

UNIVERZITA PARDUBICE

Fakulta chemicko-technologická

Analýza biologicky aktivních látek s využitím moderních
analytických metod

Ing. Miroslava Juričová

Disertační práce

2021

Prohlášení autora

Prohlašuji, že jsem tuto práci 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.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 11.01.2021

Ing. Miroslava Juričová

Anotace

Tato práce se zabývá selektivní izolací hydrofobinu SC3 s využitím polytetrafluorethylenových mikročástic a jeho následnou identifikací. V další části byl popsán proces charakterizace azaphilových pigmentů mořské houby *Talaromyces albobiverticillius*. V neposlední řadě byla věnována pozornost komplexnímu studiu medoviny se zaměřením na nalezení vhodných ukazatelů pro kontrolu jejich kvality.

Klíčová slova

hydrofobiny, azaphilony, fenolické látky, medovina, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

Title

Analysis of biologically active compounds using modern analytical techniques.

Annotation

This work deals with selective isolation of hydrophobin SC3 using polytetrafluoroethylene microparticles and its subsequent identification. In the next part the whole process of characterization of azaphilone pigments of *Talaromyces albobiverticillius* was described. Last but not least, attention was paid to the complex study of mead with a focus on finding suitable indicators for quality control of mead.

Keywords

hydrophobins, azaphilones, phenolic compounds, mead, liquid chromatography, mass spectrometry

Cíle

Tato disertační práce se skládá ze třech samostatných kapitol, pro které byly stanoveny následující cíle:

1. Selektivní izolace hydrofobinu SC3 extrakcí na pevné fázi a jeho následná identifikace pomocí moderních instrumentálních technik:
 - ✓ Optimalizace specifického proteolytického protokolu pro hydrofobin SC3.
 - ✓ Vyvinutí nové metody pro selektivní izolaci hydrofobinu SC3 ze směsi proteinů.
2. Charakterizace azaphilonových pigmentů (*Talaromyces albobiverticillius*) jako potenciálních nových potravinářských barviv:
 - ✓ Nalezení optimálního činidla pro extrakci pigmentů, izolovaných z mořské houby *Talaromyces albobiverticillius*.
 - ✓ Optimalizace podmínek chromatografické separace (HPLC-PDA-ESI/MS) pro extrahované pigmenty.
 - ✓ Identifikace nalezených pigmentů.
3. Analýza fenolických látek v medovinách:
 - ✓ Optimalizace podmínek pro extrakci fenolických látek z medovin.
 - ✓ Optimalizace parametrů pro HPLC/MS/MS analýzu vybraných fenolických látek.
 - ✓ Aplikace optimalizovaných parametrů na analýzu reálných vzorků medovin s cílem najít společné a rozdílné znaky a odhalit případné falšované vzorky.

Poděkování

Lidé, kterým bych ráda poděkovala a kteří mě provázeli a podporovali během doktorského studia je mnoho. Cesta to nebyla krátká ani jednoduchá. Zejména s nástupem do zaměstnání a přechodem na kombinované studium, bylo dokončení této podmíněno velkým množstvím volného času. Proto na prvním místě děkuji svému manželovi, rodině i všem přátelům za trpělivost a psychickou podporu, kterou mi byli. Velké díky patří vedoucí mé práce doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D., za odborné vedení a všechny cenné rady, které mi poskytovala a také za přátelský přístup a pochopení. Dále bych ráda poděkovala konzultantce Ing. Soně Řezkové, Ph.D. Velkou pracovní i životní zkušeností pro mě byla také zahraniční stáž, která ve mně zanechala jen hezké vzpomínky, a to zejména díky Danieli Giuffrida, Ph.D. a Francesco Cacciolovi, Ph.D., ale i celému týmu prof. Dr. Luigi Mondella.

Obsah

Seznam zkratk	9
Seznam obrázků	11
Seznam tabulek	14
1 Selektivní izolace hydrofobinu SC3 extrakcí na pevné fázi a jeho následná identifikace pomocí moderních instrumentálních technik	15
1.1 Úvod	15
1.2 Charakterizace	16
1.3 Rozdělení a struktura	16
1.4 Vlastnosti, funkce a význam.....	17
1.5 Současné metody izolace a analýzy.....	19
1.5.1 Izolace hydrofobinů I. třídy	19
1.5.2 Izolace hydrofobinů II. třídy.....	19
1.5.3 Strukturní modifikace před analýzou	20
1.5.4 Enzymatické štěpení	21
1.5.5 Analýza.....	21
1.6 Hydrofobin SC3.....	22
1.6.1 Struktura	22
1.6.2 Vlastnosti	23
1.7 Experimentální část	24
1.7.1 Standardy a ostatní chemikálie	24
1.7.2 Přístroje a zařízení	24
1.7.3 Příprava hydrofobinu SC3	24
1.7.4 Redukce disulfidických můstků, alkylace	25
1.7.5 Proteolytické štěpení hydrofobinu SC3	25
1.7.6 Purifikace a separace peptidů před MALDI-Orbitrap MS analýzou.....	25
1.7.7 Příprava hydrofobinu SC3 pro analýzu MALDI-TOF/TOF	26
1.7.8 Izolace hydrofobinu SC3 z modelové směsi proteinů pomocí PTFE částic..	26
1.7.9 Tris-tricinová SDS-PAGE	27
1.8 Výsledky a diskuze.....	27
1.8.1 Preanalytická příprava	27
1.8.2 Redukce disulfidických můstků	29
1.8.3 Proteolytické štěpení	30

1.8.4	Odsolení a separace peptidů před MS analýzou	31
1.8.5	MALDI-Orbitrap MS analýza	31
1.8.6	Izolace hydrofobinu SC3 z modelové směsi proteinů pomocí PTFE částic..	34
1.8.7	MALDI-TOF MS analýza	35
1.9	Závěr.....	37
2	Charakterizace azaphilonových pigmentů (<i>Talaromyces albobiverticillius</i>) jako potenciálních nových potravinářských barviv.....	38
2.1	Úvod	38
2.2	Klasifikace	39
2.3	Struktura	39
2.4	Vlastnosti a význam	39
2.5	Vybrané typy azaphilonových pigmentů.....	40
2.6	Experimentální část	42
2.6.1	Standardy a ostatní chemikálie	43
2.6.2	Přístroje a zařízení	43
2.6.3	Optimalizace separace	43
2.7	Výsledky a diskuze.....	44
2.8	Závěr.....	48
3	Analýza fenolických látek v medovinách	49
3.1	Úvod	49
3.2	Medovina.....	50
3.2.1	Historie	50
3.2.2	Výroba	51
3.2.3	Rozdělení	52
3.3	Med.....	53
3.3.1	Historie	53
3.3.2	Složení	53
3.3.3	Vliv na lidské zdraví.....	56
3.4	Fenolické látky	58
3.4.1	Rozdělení	58
3.4.2	Metody extrakce	61
3.4.3	Analytické metody.....	65
3.5	Experimentální část	70

3.5.1	Vzorky	70
3.5.2	Standardy a ostatní chemikálie	71
3.5.3	Přístroje a zařízení	71
3.5.4	Optimalizace HPLC/MS separace	71
3.5.5	Příprava standardů pro kvantifikaci.....	72
3.5.6	Optimalizace extrakce	72
3.5.7	Antioxidační aktivita	73
3.6	Výsledky a diskuze.....	74
3.6.1	Optimalizace HPLC/MS separace	74
3.6.2	Parametry pro kvantifikaci	77
3.6.3	Optimalizace extrakce	79
3.6.4	Statistická analýza	80
3.6.5	Antioxidační aktivita	88
4	Závěr.....	90
5	Literatura	91
	Seznam publikační činnosti	116

SEZNAM ZKRATEK

ABTS	2,2'-azinobis-(3-ethylbenzo-thiazolin-6-sulfonát)
ACN	Acetonitril
AMK	Aminokyselina
CE	Kolizní energie
CHCA	Kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová
CUPRAC	Metoda měření antioxidační aktivity na principu redukce měďnatého iontu
CXP	Výstupní potenciál kolizní cely
DAHC	Hydrogencitrát amonný
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DP	Deklasterační potenciál
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
ESI	Ionizace elektrosprejem
FA	Kyselina mravenčí
FRAP	Metoda měření antioxidační aktivity založená na redukci železnatých komplexů
GAE	Antioxidační aktivita vztažená na ekvivalentní množství kyseliny gallové
HMF	5-hydroxymethylfurfural
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IAA	Iodoacetamid
IMA	Mezinárodní asociace medovin
LC/MS	Kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií
LLE	Extrakce z kapaliny do kapaliny
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez stanovitelnosti
MAE	Mikrovlnná extrakce
MALDI	Ionizace a desorpce laserem za účasti matrice
MALDI-TOF	Ionizace a desorpce laserem za účasti matrice v kombinaci s analyzátozem doby letu

MF	Mobilní fáze
MRM	Monitorování hmotnostních přechodů vybraných iontů
MS	Hmotnostní spektrometrie
NMR	Nukleární magnetická rezonance
ORAC	Měření antioxidační aktivity založená na eliminaci kyslíkového radikálu
PCA	Analýza hlavních komponent
PDA	Detektor diodového pole
PFA	Kyselina permravnčí
PTFE	Polytetrafluorethylen
Q	Kvadrupól
R ²	Koeficient determinace
RP-HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie v systémech s obrácenými fázemi
RP-LC	Kapalinová chromatografie v systémech s obrácenými fázemi
SA	Kyselina trans-3,5-dimethoxy-4-hydroxysinapová
SDS	Dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsíranu sodného
SF	Stacionární fáze
SPE	Extrakce na pevné fázi
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin hydrochlorid
TEAC	Antioxidační aktivita vztažená na ekvivalentní množství troloxu
TFA	Kyselina trifluoroctová
TOF	Analyzátor doby letu
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
USE	Ultrazvuková extrakce

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1	Struktura hydrofobinů I. a II. třídy [10].	17
Obr. 2	Schopnost hydrofobinů změnit charakter různých povrchů na základě změny uspořádání molekuly [1].	17
Obr. 3	Chování hydrofobinů v roztoku [12].	18
Obr. 4	Strukturální změny hydrofobinu SC3 před a po oxidaci PFA. A) Rozpustná forma hydrofobinu SC3 s neporušenými disulfidickými můstky. B) α -helikální forma SC3 po oxidaci PFA s rozvolněnými disulfidickými můstky při kontaktu s teflonem. C) PFA oxidovaný SC3 ve formě β -skládaného listu při kontaktu s teflonem. Černě označeny aminokyseliny, které byly modifikované deuteriem [27].	20
Obr. 5	Aminokyselinová sekvence hydrofobinu SC3 s vyznačenými cysteiny [36].	22
Obr. 6	Aminokyselinová sekvence hydrofobinu SC3 a jeho předpokládané disulfidické můstky. Černě označeno typické rozmístění cysteinů, šedou barvou místa glykosylace manózy [8].	22
Obr. 7	Změna struktury hydrofobinu SC3 v závislosti na tom, s jakým prostředím přichází do kontaktu [1,5].	23
Obr. 8	Gel po aplikaci vzorků před analýzou Tris-tricin SDS-PAGE. V jamce nejvíce vpravo je obsažen hydrofobin SC3, který z důvodu vysoké hydrofobicity migruje k okraji jamky....	28
Obr. 9	Ukázka deformace proužku hydrofobinu SC3 po Tris-tricinové SDS-PAGE a obarvení amoniakálním stříbrem.	28
Obr. 10	MALDI-TOF/TOF MS spektrum hydrofobinu SC3 (SA matrice, záznam kladných iontů, lineární mód, rozsah $m/z = 12500 - 16000$).	29
Obr. 11	Tris-tricinová SDS-PAGE analýza po proteolytickém štěpení směsi hydrofobinu SC3 s chymotrypsinem (1) a termolyzinem (2). Barvení amoniakálním stříbrem. Jako MM je označen standard proteinů s distribucí molekulových hmotností v rozsahu 10–250 kDa.	31
Obr. 12	MALDI-LIT/Orbitrap spektrum peptidové směsi hydrofobinu SC3 po štěpení chymotrypsinem a přečištění pomocí C8 mikrokolonky metodou RP-LC. Označený pík o $m/z = 1692,814$ odpovídá peptidu PPSTTTIAAGGTCTTGSL. Zároveň byly pozorovány glykosylované formy peptidu obsahující až čtyři manózové jednotky. (CHCA matrice, záznam kladných iontů, rozsah $m/z = 700-4000$).	32
Obr. 13	Tris-tricinová SDS-PAGE analýza jednotlivých frakcí získaných během izolace hydrofobinu SC3 z modelové směsi 10 proteinů extrakcí na pevné fázi pomocí PTFE mikročástic. Barvení gelu amoniakálním stříbrem. MM – standard proteinů o molekulových	

hmotnostech (10–250 kDa), 1 – modelová směs proteinů, 2 – vazebná frakce (zbytek, který nebyl navázán na částice), 3 – 1. promývací krok 80% ACN/0.1% TFA, 4 – 2. promývací krok 1% SDS, 5 – 3. promývací krok kyselinou mravenčí, proužek v jamce 5 odpovídá izolovanému hydrofobinu SC3.	35
Obr. 14 MALDI-TOF hmotnostní spektrum (lineární mód) hydrofobinu SC3. (A) Nativní hydrofobin SC3 rozpuštěný v TFA (B) spektrum po přiblížení ukazuje na přítomnost několika glykosylovaných isoform hydrofobinu SC3; C) hydrofobin SC3 po izolaci na PTFE mikročásticích.	36
Obr. 15 Obecná struktura azaphilonových pigmentů [84].	39
Obr. 16 Struktura azaphilonových pigmentů. A: monascin, B: ankaflavin, C: rubropunctatin, D: monascorubrin, E: rubropunctamin, F: monascorubramin, G: PP-O, H: PP-Y [84].	41
Obr. 17 Struktura azaphilonových pigmentů. A: N-glutaryl-rubropunctamin, B: N-glutarylmonascorubramin, C: N-glukosyl-rubropunctamin, D: N-glukosylmonascorubramin [84].	42
Obr. 18 Chromatogram ukazující všechny zastoupené látky získané analýzou pigmentových extraktů <i>Talaromyces albobiverticillius</i> pomocí HPLC-PDA-ESI/MS. Na hlavním záznamu jsou označeny látky (3-12) po separaci IC extraktu EtOAc. Dále je zde zobrazen výřez separace EC extraktu CHCl ₃ , kde byly nalezeny látky (1-2).	44
Obr. 19 Strukturální analýza identifikované sloučeniny č. 4. (a) UV-VIS absorpční spektrum ethylacetátového extraktu, (b) ESI/MS spektrum změřené při snímání kladným iontů (c) ESI/MS spektrum změřené při snímání záporných iontů.	45
Obr. 20 Struktura molekuly nově identifikované látky č.4 (N-GABA-PP-V) včetně číslování uhlíkových atomů.	46
Obr. 21 Prehistorický člověk sbírající med. Skalní malba z období 6000 př. n. l. La Arana shekter, Bicorp, východní Španělsko [132].	53
Obr. 22 Obecná struktura flavonoidů [212].	59
Obr. 23 Kyselina benzoová a fenolické kyseliny od ní odvozené.	60
Obr. 24 Kyselina skořicová a fenolické kyseliny od ní odvozené.	60
Obr. 25 Struktura ABTS [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzo-thiazolin-6-sulfonát)].	66
Obr. 26 Struktura radikálu DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl).	67
Obr. 27 Chromatografická separace 24 vybraných standardů fenolických látek.	75
Obr. 28 Porovnání vlivu různých metod extrakce na celkové množství extrahovaných sledovaných fenolických látek ve vybraných vzorcích medovin (č. 1, 3, 4).	79
Obr. 29 Cattelův indexový graf úpatí pro všechny komponenty (STATISTICA, StatSoft). ...	80

Obr. 30 Graf komponentních vah – projekce proměnných do faktorové roviny 1-2 (STATISTICA, StatSoft).	81
Obr. 31 Graf komponentních vah – projekce proměnných do faktorové roviny 1-3 (STATISTICA, StatSoft).	82
Obr. 32 Graf komponentních vah – projekce proměnných do faktorové roviny 2-3 (STATISTICA, StatSoft).	82
Obr. 33 Cattellův indexový graf úpatí po odstranění redundantních proměnných (STATISTICA, StatSoft).	83
Obr. 34 Graf komponentních vah po odstranění redundantních proměnných – projekce proměnných do faktorové roviny 1-2 (STATISTICA, StatSoft).	83
Obr. 35 Graf komponentních vah po odstranění redundantních proměnných – projekce proměnných do faktorové roviny 1-3 (STATISTICA, StatSoft).	84
Obr. 36 Graf komponentních vah po odstranění redundantních proměnných – projekce proměnných do faktorové roviny 2-3 (STATISTICA, StatSoft).	84
Obr. 37 Graf komponentního skóre po odstranění redundantních proměnných – projekce případů do faktorové roviny 1-2 (STATISTICA, StatSoft).	86
Obr. 38 Graf komponentního skóre po odstranění redundantních proměnných – projekce případů do faktorové roviny 1-3 (STATISTICA, StatSoft).	87
Obr. 39 Graf komponentního skóre po odstranění redundantních proměnných – projekce případů do faktorové roviny 2-3 (STATISTICA, StatSoft).	87
Obr. 40 Porovnání antioxidační aktivity medovin metodou ABTS a DPPH radikálů, vyjádřené jako ekvivalentní množství standardu Troloxu.	88
Obr. 41 Celkový obsah fenolických látek stanovený pomocí Folin-Ciocalteouova činidla vztažený na ekvivalentní množství kyseliny gallové.	89

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Příprava modelové směsi pro izolaci na teflonových částicích.	26
Tabulka 2 Identifikované peptidy hydrofobinu SC3 po enzymatickém štěpení chymotrypsinem. MS a MS/MS data měřená za použití MALDI-Orbitrap MS po RP-LC separaci peptidové směsi na C8 stacionární fázi. MS data byla zpracována pomocí vyhledávacího programu MS-Fit v 5.10.19. Údaje získané z MS/MS byly analyzovány pomocí programu Proteome Discoverer 1.4. Jako vyhledávací databáze byla použita SwissProt. Peptidy se současnou hodnotou XCorr byly úspěšně identifikovány v databázovém vyhledávání MS/MS.....	33
Tabulka 3 Přehled sloučenin detekovaných pomocí HPLC-PDA-ESI/MS v intracelulárních a extracelulárních extraktech <i>Talaromyces albobiverticillius</i> 30548, korespondující s chromatogramem zobrazeném na obr. 18.....	47
Tabulka 4 Složení medu (Data v g/100 g) [130,135].....	54
Tabulka 5 Seznam vzorků medovin.	70
Tabulka 6 Optimalizované parametry pro HPLC/MS/MS analýzu.	76
Tabulka 7 Regresní parametry, meze detekce a stanovitelnosti pro jednotlivé fenolické látky.	78

1 SELEKTIVNÍ IZOLACE HYDROFOBINU SC3 EXTRAKCÍ NA PEVNÉ FÁZI A JEHO NÁSLEDNÁ IDENTIFIKACE POMOCÍ MODERNÍCH INSTRUMENTÁLNÍCH TECHNIK

1.1 Úvod

V současné době je většinová část produkce sladovnického ječmene využívána pro pivovarnické účely. Aby zůstal ječmen kvalitní i po sklizni, je nutné dodržovat optimální podmínky během skladování. V opačném případě může dojít k znehodnocení ječmene různými druhy patogenních plísní. Ty mohou kromě nebezpečných mykotoxinů produkovat také další nežádoucí látky, jako jsou např. hydrofobiny - proteiny způsobující přepěňování piva (primární „gushing“).

Hydrofobiny jsou malé proteiny, obsahující osm cysteinů v řetězci, které mezi sebou tvoří čtyři disulfidické můstky. Hydrofobiny jsou obecně tvořeny různými sekvencemi aminokyselin (AMK), avšak vzor 8 cysteinů je pro všechny hydrofobiny charakteristický a díky tomu je lze rozpoznat již na základě primární sekvence. Hydrofobiny se dělí na základě strukturních odlišností a rozpustnosti do dvou tříd. Hydrofobiny třídy I tvoří vysoce nerozpustné komplexy, rozpustné jen v některých silných kyselinách, a naopak hydrofobiny třídy II jsou rozpustné v běžných organických rozpouštědlech, např. v ethanolu. Neobvyklá je také celková struktura hydrofobinů. Díky uspořádání většiny hydrofobních a hydrofilních aminokyselin na opačných koncích molekuly vykazuje molekula hydrofobinů amfifilní charakter. Struktura hydrofobinů udává zároveň jejich celkový charakter a vlastnosti (povrchová aktivita, schopnost samoshluknutí, schopnost přilnout na povrchy a tím měnit jejich charakter). Hydrofobiny hrají významnou roli ve vývoji a růstu vláknitých hub, jelikož umožňují pronikání hyf do různých prostředí a šíření spor do okolí.

Během posledního desetiletí přinesl výzkum lepší pochopení role hydrofobinů při autoagregačních procesech na hydrofilních/hydrofobních rozhraních. V důsledku toho bylo navrženo široké spektrum významných vědeckých a technologických aplikací. Dodnes bohužel nejsou hydrofobiny komerčně dostupné ve větším měřítku, přestože jejich dostupnost by mohla vést ke snazším a rychlejším analýzám, charakterizaci apod.

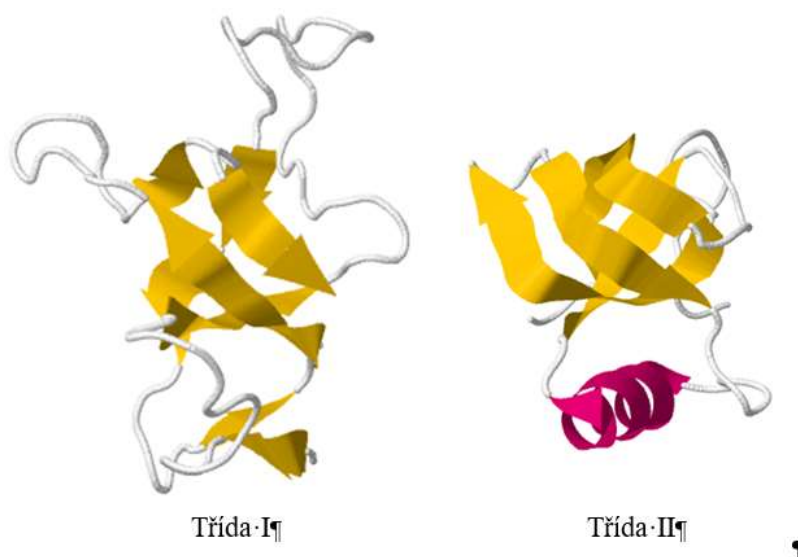
1.2 Charakterizace

Hydrofobiny jsou malé, povrchově aktivní proteiny produkované vláknitými houbami. Během vývoje a růstu vláknitých hub plní hydrofobiny široké spektrum funkcí. Umožňují například rozrůstání hyf v podhoubí, pronikání reprodukčních struktur z média, a dále zprostředkovávají přichycení hyf k hydrofobním povrchům. Tyto procesy jsou stěžejní v počátečních krocích patogeneze hub. Pro průběh patogeneze je důležité přilnutí houbového vlákna k hydrofobnímu povrchu hostitele a poté dochází k započetí samotné penetrace a infekce [1,2]. Konkrétně u plísně *Schizophyllum commune* je tvorba vzdušných hyf doprovázena expresí genu SC3 v myceliu. Tato skutečnost vede v průběhu růstu vzdušných hyf k vylučování monomerního hydrofobinu SC3 do média, který později agreguje na rozhraní voda/vzduch do podoby amfipatické membrány. Na rozdíl od většiny povrchově aktivních látek, vykazují hydrofobiny povrchovou aktivitu na základě konformačních změn, a nejsou tedy toxické, ani nenarušují buněčné membrány [3-5].

1.3 Rozdělení a struktura

V podstatě již od dob jejich objevení, jsou hydrofobiny rozděleny do dvou tříd, na základě porovnávání vlastností, sekvencí a výskytu jednotlivých aminokyselin. Přes poměrně nízkou sekvenční podobnost I. a II. třídy je pro obě skupiny společné prostorové uspořádání hydrofobních, hydrofilních a neutrálních aminokyselin. Typickým a nezaměnitelným znakem je zastoupení osmi cysteinů v řetězci hydrofobinů. Sousedící cysteiny 2,3 a 6,7 spolu tvoří páry. V řetězci se střídají samostatné cysteiny a páry (C1, C2–C3, C4, C5, C6–C7, C8) a tento jev je natolik specifický, že díky němu mohou být hydrofobiny rozeznány již dle primární sekvence. Hydrofobiny dále obsahují disulfidické můstky mezi cysteiny 1-6, 2-5, 3-4 a 7-8. Disulfidické můstky, propojující cysteiny, tvoří vysoce kompaktní strukturu, která ve velké míře ovlivňuje jejich vlastnosti [6-8].

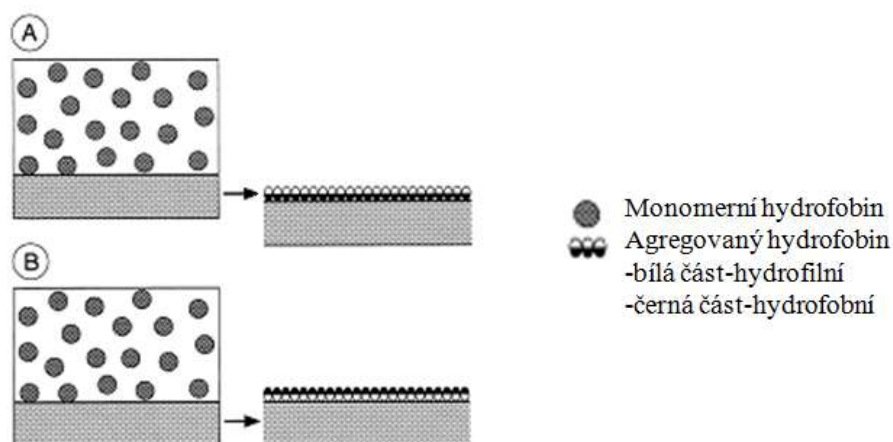
Řetězec hydrofobinů třídy I obsahuje přibližně 100-125 aminokyselin. Jejich struktura je tvořena z centrálního β -barelu, který je složen ze čtyř β -vláken. Molekula dále obsahuje dvouvláknový β -list a dvě neuspořádané smyčky. Řetězec hydrofobinů třídy II obsahuje 50-100 aminokyselin. V porovnání s hydrofobiny I. třídy je v jejich struktuře kromě cysteinových můstků jediným společným znakem centrální β -barel. Dvě vlákna β -listu jsou nahrazena α -šroubovicí ve stejné oblasti a dvě neuspořádané smyčky zcela chybí (obr.1) [9].



Obr. 1 Struktura hydrofobinů I. a II. třídy [10].

1.4 Vlastnosti, funkce a význam

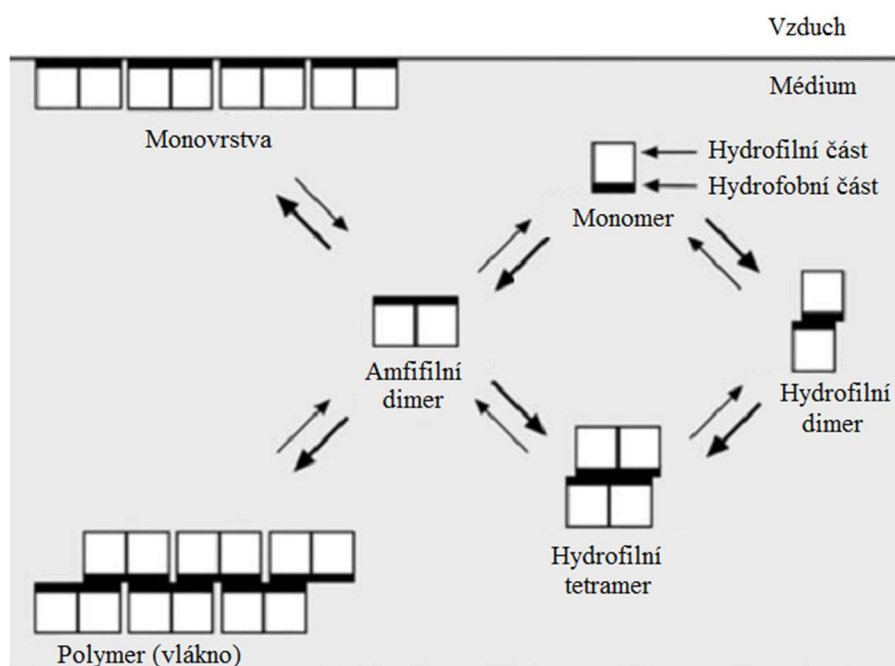
Hydrofobiny disponují množstvím zajímavých fyzikálně-chemických vlastností, které úzce souvisí s jejich funkcemi. Mezi nejvýznamnější patří povrchová aktivita. Hydrofobiny výrazně snižují povrchovou aktivitu vody a tím umožňují plísním procházet mezi různými prostředími, např. voda-vzduch. Pro hydrofobiny je dále charakteristická amfifilní povaha molekuly, díky které jsou schopny obalit hydrofobní nebo hydrofilní pevný povrch a tím naprosto změnit jeho charakter. Ponoříme-li desku z hydrofobního materiálu (teflon) do vodného roztoku obsahující hydrofobiny I. třídy, dojde k vytvoření vrstvy hydrofobinů, která zaručí smáčivý povrch desky (obr. 2A). Dojde-li naopak ke kontaktu s hydrofilním povrchem (sklo, filtrační papír), molekuly hydrofobinu přilnou na daný povrch svou hydrofilní částí a změní charakter materiálu na hydrofobní (obr. 2B) [11].



Obr. 2 Schopnost hydrofobinů změnit charakter různých povrchů na základě změny uspořádání molekuly [1].

K agregacím molekul hydrofobinů může docházet v roztoku i samovolně. Spojením dvou monomerních molekul vznikají dva druhy dimerů, amfifilní a hydrofilní (obr. 3). Amfifilní dimery jsou tvořeny spojením dvou monomerních jednotek. Jejich hydrofobní i hydrofilní části zůstávají na povrchu molekuly. Tyto dimery se mohou dále spojovat do podoby vlákna. V případě, kdy dojde ke kontaktu amfifilních dimerů s rozhraním voda/vzduch, mohou vytvářet jednovrstevné filmy (obr. 3). Další variantou jsou hydrofilní dimery, které vznikají spojením hydrofobních částí monomerních molekul. Celkově tedy vykazují hydrofilní charakter. Oba typy dimerů (amfifilní a hydrofilní) mohou tvořit tetramerové jednotky (obr. 3), které jsou vysoce stabilní a tolerují vysoké teploty i změny pH. Strukturu hydrofobinů je možné ovlivnit pomocí různých chemikálií. Například při použití 65% ethanolu dojde k rozdělení tetramerů na monomery (aniž by byl rozvinut řetězec) a naopak přidavek solí vyvolává vznik větších agregátů. Přesto počet jednotek, které tvoří agregát, neovlivňuje povrchovou aktivitu [7,12,13].

Díky výše popsaným vlastnostem umožňují hydrofobiny šíření spor do prostředí. Spory jsou převrstveny tenkým filmem hydrofobinů, který zajistí jejich hydrofobicitu a tím i voděodolnost, čímž je usnadněno rozptýlení do ovzduší [11,14]. Podobně jako zastávají hydrofobiny rozmanité role v průběhu života vláknitých hub, mohou mít i další potenciální funkce v pozemních ekosystémech. Například byla navržena hypotéza, že hydrofobní skvrny v půdách, které zabraňují pronikání vody, mohou být způsobeny přítomností hydrofobinů [2].



Obr. 3 Chování hydrofobinů v roztoku [12].

1.5 Současné metody izolace a analýzy

V minulosti bylo popsáno několik izolačních technik pro obě skupiny hydrofobinů [15-18]. Přestože hydrofobiny vykazují spoustu společných znaků, způsob jejich izolace je obecně volen na základě jejich zařazení do tříd.

1.5.1 Izolace hydrofobinů I. třídy

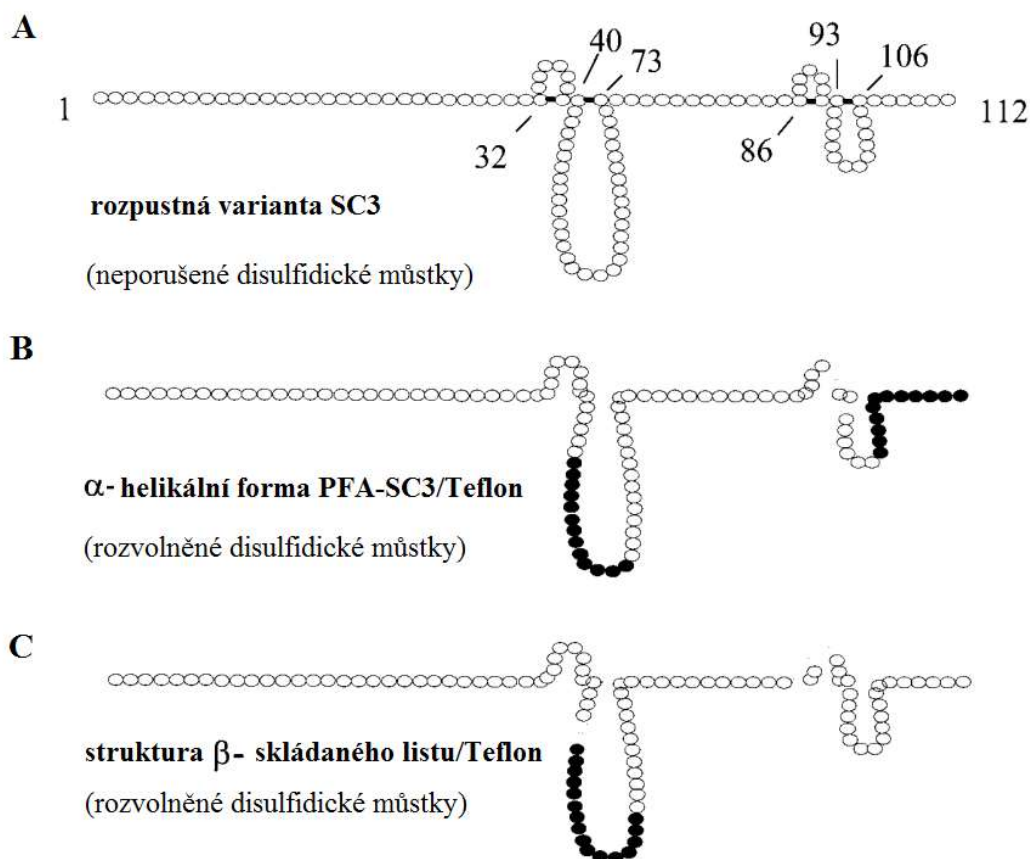
Hydrofobiny I. třídy se vyznačují extrémní odolností. Jejich extrakce z buněčných stěn vyžaduje silná činidla, jako jsou kyseliny. Díky jejich vlastnostem odolávají i např. 2% dodecylsíranu sodnému (SDS) za horka. Tohoto chování lze s výhodou využít v procesu extrakce [19]. Hydrofobiny I. třídy mohou být produkovány volně do roztoku [20,21] nebo jako součást buněčných stěn plísni [4], kde je pak nutné nejprve buněčné stěny mechanicky rozrušit [22]. Jako první extrakční činidlo lze použít 2% SDS za horka [23], který odstraní nežádoucí proteiny, včetně hydrofobinů II. třídy. Následuje extrakce 98% kyselinou mravenčí (FA) [21] nebo koncentrovanou kyselinou trifluoroctovou (TFA) [23], které rozpustí i hydrofobiny I. třídy. Po odpaření kyseliny jsou díky změně konformace hydrofobiny ve vodě rozpustné. Přestože jsou výše popsané metody funkční, nebyla dosud popsána dostatečně selektivní a účinná technika pro specifickou izolaci hydrofobinů třídy I.

1.5.2 Izolace hydrofobinů II. třídy

Pro izolaci hydrofobinů II. třídy jsou, ve srovnání s třídou I, dostačující podstatně mírnější činidla, jako např. surfaktanty. Pro izolaci hydrofobinů II. třídy se také využívá jejich vlastností – konkrétně schopnosti agregovat na různých typech rozhraní. Takto lze izolovat hydrofobiny z vodných dvoufázových systémů [24] s využitím neiontových surfaktantů, jako jsou Berol 325 [14], Berol 523, Berol 266, Triton X-114 [17] nebo SDS [25]. V těchto studiích byly hydrofobiny po extrakci přečištěny ještě pomocí hydrofobní interakční chromatografie [25] nebo preparativní vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií v systémech s obrácenými fázemi (RP-HPLC) [17]. Jiný přístup popisuje separační techniku s využitím CO₂ jako rozprašovacího plynu pro extrakci hydrofobinu HFBII (třída II) [26]. Tato studie proběhla v rámci řešení problematiky „gushingu“ piva, který mohou hydrofobiny zapříčinit. Bylo zjištěno, že hydrofobiny silně interagují s CO₂ a tohoto jevu bylo využito při izolaci. Kultivační médium *Trichoderma reesei*, obsahující hydrofobiny, bylo provzdušněno ve frakcionátoru pomocí CO₂ a vzniklá pěna byla přečištěna kapalinovou chromatografií. Žádný vzorek po provzdušnění a odebrání pěny již nevykazoval sklony ke „gushingu“ [16].

1.5.3 Strukturální modifikace před analýzou

Disulfidické můstky zastávají ve strukturální stabilitě hydrofobinů klíčovou roli (viz kapitola 1.3.). Proto je pro následnou proteomickou analýzu hydrofobinů nezbytné účinné rozrušení disulfidických můstků [8]. Existuje několik možností, jak lze disulfidické můstky odstranit, například redukce dithiothreitem (DTT) v přítomnosti guanidínhydrochloridu [8] s následnou stabilizací cysteinových jednotek jodacetamidem (IAA) nebo kyselinou jodoctovou. Další variantou je oxidace SH skupin postranních řetězců (obsažených u aminokyselin cysteinů a methioninu) pomocí kyseliny permravenčí (PFA) [27]. Po oxidaci jsou SH skupiny nahrazeny skupinami SO_3H ve struktuře cysteinů a skupinami SO_2CH_3 ve struktuře methioninu. Oxidace zajistí rozvolnění disulfidických můstků (obr. 4), tím usnadní přístup pro štěpící enzymy [23,27] a zároveň jsou do postranních řetězců vloženy hydrofilní skupiny, které snižují hydrofobicitu.



Obr. 4 Strukturální změny hydrofobinu SC3 před a po oxidaci PFA. A) Rozpustná forma hydrofobinu SC3 s neporušenými disulfidickými můstky. B) α -helikální forma SC3 po oxidaci PFA s rozvolněnými disulfidickými můstky při kontaktu s teflonem. C) PFA oxidovaný SC3 ve formě β -skládaného listu při kontaktu s teflonem. Černě označeny aminokyseliny, které byly modifikované deuteriem [27].

1.5.4 Enzymatické štěpení

Pro proteomické studium hydrofobinů hraje klíčovou roli účinné štěpení, ať už enzymatické nebo chemické. Tento proces zpravidla vyžaduje rozpuštění [28], disociaci proteinových komplexů a denaturaci proteinové struktury. Aplikace různých kompatibilních detergentů je nezbytná k usnadnění štěpení proteinů, nerozpustných v běžných pufovacích roztocích. K tomuto účelu je dostupný například komerční surfaktant RapiGest SF (Waters, USA), deoxycholát sodný [29] nebo SDS [30]. SDS ale významně inhibuje aktivitu proteáz nebo ke štěpení vůbec nedochází [25]. Deoxycholát sodný však vykazuje několik výhod pro proteomickou analýzu. Výhodou je zejména cenová dostupnost, zvýšení účinnosti proteolytického štěpení (především u hydrofobních proteinů) a možnost jeho snadného odstranění z roztoku po okyselení. [29].

Pro enzymatické štěpení hydrofobinu HFBI (třídy II) již byly testovány různé enzymy včetně proteinázy K, chymotrypsinu, papainu a pepsinu [25]. Pepsin a papain byly zcela neúčinné, zatímco chymotrypsin a proteinasa K byly účinné pouze částečně [25]. Pro štěpení hydrofobinu SC3 (třída I) byl použit pepsin s následnou analýzou pomocí hmotností spektrometrie (MS). Touto metodou byly detekovány pouze dva specifické peptidy [2].

1.5.5 Analýza

Hydrofobiny mohou být analyzovány nejrůznějšími technikami v závislosti na tom, co je očekáváno od výsledku analýz. Ke studiu terciární (3D) struktury jsou používány zejména dvě techniky: rentgenová krystalografie [6,31] a nukleární magnetická rezonance (NMR) [2, 14,31-33]. Další technikou využívanou v proteomice je mikroskopie atomárních sil [2], umožňující studium mechanických vlastností proteinů nebo určení lokální struktury buněčných membrán.

Pro identifikaci hydrofobinů se v současnosti nejvíce používá hmotnostní spektrometrie (MS). Lze volit z několika typů ionizací a analyzátorů, ale nejvyužívanější je kombinace ionizace a desorpce laserem za účasti matrice v kombinaci s analyzátozem doby letu (MALDI-TOF) [27,29,34], která umožňuje analýzu proteinů v intaktní formě. Pro analýzu primární sekvence pomocí hmotnostní spektrometrie je vhodné hydrofobiny nejprve účinně a specificky naštěpit, tento krok však dodnes činí značné potíže. Další alternativou analýzy je využití spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS), která poskytuje výhodu současné separace a identifikace [35]. Pokud se jedná o analýzu hydrofobinů ze směsi, případně ověření účinnosti štěpení, je velmi účinným nástrojem elektroforetická separace, konkrétně elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) [23,29].

1.6 Hydrofobin SC3

1.6.1 Struktura

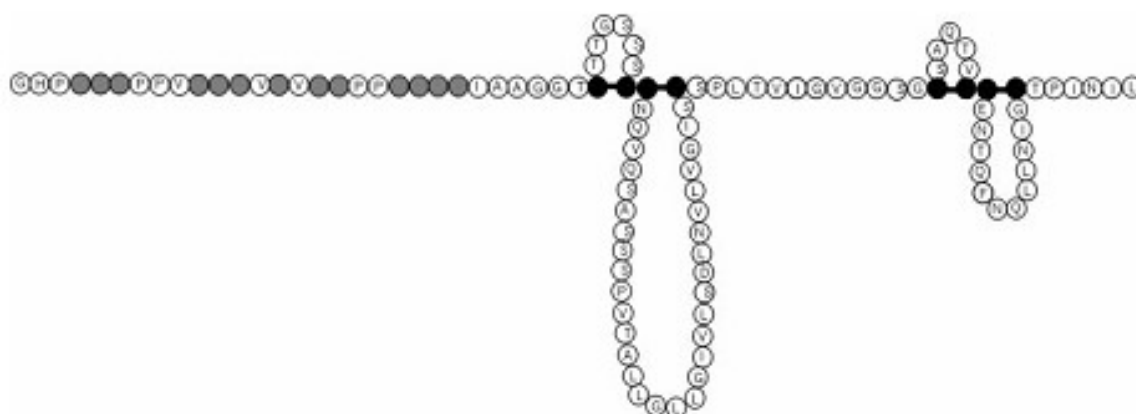
Hydrofobin SC3, produkovaný plísní *Schizophyllum commune*, je nejlépe charakterizovaným hydrofobinem I. třídy. Jeho řetězec je složen ze dvou hlavních částí: signálního řetězce (1.-24. AMK) a hlavního řetězce (25.-136. AMK). Celý řetězec hydrofobinu SC3 obsahuje celkem 136 aminokyselin, včetně osmi charakteristických cysteinů (obr. 5).

10	20	30	40	50
MFARLPVVFL	YAFVAFGALV	AALPGGHPGT	TTPPVTTTVT	VTPPSTTTI
60	70	80	90	100
AAGGTC	TTGS	LSCCNQVQSA	SSSPVTALLG	LLGIVLSDLN
110	120	130		
TVIGVGGSGC	SAQTVCCENT	QFENGLINIGC	TPINIL	

Obr. 5 Aminokyselinová sekvence hydrofobinu SC3 s vyznačenými cysteiny [36].

Stejně jako ostatní hydrofobiny, obsahuje hydrofobin SC3 v sekvenci čtyři disulfidické můstky, které se vyskytují na pozicích 56-63, 64-97, 110-116, 117-130. Díky disulfidickým můstkům vznikají v řetězci smyčky, obsahující v případě hydrofobinu SC3 6, 32, 5 a 12 aminokyselin (obr. 6). Molekulová hmotnost celého řetězce odpovídá 13 431 Da [8, 27,36,37].

Hydrofobin SC3 je řazen mezi glykoproteiny. Obsahuje O-vázané manózoové jednotky, které jsou připojeny k dvanácti threoninům a jednomu serinu, předcházející prvnímu cysteinu v dlouhé sekvenci N-konce (obr. 6). Tento úsek je pravděpodobně vystaven na hydrofilní části agregovaného SC3 a udává hydrofilní povahu celé této části molekuly [8,27,37].

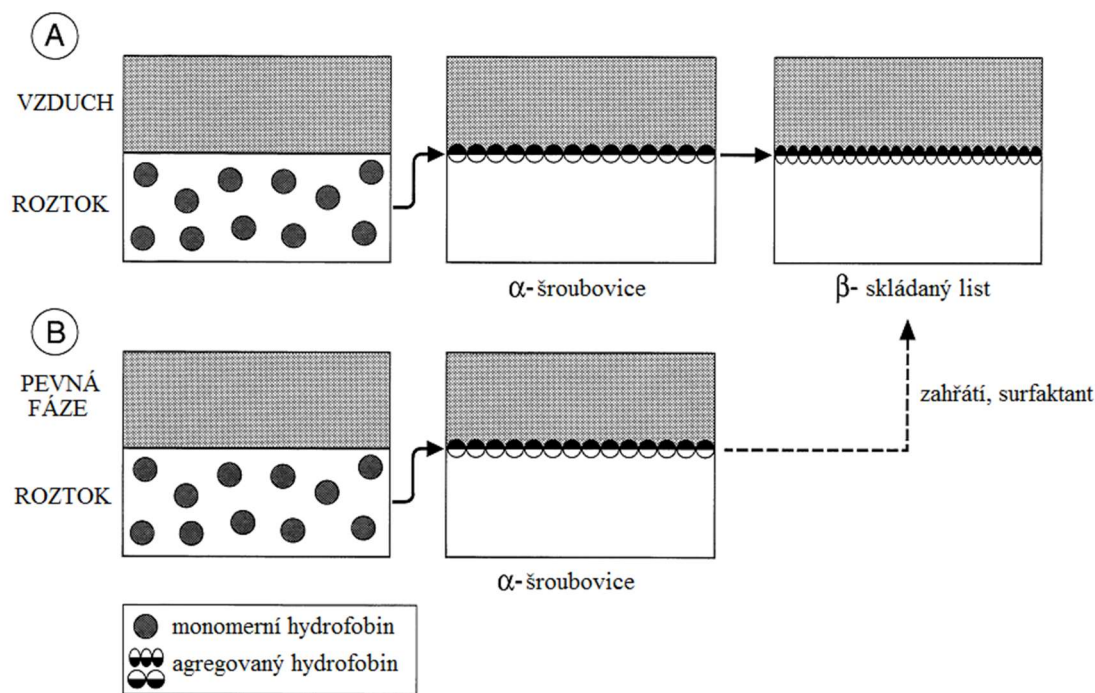


Obr. 6 Aminokyselinová sekvence hydrofobinu SC3 a jeho předpokládané disulfidické můstky. Černě označeno typické rozmístění cysteinů, šedou barvou místa glykosylace manózami [8].

1.6.2 Vlastnosti

Hydrofobin SC3, stejně jako ostatní hydrofobiny tvoří na rozhraních amfifilní membránu. Jedna strana membrány, která je orientována směrem do roztoku, je vysoce hydrofilní s kontaktními úhly mezi 22° a 63° a zároveň druhá strana, vystavená hydrofobnímu povrchu (teflon, parafín), je naopak velmi hydrofobní s kontaktními úhly 110° . Tato membrána je vysoce nerozpustná, dokonce je schopná odolat i 2% SDS o teplotě 100°C . Membránu lze rozpustit pouze silnými činidly, jako jsou koncentrovaná TFA nebo koncentrovaná FA. Pro srovnání membrána hydrofobinů druhé třídy je snadno rozpustná v 60% ethanolu nebo v 2% SDS [3,4,23].

Hydrofobin SC3 lze nalézt ve třech různých konformacích, jak bylo potvrzeno metodou cirkulární dichroické spektroskopie a měřením infračervených spekter reflexními technikami [2]. Po rozpuštění shluknutého hydrofobinu SC3 kyselinou trifluoroctovou, vysušení a resuspendování v deionizované vodě nebo pufru, přechází hydrofobin do rozpustné varianty (obr. 7). Pomocí výše zmiňovaných technik bylo zjištěno, že hydrofobin SC3 tvoří stabilní meziprodukt struktury α -šroubovice (obr. 7), který může snadno přilnout k pevným hydrofobním povrchům, jako například teflon. Tento meziprodukt po přidání detergentu a zahřátí mění svoji strukturu na β -skládaný list (obr. 7). K této změně však dochází na rozhraní vzduch/kapalina samovolně [27,38].



Obr. 7 Změna struktury hydrofobinu SC3 v závislosti na tom, s jakým prostředím přichází do kontaktu [1,5].

1.7 Experimentální část

1.7.1 Standardy a ostatní chemikálie

Standardy proteinů (hydrofobin SC3, bromelain, hovězí sérový albumin, konkanavalin A, karbonická anhydráza I, α -kasein, β -kasein, myoglobin, cytochrom C a albumin), proteolytické enzymy (chymotrypsin, thermolysin a pepsin), dithiothreitol, iodoacetamid, acetonitril (ACN), kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), Tris(2-carboxyethyl)phosphin hydrochlorid (TCEP), diammonium hydrogencitrát (DAHC) a polytetrafluorethylenové (PTFE) mikročástice (průměr 12 a 35 μm) byly zakoupeny od Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). TFA a deoxycholát sodný byly zakoupeny od firmy Fluka (Buchs, Switzerland). Guanidin hydrochlorid byl zakoupen od Acros Organics (New Jersey, USA). Kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA) a kyselina trans-3,5-dimethoxy-4-hydroxysinapová (SA) byly získány od LaserBio Labs (Sophia-Antipolis, France) a použity jako matrice pro MALDI. Tricinový pufr byl zakoupen od firmy Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

1.7.2 Přístroje a zařízení

Deionizovaná voda byla připravena filtračním systémem TKA Smart2Pure (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Vzorky byly navažovány na analytických vahách ABT 220-5DM (Kern, Balingen-Frommern, Německo). K odstředění vzorků byla použita centrifuga Eppendorf Minispin (Eppendorf, Hamburg, Německo). MS analýza byla provedena pomocí MALDI v kombinaci s analyzátozem LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) a také na přístroji 4800 MALDI-TOF/TOF Analyzer (APPLIED BIOSYSTEMS, Framingham, USA). Elektroforetická separace byla prováděna v aparatuře pro diskontinuální elektroforézu Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Snímky gelů byly zhotoveny stanicí ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a vyhodnoceny pomocí softwaru Image Lab (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

1.7.3 Příprava hydrofobinu SC3

Do skleněné vialky bylo naváženo 100 μg hydrofobinu SC3, ke kterému bylo napipetováno 20 μl koncentrované TFA a rozděleno na 2 alikvoty. Vialky byly ponechány v digestoři do úplného odpaření kyseliny. Rychlost odpaření lze podpořit mírným zahřátím. Celkové odpaření bylo ověřováno navlhčeným lakmusovým papírkem nad hrdlem vialky.

1.7.4 Redukce disulfidických můstků, alkylace

Po ošetření hydrofobinu pomocí TFA a následném vysušení byl první alikvot hydrofobinu SC3 resuspendován v 20 μ l pufru A (75 mM Tris-HCl pufr (pH 8,0), 20 mM DTT, 5,4 M guanidin hydrochlorid s následným přidáním 2,2 μ l 50 mM TCEP). Druhý alikvot byl resuspendován v 20 μ l pufru B (75 mM Tris-HCl pufr, pH 8,0, 20 mM DTT s následným přidáním 2 μ l 10% deoxycholátu sodného a 2,2 μ l 50 mM TCEP). Oba vzorky byly poté inkubovány 60 minut při 80 °C. Po uplynutí inkubace bylo do obou reakčních směsí přidáno po 2 μ l roztoku 400 mM IAA a vialky byly inkubovány po dobu 30 minut při pokojové teplotě bez přístupu světla. Reakce s IAA byla zastavena přidáním 2 μ l 200 mM DTT a směsi byly inkubovány dalších 30 minut při pokojové teplotě.

1.7.5 Proteolytické štěpení hydrofobinu SC3

Chymotryptické štěpení následovalo ihned po redukci disulfidických můstků a alkykaci pomocí IAA. Ke každé směsi byl přidán roztok chymotrypsinu, aby výsledný poměr chymotrypsin:hydrofobin činil 1:50. Po 16,5 hod inkubace při 37 °C byla reakce zastavena 5 μ l 20% TFA.

1.7.6 Purifikace a separace peptidů před MALDI-Orbitrap MS analýzou

Za účelem purifikace peptidů byla vytvořena kolona z fluorovaného ethylen-propylenu, do kterého byla vsazena kapilára z taveného oxidu křemičitého (30 mm x 50 μ m), naplněná Aeris XB C8 částicemi (3,6 μ m Widepore, Phenomenex, Torrance, CA, USA). Kolonka byla nejprve promyta 20 μ l 80% ACN/0,1% TFA (v/v) a poté ekvilibrována 20 μ l 2% ACN/0,1% TFA (v/v) pomocí Hamiltonovy stříkačky. Po ekvilibraci byl do kolonky pomocí stejné stříkačky nadávkován vzorek naštěpeného hydrofobinu SC3, který zůstane zachycen na koloně. Gradient mobilní fáze je vytvořen postupným nasátím roztoků o jednotlivých koncentracích do stříkačky (v opačném pořadí, než bude probíhat gradient) 46%; 34%; 26%; 18%; 10%; 2% ACN/0,1% TFA (v/v). Takto vytvořený nelineární gradient mobilní fáze je do systému postupně dávkován a tím peptidy hydrofobinu SC3 postupně eluovány a dávkovány přibližně po 0,75 μ l na terčíky MALDI destičky, předem pokryté CHCA matricí (2,5 mg/ml v 60% ACN/0,1% TFA/2 mM DAHC). Všechny terčíky byly po vysušení překryty 0,7 μ l CHCA matrice a tím rekrystalizovány. Pro MS analýzu peptidové směsi byl použit MALDI LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), pracující při snímání kladných iontů, s rozlišením 60 000 (plná šířka v polovině maxima při $m/z = 400$), ve spojení s pulzním dusíkovým laserem (337 nm).

1.7.7 Příprava hydrofobinu SC3 pro analýzu MALDI-TOF/TOF

Neštěpený hydrofobin SC3 byl nanesen v objemu 0,75 μl přímo na MALDI destičku. Těsně před zaschnutím byl vzorek převrstvený stejným objemem SA matrice (10 mg/ml 40% ACN/0,1% TFA). Hydrofobin SC3 byl analyzován také v intaktní formě na přístroji 4800 MALDI-TOF/TOF Analyzer (APPLIED BIOSYSTEMS, Framingham, MA, USA) v lineárním módu při snímání kladných iontů.

1.7.8 Izolace hydrofobinu SC3 z modelové směsi proteinů pomocí PTFE částic

Do GELoader špičky byl vložen disk C8 fáze (3MTM EmporeTM C8 Extraction Disks, Fisher Scientific, Waltham, USA), na který byla aplikována vrstva PTFE mikročástic (průměr 35 μm , Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) o objemu přibližně 5 μl . Nosič byl promyt 30 μl ACN a poté 30 μl deionizované vody. Modelová směs proteinů, sloužící jako vzorek, byla připravena dle tabulky 1. Postup izolace byl následující: na kolonku bylo aplikováno 45 μl standardního směsného vzorku proteinů (zředěný 1:1 deionizovanou vodou). Vzorek, který protekl, byl nanášen ještě dvakrát. Nosič byl promyt 30 μl deionizované vody a následovalo postupné promývání kolonky za účelem separace proteinů. První krok byl proveden 3x 20 μl roztoku 80% ACN/0,1% TFA (v/v) s následným promytím nosiče 30 μl deionizované vody. Druhý krok obnášel 20 μl 1% roztoku SDS a promytí nosiče 3x 20 μl deionizované vody. Na závěr byl proveden třetí promývací krok 20 μl FA eluující silně vázaný hydrofobin SC3.

Tabulka 1 Příprava modelové směsi pro izolaci na teflonových částicích.

Protein	Koncentrace [mg/ml]	Objem [μl]
Bromelain	10	1,5
Cytochrom C	5	3
Hovězí sérový albumin	5	3
Hydrofobin SC3	1	15
Karbonická anhydráza	5	3
α -kasein	5	3
β -kasein	5	3
Konkanavalin A	5	3
Myoglobin	5	3
Ovalbumin	5	3

1.7.9 Tris-tricinová SDS-PAGE

Všechny frakce získané během izolace byly smíchány s tricinovým vzorkovým pufrem v poměru 1:1 a zahřáty na 100 °C po dobu 3 min. Tyto vzorky byly poté nadávkovány do 0,75 mm Tris-tricinového separačního gelu (16,5 % T, 3 % C w/v) [39]. Vlastní elektroforetické dělení probíhalo v elektrodové nádobě v prostředí elektrodového pufru, za konstantního napětí 30 V s maximálním průchodem proudu 30 mA na jeden gel. Po 30 minutách, kdy vzorky doputovaly na rozhraní zaostřovacího a dělicího gelu, byla aparatura umístěna do chladničky (4 °C) a napětí bylo zvýšeno na 100 V (bez změny nastavení proudu). Po 2-3 hodinách, kdy čelo separovaných látek (značené bromfenolovou modří) doputovalo téměř na úroveň spodního okraje skel, byla separace ukončena.

Získané gely byly promyty destilovanou vodou a poté fixovány v Petriho miskách přes noc při 4 °C ve fixačním roztoku (5% kyselina octová/50% ethanol). Po 30 min rehydratace v destilované vodě byl gel inkubován v 10% glutaraldehydu při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Následovalo promývání destilovanou vodou 6 x 10 minut. Po promytí byly gely inkubovány 15 min v roztoku amoniakálního stříbra [40] a opět promyty destilovanou vodou. Na závěr byly gely inkubovány ve vyvolávacím roztoku (0,05% kyselina citrónová/0,04% formaldehyd) do zřetelného vyvolání proužků a přeneseny do ustalovacího roztoku (5% kyselina octová).

Po obarvení byly gely vloženy do stanice ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a byla zaznamenána jejich fotografie. Získaný snímek byl vyhodnocen pomocí programu ImageLab (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Molekulová hmotnost vzorků byla vyhodnocena porovnáním se standardem obsahující proteiny o molekulových hmotnostech v rozsahu 10-250 kDa.

1.8 Výsledky a diskuze

1.8.1 Preanalytická příprava

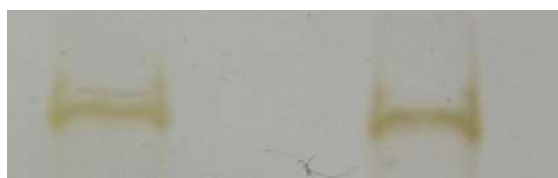
Nejprve bylo nutné zaměřit pozornost na preanalytickou fázi, jelikož chování hydrofobinů je ve srovnání s jinými proteiny velmi specifické. Jejich nestandardní chování je zapříčiněno zejména obsahem čtyř disulfidických můstků v molekule a celkovou strukturní konformací molekuly. Hydrofobin SC3, který byl pro práci zvolen jako modelový, náleží do třídy I a z tohoto důvodu jej nebylo možné rozpustit ve vodě. Tuto komplikaci lze řešit ošetřením pomocí TFA. Tímto krokem změnil hydrofobin SC3 svou konformaci na α -helix a stává se ve vodě rozpustným. Hydrofobin SC3 zároveň silně interaguje s plastovými

materiály. Při kontaktu s nimi mění svoji konformaci do podoby β -skládaného listu. Tato konformace je pro následnou manipulaci nežádoucí z toho důvodu, že hydrofobní část molekuly je tak vystavena směrem do roztoku a stává se opět ve vodě nerozpustnou. Proto bylo nutné pracovat po celou dobu ve skleněných vialkách.

Enormní hydrofobicita, kterou jsou hydrofobiny charakteristické, komplikovala nejen manipulaci, ale také silně ovlivňovala následné analýzy. Na obr. 8 je zobrazen gel po nadávkování vzorků před zahájením elektroforetické separace. V jamce nejvíce vpravo lze pozorovat, jak hydrofobin během několika minut migruje ke stěně jamky. Tímto chováním byla ovlivněna následně i samotná elektroforetická separace, kdy vzorek obsahující hydrofobin putoval v gelu opožděně a jeho molekulová hmotnost se jevila vyšší oproti teoretické. Nicméně, vyšší zdánlivá molekulová hmotnost mohla být ovlivněna i vysokým stupněm glykosylace. Zároveň byl ovlivněn také tvar proužku po separaci, kdy jeho horní okraje byly zakřiveny směrem vzhůru a spodní okraje směrem dolů (obr. 9).



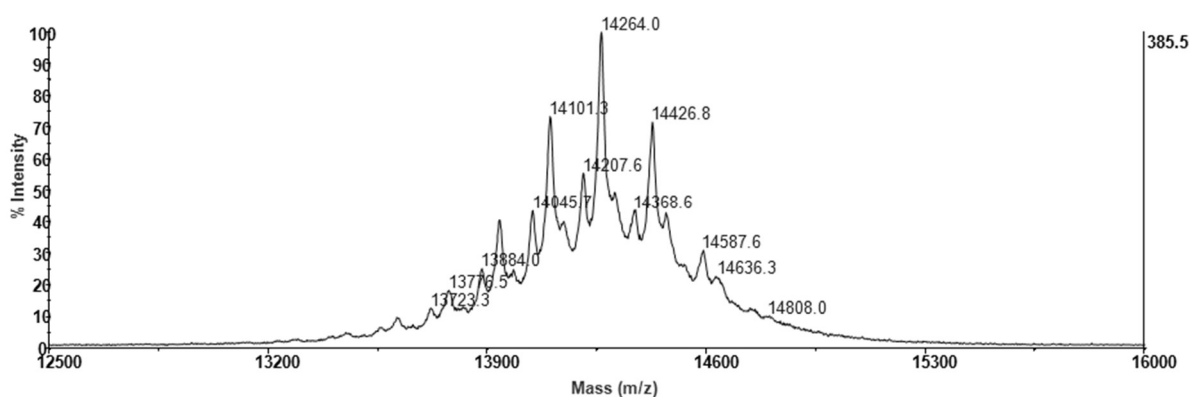
Obr. 8 Gel po aplikaci vzorků před analýzou Tris-tricin SDS-PAGE. V jamce nejvíce vpravo je obsažen hydrofobin SC3, který z důvodu vysoké hydrofobicity migruje k okraji jamky.



Obr. 9 Ukázka deformace proužku hydrofobinu SC3 po Tris-tricinové SDS-PAGE a obarvení amoniakálním stříbrem.

Jak bylo blíže popsáno v kapitole 1.6.1. hydrofobin SC3 je ve své přirozené podobě glykoprotein. Jeho řetězec může být obsahovat více než 20 O-vázaných manózových jednotek. Molekulová hmotnost proteinového řetězce hydrofobinu SC3 je 13431 Da. Molekulová hmotnost manózy je 180,156 Da. Po navázání manózy na protein dojde k odštěpení vody (18,011 Da) a molekulová hmotnost navázané části manózy tedy činí 162,145 Da. Na obr. 10 je zobrazeno hmotnostní spektrum glykosylovaného hydrofobinu SC3. Pík s nejvyšší intenzitou ve spektru $m/z = 14264,0$ odpovídá hydrofobinu SC3 s 21 navázanými manózovými

jednotkami. Další píky, které jsou ve spektru patrné, patří také hydrofobinu, ale liší se právě počtem navázaných manózových jednotek. Tato distribuce molekulových hmotností proteinu je také patrná na gelech po elektroforetické separaci (obr. 13), kdy proužek odpovídající hydrofobinu SC3 je výrazně silnější ve srovnání s ostatními proteiny.



Obr. 10 MALDI-TOF/TOF MS spektrum hydrofobinu SC3 (SA matrice, záznam kladných iontů, lineární mód, rozsah $m/z = 12500 - 16000$).

1.8.2 Redukce disulfidických můstků

Veškeré kroky protokolu proteolytického štěpení hydrofobinu SC3 byly provedeny v denaturačních podmínkách. Byly testovány dva různé detergenty: deoxycholát sodný a guanidin hydrochlorid. Guanidin hydrochlorid byl již v minulosti používán [8], z našeho pozorování však vyplývá, že vysoké množství tohoto detergentu není přímo kompatibilní s analýzou SDS-PAGE, používanou pro sledování procesu štěpení. Deoxycholát sodný se jeví jako vhodnější denaturační prostředek díky své lepší kompatibilitě s následnými analytickými kroky.

Důležitým aspektem při analýze proteinů hydrofobinu SC3 je účinné rozrušení disulfidických můstků, které udržují molekulu hydrofobinů kompaktní a vysoce odolnou. V této práci byla použita kombinace dvou redukčních činidel: DTT a TCEP (vždy za přítomnosti denaturačního činidla) při vyšší reakční teplotě (80 °C) za účelem zvýšení účinnosti redukce. Následným krokem byla alkylace redukovaných cysteinů za použití jodacetamidu, který způsobí nárůst hodnot m/z o 57,021 pro každý cystein obsažený v řetězci. Hydrofobin SC3 obsahuje osm cysteinů, byl tedy očekáván celkový nárůst m/z o 456,168. Důkazem účinné redukce a alkylace jsou identifikované peptidy s karbamidometylovou modifikací (např. (L)INIGCTPINIL(-), (F)NGLINIGCTPINIL(-), (T)PPSTTTIAAGGTcTTGSL(S) a další, všechny identifikované peptidy včetně uvedené modifikace budou popsány dále v tabulce 2).

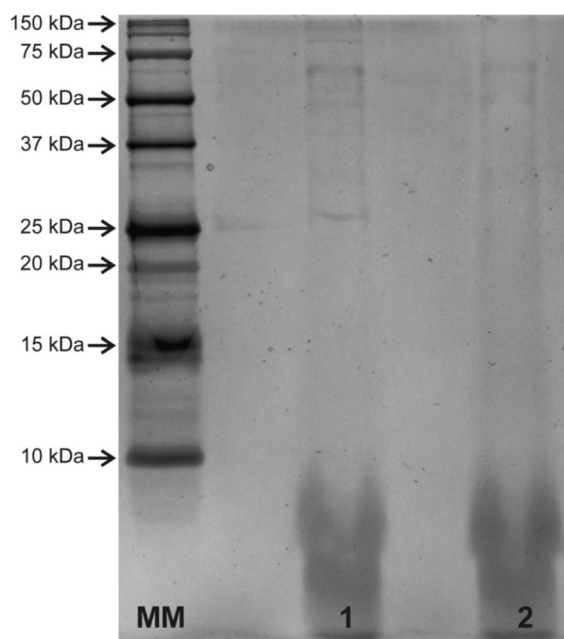
Další možností rozrušení disulfických můstků je oxidace cysteinů kyselinou permravnčí [27]. Bohužel MS spektra po oxidaci kyselinou permravnčí obsahovala po chymotryptickém štěpení pouze několik píků peptidů s velmi nízkou intenzitou. Tato skutečnost byla pravděpodobně způsobena tvorbou negativně nabitých peptidů, které nebylo možné detekovat hmotnostním spektrometrem při snímání kladných iontů.

1.8.3 Proteolytické štěpení

Dalším důležitým krokem procesu proteolytického štěpení proteinů je výběr vhodného enzymu nebo chemického činidla. Trypsin a v menší míře Lys-C a Lys-N patří v proteomice mezi nejčastěji používané enzymy [41]. Bohužel tyto enzymy nejsou vhodné pro štěpení hydrofobinu SC3 z důvodu úplné absence lysinu a argininu, a tím pádem absence štěpných míst v molekule. Z dalších enzymů, pro které byl dostatek vhodných štěpných míst v molekule hydrofobinu SC3, byly vybrány chymotrypsin, pepsin a termolyzin pro jejich dostupnost a nízkou cenu. Pokusy s pepsinem nebyly úspěšné, jelikož nebyly získány žádné specifické peptidy s odpovídající velikostí. Z toho důvodu byly další experimenty zaměřeny na použití chymotrypsinu a termolyzinu.

Účinnost štěpení hydrofobinu SC3 oběma enzymy v přítomnosti pufru B (popsaný v kap. 1.7.4) byla nejprve ověřena Tris-tricinovou SDS-PAGE analýzou. Na elektroforeogramu (obr. 11) lze v oblasti molekulových hmotností pod 10 kDa pozorovat peptidy získané proteolytickým štěpením hydrofobinu SC3, a naopak oblast výskytu neštěpeného hydrofobinu nejeví náznak o jeho přítomnosti. Z toho vyplývá, že oba enzymy (chymotrypsin i termolysin) jsou schopny hydrofobin SC3 naštěpit.

Za účelem získání bližších informací o připravené směsi peptidů byly obě směsi podrobeny MALDI-Orbitrap MS analýze. Štěpení hydrofobinu SC3 termolyzinen poskytlo pouze velmi krátké nespecifické peptidové fragmenty. Z toho důvodu nebyl termolyzin použit pro další pokusy. Chymotrypsin v porovnání s termolyzinem, produkoval výrazně specifičtější peptidy (obr. 12).



Obr. 11 Tris-tricinová SDS-PAGE analýza po proteolytickém štěpení směsi hydrofobinu SC3 s chymotrypsinem (1) a termolysinem (2). Barvení amoniakálním stříbrem. Jako MM je označen standard proteinů s distribucí molekulových hmotností v rozsahu 10–250 kDa.

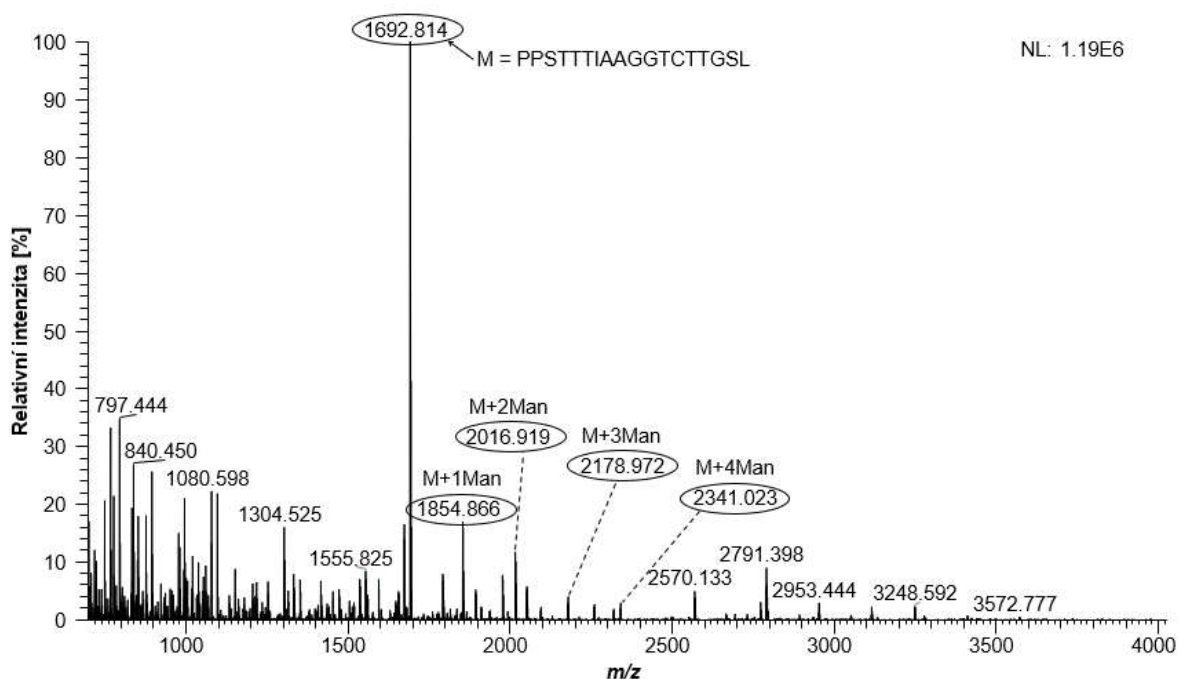
1.8.4 Odsolení a separace peptidů před MS analýzou

Pro získání podrobnějších informací o získaných peptidech byla peptidová směs po chymotryptickém štěpení separována kapalinovou chromatografií v systémech s obrácenými fázemi (RP-LC) s využitím stacionární fáze C8 [42,43]. Tato technika jednoduché separace pomocí laboratorně zhotovené mikrokolony s nelineárním gradientem acetonitrilu umožnila odsolení a separaci peptidů do 24 frakcí. Díky tomu byla výrazně usnadněna následná MS analýza a identifikace jednotlivých peptidů.

1.8.5 MALDI-Orbitrap MS analýza

Hmotnostní spektrum vybrané frakce (obr. 12) obsahuje nejen signál peptidu (T)PPSTTTIAAGGTCTTGSL(S), ale také signál jeho glykosylovaných forem, obsahující až čtyři manózoové jednotky, které jsou k němu připojeny. V rámci MALDI-Orbitrap MS analýzy bylo pozorováno neobvyklé množství sodných a draselných aduktů, které mohou mít vztah ke specifické aminokyselinové sekvenci hydrofobinu SC3. Na základě dat získaných z MS analýzy bylo identifikováno sedm specifických peptidů pocházejících z molekuly hydrofobinu SC3 s pokrytím sekvence 67 %. Analýza MS/MS provedená s využitím MALDI-LIT-Orbitrap poskytla další údaje, které byly zpracovány pomocí programu Proteome Discoverer. Tři peptidy z hydrofobinu SC3 byly úspěšně identifikovány vyhledáváním v proteinové databázi SwissProt

pomocí semispecifického chymotryptického nastavení a SEQUEST HT jako vyhledávače. Podrobné vyhledávání databáze malých kontaminantů obsahující sekvenci hydrofobinu SC3 poskytl další identifikovaný peptid (tabulka 2). Dva peptidy (L)LGLLGIVL(S) a (F)NGLINIGCTPINIL(-) byly společné pro oba identifikační přístupy. Analýza MS/MS dat tak rozšířila pokrytí sekvence proteinů na 83 % a analyzované peptidy pokrývají 93 ze 112 aminokyselin hlavního řetězce hydrofobinu SC3. Tento přístup umožňuje zvýšení proteinové sekvence pokrytí, potvrzení identity zjištěných peptidů a lepší analýzu posttranslačních modifikací hydrofobinu SC3.



Obr. 12 MALDI-LIT/Orbitrap spektrum peptidové směsi hydrofobinu SC3 po štěpení chymotrypsinem a přečištění pomocí C8 mikrokolony metodou RP-LC. Označený pík o $m/z = 1692,814$ odpovídá peptidu PPSTTTIAAGGTCTTGSL. Zároveň byly pozorovány glykosylované formy peptidu obsahující až čtyři manózoové jednotky. (CHCA matrice, záznam kladných iontů, rozsah $m/z = 700-4000$).

Tabulka 2 Identifikované peptidy hydrofobinu SC3 po enzymatickém štěpení chymotrypsinem. MS a MS/MS data měřená za použití MALDI-Orbitrap MS po RP-LC separaci peptidové směsi na C8 stacionární fázi. MS data byla zpracována pomocí vyhledávacího programu MS-Fit v 5.10.19. Údaje získané z MS/MS byly analyzovány pomocí programu Proteome Discoverer 1.4. Jako vyhledávací databáze byla použita SwissProt. Peptidy se současnou hodnotou XCorr byly úspěšně identifikovány v databázovém vyhledávání MS/MS.

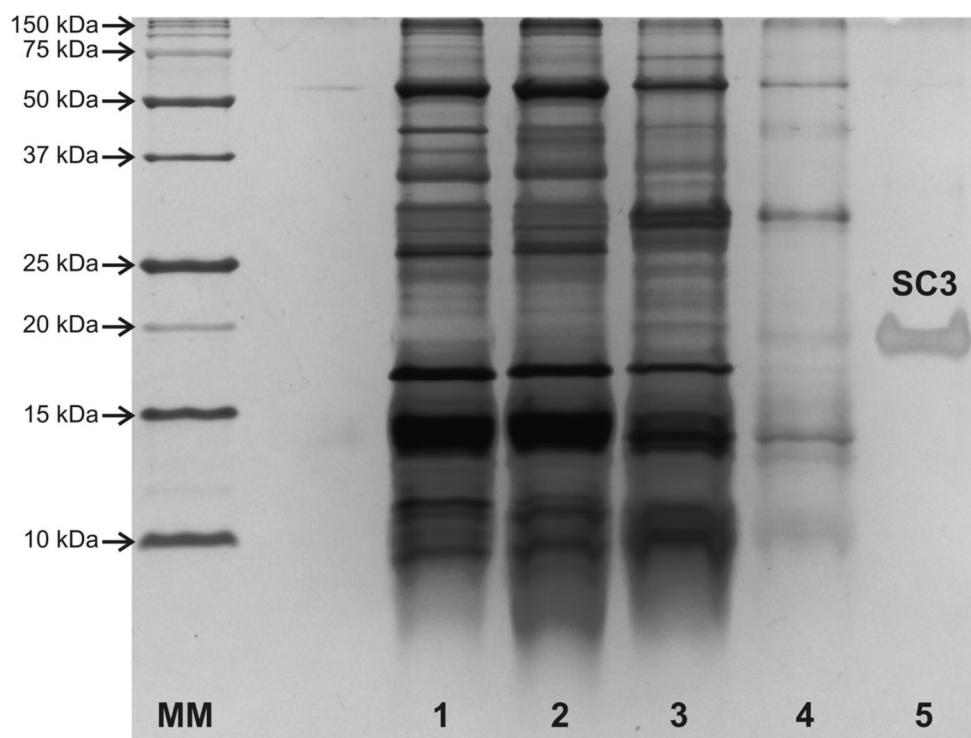
<i>m/z</i> exp.	<i>m/z</i> teor. ([M+H] ⁺)	ΔM [ppm]	Modifikace	Úsek řetězce AMK h.SC3	Počet vynechaných štěpných míst	Sekvence
797,549	797,550	-0,82		79-86	3	(L)LGLLGIVL(S)
999,608	999,609	-0,82		80-89	3	(L)GLLGIVLSL(N)
1227,679	1227,677	2,16	C5(Carbamidomethyl)	126-136	0	(L)INIGCTPINIL(-)
1511,823	1511,825	-1,05	C8(Carbamidomethyl)	123-136	1	(F)NGLINIGCTPINIL(-)
1692,810	1692,811	-0,46	C13(Carbamidomethyl)	44-61	0	(T)PPSTTTIAAGGTCTTGSL(S)
1856,015	1856,020	-2,53	C15(Carbamidomethyl)	83-100	3	(L)GIVLSDLNVLVGISCSPL(T)
1908,881	1908,879	1,27	C2,C3(Carbamidomethyl)	62-79	1	(L)SCCNQVQSASSSPVTALL(G)
2332,000	2332,000	-0,32	C10, C16, C17 (Carbamidomethyl)	101-122	0	(L)TVIGVGGSGCSAQTVCENTQF(N)

1.8.6 Izolace hydrofobinu SC3 z modelové směsi proteinů pomocí PTFE částic

Selektivní izolace hydrofobinu SC3 z modelové směsi deseti proteinových standardů byla provedena za použití mikrokolony naplněné PTFE mikročásticemi s následnou tříkrokovou elucí. Elektroforeogram Tris-tricinové SDS-PAGE analýzy (obr. 13) zobrazuje jednotlivé frakce, získané v průběhu izolace. Obr. 13 zde demonstruje vynikající schopnost nosiče PTFE specificky navázat hydrofobin SC3. Jamka 1 představuje počáteční vzorek obsahující hydrofobin SC3 a devět modelových proteinů (kap 1.7.8). Přestože tato směs je relativně jednoduchá, elektroforeogram obsahuje mnoho proužků, odpovídajících různým formám separovaných proteinů (např. dimery, degradační produkty atd) a případné kontaminanty těchto standardů. Jamka 2 odpovídá vazebné frakci, kde by hydrofobin SC3 neměl být přítomen (očekává se, že bude navázán na PTFE nosiči). V oblasti odpovídající molekulové hmotnosti hydrofobinu SC3 není patrný žádný proužek, což značí dobrou izolační účinnost. Dalším krokem izolačního protokolu bylo promývání PTFE částic. Pro první promývací krok byl použit 80% ACN/0,1% TFA (v/v) - jamka 3, který se ukázal jako velmi účinné činidlo pro odstranění velkého množství slabě vázaných proteinů z PTFE nosiče. Jako druhý promývací krok byl zařazen 1% roztok SDS, díky kterému došlo k odstranění dalších silněji vázaných proteinů a kontaminujících látek z PTFE částic s výjimkou hydrofobinu SC3 (jamka 4). Toto chování je v souladu s předchozími studiemi, kde hydrofobiny třídy I zůstaly navázané na povrchu PTFE částic i v přítomnosti roztoků obsahujících SDS [15,44,45]. V závěru byl hydrofobin SC3 eluován koncentrovanou kyselinou mravenčí. Hydrofobin SC3 byl tak téměř kompletně izolován od jiných proteinů ve velmi vysoké čistotě (jamka 5). Rozdíl mezi očekávanou molekulovou hmotností hydrofobinu SC3 bez signálního řetězce (11 kDa) a nalezenou polohou na gelu (19 kDa) je pravděpodobně způsoben jeho vyšší hladinou glykosylace (obr. 14) a vysokou mírou hydrofobicity. Oba důvody mají významný vliv na elektroforetickou pohyblivost v SDS-PAGE [46] a pozorované proužky v gelu jsou tak posunuty k vyšší molekulové hmotnosti.

Výsledky Tris-tricinové SDS-PAGE analýzy potvrdily velmi silnou afinitu a specifitu hydrofobinu SC3 pro izolaci na PTFE mikročásticích. Toto zjištění je stěžejní pro další přístup k izolaci hydrofobních proteinů. Ačkoli techniky extrakce na pevné fázi (SPE) nebyly doposud pro izolaci a purifikaci hydrofobinů použity, ve srovnání s extrakcí z kapaliny do kapaliny, poskytuje SPE několik výhod, např. vyšší reprodukovatelnost a opakovatelnost, snížení spotřeby organických rozpouštědel, čistší extrakty nebo volbu selektivity výběrem SPE fáze a směsi rozpouštědel. Další výhodou je vysoká čistota izolovaného proteinu, která pozitivně

ovlivňuje další analýzy těchto proteinů v reálných vzorcích (např. pivo nebo sladovnický ječmen). Vysoká čistota je také velmi důležitá pro jejich přímé využití v jiných aplikačních oblastech (např. modifikace povrchu, nanomateriály nebo léčiva).

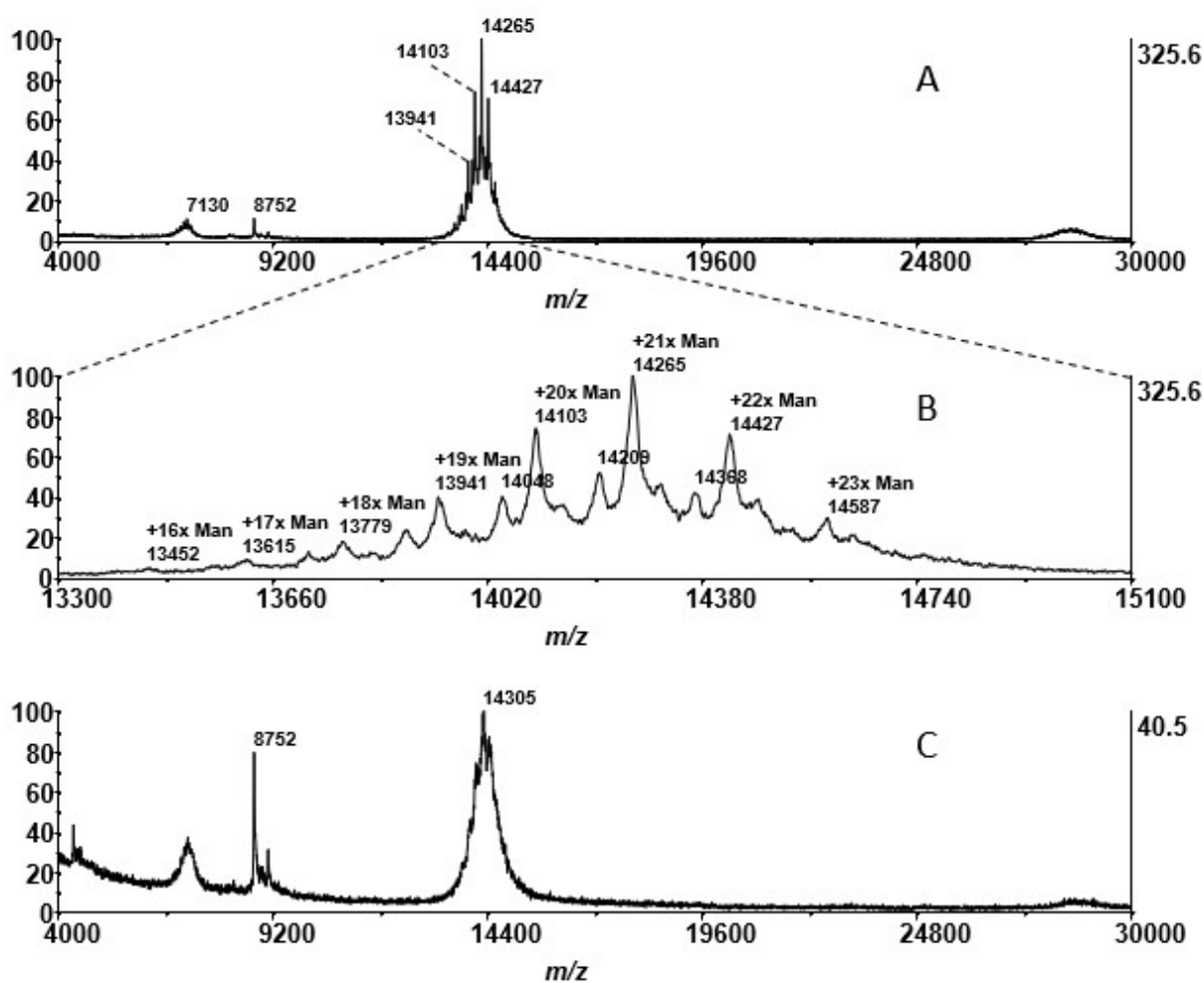


Obr. 13 Tris-tricinová SDS-PAGE analýza jednotlivých frakcí získaných během izolace hydrofobinu SC3 z modelové směsi 10 proteinů extrakcí na pevné fázi pomocí PTFE mikročástic. Barvení gelu amoniakálním stříbrem. MM – standard proteinů o molekulových hmotnostech (10–250 kDa), 1 – modelová směs proteinů, 2 – vazebná frakce (zbytek, který nebyl navázán na částice), 3 – 1. promývací krok 80% ACN/0.1% TFA, 4 – 2. promývací krok 1% SDS, 5 – 3. promývací krok kyselinou mravenčí, proužek v jamce 5 odpovídá izolovanému hydrofobinu SC3.

1.8.7 MALDI-TOF MS analýza

Pro analýzu hydrofobinu SC3 v intaktní formě byl použit lineární hmotnostní spektrometr MALDI-TOF. Nejprve byla ověřena molekulová hmotnost hydrofobinu SC3 po ošetření TFA (obr. 14A). Monomerní hydrofobin SC3 byl v MS spektru úspěšně detekován. Naměřená molekulová hmotnost jednotlivých izoform odpovídá intaktnímu glykosylovanému hydrofobinu SC3. Na obr. 14B je detailně zobrazeno osm dominantních píků jednotlivých glykoforem hydrofobinu SC3, které se liší počtem manózových jednotek. Nejvyšší zjištěná izoforma o $m/z = 14587$ odpovídá hydrofobinu SC3 obsahujícímu 23 manózových jednotek a nejnižší zjištěná izoforma obsahuje 16 manózových jednotek ($m/z = 13452$). Toto zjištění

potvrzuje vysokou úroveň glykosylace hydrofobinu SC3 popsaného dříve [47], kde bylo nalezeno maximálně 22 manózových jednotek. Mimoto lze na obrázku 14B pozorovat i menší distribuci izoform se ztrátou asi 57 Da, která odpovídá ztrátě glycinové jednotky na N-konci. Obrázek 14C znázorňuje hmotnostní spektrum hydrofobinu SC3 po procesu izolace na PTFE mikročasticích. Obě spektra, před a po čištění (obr. 14A a 14C) mají podobný profil.



Obr. 14 MALDI-TOF hmotnostní spektrum (lineární mód) hydrofobinu SC3. (A) Nativní hydrofobin SC3 rozpuštěný v TFA (B) spektrum po přiblížení ukazuje na přítomnost několika glykosylovaných isoform hydrofobinu SC3; C) hydrofobin SC3 po izolaci na PTFE mikročasticích.

1.9 Závěr

Proteomická analýza hydrofobinu SC3 je velmi obtížná, zejména kvůli některým jeho vlastnostem, jako je nízká rozpustnost, vysoká hydrofobicita, velmi stabilní disulfidické vazby a nepřítomnost zásaditých jednotek (lysin a arginin). V této práci byla věnována pozornost optimalizaci protokolu proteolytického štěpení hydrofobinu SC3. Kombinací denaturačního činidla (deoxycholátu sodného) s redukčními činidly (DTT a TCEP) a zvýšené teploty bylo dosaženo dostatečné účinnosti v redukci disulfidických můstků a tím ke zpřístupnění molekuly enzymům pro následné proteolytické štěpení. Byly testovány různé enzymy a jiné chemické látky (např. kyselina mravenčí), avšak nejlepších výsledků bylo dosaženo pomocí chymotrypsinu, jehož použití vedlo k identifikaci přibližně 83 % primární struktury hlavního řetězce hydrofobinu SC3. MS a MS/MS analýza na úrovni peptidů společně s MALDI-TOF analýzou intaktního hydrofobinu SC3 poskytly další doplňující informace o primární struktuře a posttranslačních modifikacích.

V další části byla vyvinuta metoda extrakce na pevné fázi v mikrokolonce s využitím hydrofobního PTFE nosiče. Tato technika v kombinaci s kyselou elucí poskytuje jednoduchý, rychlý, specifický a účinný nástroj pro izolaci hydrofobinu SC3, jako reprezentativního zástupce hydrofobinů třídy I. Postup izolace byl demonstrován na modelové směsi deseti proteinů, obsahující hydrofobin SC3. Metodami hmotnostní spektrometrie (MALDI-Orbitrap a MALDI-TOF) a také metodou Tris-tricinové SDS-PAGE bylo ověřeno, že takto navržený postup je vhodný pro izolaci hydrofobinů z proteinových směsí. Významnou výhodou metody, ve srovnání se současnými technikami, je selektivita postupu izolace, díky čemuž není nutné použít další separační kroky a je možné získat téměř čistý hydrofobin SC3. Závěrem lze konstatovat, že prezentovaná metoda izolace je snadno použitelná, spolehlivá a finančně nenáročná.

Zde popsané analytické metody mohou sloužit jako nástroj k získání podrobných informací o výskytu, chování a vlastnostech hydrofobinů extrahovaných z hub a plísní a dalších vzorků, jako je pivo nebo sladovnický ječmen.

2 CHARAKTERIZACE AZAPHILONOVÝCH PIGMENTŮ (*TALAROMYCES ALBOBIVERTICILLIUS*) JAKO POTENCIÁLNÍCH NOVÝCH POTRAVINÁŘSKÝCH BARVIV

2.1 Úvod

Během posledních let neustále roste zájem o využívání barviv z přírodních zdrojů, a to zejména ze strany spotřebitele v důsledku obav spojených se škodlivostí syntetických pigmentů. V současné době jsou přírodní pigmenty získávány z rostlin [48-50], mikroorganismů [51-55] a hmyzu [56] a nacházejí uplatnění v potravinářském průmyslu při barvení potravin i nápojů. Nicméně tyto pigmenty mají i některé nevýhody, jako je nestabilita, sezónní dostupnost a vysoké náklady při zvažování průmyslové aplikace [57-59].

Mikroorganismy mohou poskytnout alternativu syntetických pigmentů. Jsou schopny růst v různých systémech kultur [60,61], jsou nezávislé na klimatických podmínkách a dodávkách zemědělských surovin [62]. Mimoto, některá barviva produkovaná mikroorganismy vykazují vysokou stabilitu vůči světlu, teplotě a pH. [63,64]. Díky těmto výhodám byla zaměřena zvláštní pozornost na vláknité houby, které jsou potenciálními producenty mnoha odstínů pigmentů od žluté, červené, načervenalé, červenohnědé až po bronzovou [65].

Pigmenty, produkované plísněmi, mohou být chemicky klasifikovány jako karotenoidy, melaniny a polyketidy. Pigmenty na polyketidové bázi představují početnou skupinu pigmentů, zahrnující antrachinony, hydroxyantrachinony, naftochinony a azaphilony, z nichž každý vykazuje řadu barevných odstínů [66]. Azaphilonové pigmenty, produkované *Monascus sp.*, jsou široce používány v orientálních zemích (zejména v Japonsku a Číně) na zlepšení barvy rýžového vína, sójových bobů, sýrů a masa. Nicméně, použití pigmentů rodu *Monascus* jako potravinářského barviva je v evropských zemích stále zakázáno, zejména z důvodu, že společně s pigmenty může být produkován mykotoxin citrinin [67].

Díky celosvětové snaze vědců identifikovat potenciální netoxické producenty pigmentů pro průmyslové aplikace bylo vyhodnoceno několik druhů vláknitých hub náležících k rodu *Paecilomyces*, *Cordyceps*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Epicoccum*, *Fusarium* [54,68-70].

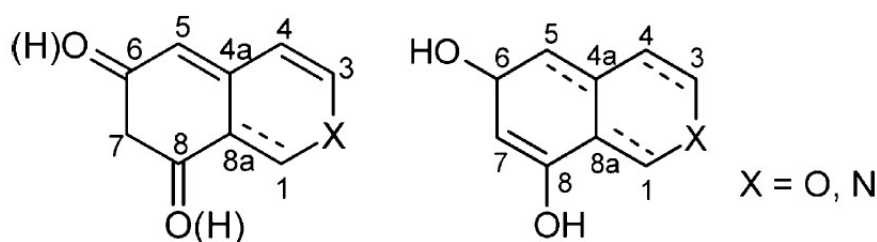
Na druhé straně existuje také několik pigmentů-azaphilonů žluté a červené barvy, produkované *Talaromyces sp.*, které jsou získávány bez produkce mykotoxinů. Jsou tedy pro člověka nepatogenní a zdají se být vhodnou alternativou červených pigmentů *Monascus* [71].

2.2 Klasifikace

Houby (*Fungi*), zejména ty mikroskopické (*Mikromyceta*), poskytují bohatý a důležitý zdroj sekundárních metabolitů s biologickou aktivitou a velkou rozmanitostí chemických struktur. Z chemického hlediska se jedná o různé organické kyseliny a jiné oxo-deriváty, aromatické látky, polyeny a polyyny, polyketidy, chinony, xanthy, flavonoidy, terpeny, polysacharidy, lipopolysacharidy, steroidy, makrolidy, heterosloučeniny dusíku, kyslíku a síry, a další látky [72-79]. Polyketidy, produkované vláknitými houbami, zahrnují jednu z nejvíce strukturálně rozmanitých tříd, které se přirozeně vyskytují, od jednoduchých aromatických metabolitů ke komplexním makrocyclickým laktonům [80,81]. Pigmenty na polyketidové bázi jsou velice komplexní látky, které vyžadují katalýzu polyketidovou syntázou. Polyketidové pigmenty se dále dělí na antrachinony, hydroxyantrachinony, naftochinony a azaphilony.

2.3 Struktura

Azaphilony jsou strukturálně různorodé biologicky aktivní látky s pyron-chinonovou strukturou (obr. 15), obsahující vysoce oxidované bicyklické jádro [82,83], (obvykle známé jako isochrom) a chirální kvarterní centrum.



Obr. 15 Obecná struktura azaphilonových pigmentů [84].

2.4 Vlastnosti a význam

Svůj název azaphilony získaly z důvodu výrazné afinity k molekulám obsahující dusík ve formě amino-skupiny. S takovým typem látek azaphilony reagují za vzniku červeně nebo purpurově zbarvených derivátů γ -pyridonu [66,82,85]. Azaphilony takto reagují nejen s amoniakem a různými alkylaminy, ale i s aminokyselinami, peptidy, proteiny a nukleovými kyselinami.

Pigmentové i nepigmentové azaphilonové sloučeniny jsou produkovány mnoha druhy vřeckovýtrusých (*Ascomycota*) a stopkovýtrusých (*Basidiomycota*) hub, zejména rody *Aspergillus*, *Penicillium*, *Chaetomium*, *Talaromyces*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Emericella* a *Epicoccum*. A dále rody *Monascus* a *Hypoxylon*, které jsou zodpovědné za jasně žluté,

červené nebo zelené barvy plodnic nebo mycelia [62]. Některé azaphilony jsou jedinečné pro určitý druh hub a představují tak taxonomicky významné markerové metabolity [86-88].

Azaphilony vykazují řadu biologických účinků, z nichž nejvýznamnější jsou antimikrobiální, antifungální, antivirové, antioxidační, cytotoxické a protizánětlivé [82,89]. Mnohé z těchto účinků lze přičíst reakci azaphilonů s aminoskupinou sloučeniny, jako jsou aminokyseliny, proteiny a nukleové kyseliny, které vedou ke vzniku vinylových γ -pyridonů.

Z pohledu jejich slibné biologické aktivity a zajímavých strukturálních rysů se azaphilonům stále častěji dostává pozornosti vědců. Od sedmdesátých let vznikla řada studií o syntetických azaphilonech [90-92]. Byly provedeny podrobné studie [93-96] izolace, charakterizace a chemie azaphilonů, zejména pigmentů z mořských a suchozemských houbových zdrojů, včetně makromycetických hub (*Macrofungi*) [97,98] a vláknitých hub (*Monascus*). V Turnerově a Aldridgeově monografii lze nalézt rozsáhlý seznam sekundárních metabolitů hub, včetně azaphilonů, klasifikovaných na základě jejich biosyntetického původu [99]. Všechny tyto studie se zabývají především chemií pigmentů, ale některé i obecně všemi typy houbových metabolitů. Do roku 2010 bylo podrobně popsáno více než 170 různých azaphilonů produkovaných 23 rody hub [82]. Později však bylo zjištěno, že existuje výrazně vyšší počet relevantních metabolitů hub, přibližně 373 sloučenin [84].

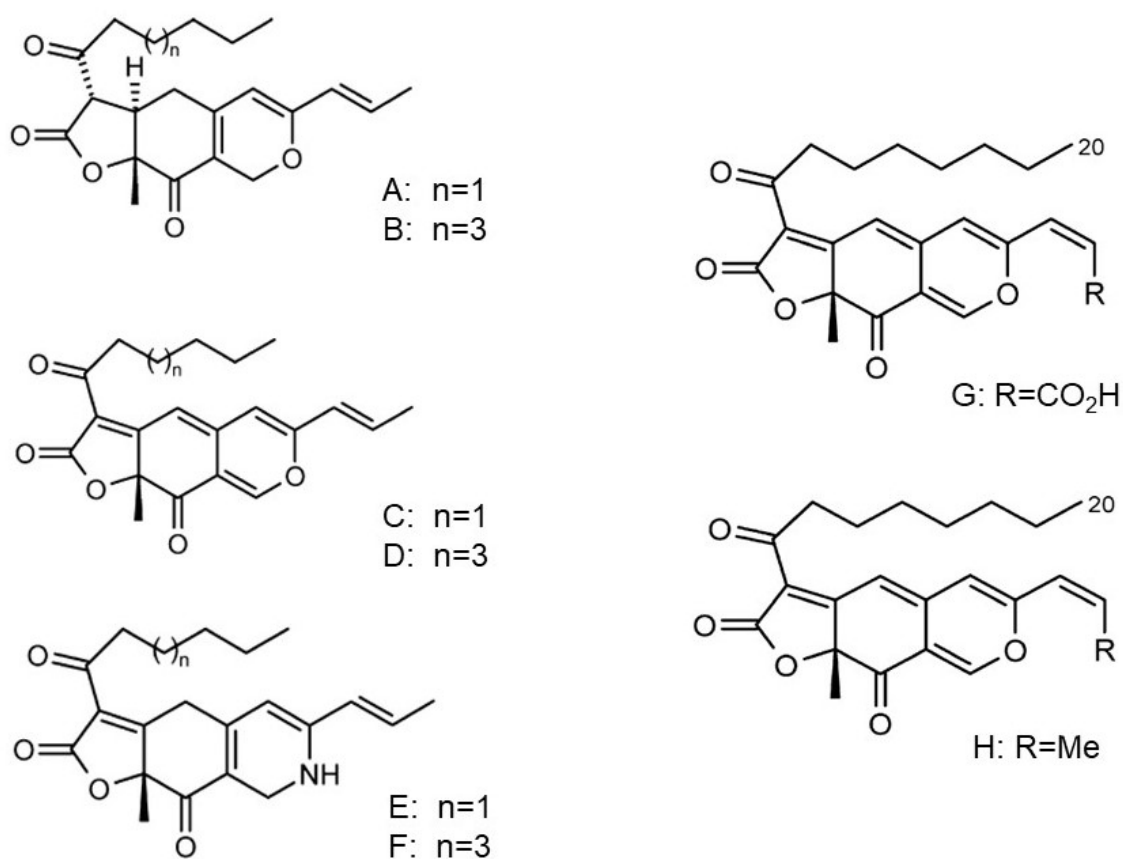
2.5 Vybrané typy azaphilonových pigmentů

Vláknité houby rodu *Monascus* produkují pigmenty převážně v myceliu. Tato skupina se dále dělí na O-azaphilony, které ve své struktuře obsahují kyslík a N-azaphilony, které ve své struktuře obsahují dusík.

Azaphilony, které ve své struktuře obsahují kyslík, jsou obvykle tvořeny skeletem 1H-isochromu spojeného s propenylovým postranním řetězcem a acylovým řetězcem z acetylu k dekanoylové jednotce. Rod *Monascus* je bohatým zdrojem O-azaphilonových pigmentů, dodnes bylo identifikováno celkem 24 pigmentů tohoto typu [93-95]. Mezi šest nejznámějších patří dva žluté pigmenty: monascin (obr. 16A) [100-102] a ankaflavin (obr. 16B), dva oranžové pigmenty: rubropunctatin (obr. 16C) [103] a monascorubrin (obr. 16D) [104-107] a dva červené pigmenty: rubropunctamin (obr. 16E) a monascorubramin (obr. 16F) [93-95].

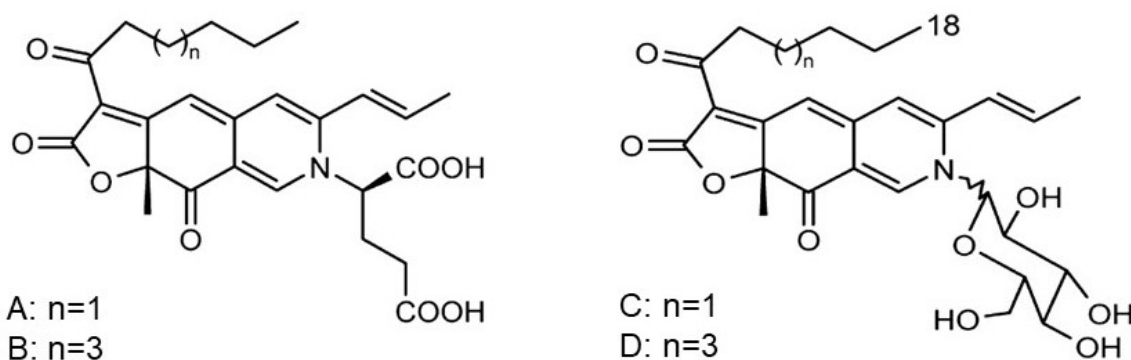
Monascin a monascorubrin byly poprvé izolovány v roce 1926 Eijiro Nishikawou z *Monascus purpureus* Mentii [101,102] s následnou strukturální charakterizací [104-107]. Monascin byl poté izolován z *Monascus purpureus* Went (zodpovědného za barvu červené rýže) [84] a také z *Monascus rubiginosus* Sato a *Monascus rubropunctatus*. Ukázalo se, že některé monascové pigmenty se mohou vyskytovat společně jako metabolity různých druhů

hub. Často se liší pouze délkou nasyceného řetězce např. monascin-ankaflavin, monascorubrin-rubropunctatin nebo monascorubramin-rubropunctamin. Ve struktuře monascových metabolitů lze pozorovat, že obsahuje spojení α,β -ketolaktonového kruhu s azaphilonovým skeletem, přičemž laktonový kruh žlutých monascových pigmentů je nasycený a u oranžových je nenasycený. Žluté pigmenty (monascin, ankaflavin) jsou tetrahydroderiváty oranžových pigmentů (rubropunctatinu, monascorubrinu). Zvýšená acidita metabolitů monascinu a ankaflavinu souvisí s terciárně navázaným vodíkem na α -uhlík β -ketolaktonového systému [84]. Za zmínku stojí i další objevené pigmenty, jako je Yellow II - žlutý pigment s vysokým obsahem barviva, produkovaný mutovaným kmenem *Monascus sp* [108] nebo dva monascorubrinové homology PP-O (obr. 16G) a PP-Y (obr. 16H), které byly purifikovány z nově izolovaného kmene *Penicillium sp.* AZ [109]. Dva nové žluté pigmenty s modrou fluorescencí nazvané monarubrin a rubropunctin, byly identifikovány u *Monascus ruber* [110].



Obr. 16 Struktura azaphilonových pigmentů. A: monascin, B: ankaflavin, C: rubropunctatin, D: monascorubrin, E: rubropunctamin, F: monascorubramin, G: PP-O, H: PP-Y [84].

Skupinu monascových azaphilonů, obsahujících dusík, tvoří prozatím 39 známých pigmentů. Jejich strukturu obvykle tvoří isochinolinový skelet s n-oktanoyl- nebo n-hexanoyl-postranním řetězcem a γ -laktonový kruh [84]. Většina pigmentů této skupiny je tvořena různými deriváty aminokyselin a monascorubrinu nebo rubropunctatinu [111,112]. Rubropunctamin a monascorubramin byly již dříve objeveny jako hlavní součást hub rodu *Monascus* [113,114]. Současnou kultivací *M. ruber* a *M. purpureus* v chemicky definovaném médiu za použití kyseliny glutamové, jako zdroje dusíku, lze získat dva pigmenty: N-glutarylrubropunctamin (obr. 17A) a N-glutarylmonascorubramin (obr. 17B), které jsou navázány ke kyselině glutamové jejich aminoskupinou [70]. Podobně i houba *M. ruber* ponořená v kultuře produkuje dva červené, ve vodě rozpustné pigmenty: N-glukosylrubropunctamin (obr. 17C) a N-glukosylmonascorubramin (obr. 17D) [115].



Obr. 17 Struktura azaphilonových pigmentů. A: N-glutarylrubropunctamin, B: N-glutarylmonascorubramin, C: N-glukosylrubropunctamin, D: N-glukosylmonascorubramin [84].

Osm pigmentů, které obsahují L- a D-aminokyselinové jednotky, byly izolovány z komerčních monascových pigmentů. Tyto pigmenty byly identifikovány jako alaninové nebo aspartátové deriváty monascorubrinu a rubropunctatinu [116]. Další červené pigmenty rodu *Monascus* obsahují aromatické a nepolární alifatické L- a D-aminokyseliny [117-119]. Monascové pigmenty, obsahující deriváty threoninu a argininu, byly identifikovány jako nové červené pigmenty, produkované *M. ruber* [120,121]. Kultivací latentních buněk *M. purpureus* s glycinem lze získat tmavě červené pigmenty [96].

2.6 Experimentální část

Podrobný popis celého procesu od odběru mořské houby, její kultivace, přes izolaci, genetickou identifikaci, produkci pigmentů až po provedení extrakce je detailně popsán v již

vyšlé studii [122]. Pro tuto práci byly použity předem připravené extrakty, které byly získány jak přímo z vykultivované biomasy (intracelulární pigmenty), tak z filtrátu kultury (extracelulární pigmenty) postupnou extrakcí při pokojové teplotě rozpouštědly s rostoucí polaritou: n-hexan, chloroform, ethylacetát a ethanol. Extrakty byly vysušeny pomocí rotační odparky při 30 °C za sníženého tlaku. Odparky byly rozpuštěny v 1 ml methanolu (1:1 v/v) a filtrovány přes stříkačkové PTFE filtry o velikosti pórů 0,20 µm (Sartorius). Finální extrakty byly až do analýzy skladovány při teplotě 4 °C v tmavých vialkách.

2.6.1 Standardy a ostatní chemikálie

Deionizovaná voda byla připravena pomocí filtračního systému Milli-Q (Merck Millipore, Německo). Ostatní chemikálie (acetonitril a kyselina mravenčí) byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).

2.6.2 Přístroje a zařízení

Pro analýzu byl použit HPLC systém Shimadzu Prominence LC-20A (Shimadzu, Milan, Italy) obsahující kontrolní stanici CBM-20A, dvě čerpadla LC-20AD, degaser DGU-20A3, autosampler SIL-20AC a detektor diodového pole SPD-M20A. Data byla zpracována pomocí softwaru Shimadzu Labsolution ver. 5.53. Pro MS analýzu byl použit hmotnostní spektrometr LCMS-2020 (Shimadzu, Milan, Italy), využívající ionizaci elektrosprejem (ESI) při snímání kladných i záporných iontů.

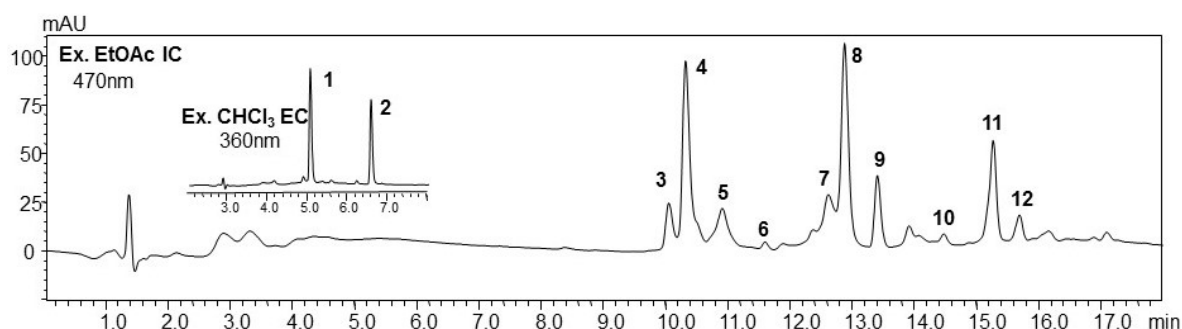
2.6.3 Optimalizace separace

Pro HPLC separaci bylo testováno několik kolon. Nejlepší výsledky poskytovala kolona C18 Kinetex (Phenomenex) (100×2,1 mm-1,7 µm velikost částic), vyhřívanou na 30 °C. Mobilní fáze A: 0,1% HCOOH (v/v), mobilní fáze B: acetonitril/0,1% HCOOH (v/v). Optimální gradient pro separaci jednotlivých složek byl: 0 min – 5 % B, 15 min – 95 % B, 17 min – 95 % B, 18 min – 5 % B. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,2 ml/min a dávkovaný objem vzorku byl 1 µl. UV–VIS spektra byla snímána v rozsahu 200–600 nm. Pro vyhodnocení byly zvoleny záznamy snímané při 470 nm a 360 nm. Podmínky MS analýzy byly následující: ESI + a ESI -, průtok plynu pro rozprášení eluátu (N₂): 1,5 l/min; napětí detektoru: 4,5 kV; hmotnostní rozsah: 60–600; napětí převodníku: ± 3,5 kV; teplota převodníku: 350 °C; teplota DL: 250 °C; Heat Block: 400 °C.

2.7 Výsledky a diskuze

V rámci této práce byla provedena optimalizace separačních podmínek pomocí HPLC/MS a dále podmínek pro identifikaci pomocí detektoru diodového pole (PDA) a MS. Byla testována extrakční účinnost různých rozpouštědel. Analyzovány byly extrakty získané postupnou extrakcí čtyřmi různými rozpouštědly (n-hexan, chloroform, ethylacetát a ethanol) a dále extrakty vytvořené za použití pouze jednoho rozpouštědla (ethylacetátu a ethanolu). Na základě výsledků získaných pomocí RP-HPLC v kombinaci s PDA a hmotnostním spektrometrem s ionizací elektrosprejem (ESI/MS), bylo zjištěno, že ethylacetát, použitý jako samostatné rozpouštědlo, je nejlepším rozpouštědlem pro extrakci hlavních pigmentových sloučenin. Jako druhý nejlepší byl určen ethanol, jako samostatné rozpouštědlo. Tato dvě rozpouštědla se jeví jako nejvhodnější i z toho důvodu, že extrahované pigmenty jsou v přirozené formě hydrofilní, mírně polární a jsou tedy snadno extrahovatelné polárními rozpouštědly. V nepolárních rozpouštědlech (n-hexanu a chloroformu) byla výtěžnost extrakce získaných pigmentů velmi nízká. Nicméně chloroformový extrakt poskytl dvě sloučeniny (obr. 18 – píky 1 a 2), které nebyly pigmentové povahy. Celkově bylo tedy nalezeno 12 různých sloučenin, z nichž 10 sloučenin bylo pigmentové povahy a 2 sloučeniny bez pigmentu.

Na obr. 18 je znázorněna chromatografická separace pigmentů získaných extrakcí *Talaromyces albobiverticillius* 30548 ethylacetátem. Chromatografický záznam byl pořízen při vlnové délce 470 nm. Při analýze pigmentů, které byly extrahovány chloroformem, byly při vlnové délce 360 nm pozorovány sloučeniny č.1 a č.2 (obr. 18, vložený chromatogram). Společně s PDA byla použita hmotnostně spektrometrická detekce s ionizací elektrosprejem při snímání kladných i záporných iontů. V tabulce 3 jsou uvedeny všechny nalezené sloučeniny, jejich retenční časy, data z PDA a MS s relativní předběžnou identifikací

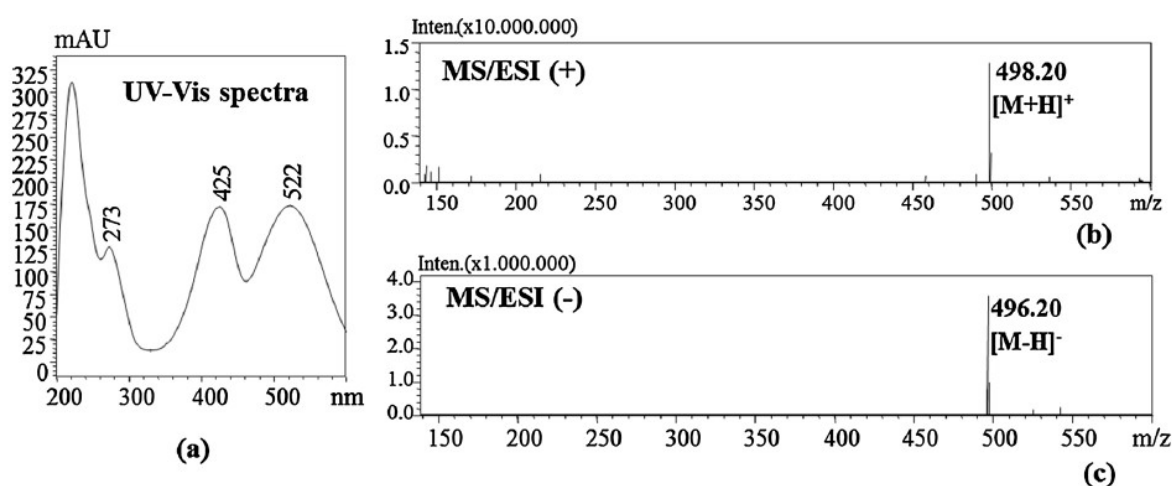


Obr. 18 Chromatogram ukazující všechny zastoupené látky získané analýzou pigmentových extraktů *Talaromyces albobiverticillius* pomocí HPLC-PDA-ESI/MS. Na hlavním záznamu jsou označeny látky (3-12) po separaci IC extraktu EtOAc. Dále je zde zobrazen výřez separace EC extraktu CHCl₃, kde byly nalezeny látky (1-2).

Z celkem 12 nalezených pigmentů byly čtyři identifikovány jako pigmenty typu *Monascus* (tabulka 3). Tři z těchto sloučenin, na obr. 18 označené jako látky 3, 5 a 8, jsou podobné již známým pigmentům N-threonine-monascorubraminu, N-glutaryl-rubropunctaminu a PP-O. Pigment č. 4 (obr. 18) nebyl dosud identifikován. Postup identifikace všech čtyř zmiňovaných pigmentů bude dále detailně popsán.

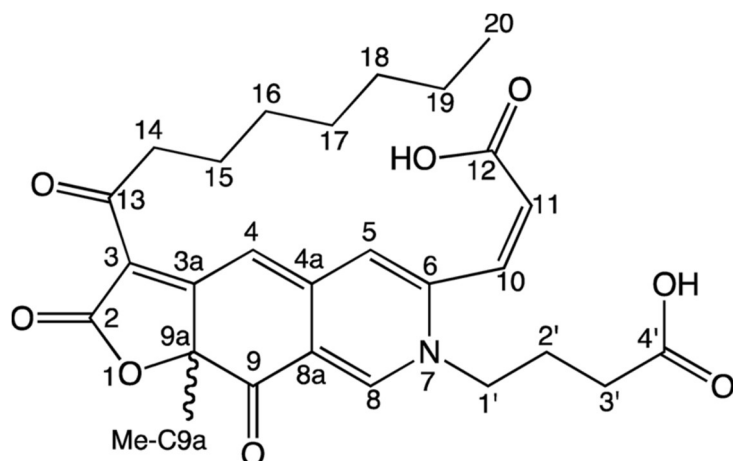
Identifikovaná sloučenina č. 3: za předpokladu, že α -aminokyselina – threonin byla začleněn do pigmentu, byla tato sloučenina identifikována jako N-threonin-monascorubramin s molekulovou hmotností 483,55 Da; korespondující s naměřenými hodnotami $[M+H]^+$ $m/z = 484$ a $[M-H]^-$ $m/z = 482$. Hodnoty molekulových hmotností byly ve shodě s hodnotami, které popsal Jung a kol., 2003 [123] a zároveň data naměřená z UV spektra (maxima při 222, 273, 422 a 511 nm) byly v souladu s uvedenými hodnotami pigmentů typu *Monascus* [124].

Identifikovaná sloučenina č.4: tato sloučenina byla identifikována jako látka, která nebyla dosud publikována. Tento nově objevený pigment byl nazván jako 6-[(Z)-2-karboxyvinyl]-N-GABA-PP-V nebo zjednodušeně jako N-GABAPP-V. Identifikace molekuly vychází z předpokladu, že byla do pigmentu PP-V začleněna kyselina γ -aminomáselná. Struktura byla určena na základě získaných dat z PDA, MS a detailní NMR [122]. Dle dat získaných pomocí PDA detekce (maxima při 221, 273, 425 a 522 nm) koresponduje tento pigment s pigmenty typu *Monascus* [124]. Tato sloučenina vykazovala taktéž protonované a deprotonované molekuly $[M+H]^+$ $m/z = 498$ a $[M-H]^-$ $m/z = 496$ (obr. 19).



Obr. 19 Strukturní analýza identifikované sloučeniny č. 4. (a) UV-VIS absorpční spektrum ethylacetátového extraktu, (b) ESI/MS spektrum změřené při snímání kladném iontů (c) ESI/MS spektrum změřené při snímání záporných iontů.

Výše uvedená spektra korespondují s navrhovanou strukturou (obr. 20), jejíž sumární vzorec je $C_{27}H_{31}NO_8$ o molekulové hmotnosti 497,53 Da. Tato práce tedy poprvé uvádí charakteristiku derivátu pigmentu N-GABA-PP-V, nesoucího cis-konfiguraci na C10-C11 dvojnou vazbu, ve zkoumaném druhu *Talaromyces albobiverticillius*.



Obr. 20 Struktura molekuly nově identifikované látky č.4 (N-GABA-PP-V) včetně číslování uhlíkových atomů.

Identifikovaná sloučenina č. 5: na základě hodnot protonovaných a deprotonovaných molekul $[M+H]^+$ $m/z = 484$ a $[M-H]^-$ $m/z = 482$ byla identifikována jako N-glutaryl-rubropunctamin (483,51 Da). Absorpční maxima při 223, 430 a 499 nm byla v souladu s hodnotami uvedenými v dostupné literatuře [125].

Identifikovaná sloučenina č. 8: na základě odpovídajících hodnot protonovaných a deprotonovaných molekul $[M+H]^+$ $m/z = 413$ a $[M-H]^-$ $m/z = 411$ byla identifikována jako PP-O (412,43 Da). Absorpční maxima při 223, 286, 458 a 470 nm byla taktéž v souladu s dostupnou literaturou [109,124].

Tabulka 3 Přehled sloučenin detekovaných pomocí HPLC-PDA-ESI/MS v intracelulárních a extracelulárních extraktech *Talaromyces albobiverticillius* 30548, korespondující s chromatogramem zobrazeném na obr. 18.

Compound number	Retention time	λ_{MAX} [nm]	ESI (+)	ESI (-)	Tentative identification
1	4.89	207, 362	255 [M + H] ⁺		n.i.
2	7.35	223, 390	269 [M + H] ⁺	267 [M - H] ⁻	n.i.
3	10.04	222,273,422, 511	484 [M + H] ⁺ 547 [M + H + Na + CH ₃ CN] ⁺	482 [M - H] ⁻	N-threonine-monascorubramine
4	10.32	221,273,425, 522	456 [M + H] ⁺ 498 [M + H + CH ₃ CN] ⁺	454 [M - H] ⁻ 496 [M - H + CH ₃ CN] ⁻	N-threonine-rubropunctamine
5	10.92	223, 430, 499	484 [M + H] ⁺ 440 [M + H - CO ₂] ⁺	482 [M - H] ⁻ 438 [M - H - CO ₂] ⁻	N-glutaryl-rubropunctamine
6	11.57	225, 409	375 [M + H] ⁺		n.i.
7	12.6	222, 280, 461	413 [M + H] ⁺ 475 [M + H + Na + CH ₃ CN] ⁺	411 [M - H] ⁻ 473 [M - H + Na + CH ₃ CN] ⁻	n.i.
8	12.8	223,286,458,470	413 [M + H] ⁺ 475 [M + H + Na + CH ₃ CN] ⁺	411 [M - H] ⁻ 473 [M - H + Na + CH ₃ CN] ⁻	PP-O
9	13.4	224, 287, 458	459 [M + H] ⁺	457 [M - H] ⁻	n.i.
10	14.4	225, 421	503 [M + H] ⁺	501 [M - H] ⁻	n.i.
11	15.2	224, 446	445 [M + H] ⁺	443 [M - H] ⁻	n.i.
12	15.6	225, 458	459 [M + H] ⁺		n.i.

2.8 Závěr

Tato práce přináší nové informace ve snaze o identifikaci pigmentů, prováděné v rámci komplexní studie mořské vláknité houby kmene 30548 *Talaromyces albobiverticillius*, izolované z vnějšího svahu korálového útesu ostrova Réunion (Indický oceán). V rámci našeho výzkumu byla pro charakterizaci těchto pigmentů použita metoda HPLC-PDA-ESI/MS, později doplněná o NMR. Byly analyzovány pigmenty extrahované rozpouštědly různé polarity. Jako nejvhodnější extrakční činidlo byl vyhodnocen ethylacetát, potažmo ethanol. Této skutečnosti nasvědčuje i mírně polární povaha pigmentů. Přesto byly detekovány dvě pigmentové sloučeniny v extraktu chloroformu. Pomocí různých rozpouštědel bylo v extraktech *Talaromyces albobiverticillius* 30548 detekováno celkem dvanáct sloučenin, z nichž 10 bylo pigmentové povahy. Konkrétně byly identifikovány sloučeniny: N-threonin-monascorubramin (sumární vzorec $C_{27}H_{33}NO_7$, 483,55 Da), N-glutaryl rubropunctamin (sumární vzorec $C_{26}H_{29}NO_8$, 483,51 Da), PP-O (sumární vzorec $C_{23}H_{24}O_7$, 412,43 Da) a zcela nová sloučenina N-GABA-PP-V (sumární vzorec $C_{27}H_{31}NO_8$, 497,53Da). Tato nová sloučenina rozšíří seznam 63 dosud známých monascových pigmentů. Výzkum v oblasti červených pigmentů hub bude v příštích letech intenzivně pokračovat. Již nyní je však prokázáno, že některé druhy *Talaromyces/Penicillium* jsou schopné produkovat pigmenty bez současné produkce mykotoxinu, např. *Talaromyces atroseus*; *T. albobiverticillius* a přináší tak možnost pro širokého budoucí využití.

3 ANALÝZA FENOLICKÝCH LÁTEK V MEDOVINÁCH

3.1 Úvod

Medovina je jedním z nejstarších alkoholických nápojů, zejména v oblasti České republiky byla již od nepaměti velmi oblíbenou. V současné době si můžeme zakoupit medoviny různé kvality českých i zahraničních značek. Vzhledem k nedostatečnému legislativnímu ošetření kvality medovin se na trhu bohužel vyskytují i produkty při jejichž výrobě je použito menší množství medu, než je dáno vyhláškou, nebo jsou použity medy nekvalitní. Spotřebitel tak často za poměrně vysokou cenu nedostává produkt s dostatečnou kvalitou.

Z tohoto důvodu byla cílem této práce snaha o nalezení ukazatelů jakosti medovin, které by mohly v budoucnu sloužit kontrolním orgánům k odhalení nekvalitních medovin. Mezi tyto parametry by mohl patřit 5-hydroxymethylfurfural (HMF), který se standardně používá jako jeden z ukazatelů kvality jakosti medu a vzniká působením vysokých teplot na matrice s vyšším obsahem fruktózy, tedy i med. Během tohoto procesu dochází k přeměně jednoduchých cukrů, zejména fruktózy, na toxický HMF a jeho další deriváty. Dalším možným sledovaným parametrem by mohlo být zastoupení jednotlivých cukrů v medovinách. Kromě majoritních monosacharidů glukózy a fruktózy se v medu a medovinách v menších koncentracích přirozeně vyskytuje disacharid sacharóza a v případě medovicových medů i trisacharid melezitóza. Popis vyvinutých metod pro stanovení HMF a cukrů [126] není hlavním tématem této práce.

Dalším navrhovaným parametrem je profil fenolických látek obsažených v medovinách. Fenolické látky, jako sekundární metabolity rostlin, slouží mimo jiné jako lákadla pro opylovače, tedy i včely. Fenolické látky se touto cestou stávají přirozenou součástí medu. Obsah a zastoupení konkrétních fenolických látek se může v jednotlivých druzích medu a medovin lišit. Přesto bylo v této práci zjištěno, že určité fenolické látky byly ve větší či menší míře obsaženy ve všech testovaných medovinách.

Pro kvalitativní i kvantitativní stanovení vybraných fenolických látek byla vyvinuta metoda RP-HPLC ve spojení s hmotnostní spektrometrií, jako detekčním systémem. V medovinách byla dále testována antioxidační aktivita několika různými metodami, jako je celkový obsah fenolických látek s využitím Folin-Ciocalteuova činidla, metodou využívající radikály ABTS [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzo-thiazolin-6-sulfonát)] a DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl). Zjištěné obsahy fenolických látek metodou HPLC/MS byly porovnávány

s daty získanými analýzou antioxidační aktivity a zpracovány pomocí vícerozměrné statistické analýzy.

3.2 Medovina

3.2.1 Historie

Víno je součástí lidské kultury přes 6 000 let a od počátku sloužilo ke společenským i náboženským účelům. Avšak historie medoviny sahá mnohem dále do historie (přibližně 20 000-40 000 let). Abychom opravdu pochopili historii medoviny, musíme jít zpět v čase mnohem dále. Historii dnešní včely lze vystopovat pomocí mitochondriální analýzy deoxyribonukleové kyseliny (DNA) do doby před 1 miliónem let. Včely vždy shromažďovaly nektar a pyl, avšak během tisíciletí se potýkaly s divokými kvasinkami. Sladký nektar s vysokým podílem vody a nízkým obsahem cukru často procházel spontánní fermentací v důsledku působení divokých kvasinek. Tento proces je však pro včely nežádoucí, protože pro svůj metabolismus potřebují cukry. V žaludku včely dochází k přeměně disacharidu (sacharózy) na dvě monosacharidové jednotky (fruktózu a glukózu). Během tisíciletí se včely naučily svoji potravu bránit. Odpařením dostatečného množství vody z medu dochází ke zvýšení osmotického tlaku a med se stává podstatně méně náchylný ke spontánnímu kvašení. Kvasinky však také pokračovaly ve vývoji, některé druhy se adaptovaly, staly se osmotolerantními a mohly tak přežít i v prostředí s vysokým osmotickým tlakem. Tyto kvasinky se v budoucnu staly ideálními pomocníky pro kvašení piva a vína [127].

Když se vrátíme do doby před 20 000 až 40 000 lety, můžeme nalézt první zmínku o lidské znalosti medoviny. V té době panovaly v Africe podobné klimatické podmínky jako v současnosti. Střídání období extrémního sucha a přivalových dešťů bylo běžné. Často se tak stávalo, že vyhnívaly dutiny stromů, jako jsou Baobab a Miombo. Během období sucha v těchto dutinách hnízdily včely a s příchodem období dešťů se dutiny naplňovaly vodou. Voda, med a osmotolerantní kvasinky poskytly ideální podmínky pro přirozený vznik medoviny. Tehdejší afričtí domorodci měli k dispozici nejen med, ale také medovinu. Když se tito lidé později vydali putovat z Afriky přes Středozemní moře, vzali si s sebou včely, med a znalosti o výrobě medoviny [127].

Nakonec se znalost medoviny rozšířila po celé Evropě, Indii a Číně. Bohužel v době urbanizace výroba medoviny téměř vymizela (před 1700 lety v Indii, před 1500 lety v Číně a před asi 500 lety v Evropě). Med byl vysoce ceněnou komoditou a postupně se stal

dostupným pouze pro nejvyšší vrstvy obyvatelstva. Tradice medoviny byla naštěstí zachována v evropských kláštrech. Potřeba ceremoniálních svíček z včelího vosku vyžadovala péči o včely a přebytečný med sloužil k výrobě medoviny, kterou mniši využívali pro jejich církevní obřady. Ve Velké Británii můžeme nalézt kláštery, které mají více než 400letou tradici výroby medoviny [127].

Průmyslová revoluce měla za následek další výrazný pokles výroby medoviny. První medomet (přístroj k odstředění medu z medových plástů) byl vynalezen v roce 1865 rakouským majorem Francesco de Hruschka. Dle legendy ho k nápadu přivedlo sledování syna, který kolem hlavy točil kyblíkem medu. Do té doby byly voštiny medu jednoduše mačkány, aby mohl být med odstraněn. Tento proces nebyl vůbec efektivní a zanechával spoustu medu ve zbytcích včelího vosku. Nejsnadnějším zpracováním těchto zbytků bylo vymývání medu z vosku teplou vodou, která skvěle sloužila k výrobě medoviny. Mechanizace získávání medu znamenala výrazný úbytek produkce medové vody pro výrobu medoviny a znalosti o výrobě medoviny byly zachovány pouze jako řemeslo bez komerčního využití [127].

V dnešní době existuje mezinárodní organizace (International Mead Association, IMA), která představuje globální trh s medovinami. IMA sponzoruje mezinárodní festival medovin a snaží se ovlivňovat potravinářský průmysl tak, aby se medovina dostala do hlavního proudu trhu s alkoholickými nápoji. Toho lze dosáhnout pouze v případě, že bude dostatečná poptávka spotřebitelů a potravinářský průmysl na ni bude muset reagovat. Neméně důležité je, aby bylo pro běžného spotřebitele na první pohled jasné, zda se jedná o kvalitní produkt či nikoliv, ale orientace na trhu medovin není v tuto chvíli vůbec snadná.

Výhled do budoucnosti však vypadá optimisticky. Vzhledem k ekologické náročnosti pěstování vinné révy, sladovnického ječmene a chmele, je medovina do budoucna pravděpodobně nejudržitelnějším alkoholickým nápojem [127]. Snaha o udržitelnost včelaření je velická, protože kdyby vymizely včely do několik let vyhyne i lidstvo.

3.2.2 Výroba

Medovina je tradiční alkoholický nápoj s přirozeným obsahem 8-18 % alkoholu [128], připravený kvašením vodného roztoku medu pomocí kulturních vinných kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*) [128]. Kvas se připravuje smísením medu a vody v různých poměrech (2:1, 1:1, 1:2, 1:3). K tomuto základu lze před zakvašením přidat živiny pro lepší prospívání kvasinek, různé druhy bylin, koření, či ovocné šťávy. Výroba medoviny je

poměrně složitý a časově náročný proces, trvající v průměru několik měsíců, v některých případech i několik let.

Samotný proces výroby medoviny závisí na typu medu, jako základní vstupní suroviny. Med může přirozeně obsahovat nejrůznější druhy mikroorganismů, např. nekulturních kvasinek, které mohou nepříznivě ovlivnit průběh kvašení a učinit výsledný nápoj nepoživatelným. Z tohoto důvodu se většina výrobců uchyluje k tomu, že med před zakvácením zahřívají za účelem eliminace přítomných mikroorganismů. Zahříváním zároveň dochází k vysrážení proteinů obsažených v medu. Technologický proces je tímto krokem výrazně zjednodušen, avšak částečně na úkor kvality výsledného produktu. Během zahřívání medu dochází ke vzniku HMF a dalších nežádoucích látek a zároveň dochází k degradaci některých zdraví prospěšných látek, které jsou u medovin nevařených zachovány. Po zahřátí je výrazně snížena i antioxidační aktivita medu, potažmo medoviny, díky změně profilu (degradaci) fenolických látek [128].

3.2.3 Rozdělení

V České republice používáme jednotný název medovina, který může zahrnovat nejrůznější příchutě i složení, jedinou podmínkou by měl být med, jako základní surovina daného nápoje. Jako hlavní kritérium, podle kterého by měl zkušený spotřebitel volit, je technologický postup, tedy zda byla medovina připravena kvašením za studena nebo byla převařená. Medoviny kvašené za studena budou logicky vždy kvalitnější, zejména díky zachování původního obsahu prospěšných látek.

V zahraničí se ale můžeme setkat s mnoha nápoji s různými názvy, které bychom u nás nazvali jednoduše medovinou (případně medovinou s příchutí). Nejčastějším typem je „Metheglin“ [129]. Jedná se o medovinu obsahující koření nebo byliny, jejichž chuť nebo vůně může zcela potlačit chuť samotného medu. Další variantou je „Melomel“ (počeštěný název Melomela) [129]. Při výrobě Melomely je pro zakvácení použita ovocná šťáva namísto vody. Ovocné šťávy využívají výrobci pro jejich vysoký obsah cukrů na úkor množství medu. Výroba Melomely je z ekonomického hlediska výhodnější, protože ovocná šťáva je ve srovnání s medem výrazně levnější. Melomela se dále dělí na několik podskupin: „Cyser“ (obsahuje jablečnou šťávu) a „Pyment“ (obsahuje hroznovou šťávu) [129]. Pokud je Pyment obohacen ještě o bylinky a koření, je nazýván jako „Hippocras“ [129]. Dalším typem medoviny je „Rhodomel“, k jejíž výrobě jsou použity okvětní lístky růže. Speciální dezertní medovina s vysokým obsahem medu je označována jako „Sack mead“ [129].

3.3 Med

3.3.1 Historie

Nejstarší dochovanou písemností o medu je Sumerská tabulka z doby 2100-2000 př. n. l., která popisuje používání medu jako léčiva a masti [130]. Avšak zmínky o konzumaci medu člověkem sahají výrazně dále do historie. Med tvořil již pro člověka *Homo sapiens* důležitou složku potravy, pro kterou byl ochoten riskovat život. Důkazem jsou nástěnné malby (obr. 21) z období 6000 př. n. l. (mladší doba kamenná) [131]. Během historie byl med používán ve většině dávných kultur pro výživové i lékařské účely. Zmínky lze najít také v Bibli. Víra, že med je téměř zázračným zdrojem živin, lékem i mastí, byla dochována až do našich dnů. V průběhu celé historie byl med důležitým zdrojem sacharidů a jediným dostupným sladidlem. Změna nastala v době průmyslové revoluce okolo roku 1800 n.l, kdy započala průmyslová výroba cukru. Poté nastalo postupné nahrazování medu cukrem [130].



Obr. 21 Prehistorický člověk sbírající med. Skalní malba z období 6000 př. n. l. La Arana shekter, Bicorp, východní Španělsko [132].

3.3.2 Složení

Med patří mezi nejznámější přírodní sladidla po celém světě. Za možnost jej využívat vděčíme včele medonosné (*Apis mellifera*). Na základě původu sladké šťávy rozlišujeme med na dva základní typy: květový a medovicový. Jak už název napovídá, med květový

vzniká primárně z nektaru květů rostlin [133]. Základem medovicového medu, který je známý také jako med lesní, je medovice. Medovice je sladký roztok, který vylučují mšice a červci z řádu polokřídých (*Hemiptera*) [134] po přefiltrování mízy stromů. V obou případech včely ve svém medovém vaku donesou sladkou šťávu do úlu, kde jej předají mladším včelám. Díky několikanásobnému předání nektaru mezi včelami dochází k obohacení sladké tekutiny o důležité enzymy a aminokyseliny a zároveň k odpaření vody (přibližně na 30 %). Poté je sladká šťáva uložena do typických šestihranných buněk včelích plástů. Díky vyšší teplotě v úlu (kolem 35 °C) a mávání křídel jsou včely schopny snížit obsah vlhkosti pod 20 %. Poté je med v buňkách zavíčkován a dozrává.

Celkové složení medu je uvedeno v tabulce 4 [130,135]. Hlavní složkou jsou sacharidy, které tvoří asi 95 % sušiny medu. Kromě sacharidů, obsahuje med četné množství dalších sloučenin, jako jsou organické kyseliny, proteiny, aminokyseliny, minerály, fenolické látky, vitamíny a aromatické sloučeniny. Je však důležité poznamenat, že přesné složení medu se může lišit a vždy velmi závisí na jeho botanickém původu.

Tabulka 4 Složení medu (Data v g/100 g) [130,135].

		Med kvěťový		Med medovicový	
		průměr	rozmezí	průměr	rozmezí
Voda		17,2	15-20	16,3	15-20
Monosacharidy	glukóza	38,2	30-45	31,8	28-40
	fruktóza	31,3	24-40	26,1	19-32
Disacharidy	sacharóza	0,7	0,1-4,8	0,5	0,1-4,7
	ostatní	5,0	2-8	4	1-6
Trisacharidy	melecitóza	<0,1		4	0,3-22
	erlóza	0,8	0,5-6	1,0	0,1-6
	ostatní	0,5	0,5-1	3,0	0,1-6
Blíže neurčené oligosacharidy		3,1		10,1	
Celkový obsah sacharidů		79,7		80,5	
Minerály		0,2	0,1-0,5	0,9	0,6-2,0
Aminokyseliny, proteiny		0,3	0,2-0,4	0,6	0,4-0,7
Kyseliny		0,5	0,2-0,8	1,1	0,8-1,5
pH		3,9	3,5-4,5	5,2	4,5-6,5

3.3.2.1 Sacharidy

Hlavními sacharidy obsaženými v medu jsou monosacharidy glukóza a fruktóza. Med dále obsahuje přibližně 25 různých oligosacharidů. V květových medech lze nalézt disacharidy, jako sacharóza, maltóza, trehalóza a turanóza, stejně jako některé nutričně významné oligosacharidy – panóza, 1-kestóza, 6-kestóza a palatinóza. Ve srovnání s květovými medy, obsahují medovicové medy vyšší množství oligosacharidů melezitózy a rafinózy.

3.3.2.2 Proteiny, aminokyseliny a enzymy

Med obsahuje přibližně 0,5 % bílkovin, především enzymů, peptidy a volné aminokyseliny. Třemi hlavními enzymy, obsaženými v medu, jsou diastáza (amyláza), rozkládající škrob nebo glykogen na menší cukerné jednotky, invertáza (sacharáza, α -glukosidáza), rozkládající sacharózu na fruktózu a glukózu, a v neposlední řadě glukózaoxidáza, která v přítomnosti kyslíku rozkládá glukózu na peroxid vodíku a glukonolakton.

3.3.2.3 Vitamíny, minerály a stopové prvky

Obsah minerálů a stopových prvků se může v jednotlivých druzích medu výrazně lišit [136]. Například je známo, že medovicové medy přirozeně obsahují vyšší množství minerálů ve srovnání s květovými medy. Avšak celkové množství vitamínů a minerálů, obsažených v medu, je vzhledem k doporučené denní dávce poměrně malé.

Z hlediska výživy obsahuje med důležité stopové prvky (chrom, mangan, selen, zinek, síru, bór, kobalt, molybden a křemík) a makroprvky (sodík, draslík, vápník, hořčík, fosfor) [137]. Dále med obsahuje vitamíny z řady B (B1, B2, B3, B5, B6), vitamín C a K. Mimoto, med obsahuje 0,3–25 mg/kg cholinu a 0,06–5 mg/kg acetylcholin [138]. Cholin je nezbytný pro kardiovaskulární systém a mozek, zatímco acetylcholin působí jako neurotransmitter.

3.3.2.4 Aromatické sloučeniny, chuťové látky a fenolické látky

Senzorické vlastnosti medu jsou důležitým kritériem jak pro výběr spotřebitele, tak pro další použití v potravinářství. Medy nabízí širokou škálu barev i chutí, které jsou dány zejména jejich botanickým původem [139]. Hlavními složkami vytvářející chuť jsou bezesporu cukry. Obecně medy s převahou fruktózy (akácie) jsou chuťově sladší ve srovnání s medy s převahou glukózy (řepka olejka). Aroma medu je ovlivňováno obsahem jednotlivých organických a fenolických kyselin a aminokyselin. V uplynulých desetiletích

byl prováděn rozsáhlý výzkum aromatických látek v medu. Bylo identifikováno více než 500 různých těkavých sloučenin v různých typech medu a jejich obsah se lišil dle botanického původu [140]. Důležitou skupinou sloučenin ovlivňující sensorické vlastnosti jsou fenolické látky. Celkový obsah fenolických látek v medu se pohybuje v koncentracích až 500 mg/kg [141,142]. Nejčastěji zastoupenými fenolickými látkami jsou flavonoidy, fenolické kyseliny a jejich deriváty [143]. Fenolické látky budou podrobně popsány v samostatné kapitole 3.4.

3.3.3 Vliv na lidské zdraví

3.3.3.1 Antimikrobiální, antivirová a antiparazitická aktivita

Med vykazuje inhibující účinky na růst nejrůznějších mikroorganismů a hub. Jeho antimikrobiální účinky, zejména proti grampozitivním bakteriím, byly podrobně popsány v řadě studií [144-147]. Byly ověřeny bakteriostatické a baktericidní účinky pro mnoho nepatogenních, ale i výrazně patogenních kmenů (např. *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella cholerae-suis*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* a mnoho dalších) [144,145]. Mimo jiné byla prokázána schopnost medu inhibovat in vitro virus *Rubeolla* – původce zarděnek [148], tři druhy parazita *Leishmania* [149] a *Echinococcus* [150].

Antimikrobiální účinek medu je dán zejména nízkou aktivitou vody a zároveň přítomností enzymu glukózaoxidázy, který zajišťuje produkci peroxidu vodíku [151]. V medu lze nalézt i další antibakteriální látky neperoxidové povahy, např. aromatické kyseliny [152], fenoly, flavonoidy [153,154] a další zatím neidentifikované látky s různými chemickými vlastnostmi [147]. V neposlední řadě přispívá k antibakteriálním vlastnostem medu i nízké pH [155]. Pro optimální antibakteriální aktivitu by měl být med skladován v chladném, tmavém prostředí a být konzumován v čerstvém stavu.

3.3.3.2 Antioxidační účinky

Termín „oxidativní stres“ popisuje nerovnováhu mezi vznikem volných radikálů a přítomností antioxidačních látek v daném organismu. Předpokládá se, že dostatečnou ochranou proti oxidaci lze zabránit mnohým chronickým onemocněním [156]. Bylo zjištěno, že med zajišťuje významnou antioxidační aktivitu, která je dána mnoha složkami medu: glukózaoxidázou, katalázou, kyselinou askorbovou, flavonoidy, fenolickými kyselinami,

deriváty karotenoidů, organickými kyselinami, produkty Maillardovy reakce, aminokyselinami a proteiny [141,157-166].

3.3.3.3 Protizánětlivé účinky

Protizánětlivé účinky medu byly studovány [167] u lidí po konzumaci 70 g medu. Byla sledována průměrná plazmatická koncentrace zánětlivých markerů, která po konzumaci medu v čase úměrně klesala. Dále byly provedeny studie monitorující vliv medu na snížení zánětlivých procesů ve střevech potkanů [168]. Při léčbě kolitidy dosahoval med obdobných účinků jako protizánětlivý lék prednizol. Předpokládaný mechanismus účinku je prevence tvorby a uvolňování volných radikálů ze zanícených tkání. Snížení zánětu může být způsobeno antibakteriálními účinky medu nebo přímým protizánětlivým účinkem. Druhá hypotéza byla podpořena ve studiích na zvířatech, kde byly protizánětlivé účinky medu pozorovány u ran bez bakteriální infekce [169].

3.3.3.4 Vliv na imunitu a další fyziologické účinky

Konzumace medu stimuluje produkci protilátek během primární a sekundární imunitní reakce. V pokusech na zvířatech [170,171] med vykazoval imunosupresivní účinky, které by mohly vysvětlit hypotézu, že konzumace medu může zmírnit přecitlivělost na pyl. V obdobné studii prováděné na lidech dostávali pacienti stravu doplněnou denní konzumací medu (1,2 g/kg tělesné hmotnosti) [172]. Účinky pozorované v krevním séru byly následující: zvýšení monocytů o 50 %, železa o 20 %, mědi o 33 %, mírný nárůst lymfocytů, eosinofilů, hemoglobinu, objemu buněk, zinku a hořčíku, a dále snížení feritinu (11 %), IgE (34 %), aspartát-transaminázy (22 %), alanin-transaminázy (18 %), dehydrogenázy kyseliny mléčné (41 %), kreatinkinázy (33 %) a cukru nalačno (5 %).

3.3.3.5 Výživa a účinky na zdraví

S ohledem na zdraví ústní dutiny existují debaty, zda je med škodlivý nebo naopak. Některé studie popisují kariogenní účinek medu (vliv na vznik zubního kazu) [173-176] jako výrazně nižší ve srovnání se sacharózou [177]. Vzhledem k antibakteriální aktivitě medu dochází k inhibici růstu bakterií způsobujících zubní kazy [178,179]. Na základě zkoumání za použití elektronového mikroskopu bylo zjištěno, že med nezpůsobuje erozi zubní skloviny, jako k tomu dochází po konzumaci ovocné šťávy [180]. Lze tedy konstatovat, že med pravděpodobně není tak kariogenní jako jiné cukry a v některých může být dokonce karioprotektivní [181,182]. Celkově se však doporučuje po konzumaci medu čistění zubů.

Med má významné účinky také na trávicí systém. Na průjmová onemocnění doporučoval med již prorok Mohamed podle svaté muslimské knihy [183] (8. století n. l.), obdobně jako římský lékař Celsus (25 n. l.) [184]. Existuje množství písemností z východní Evropy a arabských zemí, kde je med doporučován jak pro prevenci, tak k léčbě nejruznějších poruch zažívacího traktu (peptické vředy, gastritida, gastroenteritida) [185-192]. Med je také silný inhibitor růstu bakterie *Helicobacter pylori*, vyvolávající gastritidy a peptické vředy [193-195]. Zajímavostí medu ve vztahu k trávicímu traktu je, že samotné zpracování sacharidů v žaludku po konzumaci medu je výrazně pomalejší ve srovnání se směsí glukózy a fruktózy [196]. Další důležité účinky medu na lidské trávení jsou spojeny s oligosacharidy. Tyto složky medu mají prebiotické účinky [197,198], tzn. ve střevním traktu podporují navýšení počtu bifidobakterií a laktobacilů a zároveň podporují celkový synergický účinek těchto zdravých prospěšných bakterií [199]. Existují i klinické studie na kojencích a malých dětech, kdy konzumace medu zkrátila dobu trvání bakteriálního průjmu [200].

3.4 Fenolické látky

Fenolické látky, jako sekundární metabolity rostlin, jsou řazeny mezi důležité složky sensorické a nutriční kvality ovoce, zeleniny a dalších rostlin [201]. Jedná se o obsáhlou skupinu bioaktivních látek s různými biologickými funkcemi. Fenolické látky ovlivňují sensorické a barevné vlastnosti potravin [202] a zároveň mohou působit jako antioxidanty, antinutriční látky, fytoalexiny [203], lákadla pro opylovače nebo ochranné látky proti UV záření [204]. Tyto bioaktivní vlastnosti hrají důležitou roli při reprodukci a růstu rostlin a také jim poskytují účinnou ochranu proti patogenům a predátorům [205,206].

Fenolické látky hrají neméně podstatnou roli pro člověka, neboť se podílí na ochraně těla proti řadě patologických poruch, jako jsou ateroskleróza, mozkové dysfunkce a rakovina [207]. Kromě toho mají fenolické látky mnoho průmyslových aplikací, například mohou být použity jako přírodní barviva a konzervační látky pro potraviny [208] nebo při výrobě nátěrových hmot, papíru a kosmetiky. Z toho vyplývá, že bylo vyvinuto velké úsilí o charakterizaci fenolických látek přirozeně se vyskytujících v rostlinách [209].

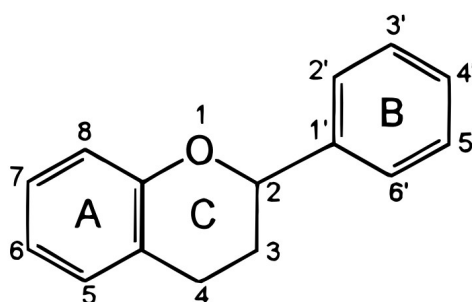
3.4.1 Rozdělení

Fenolické látky tvoří rozmanitou skupinu přibližně 8000 [210] dosud identifikovaných molekul. Můžeme mezi nimi nalézt látky poměrně jednoduchých struktur (deriváty benzenu či fenolické kyseliny), ale i struktury podstatně složitější (ligniny, antokyany,

kumariny a třísloviny). V závislosti na počtu fenolových kruhů a podle dalších substituentů se dělí do několika skupin: flavonoidy, fenolické kyseliny, třísloviny, stilbeny a lignany [211].

3.4.1.1 Flavonoidy

Flavonoidy jsou nízkomolekulární sloučeniny, obsahující patnáct atomů uhlíku, uspořádaných v konfiguraci C₆-C₃-C₆ (obr. 22). Jak je z obr. 22 patrné, struktura flavonoidů se skládá ze dvou aromatických kruhů A a B, které jsou spojeny můstkem se třemi uhlíky, obvykle ve formě heterocyklického kruhu C.



Obr. 22 Obecná struktura flavonoidů [212].

Do dnešní doby bylo identifikováno více než 4000 různých látek, náležících do této skupiny a jejich počet stále roste [211]. Flavonoidy mohou být rozděleny do několika podtříd: anthokyaniny, flavony, isoflavony, flavanony, flavonoly a flavanoly [213]. Flavonoidy jsou velmi důležité antioxidanty, zejména díky jejich vysokému oxidačně-redukčnímu potenciálu, který jim umožňuje působit jako redukční činidla, donory vodíku a tzv. „zhášecí“ singletového kyslíku. Flavonoidy pomáhají chránit rostliny proti UV záření, houbovým parazitům, býložravcům, patogenům a oxidačnímu poškození buněk [214]. Díky několika studiím [214-216] bylo zjištěno, že pravidelnou konzumací flavonoidů došlo ke snížení výskytu nemocí, jako je rakovina a onemocnění srdce. Není tedy divu, že je věnována zvýšená pozornost výzkumu flavonoidů, zejména vzhledem k možnosti zlepšení lidského zdraví prostřednictvím stravy.

3.4.1.2 Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny tvoří asi jednu třetinu fenolů, které mohou být volné či vázané pomocí esterových, etherových nebo acetalových vazeb na různé složky rostlin [217]. Fenolické kyseliny se dělí do dvou podskupin: deriváty kyseliny benzoové (hydroxybenzoové kyseliny) a deriváty kyseliny skořicové (hydroxyskořicové kyseliny) [218].

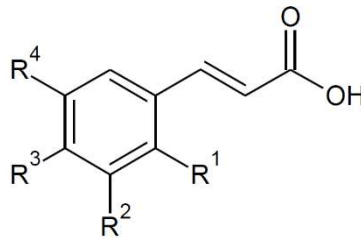
Deriváty kyseliny benzoové mají strukturu C₆-C₁ (obr. 23). Kyseliny hydroxybenzoové jsou v rostlinách obvykle přítomny volné nebo vázané, jako součást komplexních struktur (např. hydrolyzovatelné taniny) [219]. Nejčastěji se vyskytující hydroxybenzoové kyseliny jsou shrnuty v tabulce u obr. 23 [220].



Kyselina	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Benzoová	H	H	H	H
Salicylová	OH	H	H	H
4-hydroxybenzoová	H	H	OH	H
Gentisová	OH	H	H	OH
Protokatechová	H	OH	OH	H
Gallová	H	OH	OH	OH
Vanilová	H	OCH ₃	OH	H
Syringová	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

Obr. 23 Kyselina benzoová a fenolické kyseliny od ní odvozené.

Na druhé straně, deriváty kyseliny skořicové jsou aromatické sloučeniny s tříuhlíkovým postranním řetězcem C₆-C₃ (obr. 24). Hydroxyskořicové kyseliny jsou více běžné než hydroxybenzoové kyseliny. Mezi jejich nejznámější vázané formy patří glykosylované deriváty a estery kyseliny chinové, kyseliny šikimové a kyseliny vinné. Spojením kyseliny kávové a kyseliny chinové vzniká kyselina chlorogenová, která se nachází ve vysokých koncentracích v kávě a mnoha druzích ovoce [218]. Vybrané fenolické kyseliny jsou shrnuty v tabulce u obr. 24 [220].



Kyselina	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Skořicová	H	H	H	H
<i>o</i> -kumarová	OH	H	H	H
<i>m</i> -kumarová	H	OH	H	H
<i>p</i> -kumarová	H	H	OH	H
Kávová	H	OH	OH	H
Ferulová	H	OCH ₃	OH	H
Sinapová	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

Obr. 24 Kyselina skořicová a fenolické kyseliny od ní odvozené.

Třísloviny, nebo-li taniny, jsou sloučeniny s relativně vysokou molekulovou hmotností, které tvoří třetí hlavní skupinu fenolických látek. Třísloviny lze rozdělit do tří podskupin: hydrolyzovatelné taniny, kondenzované taniny a florotanin [221]. Třísloviny mají rozdílné účinky na biologické systémy, jsou potenciálními chelatanty kovových iontů, biologickými antioxidanty a bílkovinnými precipitátory. Vzhledem k jejich různorodé struktuře a širokému biologickému využití není stále zcela jasné, jaké účinky v organismu mají [222].

3.4.1.3 Stilbeny

V lidské stravě je přítomno pouze malé množství stilbenů. Hlavním představitelem stilbenů je resveratrol, který existuje v *cis*- a *trans*-izomerních podobách, většinou v glykosylovaných formách [223]. Stilbeny jsou produkovány rostlinami jako reakce na infekci a patogeny nebo jiné stresové podněty [224]. Stilbeny byly nalezeny ve více než 70 druzích rostlin, včetně hroznů, jahod a arašídů.

3.4.1.4 Lignany

Lignany vznikají oxidační dimerizací dvou fenylypropanových jednotek. V přírodě jsou většinou přítomny ve volné formě, zatímco jejich glykosidové deriváty jsou zastoupeny jen minoritně. Zájem o studium lignanů a jejich syntetických derivátů roste z důvodu potenciální aplikace při onkologických chemoterapiích a díky jejich dalším farmakologickým účinkům [225].

3.4.2 Metody extrakce

Mnoho studií se zaměřuje na extrakci a analýzu fenolických látek v různých rostlinách, včetně ovoce, zeleniny, vína, kávy, čaje, bylin, obilovin a luštěnin [204, 226, 227]. Bohužel vzhledem k obrovské rozmanitosti fenolických látek neexistuje žádný jednotný a standardní postup extrakce. Podobně jako u jiných sloučenin je správné provedení extrakce stěžejním krokem pro následnou identifikaci či kvantifikaci fenolických látek. Hlavním aspektem, který je při extrakci fenolických látek třeba vzít v úvahu, je povaha vzorku. Metody extrakce by měly být navrženy v závislosti na rozdílných strukturních vlastnostech a jejich fyzikálně-chemickém chování. V případě fenolických látek je třeba také rozlišovat, zda chceme extrahovat volnou nebo vázanou formu.

3.4.2.1 Extrakce z kapaliny do kapaliny

Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) je založena na přechodu rozpuštěné látky z jedné kapalně fáze do druhé. Tato metoda může být použita buď k získání požadované látky z roztoku nebo k odstranění nežádoucích nečistot z rozpouštědla. Nejčastěji se využívá kombinace vody (nebo vodného roztoku) a organického rozpouštědla, nemísitelného s vodou. Látky mohou být ve vodné fázi rozpuštěny, emulgovány či suspendovány. Důkladným vytřepáním se vytvářejí dvě zřetelně ohraničené vrstvy, které lze následně snadno oddělit. LLE s využitím organických rozpouštědel [222, 228-232] se pro rozpustné fenolické látky používá poměrně často. Pro stanovení fenolických látek v medu se jako nejvhodnější jeví použití ethylacetátu [233,234], diethyletheru nebo chloroformu. Nevýhodou LLE je nekompatibilita rozpouštědla s chromatografickým stanovením, možnost tvorby nežádoucích emulzí nebo nežádoucí ko-extrakce dalších látek (cukry, organické kyseliny a proteiny). Naopak velkou výhodou této metody je její jednoduchost, možnost volby různých kombinací rozpouštědel a odstranění matričních efektů pro následnou HPLC/MS analýzu.

Existují však také nerozpustné komplexy fenolických látek a polymerů buněčné stěny, které jsou spojeny prostřednictvím esterových nebo glykosidických vazeb. Tyto látky nelze extrahovat organickými rozpouštědly, ale je vhodnější použít kyselou či alkalickou hydrolýzu [235].

3.4.2.2 Extrakce na pevné fázi

Principem extrakce na pevné fázi je rozdělení stanovovaných látek mezi pevnou a kapalnou fázi. Provádí se nanášením většího množství kapalného vzorku na kolonku s vhodným pevným sorbentem. Během tohoto procesu dochází k zachycení a zakoncentrování sledovaného analytu. Poté může být kolonka dle potřeby promyta za účelem odstranění případných balastních látek. Na závěr je provedena eluce analytu vhodným činidlem. SPE je jednou z nejčastěji používaných metod pro extrakci, čištění i zakoncentrování fenolických látek z rostlinných matric [236, 237]. Pro extrakci fenolických látek z medu se používá několik různých postupů. Jednou z možností je adsorbent Amberlite XAD-2 [238-249] s výtěžností 80-90 % [239]. Pro tento postup je vzorek medu smíchán s pěti podíly vody, okyselené na pH 2 pomocí HCl a zfiltrován. Poté je filtrát nanesen do kolonky, kde jsou fenolické látky zadrženy, zatímco cukry a další polárnější sloučeniny jsou vymyty okyselenou vodou. K závěrečné eluci fenolických látek je používán methanol a eluát je poté

vysušen za sníženého tlaku při 40 °C. Alternativním postupem je smíchání filtrátu s částicemi Amberlitu XAD-2 (na magnetické míchačce po dobu 10 minut) před naplněním kolony [238, 244-247]. Před analýzou může být zařazen ještě krok přechištění pomocí LLE. Odparek lze znovu rozpustit v destilované vodě a tento roztok extrahovat diethyletherem s následným vysušením pod dusíkem. Poté je odparek znovu rozpuštěn v methanolu a připraven pro HPLC analýzu filtrací přes membránový filtr s velikostí póru 0,45 µm [238, 244-246]. Další variantou extrakce fenolických látek z medu jsou SPE kolonky obsahující alkylované silikagely (C8, C18) [250]. Pro tuto metodu byly vzorky medu rozpuštěny, extrahovány ethylacetátem a vysušeny [250]. Odparek byl rozpuštěn v okyselené deionizované vodě (pH 3,5) a tento roztok byl nanesen na kolonku Isolute C18 po předchozím promytí methanolem a okyselenou vodou. Adsorbované analyty byly eluovány vodným roztokem methanolu. Eluát byl vysušen pod dusíkem a podroben další analýze.

Výhodou metody je možnost zakoncentrovat stanovovanou látku z původně velkého objemu kapalného vzorku do malého objemu vhodného elučního rozpouštědla, jednoduchost a nenáročnost na vybavení a dále eliminace tvorby emulzí, ke kterým může docházet u LLE. Nevýhodou může být přítomnost kompetitivních procesů během extrakce, přesycení kolonky nebo horší reprodukovatelnost způsobená různou kvalitou sorbentu i od stejného výrobce. Další nevýhodou je možná kontaminace vzorku z kolonky, kterou lze minimalizovat přechozím promytím. Účinnost extrakce je do velké míry ovlivněna volbou vhodného sorbentu a elučního rozpouštědla.

3.4.2.3 Extrakce nadkritickou tekutinou

Při teplotách a tlacích nad kritickým bodem vzniká homogenní kapalina známá jako nadkritická tekutina. V kritickém bodě mají nadkritické tekutiny hustotu blízkou kapalinám a viskozitu podobnou plynům (mohou pronikat přes pevné látky jako plyny a rozpouští materiály jako kapalina). Proto je nadkritická tekutina účinným selektivním rozpouštědlem [251]. Nejčastěji používanou nadkritickou tekutinou je CO₂, protože má nízkou kritickou teplotu ($T_c = 31,1^\circ\text{C}$), je cenově dostupný a netoxický. Jelikož je CO₂ nepolární, není pro polární fenolické látky příliš vhodným rozpouštědlem. Tuto nevýhodu lze řešit přidáním pomocných organických rozpouštědel (např. methanolu, ethanolu nebo acetonu), které zvyšují solvatační sílu CO₂ a výtěžnost extrakce fenolických látek. Extrakce nadkritickou tekutinou pomocí CO₂ v kombinaci s ethanolem nebo methanolem byla použita pro extrakci

fenolických látek z hroznových jadérek [252,253], z vedlejších produktů při výrobě vína [254], z olivových listů [255] či pistáciových slupek [256].

3.4.2.4 Extrakce ultrazvukem

Při extrakci ultrazvukem (USE) jsou využívány zvukové vlny při frekvencích nad hranicí slyšitelnosti lidského ucha (>20 kHz) [257]. Vlivem ultrazvukových vln dochází k rozpadu pevného vzorku a v případě rostlinného materiálu dochází k narušení buněčných stěn. Tento proces umožňuje lepší penetraci rozpouštědla do vzorku a snadnější uvolnění extrahovaných složek. Potenciální komplikace při extrakčním procesu USE mohou souviset především s resorpcí extrahovaných sloučenin na povrch pevného vzorku, zahřívání vzorku (popř. rozpouštědla) a tedy odpaření části extrakčního rozpouštědla. Další nevýhodou je nerovnoměrná distribuce ultrazvukové energie (a její pokles v čase) a z toho vyplývající možný rozklad sledovaných sloučenin, vyskytujících se v místech s velkou energií. Mezi významné parametry, ovlivňující extrakční proces USE, patří zejména intenzita ultrazvukových vln, typ extrakčního rozpouštědla, teplota a tlak. Přesto je USE snadnou, levnou, bezpečnou a ekologickou metodou extrakce, která zvyšuje extrakční účinnost fenolických sloučenin z různých rostlinných zdrojů, zkracuje dobu extrakce a může být také použita pro extrakci termolabilních sloučenin. Jako důkaz tvrzení, že USE je stále atraktivní extrakční metodou, mohou sloužit příklady aplikací publikovaných v posledních letech, např. extrakce fenolických látek z jablečného výlisku [258], medu [259] nebo extrakce saponinů z různých typů ženšenu [260].

3.4.2.5 Mikrovlnná extrakce

Mikrovlnná extrakce (MAE) je velmi pokročilou technikou používanou pro extrakci látek z nejrůznějších rostlinných materiálů. Jedná se o jednu z nejrychlejších extrakčních metod s vysoce efektivní extrakční schopností. Mikrovlnná energie je neionizující elektromagnetická vlna o frekvenci mezi 300 MHz a 300 GHz (v elektromagnetickém spektru se nachází mezi rentgenovým a infračerveným paprskem). Princip MAE je založen na přímém účinku mikrovlny na molekuly vedením iontů a rotací dipólu. Polární molekuly, jako jsou fenolické látky a iontové roztoky, silně absorbují mikrovlnnou energii, protože mají trvalý dipólový moment, což má za následek rychlý vzestup teploty a rychlé dokončení reakce [261-263]. Polarita rozpouštědla je velmi důležitým faktorem, protože rozpouštědla s vysokými dielektrickými konstantami (např. voda) mohou absorbovat více mikrovlnné energie [264]. Bylo zjištěno, že extrahovatelnost fenolických látek je vyšší s využitím

acetonu ve srovnání s methanolem [257]. Míra účinnosti extrakce také závisí na typu extrahovaného rostlinného materiálu a rozpouštědlech použitých pro extrakci [265]. MAE se používá mimo jiné k extrakci fenolických látek z různých rostlinných zdrojů, jako jsou čajové listy, lněná semínka, vanilka [266-269] nebo med [259]. Výhodou MAE je nízká spotřeba rozpouštědla, vyšší rychlost, lepší výtěžnost a možnost extrakce stopových množství. Hlavní nevýhodou MAE jsou vysoké pořizovací náklady a nutnost filtrace vzorku.

3.4.2.6 Enzymaticky asistovaná extrakce

V některých případech je vhodné pro extrakci použít také enzymy. Jedná se zejména o enzymy hydrolyzující škroby (pektináza, celulóza, hemicelulóza a glukonáza). Tyto enzymy mohou účinně rozložit buněčné stěny rostlin a usnadnit tak extrakci fenolických látek [220,270-275]. Bylo popsáno několik konkrétních využití enzymů, např. pektináza byla použita pro zvýšení extrakce polyfenolů z jablečného výlisku [276]. K uvolnění fenolických kyselin z ječmene byly použity alfa-amyláza a celulóza [277] nebo kombinace komerčních enzymů (Viscozyme, Termamyl a Lallzyme) [278]. Extrakce fenolických látek s využitím enzymů mají mnoho výhod oproti konvenčním metodám. Nevýhodou může být vyšší cena enzymů.

3.4.3 Analytické metody

3.4.3.1 Spektrofotometrické metody

Pro stanovení antioxidační aktivity bylo vyvinuto mnoho metod na základě odlišného chemického a biologického mechanismu antioxidantů. Mezi hlavní metody patří: TEAC nebo-li antioxidační aktivita vztažená na ekvivalentní množství látky Trolox, využívající nejčastěji radikály ABTS a DPPH, FRAP (metoda měření antioxidační aktivity, založená na redukci železnatých komplexů), ORAC (metoda měření antioxidační aktivity, založená na eliminaci kyslíkového radikálu) a CUPRAC (metoda měření antioxidační aktivity na principu redukce měďnatého iontu) [279,280]. Pro stanovení celkového množství fenolických látek se používá metoda využívající Folin-Ciocalteuova činidla. Všechny zmíněné testy jsou založeny na různých principech a jsou používány k určení rozličných skupin přítomných fenolických sloučenin, např. v medu [281,282] nebo medovinách [283,284]. Spektrofotometrické metody poskytují užitečné kvalitativní a kvantitativní informace a jsou velmi rozšířené zejména vzhledem k jednoduchosti provedení a nízkým nákladům. Hlavní nevýhodou spektrofotometrických analýz je možnost poskytnout pouze

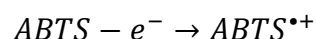
informaci o obsahu antioxidantů, které reagují s danými radikály. Tyto metody neumožňují jednotlivé antioxidanty identifikovat ani kvantifikovat.

Stanovení celkového množství fenolických látek pomocí Folin-Ciocalteuova činidla

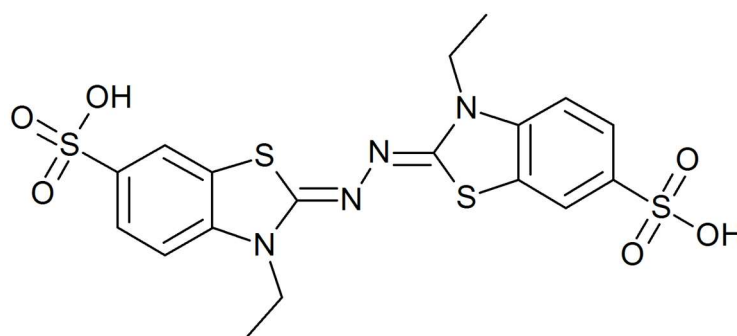
Nejčastěji používanou metodou pro stanovení celkového množství fenolických látek je metoda využívající Folin-Ciocalteuova činidla [201,213]. Tato metoda je založena na oxidačně redukčních vlastnostech fenolických látek, tj. jejich schopnosti poskytovat hydrogenový radikál nebo elektron. Principem metody je oxidace fenolů v alkalickém prostředí při současné redukci fosfowolframového a fosfomolybdenového komplexu za vzniku modrého roztoku (oxidů wolframu (W_8O_{23}) a molybdenu (Mo_8O_{23}) [285,286]. Intenzita absorbance je měřena při 750 nm a vyjadřuje se jako ekvivalentní množství kyseliny gallové [287].

Stanovení celkové antioxidační aktivity pomocí radikálu ABTS

Metoda TEAC je nejpoužívanější metodou stanovení celkové antioxidační aktivity [288]. Pro tuto metodu se nejčastěji používá radikalkationt, který vznikl jednoelektronovou oxidací syntetického chromoforu ABTS (obr. 25).



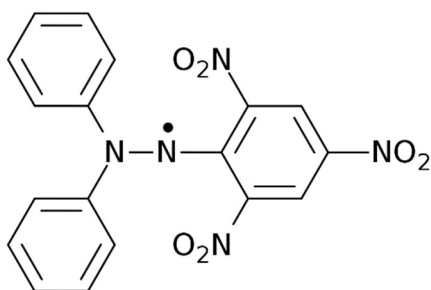
Schopnost antioxidantů zhášet ABTS radikál tak tvoří základ této spektrofotometrické metody pro měření celkové antioxidační aktivity. Míra odbarvení původně intenzivně modrozeleného roztoku je měřena při 734 nm a je závislá nejen na koncentraci antioxidantů, ale také na době trvání reakce. Výsledná koncentrace antioxidantů je vztažena k ekvivalentu Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), jako standardu, měřeného za stejných podmínek.



Obr. 25 Struktura ABTS [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzo-thiazolin-6-sulfonát)].

Stanovení antioxidační aktivity pomocí radikálu DPPH

Tato jednoduchá metoda patří mezi velmi oblíbené nejen pro vědecké účely, ale také v potravinářském průmyslu. DPPH je běžně používaný syntetický radikál, který slouží ke stanovení antioxidační aktivity přírodních i syntetických antioxidantů. Principem metody je reakce stabilního radikálu DPPH s antioxidanty [289], jako donory vodíkového protonu. Při této reakci je radikál 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (obr. 26) redukován na difenylpikrylhydrazin (DPPH-H). Reakce probíhá v organických nebo vodně organických roztocích, kde dochází k odbarvení původně fialového roztoku na světle žlutou. Pokles absorbance je měřen při 515 nm a výsledná koncentrace antioxidantů je opět vztažena k ekvivalentu Troloxu, měřeného za stejných podmínek.



Obr. 26 Struktura radikálu DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl).

3.4.3.2 Chromatografické metody

Vysokoučinná kapalinová chromatografie se řadí mezi nejčastěji používané separační metody. Tato metoda je vhodná pro dělení méně těkavých organických kapalných a pevných látek, rozpustných ve vodě, v organických rozpouštědlech nebo zředěných kyselinách. HPLC vyniká vysokou účinností, dobrou opakovatelností a robustností.

Při použití HPLC jsou vzorky dávkovány dávkovacím ventilem do mobilní fáze (MF). Ta unáší jednotlivé složky vzorku na kolonu, kde dochází k opakovanému ustálení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází (SF) a k separaci analytů dle fyzikálně-chemických vlastností. Po průchodu separační kolonou jsou analyty v mobilní fázi vedeny do detektoru. Měřenou veličinou může být fluorescence, absorbance, index lomu, elektrická vodivost atd. Výstupem z detektoru je grafický záznam závislosti odezvy detektoru na retenčním čase nebo-li chromatogram, na němž se hodnotí plocha nebo výška píku a retenční čas.

Principem HPLC je separace analytů na základě jejich distribuce mezi SF a MF. SF je zpravidla pevná fáze, zakotvená v chromatografické koloně. Jako náplň kolon se používají

polární nemodifikované adsorbenty (silikagel, Al_2O_3) nebo náplně s chemicky vázanými stacionárními fázemi na silikagelovém nosiči. Jako MF se většinou používá voda, organická rozpouštědla a jejich směsi. Volba konkrétních fází vždy závisí na povaze vzorku. Je-li SF polárnější než MF, mluvíme o systémech s normálními fázemi. V opačném případě jde o systém s obrácenými fázemi.

Pro separaci v systémech s obrácenými fázemi volíme jako nepolární SF silikagel modifikovaný vhodným ligandem (-C8, -C18, -CN) a jako polární MF nejčastěji směsí vody či pufru s polárními organickými rozpouštědly (methanol, ethanol, ACN). Molekuly vzorku interagují se SF podle své polaritě – vysoce polární látky interagují se stacionární fází málo či vůbec a jsou eluovány nejdříve a s klesající polaritou látek vzrůstá jejich retence v koloně. K retenci látek dochází na základě jejich hydrofobních interakcí se SF. Zpravidla se pracuje v režimu gradientové eluce, při níž se během analýzy snižuje polarita MF (vyšším přidavkem organické fáze), a tím dochází k rychlejší eluci nepolárních látek z kolony.

V minulosti byly pro separaci fenolických látek používány metody tenkovrstvé [290, 291] a jednoduché kolonové chromatografie. V současné době je však pro separaci a kvantifikaci fenolických látek jednoznačně nejpoužívanější metodou RP-HPLC. Za účelem potlačení disociace fenolických látek se jako MF používá voda s přidavkem kyseliny mravenčí nebo octové (v případě UV detekce lze použít i kyselinu fosforečnou) v kombinaci s organickým rozpouštědlem, např. ACN nebo methanolem. Separace probíhá v koloně naplněné nepolární SF, nejčastěji s vázaným oktadecyl silikagelem (C18). Fenolické látky umožňují použití různých systémů detekce. Nejčastěji bývá využit detektor diodového pole (PDA), který díky možnosti snímat zároveň celé UV-VIS spektrum, poskytuje velmi cenné informace při identifikaci fenolických látek. Detekce pomocí hmotnostní spektrometrie nabízí možnost identifikace fenolických látek na základě molekulové hmotnosti a tím přesné určení jednotlivých struktur fenolických sloučenin [292].

Můžeme nalézt nepřeberné množství studií využívající obě varianty detekce (HPLC/PDA [293-297], HPLC/MS [298-301]). Například bylo provedeno stanovení obsahu fenolických látek v zelenině, ovoci a čaji, využívající HPLC/PDA systém [297]. V rámci této studie byla vyvinuta metoda umožňující stanovení veškerých obsažených fenolických látek najednou. Byly sledovány volné formy z důvodu zabránění rozkladu některých fenolických látek (např. nestabilních antokyanů) během hydrolyzy. Tato metoda umožňuje současné kvantitativní stanovení jednotlivých tříd fenolických látek (flavony, flavonoly, flavanony, katechiny, isoflavony, antokyanidiny, chalkony a antrachinony včetně jejich

glykosidů). Nicméně v důsledku nevýhod nízkého detekčního limitu a citlivosti přináší metoda HPLC/PDA současně i omezení při analýze komplexních matric, jako jsou surové rostlinné extrakty a environmentální vzorky. Proto je vhodné před analýzou provést extrakci, která může zajistit odstranění matrice, balastních látek a zakoncentrování vzorku. Tímto krokem lze výrazně zjednodušit chromatogramy a snížit detekční limity, aby mohly být jednotlivé látky spolehlivě identifikovány a kvantifikovány.

Pro identifikaci a charakterizaci fenolických sloučenin z rostlinných extraktů a potravin je široce používána metoda HPLC/MS s různými iontovými zdroji, jako jsou ionizace elektrosprejem [302], chemická ionizace za atmosférického tlaku [303] nebo ionizace a desorpce laserem za účasti matrice [304]. ESI je jednou z nejvšestrannějších ionizačních technik a je vhodná zejména pro látky polární povahy, tedy i fenolické látky. ESI je šetrná ionizační technika, která v závislosti na vloženém napětí produkuje deprotonované molekuly (analyzované při snímání záporných iontů) nebo protonované molekuly (analyzované při snímání kladných iontů). Pro separaci vzniklých iontů lze využít různé typy analyzátorů: kvadrupól (Q), iontová past, analyzátor doby letu, orbitrap nebo jejich tandemové uspořádání, např. QqQ, QqTOF nebo QqOrbitrap. Analyzátor QqQ je díky možnosti vícenásobné fragmentace a sledování fragmentových iontů vhodný pro kvantitativní analýzu. Analyzátor QqTOF pracuje v poměrně širokém rozsahu m/z (až 20000) a zároveň umožňuje určení velmi přesných hmot a díky tomu je ideální k přesné identifikaci fenolických látek. Analyzátor QqOrbitrap pracuje v menším rozsahu m/z (max 4000), ale zároveň dosahuje ještě přesnějšího rozlišení ve srovnání s QqTOF, je tedy také vhodný k přesné identifikaci fenolických látek.

Pro analýzu fenolických látek je tedy nejvýhodnější volbou tandemová hmotnostní spektrometrie, která umožňuje několikanásobnou fragmentaci a tím přináší velmi důležité strukturní informace a možnost kvantifikace. Obecnou výhodou HPLC/MS jsou velmi nízké detekční limity, schopnost určit molekulovou hmotnost [305] a získat strukturní informace o neznámých sloučeninách [306].

3.5 Experimentální část

3.5.1 Vzorky

V této práci byly porovnávány medoviny zakoupené v obchodech a medoviny získané přímo od včelařů (tabulka 5). Vzorky č. 19-25 (tabulka 5) byly zakoupeny v obchodních řetězcích, případně na trzích. Vzorky č. 1-10 a 31, 36-38 (tabulka 5) byly získány od včelařů, ale je možné je také zakoupit. Ostatní vzorky byly získány od včelařů, kteří si medovinu vyrábí pouze pro vlastní použití.

Tabulka 5 Seznam vzorků medovin.

Číslo vzorku	Výrobce	Název medoviny	Původ
1	Miroslav Zelený	Přibyslavská Letní	získáno od včelaře
2	Miroslav Zelený	Přibyslavská Jarní	získáno od včelaře
3	Miroslav Zelený	Přibyslavská Luční	získáno od včelaře
4	Miroslav Zelený	Přibyslavská Lípa	získáno od včelaře
5	Miroslav Zelený	Přibyslavská Lesní	získáno od včelaře
6	Pleva	Medovina z akátového medu	získáno od včelaře
7	Pleva	Medovina z akátového medu	získáno od včelaře
8	Pleva	Medovina z lesního medu	získáno od včelaře
9	Pleva	Medovina z lesního medu	získáno od včelaře
10	Pleva	Medovina z Potštějna	získáno od včelaře
11	Jiří Mohelník	Medovina Lipová + chmel	získáno od včelaře
12	Jiří Mohelník	Lipová + chmel + zázvor	získáno od včelaře
13	Jiří Mohelník	Slunečnicová	získáno od včelaře
14	Jiří Mohelník	Květová + malverina	získáno od včelaře
15	Vrzáň	Klasická + citron a pomeranč	získáno od včelaře
16	Vrzáň	Klasická + višň, citron, pomeranč	získáno od včelaře
17	Anatol Kucharčuk	Medovina z Tachova	získáno od včelaře
18	Anatol Kucharčuk	Medovina z Tachova – melomela	získáno od včelaře
19	Jan Halada	Medovina Zlatá	zakoupeno
20	Jan Halada	Medovina Klášterní	zakoupeno
21	Medovinka s.r.o.	Medovina „medvědí objetí“	zakoupeno
22	Dalibor Hromčík	Hromčírova hořká – Medovina Elisa	zakoupeno
23	Včelařství Babákov	Medovina originál	zakoupeno
24	-	Festivalová domácí Fojtova medovina	zakoupeno
25	Hrad a zámek Staré Hrady	Starohradská archivní medovina	zakoupeno
26	Gustav Novotný	Bylinná	získáno od včelaře
27	Marián Solčanský	Medovina	získáno od včelaře
28	Josef Syrový	Medovina	získáno od včelaře
29	František Čáp	Přírodní medovina	získáno od včelaře
30	František Plachý	Přírodní medovina	získáno od včelaře
31	Texl a syn	Vranovská medovina	získáno od včelaře
32	Metapis	Domácí jemná medovina	zakoupeno
33	Josef Salaj	Propolisová medovina	získáno od včelaře
34	Antonín Váhala	Přírodní medovina + arónie	získáno od včelaře
35	Včelařství Marada	Medovina višňová	získáno od včelaře
36	Karel Šíma	Medovina bylinkáře Karla (bylinná)	získáno od včelaře
37	Karel Šíma	Medovina bylinkáře Karla (černý rybíz)	získáno od včelaře
38	Karel Šíma	Medovina bylinkáře Karla (přírodní)	získáno od včelaře

3.5.2 Standardy a ostatní chemikálie

Standardy fenolických látek (3,4-dihydroxybenzaldehyd, katechin, epikatechin, rutin, vanilin, taxifolin, myricetin, luteolin, kvercetin, apigenin a dále kyseliny gallová, gentisová, protokatechová, chlorogenová, 4-hydroxybenzoová, kávová, vanilová, syringová, *o*-, *m*- a *p*-kumarová, *trans*-ferulová, *iso*-ferulová, salicylová), acetonitril, kyselina mravenčí, ABTS, Trolox, Folin-Ciocalteovo činidlo a sorbent Amberlite XAD-2 byly zakoupeny od Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dále byly použity tyto chemikálie: peroxodisíran draselný (Laborchemie Apolda, Německo) a uhličitan sodný (Lachner, Neratovice). Deionizovaná voda byla upravena čistícím zařízením Milli-Q (Merck Millipore, Německo).

3.5.3 Přístroje a zařízení

HPLC/MS analýza byla provedena na modulárním kapalinovém chromatografu, složeného ze dvou čerpadel LC-20ADXR, odplyňovací jednotky DGU-5, autosampleru SIL-20ADXR (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) a termostatem pro kolonu LCO-102 (Ecom, Praha), spojeném s hmotnostním spektrometrem QTRAP 4500 (AB SCIEX, Framingham, MA, USA).

3.5.4 Optimalizace HPLC/MS separace

Pro chromatografickou separaci byla zvolena kolona Ascentis Express C18 (150 mm × 3,0 mm × 2,7 μm), vyhřívána na 30°C. Mobilní fáze A: 0,3% HCOOH, mobilní fáze B: acetonitril. Průtok byl optimalizován na 0,6 ml/min, při dávkovaném objemu vzorku 2 μl. Optimální gradient pro separaci jednotlivých složek byl následující: 0 min – 10 % B, 0,1 min – 23 % B, 3 min – 24 % B, 4 min – 50 % B, 5 min – 60 % B, 6 min – 10 % B.

Kvantitativní analýza byla provedena metodou monitorování hmotnostního přechodu vybraných iontů (MRM). Optimalizace MRM přechodu probíhala pro jednotlivé standardy pomocí přímé infúze při snímání záporně nabitých iontů. Iontový zdroj byl nastaven na tyto podmínky: průtoky plynů podílejících se na sušení a rozprášení eluátu: „curtain gas a ion source gases 1 a 2“ byly za tlaku 20 psi, 40 psi a 50 psi, kolizní plyn byl nastaven na střední hodnotu, teplota 400 °C, napětí iontového zdroje -4500 V, vstupní potenciál -10 V. Jednotlivé optimalizované parametry jsou uvedeny v kapitole 3.6.1 v tabulce 6.

3.5.5 Příprava standardů pro kvantifikaci

Standards jednotlivých fenolických látek byly naváženy na analytických vahách a rozpuštěny v methanolu tak, aby jejich koncentrace odpovídala 1 g/l. Tyto zásobní roztoky byly následně naředěny do jedné odměrné baňky na tři různé koncentrační úrovně: 50 µg/ml (3,4-dihydroxybenzaldehyd, epikatechin, rutin, taxifolin a kyseliny: 4-hydroxybenzoová, chlorogenová, syringová, kávová, ferulová), 10 µg/ml (vanilin, myricetin, katechin, kvercetin, luteolin, apigenin a kyseliny: gallová, protokatechová, vanilová, isoferulová, salicylová a *o*-, *m*-, a *p*-kumarová) a 0,5 µg/ml (kyselina gentisová). Z tohoto roztoku byla následně připravena kalibrační řada ve třech kalibračních hladinách 0,01-5 µg/ml pro první skupinu; 0,002-1 µg/ml pro druhou skupinu a 0,1-50 ng/ml pro třetí skupinu.

3.5.6 Optimalizace extrakce

Byly testovány tři různé metody extrakce. Jako první byla zvolena metoda SPE extrakce [299]. Pro tyto účely byla připravena SPE kolonka z 10 ml stříkačky, která byla naplněna vatou (do úrovně 1 ml), následně naplněna sorbentem Amberlite XAD-2 (do úrovně 8 ml) a opět ukončena vrstvou vaty. Takto připravená kolonka byla nejprve promyta 20 ml deionizované vody, poté byl nanesen vzorek medoviny (10 ml). Po protečení veškerého vzorku byla kolonka promyta 10 ml okyselené vody, poté 10 ml deionizované vody. Na závěr byla provedena eluce 10 ml methanolu a eluát byl zcela odpařen pod proudem dusíku. Odparek byl rozpuštěn v 2 ml roztoku 20 % ACN/0,3 % HCOOH (v/v) a zfiltrován pomocí PTFE filtru.

Další zvolenou metodou byla opět SPE, avšak s použitím komerční SPE kolonky plněné oktadecyl silikagelovou fází. Kolonka byla v prvním kroku kondicionována 20 ml methanolu, poté promyta 20 ml deionizované vody a 10 ml okyselené vody. Následovalo nanesení 10 ml vzorku a prosátí pod vakuem. Poté byl vzorek promyt 10 ml okyselené vody do úplného prosátí. Následně byla provedena eluce methanolem (10 ml) a eluát odpařen pod dusíkem. Odparek byl rozpuštěn v 2 ml roztoku 20 % ACN/0,3 % HCOOH (v/v) a zfiltrován pomocí PTFE filtru.

Jako třetí extrakční metoda byla zvolena metoda extrakce z kapaliny do kapaliny. Vzorek byl extrahován v 50 ml centrifugačních zkumavkách. Bylo použito 10 ml vzorku, k němuž bylo přidáno 150 µl 35% HCl pro okyselení na pH 2 a dále 30 ml ethylacetátu. Zkumavka byla uzavřena a umístěna do třepačky na 5 min. Poté byl vzorek centrifugován 5 min při 4000 rpm. Následně byla ze zkumavky odebrána organická vrstva a pod dusíkem

odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn ve 2 ml 20% ACN/0,3% HCOOH a zfiltrován pomocí PTFE filtru.

Pro porovnání byly vzorky také po 10-násobném naředění analyzovány bez extrakce.

3.5.7 Antioxidační aktivita

Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS radikálu

Pro přípravu ABTS radikálu byla rozpuštěna zakoupená tableta (10 mg) v 5 ml deionizované vody ($c = 3,6 \text{ mmol/l}$). K tomuto roztoku bylo přidáno 100 μl roztoku $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ o koncentraci 0,064 mol/l. Takto připravená reakční směs byla ponechána 12-16 hodin bez přístupu světla. Před použitím byl roztok naředěn tak, aby výsledná hodnota absorpance (při vlnové délce 734 nm) dosahovala přibližně 0,8.

Analýza antioxidační aktivity v medovinách probíhala ve 4 ml vialkách. Ke 3 ml pracovního roztoku ABTS bylo přidáno 100 μl medoviny. Úbytek absorpance byl měřen po 10 minutách při vlnové délce 734 nm. Antioxidační aktivita medovin byla vyjádřena v procentech a přepočítána pomocí kalibrační křivky na TEAC.

Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH radikálu

Zásobní roztok byl připraven navážením 0,0158 g 2,2-difenyl-1-pikylhydrazylu do 25 ml odměrné baňky a rozpuštěním v methanolu. Tento výchozí roztok byl před použitím ředěn methanolem tak, aby jeho absorpance (při vlnové délce 515 nm) dosahovala přibližně 0,8-0,9.

Analýza antioxidační aktivity v medovinách probíhala opět ve 4 ml vialkách. Ke 3 ml pracovního roztoku DPPH bylo přidáno 200 μl medoviny. Po důkladném promíchání probíhala inkubace bez přístupu světla po dobu 30 min. Úbytek absorpance byl měřen při vlnové délce 515 nm. Antioxidační aktivita medovin byla vyjádřena v procentech a přepočítána pomocí kalibrační křivky na TEAC.

Stanovení celkového obsahu fenolických látek pomocí Folin-Ciocalteuova činidla

Pracovní roztok byl připraven naředěním 2 M Folin-Ciocalteuova činidla s vodou v poměru 1:9. Dále byl připraven 7,5% roztok uhličitanu sodného (m/v).

Stanovení obsahu fenolických látek probíhalo ve 4 ml vialkách smísením 1 ml pracovního roztoku a 1 ml deionizované vody a 50 μl vzorku medoviny. Tato výchozí směs byla inkubována bez přístupu světla po dobu 5 min. Poté byl k reakční směsi přidán 1 ml

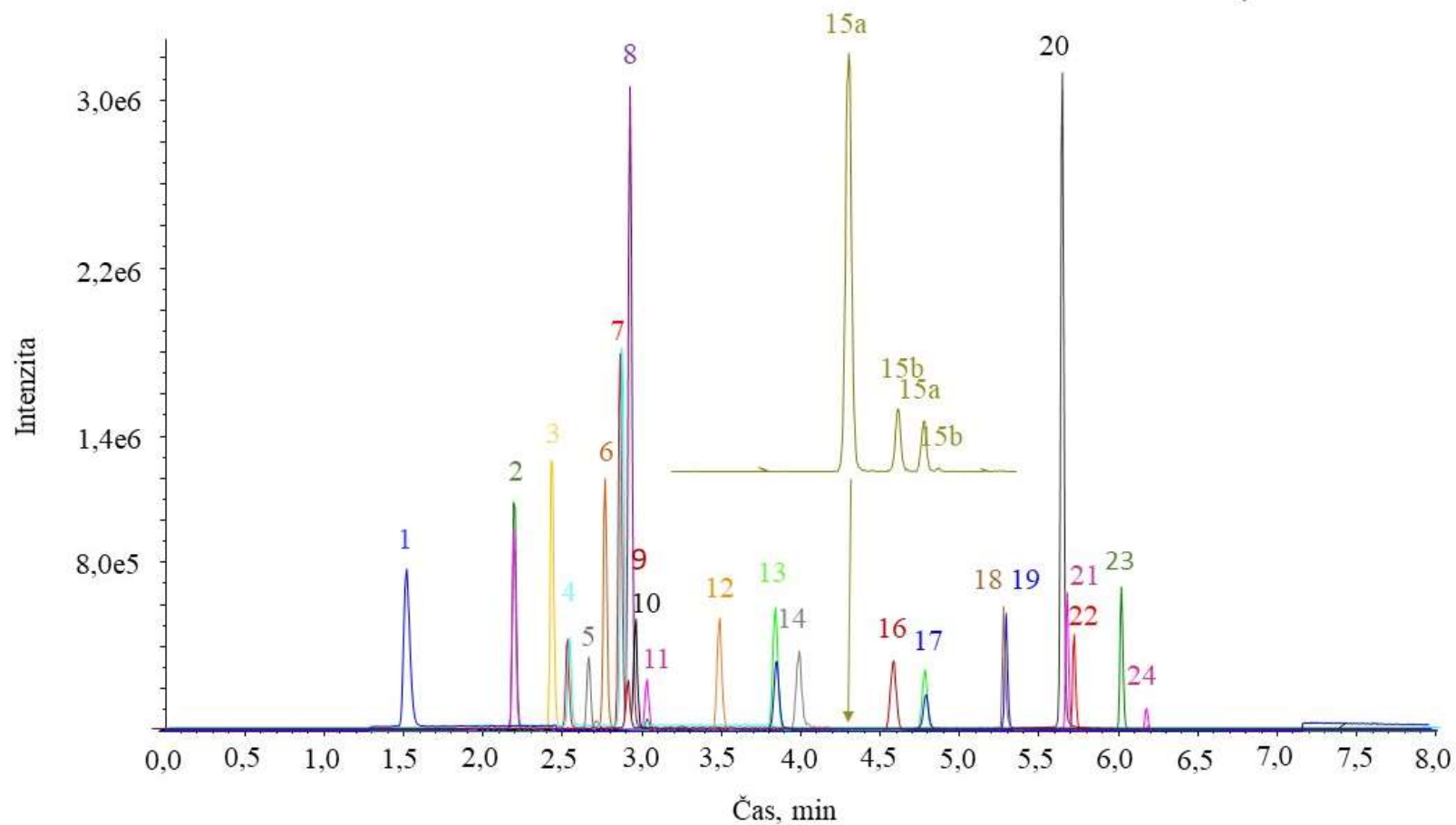
roztoku Na_2CO_3 . Takto připravená směs byla ponechána bez přístupu světla dalších 30 min. Následně byla ihned změřena absorbance při vlnové délce 750 nm. Výsledná koncentrace antioxidantů byla vztažena k ekvivalentu kyseliny gallové, měřené za stejných podmínek (GAE).

3.6 Výsledky a diskuze

3.6.1 Optimalizace HPLC/MS separace

Celkem bylo vybráno 24 fenolických látek, které jsou v medu a potažmo medovinách nejčastěji zastoupeny. S cílem pro budoucí rutinní použití byla vyvíjena separace v nejkratším možném čase s minimální koelucí jednotlivých fenolických látek. Optimalizace separace byla provedena na koloně Ascentis Express C18, obsahující povrchově porézní částice. Bylo optimalizováno hned několik faktorů separace (strmost gradientu, obsah HCOOH v mobilní fázi a počáteční koncentrace ACN). Vzhledem k obsahu polárních složek ve vzorcích, byl nastaven gradient tak, aby první látka, tj. kyselina gallová, eluovala přibližně minutu za mrtvým objemem kolony. Strmost gradientu byla volena tak, aby byly důkladně odděleny látky se stejnou molekulovou hmotností, respektive se stejným MRM přechodem, jelikož tyto látky nemohou být rozlišeny pomocí hmotnostní spektrometrie. Optimálního gradientu bylo dosaženo během šestiminutové chromatografické separace (bližší popis v kapitole 3.5.4). Optimalizované parametry jednotlivých látek jsou uvedeny v tabulce 6. Jako mobilní fáze A byla zvolena 0,3% HCOOH , mobilní fáze B tvořil acetonitril s počáteční koncentrací 10 %. Optimalizovaná chromatografická separace je zobrazena na obr. 27.

V další části byla optimalizována detekce fenolických látek pomocí hmotnostního spektrometru Q-TRAP. Pro vysokou citlivost a zároveň selektivitu byla zvolena metoda MRM. Pro každou z vybraných látek bylo nutné optimalizovat veškeré nezbytné parametry, jako jsou deklasterační potenciál (DP), kolizní energie (CE) a výstupní potenciál kolizní cely (CXP). Při správném nastavení těchto parametrů lze dosáhnout velmi nízkých limitů detekce a zároveň vysoké citlivosti. Jednotlivé optimalizované parametry pro námi vybrané látky jsou shrnuty v tabulce 6.



Obr. 27 Chromatografická separace 24 vybraných standardů fenolických látek.

1 – kyselina gallová, 2 – kyselina protokatechová, 3 – kyselina chlorogenová, 4 – katechin, 5 – 3,4-dihydroxybenzaldehyd, 6 – kyselina 4-hydroxybenzoová, 7 – epikatechin, 8 – kyselina kávová, 9 – kyselina vanilová, 10 – kyselina syringová, 11 – kyselina gentisová, 12 – rutin, 13 – kyselina *p*-kumarová, 14 – vanilin, 15 – isomery kyseliny ferulové (15a-*trans*-, 15b-*cis*-forma), 16 – taxifolin, 17 – kyselina *m*-kumarová, 18 – kyselina *o*-kumarová, 19 – myricetin, 20 – kyselina salicylová, 21 – luteolin, 22 – kvercetin, 23 – apigenin, 24 – hesperetin

Podmínky: kolona Ascentis C18 (150 mm × 3,0 mm × 2,7 μm), mobilní fáze: A: 0,3 % HCOOH, B: ACN, průtok: 0,6 ml/min, teplota: 30 °C, dávkování 2 μl, detekce: MS/MS-MRM mód.

Tabulka 6 Optimalizované parametry pro HPLC/MS/MS analýzu.

Látka	Označení	Čas [min]	Q1 <i>m/z</i>	Q3 <i>m/z</i>	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
Kyselina gallová	1	1,56	168,70	124,90	-80	-20	-9
Kyselina protokatechová	2	2,19	152,90	108,97	-70	-22	-9
Kyselina chlorogenová	3	2,43	352,80	190,80	-60	-30	-9
Katechin	4	2,53	288,85	244,91	-95	-22	-7
3,4-dihydroxybenzaldehyd	5	2,71	136,80	107,90	-90	-30	-9
Kyselina 4-hydroxybenzoová	6	2,76	136,85	92,90	-5	-24	-7
Epikatechin	7	2,81	288,80	244,90	-110	-24	-9
Kyselina kávová	8	2,92	178,80	134,90	-80	-22	-9
Kyselina vanilová	9	2,98	166,90	107,90	-60	-30	-9
Kyselina syringová	10	3,00	196,90	122,90	-75	-32	-8
Kyselina gentisová	11	3,03	152,80	107,90	-50	-30	-9
Rutin	12	3,53	608,80	299,80	-130	-50	-5
Kyselina <i>p</i> -kumarová	13	3,88	162,80	118,91	-65	-24	-9
Vanilin	14	4,03	150,90	136,00	-55	-20	-8
Kyselina ferulová (<i>cis/trans</i> isomery)	15	4,34	192,80	133,90	-75	-24	-9
Taxifolin	16	4,63	302,80	284,90	-80	-18	-9
Kyselina <i>m</i> -kumarová	17	4,82	162,81	118,90	-65	-24	-9
Kyselina <i>o</i> -kumarová	18	5,31	162,80	118,90	-65	-24	-9
Myricetin	19	5,32	316,80	150,80	-100	-34	-7
Kyselina salicylová	20	5,69	136,80	92,90	-35	-24	-9
Luteolin	21	5,72	284,70	132,90	-160	-40	-6
Kvercetin	22	5,76	300,80	150,70	-100	-32	-11
Apigenin	23	6,00	268,80	116,90	-90	-40	-6

Q1 – *m/z* izolované na prvním kvadrupólu, Q3 – *m/z* sledované na třetím kvadrupólu. DP – deklasterační potenciál, CE – kolizní energie, CXP – výstupní potenciál kolizní cely

3.6.2 Parametry pro kvantifikaci

Pro kvantitativní stanovení byla zvolena metoda kalibrační křivky. Jednotlivé kalibrační roztoky byly měřeny na deseti koncentračních hladinách. Regresní diagnostika byla provedena v programu QC Expert 3.3 (TriloByte, ČR). Nejprve byla provedena kritika dat s následným využitím grafických diagnostik (Pregibonův graf, Williamsův graf, L-R graf, Jacknife rezidua a McCulloh-Meterův) na odhalení a odstranění vlivných bodů. Na závěr byla aplikována kritika metody a modelu na hladině významnosti 95 %. Na základě těchto testů nebyly ve většině případů do výpočtu regresní závislosti zahrnuty body odpovídající nejnižší a nejvyšší koncentraci. Významnost regresních parametrů byla testována pomocí Studentova t-testu. Regresní parametry lineární závislosti ploch pod píkem na koncentraci látek vyjádřené v ng/ml (úsek a směrnice) jsou uvedeny spolu s vypočtenými směrodatnými odchylkami v tabulce 7. Dále jsou zde uvedeny koeficienty determinace (R^2), meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ). LOD bylo stanoveno jako trojnásobek odstupu signálu od šumu a LOQ jako desetinásobek odstupu signálu od šumu. Ve většině případů je limit kvantifikace v oblasti mezi prvním a druhým nejnižším kalibračním standardem. Vzhledem k vyloučení nejnižšího kalibračního standardu z výpočtu kalibrační závislosti lze konstatovat, že využitelný rozsah kalibrace se nachází nad limitem kvantifikace.

Získané regresní parametry byly dále využity na kvantifikaci sledovaných fenolických látek v 38 vzorcích medovin. Z důvodu velkého množství dat nejsou naměřené obsahy jednotlivých fenolických látek součástí této práce. V kapitole 3.6.4 bude následně popsána statistická analýza těchto dat.

Tabulka 7 Regresní parametry, meze detekce a stanovitelnosti pro jednotlivé fenolické látky.

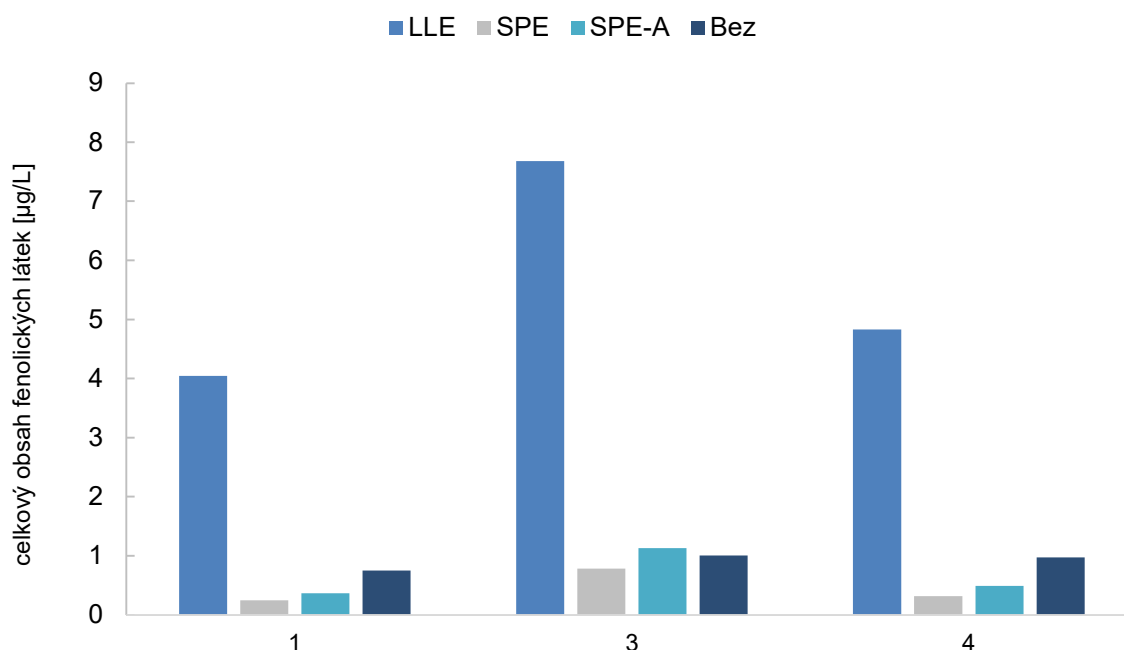
Látka	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]	Směrnice	Úsek	R ²
Kyselina gallová	0,714	5,714	759900 ± 8000	-17933 ± 2166	0,9984
Kyselina protokatechová	0,387	1,290	1720194 ± 11469	-3207 ± 2613*	0,9994
Kyselina chlorogenová	2,000	6,666	381307 ± 6313	-6644 ± 6366*	0,9962
Katechin	2,800	9,333	102700 ± 1300	-221 ± 338*	0,9973
3,4-dihydroxybenzaldehyd	3,031	10,10	239644 ± 3195	16789 ± 4039*	0,9972
Kyselina 4-hydroxybenzoová	11,90	39,69	809862 ± 15947	47548 ± 16081*	0,9946
Epikatechin	14,28	47,61	128922 ± 1491	-6166 ± 1863	0,9980
Kyselina kávová	4,489	14,96	2746567 ± 37176	93369 ± 47001*	0,9971
Kyselina vanilová	2,589	8,630	6130 ± 53	392 ± 11	0,9996
Kyselina syringová	194,4	648,1	6913 ± 153	-17 ± 154*	0,9931
Kyselina gentisová	0,517	1,709	2517 ± 54	-1946 ± 551	0,9934
Rutin	4,569	15,22	260652 ± 4370	-8805 ± 4406	0,9961
Kyselina <i>p</i> -kumarová	2,719	9,065	2303309 ± 45292	-17058 ± 9134*	0,9946
Vanilin	7,352	24,48	86663 ± 448	32 ± 120*	0,9996
Kyselina ferulová	11,83	39,44	81561 ± 1120	-2287 ± 1129*	0,9974
Kyselina isoferulová	3,120	10,40	70167 ± 615	-359 ± 165*	0,9989
Taxifolin	10,25	34,19	386374 ± 1103	3192 ± 1257	0,9989
Kyselina <i>m</i> -kumarová	5,014	16,71	1175366 ± 23825	-7317 ± 4805*	0,9943
Myricetin	9,454	15,22	260652 ± 4370	-8805 ± 4406*	0,9961
Kyselina salicylová	0,469	1,563	10726112 ± 143053	-42619 ± 36171*	0,9972
Luteolin	0,960	3,200	332701 ± 3741	946 ± 2605	0,9980
Kvercetin	0,686	2,286	1809675 ± 27181	-135794 ± 5478	0,9986
Apigenin	0,124	0,412	2240123 ± 32223	13566 ± 2711	0,9983

*absolutní člen je na hladině významnosti 95 % nevýznamný (P > 0,05)

3.6.3 Optimalizace extrakce

V rámci optimalizace procesu extrakce fenolických látek byly testovány různé přístupy na vybraných vzorcích. Nejprve byla použita metoda popsaná v literatuře [299] s využitím vlastnoručně vyráběných SPE kolonek se sorbentem Amberlite XAD-2. Dále byly použity komerční SPE kolonky s oktadecyl silikagelovou stacionární fází. Jako třetí varianta byla zvolena extrakce z kapaliny do kapaliny za použití ethylacetátu jako extrakčního činidla. Pro porovnání byly vzorky analyzovány také bez extrakce. Na obr. 28 je sloupcový graf popisující sumu sledovaných fenolických látek získaných jednotlivými metodami extrakce ve vybraných vzorcích.

Obě varianty SPE poskytly přibližně obdobné množství fenolických látek s tím, že sorbent Amberlite XAD-2 poskytoval mírně lepší výsledky. Mírně vyšší obsah fenolických látek, než SPE poskytla analýza bez extrakčního kroku. Výjimku tvoří vzorek 3, kde byla metoda SPE-A mírně vyšší než bez extrakce. Jako jednoznačně nejúčinnější extrakční metoda se ukázala extrakce z kapaliny do kapaliny. Z tohoto důvodu byla později použita pro všechny vzorky medovin.



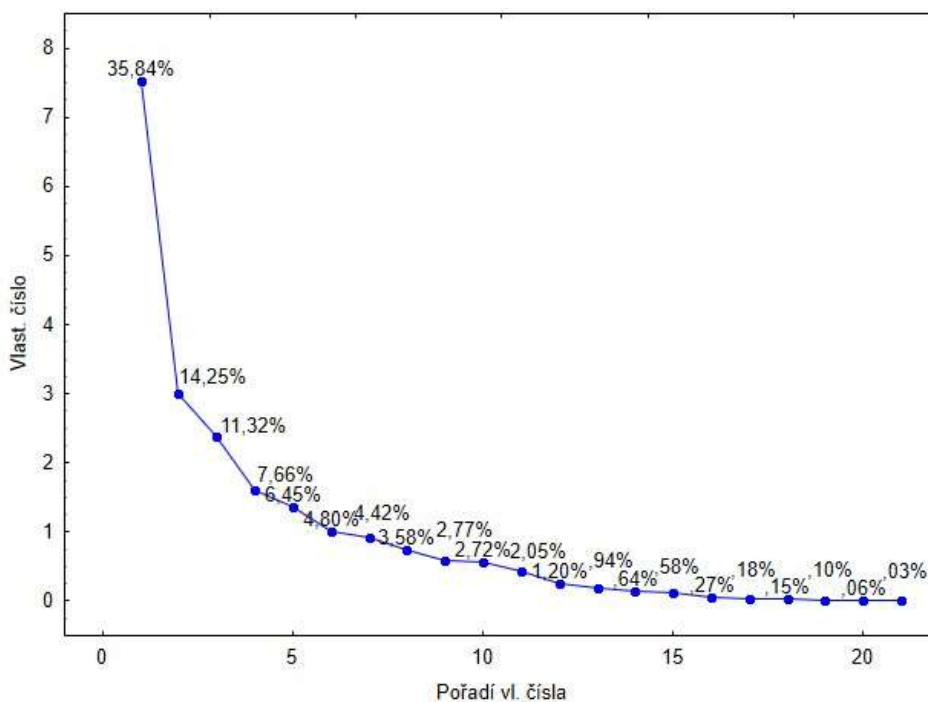
Obr. 28 Porovnání vlivu různých metod extrakce na celkové množství extrahovaných sledovaných fenolických látek ve vybraných vzorcích medovin (č. 1, 3, 4).

LLE – extrakce z kapaliny do kapaliny, SPE – extrakce na pevné fázi, SPE-A – extrakce na pevné fázi se sorbentem Amberlite, Bez – analýza bez extrakce

3.6.4 Statistická analýza

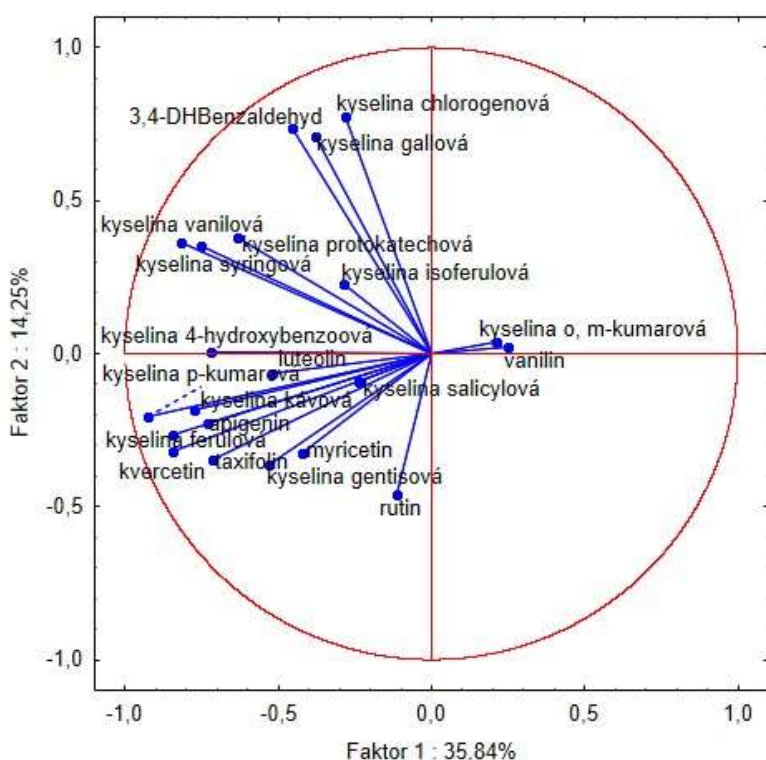
Data naměřená pomocí HPLC/MS/MS byla zpracována pomocí statistického programu STATISTICA (StatSoft, ČR). Pro hodnocení sledovaných vzorků medovin byla vybrána analýza hlavních komponent (PCA), která umožňuje snížit variabilitu do méně dimenzí s minimální ztrátou informací. Tato metoda slouží k lepšímu pochopení vztahu mezi proměnnými a nalezení odlehklých hodnot.

Cattelův indexový graf úpatí zobrazuje relativní velikost jednotlivých vlastních čísel a slouží k určení významných hlavních komponent. V ideálním případě je vhodné vybírat komponenty s hodnotou vlastních čísel vyšší než 1 s co nejvyšším celkovým procentuálním pokrytím sledovaného systému. V případě, že pro popis systému je použito velké množství proměnných, existuje také velké množství komponent a záleží, do jaké míry jednotlivé komponenty přispívají k popisu systému. V praxi se snažíme najít dvě nebo tři komponenty, které co nejvíce popisují systém, optimálně více než 75 % systému. V našem případě první tři komponenty vykazují pokrytí přibližně 61,5 % (obr. 29), což není mnoho, a proto je nutné redukovat redundantní proměnné, které korelují nebo mají na popis systému malý vliv. Vliv jednotlivých proměnných na popis systému je vidět z grafů komponentních vah, uvedených na obr. 30-32.

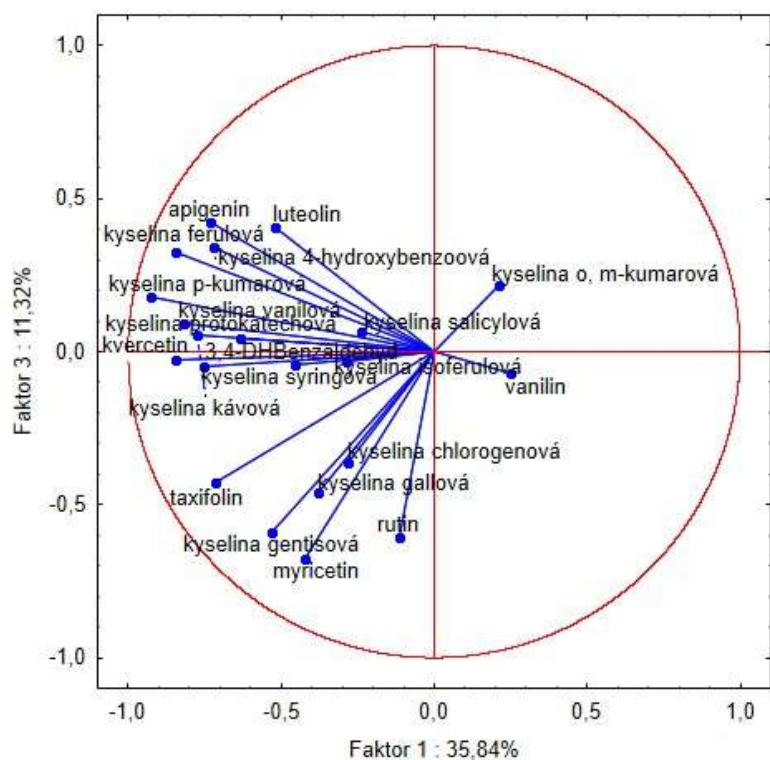


Obr. 29 Cattelův indexový graf úpatí pro všechny komponenty (STATISTICA, StatSoft).

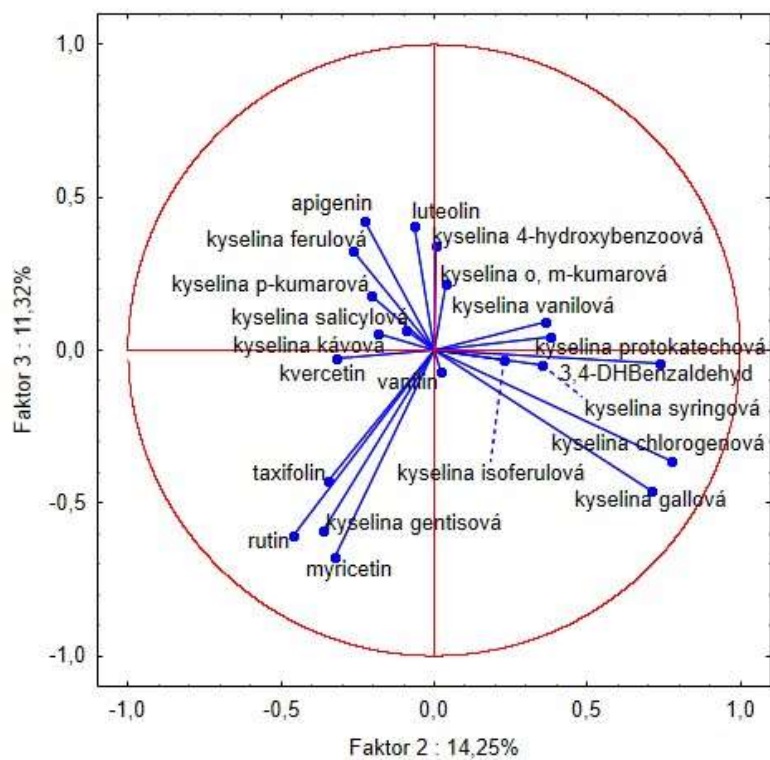
Obecně graf komponentních vah udává míru korelace mezi jednotlivými proměnnými. V tomto typu grafu jsou porovnávány vzdálenosti mezi průvodiči jednotlivých proměnných. Malá vzdálenost mezi jednotlivými průvodiči značí silnou korelaci. Pokud jsou průvodiče ve vzájemném úhlu 90° , vykazují nulovou korelaci. Vzájemný úhel 180° značí negativní korelaci. Délka průvodiče odpovídá jeho důležitosti. Na obr. 30-32 je zobrazena projekce proměnných do faktorové roviny (1-2, 1-3 a 2-3). Na základě tohoto zobrazení byly postupně vyloučeny proměnné s krátkými průvodiči, které vykazují nižší důležitost a proměnné, které korelují s další významnější proměnnou.



Obr. 30 Graf komponentních vah – projekce proměnných do faktorové roviny 1-2 (STATISTICA, StatSoft).

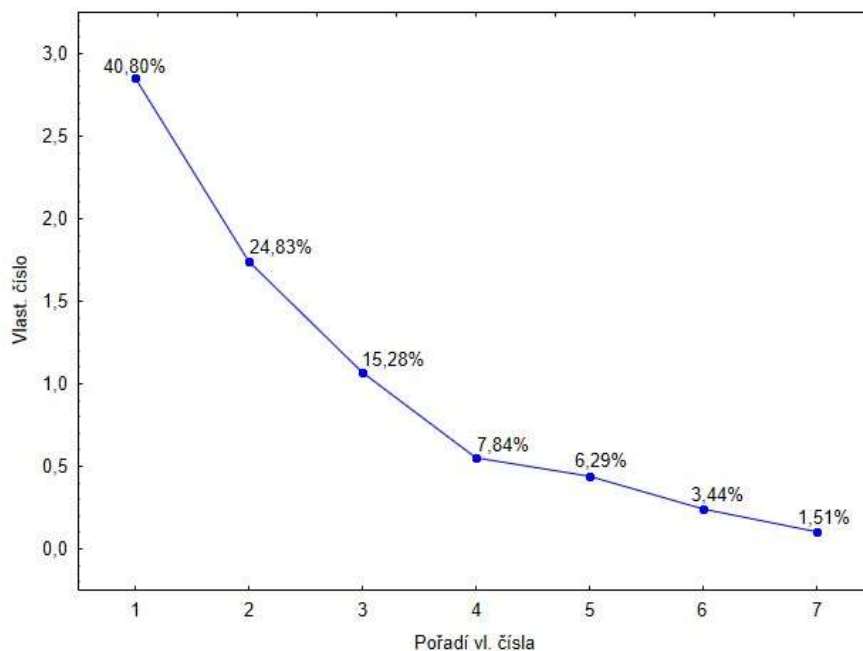


Obr. 31 Graf komponentních vah – projekce proměnných do faktorové roviny 1-3 (STATISTICA, StatSoft).

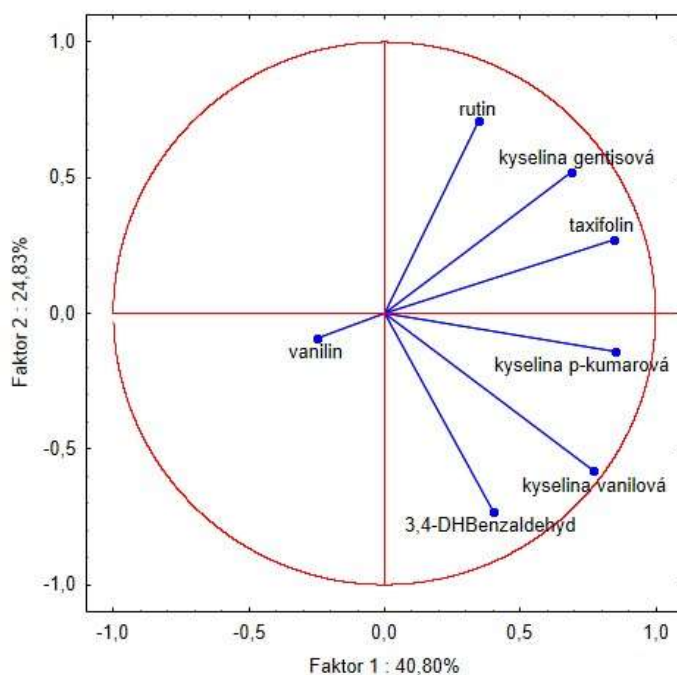


Obr. 32 Graf komponentních vah – projekce proměnných do faktorové roviny 2-3 (STATISTICA, StatSoft).

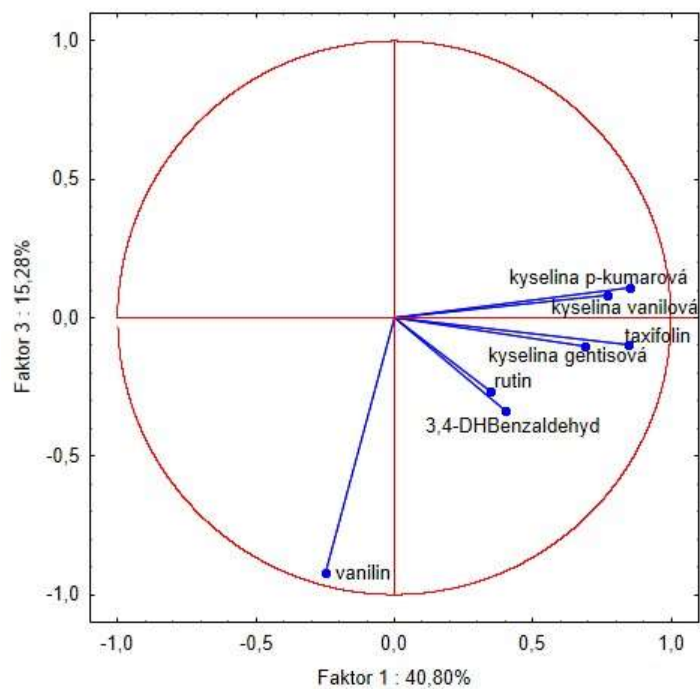
Na obr. 33 je uveden Cattelův indexový graf úpatí po odstranění redundantních proměnných. Jak je z obrázku patrné, pro celkový popis systému stačí sedm proměnných, přičemž první tři komponenty (vlastní číslo větší než 1) vykazují pokrytí již 80,9 %. Na obr.34-36 jsou uvedeny grafy komponentních vah po odstranění redundantních proměnných.



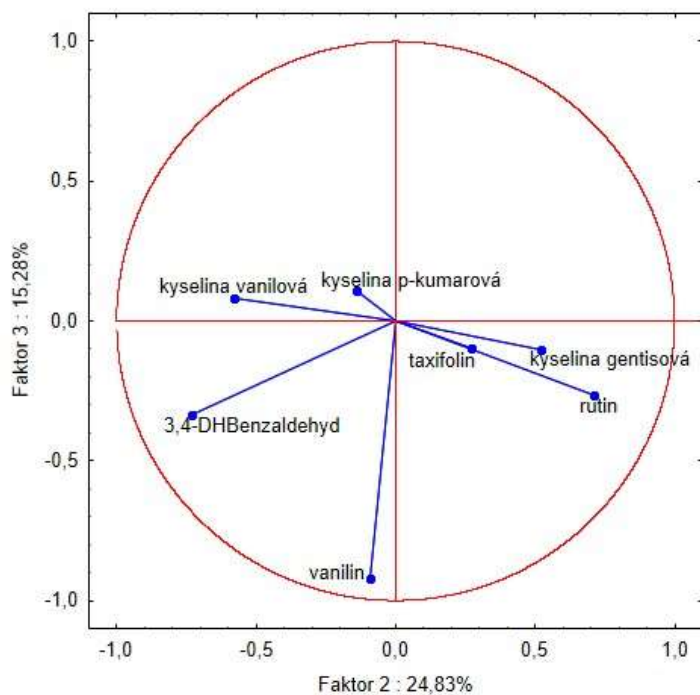
Obr. 33 Cattelův indexový graf úpatí po odstranění redundantních proměnných (STATISTICA, StatSoft).



Obr. 34 Graf komponentních vah po odstranění redundantních proměnných – projekce proměnných do faktorové roviny 1-2 (STATISTICA, StatSoft).



Obr. 35 Graf komponentních vah po odstranění redundantních proměnných – projekce proměnných do faktorové roviny 1-3 (STATISTICA, StatSoft).



Obr. 36 Graf komponentních vah po odstranění redundantních proměnných – projekce proměnných do faktorové roviny 2-3 (STATISTICA, StatSoft).

Rozptylový diagram komponentního skóre zobrazuje objekty dokonale rozptýleny v rovině. Následně lze nalézt shluky podobných objektů a objekty odlehlé (silně odlišné od ostatních). Grafy komponentního skóre na obr. 37-39 zobrazují několik shluků (vzorků si vzájemně podobných), ale i některé velmi odlehlé body (vzorky, které se významně liší od ostatních).

Prvním odlehlým bodem, na obr. 37-39 označeným zeleně, je vzorek 37. V tomto vzorku byl ve srovnání s ostatními vzorky naměřen extrémně vysoký obsah kyseliny gentisové, *p*-kumarové a taxifolinu, které dle grafů komponentních vah (obr. 34-36) mají výrazně pozitivní korelaci s faktorem 1 a v případě kyseliny gentisové i s faktorem 2. Jedná se o medovinu kvašenou s přídavkem šťávy z černého rybízu. Je tedy velice pravděpodobné, že takto vysoké obsahy již zmíněných, ale i dalších fenolických látek jsou způsobeny obohacením šťávou z černého rybízu.

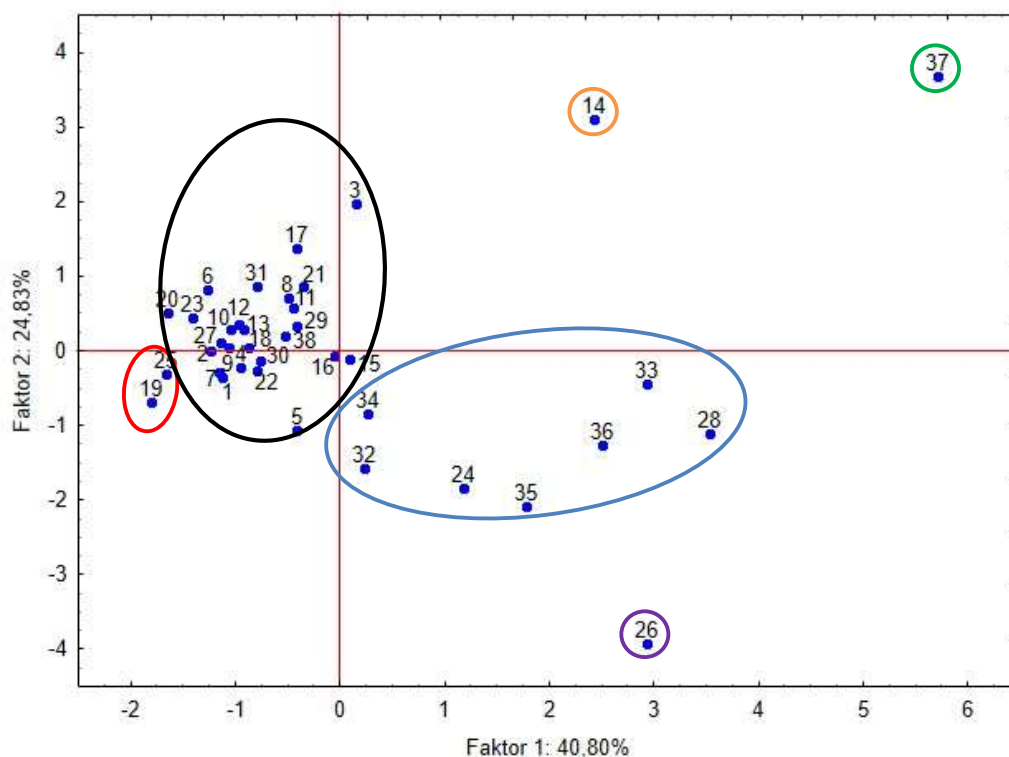
Dalším odlehlým bodem je vzorek č. 14, na obr. 37-39 označený oranžově. Na grafech komponentního skóre je tento bod zobrazen ve stejném směru jako vzorek 37. I v tomto vzorku byl ve srovnání s ostatními naměřen velmi vysoký obsah kyseliny gentisové (srovnatelný se vz. 37) a taxifolinu a dále vyšší obsah kyseliny *p*-kumarové a dalších. Tyto fenolické látky se nachází přirozeně i v medu. Jelikož se ale jedná o medovinu, která byla kvašena s přídavkem malveriny, nebo-li šťávy z vinné révy, je v tomto případě navýšení opět způsobeno obohacením ovocnou šťávou, která výše zmíněné látky obsahuje ve velkém množství.

Posledním odlehlým bodem je vzorek č. 26, na obr. 37-39 označen fialově. Z grafů komponentního skóre vyplývá, že tento vzorek koreluje pozitivně s faktorem 1 díky vyššímu obsahu taxifolinu a kyseliny gentisové a negativně s faktorem 2 díky velmi vysokému obsahu 3,4-hydroxybenzaldehydu. Medovina byla připravena s příměsí bylin, díky nimž byly v tomto vzorku naměřeny vysoké obsahy téměř všech sledovaných fenolických látek.

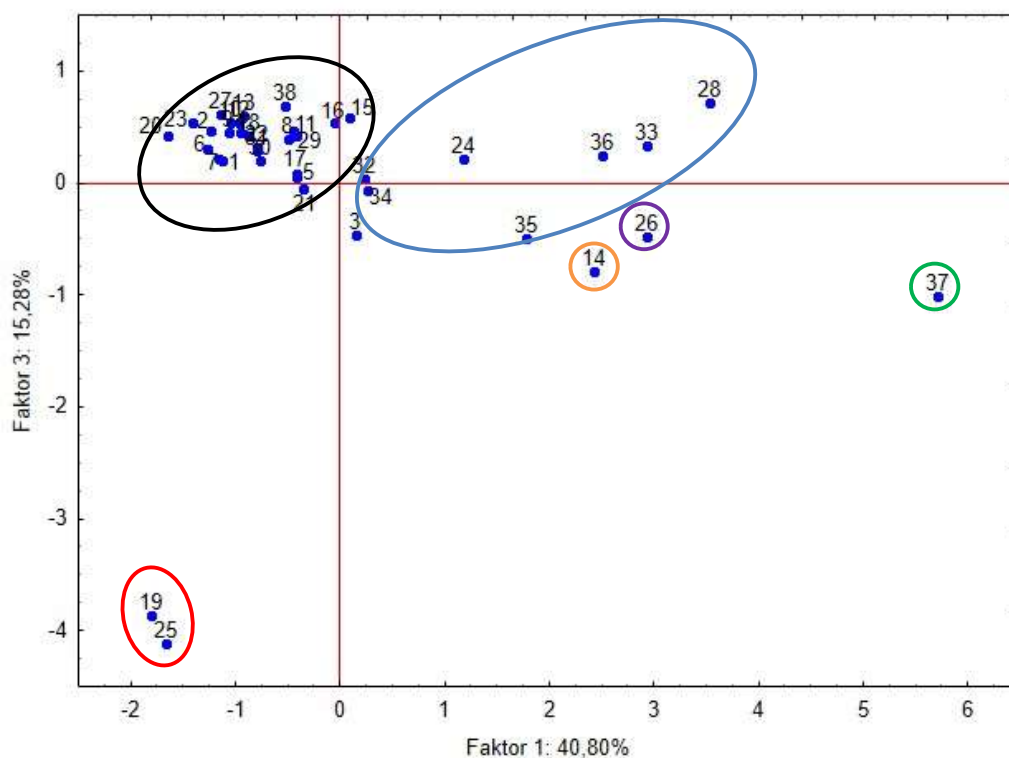
Červeně označená dvojice odlehlých bodů č. 19 a 25 (obr. 38, 39) popisuje vzorky, kde byl naměřen neobvykle vysoký obsah vanilinu, který výrazně koreluje s faktorem 3. Zároveň takto vysoký obsah vanilinu v medovinách není přirozeně možný, je tedy zřejmé, že byl do medovin přidán syntetický vanilin. U těchto dvou vzorků byl naměřen také výrazně nižší obsah ostatních fenolických látek a je tedy pravděpodobné, že tyto medoviny nebyly vyrobeny z dostatečného množství medu, které je dáno vyhláškou.

Modrý shluk popisuje medoviny, které byly při přípravě obohaceny bylinami nebo ovocnými šťávami, ale pravděpodobně v menší míře než ve výše popsanych vzorcích. Proto mají také vyšší obsah fenolických látek a statisticky byly vyhodnoceny jako podobné.

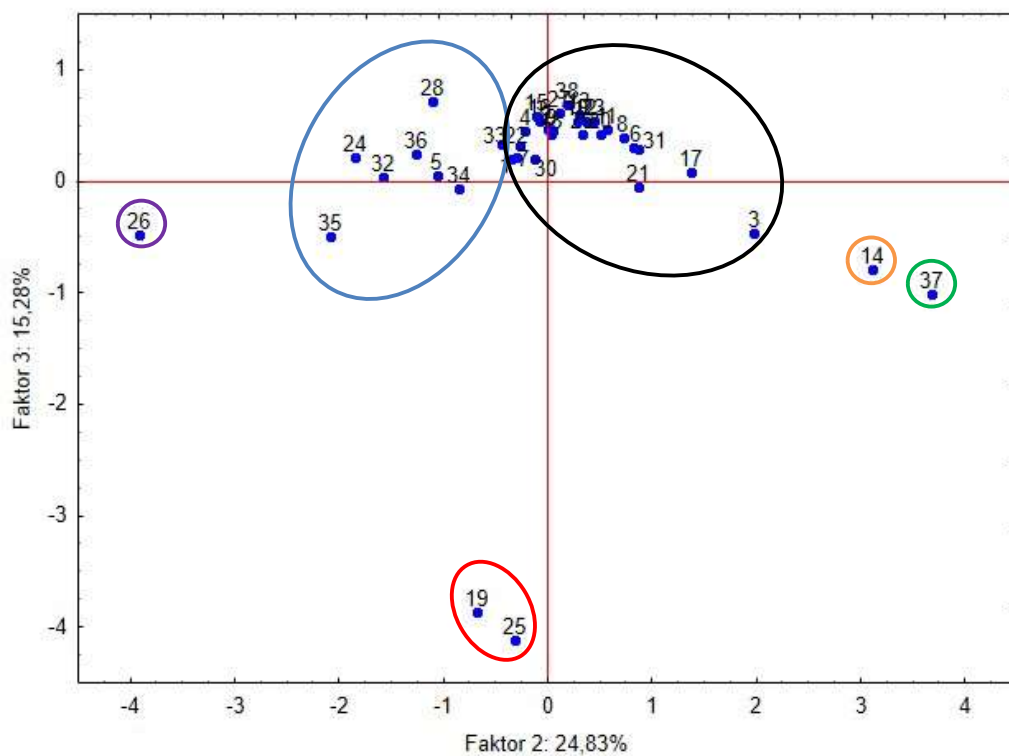
Poslední (černě označený) shluk tvoří ostatní medoviny, které byly pravděpodobně kvašeny pouze z medu bez dalších přísad nebo se šťávami, s nižším obsahem fenolických látek.



Obr. 37 Graf komponentního skóre po odstranění redundantních proměnných – projekce případů do faktorové roviny 1-2 (STATISTICA, StatSoft).



Obr. 38 Graf komponentního skóre po odstranění redundantních proměnných – projekce případů do faktorové roviny 1-3 (STATISTICA, StatSoft).

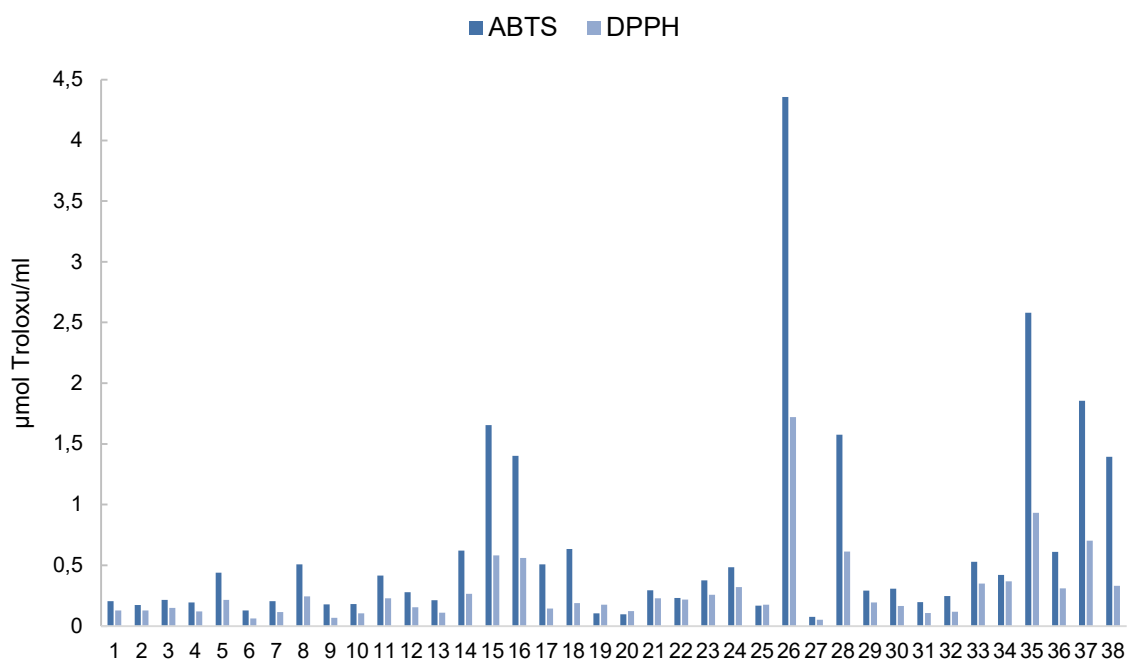


Obr. 39 Graf komponentního skóre po odstranění redundantních proměnných – projekce případů do faktorové roviny 2-3 (STATISTICA, StatSoft).

3.6.5 Antioxidační aktivita

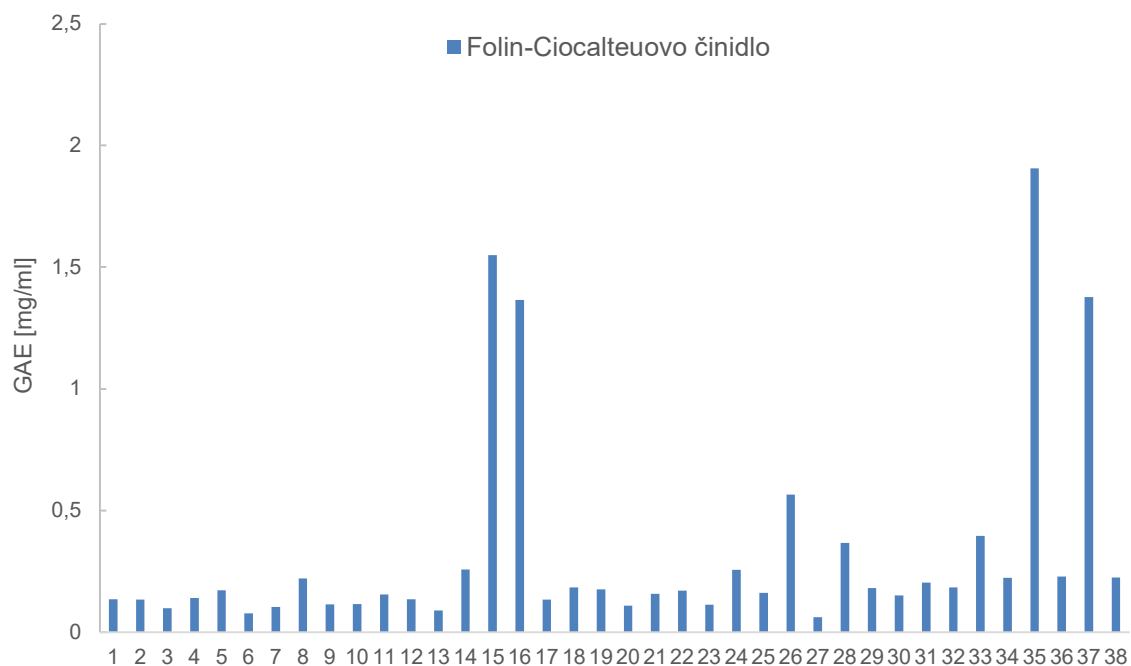
Fenolické látky patří mezi antioxidanty, a proto se tyto látky významnou měrou podílí na antioxidační aktivitě. Za účelem ucelenějšího pohledu na jednotlivé medoviny byla ve všech sledovaných vzorcích měřena také aktivační aktivita. Byly zvoleny tři spektrofotometrické metody – stanovení antioxidační aktivity pomocí radikálů ABTS a DPPH (obr. 40) a s využitím Folin-Ciocalteuova činidla (obr. 41).

Na obrázku 40 je zobrazeno grafické vyjádření antioxidační aktivity jako ekvivalentní množství Troloxu/ml medoviny. Ve většině vzorků byla naměřena výraznější antioxidační aktivita pomocí radikálu ABTS. Opačný trend můžeme pozorovat u vzorků č. 19, 20 a 25, kde byla naměřena vyšší antioxidační aktivita pomocí radikálu DPPH. Celkově lze konstatovat, že medoviny ochucené ovocnými šťávami (č. vz. 14, 15, 16, 18, 35, 37 a 38) nebo bylinami (26, 28, 36) mají proti tradičním medovinám nesrovnatelně vyšší antioxidační aktivitu. Tento nárůst je způsoben velmi vysokým množstvím dalších látek vykazující antioxidační aktivitu (např. i vitamíny atd), obsažených v ovoci a bylinách.



Obr. 40 Porovnání antioxidační aktivity medovin metodou ABTS a DPPH radikálů, vyjádřené jako ekvivalentní množství standardu Troloxu.

Podobný trend můžeme pozorovat i u intenzity antioxidační aktivity naměřené pomocí Folin-Ciocalteuova činidla na obr. 41. Nejvyšších hodnot dosáhly medoviny obsahující ovocné šťávy: č. 15 (citron, pomeranč), č. 16 (citron, pomeranč, višně), č. 35 (višně) a č. 37 (černý rybíz).



Obr. 41 Celkový obsah fenolických látek stanovený pomocí Folin-Ciocalteuova činidla vztahený na ekvivalentní množství kyseliny gallové.

4 ZÁVĚR

V České republice patří medovina mezi oblíbené alkoholické nápoje. Bohužel ne vždy se jedná o medovinu, která splňuje požadovanou kvalitu a běžný spotřebitel dle současné legislativy nemá možnost tuto skutečnost zjistit. Z tohoto důvodu bylo hlavním záměrem této práce vytvořit jednoduchou a rychlou metodu separace fenolických látek, která by mohla sloužit k ověření kvality medovin.

V této práci bylo sledováno celkem 23 fenolických látek, které jsou nejčastěji zastoupeny v medu, a tedy i v medovinách. Byla optimalizována jak metoda extrakce, tak následná separace pomocí HPLC/MS/MS. Na třech vzorcích medovin byly porovnávány tři typy extrakce a metoda bez extrakce. Jako nejúčinnější byla zvolena extrakce z kapaliny do kapaliny pomocí ethylacetátu. HPLC/MS analýza probíhala dle optimalizovaného 6-min gradientu. Pro separaci byla použita kolona s povrchově porézními částicemi (Ascentis Express C18). Jako mobilní fáze A byla zvolena 0,3 % HCOOH, mobilní fázi B tvořil acetonitril s počáteční koncentrací 10 %.

Všechny optimalizované parametry byly využity pro analýzu celkem 38 vzorků medovin, získaných jak přímo od včelařů, tak i zakoupených v obchodech. U všech vzorků byla provedena extrakce a následná analýza pomocí HPLC/MS/MS. Naměřené výsledky byly vyhodnoceny pomocí kalibrační křivky a přepočteny na obsah sledovaných fenolických látek v jednotlivých vzorcích medovin. Získaná data byla analyzována pomocí vícerozměrné statistické metody PCA. Touto metodou bylo získáno několik shluků vzorků medovin se společnými znaky a také některé odlehlé body, u vzorků, které se významně lišily od ostatních. Byly nalezeny také dva vzorky medovin, které obsahovaly přidaný syntetický vanilin a byly pravděpodobně připraveny z menšího množství medu, než je dáno vyhláškou.

Dále bylo ve všech vzorcích medovin provedeno stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS a DPPH radikálů a stanovení celkového obsahu fenolických látek pomocí Folin-Ciocalteuova činidla. Tyto metody sice neumožňují získat informace o jednotlivých fenolických látkách, ale poskytují zajímavé informace o celkovém obsahu fenolických látek a jiných antioxidantů.

5 LITERATURA

- [1] Wösten, H. A. B., de Vocht, M. L. Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochim. Biophys. Acta.* **2000**, 1469 (2), 79-86.
- [2] Sunde, M., Kwan, A. H. Y., Templeton, M. D., Beever, R. D., Mackay, J. P. Structural analysis of hydrophobins. *Micron.* **2008**, 39 (7), 773-784.
- [3] Wösten, H. A. B. Hydrophobins: Multipurpose proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **2001**, 55 (1), 625-646.
- [4] Wösten, H. A. B. Interfacial self-assembly of a fungal hydrophobin into a hydrophobic rodlet layer. *The Plant Cell Online.* **1993**, 5 (11), 1567-1574.
- [5] Wösten, H. A. B., Willey, J. M. Surface-active proteins enable microbial aerial hyphae to grow into the air. *Microbiology.* **2000**, 146 (4), 767-773.
- [6] Linder, M. B. Hydrophobins: Proteins that self assemble at interfaces. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2009**, 14 (5) 356-363.
- [7] Shokribousjein, Z., Deckers, S. M., Gebruers, K., Lorgouilloux, Y., Baggerman, G., Verachtert, H., Delcour, J. A., Etienne, P., Rock, J.-M., Michiels, C., Derdelinckx, G. Hydrophobins, beer foaming and gushing. *Cerevisia.* **2011**, 35 (4), 85-101.
- [8] de Vocht, M. L. Structural and functional role of the disulfide bridges in the hydrophobin SC3. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275 (37), 28428-28432.
- [9] Kwan, A. H. Y., Winefield, R. D., Sunde, M., Matthews, J. M., Haverkamp, R. G., Templeton, M. D., Mackay, J. P. Structural basis for rodlet assembly in fungal hydrophobins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, 103 (10), 3621-3626.
- [10] De Stefano, L., Rea, I., Rendina, I., Giocondo, M., Houmadi, S., Longobardi, S. Organic-inorganic interfaces for a new generation of hybrid biosensors. *Biosensors - Emerging Materials and Applications. InTech*, **2011**, 311-332.
- [11] Bayry, J., Aïmanianda, V., Guijarro, J. I., Sunde, M., Latgé, J.-P., Heitman, J. Hydrophobins-Unique fungal proteins. *PLoS Pathog.* **2012**, 8 (5), e1002700.
- [12] Kallio, J. M., Linder, M. B., Rouvinen, J. Crystal structures of hydrophobin HFBII in the presence of detergent implicate the formation of fibrils and monolayer films. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282 (39), 28733-28739.
- [13] Szilvay, G. R., Kisko, K., Serimaa, R., Linder, M. B. The relation between solution association and surface activity of the hydrophobin HFBI from *Trichoderma reesei*. *FEBS Lett.* **2007**, 581 (14), 2721-2726.

- [14] Hakanpää, J., Paananen, A., Askolin, S., Nakari-Setälä, T., Parkkinen, T., Penttilä, M., Linder M. B., Rouvinen, R. Atomic resolution structure of the HFBII hydrophobin, a self-assembling amphiphile. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279 (1) 534-539.
- [15] Viguera, G., Shirai, K., Martins, D., Franco, T. T., Fleuri, L. F., Revah, S. Toluene gas phase biofiltration by *Paecilomyces lilacinus* and isolation and identification of a hydrophobin protein produced thereof. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, 80, 147–154.
- [16] Khalesi, M., Venken, T., Deckers, S., Winterburn, J., Shokribousjein, Z., Gebruers, K., Verachtert, H., Delcour, J., Martin P., Derdelinckx, G. A novel method for hydrophobin extraction using CO₂ foam fractionation system. *Ind. Crop. Prod.* **2013**, 43, 372-377.
- [17] Linder, M. B., Selber, K., Nakari-Setälä, T., Qiao, M., Kula, M.-G., Penttilä, M. The hydrophobins HFBI and HFBII from *Trichoderma reesei* showing efficient interactions with nonionic surfactants in aqueous two-phase systems. *Biomacromolecules.* **2001**, 2 (2), 511-517.
- [18] Sarlin, T., Kivioja, T., Kalkkinen, N., Linder, M. B., Nakari-Setälä, T., J. Identification and characterization of gushing-active hydrophobins from *Fusarium graminearum* and related species. *J. Basic Microbiol.* **2012**, 52 (2), 184–194.
- [19] Kupčik, R., Zelená, M., Řehulka, P., Bílková, Z., Česlová, L. Selective isolation of hydrophobin SC3 by solid-phase extraction with polytetrafluoroethylene microparticles and subsequent spectrometric analysis, *J. Sep. Sci.* **2016**, 39, 717-724.
- [20] Wessels, J. G. H., De Vries, O. M. H., Ásgeirsdóttir, S. A., Schuren, F. H. J. Hydrophobin genes involved in formation of aerial hyphae and fruit bodies in *Schizophyllum*. *The plant cell online.* **1991**, 3 (8), 793-799.
- [21] Wessels, J. G. H., De Vries, O. M. H., Ásgeirdóttir, S. A., Springer, J. The thn mutation of *Schizophyllum commune*, which suppresses formation of aerial hyphae, affects expression of the SC3 hydrophobin gene. *J. Gen. Microbiol.* **1991**, 137, 2439-2445.
- [22] Lugones, L. G., Wösten, H. A. B., Wessels, J. G. H. A hydrophobin (ABH3) specifically secreted by vegetatively growing hyphae of *Agaricus bisporus* (common white button mushroom). *Microbiology.* **1998**, 144, 2345-2253.

- [23] De Vries, O. M. H., Fekkes, M. P., Wösten, H. A. B., Wessels, J. G. H. Insoluble hydrophobin complexes in the walls of *Schizophyllum commune* and other filamentous fungi. *Arch. Microb.* **1993**, 159 (4), 330-335.
- [24] Hatti-Kaul, R. Aqueous two-phase systems. A general overview. *Mol. Biotechnol.* **2001**, 19 (3), 269-278.
- [25] Askolin, S., Nakari-Setälä, T., Tenkanen, M. Overproduction, purification, and characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, 57 (1-2), 124-130.
- [26] Deckers, S. M., Gebruers, K., Baggerman, G., Lorgouilloux, Y., Delcour, J. A., Michiels, C., Derdelinckx, G., Martens, J., Neven, H. CO₂-hydrophobin structures acting as nanobombs in beer. *Brew. Sci.* **2010**, 63, 54-61.
- [27] Wang, X., Permentier, H. P., Rink, R., Kruijtzter, J. A. W., Liskamp, R. M. J., Wösten, H. A. B., Poolman, B., Robillard, G. T. Probing the self-assembly and the accompanying structural changes of hydrophobin SC3 on a hydrophobic surface by mass spectrometry. *Biophys. J.* **2004**, 87 (3), 1919-1928.
- [28] Chen, E. I., Cociorva, D., Norris, J. L., Yates, J. R. Optimization of mass spectrometry-compatible surfactants for shotgun proteomics. *J. Proteome Res.* **2007**, 6 (7), 2529–2538.
- [29] Zhou, J., Zhou, T.Y., Cao, R., Liu, Z., Shen, J. Y., Chen, P., Wang, X. C., Liang, S. P. Evaluation of the application of sodium deoxycholate to proteomic analysis of rat hippocampal plasma membrane. *J. Proteome Res.* **2006**, 5 (10), 2547–2553.
- [30] Yu, Y. Q., Gilar, M., Lee, P. J., Bouvier, E. S. P., Gebler, J. C. Enzyme-friendly, mass spectrometry-compatible surfactant for in-solution enzymatic digestion of proteins. *Anal. Chem.* **2003**, 75 (21), 6023–6028.
- [31] Hakanpää, J., Parkkinen, T.A.A., Hakulinen, N., Linder, M., Rouvinen, J. Crystallization and preliminary X-ray characterization of *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI. *Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.* **2004**, 60, 163–165.
- [32] Hakanpää, J., Linder, M., Popov, A., Schmidt, A., Rouvinen, J. Hydrophobin HFBI in detail: ultrahigh-resolution structure at 0.75 angstrom. *Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.* **2006**, 62, 356–367.
- [33] Hakanpää, J., Szilvay, G.R., Kaljunen, H., Maksimainen, M., Linder, M., Rouvinen, J. Two crystal structures of *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI-The structure of

- a protein amphiphile with and without detergent interaction. *Protein Sci.* **2006**, 15, 2129–2140.
- [34] Šalplachta, J., Bobálová, J. MALDI-TOF mass spectrometry of hordeins: rapid approach for identification of malting barley varieties. *J. Mass Spectrom.* **2009**, 44 (9), 1287-1292.
- [35] Sarlin, T., Nakari-Setälä, T., Linder, M., Penttilä, M., Haikara, A. Fungal hydrophobins as predictors of the gushing activity of malt. *J. Inst. Brew.* **2005**, 111 (2), 105-111
- [36] Fruiting body protein SC3 precursor. *UniProtKB* [online]. **2019** [cit. 2019-04-06]. Dostupné z: <http://www.uniprot.org/uniprot/P16933>.
- [37] Wang, X. Oligomerization of hydrophobin SC3 in solution: From soluble state to self-assembly. *Protein Sci.* **2004**, 13 (3), 810-821.
- [38] Wang, X., de Vocht, M. L., De Jonge, J., Poolman, B., Robillard, G. T. Structural changes and molecular interactions of hydrophobin SC3 in solution and on a hydrophobic surface. *Protein Sci.* **2002**, 11 (5), 1172-1181.
- [39] Schägger, H. Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* **2006**, 1 (1), 16–22.
- [40] Oakley, B., Kirsch, D., Morris, N. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **1980**, 105 (2), 361–363.
- [41] Gershon, P. D. Cleaved and missed sites for trypsin, lys-C, and lys-N can be predicted with high confidence on the basis of sequence context. *J. Proteome Res.* **2014**, 13 (2), 702–709.
- [42] Franc, V., Řehulka, P., Medda, R., Padiglia, A., Floris, G., Šebela, M. Analysis of the glycosylation pattern of plant copper amine oxidases by MALDI-TOF/TOF MS coupled to a manual chromatographic separation of glycans and glycopeptides. *Electrophoresis.* **2013**, 34 (16), 2357–2367.
- [43] Franc, V., Řehulka, P., Raus, M., Stulík, J., Novak, J., Renfrow, M. B., Šebela, M. Elucidating heterogeneity of IgA1 hinge-region O-glycosylation by use of MALDI-TOF/TOF mass spectrometry: role of cysteine alkylation during sample processing. *J. Proteomics.* **2013**, 92, 299–312.
- [44] Wösten, H. A. B., Schuren, F. H. J., Wessels, J. G. H. Interfacial self-assembly of a hydrophobin into an amphipathic protein membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. *EMBO J.* **1994**, 13 (24), 5848–5854.

- [45] Wösten, H. A. B., Ruardy, T. G., van der Mei, H. C., Busscher, H. J., Wessels, J. G. H. Interfacial self-assembly of a *Schizophyllum commune* hydrophobin into an insoluble amphipathic protein membrane depends on surface hydrophobicity. *Colloids Surf., B*. **1995**, 5 (3-4), 189–195.
- [46] Shirai, A., Matsuyama, A., Yashiroda, Y., Hashimoto, A., Kawamura, Y., Arai, R., Komatsu, Y., Horinouchi, S., Yoshida, M. Global analysis of gel mobility of proteins and its use in target identification. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283 (16), 10745–10752.
- [47] de Vocht, M. L., Scholtmeijer, K., van der Vegte, E.W., de Vries, O. M. H., Sonveaux, N., Wösten, H. A. B., Ruyschaert, J. M., Hadziioannou, G., Wessels, J. G. H., Robillard, G. T. Structural characterization of the hydrophobin SC3, as a monomer and after self-assembly at hydrophobic/hydrophilic interfaces. *Biophys. J.* **1998**, 74 (4), 2059–2068.
- [48] Kim, D. H.; Kim, J. H.; Bae, S. E.; Seo, J. H.; Oh, T. K.; Lee, C. H. Enhancement of natural pigment extraction using *Bacillus* species xylanase. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 2541-2545.
- [49] Wybraniec, S. Formation of decarboxylated betacyanins in heated purified fractions from red beet root (*Beta Vulgaris* L.) monitored by LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 3483-3487.
- [50] Ferruzzi, M. G., Schwartz, S. Thermal degradation of commercial grade sodium copper chlorophyllin. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 7098-7102.
- [51] Unagul, P., Wongsap, P., Kittakoop, P., Intamas, S., Srikitikulchai, P. Production of red pigments by the insect pathogenic fungus *Cordyceps unilateralis* BCC 1869. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 32, 135-140.
- [52] Cho, Y. J., Park, J. P., Hwang, H. J., Kim, S. W., Choi, J. W., Yun, J. W. Production of red pigment by submerged culture of *Paecilomyces sinclairii*. *Lett. Appl. Microbiol.* **2002**, 35, 195-202.
- [53] Cho, Y. J., Hwang, H. J., Kim, S. W., Song, C. H., Yun, J. W. Effect of carbon source and aeration rate on broth rheology and fungal morphology during red pigment production by *Paecilomyces sinclairii* in a batch bioreactor. *J. Biotechnol.* **2002**, 95, 13-23.
- [54] Kim, C. H., Kim, S. W., Hong, S. I. Production of red pigment by *Serratia* sp. KH-95 and its cultural properties. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **1998**, 13, 431-437.

- [55] Medenstev, A. G., Akimenko, V. K. Naphthoquinone metabolites of the fungi. *Phytochemistry*. **1998**, *47*, 935-959.
- [56] Sugimoto, N., Kawasaki, Y., Sato, K., Aoki, H., Ichi, T., Koda, T., Yamazaki, T., Maitani, T. Structure of acid-stable carmine. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* **2002**, *43*, 18-23.
- [57] Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S. M., Blanc, P., Chidambara Murthy, K. N., Ravishankar, G. A. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends Food Sci. Technol.* **2005**, *16* (9), 389-406.
- [58] Gunasekaran, S., Poorniammal, R. Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Penicillium sp.* under submerged cultivation. *Afr. J. Biotechnol.* **2008**, *7*(12), 1894-1898.
- [59] Jiang, Y., Li, H., Chen, F., Hyde, K. Production potential of water-soluble *Monascus* red pigment by a newly isolated *Penicillium sp.* *J. Agric. Technol.* **2005**, *1*(1), 113-126.
- [60] Campoy, S., Perez, F., Martín, J. F., Gutierrez, S., Liras, P. Stable transformants of the azaphilone pigment-producing *Monascus purpureus* obtained by protoplast transformation and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Curr. Genet.* **2003**, *43* (6), 447-452.
- [61] Yan, Y., Chemler, J., Huang, L., Martens, S., Koffas, M. A. Metabolic engineering of anthocyanin biosynthesis in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71* (7), 3617-3623.
- [62] Mapari, S. A., Meyer, A. S., Thrane, U. Colorimetric characterization for comparative analysis of fungal pigments and natural food colorants. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (19), 7027-7035.
- [63] Joshi, V., Attri, D., Bala, A., Bhushan, S. Microbial pigments. *Indian J. Biotechnol.* **2003**, *2* (3), 362-369.
- [64] Malik, K., Tokkas, J., Goyal, S. Microbial pigments: a review. *Int. J. Microbial. Res. Technol.* **2012**, *1* (4), 361-365.
- [65] Caro, Y., Anamale, L., Fouillaud, M., Laurent, P., Petit, T., Dufosse, L. Natural hydroxyanthraquinoid pigments as potent food grade colorants: an overview. *Nat. Prod. Bioprospect.* **2012**, *2* (5), 174-193.
- [66] Mapari, S. A., Thrane, U., Meyer, A. S. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? *Trends Biotechnol.* **2010**, *28* (6), 300-307.

- [67] Goyal, S., Ramawat, G. K., Mérillon, M. J. Different Shades of Fungal Metabolites: An Overview, *Fungal Metabolites*. Springer International Publishing, **2016**, pp.1-29.
- [68] Pradeep, F., Begam, M., Palaniswamy, M., Pradeep, B. Influence of culture media on growth and pigment production by *Fusarium moniliforme* KUMBF1201 isolated from paddy field soil. *World Appl. Sci. J.* **2014**, 22 (1), 70-77.
- [69] Suhr, K. I., Haasum, I., Steenstrup, L., Larsen, T. O. Factors affecting growth and pigmentation of *Penicillium caseifulvum*. *J. Dairy Sci.* **2002**, 85 (11), 2786-2794.
- [70] Unagul, P., Wongsap, P., Kittakoop, P., Intamas, S., Srikitikulchai, P., Tanticharoen, M. Production of red pigments by the insect pathogenic fungus *Cordyceps unilateralis* BCC 1869. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 32 (4), 135-140.
- [71] Frisvad, J. C., Yilmaz, N., Thrane, U., Rasmussen, K. B., Houbraken, J., Samson, R. A. *Talaromyces atroroseus*, a new species efficiently producing industrially relevant red pigments. *PLoS ONE.* **2013**, 8 (12), e84102.
- [72] Hoffmeister, D., Keller, N. P. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, 24 (2), 393-416.
- [73] Cichewicz, R. H. Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, 27 (1), 11-22.
- [74] Gunatilaka, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *J. Nat. Prod.* **2006**, 69 (3), 509-526.
- [75] Zhang, H. W., Song, Y. C., Tan, R. X. Biology and chemistry of endophytes. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, 23 (5), 753-771.
- [76] Gao, J. M. New biologically active metabolites from chinese higher fungi. *Curr. Org. Chem.* **2006**, 10 (8), 849-871.
- [77] Zhang, Q., Zong, S. C., Li, H. Q., Gao, J. M., Zhang, A. L. Chemical and bioactive diversities of the genus chaetomium secondary metabolites. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2012**, 12 (2), 127-148.
- [78] Demain, A. L., Sanchez, S. J. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J. Antibiot.* **2009**, 62 (1), 5-16.
- [79] Kim, B. S., Hwang, B. K. Microbial Fungicides in the Control of Plant Diseases. *J. Phytopathol.* **2007**, 155 (11-12), 641-653.
- [80] O'Hagan, D. The polyketide metabolites; Ellis Horwood: Chichester, U.K., **1991**.

- [81] Thomas, R. A biosynthetic classification of fungal and streptomycete fused-ring aromatic polyketides. *ChemBioChem*. **2001**, 2 (9), 612-627.
- [82] Osmanova, N., Schultze, W., Ayoub, N. Azaphilones: a class of fungal metabolites with diverse biological activities. *Phytochem. Rev.* **2010**, 9 (2), 315-342.
- [83] Padmavathi, T., Prabhudessai, T. A solid liquid state culture method to stimulate *Monascus* pigments by intervention of different substrates. *Int. Res. J. Biol. Sci.* **2013**, 2(10), 22-29.
- [84] Gao, J. M., Yang, S. X., Qin, J. Ch. Azaphilonoids: Chemistry and biology. *Chem. Rev.* **2013**, 113 (7), 4755-4811
- [85] Nakanishi, K. Studies in microbial and insect natural products chemistry. *J. Nat. Med.* **2006**, 60 (1), 2-20.
- [86] Stadler, M., Fournier, J. Pigment chemistry, taxonomy and phylogeny of the *Hypoxyloideae* (*Xylariaceae*). *Rev. Iberoam. Micol.* **2006**, 23 (3), 160-170.
- [87] Frisvad, J. C., Andersen, B., Thrane, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycol. Res.* **2008**, 112 (2), 231-240.
- [88] Stadler, M., Ju, Y. M., Rogers, J. D. Chemotaxonomy of *Entonaema*, *Rhopalostroma* and other *Xylariaceae*. *Mycol. Res.* **2004**, 108 (3), 239-256.
- [89] Wang, T. H., Lin, T. F. *Monascus* rice products. *Adv. Food Nutr. Res.* **2007**, 53, 123-159.
- [90] Clark, R. C., Lee, S. Y., Searcey, M., Boger, D. L. The isolation, total synthesis and structure elucidation of chlorofusin, a natural product inhibitor of the p53-mDM2 protein-protein interaction. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, 26 (4), 465-477.
- [91] Chong, R., King, R. R., Whalley, W. B. The chemistry of fungi. LXI. The synthesis of ()-sclerotiorin, of ()-4,6-dimethylocta-trans-2,trans-4-dienoic acid, and of an analogue of rotiorin. *J. Chem. Soc.* **1971**, 21, 3566-3571.
- [92] Marsini, M. A., Gowin, K. M., Pettus, T. R. Total synthesis of (+/-)-mitorubrinic acid. *Org. Lett.* **2006**, 8 (16), 3481-3483.
- [93] Jůzlová, P., Martínková, L., Křen, V. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: A review. *J. Ind. Microbiol.* **1996**, 16, 163-170.
- [94] Šturdíková, M., Slugeň, D., Lešová, K., Rosenberg, M. Mikrobiálna produkcia farebných azafilónových metabolitov. *Chem. Listy.* **2000**, 94, 105-110.

- [95] Lin, Y. L., Wang, T. H., Lee, M. H., Su, N. W. Biologically active components and nutraceuticals in the *Monascus*-fermented rice: A review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, 77 (5), 965-973.
- [96] Martínková, L., Patáková-Jůzlová, P., Krent, V., Kucerová, Z., Havlíček, V., Olšovský, P., Hovorka, O., Ríhová, B., Veselý, D., Veselá, D., Ulrichová, J., Prikrylová, V. Biological activities of oligoketide pigments of *Monascus purpureus*. *Food Addit. Contam.* **2001**, 16 (1), 15-24.
- [97] Gill, M. Pigments of fungi (*Macromycetes*). *Nat. Prod. Rep.* **2003**, 20, 615-639.
- [98] Zhou, Z. Y., Liu, J. K. Pigments of Fungi (*Macromycetes*). *Nat. Prod. Rep.* **2010**, 27 (11), 1531-1570.
- [99] Turner, W. B., Aldridge, D. C. Fungal Metabolites; *Academic Press*: New York, **1971** and **1983**, Vols. 1 and 2.
- [100] Fielding, B. C., Holker, J. S. E., Jones, D. F., Powell, A. D. G., Richmond, K. W., Roberston, A., Whalley, W. B. The chemistry of fungi. Part XXXIX. The structure of monascin. *J. Chem. Soc.* **1961**, 4579-4589.
- [101] Chen, F. C., Manchand, P. S., Whalley, W. B. The chemistry of fungi. LXIV. The structure of monascin: the relative stereochemistry of the azaphilones. *J. Chem. Soc.* **1971**, 21, 3577-3579.
- [102] Nishikawa, H. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* **1932**, 5, 1007-1015.
- [103] Haws, E. J., Holker, J. S. E., Kelly, A., Powell, A. D. G., Robertson, A. The chemistry of fungi. Part XXXVII. The structure of rubropunctatin. *J. Chem. Soc.* **1959**, 3598-3610.
- [104] Ohashi, M., Kumasaki, S. I., Yamamura, S., Nakanishi, K., Koike, H., Monascorubrin I: Monascaminone, A Degradation Product. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 6339.
- [105] Nakanishi, K., Ohashi, M., Kumasaki, S. I., Yamamura, S. Monascorubrin II: Structures of Monascorubrin and Monascamine. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 6339-6340.
- [106] Fielding, B. C., Haws, E. J., Holker, J. S. E., Powell, A. D. G., Robertson, A., Stanway, D. N., Whalley, W. B. Monascorubrin. *Tetrahedron Lett.* **1960**, 1 (26), 24-27.
- [107] Kumasaki, S., Nakanishi, K., Nishikawa, E., Ohashi, M. Structure of Monascorubrin. *Tetrahedron* **1962**, 18 (10), 1171-1184.

- [108] Yongsmith, B., Krairak, S., Bavavoda, R. Production of yellow pigments in submerged culture of a mutant of *Monascus* spp. *J. Ferment. Bioeng.* **1994**, 78 (3), 223-228.
- [109] Ogihara, J., Oishi, K. Effect of ammonium nitrate on the production of PP-V and monascorubrin homologues by *Penicillium* sp. *AZ. J. Biosci. Bioeng.* **2002**, 93 (1), 54-59.
- [110] Loret, M. O., Morel, S. Isolation and Structural Characterization of Two New Metabolites from *Monascus*. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58 (3), 1800-1803.
- [111] Lin, T. F., Yakushijin, K., Buchi, G. H., Demain, A. L. Formation of water-soluble *Monascus* red pigments by biological and semi-synthetic processes. *J. Ind. Microbiol.* **1992**, 9, 173-179.
- [112] Carvalho, J. C., Pandey, A., Babitha, S., Soccol, C. R. Production of *Monascus* biopigments: An overview. *Agro Food Ind. Hi-Tech.* **2003**, 14, 37-42.
- [113] Hiroi, T., Shima, T., Isobe, A., Kimura, S. Studies on the structure of two pigment obtained from *Monascus* sp. *J. Jpn. Soc. Food Nutr.* **1975**, 28, 497-502.
- [114] Powell, A. D. G., Robertson, A., Whalley, W. B. *J. Chem. Soc.* **1956**, 5, 27.
- [115] Hajiaj, H., Klaébé, A., Loret, M. O., Tzédakis, T., Goma, G., Blanc, P. Production and identification of N-glucosylrubropunctamine and N-glucosylmonascorubramine from *Monascus ruber* and occurrence of electron donor-acceptor complexes in these red pigments. *J. Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, 63 (7), 2671-2678.
- [116] Sato, K., Goda, Y., Sakamoto, S. S., Shibata, H., Maitani, T., Yamada, T. Identification of major pigments containing D-amino acid units in commercial *Monascus* Pigments. *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, 45 (1), 227-229.
- [117] Kim, J. H., Kim, H. J., Kim, C., Jung, H., Kim, Y. O., Ju, J. Y., Shin, C. S. Development of lipase inhibitors from various derivatives of monascus pigment produced by *Monascus* fermentation. *Food Chem.* **2007**, 101 (1), 357-364.
- [118] Kim, J. H., Kim, H. J., Park, H. W., Youn, S. H., Choi, D. Y., Shin, C. S. Development of inhibitors against lipase and α -glucosidase from derivatives of monascus pigment. *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, 276 (1), 93-98.
- [119] Lin, T. F., Demain, A. L. Leucine interference in the production of water-soluble red *Monascus* pigments. *Arch. Microbiol.* **1994**, 162 (1-2), 114-119.

- [120] Jeun, J., Jung, H., Kim, J. H., Kim, Y. O., Youn, S. H., Shin, C. S. Effect of the monascus pigment threonine derivative on regulation of the cholesterol level in mice. *Food Chem.* **2008**, 107 (3), 1078-1085.
- [121] Lian, X., Wang, C., Guo, K. Identification of new red pigments produced by *Monascus ruber*, *Dyes Pigm.* **2007**, 73 (1), 121-125.
- [122] Venkatachalam, M., Zelená, M., Cacciola, F., Česlová, L., Girard-Valenciennes, E., Clerc, P., Dugo, P., Mondello, L., Fouillaud, M., Rotondo, A., Giuffrida, D., Dufossé, L. Partial characterization of the pigments produced by the marine-derived fungus *Talaromyces albobiverticillius* 30548. Towards a new fungal red colorant for the food industry. *J. Food Compos. Anal.* **2018**, 67, 38-47.
- [123] Jung, H., Kim, C., Kim, K., Shin, C.S. Color characteristics of *Monascus* pigments derived by fermentation with various amino acids. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51 (5), 1302–1306.
- [124] Mapari, S. A., Hansen, M. E., Meyer, A. S., Thrane, U. Computerized screening for novel producers of *Monascus*-like food pigments in *Penicillium* species. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56 (21), 9981–9989.
- [125] Mapari, S. A., Meyer, A. S., Thrane, U., Frisvad, J. C. Identification of potentially safe promising fungal cell factories for the production of polyketide natural food colorants using chemotaxonomic rationale. *Microb. Cell Fact.* **2009** 8 (1), 15.
- [126] Juričová, M., Řezková, S., Moravcová, K., Fischer, J., Česlová, L. Stanovení 5-hydroxymethylfurfuralu a vybraných sacharidů v medovinách, *Kvasný Průmysl*, **2008**, 2, 65-70.
- [127] Badger, M., Mead and Honey Wines: A Comprehensive Guide, *Brown Dog Books*, **2017**.
- [128] Iglesias, A., Pascoal A., Choupina A. B., Carvalho C. A., Feás X., Estevinho L. M. Developments in the fermentation process and quality improvement strategies for mead production. *Molecules.* **2014**. 19 (8), 12577-12590.
- [129] Gupta, J. K., Sharma, R., Production technology and quality characteristics of mead and fruit-honey wines: A review. *Nat. Prod. Rad.* **2009**, 8 (4), 345-355.
- [130] Crane, E., Honey, a comprehensive survey. *William Heinemann Ltd.*, **1975**, 439-488.
- [131] Crane, E., The archaeology of beekeeping. *Gerald Duckworth & Co.* **1983**.
- [132] The history of honey [online]. [cit. 2019-12-23]. Dostupné z: https://weynshoning.be/_library/_files/rotstekening-spanje.jpg

- [133] Özcan, M. M., Ölmez, Some qualitative properties of different monofloral honeys. *Food Chem.* **2014**, 163, 212-218.
- [134] Haragsim, O., Medovice a včely. *Brázda*. **2016**
- [135] Bogdanov, S., Bieri, K., Gremaud, G., Iff, D., Känzig, A., Seiler, K., Stöckli, H., Zürcher, K. Bienenprodukte; 23 A Honig. *Swiss Food Manual*. **2003**, 1-35.
- [136] Bengsch, E., Connaissance du miel. Des oligo-éléments pour la santé. *Rev franç apicult.* **1992**, 569, 383-386.
- [137] Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., Gallmann, P. Honey for nutrition and health: A Review. *J. Am. Coll. Nutr.* **2008**, 27 (6), 677-689.
- [138] Heitkamp, K. Pro und kontra Honig - Sind Aussagen zur Wirkung des Honigs "wissenschaftlich hinreichend gesichert"? *Schriften zur Oecotrophologie*. **1984**, 1-60.
- [139] Crane, E., Walker, P., Day, R. Directory of important world honey sources. *International Bee Research Association*, London, **1984**.
- [140] Bogdanov, S., Ruoff, K., Persano Oddo, L. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie*. **2007**, 35, 4-17.
- [141] Al-Mamary, M., Al-Meerri, A., Al-Habori, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutr. Res.* **2002**, 22, 1041-1047.
- [142] Gheldof, N., Engeseth, N. J. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 3050-3055.
- [143] Tomás-Barberán, F. A., Martos, I., Ferreres, F., Radovic, B. S., Anklam, E. HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, 81, 485-496.
- [144] Molan, P. C. Honey as an antimicrobial agent. bee products: properties, applications and apitherapy. *Plenum Press*, New York, **1997**, 27-37.
- [145] Molan, P. C. The antibacterial activity of honey. 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World*. **1992**, 73, 5-28.
- [146] Molan, P. C. The antibacterial activity of honey. 2. Variation in the potency of the antibacterial activity. *Bee World*. **1992**, 73, 59-76.
- [147] Bogdanov, S. Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *Lebensm.-Wiss -Technol*, **1997**, 30, 748-753.

- [148] Zeina, B., Othman, O., Al-Assad, S. Effect of honey versus thyme on *Rubella* virus survival in vitro. *J. Altern. Complement Med.* **1996**, 2, 345-348.
- [149] Zeina, B., Zohra, B. I., al Assad, S. The effects of honey on *Leishmania* parasites: an in vitro study. *Trop. Doct.* 1997, 27 (1):36-38.
- [150] Kilicoglu, B., Kismet, K., Koru, O., Tanyuksel, M., Oruc, M. T., Sorkun, K., Akkus, M. A. The scolicial effects of honey. *Adv. Ther.* **2006**, 23, 1077-1083.
- [151] White, J. W., Subers, M. H., Schepartz, A. J. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochim. Biophys. Acta.* **1963**, 73, 57-70.
- [152] Russell, K. M., Molan, P. C., Wilkins, A. L., Holland, P. T. Identification of some antibacterial constituents of New Zealand Manuka honey. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, 38, 10-13.
- [153] Cushnie, T., Lamb, A. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2005**, 26, 343-356.
- [154] Weston, R. J., Mitchell, K. R., Allen, K. L. Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. *Food Chem.* **1999**, 64, 295-301.
- [155] Yatsunami, K., Echigo, T. Antibacterial action of honey and royal jelly (japanese). *Honeybee Sci.* **1984**, 5, 125-130.
- [156] Ames, B. N., Shigenaga, M. K., Hagen, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1993**, 90, 7915-7922.
- [157] Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., Facino, R. M. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Anal. Chim. Acta.* **2005**, 533, 185-191.
- [158] D'Arcy, B. R. Antioxidants in Australian floral honeys - Identification of health-enhancing nutrient components. *RIRDC Publication.* **2005**, 1, 1-84
- [159] Gheldof, N., Wang, X. H., Engeseth, N. J. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 5870-5877.
- [160] Frankel, S., Robinson, G. E., Berenbaum, M. R. Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. *J. Apic. Res.* **1998**, 37, 27-31.
- [161] Aljadi, A. M., Kamaruddin, M. Y. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chem.* **2004**, 85, 513-518.

- [162] Inoue, K., Murayama, S., Seshimo, F., Takeba, K., Yoshimura, Y., Nakazawa, H. Identification of phenolic compound in manuka honey as specific superoxide anion radical scavenger using electron spin resonance (ESR) and liquid chromatography with coulometric array detection. *J. Sci. Food Agric.* **2005**, 85, 872-878.
- [163] Fahey, J. W., Stephenson, K. K. Pinostrobin from honey and Thai ginger (*Boesenbergia pandurata*): A potent flavonoid inducer of mammalian phase 2 chemoprotective and antioxidant enzymes. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 7472-7476.
- [164] Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, M., Albertini, M., Piatti, E. Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chem.* **2006**, 97, 217-222.
- [165] Nagai, T., Inoue, R., Kanamori, N., Suzuki, N., Nagashima, T. Characterization of honey from different floral sources. Its functional properties and effects of honey species on storage of meat. *Food Chem.* **2006**, 97, 256-262.
- [166] Perez, R. A., Iglesias, M. T., Pueyo, E., Gonzalez, M., de Lorenzo, C. Amino acid composition and antioxidant capacity of Spanish honeys. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 360-365.
- [167] Al-Waili, N. S., Boni, N. S. Natural honey lowers plasma prostaglandin concentrations in normal individuals. *J. Med. Food.* **2003**, 6, 129-133.
- [168] Bilsel, Y., Bugra, D., Yamaner, S., Bulut, T., Cevikbas, U., Turkoglu, U. Could honey have a place in colitis therapy? Effects of honey, prednisolone, and disulfiram on inflammation, nitric oxide, and free radical formation. *Dig. Surg.* **2002**, 19, 306-311.
- [169] Postmes, T. The treatment of burns and other wounds with honey. *IBRA International Bee Research Association, Cardiff*, **2001**, 41-47.
- [170] Al-Waili, N. S., Haq, A. Effect of honey on antibody production against thymus-dependent and thymus-independent antigens in primary and secondary immune responses. *J. Med. Food.* **2004**, 7, 491-494.
- [171] Duddukuri, G. R., Kumar, P. S., Kumar, V. B., Athota, R. R. Immunosuppressive effect of honey on the induction of allergen-specific humoral antibody response in mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **1997**, 114, 385-388.
- [172] Al-Waili, N. S. Effects of daily consumption of honey solution on hematological indices and blood levels of minerals and enzymes in normal individuals. *J. Med. Food.* **2003**, 6, 135-140.

- [173] Shannon, I. L., Edmonds, E. J., Madsen, K. O. Honey: sugar content and cariogenicity. *J. Dent. Children.* **1979**, 46, 29-33.
- [174] Lembke, A., Kay, H. W., Rathjen, G. Kariogene Wirkungen von zuckerhaltigen Lebensmitteln am Beispiel von Aufstrichen. *Milchwissenschaft.* **1982**, 37, 467-471.
- [175] Thylstrup, A., Fejerskov, O. Textbook of Cariology. *Munksgaard*, Copenhagen, **1986**.
- [176] Bowen, W. H., Lawrence, R. A. Comparison of the cariogenicity of cola, honey, cow milk, human milk, and sucrose. *Pediatrics.* **2005**, 116, 921-926.
- [177] Decaix, C. Comparative study of sucrose and honey. *Chir. Dent. Fr.* **1976**, 46, 59-60.
- [178] Steinberg, D., Kaine, G., Gedalia, I. Antibacterial effect of propolis and honey on oral bacteria. *Am. J. Dent.* **1996**, 9, 236-239.
- [179] Molan, P. C. Honey for oral health. *J. Dental Res.* **2001**, 80, 1-130.
- [180] Grobler, S. R., du Toit, I. J., Basson, N. J. The effect of honey on human tooth enamel in vitro observed by electron microscopy and microhardness measurements. *Arch. Oral. Biol.* **1994**, 39, 147-153.
- [181] Sela, M. O., Shapira, L., Grizim, I., Lewinstein, I., Steinberg, D., Gedalia, I., Grobler, S. R. Effects of honey consumption on enamel microhardness in normal versus xerostomic patients. *J. Oral Rehabil.* **1998**, 25, 630-634.
- [182] Edgar, W. M., Jenkins, G. N. Solubility-reducing agents in honey and partly-refined crystalline sugar. *Br. Dent. J.* **1974**, 136, 7-14.
- [183] al-Bukhaari, M. Holy Hadith (Sahih Al-Bukhari, Arabic). *Kazi Publications*, 3rd ed. Chicago, **1994**.
- [184] Celsus, C. De medicina. *Heinemann*, London, **1935**.
- [185] Potschinkova, P. Bienenprodukte in der Medizin. Apitherapie. *Ehrenwirth Verlag*, München, **1992**.
- [186] Cherbuliez, T., Domerego, R. L'Apitherapie. *Amyris SPRL*, Bruxelles, **2003**.
- [187] Khotkina, M. L. Honey as part of therapy for patients with stomach ulcers. Collection of papers, *Irkutsk State Medical Institute*, **1955**, 252-262.
- [188] Ludyanskii, E. A. Apiterapia. Poligrafist, Vologda, Russia, **1994**.
- [189] Menshikov, F. K., Feidman, S. I. Curing stomach ulcers with honey. *Sovetskaya Meditsing*, **1949**, 10, 13-14.

- [190] Mladenov, S. Pcelnite produkti hrana i lekarstvo (BG) / The bee products - food and medicine. *Medizina i Fizkultura*, Sofia, **1978**.
- [191] Slobodianiuk, A. A., Slobodianiuk, M. S. Complex treatment of gastritis patients with high stomach secretion in combination with (and without) a 15-20% solution of honey. In: *Conference. Resorts of Bashkiria in the Service of Health*. Bashkir: Khniz. izd-vo, Ulfa, **1969**, 249-253.
- [192] Salem, S. N. Honey regimen in gastrointestinal disorders. *Bull. Islamic. Med.* **1981**, 1, 358-362.
- [193] al Somal, N., Coley, K. E., Molan, P. C., Hancock, B. M. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the antibacterial activity of Manuka honey. *J. R. Soc. Med.* **1994**, 87, 9-12.
- [194] Ali, A. T., Chowdhury, M. N., Al-Humayyd, M. S. Inhibitory effect of natural honey on *Helicobacter pylori*. *Trop. Gastroenterol.* **1991**, 12, 139-143.
- [195] Osato, M. S., Reddy, S. G., Graham, D. Y. Osmotic effect of honey on growth and viability of *Helicobacter pylori*. *Dig. Dis. Sci.* **1999**, 44, 462-464.
- [196] Pokorn, D., Vukmirovic, V. Velocity of gastric emptying of saccharides after administering honey and pure invert sugar, III International Apitherapy, Apimondia, **1978**, 277-279.
- [197] Sanz, M. L., Polemis, N., Morales, V., Corzo, N., Drakoularakou, A., Gibson, G. R., Rastall, R. A. In vitro investigation into the potential prebiotic activity of honey oligosaccharides. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 2914-2921.
- [198] Yun, Y. W. Fructooligosaccharides - occurrence, preparation and application. *Enzyme Microb. Technol.* **1996**, 19, 107-117.
- [199] Ustunol, Z. The effect of honey on the growth of bifidobacteria. Report for the National Honey Board, **2000**, 1-8,. <http://www.honey.com/downloads/bifido.pdf>, accessed on 25 May 2007.
- [200] Haffejee, I. E., Moosa, A. Honey in the treatment of infantile gastroenteritis. *Br. Med. J.* **1985**, 290, 1866-1867.
- [201] Lapornik, B., Prošek, M., Wondra, A. G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J. Food Eng.* **2005**, 71 (2), 214-222.

- [202] Alasalvar, C., Grigor, J. M., Zhang, D., Quantick, P. C., Shahidi, F. Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49 (3), 1410-1416.
- [203] Popa, V., Dumitru, M., Volf, I., Anghel, N. Lignin and polyphenols as allelochemicals. *Ind. Crops Prod.* **2008**, 27 (2), 144-149.
- [204] Naczk, M., Shahidi, F., Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, 41 (5), 1523-1542.
- [205] Bravo, L., Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews.* **1998**, 56 (11), 317-333.
- [206] Popa, V. I., Agache, C., Beleca, C., Popa, M. I. Polyphenols from spruce bark as plant growth regulator. *Crop. Research.* **2002**, 27, 144-149.
- [207] Gordon, M. H., Dietary antioxidants in disease prevention. *Nat. Prod. Rep.* **1996**, 13 (4), 265-273.
- [208] Valenzuela, A., Nieto, S., Cassels, B. K., Speisky, H. Inhibitory effect of boldine on fish oil oxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1991**, 68 (12), 935-937.
- [209] Pinelo, M., Del Fabbro, P., Manzocco, L., Nuñez, M. J., Nicoli, M. C. Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chem.* **2005**, 92 (1), 109-117.
- [210] Baxter, H., Harborne, J. B., Moss, G. P. Phytochemical dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants, *CRC press*, **1998**.
- [211] D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., Masella, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super. Sanita.* **2007**, 43 (4), 348-361.
- [212] Pietta, P. G. Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63 (7), 1035–1042.
- [213] Tsao, R., Yang, R. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* **2003**, 1018 (1), 29-40.
- [214] Cook, N., Samman, S. Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* **1996**, 7 (2), 66-76.
- [215] Liu, Q., Cai, W., Shao, X. Determination of seven polyphenols in water by high performance liquid chromatography combined with preconcentration. *Talanta.* **2008**, 77 (2), 679-683.

- [216] Beecher, G. R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J. Nutr.* **2003**, 133 (10), 3248-3254.
- [217] Zadernowski, R., Czaplicki, S., Naczka, M. Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (*Garcinia mangostana*). *Food Chem.* **2009**, 112 (3), 685-689.
- [218] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, 79 (5), 727-747.
- [219] Clifford, M. N., Scalbert, A. Ellagitannins - occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. *J. Food Sci. Agric.* **2000**, 80, 1118-1125.
- [220] Stalikas, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Separ. Sci.* **2007**, 30 (18), 3268-3295.
- [221] Dey, P. M. Methods in plant biochemistry. *Academic Press.* **1989**.
- [222] Ignat, I., Volf, I., Popa, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* **2011**, 126 (4), 1821-1835.
- [223] Delmas, D., Lançon, A., Colin, D., Jannin, B., Latruffe, N. Resveratrol as a chemopreventive agent: a promising molecule for fighting cancer. *Curr. Drug Targets.* **2006**, 7 (4), 423-442.
- [224] Bavaresco, L., Role of viticultural factors on stilbene concentrations of grapes and wine. *Drugs Exp. Clin. Res.* **2002**, 29 (5-6), 181-187.
- [225] Saleem, M., Kim, H. J., Ali, M. S., Lee, Y. S. An update on bioactive plant lignans. *Nat. Prod. Rep.* **2005**, 22 (6), 696-716.
- [226] Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* **2006**, 99 (1), 191-203.
- [227] Luthria, D. L., Pastor-Corrales, M. A. Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, 19 (2), 205-211.
- [228] Merken, H. M., Beecher, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48 (3), 577-599.
- [229] Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M., Velić, D. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *J. Food Eng.* **2007**, 81 (1), 236-242.

- [230] Baydar, N. G., Özkan, G., Sağdıç, O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera L.*) extracts. *Food Control*. **2004**, 15 (5), 335-339.
- [231] Escarpa, A., Morales, M. D., Gonzalez, M. C. Analytical performance of commercially available and unavailable phenolic compounds using real samples by high-performance liquid chromatography–diodearray detection. *Anal. Chim. Acta*. **2002**, 460 (1), 61–72.
- [232] Escarpa, A., González, M. C., López Gil, M. A., Crevillén, A. G., Hervás, M., García, M. Microchips for CE: Breakthroughs in real-world food analysis. *Electrophoresis*. **2008**, 29 (24), 4852–4861.
- [233] Cabras, P., Angioni, A., Tuberoso, C., Floris, I., Reniero, F., Guillou, C., Ghelli, S. Homogentisic acid: a phenolic acid as a marker of strawberry-tree (*Arbutus unedo*) honey. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 47 (10), 4064-4067.
- [234] Bonvehi, J. S., Torrento, M. S., Lorente, E. C. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49 (4), 1848-1853.
- [235] Mattila, P., Kumpulainen, J. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50 (13), 3660–3667.
- [236] Glowniak, K., Zgoarka, G., Kozyra, M. Solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography chromatography of free phenolic acids in some *Echinacea* species. *J. Chromatogr A*. **1996**, 730 (1-2), 25-29.
- [237] Klejdus, B., Kubá, V. High performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in seed exudates of *Festuca arundinacea* and *F. pratense*. *Phytochem. Anal.* **2000**, 11 (6), 375–379.
- [238] Yao, L., Jiang, Y., D'Arcy, B., Singanusong, R., Datta, N., Caffin, N., Raymont, K. Quantitative high-performance liquid chromatography analyses of flavonoids in Australian Eucalyptus honeys. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52 (2), 210-214.
- [239] Thomas-Barberan, F. A., Amparo-Blazquez, M., Garcia-Viguera, C., Ferreres, F., Tomas-Lorente, F. A comparative study of different amberlite XAD resins in flavonoid analysis. *Phytochem. Anal.* **1992**, 3 (4), 178-181.
- [240] Martos, I., Ferreres, F., Tomas-Barberan, F. A. Identification of flavonoid markers for the botanical origin of Eucalyptus honey. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48 (5), 1498-1502.

- [241] Yao, L., Jiang, Y., Singanusong, R., Datta, N., Raymont, K. Phenolic acids and abscisic acid in Australian Eucalyptus honeys and their potential for floral authentication. *Food Chem.* **2004**, 86 (2), 169-177.
- [242] Weston, R. J., Broncklebank, L. K., Lu, Y. Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys. *Food Chem.* **2000**, 70 (4) 427-435.
- [243] Yao, L., Jiang, Y., Singanusong, R., Datta, V., Raymont, K. Phenolic acids in Australian *Melaleuca*, *Guioa*, *Lophostemon*, *Banksia* and honeys and their potential for floral authentication. *Food Res. Int.* **2005**, 38 (6), 651-658.
- [244] Yao, L., Datta, M., Tomas-Barberan, F. A., Ferreres, F., Martos, I., Singanusong, R. Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. *Food Chem.* **2003**, 81 (2) 159-168.
- [245] Martos, I., Cossentini, M., Ferreres, F. Tomas-Barberan, F. A. Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45 (8), 2824-2829.
- [246] Yao, L., Jiang, Y., Singanusong, R., D'Arcy, B., Datta, N., Caffin, N., Raymont, K. Flavonoids in Australian *Melaleuca*, *Guioa*, *Lophostemon*, *Banksia* and *Helianthus* honeys and their potential for floral authentication. *Food Res. Int.* **2004**, 37 (2), 166-174.
- [247] Arráez-Román, A., Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. Identification of phenolic compounds in rosemary honey using solid-phase extraction by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, 41 (5), 1648-1656.
- [248] Andrade, P., Ferreres, F., Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A. Determination of phenolic compounds in honeys with different floral origin by capillary zone electrophoresis. *Food Chem.* **1997**, 60 (1) 79-84.
- [249] Gómez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. Problems of quantitative and qualitative estimation of polyphenols in honey by capillary electrophoresis with UV-Vis detection. *Agro Food Ind. Hi-Tech.* **2006**, 17 (4), 68-71.
- [250] Aljadi, A. M., Kamaruddin, M.Y. Evaluation of the phenolic and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chem.* **2004**, 85 (4), 513-518.

- [251] Sarker, S. D., Latif, Z., Gray, A. I. Natural Products Isolation, kap. Supercritical fluid extraction, 2nd ed. *Humana Press*, Totowa, NJ. **2005**, 47-76.
- [252] Palma, M., Taylor, L. T. Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. *J. Chromotogr. A*, **1999**, 849 (1), 117-124.
- [253] Murga, R., Ruiz, R., Beltran, S., Cabezas, J. L. Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48 (8), 3408-3412.
- [254] Louli, V., Ragoussis, N., Magoulas, K. Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. *Bioresour. Tech.* **2004**, 92 (2), 201-208.
- [255] Le Floch F., Tena, M. T., Ríos, A., Valcárcel, M. Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves. *Talanta*. **1998**, 46 (5), 1123-1130.
- [256] Goli, A. H., Barzegar, M., Sahari, M. A. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chem.* **2005**, 92 (3), 521–525.
- [257] Ajila, C. M., Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Godbout, S. Valéro, J. R. Extraction and analysis of polyphenols: recent trends. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2010**, 31 (3), 227-249.
- [258] Virot, M., Tomao, V., Le Bourvellec, C., Renard, C. M., Chemat, F. Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrason. Sonochem.* **2009**, 17 (6), 1066–1074.
- [259] Biesaga, M., Pyrzyńska, K. Stability of bioactive polyphenols from honey during different extraction methods. *Food Chem.* **2013**, 136 (1), 46-54.
- [260] Wu, J., Lin, L., Chau, F. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. *Ultrason. Sonochem.* **2001**, 8 (4), 347-352.
- [261] Eskilsson, S. C., Bjorklund, E. Analytical-scale microwave assisted extraction. *J. Chromatogr. A*. **2000**, 902 (1), 227-250.
- [262] Venkatesh, M. S., Raghavan, G. S. An overview of microwave processing and dielectric properties of agri-food materials. *Biosys. Eng.* **2004**, 88 (1), 1-18.
- [263] Gfrerer, M., Lankmayr, E. Screening, optimization and validation of microwave-assisted extraction for the determination of persistent organochlorine pesticides. *Anal. Chimi. Acta.* **2005**, 533 (2), 203-211.
- [264] Wang, L., Weller, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Tech.* **2006**, 17 (6), 300-312.

- [265] Proestos, C., Komaitis M. Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. *LWT-Food Sci. Tech.* **2008**, 41 (4), 652-659.
- [266] Pan, X., Niu, G., Liu, H. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chem. Eng. Process.* **2003**, 42 (2), 129-133.
- [267] Liu, Z., Wang, J., Shen, P., Wang, C., Shen, Y. Microwave-assisted extraction and high-speed counter-current chromatography purification of ferulic acid from *Radix Angelicae sinensis*. *Separa. Purifi. Tech.* **2006**, 52 (1), 18-20.
- [268] Longares-Patrón, A., Canizares-Macías, M. P. Focused microwaves assisted extraction and simultaneous spectrophotometric determination of vanillin and *p*-hydroxybenzaldehyde from *Vanilla fragans*. *Talanta.* **2006**, 69 (4), 882-887.
- [269] Martino, E., Ramaiola, I., Urbano, M., Bracco, F., Collina, S. Microwave-assisted extraction of coumarin and related compounds from *Melilotus officinalis* (L.) Pallas as an alternative to Soxhlet and ultrasound-assisted extraction. *J. Chromatogr. A.* **2006**, 1125 (2), 147-151.
- [270] Meyer, A. S., Jepsen, S. M., Sørensen, N. S. Enzymatic release of antioxidants for human low-density lipoprotein from grape pomace. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46 (7), 2439-2446.
- [271] Landbo, A. K., Meyer, A. S. Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenols from black currant juice press residues (*Ribes nigrum*). *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49 (7), 3169-3177.
- [272] Sørensen, H. R., Pedersen, S., Anders, V. N., Meyer, A. S. Efficiencies of designed enzyme combinations in releasing arabinose and xylose from wheat arabinoxylan in an industrial ethanol fermentation residue. *Enzy. Micro. Tech.* **2005**, 36 (5-6), 773-784.
- [273] Renard, C. M. G. C., Baron, A., Guyot, S., Drilleau, J. F. Interactions between apple cell walls and native apple polyphenol: quantification and some consequences. *Inter. J. Biol. Macromol.* **2001**, 29 (2), 115-125.
- [274] Pinelo, M., Arnous, A., Meyer, A. S. Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends Food Sci. Tech.* **2006**, 17 (11), 579-590.
- [275] Le Bourvellec, C., Guyot, S., Renard, C. M. G. C. Interactions between apple (*Malus x domestica Borkh.*) polyphenol and cell walls modulate the extractability of polysaccharides. *Carbohydr. Polym.* **2009**, 75 (2), 251-261.

- [276] Zheng, H. Z., Lee, H. R., Lee, S. H., Kim, C. S., Chung, S. K. Pectinase assisted extraction of polyphenol from apple pomace. *Chin. J. Anal. Chem.* **2008**, 36 (3), 306-310.
- [277] Yu, J., Vasanthan, T., Temelli, F. Analysis of phenolic acids in barley by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49 (9), 4352-4358.
- [278] Bartolomé, A., Gómez-Cordovés, C. Barley spent grain: release of hydroxycinnamic acids (ferulic and p-coumaric acids) by commercial enzyme preparations. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, 79 (3), 435-439.
- [279] Musa, K. H., Abdullah, A., Kuswandi, B., Hidayat, M. A. A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity. *Food Chem.* **2013**, 141 (4), 4102-4106.
- [280] Chen, Z., Bertin, R., Frolidi, D. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chem.* **2013**, 138 (1), 414-420.
- [281] Dżugan, M., Tomczyk, M., Sowa, P., Grabek-Lejko, D. Antioxidant activity as biomarker of honey variety. *Molecules.* **2018**, 23 (8), 2069, 1-14.
- [282] Bueno-Costa, F. M., Zambiazia, R. C., Bohmera, B. W., Chavesa, F. C., Padilha da Silvaa, W., Teixeira, J., Dutrac, Z. I. Antibacterial and antioxidant activity of honeys from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *LWT - Food Sci. Technol.* **2016**, 65, 333-340.
- [283] Socha, R., Pająk, P., Fortuna T., Buksa, K. Phenolic profile and antioxidant activity of Polish meads. *Int. J. Food Prop.* **2005**, 18 (12), 2713-2725.
- [284] Czabaj, S., Kawa-Rygielska, J., Kucharska, A. Z., Kliks, J. Effects of mead wort heat treatment on the mead fermentation process and antioxidant activity. *Molecules.* **2017**, 22 (5), 803, 1-15.
- [285] Blainski, A., Lopes, G. C., de Mello, J. C. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense L.* *Molecules.* **2013**, 18 (6), 6852-6865.
- [286] Medina, M. B., Klejdus, B., Kubáň, V. Simple and rapid method for the analysis of phenolic compounds in beverages and grains. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59 (5), 1565-1571.
- [287] Cicco, N., Lanorte, M. T., Paraggio, M., Viggiano, M., Lattanzio, V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchem. J.* **2009**, 91(1), 107-110.

- [288] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, 26 (9–10), 1231-1237.
- [289] Malig, T. C., Ashkin, M. R., Burman, A. L., Barday, M., Heyne, B. J. M., Back, T. G. Comparison of free-radical inhibiting antioxidant properties of carvedilol and its phenolic metabolites. *MedChemComm.* **2017**, 8 (3), 606–615.
- [290] Maleš, Ž., Medić-Šarić, M. Optimization of TLC analysis of flavonoids and phenolic acids of *Helleborus atrorubens* Waldst. et Kit. *J. Pharm. Biomed.* **2001**, 24 (3), 353-359
- [291] Hawrył, M., Hawrył, A., Soczewiński, E. Application of normal- and reversed-phase 2D TLC on a cyanopropyl-bonded polar stationary phase for separation of phenolic compounds from the flowers of *Sambucus nigra* L. *JPC-J. Planar. Chromat.* **2002**, 15 (1), 4-10.
- [292] Bureau, S., Renard, C. M.G.C., Reich, M., Ginies, Ch., Audergon, J.-M. Change in anthocyanin concentrations in red apricot fruits during ripening. *LWT-Food Sci. Tech.* **2009** 42 (1), 372-377.
- [293] Lazarova, I., Zengin, G., Aktumsek, A., Gevrenova, R., Ceylan, R., Uysal, S. HPLC–DAD analysis of phenolic compounds and antioxidant properties of *Asphodeline lutea* roots from Bulgaria and Turkey. *Ind. Crop. Prod.* **2014**, 61, 438-441.
- [294] Sagdic, O., Ozturk, I., Ozkan, G., Yetim, H., Ekici, L., Yilmaz, M.T. RP-HPLC-DAD analysis of phenolic compounds in pomace extracts from five grape cultivars: Evaluation of their antioxidant, antiradical and antifungal activities in orange and apple juices. *Food Chem.* **2011**;126 (4), 1749-1758.
- [295] Areias, F., Valentão, P., Andrade P., Moreira M.M. HPLC/DAD analysis of phenolic compounds from lavender and its application to quality control. *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.* **2000**, 23 (16), 2563-2572.
- [296] Silici, S., Sarioglu, K., Dogan, M., Karaman, K. HPLC-DAD Analysis to Identify the Phenolic Profile of Rhododendron Honeys Collected from Different Regions in Turkey, *Int. J. Food Prop.* **2014**, 17 (5), 1126-1135.
- [297] Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., Kanazawa, K. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51 (3), 571-581.

- [298] Terpinč, P., Cigić, B., Polak, T., Hribar, J., Požrl, T., LC-MS analysis of phenolic compounds and antioxidant activity of buckwheat at different stages of malting. *Food Chem.* **2016**, 210, 9-17.
- [299] Tohma, H., Köksal, E., Kılıç, Ö., Alan, Y., Yılmaz, M., Gülçin, İ., Alwasel, S. RP-HPLC/MS/MS Analysis of the Phenolic Compounds, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Salvia L. Species*. *Antioxidants* **2016**, 5 (4), 38.
- [300] Pyrzynska, K., Biesaga, M. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trends Anal. Chem.* **2009** 28 (7), 893–902.
- [301] Ciulu, M., Spano, N., Pilo M. I., Sanna, G. Recent Advances in the Analysis of Phenolic Compounds in Unifloral Honeys, *Molecules* **2016**, 21, 451.
- [302] Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I.C.F.R., Baptist, P., Santos-Buelga, C. Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, 47, 1076–1079.
- [303] Lai, J.P., Lim, Y.H., Su, J., Shen, H.M., Ong, C.N. Identification and characterization of major flavonoids and cafeoylquinic acids in three Compositae plants by LC/DAD–APCI/MS. *J. Chromatogr. B.* **2007**, 848, 215–225.
- [304] Kool, M.M., Comeskey, D.J., Cooney, J.M., McGhie, T.K. Structural identification of the main ellagitannins of a boysenberry (*Rubus loganbaccus* × *baileyanus* Britt.) extract by LC–ESI-MS/MS, MALDI-TOF-MS and NMR spectroscopy. *Food Chem.* **2010**, 119, 1535–1543.
- [305] Gioacchini, A.M., Roda, A., Galletti, G.C., Bocchini, P., Manetta, A.C., Baraldini M. High-performance liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric analysis of phenolic acids and aldehydes. *J. Chromatogr. A*, **1996**, 730, 31–37.
- [306] Carrasco-Pancorbo, A., Neusüss, C., Pelzing, M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. CE- and HPLC-TOF-MS for the characterization of phenolic compounds in olive oil. *Electrophoresis*, **2007**, 28, 806–21.

SEZNAM PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI

Publikace v odborných časopisech

1. Rudolf Kupčík, Miroslava Zelená, Pavel Řehulka, Zuzana Bílková, Lenka Česlová, Selective isolation of hydrophobin SC3 by solid-phase extraction with polytetrafluoroethylene microparticles and subsequent spectrometric analysis, *Journal of Separation Science*, 39, 717-724, 2016
2. Mekala Venkatachalam, Miroslava Zelená, Francesco Cacciola, Lenka Česlová, Emmanuelle Girard-Valenciennes, Patricia Clerc, Paola Dugo, Luigi Mondello, Mireille Fouillaud, Archimede Rotondo, Daniele Giuffrida, Laurent Dufossé, Partial characterization of the pigments produced by the marine-derived fungus *Talaromyces albobiverticillius* 30548. Towards a new fungal red colorant for the food industry, *Journal of Food Composition and Analysis*, 67, 38-47, 2018
3. Miroslava Juričová, Soňa Řezková, Kamila Moravcová, Jan Fischer, Lenka Česlová, Stanovení 5-hydroxymethylfurfuralu a vybraných sacharidů v medovinách, *Kvasný Průmysl*, 2, 65-70, 2018

Přednášky na konferencích

1. Miroslava Zelená, Rudolf Kupčík, Lenka Česlová, Pavel Řehulka a Zuzana Bílková, Izolace a analýza hydrofobinů pomocí moderních instrumentálních technik, Monitorování cizorodých látek v životním prostředí, Ovčárna pod Pradědem, 8. 4. 2015 – 10. 4. 2015, Plnotextový sborník: ISBN 978-80-7395-926-5
2. Jitka Klikarová, Miroslava Zelená, Soňa Řezková, Lenka Česlová, Stanovení vybraných organických kyselin v medovinách s využitím spektrofotometrických metod, SVOČ-FCHT 2014-2015, 16. 6. 2015
3. Miroslava Zelená, Lenka Česlová, Rudolf Kupčík, Pavel Řehulka, Zuzana Bílková, Nová metoda izolace hydrofobinu SC3 jako účinného tenzidu biologického původu, XLVIII. Seminář o tenzidech a detergentech, Velké Bílovice, 4.-6.11.2015, str. 29-38, ISBN 978-80-7395-942-5
4. Miroslava Zelená, Daniele Giuffrida, Francesco Cacciola, Rosana Goncalves, Lenka Česlová, Paola Dugo, Luigi Mondello, Přírodní zastoupení karotenoidů v brazilském

ovoci, Monitorování cizorodých látek v životním prostředí XIX., Ovčárna pod Pradědem, 19.4. – 21.4.2017, Plnotextový sborník: ISBN 978-80-7560-086-8

5. Miroslava Zelená, Rudolf Kupčík, Pavel Řehulka, Zuzana Bílková, Lenka Česlová, Selektivní izolace hydrofobinu SC3 a jeho následná proteomická analýza, 69. Zjazd chemikov, Horný Smokovec - Vysoké Tatry, 11.-15.9.2017, 123, ISSN: 1336-7242 ISBN 978-80-7395-942-5

Posterové Prezentace

1. Miroslava Zelená, Rudolf Kupčík, Lenka Česlová, Pavel Řehulka a Zuzana Bílková, Izolace a identifikace hydrofobinu SC3, 4. Konference České společnosti pro hmotnostní spektrometrii, Hradec Králové, 15. – 17. 4. 2015
2. Miroslava Zelená, Lenka Česlová, Soňa Řezková, Petr Česla, Jan Fischer, Optimization of HILIC Separation of Saccharides in Mead, 10th Balaton symposium on high performance separation methods, Siófok, Hungary, 2.- 4. 9. 2015.
3. Miroslava Zelená, Laurent Dufosse, Daniele Giuffrida, Francesco Cacciola, Venkatachalam, Mireille Fouillaud, Emmanuelle Girard-Valenciennes, Lenka Česlová, Paola Dugo, Luigi Mondello, Azaphilones Pigments from *Talaromyces Albobiverticillius*, 40th International Symposium on Capillary Chromatography and 13th GCxGC Symposium, Riva del Garda, Italy, 29.5.-3.6.2016, str. 514, ISBN 978-88-941816-0-9.
4. Miroslava Zelená, Daniele Giuffrida, Francesco Cacciola, Rosana Goncalves, Lenka Česlová, Paola Dugo, Luigi Mondello, Native carotenoids composition in two Brazilian fruits from the Cerrado area, 31st International Symposium on Chromatography, Cork, Ireland, 28.8.- 1.9.2016
5. Miroslava Zelená, Kateřina Pravcová, Jan Fischer, Lenka Česlová, Determination of selected phenolic compounds in mead, 23rd International Symposium on Separation Science, Vienna, Austria, 19.-22.9.2017, 250, ISBN: 978-3-9504017-7-6