kyselinám [5].

Hemicelulózy se skládají z několika různých jednotek cukrů, které jsou přítomny v rozličném poměru a s odlišnými substituenty. Mezi takové základní cukry patří D-xylóza, L-arabínóza, D-glukóza, D-galaktóza, D-manóza, D-glukuronová kyselina, 4-O-methyl-D-glukuronová kyselina, D-galakturonová kyselina a v menším množství také L-rhamnóza a L-fukóza [5].

Nejčastějším typem hemicelulóz bývají řetězce založené na (1-4)- β -D-xylopyranosylových jednotkách. Jejich řetězec může být lineární, ale většinou se jedná o rozvětvené struktury zejména díky glykosidicky připojeným jednotkám cukrů. Tyto xylopyranosové jednotky tvoří xylanovou kostru s navázanými bočními řetězci, nejčastěji arabinózou a glukuronovou kyselinou. Takové látky jsou pak nazývány glukuronoarabinoxylany a nebo jen arabinoxylany, pokud obsahují výrazně vyšší množství zbytků arabinózy než kyseliny glukuronové [7].



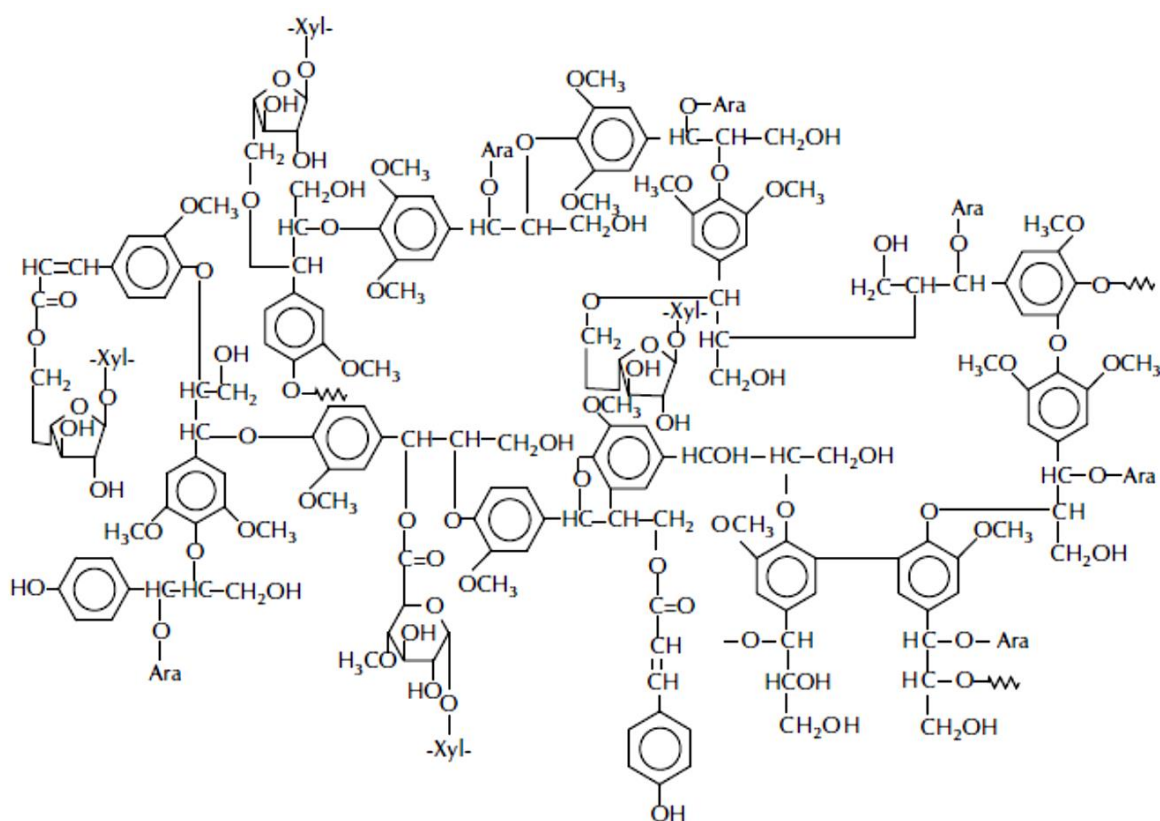
Obrázek 3: Struktura arabinoxylanů: A = xylanová kostra; B = arabinosylová skupina; C = ferulová skupina; D = xylosylová skupina; E = galaktosylová skupina [7].

2.2.1.3 Lignin

Lignin je velmi větvená amorfni biomakromolekula, jejíž molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí od 1 000 až do 20 000 g/mol. Nejčastěji se rozkládá společně s hemicelulózou okolo celulóзовých vláken v primární a sekundární buněčné stěně. Kovalentní vazbou se poutá k celulóзовým strukturám. Primárně je důležitá jeho strukturní funkce v buněčné stěně, kde jí dodává pevnost a tuhost. Chrání rostlinu před útokem fytopatogenů a jiných environmentálních faktorů [8].

Lignin se dělí do tří skupin podle chemické struktury jeho monomerních jednotek na: lignin měkkých dřev, lignin tvrdých dřev a lignin travnatých rostlin. Za tyto monomerní jednotky jsou považovány tři fenyylpropanové monomery zvané též monolignoly, mezi něž patří koniferylalkohol, p-kumarylalkohol a sinapylalkohol. V případě, že jsou tyto jednotky zapojeny do polymerní struktury ligninu, nazývají se guaiacyl (G), p-hydroxyfenyl (H) a syringyl (S). Lignin cereálií je složen ze všech tří složek a je označován jako GSH-lignin. V měkkém dřevě je přítomný G-lignin a ve tvrdém dřevě GS-lignin. Lignin je dále spojen s polysacharidy přes hydroxyskořicové kyseliny, konkrétně přes kyselinu p-kumarovou a ferulovou [5,8,9].

Významnými vlastnostmi a pozitivy ligninu jsou antioxidační, antifungální a antimikrobiální aktivity. Je schopen absorbovat UV-záření a zmírňovat oheň. Ve srovnání s celulózou a hemicelulózami je odolnější vůči chemickým i biologickým zásahům. Jedná se převážně o bezbarvou látku, která po aplikaci kyseliny nebo zásady získává hnědé až tmavě hnědé zbarvení [8].



Obrázek 4: Struktura pšeničného ligninu [5].

2.2.2 Fenolické sloučeniny

Fenolické sloučeniny získané z rostlinného materiálu jsou významnou složkou lidské stravy. Vyznačují se svými antioxidačními vlastnostmi. Skládají se z aromatického kruhu, který nese několik hydroxylových skupin. Může se jednat o jednoduché látky s nízkou molekulovou hmotností i o komplexní sloučeniny, polymery s vysokou molekulovou hmotností. Jejich antioxidační aktivita závisí na struktuře, počtu a pozici hydroxylových skupin a na ostatních substituentech aromatického kruhu. Nejčastěji tyto látky přijímáme z ovoce, zeleniny a nealkoholických nápojů [10].

2.2.2.1 Polyfenolické sloučeniny

Polyfenolické látky se obvykle řadí k různorodé skupině přírodně vyskytujících se sloučenin obsahujících několik fenolických funkčních skupin. Lze je najít ve vyšších rostlinách jako jejich sekundární metabolity. Dávají ovoci, zelenině a dalším rostlinám jejich typické senzorické a nutriční vlastnosti. Jsou významné z hlediska syntézy, medicíny a průmyslu. Polyfenoly jako velká skupina bioaktivních chemikálií mají různé biologické funkce. Mezi takové funkce patří např. schopnost působit jako fytoalexin (obranná látka rostlin proti mikrobiálním parazitům), antifeedant (obranná látka rostlin proti škůdcům – hmyzu), lákadlo pro opylovače, látky přispívající k pigmentu, antioxidanty a ochranná činidla proti UV záření. Díky těmto bioaktivním vlastnostem hrají polyfenolické sloučeniny důležitou roli při růstu a reprodukci rostlin, chrání je před predátory a patogeny [11,12].

Jak se ukázalo, polyfenolické látky mají ještě další důležité vlastnosti. Jsou velmi významné nejen jako konzervanty v potravinářství, ale i jako látky působící proti různým patologickým poruchám, mezi něž patří ateroskleróza, mozková dysfunkce a rakovina. V průmyslu se používají jako přírodní barviva a konzervanty potravin nebo také při výrobě barev, papíru a kosmetiky [12].

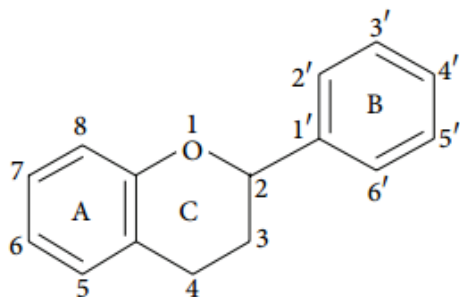
Z chemického hlediska polyfenoly mohou reagovat s jednoelektronovými oxidanty, což zabráňuje tvorbě volné radikálové formace v biologických systémech. Děje jako radikálová oxidace jsou považovány za klíčové kroky při používání polyfenolů v léčivech. Dalšími důležitými aspekty polyfenolických látek jsou interakce s různými polárními funkčními skupinami vykazující selektivitu nebo neselektivitu vazby s biologicky důležitými molekulami, jakož jsou proteiny. Kvůli přítomnosti několika fenolických funkčních skupin interagují s proteiny velmi silně. Na základě toho se často tvoří komplexy protein – polyfenol ve formě sraženiny, čehož se využívá při zpracování kůže [11].

Polyfenoly patří mezi nejčtenější antioxidanty obsažené ve stravě. Jejich celkový příjem dosahuje až 1 g/den, což je mnohem více než příjem ostatních fytochemikálií a známých antioxidantů. Pro srovnání, tato hodnota je desetkrát vyšší než pro vitamin C a stokrát vyšší než pro vitamin E a karotenoidy. Zdroji polyfenolických látek ve stravě jsou ovoce, nápoje rostlinného původu jako ovocné džusy, čaje, káva a červené víno. Zelenina, cereálie, čokoláda a luštěniny též přispívají k celkovému příjmu polyfenolů [13].

Polyfenolické látky se dělí do několika skupin podle počtu obsažených fenolických kruhů a strukturních prvků, jež tyto kruhy vážou mezi sebou. Hlavními skupinami jsou: flavonoidy, taniny (hydrolyzovatelné a kondenzované), stilbeny a lignany [12].

Flavonoidy

Flavonoidy představují největší skupinu rostlinných fenolů, která čítá více než polovinu z 8 000 v přírodě vyskytujících se fenolických sloučenin. Jsou to sloučeniny s nízkou molekulární hmotností, skládající se z patnácti uhlíkových atomů řazených v $C_6 - C_3 - C_6$ konfiguraci. V podstatě, molekula je složena ze dvou aromatických kruhů spojených tří uhlíkatým mostem, obvykle ve formě heterocyklického kruhu. První aromatický kruh bývá derivátem acetátovou nebo malonátovou drahou, zatímco druhý aromatický kruh bývá derivátem fenylalaninu šikimátovou drahou [10].



Obrázek 5: Obecná struktura flavonoidů [14].

Flavonoidy lze dále dělit díky variaci substituce heterocyklického kruhu na několik hlavních skupin, kterými jsou flavonoly, flavony, flavanony, flavanoly (také katechiny), isoflavonoidy, flavanonoly a anthokyanidiny, z nichž jsou flavony a flavonoly nejrozšířenější a strukturně velmi pestré. Substituce na prvním a druhém aromatickém kruhu dávají za vznik různým sloučeninám dané skupiny flavonoidů. Tyto substituce mohou zahrnovat oxygenaci, alkylaci, glykosylaci, acylaci a sulfonaci [10].

Flavonoidy se řadí mezi významné antioxidanty a to díky jejich vysokému redoxnímu potenciálu, který mu umožňuje působit jako redukční činidlo, donor vodíkového atomu a zhasěč singletového kyslíku. Je také schopen tvořit cheláty s atomy kovů [12].

2.2.2.2 Fenolické kyseliny

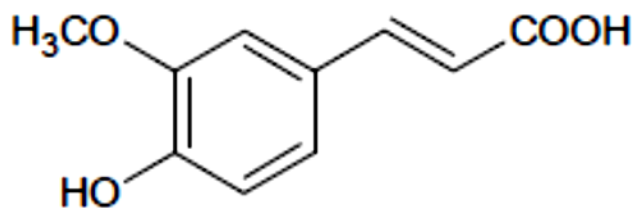
Fenolové kyseliny tvoří asi 1/3 fenolických látek přítomných ve stravě, buď ve formě volné, nebo vázané. Vázané kyseliny mohou být navázány k různým částem rostliny přes esterové, etherové nebo acetalové vazby. Podmínky extrakce a také citlivost při degradaci se liší z důvodu široké různorodosti fenolických kyselin [12].

Těmito kyselinám se v potravinářském průmyslu začala věnovat pozornost díky jejich potenciálním zdravotně prospěšným vlastnostem. Měly by mít antioxidační, antivirové, antibakteriální, protizánětlivé, antikarcinogenní a vazodilatační účinky. V kapalném skupenství za přítomnosti cereálií jsou citlivé na úpravu potravin, zejména pak na tepelné ošetření. Vysoké teploty při pasterizaci nebo sterilizaci mohou způsobit oxidaci vedoucí ke značným ztrátám a degradaci těchto sloučenin na nové chemické látky. Navíc mají zoxidované fenoly potenciál k interakcím s okolními makromolekulami, včetně proteinů, rozličnými fyzikálně-chemickými cestami, které zapříčiňují nižší kvalitu výsledných potravinových výrobků [15].

Fenolické kyseliny patří mezi nejvíce zastoupené fenolické látky pšenice a jsou tak jednou z hlavních komplexních skupin fotochemikálií v obilném zrna. Dělí se na dvě podskupiny podle toho, jestli jsou derivátem kyseliny hydroxybenzoové nebo hydroxyskořicové [10,16].

Deriváty kyseliny hydroxybenzoové se vyznačují svou typickou strukturou ve formě $C_6 - C_1$. Mezi tyto kyseliny se řadí kyselina gallová, p-hydroxybenzoová, protokatechová, vanilová a syringová. Deriváty kyseliny hydroxyskořicové jsou aromatické sloučeniny s tříuhlíkatým bočním řetězcem. Jejich struktura je tedy ve tvaru $C_6 - C_3$. Do této skupiny řadíme mimo jiné kyselinu kávovou, ferulovou, p-kumarovou a sinapovou. Tyto kyseliny jsou nejčastěji vázané esterovou vazbou na strukturní části buněčné stěny, jako jsou celulóza, hemicelulózy, lignin a proteiny. Vázané fenolické sloučeniny mají větší antioxidační kapacitu, protože prochází horním gastrointestinálním traktem spolu s materiály buněčné stěny a jsou absorbovány krevní plazmou v průběhu trávení střevní mikroflórou [10,16].

Kyselina ferulová



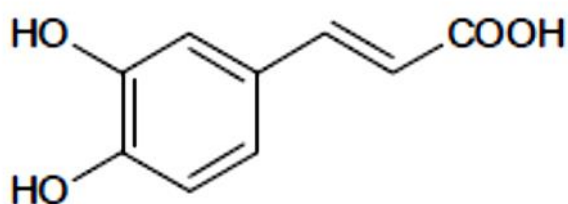
Obrázek 6: Vzorec kyseliny ferulové [17].

Poprvé byla kyselina ferulová, strukturním názvem 4-hydroxy-3-methoxyskořicová kyselina, izolována z rostliny zvané *Ferula foetida* při jejím strukturálním stanovení. Její jméno bylo tedy odvozeno od botanického názvu této rostliny. V roce 1925 byla chemicky syntetizována a spektroskopickými technikami byl dokázán její nenasycený postranní řetězec a také existence cis i trans izomerické formy. Dvojná vazba v postranním řetězci je důvodem cis a trans izomerace, a rezonančně stabilizovaný fenoxyl radikál se počítá díky své význačné antioxidační aktivitě. Katalyzuje tvorbu stabilních fenoxyl radikálů absorpcí ultrafialového světla, což dává sílu kyselině ferulové k terminaci reakcí volných radikálových řetězců. Kyselina ferulová je neobvykle hojná a téměř všudypřítomný fytochemický fenolický derivát kyseliny skořicové, který je v buněčné stěně rostlin vázán kovalentní vazbou na polysacharidy, glykoproteiny, polyaminy, lignin a hydroxy deriváty mastných kyselin jako jejich postranní řetězec [18].

Kyselina ferulová, jako nejčastější fenolická kyselina celozrnných obilovin, byla převážně nalezena ve vázané formě v kukuřici, pšenici, ovsu a rýži [19].

Využití kyseliny ferulové je velmi rozsáhlé. Vyznačuje se několika různými biomedicínskými účinky, jako jsou např. antioxidační, antialergický, hepatoprotektivní, antikarcinogenní, protizánětlivý, antimikrobiální, antivirální, vazodilatační efekt, dále se používá jako antitrombotikum a pomáhá zvyšovat životaschopnost spermií. V potravinářství se aplikuje jako konzervační zesilovací činidlo, v kosmetice mimo jiné jako fotoprotektivní složka opalovacích a tělových mlék [18].

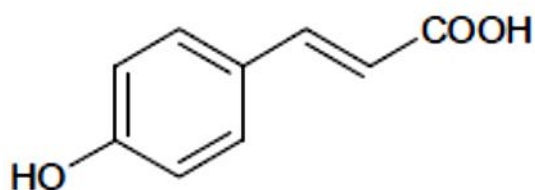
Kyselina kávová



Obrázek 7: Vzorec kyseliny kávové [17].

Kyselina kávová, strukturním názvem 3,4-dihydroxyskořicová kyselina, se v potravinách nejčastěji vyskytuje ve formě kyseliny chlorogenové, kde je přes esterovou vazbu vázána na kyselinu chinovou. Působí jako antioxidant tím, že vychytává volné radikály, chelatuje prooxidační kovové ionty a zabraňuje peroxidaci lipidů. Vyznačuje se biologickou aktivitou, má antimikrobiální, antivirové a protinádorové schopnosti. Kyseliny chlorogenové má navíc neuroprotektivní účinky, dokáže chránit organismus proti kardiovaskulárním onemocněním, střevním ischemicko-reperfúzním poškozením, trombóze, hypertenzi a jaterní fibróze. Tato sloučenina je bohatě zastoupena v kávě, jako hlavní rozpustný polyfenol v bramborách, rajčatech a lilku, je součástí také jablek, hrušek, švestek a borůvek. Extrakt ze zelené kávy je používán pro výrobu různých potravinových doplňků, nápojů a konvenčních kávových produktů [20,21].

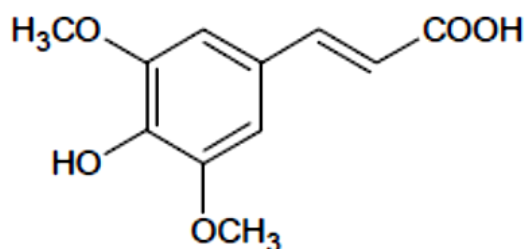
Kyselina p-kumarová



Obrázek 8: Vzorec kyseliny p-kumarové [17].

Para-kumarová kyselina je fenypropánová kyselina odvozená od aromatických aminokyselin. Z biotechnologického hlediska je důležitým prekurzorem různých flavonoidů, např. resveratrolu a naringenin, z farmakokinetického hlediska se její vlastnosti projevují rychlou absorpcí ve střevě a vyšší biologickou dostupností oproti ostatním fenolickým sloučeninám [22].

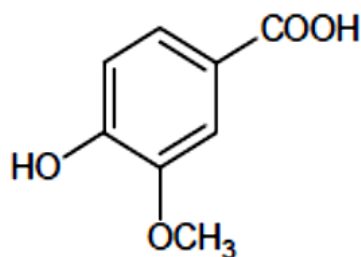
Kyselina sinapová



Obrázek 9: Vzorec kyseliny sinapové [17].

Kyselina sinapová je převládající látkou v řiši rostlin. Byla nalezena v řadě různých druhů ovoce, zeleniny, obilných zrn, olejnatých plodin, koření a léčivých rostlin. V poslední době je kyselině sinapové a jejím derivátům věnována zvýšená pozornost díky jejich významné biologické aktivitě. Ve farmakologii je používána díky svým anxiolytickým, protizánětlivým a antioxidačním vlastnostem [23].

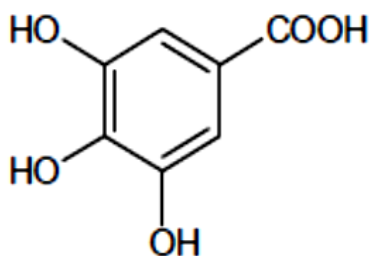
Kyselina vanilová



Obrázek 10: Vzorec kyseliny vanilové [17].

Kyselina vanilová, strukturním názvem 4-hydroxy-3-methoxybenzoová kyselina, se ve vysokých koncentracích nachází v mnoha rostlinách používaných v tradiční medicíně. Bývá spojována s různými farmakologickými efekty, jako např. inhibice karcinogeneze, apoptózy a zánětu, avšak významná je především pro svou příjemnou krémovou vůni. Zjistil se také určitý uklidňující účinek na bolest, tudíž se může považovat i za analgetikum [24,25].

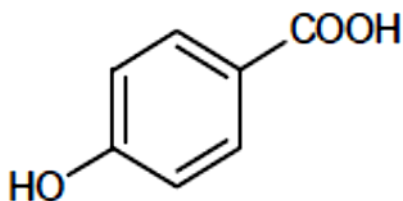
Kyselina gallová



Obrázek 11: Vzorec kyseliny gallové [17].

Kyselina gallová nese strukturní název 3,4,5-trihydroxybenzoová kyselina. Má mnoho cenných biologických funkcí, působí jako antioxidační, protizánětlivé, anti-apoptotické, antimikrobiální, protinádorové činidlo či jako protilátka. Chrání DNA a plíce před poškozením oxidativním stresem a utlumuje diabetický oxidativní stres. Zabraňuje oxidaci lipidů za normálních skladovacích podmínek [26].

Kyselina p-hydroxybenzoová

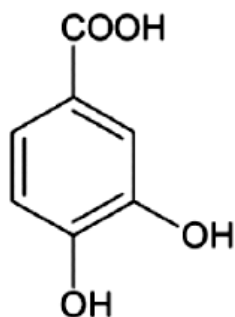


Obrázek 12: Vzorec kyseliny p-hydroxybenzoové [17].

P-hydroxybenzoová kyselina, též monohydroxybenzoová kyselina, je fenolickým derivátem

kyseliny benzoové. Obsahuje dvě proton donorové skupiny, karboxylovou (COOH) a hydroxylovou (OH). Za normálních podmínek se vyskytuje jako bílá krystalická pevná látka mírně rozpustná ve vodě. Krystalizuje jako monohydrát, kde jsou páry jejích molekul spojeny vodíkovými můstky mezi karboxylovými skupinami, v případě tvorby dimerů vodíkovými můstky mezi fenolickými hydroxylovými skupinami a molekulami vody. V přírodě se nachází v Kokosovníku ořechoplodém, latinsky *Cocos nucifera*. Lze ji také nalézt u člověka po konzumaci zeleného čaje nebo vína jako jeden z hlavních metabolitů katechinů [27,28].

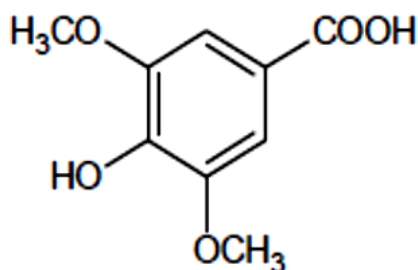
Kyselina protokatechová



Obrázek 13: Vzorec kyseliny protokatechové [29].

Kyselina protokatechová, strukturním názvem 3,4-dihydroxybenzoová kyselina, je antioxidační fenolickou kyselinou, která se může do tkání dostat v takových množstvích, že dokáže pozitivně působit na lidské zdraví. Byly dokázány antioxidační, antihyperglykemické a neuroprotektivní účinky. Tato kyselina získala svou pozornost také díky své schopnosti snadného přecházení přes hematoencefalickou bariéru, čímž inhibuje posun neurodegenerativního onemocnění. Jedná se o vysoce selektivní bariéru oddělující vnitřní prostředí mozku od centrálního nervového systému a omezující difúzi ve vodě rozpustných látek z krve do mozku [30].

Kyselina syringová



Obrázek 14: Vzorec kyseliny syringové [17].

Kyselina syringová, jakožto derivát kyseliny benzoové, redukuje kolagenem stimulované agregáty trombocytů. Indukuje degradaci krevních sraženin, zabraňuje tvorbě těchto sraženin a aktivaci prokoagulačních proteáz [31].

Nese strukturní název 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoová kyselina. Tato látka je dalším

potenciálním antioxidantem. Mimo to se však vyznačuje mnohými farmakologickými účinky, např. účinky antihyperglykemickými, antiangiogenními, antiglykačními, neuroprotektivními a kardioprotektivními. Hraje také významnou roli jako látka zlepšující paměť [32].

2.2.3 Minerální látky

Minerální látky se obvykle uvádí pod názvem popeloviny. Jejich obsah se pohybuje od 1,5 % až do 5,9 %, kde u pšenice je to zhruba 1,8 %. Patří sem biogenní prvky, jako jsou P, K, Mg, Ca, Na, S, Fe a v nižším množství také mikroprvky B, Mn, Sn, Zn, Mo, Co. Mikroprvky přispívají k tvorbě či aktivaci enzymů. Výskyt a koncentrace minerálů závisí na agronomických faktorech a množství kontaminované půdy [2,5].

2.3 Valorizace mlynářského odpadu

V celosvětovém měřítku se roční produkce obilovin pohybuje okolo 2 miliard tun, z toho tvoří pšenice zhruba 650 milionů tun (z nichž je 150 milionů tun otrub), kukuřice 570 mil. tun, rýže 550 mil. tun, ječmen 160 mil. tun, oves 35 mil. tun, žito 26 mil. tun, zbytek čirok a proso. V potravinářství se využije poté 69 % vypěstované pšenice. Jedním z hlavních mlynářských výstupů, mimo klíček a endosperm, jsou otruby. Tyto obalové vrstvy složené z několika odlišných částí tvoří asi 25 % hmotnosti pšenice. Otruby bývají z velké části využívány jako krmivo pro hospodářská zvířata. I když byly již mnohokrát prokázány zdraví prospěšné účinky otrub na lidský organismus, jejich zakomponování do potravin je pouze minoritní. Představují totiž problém z hlediska zpracování a vzhledu výrobku [2,33].

2.4 Metody extrakce fenolických látek

Extrakce je jednou z nejvýznamnějších metod izolace analytů. Jedná se o separační metodu, při které složka obsahující analyt přechází dle rozpustnosti z kapalné nebo tuhé fáze do jiné kapalné fáze. Zmíněné dvě fáze jsou vzájemně nemísitelné. Důležité je zvolit vhodné podmínky pro extrakci požadované látky. Mezi faktory ovlivňující účinnost extrakce patří teplota, doba extrakce, typ rozpouštědla, poměr rozpouštědla a vzorku, pH a počet opakování extrakcí [34,35].

2.4.1 Macerace

Macerace je jednou z extrakčních technik, které lze použít pro extrakci fenolických látek z pšeničných otrub. Používají se různá organická rozpouštědla, nejčastěji alkoholy (aceton, ethanol, methanol). Je třeba zvolit vhodnou teplotu macerace (nejčastěji teplota laboratoře), druh rozpouštědla a jeho poměr vůči analyzovanému vzorku. Doba trvání se pohybuje v řádech několika dnů [36].

2.4.2 Soxhletova extrakce

Soxhletova extrakce se provádí pomocí organických rozpouštědel při teplotě asi 90°C po dobu několika hodin. Výhodou je poměrně vysoký zisk fenolických látek a levná aparatura. I když má tato metoda významné pozitivní znaky, vyskytují se zde velmi důležitá negativa, mezi něž patří vysoká spotřeba nebezpečných organických rozpouštědel, která silně znečišťují prostředí a škodí lidskému zdraví, dlouhá doba extrakce, interakce a degradace požadovaných látek vzhledem k přítomnosti vzduchu, světla, vysokých teplot a enzymatických reakcí [37].

2.4.3 Ultrazvuková extrakce

Ultrazvuková extrakce mající frekvenci vyšší než 20 kHz se využívá pro extrakci organických i anorganických látek z pevných vzorků za pomoci kapalných rozpouštědel. Tato technika umožňuje narušit buněčné stěny materiálu a tak z nich snáze uvolnit požadované látky. Rozpouštědlo se smíchá se vzorkem, tato směs je poté vystavena ultrazvuku za specifikované teploty po určenou dobu. Existují dvě možnosti dávkování vzorku buď vše najednou nebo kontinuálně. Kontinuální způsob přidávání vzorku zabraňuje degradaci termo-labilních sloučenin teplem tvořícím se při působení ultrazvuku [37].

2.4.4 Mikrovlnná extrakce

Mikrovlny se používají při výzkumech na sekundární metabolity rostlin již po desetiletí. Jsou to neionizující záření o frekvencích pohybujících se od 300 MHz až do 300 GHz. Mikrovlny indukují pohyb molekul vzorku nebo rozpouštědla s dipólem a tím dochází k zahřívání. Při zahřívání dochází k odpařování, rostlinné buňky ztrácí svou vlhkost. Vzniklá pára může narušit buněčnou strukturu, což vede k uvolnění některých aktivních komponent. Použitím této metody eliminujeme spotřebu organických rozpouštědel, zkrátíme čas extrakce (většinou pod 30 minut) a zvýšíme výtěžek fenolických látek [37].

2.4.5 Superkritická fluidní extrakce

Superkritická fluidní extrakce je metoda šetrná k životnímu prostředí, která může nahradit konvenční extrakční metody používající organická rozpouštědla, např. maceraci. Snižuje požadavek na toxická organická rozpouštědla, čas extrakce, zvyšuje bezpečnost a selektivitu, usnadňuje separaci extraktu od tekutin v superkritickém stavu. Degradaci extraktu lze zabránit nepřítomností vzduchu a světla. Šance kontaminace nečistotami z rozpouštědla je mnohem nižší ve srovnání s ostatními metodami [37].

2.4.6 Subkritická vodní extrakce

Jedná se o metodu šetrnou k životnímu prostředí. Je zde používána voda v pod-kritickém stavu. Běžně se její teplota pohybuje v rozmezí 100°C až 374°C. Voda však musí být udržována v kapalném stavu, tudíž její tlak musí být 1 až 6 MPa. Jedná se opět o náhradu konvenčních extrakčních metod používající organická rozpouštědla. Voda je za pokojových teplot polární, avšak s narůstající teplotou dochází k přerušování vodíkových můstků, voda postupně ztrácí svou polaritu a tak dokáže rozpustit i nepolární organická rozpouštědla, jež by za normálních podmínek rozpustná ve vodě nebyla. Pro extrakci fenolických kyselin se podmínky upravují na teplotu vody 120°C a tlak 4 MPa. Hlavními výhodami této metody jsou nízké provozní náklady, nulová toxicita rozpouštědla a vysoké výtěžky [37,38].

2.4.7 Kyselá hydrolýza

Kyselá hydrolýza se provádí působením anorganické kyseliny, nejčastěji chlorovodíkové nebo sírové, na rostlinný vzorek. Tento postup není vhodný, protože zde dochází k rozpojování glykosidických vazeb, rozpuštění sacharidů, zachování esterových a etherových vazeb fenolických kyselin a dokonce k poškození hydroxykořicových kyselin [39].

2.4.8 Alkalická hydrolyza

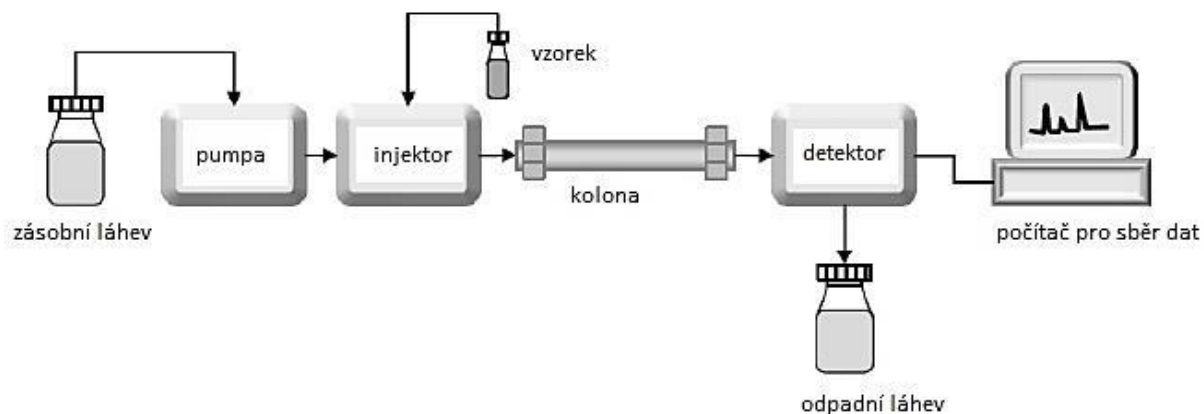
Alkalická hydrolyza je mnohem účinnější ve srovnání s kyselou hydrolyzou. Dochází zde k tzv. saponifikaci, neboli zmýdelnění. Spočívá v tom, že se vzorek zaleje hydroxidem sodným a nechá se hydrolyzovat. Opět zde hrají důležitou roli koncentrace hydroxidu, teplota a doba hydrolyzy. Pro lepší výsledky se v průběhu reakce může vzorek udržovat v inertní atmosféře argonu nebo dusíku, tím lze zabránit oxidaci fenolických kyselin. Skladováním ve tmě se vyhneme cis-trans izomeraci pod UV zářením. Po působení alkálie se vzorek zneutralizuje kyselinou a nežádoucí látky se vysráží pomocí organického rozpouštědla [39].

2.4.9 Enzymatická hydrolyza

Enzymatická hydrolyza je považována za šetrnější metodu s nižšími denaturačními schopnostmi na rozdíl od kyselé nebo alkalické hydrolyzy. Většina kyseliny ferulové z rostlinné buněčné stěny lze získat synergickými interakcemi xylanáz nebo pektináz s esterázami kyseliny ferulové. Tyto enzymy jsou přirozeně produkovány bakteriemi, kvasinkami nebo plísněmi a jsou snadno dostupné v surovém stavu [39].

2.5 Analýza fenolických kyselin pomocí HPLC

Jedná se o moderní vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, HPLC (High-Performance Liquid Chromatography). Skládá se z několika částí, mezi něž patří zásobní láhve s mobilní fází, odplyňovač mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, směšovač mobilních fází, nástřikové zařízení, kolona s termostatem, detektor a nakonec zařízení sbírající data (počítač). Principem jsou interakce komponent vzorku s nepolární stacionární fází a polární mobilní fází. Toto uspořádání fází se nazývá systém s reverzními fázemi [40].



Obrázek 15: Schéma HPLC systému [41]

2.5.1 Zásobní lahve

Zásobní lahve pro mobilní fázi jsou skleněné, případně plastové, půllitrové až dvoulitrové nádoby uzavřené víčkem. Uzavřením nádoby lze zabránit kontaminaci mobilní fáze prachem, vypařování rozpouštědla a umožní se tvorba podtlaku při dávkování [40].

2.5.2 Dávkovací systém mobilní fáze

Dávkování mobilní fáze je umožněno díky vysokotlaké pumpě. Nároky na pumpu jsou vysoké, pumpa by měla dávkovat mobilní fázi na kolonu precizně, přesně, reprodukovatelně, konstantně a bez pulzů. Nejčastějším druhem pumpy je rotační reciproká pístová pumpa.

Rotační energie motoru je přenesena na reciproký pohyb pístu. Hlavička pístu obsahující komoru pro rozpouštědlo má objem 10 až 100 μl . Pár zpětných ventilů kontroluje správný tok mobilní fáze hlavičkou pumpy. Při nasávání je píst vyjmut z hlavy čerpadla a vytváří se zóna s podtlakem. Nízký tlak způsobí otevření vstupního ventilu (ze zásobní láhve mobilní fáze), uzavření výstupního ventilu (vedoucí na kolonu) a naplnění hlavičky pumpy mobilní fází. Při výtlačném procesu se píst přesune do komory rozpouštědla, což zvýší tlak. Vysoký tlak uzavře vstupní ventil, otevře výstupní ventil a mobilní fáze se dopraví na kolonu [40].

2.5.3 Dávkovací zařízení vzorku

V mnoha případech leží limitující faktor HPLC v reprodukovatelnosti dávkovacího zařízení vzorku. Vzorek se dává do systému HPLC bez změny tlaku. Nejběžněji je používán dávkovací systém, neboli injektor, se smyčkou. Smyčka může být uvnitř nebo mimo mobilní fázi díky přepínání ventilu. Smyčka je plněna vzorkem za atmosférického tlaku. Objem vzorku se obvykle pohybuje mezi 5 až 500 μl . Při pozici nástřiku se smyčka se vzorkem napojí na vysokotlaký proud mobilní fáze a vzorek se tak dopraví na kolonu [40].

2.5.4 Kolona

Kolona je částí přístroje, na které dochází k separaci látek vzorku. Většinou je vyrobena z nerezové oceli, aby byla odolná vůči vysokému tlaku. Může být dlouhá 10-30 cm a její vnitřní průměr je 4-10 mm. Velikost částic bývá nejčastěji 3, 5 nebo 10 μm . Kolony jsou velmi specifické, proto je důležité vždy zvolit tu správnou pro dané látky (např. kolony obsahující křemík jsou většinou použitelné jen pro pH 2-7) [40].

2.5.5 UV/VIS detektor

Při UV/VIS detekci prochází mobilní fáze průtokovou celou, kde přichází do kontaktu se svazkem záření produkovaném UV/VIS fotometrem nebo spektrofotometrem. Vzorek absorbující záření poté prochází průtokovou celou, generuje se signál, jehož velikost je přímo úměrná koncentraci daných látek ve vzorku. Složky mobilní fáze tedy musí být voleny precizně tak, aby absorpce záření byla jen minimální nebo nejlépe nulová. Existují tři různé typy UV/VIS absorpčních detektorů: detektor s pevnou vlnovou délkou, detektor s variabilními vlnovými délkami a detektor s fotodiodovým polem [40].

Detektor s pevnou vlnovou délkou využívá zdroj světla, který emituje maximální intenzitu světla při jedné nebo několika málo vlnových délkách, jež jsou oddělovány příslušnými filtry. Pro rtuťovou výbojku jsou to vlnové délky 254, 280 a 365 nm [40].

Detektory s variabilními vlnovými délkami využívají relativně rozsáhlý UV/VIS spektrofotometr, jehož výhoda spočívá v možnosti volby vlnové délky. Jeho komplikovanější složení se ale odráží i v ceně výrobku [40].

Při použití detektoru s diodovým polem se pro každou látku vzorku vygeneruje spektrum v jejím elučním čase. Látky pak lze snadno identifikovat podle předem známého chromatografického spektra. Podle elučního času a tvaru spektra lze rozpoznat, o kterou látku se jedná a podle výšky píku lze zjistit její koncentraci. Jedná se tedy jak o kvalitativní,

tak i o kvantitativní metodu. Hlavní nevýhodou je nízká citlivost detektoru [40].

2.6 Analýza rozptylu

Analýza rozptylu, zkráceně ANOVA (Analysis of Variance), se používá k separaci získaných dat do skupin souvisejících s různými faktory dat a jejich vzájemných interakcí. Metoda je založená na zjišťování vlivů různých faktorů (nezávislých proměnných) na sledovanou veličinu (závislou proměnnou), jejíž hodnoty kolísají s variabilitou těchto faktorů. Celkový rozptyl dat je nutno rozdělit na skupiny, které mají známé zdroje variability, a na skupinu neobjasněnou. Je předpokládána hypotéza H_0 , jejíž pravdivost je posuzována oproti alternativní hypotéze H_1 . Základem této statistické metody je počítání testovacího kritéria F , které porovnává průměrné hodnoty jednotlivých skupin a testuje, jestli se liší díky působení přirozené variability nebo vlivem studovaného faktoru. Vypočtená F hodnota se srovnává s tabelovanou kritickou hodnotou F . V případě, že je vypočtená F hodnota větší než kritická hodnota F , nulová hypotéza je zamítnuta. Zda hypotéza H_0 platí je hodnoceno také pomocí tzv. p -hodnoty, kterou lze definovat jako nejmenší hladinu významnosti testu, při níž se hypotéza H_0 ještě zamítá. Tato hodnota bývá zpravidla přirovnávána ke stanovené hladině významnosti α . Pokud je p -hodnota menší než α , hypotéza H_0 se zamítá. Na základě pravdivosti jedné z těchto hypotéz lze zhodnotit významnost jednotlivých zdrojů variability v datech. Podle počtu nezávislých proměnných ovlivňujících závislou proměnnou se jedná buď o metodu jednorozměrnou (ANOVA) mající jednu nezávislou proměnnou a nebo vícerozměrnou (MANOVA) [42,43,45,46].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiály a zařízení

3.1.1 Pomůcky

Běžné laboratorní sklo (Simax), Büchnerova nálevka, filtrační papír Munktell Ashless 389, plastové zkumavky se závitovým uzávěrem, plastové stříkačky se stupnicí (Omifix), stříkačkové filtry (LABICOM), pH papírky, automatické pipety 5 a 10 ml (Biohit, USA), plastové špičky, skleněné vialky s plastovým uzávěrem.

3.1.2 Chemikálie

Demineralizovaná voda, hydroxid sodný (Lachner, ČR), kyselina chlorovodíková (Lachner, ČR), 95% ethanol, methanol (SIGMA, Čína), kyselina mravenčí (Lachner, ČR), kyselina octová (Lachner, ČR), kyselina ferulová (SIGMA, Čína).

3.1.3 Pšeničné otruby

Pšeničné otruby byly poskytnuty společností Mlýny J. Voženílek, spol. s r. o. z Předměřic nad Labem, Česká Republika. Byly získány z přetříděných obilných zrn. Materiál se skládal zejména z vnějších vrstev zrna a dalších částí zrna s výjimkou endospermu. Maximální vlhkost otrub je 15 % a obsah surové vlákniny je asi 8 %. Otruby byly skladovány při pokojové teplotě.

3.1.4 Přístroje

Analytické váhy GR-120 EC (Helago, ČR), reciproční třepačky s termoregulací, vodní vývěva, mraznička (Elektrolux, ČR), HPLC (Agilent 1260 Infinity s UV/VIS detektorem).

3.2 Optimalizace extrakčního procesu

Extrakční proces byl založen na metodě popsané dle Buranova a Mazzy 2009 [44]. Pro optimalizaci extrakčního procesu při našich laboratorních podmínkách byly testovány tři různé navážky otrub, čtyři koncentrace hydroxidu sodného, tři teploty hydrolýzy, čtyři rozpouštědla, šest různých objemů ethanolu a doba hydrolýzy.

3.2.1 Výchozí parametry

Podmínky alkalické hydrolýzy otrub vychází z metody popsané v článku od Buranova a Mazzy 2009 [44]. Vzorek pšeničných otrub o hmotnosti 5 g byl umístěn do Erlenmeyerových baněk a připojen ke kondenzátoru. Bylo přidáno 150 ml 0,5 M roztoku hydroxidu sodného. Baňka byla zahřívána a kontinuálně míchána po dobu 4 hodin na 50 °C. Po skončení hydrolýzy byl vzorek ochlazen na laboratorní teplotu a byl zneutralizován 6 M kyselinou chlorovodíkovou. Následně byly vysráženy hemicelulózy a glukomannany trojnásobným zředěním použitím 95% ethanolu. Sraženina byla oddělena filtrací. Přebytek ethanolu ve filtrátu byl odstraněn pomocí vakuové odparky. Byl získán hnědý extrakt obsahující kyselinu ferulovou. Pro zjištění obsahu kyseliny ferulové byl 1 ml extraktu zředěn 1 ml bezvodého ethanolu a přefiltrován přes 0,45 µm nylonový filtr. Filtrát byl následně analyzován na HPLC.

3.2.2 Optimalizace navážky pšeničných otrub

Pro studium vlivu navážky otrub na výtěžnost kyseliny ferulové byly zvoleny celkem tři různé hmotnosti. Do Erlenmeyerových baněk bylo naváženo 5, 10 a 15 gramů pšeničných otrub. Odměrným válcem bylo odměřeno 150 ml 0,5 M hydroxidu sodného, který se poté smíchal v Erlenmeyerových baňkách s otrubami. Baňky se umístily na reciproční třepačky s termoregulací. Třepačky byly nastaveny na 190 otáček za minutu při teplotě 50 °C. Po 4 hodinách hydrolýzy byly vzorky odebrány, zneutralizovány 6 M kyselinou chlorovodíkovou a vysráženy ve 450 ml 95% ethanolu po dobu 5 minut. Následně byly vysrážené hydrolyzáty přefiltrovány pomocí vodní vývěvy přes Büchnerovu nálevku. Filtráty byly uschovány při teplotě -20 °C. Těsně před analýzou na HPLC byly extrakty přefiltrovány přes nylonový mikrofiltr a následně analyzovány.

3.2.3 Optimalizace koncentrace hydroxidu sodného

Pro zjištění vlivu koncentrace hydroxidu sodného na výtěžnost kyseliny ferulové z pšeničných otrub byly testovány čtyři různé koncentrace NaOH. Do Erlenmeyerových baněk bylo naváženo vždy 10 g pšeničných otrub. Odměrným válcem bylo odměřeno 150 ml hydroxidu sodného o koncentracích 0,5, 1, 2 a 3 M a přidáno do Erlenmeyerových baněk s otrubami. Baňky byly umístěny na reciproční třepačky s termoregulací. Třepačky byly nastaveny na 190 otáček za minutu, teplotu 50 °C po dobu 4 hodin. Poté byly vzorky odebrány, zneutralizovány 6 M kyselinou chlorovodíkovou a vysráženy přidáním 450 ml 95% ethanolu. Po 5 minutách srážení byly hydrolyzáty přefiltrovány pomocí vodní vývěvy přes Büchnerovu nálevku. Filtráty byly uschovány při teplotě -20 °C. Těsně před analýzou na HPLC byly extrakty přefiltrovány přes nylonový mikrofiltr a následně analyzovány.

3.2.4 Optimalizace teploty hydrolýzy

Při zjišťování vlivu teploty hydrolýzy na výtěžnost kyseliny ferulové z pšeničných otrub byly zvoleny tři různé teploty. Do Erlenmeyerových baněk bylo naváženo 10 g pšeničných otrub. Bylo odměřeno 150 ml 0,5 M hydroxidu sodného pomocí odměrného válce. Tento hydroxid byl smíchán v Erlenmeyerových baňkách s naváženými otrubami. Baňky byly umístěny na reciproční třepačky s termoregulací. Tři různé třepačky byly nastaveny na 190 otáček za minutu a poté postupně na 40, 50 a 60 °C po dobu 4 hodin. Potom byly baňky odebrány, hydrolyzáty byly zneutralizovány 6 M kyselinou chlorovodíkovou a sráženy 450 ml 95% ethanolu po dobu 5 minut. Poté byly hydrolyzáty přefiltrovány přes Büchnerovu nálevku pomocí vodní vývěvy. Filtráty byly uschovány při teplotě -20 °C. Těsně před analýzou na HPLC byly extrakty přefiltrovány přes nylonový mikrofiltr a následně analyzovány.

3.2.5 Optimalizace doby hydrolýzy

Pro optimalizaci doby hydrolýzy byly vzorky postupně odebírány v průběhu 6 hodin. Do Erlenmeyerových baněk bylo naváženo 10 g pšeničných otrub. Odměrným válcem bylo odměřeno a přidáno do Erlenmeyerových baněk 150 ml 0,5 M hydroxidu sodného. Baňky byly umístěny na reciproční třepačky s termoregulací. Třepačky byly nastaveny na 190 otáček za minutu, teplotu 40 °C a čas 6 hodin. Během těchto 6 hodin byly hydrolyzáty každých 30 minut postupně odebírány. Hydrolyzát byl vždy zneutralizován 3 M kyselinou chlorovodíkovou a 5 minut srážen 450 ml 95% ethanolu. Poté byl vzorek přefiltrován

přes Büchnerovu nálevku s použitím vodní vývěvy a uskladněn při -20 °C až do doby analýzy. Po vytažení z mrazáku byl vzorek přefiltrován přes nylonový mikrofiltr a analyzován na HPLC.

3.2.6 Optimalizace objemu srážecího rozpouštědla z hlediska filtrovatelnosti hydrolyzátu

Pro optimalizaci objemu rozpouštědla z hlediska filtrovatelnosti hydrolyzátu, v tomto případě ethanolu, bylo testováno šest různých objemů ethanolu. Do Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 10 g pšeničných otrub. Odměrným válcem bylo odměřeno 150 ml 0,5 M hydroxidu sodného a přidáno k naváženým pšeničným otrubám. Erlenmeyerovy baňky byly umístěny na reciproční třepačky s termoregulací. Třepačky byly nastaveny na 190 otáček za minutu a teplotu 40 °C po dobu 2,5 hodiny. Poté byly hydrolyzáty odebrány, zneutralizovány 3 M HCl a 5 minut sráženy různými objemy ethanolu. Objemy 95% ethanolu byly 125, 250, 375, 500, 625 a 750 ml. Vysrážené hydrolyzáty byly zfiltrány přes Büchnerovu nálevku pomocí vodní vývěvy za současného měření doby filtrace, tedy filtrovatelnosti. Extrakty byly poté uschovány při -20 °C až do doby analýzy. Těsně před analýzou byly extrakty přefiltrovány přes nylonový mikrofiltr a analyzovány na HPLC.

3.2.7 Optimalizace výběru srážecího rozpouštědla z hlediska filtrovatelnosti hydrolyzátu

Pro studium vlivu různých rozpouštědel na rychlost filtrace byla použita čtyři různá rozpouštědla. Do Erlenmeyerových baněk bylo naváženo 10 g pšeničných otrub. Odměrným válcem bylo odměřeno 150 ml 0,5 M NaOH a přidáno do baněk k otrubám. Baňky byly umístěny na reciproční třepačky s termoregulací. Třepačky byly nastaveny na 190 otáček za minutu a teplotu 40 °C po dobu 2,5 hodin. Poté byly hydrolyzáty odebrány z třepaček, zneutralizovány 3 M HCl a 5 minut sráženy čtyřmi různými rozpouštědly o objemu 375 ml, ethanolem, methanolem, isopropanolem a acetone. Poté byly vysrážené hydrolyzáty přefiltrovány pomocí vodní vývěvy přes Büchnerovu nálevku za současného měření času filtrace. Filtráty byly poté uschovány při -20 °C až do doby analýzy. Těsně před analýzou byly extrakty přefiltrovány přes nylonový mikrofiltr a následně analyzovány na HPLC.

3.2.8 Analýza kyseliny ferulové pomocí HPLC

Ke kvalitativnímu a kvantitativnímu stanovení kyseliny ferulové byla použita analytická metoda HPLC. K určení množství kyseliny ferulové v našich vzorcích byla sestavena kalibrační křivka v rozsahu koncentrací 10, 25, 50, 100 a 200 mg/l. Standard čisté kyseliny ferulové byl rozpouštěn v methanolu (HPLC čistota) v poměru pro dané kalibrační koncentrace.

Po přefiltrování přes 0,45 µm nylonový filtr byly extrakty nadávkovány do 1,5 ml vialek. Separace byla realizována pomocí gradientové eluce směsí methanolu a 0,5% kyseliny mravenčí. Kyselina ferulová byla detekována pomocí UV/VIS detektoru při vlnové délce 330 nm. Detailní nastavení přístroje HPLC je popsáno v tabulce 1, vlastnosti kolony v tabulce 2 a průběh gradientové eluce, která sloužila pro separaci látek, v tabulce 3.

Tabulka 1: Nastavení přístroje HPLC pro stanovení kyseliny ferulové

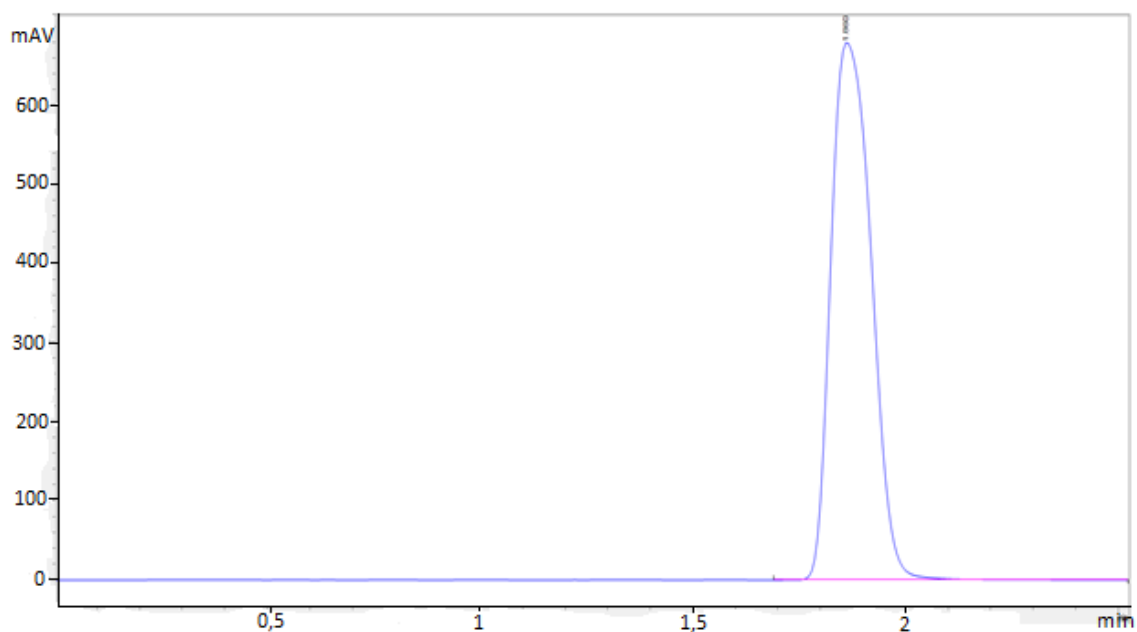
Název a typ přístroje	HPLC Agilent 1260 Infinity
Objem nástřiku	3 μ l
Průtok mobilní fáze	0,7 ml/min
Složení mobilní fáze	methanol 5 %, 0,5% kyselina mravenčí 95 %
Teplota	30 °C
Vlnová délka detekce	330 nm
Detektor	UV/VIS
Doba analýzy	40 min

Tabulka 2: Vlastnosti kolony

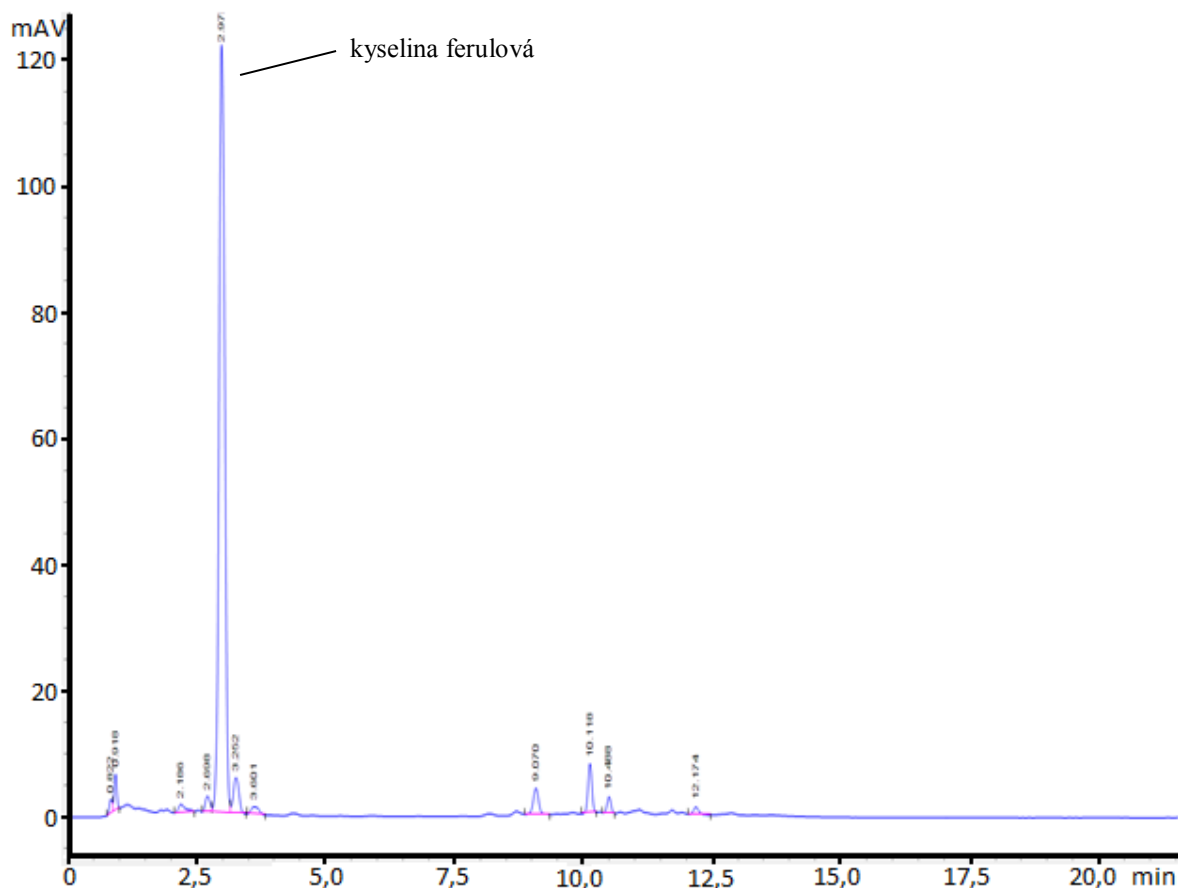
Výrobce	Phenomenex
Velikost	LC Column 100 \times 3,0 mm
Popis	Kinetex® 2,6 μ m EVO C18 100 Å

Tabulka 3: Nastavení gradientové eluce

čas [min]	kys. mravenčí [%]	methanol [%]	acetonitril [%]
0	95	5	0
4	80	20	0
10	60	20	20
30	95	5	0
40	95	5	0



Obrázek 16: Chromatogram standardu kyseliny ferulové



Obrázek 17: Chromatogram vzorku pšeničných otrub po alkalické hydrolýze

3.2.9 Statistická metoda ANOVA

Pro statistické vyhodnocení vlivu optimalizovaných parametrů na výtěžnost kyseliny ferulové z pšeničných otrub byla použita Analýza rozptylu (ANOVA). Hladina významnosti α byla rovna 0,05, tedy 5 %. Otázkou bylo, zda má právě optimalizovaný parametr vliv na výtěžnost kyseliny ferulové. Hypotéza H_0 tvrdila, že parametr vliv na výtěžnost kyseliny ferulové nemá. Alternativní hypotéza H_1 tvrdila opak, že tedy daný parametr vliv na výtěžnost kyseliny ferulové má. Pro posouzení pravdivosti hypotézy H_0 byla p -hodnota $< 0,05$ a testovací kritérium $F > F$ kritické. V případě, že tyto nerovnosti test vyhodnotil jako platné, nulová hypotéza byla zamítnuta. Pokud některá z nerovností byla neplatná, nulová hypotéza byla označena za pravdivou. Tím bylo zjištěno, jestli daný parametr má nebo nemá vliv na výtěžnost kyseliny ferulové.

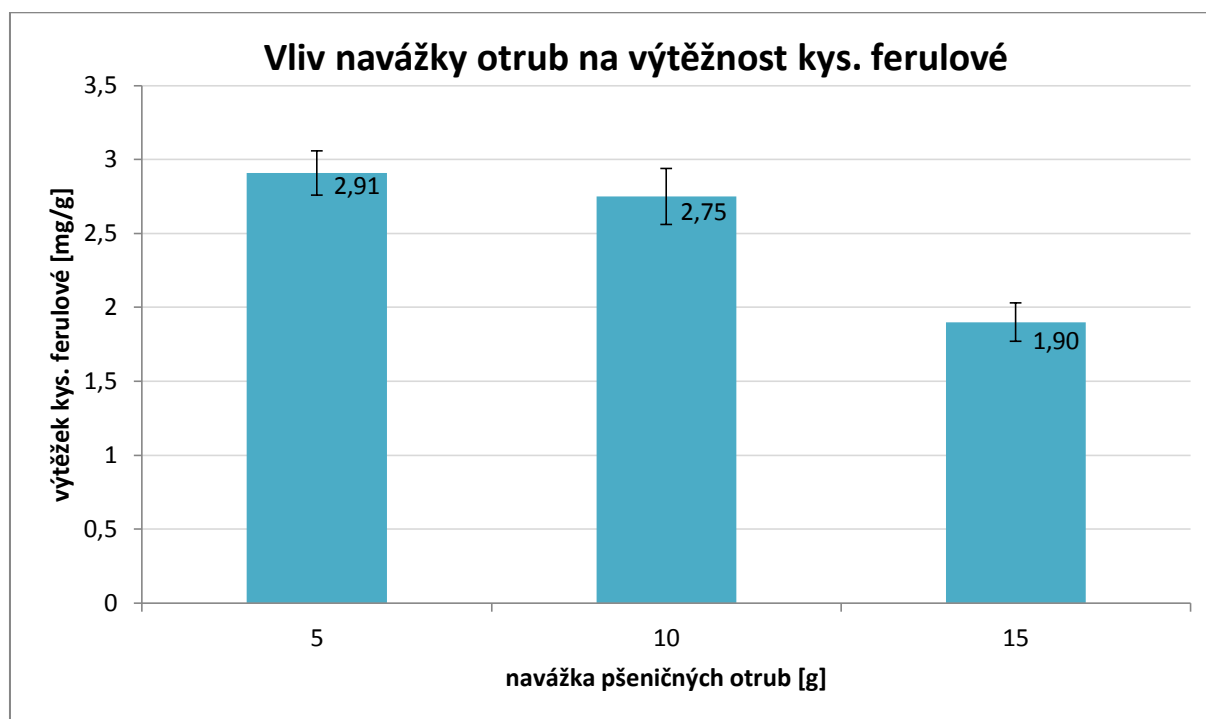
4 DISKUZE A VÝSLEDKY

4.1 Výsledky optimalizace navážky pšeničných otrub

V první fázi optimalizace metody byla vyhodnocována nejvhodnější navážka pšeničných otrub z hlediska výtěžnosti kyseliny ferulové. Ostatní parametry extrakce byly vybrány dle kapitoly 2.2.1, tzn. teplota hydrolýzy 50 °C, 0,5 M hydroxid sodný, trojnásobný objem ethanolu oproti původnímu objemu, doba hydrolýzy 4 hodiny. Navážky byly zvoleny na 5, 10 a 15 g. Výtěžky kyseliny ferulové jsou zaznamenány v tabulce 4 a grafu 1.

Tabulka 4: Optimalizace navážky pšeničných otrub

Navážka pšeničných otrub [g]	Výtěžek kyseliny ferulové [mg/g]
5	2,91 ± 0,15
10	2,75 ± 0,19
15	1,90 ± 0,13



Graf 1: Optimalizace navážky pšeničných otrub

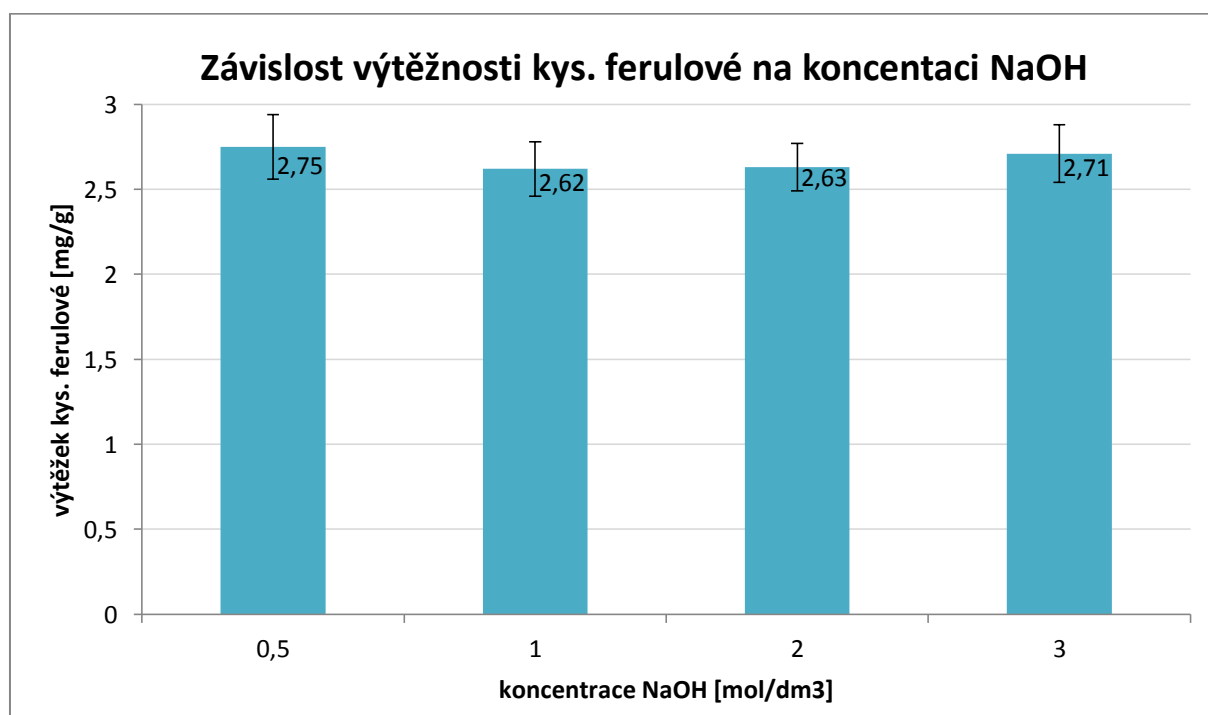
Z výsledků uvedených v tabulce 4 a grafu 1 je zřejmé, že nejvyšší výtěžky byly získány z 5g navážky a to 2,91 mg kyseliny ferulové na 1 g pšeničných otrub. Navyšování navážky vedlo k významnému snižování výtěžnosti extrakce mezi 5g a 15g navážkou ($p < 0,0001$; $F = 260,1$; $F_{krit} = 3,89$). Mezi 5 a 10 g navážkou nebyl stanoven statisticky významný rozdíl. Byly pozorovány i změny viskozity. Viskozita vzorků se zvyšovala s rostoucí navážkou. To mohlo být způsobeno vznikajícími produkty hydrolýzy. Změna viskozity se dala pozorovat i při srážení ethanolom, což by odpovídalo fyzikálním vlastnostem β -glukanů, které se vysrážely ze struktury otrub po přidání ethanolu, spočívajících ve velmi nízké rozpustnosti a schopnosti rychle tvořit gel. Vysokomolekulární β -glukany zvyšují viskozitu roztoků, zatímco nízkomolekulární β -glukany velmi snadno tvoří gel [33]. Vzorky s 15 gramy otrub bylo téměř nemožné promíchávat v průběhu hydrolýzy, což omezilo efektivitu procesu (extrakční rozpouštědlo nebylo schopno pořádně reagovat s hemicelulózovou strukturou). Tento jev vedl k výrazně menším výtěžkům kyseliny ferulové (1,90 mg/g). Na základě tohoto experimentu se rozhodlo pro navážku 10 g proto, že potenciální využití tohoto procesu v průmyslu vyžaduje co nejvyšší možné navážky pšeničných otrub z důvodu velkého produkovaného množství.

4.2 Výsledky optimalizace koncentrace hydroxidu sodného

Dalším optimalizovaným parametrem byla koncentrace hydroxidu sodného. Navážka byla zvolena podle předchozího experimentu, tedy 10 gramů. Teplota hydrolyzy byla 50 °C, viz kapitola 2.2.1. Testované koncentrace hydroxidu sodného byly 0,5, 1, 2 a 3 M. Výťažnost je zaznamenána v tabulce 5 a grafu 2.

Tabulka 5: Optimalizace koncentrace hydroxidu sodného

Koncentrace NaOH [M]	Výtěžek kyseliny ferulové [mg/g]
0,5	2,75 ± 0,19
1	2,62 ± 0,16
2	2,63 ± 0,14
3	2,71 ± 0,17



Graf 2: Optimalizace koncentrace hydroxidu sodného

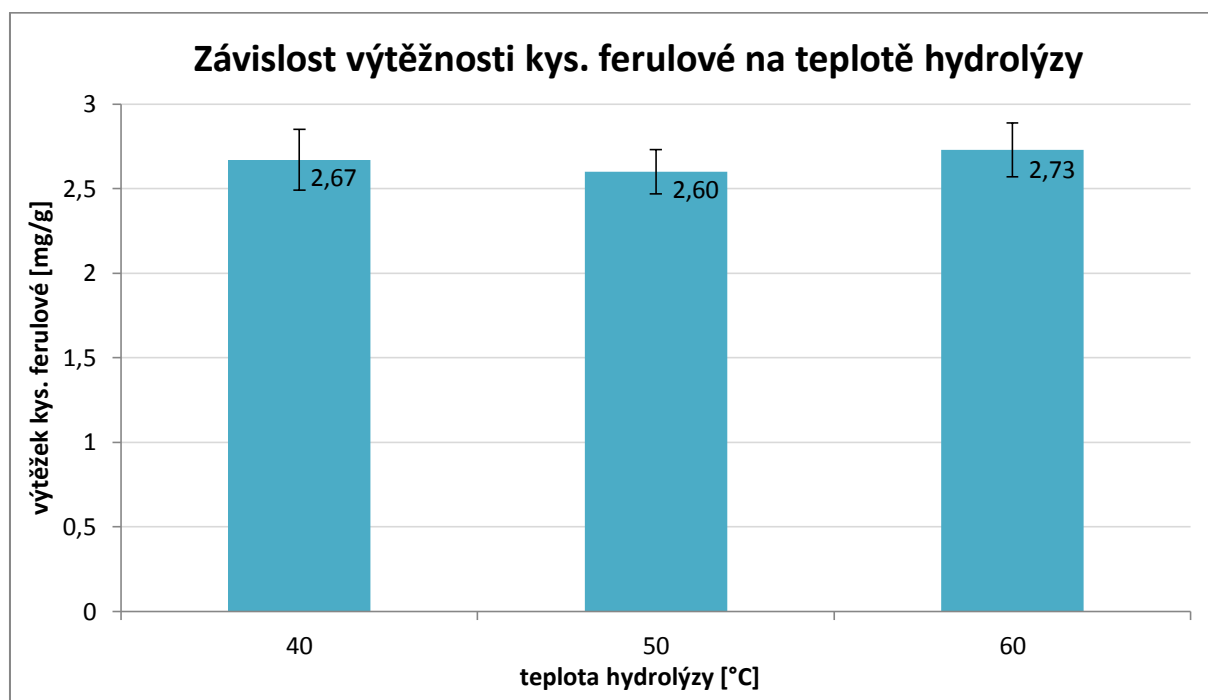
Nejvyšší výtěžnosti bylo dosaženo použitím 0,5 M NaOH (2,75 mg/g). Porovnáním s experimentem popsáním dle Buranova a Mazzy (2009) [44] bylo zjištěno, že bylo dosaženo výtěžku $3,91 \pm 0,5$ mg/g při použití 0,5 M NaOH. Rozdíly ve výtěžnosti mohly být způsobeny nehomogenitou a původem pšeničných otrub. Následným zvýšením koncentrace hydroxidu nebyly zpozorovány výrazné rozdíly v množství získané kyseliny ferulové ($p=0,079$; $F=2,72$; $F_{krit}=3,24$). Tento fakt je důležitý pro potenciální průmyslovou produkci kyseliny ferulové. Je možné použít hydroxid o nízké koncentraci, což je velkou výhodou hlavně po ekonomické stránce. Nicméně, při použití 3 M hydroxidu byl vzorek snáze filtrovatelný. Bylo to způsobeno pravděpodobně tzv. vysolovacím efektem, který probíhá při neutralizaci, kdy vzniká větší množství chloridu sodného a hemicelulózy se stávají méně rozpustnými. Vysolování má potenciál pro úsporu ethanolu, který se využívá pro srážení hemicelulóz a to převážně v průmyslovém měřítku [5].

4.3 Výsledky optimalizace teploty hydrolýzy

Dalším experimentem bylo stanovení optimální teploty hydrolýzy z hlediska maximalizace výtěžku kyseliny ferulové. Navážka i koncentrace hydroxidu sodného byly zvoleny podle předchozích testů, viz kapitola 2.2.1 (10 g a 0,5 M NaOH). Zkoumané teploty byly 40, 50 a 60 °C. Výsledky tohoto optimalizačního kroku jsou prezentovány v tabulce 6 a grafu 3.

Tabulka 6: Optimalizace teploty hydrolýzy

Teplota hydrolýzy [°C]	Výtěžek kyseliny ferulové [mg/g]
40	2,67 ± 0,18
50	2,60 ± 0,13
60	2,73 ± 0,16



Graf 3: Optimalizace teploty hydrolýzy

Z tabulky 6 a grafu 3 je zřejmé, že nejvyšších výtěžků se získalo při extrakční teplotě 60 °C (2,73 mg/g). Mezi teplotami však nebyly zaznamenány výrazné rozdíly s ohledem na výtěžnost ($p=0,88$; $F=0,13$; $F_{\text{krit}}=3,89$). Je nutno zvážit také ekonomickou stránku věci kvůli potenciálnímu použití procesu v průmyslovém měřítku, v tomto případě lze tedy použít teplotu 40 °C.

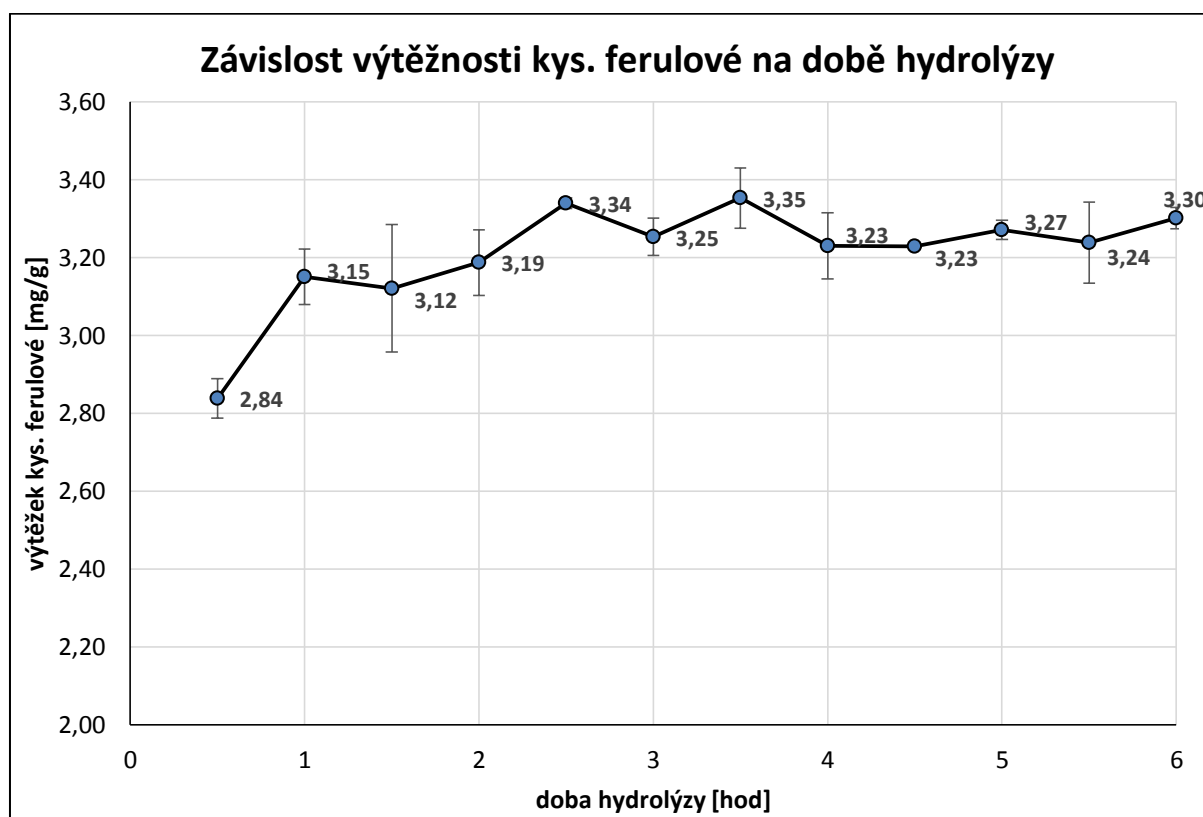
Při vizuálním porovnání hydrolyzátů bylo zjištěno, že při 40 °C byl získán hydrolyzát s nejsvětlejší barvou a při 60 °C hydrolyzát s nejtmaší barvou. Byl také pozorován vliv teploty hydrolýzy na vznik aglomerátů při následném srážení ethanolem. Při 40 °C vznikaly v hydrolyzátu velmi jemné aglomerace vysrážených glukomannanů a hemicelulóz a při 60 °C větší aglomerace. Na samotnou rychlost filtrace však tento jev neměl vliv.

4.4 Výsledky optimalizace doby hydrolýzy

Dalším optimalizovaným parametrem byla doba hydrolýzy. V průběhu šesti hodin byly postupně odebírány vzorky. Byly použity již optimalizované parametry a parametry viz kapitola 2.2.1. V závislosti na době hydrolýzy byl zjišťován výtěžek kyseliny ferulové. Výsledky lze možné vyčíst z tabulky 7.

Tabulka 7: Optimalizace doby hydrolýzy

Doba hydrolýzy [hod]	Výtěžek kyseliny ferulové [mg/g]
0,5	2,84 ± 0,07
1	3,15 ± 0,10
1,5	3,12 ± 0,23
2	3,19 ± 0,12
2,5	3,34 ± 0,02
3	3,25 ± 0,07
3,5	3,35 ± 0,11
4	3,23 ± 0,12
4,5	3,23 ± 0,01
5	3,27 ± 0,03
5,5	3,24 ± 0,15
6	3,30 ± 0,04



Graf 4: Optimalizace doby hydrolýzy

Z tabulky 7 i grafu 4 lze vidět, že již po 1 hodině hydrolýzy dosahoval výtěžek kyseliny ferulové $3,15 \pm 0,10$ mg/g, nejvyšších průměrných výtěžků bylo získáno po 2,5 hodinách

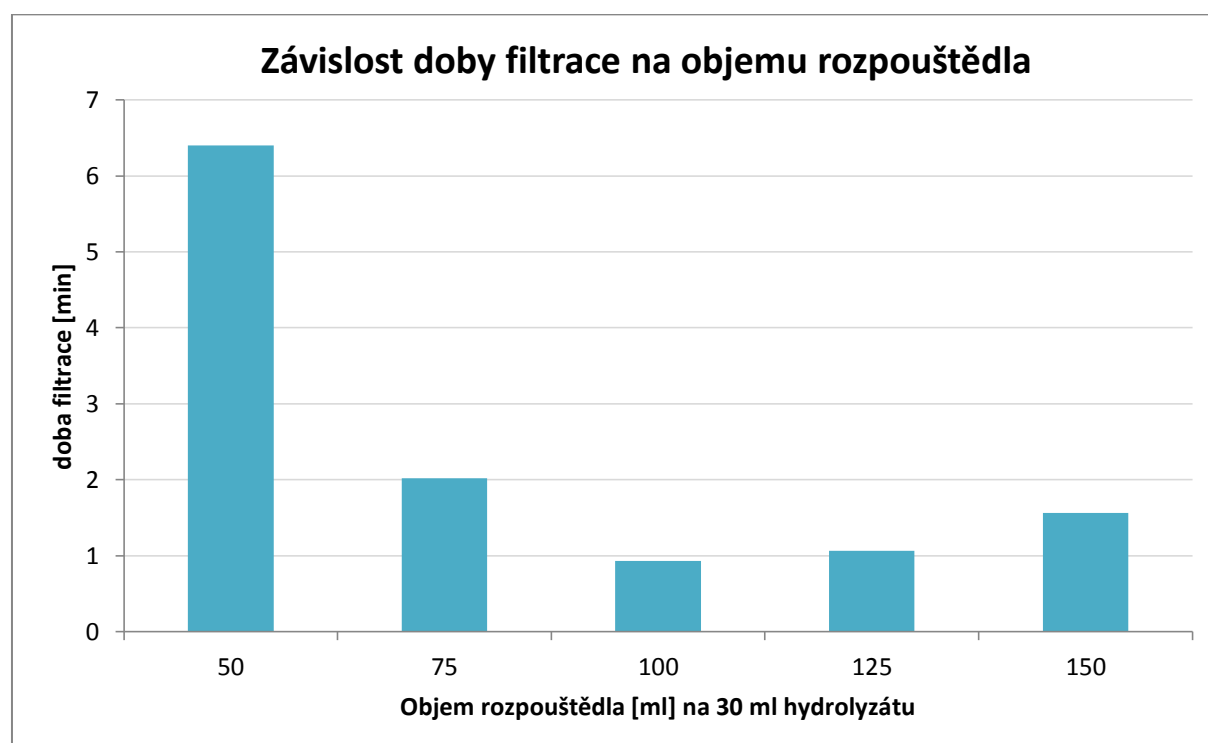
hydrolýzy. Po této době již nedocházelo ke statisticky významnému nárůstu ani poklesu koncentrace. Pro průmyslové použití je zajímavé zvážit krátkou, jednododinovou dobu hydrolýzy. Zkrácení doby hydrolýzy by významně snížilo energetické vstupy do technologie pouze za cenu minimálního rozdílu v extrakčním výtěžku oproti delším časům.

4.5 Výsledky optimalizace objemu rozpouštědla

Srážení hemicelulóz je kritickou fází celého procesu. Objem ethanolu, přidávaného do zneutralizovaného hydrolyzátu jako srážecí činidlo, má významný vliv na filtrovatelnost vzorku. Testováno bylo 25, 50, 75, 100, 125 a 150 ml ethanolu na 30 ml zneutralizovaného hydrolyzátu. Ostatní podmínky byly zvoleny podle výše optimalizovaných parametrů, případně dle kapitoly 2.2.1. V závislosti na množství rozpouštědla byla měřena doba filtrace vzorku.

Tabulka 8: Optimalizace objemu rozpouštědla

Objem ethanolu [ml]/30 ml hydrolyzátu	Čas filtrace [min:s]
25	nefiltrovatelné
50	6:24
75	2:01
100	0:56
125	1:40
150	1:34



Graf 5: Optimalizace objemu rozpouštědla

Z tabulky 8 lze vyčíst, že při použití 25 ml ethanolu vzorek nebylo možné přes kvantitativní papírové filtry přefiltrovat. Nejlepšího času filtrace se dosáhlo při použití 100 ml ethanolu, ale rozdíly pro objemy 75, 125 a 150 ml nebyly příliš velké. Vzhledem k potenciálnímu

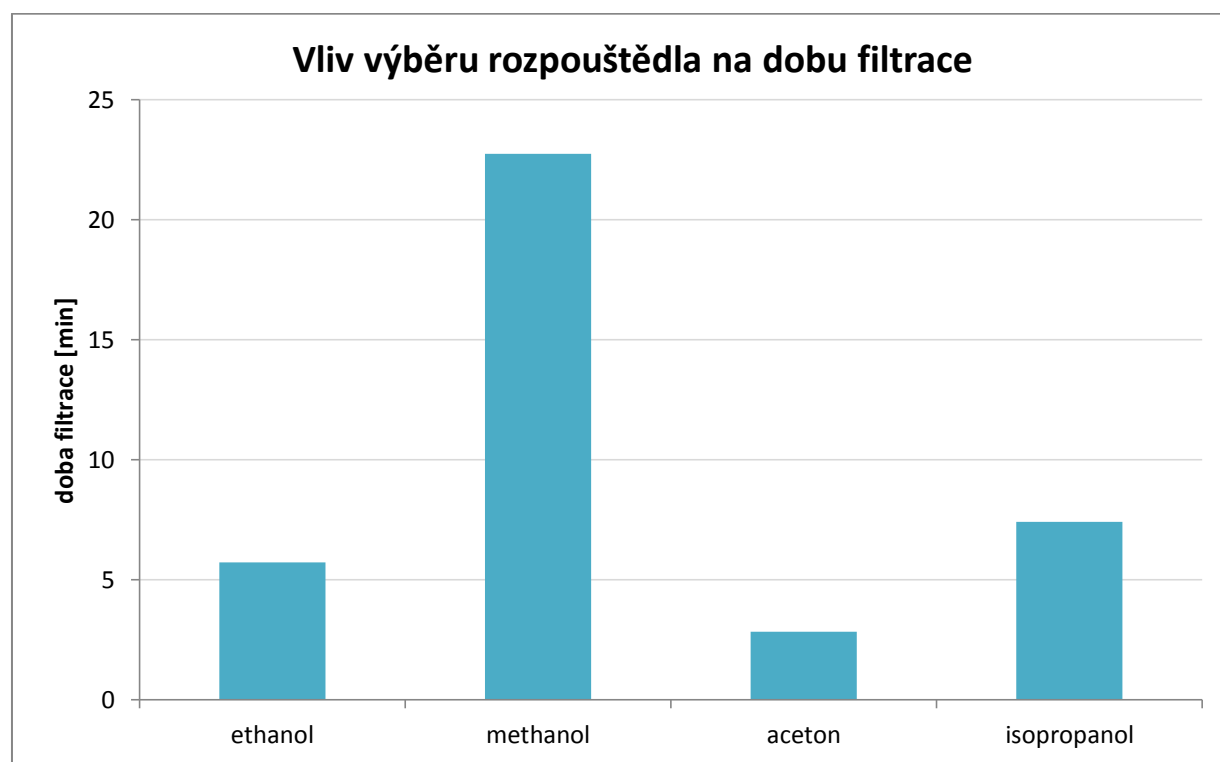
použití metody v průmyslovém měřítku, je nutno vybrat jak snadnou, tak i ekonomicky výhodnou variantu. Proto tedy pro další experimenty byl zvolen objem 75 ml rozpouštědla na 30 ml zneutralizovaného hydrolyzátu z pšeničných otrub.

4.6 Výsledky optimalizace výběru rozpouštědla

Následně byla testována čtyři různá rozpouštědla. V závislosti na výběru rozpouštědla dochází k odlišnému srážení hemicelulóz, případně jiných polymerních látek. Zjišťován byl rozdíl při srážení ethanolem, methanolem, acetonem a isopropanolem. Ostatní parametry odpovídaly těm dříve optimalizovaným nebo popsaným v kapitole 2.2.1. Sledována byla doba filtrace a srážení vzorku v závislosti na zvoleném rozpouštědle.

Tabulka 9: Optimalizace výběru rozpouštědla

Rozpouštědlo	Čas filtrace [min:s]
ethanol	5:44
methanol	22:45
aceton	2:50
isopropanol	7:25



Graf 6: Optimalizace výběru rozpouštědla

Z tabulky 9 a grafu 6 je zřejmé, že methanol, co se času filtrace týká, dopadl nejhůře. Nejrychlejší byla filtrace s acetonem. Rychlosti filtrace ethanolu, acetonu a isopropanolu se stále pohybují v přijatelných hodnotách. Vzhled sraženiny byl u ethanolu, methanolu i acetonu velmi podobný, vytvořila se hustá aglomerace. Sraženina při použití isopropanolu byla mnohem jemnější a řidší. Doba filtrace vzorku v tomto experimentu nelze srovnávat

s dobou filtrace při optimalizaci objemu rozpouštědla, jelikož byly použity dva různé druhy filtrů a vodních vývěv.

Při výběru rozpouštědla, v tomto případě zejména ethanolu, acetonu a isopropanolu, je nutno zvážit několik faktorů a rizik. Jedná se totiž o látky vysoce hořlavé a způsobující podráždění očí. V případě acetonu a isopropanolu jde o látky způsobující závratě a ospalost a v určitých koncentracích toxické. Relativním porovnáváním cen bylo zjištěno, že ethanol je několikanásobně dražší než ostatní testovaná rozpouštědla. Ceny acetonu a isopropanolu jsou srovnatelné. Ethanol je nutné mít v případě dovozu ze zahraničí ošetřen legislativou, která zahrnuje i platbu kaucí. Pro průmyslové použití je ale nutné zvážit jak zdravotní a environmentální hlediska, tak i ekonomické náklady spojené s výběrem rozpouštědla.

4.7 Optimalizované parametry

Tabulka 10: Optimalizované parametry

Navážka pšeničných otrub	10 g
Hydroxid sodný	150 ml 0,5 M
Doba hydrolýzy	2,5 hod
Teplota hydrolýzy	40 °C
Rozpouštědlo	ethanol
Množství rozpouštědla	375 ml

5 ZÁVĚR

Předmětem této bakalářské práce bylo optimalizovat extrakční metodu, konkrétně alkalickou hydrolýzu, pro získání kyseliny ferulové z pšeničných otrub. Experimentální část byla založena na metodě popsané v publikaci od Buranova a Mazzy (2009) [44]. Výchozí parametry byly voleny na základě tohoto článku a postupně optimalizovány na naše laboratorní podmínky a druh testovaných otrub. Byl zjišťován vliv mnoha faktorů na hydrolýzu, mezi které patří navážka materiálu, teplota a doba hydrolýzy, koncentrace hydroxidu sodného jako alkálie nutné pro započetí hydrolýzy, výběr a objem rozpouštědla. Všechny tyto zmíněné parametry byly optimalizovány s cílem maximalizovat výtěžek kyseliny ferulové a minimalizovat vstupy do technologie z ekonomického hlediska.

Postupnými kroky bylo zjištěno, že vliv na kvantitativní zisk kyseliny ferulové má navážka pšeničných otrub a doba hydrolýzy. Významný vliv ostatních parametrů na výtěžnost pozorován nebyl. Z důvodu zacílení této práce na vývoj postupu aplikovatelného v provozním měřítku byly testovány také různé objemy a druhy rozpouštědel používaných při srážení hemicelulóz z hydrolyzátu. Tato část technologie je z ekonomického hlediska kritická. Jako srážecí činidlo se nejčastěji využívá ethanol, a to v nezanedbatelném množství. Využívání ethanolu je problematické jak s ohledem na přísné legislativní předpisy celní zprávy, tak i s ohledem na vysokou cenu tohoto rozpouštědla.

Cílem bylo optimalizovat metodu tak, aby tento proces probíhal v průmyslovém měřítku co nejkratší dobu, s co nejmenšími vklady a co nejvyššími výtěžky. Při optimalizovaných podmínkách bylo získáno vysokých výtěžků ($3,15 \pm 0,10$ mg/g) již po jedné hodině hydrolýzy. Nejvyšších průměrných výtěžků ($3,34 \pm 0,02$ mg/g) bylo dosaženo po 2,5 hodinách hydrolýzy. Po srovnání výtěžku jedné čtyřhodinové hydrolýzy a jedné hodinové hydrolýzy pšeničných otrub je možné tvrdit, že za 4 hodiny lze námi optimalizovanou metodou získat až čtyřnásobné množství kyseliny ferulové oproti metodě výchozí. Během 4 hodin by bylo možné alkalickou hydrolýzu za optimalizovaných podmínek provést až čtyřikrát. V závěru lze tedy usoudit, že množství získané kyseliny ferulové za tak krátký čas extrakce je solidním posunem pro aplikaci metody do poloprovazního měřítka.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KADLEC, Pavel, Karel MELZUCH a Michal VOLDŘICH, 2012. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-807-4181-450.
- [2] BENDA, Vladimír, Ivan BABŮREK a Josef ŽDÁRSKÝ, 2000. *Biologie II: Nauka o potravinářských surovinách*. Vyd. 3., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 80-708-0402-5.
- [3] Wheat kernel, 2016. In: *Tes teach* [online]. Barcelona: Grain [cit. 2017-12-28]. Dostupné z: <https://www.tes.com/lessons/sWM5rku2Gb5ybw/grain>
- [4] KHALID, Khairunizah Hazila, Jae-Bom OHM a Senay SIMSEK, 2017. Whole wheat bread: Effect of bran fractions on dough and end-product quality. *Journal of Cereal Science*. **78**, 48-56. DOI: 10.1016/j.jcs.2017.03.011. ISSN 07335210. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521016303186>
- [5] SUN, Run-Cang, 2010. *Cereal straw as a resource for sustainable biomaterials and biofuels: chemistry, extractives, lignins, hemicelluloses and cellulose*. Amsterdam: Elsevier. ISBN 978-044-4532-343.
- [6] *Mindmeister* [online], 2018. San Francisco, USA: © 2018 MeisterLabs [cit. 2018-05-17]. Dostupné z: <https://www.mindmeister.com/521885934/main-parts-of-plant-cells-http-www-enchantedlearning-com-subjects-plants-cell>
- [7] BENTO-SILVA, Andreia, Maria Carlota VAZ PATTO a Maria DO ROSÁRIO BRONZE, 2018. Relevance, structure and analysis of ferulic acid in maize cell walls. *Food Chemistry*. **246**, 360-378. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.11.012. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814617318071>
- [8] FIGUEIREDO, Patrícia, Kalle LINTINEN, Jouni T. HIRVONEN, Mauri A. KOSTIAINEN a Hélder A. SANTOS, 2018. Properties and chemical modifications of lignin: Towards lignin-based nanomaterials for biomedical applications. *Progress in Materials Science*. **93**, 233-269. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2017.12.001. ISSN 00796425. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079642517301421>
- [9] KUN, Dávid a Béla PUKÁNSZKY, 2017. Polymer/lignin blends: Interactions, properties, applications. *European Polymer Journal*. **93**, 618-641. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2017.04.035. ISSN 00143057. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305716317529>

- [10] BALASUNDRAM, Nagendran, Kalyana SUNDRAM a Samir SAMMAN, 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. **99**(1), 191-203. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.07.042. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814605006242>
- [11] HANDIQUE, J.G. a J.B. BARUAH, 2002. Polyphenolic compounds: an overview. *Reactive and Functional Polymers*. **52**(3), 163-188. DOI: 10.1016/S1381-5148(02)00091-3. ISSN 13815148. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1381514802000913>
- [12] *Food Chemistry*, 2011. **126**(4). ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610016353>
- [13] SCALBERT, Augustin, Ian T JOHNSON a Mike SALTMARSH, 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **2005**(81), 215S-7S.
- [14] Flavonoidy, 2017. In: *Goji Kustovnica* [online]. [cit. 2017-12-30]. Dostupné z: <http://www.goji-kustovnica.sk/flavonoidy/>
- [15] KAUR, Jasmeet, Lita KATOPO, Andrew HUNG, John ASHTON a Stefan KASAPIS, 2018. Combined spectroscopic, molecular docking and quantum mechanics study of β -casein and p -coumaric acid interactions following thermal treatment. *Food Chemistry*. -. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.01.091. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618301006>
- [16] WANG, Lan, Yang YAO, Zhonghu HE, Desen WANG, Aihua LIU a Yong ZHANG, 2013. Determination of phenolic acid concentrations in wheat flours produced at different extraction rates. *Journal of Cereal Science*. **57**(1), 67-72. DOI: 10.1016/j.jcs.2012.09.013. ISSN 07335210. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521012002172>
- [17] ŠTÝBLOVÁ, Romana, 2015. *Změna obsahu fenolických kyselin během sladování ječmene jarního*. Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ing. Sylvie Běláková, Ph.D.
- [18] KUMAR, Naresh a Vikas PRUTHI, 2014. Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*. **4**, 86-93. DOI: 10.1016/j.btre.2014.09.002. ISSN 2215017x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2215017X14000368>

- [19] ŽILIĆ, Slađana, Vesna HADŽI-TAŠKOVIĆ ŠUKALOVIĆ, Dejan DODIG, Vuk MAKSIMOVIĆ, Milan MAKSIMOVIĆ a Zorica BASIĆ, 2011. Antioxidant activity of small grain cereals caused by phenolics and lipid soluble antioxidants. *Journal of Cereal Science*. **54**(3), 417-424. DOI: 10.1016/j.jcs.2011.08.006. ISSN 07335210. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521011001469>
- [20] GRANATA, Giuseppe, Grazia M.L. CONSOLI, Raffaella LO NIGRO a Corrada GERACI, 2018. Hydroxycinnamic acids loaded in lipid-core nanocapsules. *Food Chemistry*. **245**, 551-556. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.10.106. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814617317430>
- [21] MARKOVIĆ, Svetlana a Jelena TOŠOVIĆ, 2016. Comparative study of the antioxidative activities of caffeoylquinic and caffeic acids. *Food Chemistry*. **210**, 585-592. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.05.019. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616306951>
- [22] KIM, Hyun-Bum, Seok LEE, Eun-Sang HWANG, Sungho MAENG a Ji-Ho PARK, 2017. P-Coumaric acid enhances long-term potentiation and recovers scopolamine-induced learning and memory impairments. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **492**(3), 493-499. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.08.068. ISSN 0006291X. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X17316273>
- [23] LI, Yanli, Tong HE, Rong LIANG, Zhengzhe LUO, Yuanbo ZHU a Cheng YANG, 2018. Preparation and properties of multifunctional sinapic acid corn bran arabinoxylan esters. *International Journal of Biological Macromolecules*. **106**, 1279-1287. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.137. ISSN 01418130. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014181301730168X>
- [24] YRBAS, María de los Angeles, Florencia MORUCCI, Rosario ALONSO a Susana GORZALCZANY, 2015. Pharmacological mechanism underlying the antinociceptive activity of vanillic acid. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **132**, 88-95. DOI: 10.1016/j.pbb.2015.02.016. ISSN 00913057. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009130571500057X>
- [25] ABATTI, Guilherme Pazini, Alfredo T. NUNES PIRES, Almir SPINELLI, Nico SCHARNAGL a Thiago F. DA CONCEIÇÃO, 2018. Conversion coating on magnesium alloy sheet (AZ31) by vanillic acid treatment: Preparation, characterization and corrosion behavior. *Journal of Alloys and Compounds*. **738**, 224-232. DOI: 10.1016/j.jallcom.2017.12.115. ISSN 09258388. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925838817343050>

- [26] FARHOOSH, Reza a Laura NYSTRÖM, 2018. Antioxidant potency of gallic acid, methyl gallate and their combinations in sunflower oil triacylglycerols at high temperature. *Food Chemistry*. **244**, 29-35. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.10.025. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814617316552>
- [27] OJANI, Reza, Akbar KHANMOHAMMADI a Jahan-Bakhsh RAOOF, 2015. Photoelectrocatalytic degradation of p-hydroxybenzoic acid at the surface of a titanium/titanium dioxide nanotube array electrode using electrochemical monitoring. *Materials Science in Semiconductor Processing*. **31**, 651-657. DOI: 10.1016/j.mssp.2014.12.055. ISSN 13698001. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369800114007471>
- [28] DEGA-SZAFRAN, Zofia, Kinga ROSZAK, Andrzej KATRUSIAK, Anna KOMASA a Mirosław SZAFRAN, 2017. Three-component complex of piperidine-ethanol, p-hydroxybenzoic acid and water studied by X-ray, Raman, FTIR and DFT. *Vibrational Spectroscopy*. **92**, 194-199. DOI: 10.1016/j.vibspec.2017.06.010. ISSN 09242031. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924203117300966>
- [29] MAŇÁSKOVÁ, Věra, 2013. *Extrakce fenolových kyselin z rostlinných potravin pevného charakteru*. Vavrečkova 275, 760 01 Zlín. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav technologie potravin. Vedoucí práce Ing. Pavel Hanuštiak.
- [30] ARSLAN, Rana, Sule AYDIN, Dilara NEMUTLU SAMUR a Nurcan BEKTAS, 2018. The possible mechanisms of protocatechuic acid-induced central analgesia. *Saudi Pharmaceutical Journal*. **26**(4), 541-545. DOI: 10.1016/j.jsps.2018.02.001. ISSN 13190164. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1319016418300252>
- [31] CHOI, Jun-Hui a Seung KIM, 2018. Mechanisms of attenuation of clot formation and acute thromboembolism by syringic acid in mice. *Journal of Functional Foods*. **43**, 112-122. DOI: 10.1016/j.jff.2018.02.004. ISSN 17564646. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464618300495>
- [32] RASHEEDA, K., H. BHARATHY a N. NISHAD FATHIMA, 2018. Vanillic acid and syringic acid: Exceptionally robust aromatic moieties for inhibiting in vitro self-assembly of type I collagen. *International Journal of Biological Macromolecules*. -. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.015. ISSN 01418130. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813018303507>
- [33] PRÜCKLER, Michael, Susanne SIEBENHANDL-EHN, Silvia APPRICH, Stefan HÖLTINGER, Cornelia HAAS, Erwin SCHMID a Wolfgang KNEIFEL, 2014. Wheat bran-based biorefinery 1: Composition of wheat bran and strategies of functionalization. *LWT - Food Science and Technology*. **56**(2), 211-221. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.12.004. ISSN 00236438. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643813004751>

- [34] CHYTIL, Dalibor, 2017. *Vývoj a optimalizace postupů pro extrakci vybraných složek z Třezalky tečkované*. Purkyňova 464/118, Brno 612 00. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D.
- [35] PLUHAŘOVÁ, Lenka, 2012. *Využití extrakce přehřátou vodou při analýze různých matric*. Studentská 573, Pardubice 532 10. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Ing. Petra Bajerová, Ph.D.
- [36] SAFDAR, Muhammad N., Tusneem KAUSAR, Saqib JABBAR, Amer MUMTAZ, Karam AHAD a Ambreen A. SADDZOAI, 2017. Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (Citrus reticulate L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *Journal of Food and Drug Analysis*. **25**(3), 488-500. DOI: 10.1016/j.jfda.2016.07.010. ISSN 10219498. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1021949816301272>
- [37] KHODDAMI, Ali, Meredith WILKES a Thomas ROBERTS, 2013. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*. **18**(2), 2328-2375. DOI: 10.3390/molecules18022328. ISSN 1420-3049. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/18/2/2328>
- [38] ZYCHOVÁ, Markéta, Mariana RŮŽIČKOVÁ, Jan MACÁK a Václav JANDA, 2013. Vlastnosti a použití superkritické vody. *Chemické listy*. (107), 126-135.
- [39] BARBEROUSSE, Hélène, Olivier ROISEUX, Christelle ROBERT, Michel PAQUOT, Claude DEROANNE a Christophe BLECKER, 2008. Analytical methodologies for quantification of ferulic acid and its oligomers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **88**(9), 1494-1511. DOI: 10.1002/jsfa.3242. ISSN 00225142. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.3242>
- [40] LACOURSE, William R., 2017. HPLC Instrumentation. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier, 2017. DOI: 10.1016/B978-0-12-409547-2.11123-0. ISBN 9780124095472. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124095472111230>
- [41] CZAPLICKI, Sylwester, 2013. Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds. *Column Chromatography*. InTech, 2013-04-10, 102. DOI: 10.5772/55620. ISBN 978-953-51-1074-3. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/column-chromatography/chromatography-in-bioactivity-analysis-of-compounds>
- [42] ŠKAŘUPA, Přemysl, 2012. *Možnosti určení původu vína z prvkového složení*. Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.

[43] CRAMER, Angélique O. J., Don VAN RAVENZWAAIJ, Dora MATZKE, Helen STEINGROEVER, Ruud WETZELS, Raoul P. P. GRASMAN, Lourens J. WALDORP a Eric-Jan WAGENMAKERS, 2016. Hidden multiplicity in exploratory multiway ANOVA: Prevalence and remedies. *Psychonomic Bulletin & Review*. **23**(2), 640-647. DOI: 10.3758/s13423-015-0913-5. ISSN 1069-9384. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.3758/s13423-015-0913-5>

[44] BURANOV, Anvar U. a G. MAZZA, 2009. Extraction and purification of ferulic acid from flax shives, wheat and corn bran by alkaline hydrolysis and pressurised solvents. *Food Chemistry*. **115**(4), 1542-1548. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.01.059. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814609001010>

[45] P-hodnota a její interpretace, *Matematická biologie* [online]. Brno: Institut biostatistiky a analýz Masarykovy univerzity [cit. 2018-05-17]. Dostupné z: <http://portal.matematickabiologie.cz/index.php?pg=aplikovana-analyza-klinickych-a-biologickych-dat--biostatistika-pro-matematickou-biologii--uvod-do-testovani-hypotez--p-hodnota-a-jeji-interpretace>

[46] SEBERA, Martin, 2012. Statistika - vícerozměrné metody. *Fakulta sportovních studií, Masarykova univerzita* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 23. 1. 2012 [cit. 2018-05-17]. Dostupné z: http://www.fsps.muni.cz/~sebera/vicerozmerna_statistika/default.html

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ANOVA	Analysis of Variance (analýza rozptylu)
B	Borum (bor)
Ca	Calcium (vápník)
Co	Cobaltum (kobalt)
DNA	Deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
Fe	Ferrum (železo)
HCl	Acidum Hydrogenchloridum (kyselina chlorovodíková)
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
K	Kalium (draslík)
MANOVA	Multiway Analysis of Variance
Mg	Magnesium (hořčík)
Mn	Manganum (mangan)
Mo	Molybdaenum (molybden)
Na	Natrium (sodík)
NaOH	Natrii Hydroxidum (hydroxid sodný)
P	Phosphorus (fosfor)
S	Sulphur (síra)
Sn	Stannum (cín)
UV	Ultraviolet (ultrafialové)
UV/VIS	Ultraviolet-Visible (ultrafialové a viditelné)
Zn	Zincum (zinek)