

## ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SELECTED VARIETIES OF MALTING BARLEY

Mareček V., Cerkal R.

Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: vit.marecek@mendelu.cz

---

### ABSTRACT

Antioxidants can be defined as substances capable of hindering, slowing down, or preventing undesirable tastes and scents that occur as a result of oxidation caused by free radicals. The vast majority of natural antioxidants are being taken in by humans as a part of complex mixtures and therefore, the term Total Antioxidant Activity (TAA) has been introduced. The aim of this work was to determine the total TAA of grain in selected varieties of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) treated by zinc fertilizer in two growth stages and subsequently, compare the TAA to the qualitative parameters of malt. One of the most often used methods for establishing TAA is the TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) method that indicates the antioxidant activity of a sample that is equivalent to a specific amount of the standard of Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid). The extracts were obtained by mashing 25 g of homogenized grist with the supplement of 225 ml of distilled water at a temperature of 45 °C for the duration of 15 minutes. TEAC was determined on the basis of the samples' capacity to eliminate synthetic radicals DPPH (1,1-diphenyl-2-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl). The absorbance decrease was measured at the 515 nm wave length after 10 minutes from the beginning of the reaction. The highest average TEAC value was found in the Aksamit variety ( $1.34 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ ), the lowest one was found in the Radegast variety ( $1.05 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ ). The inter-variety difference for the measured TEAC values represented almost 30 %, the difference in varieties treated by zinc fertilizer was 10 %. Very weak or weak correlations were found between TEAC and the extract content ( $r=-0.3^*$ ), the final attenuation ( $r=0.34^*$ ), soluble nitrogen content ( $r=-0.43^*$ ),  $\beta$ -glucans content ( $r=0.49^*$ ) and malting quality index (MQI,  $r=-0.33^*$ ).

**Key words:** Barley, antioxidant, malt, TEAC

**Acknowledgements:** This work was carried out with the support of the Research Centre for Study of Extract Compounds of Barley and Hop VC 1M0570 and the project IGA SP2100061.

## ÚVOD

Látky s antioxidačními účinky se v průběhu několika minulých let dostaly do popředí zájmu jak laické veřejnosti, tak i mnoha odborníků, především z potravinářských oborů (Karabín et al., 2006). Antioxidanty v potravinách mohou být definovány jako jakékoli látky, které jsou schopny zdržovat, zpomalovat nebo zabraňovat rozvoji nežádoucích chutí a vůní v důsledku oxidace způsobené volnými radikály. Podle způsobu inhibice oxidačních procesů mohou být antioxidanty děleny na dvě základní skupiny. Primární antioxidanty jsou látky, které s volnými radikály reagují za vzniku stabilních molekul. O sekundárních antioxidantech hovoříme v případě, že nereagují přímo s volnými radikály, ale různými mechanismy zabraňují jejich vzniku (Gordon, 2001). Volné radikály jsou atomy nebo molekuly obsahující nepárové elektrony, díky čemuž jsou vysoce reaktivní a nestabilní. Hrají velmi důležitou roli v mnoha biologických procesech, včetně metabolických cyklů, buněčné signalizaci, imunitní reakci a různých patofyziologických stavech (Vikram et al., 2009). Převážnou většinu přírodních antioxidantů přijímají lidé jako součást složitých směsí, jejichž složky mohou vzájemně reagovat s různými radikály rozličnými mechanismy. Z tohoto důvodu jsou snahy charakterizovat antioxidační aktivitu směšných vzorků jako celek. Termín celková antioxidační aktivita (Total Antioxidant Activity, TAA) byl zaveden pro snadnější vzájemné porovnání antioxidačních účinků různých vzorků. Metod pro stanovení TAA bylo vyvinuto velké množství. Jednou z nejvíce používaných je metoda TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), která udává antioxidační aktivitu vzorku ekvivalentní určitému množství standardu Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) (Fidler a Kolářová, 2009).

Cílem práce bylo u vybraných odrůd ječmene jarního stanovit celkovou antioxidační aktivitu v zru a následně porovnat s kvalitativními parametry sladu.

## MATERIÁL A METODIKA

Jako výchozí materiál byly využity vzorky zrna ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) získané při řešení aktivity Výzkumného centra pro studium obsahových látek ječmene a chmele (VC 1M0570) vypěstované na ŠZP v Žabčicích v roce 2009. V pokusu byl sledován vliv aplikace zinečnatého hnojiva Zinran (celkový obsah 50 % Zn a 4,7 % S) ve dvou růstových fázích: Zn1 (1 kg · ha<sup>-1</sup> v DC 31) a Zn2 (1 kg · ha<sup>-1</sup> v DC 55) na technologickou jakost zrna (Cerkal et al., 2010).

Laboratorní vzorek zrna (30 g) každé ze šesti sladovnických odrůd (Aksamit, Bojos, Jersey, Prestige, Radegast, Sebastian) byl rozemlet na laboratorním mlýnku QC 124 (Mezos, ČR) s velikostí síta 0,8 mm a následně homogenizován. Do rmutovací nádoby bylo naváženo 25 g meliva a přidáno 225 ml destilované vody. Melivo bylo rmutováno ve 12místné rmutovací

lázní Bender a Hobein 15 minut při teplotě 45 °C a poté byly vyjmuty a ponechány při pokojové teplotě 30 minut. Ochlazené vzorky byly hodinu filtrovány přes skládaný filtr (červený filtrační papír č. 560), přelity do uzavíratelných plastových lahvíček a skladovány při teplotě -20 °C.

Před měřením absorbance byly vzorky extraktů rozmrazeny a přefiltrovány přes nitrát-celulózový filtr s pórovitostí 0,2 μm. Pro stanovení antioxidační aktivity byla použita metoda využívající eliminaci syntetických radikálů DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl). Jako standardní látka byl použit Trolox rozpuštěný v methanolu a z tohoto zásobního roztoku byla ředěním připravena kalibrační řada v experimentálně zjištěném rozmezí koncentrací 20–500 μmol · l<sup>-1</sup>. Ze zásobního roztoku DPPH (0,2 mol · l<sup>-1</sup>) v methanolu byl připraven pracovní roztok o koncentraci 100 μmol · l<sup>-1</sup> obsahující octanový pufr (pH 4,3) v poměru 1:2 (DPPH:pufr). Pro analýzu bylo do polystyrénových kyvet (Plastibrand-Brand ISO 9001/14001) odebráno 1,9 ml této reakční směsi, ke které bylo přidáno 100 μl vzorku. Úbytek absorbance byl měřen při vlnové délce 515 nm po dobu 10 min. od začátku reakce na Life science UV/VIS spektrofotometru DU 730 (Beckman Coulter, USA). Původní fialové zbarvení roztoku bylo působením antioxidantů odbarveno. Míra schopnosti inhibice fialového zbarvení byla vyjádřena v procentech a pomocí kalibrační křivky přepočtena na ekvivalentní množství Troloxu (Fidler, Kolářová, 2009).

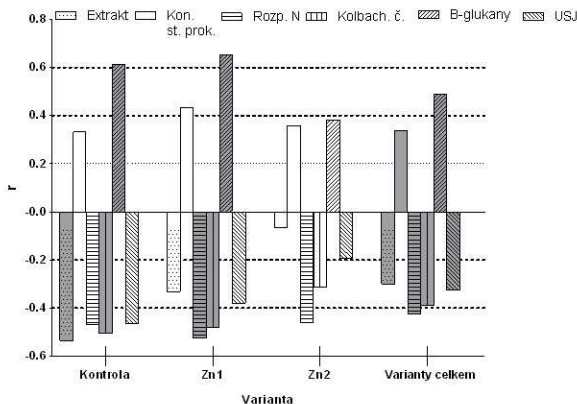
## VÝSLEDKY A DISKUZE

Výstupy analýzy variance a následného testování podle Tukeye ( $P < 0,05$ ) ukázaly na existenci rozdílů v celkové antioxidační aktivitě zrna (TEAC) mezi jednotlivými genotypy i mezi variantami ošetření zinečnatým hnojivem. Pro objasnění vztahů mezi antioxidační kapacitou a vybranými ukazateli jakosti sladu byly vypočteny korelační koeficienty (Obr. 1).

Nejvyšší průměrná hodnota TEAC byla zjištěna u odrůdy Aksamit (1,34 μmol · g<sup>-1</sup>; Tab. 2), nejnižší u odrůdy Radegast (1,05 μmol · g<sup>-1</sup>). Rozdíl v naměřených hodnotách TEAC tedy představoval téměř 30 %. Významnou roli v metabolismu antioxidačních látek sehrála také přítomnost zinku (Moos, 2000). Jeho aplikace na vyvíjející se zrna (ve fázi DC 57) přispěla k poklesu hodnot TEAC o více než 10 % oproti kontrolní, neošetřené variantě (1,28 μmol · g<sup>-1</sup>). Aplikace zinku ve fázi DC 31 se na hodnotách antioxidační kapacity zrna průkazně neprojevila (1,24 μmol · g<sup>-1</sup>). Vycházíme-li z předpokladu, že antioxidační látky byly z meliva získány extrakcí ve vodném roztoku, je zajímavé sledovat také hodnoty celkového extraktu v moučce. Průkazně nejvyšší hodnoty extraktu byly zjištěny u odrůdy Sebastian (81,83 %), nejnižší u odrůdy Aksamit (80,69 %), u které byl zároveň zjištěn absolutně nejnižší obsah rozpustného dusíku (75 mg · 100 ml<sup>-1</sup>). Obsah rozpustného dusíku nárůstal u jednotlivých odrůd s jejich klesající TEAC (viz obr. 1). To lze zdůvodnit degradací skupiny látek antioxidační povahy, u kterých dochází při teplotě 45 °C k uvolňování radikálů obsahujících rozpustný dusík. U souboru sladovnických odrůd bylo zjištěno široké spektrum obsahu β-glukanů (od 130 do 331,4 mg · l<sup>-1</sup>), které pozitivně korelovalo s hodnotami TEAC ( $r = 0,49^*$ ). Uvedené potvrzuje obecně známý fakt o antioxidačním působení β-glukanů (Hall, 2001). V pivovarské praxi jsou však vysoké hodnoty β-glukanů

příčinou technologických problémů a jejich zvýšený obsah v zrnu, resp. ve sladu, je proto nežádoucí (Wunderlich, Back, 2008).

Obr. 1 Korelace mezi antioxidační kapacitou (TEAC) zrna a vybranými parametry jakosti sladu ječmene jarního z lokality Žabčice (2009)



Pozn. Pro výpočet vztahů byly použity data z celého souboru ( $n=54$ ), resp. hodnoty grupované podle variant ošetření zinečnatým hnojivem (kontrola, Zn1 a Zn2;  $n=18$ ) bez ohledu na odrůdu. Příkazné závislosti jsou v grafu znázorněny výplní.

Hodnocení souboru dat regresní analýzou ukázalo na existenci velmi slabé negativní závislosti mezi TEAC a obsahem extraktu ( $r=-0,3^*$ ), velmi slabé pozitivní korelace s konečným stupněm prokvašení ( $r=0,34^*$ ). Slabý negativní vztah byl zjištěn mezi u obsahem rozpustného dusíku ( $r=-0,43^*$ ). Slabou pozitivní závislostí ( $r=0,49^*$ ) se vyznačoval vztah mezi TEAC a obsahem  $\beta$ -glukanů. Mezi hodnotami TEAC a USJ byla zjištěna velmi slabá negativní závislost ( $r=-0,33^*$ )

## ZÁVĚR

Byla stanovena celková antioxidační aktivita (TEAC) u šesti odrůd ječmene jarního ošetřeného ve dvou růstových fázích zinečnatým hnojivem Zinran. Rozdíl v hodnotách TEAC mezi jednotlivými odrůdami činil téměř 30 % ( $1,34-1,05 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ ), mezi variantami ošetření pak více než 10 % ( $1,28-1,15 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ ). Z těchto skutečností lze vyvozovat, že aplikace zinečnatého hnojiva ovlivňuje množství obsažených látek s antioxidačními účinky v zrnu ječmene jarního, avšak primárně je TEAC spíše odrůdovou záležitostí. Byly zjištěny velmi slabé nebo slabé závislosti mezi TEAC a obsahem extraktu ( $r=-0,3^*$ ), konečným stupněm prokvašení ( $r=0,34^*$ ), obsahem rozpustného dusíku ( $r=-0,43^*$ ), obsahem  $\beta$ -glukanů ( $r=0,49^*$ ) a USJ ( $r=-0,33^*$ ).

**LITERATURA**

Cerkal R., Hřivna L., Ryant P., Prokeš J., Březinová Belcredi N., Vejražka K., Michnová M., Gregor T. (2010): Zinek – vliv na růst rostlin a kořenů ječmene, technologickou kvalitu zrna a kvašení sladiny. *Kvasný průmysl*, 56(3): 152-159.

Fidler M., Kolářová L. (2009): Analýzy antioxidantů v chmelu a pivu. *Chem. Listy*, 103: 232-235.

Gordon M. H. (2001): The development of oxidative rancidity in foods. In: Pokorný J., Yanishlieva N., Gordon M. (eds.) *Antioxidants in Food*. Woodhead Publishing Limited, Sawston (UK):7-21. ISBN: 1 85573 463 X.

Hall C. (2001): Sources of natural antioxidants: oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources. In: Pokorný J., Yanishlieva N., Gordon M. (eds.) *Antioxidants in Food*. Woodhead Publishing Limited, Sawston (UK):159-209. ISBN: 1 85573 463 X.

Karabín M., Dostálek P., Hořta P. (2006): Přehled metod pro stanovení antioxidační aktivity v pivovarství. *Chem. Listy*, 100: 184-189.

Moss R. W. (2000): *Antioxidants against Cancer*. Equinox Press, Inc. New York: p.82. ISBN: 1-881025-28-74.

Vikram D. S., Rivera B. K., Kuppasamy P. (2009): In Vivo Imaging of Free Radicals and Oxygen. In: Uppu R. M., Murthy S. N., Parinandi N. L. (eds.): *Free Radicals and Antioxidant Protocols*, Second Edition. Humana Press, New York: 3-28. ISBN: 978-1-58829-710-5.

Wunderlich S., Back W. (2008): Overview of Manufacturing Beer: Ingredients, Processes, and Quality Criteria. In: Preedy V. R. (ed.): *Beer in Health and Disease Prevention*. Academic Press (Elsevier): 3-16. ISBN: 978-0-12-373891-2.

**PŘÍLOHY:**

Tab. 1: Tabulka analýzy variance pro antioxidační kapacitu zrna ječmene (TEAC) a vybrané jakostní parametry sladu

Faktor	n	TEAC ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ )		Extrakt v moučce (%)		Kon. stupeň prokvašení (%)		Rozp. N ( $\text{mg} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$ )		Kolbachovo číslo		Obsah $\beta$ -glukanů ( $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ )		USJ	
		MS	Výz.	MS	Výz.	MS	Výz.	MS	Výz.	MS	Výz.	MS	Výz.	MS	Výz.
Odr.	5	0,09074	***	2,4	***	29,5	***	460,1	***	157,7	***	51449	***	14,0923	***
Var.	2	0,07825	***	0,2	NS	0,0	NS	1,5	NS	1,8	NS	1538	NS	0,2984	NS
Odr. x Var.	10	0,00183	NS	0,0	NS	0,3	NS	9,5	NS	1,4	NS	1474	NS	0,1020	NS
Chyba	36	0,00818		0,3		0,2		8,5		2,2		1339		0,5163	
Celkem	53														

Pozn. MS – průměrný čtverec; Výz. – významnost na hladině  $P < 0,05$  \*,  $P < 0,01$  \*\*,  $P < 0,001$  \*\*\* \* Odr. – odrůda, Var. – varianta; NS – statisticky nevýznamné. USJ – ukazatel sladovnické jakosti.

Tab. 2: Průměrné hodnoty TEAC zrna ječmene, vybraných jakostních parametrů sladu a výsledky testování rozdílů mezi úrovněmi faktorů Tukeyovým testem ( $P < 0,05$ )

	Faktor	TEAC ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Extrakt v moučce (%)	Kon. stupeň prokvašení (%)	Rozp. N ( $\text{mg} \cdot 100 \text{ml}^{-1}$ )	Kolbachovo číslo	Obsah $\beta$ -glukanů ( $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ )	USJ
		Průměr $\pm s_d$	Průměr $\pm s_d$	Průměr $\pm s_d$	Průměr $\pm s_d$	Průměr $\pm s_d$	Průměr $\pm s_d$	Průměr $\pm s_d$
Odrůda	Aksamit	1,34 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	80,69 $\pm$ 0,52 <sup>b</sup>	80,24 $\pm$ 0,53 <sup>b</sup>	75,00 $\pm$ 2,87 <sup>d</sup>	36,39 $\pm$ 1,32 <sup>c</sup>	331,44 $\pm$ 49,93 <sup>a</sup>	1,68 $\pm$ 0,09 <sup>e</sup>
	Bojos	1,25 $\pm$ 0,07 <sup>ab</sup>	80,72 $\pm$ 0,71 <sup>b</sup>	78,34 $\pm$ 0,56 <sup>c</sup>	90,89 $\pm$ 3,26 <sup>bc</sup>	42,27 $\pm$ 1,63 <sup>b</sup>	130,00 $\pm$ 31,69 <sup>d</sup>	2,82 $\pm$ 0,43 <sup>d</sup>
	Jersey	1,27 $\pm$ 0,09 <sup>ab</sup>	81,77 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>	81,52 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>	88,11 $\pm$ 1,69 <sup>c</sup>	46,89 $\pm$ 1,78 <sup>a</sup>	259,89 $\pm$ 42,55 <sup>b</sup>	4,73 $\pm$ 0,57 <sup>ab</sup>
	Prestige	1,26 $\pm$ 0,09 <sup>ab</sup>	80,89 $\pm$ 0,38 <sup>b</sup>	81,83 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>	87,56 $\pm$ 2,13 <sup>c</sup>	42,26 $\pm$ 1,09 <sup>b</sup>	194,33 $\pm$ 31,25 <sup>c</sup>	3,90 $\pm$ 0,44 <sup>bc</sup>
	Radegast	1,05 $\pm$ 0,11 <sup>c</sup>	81,17 $\pm$ 0,44 <sup>ab</sup>	77,46 $\pm$ 0,39 <sup>d</sup>	92,44 $\pm$ 2,13 <sup>ab</sup>	44,21 $\pm$ 1,71 <sup>b</sup>	157,33 $\pm$ 33,41 <sup>cd</sup>	3,33 $\pm$ 0,53 <sup>cd</sup>
	Sebastian	1,17 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	81,83 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>	81,83 $\pm$ 0,39 <sup>a</sup>	95,67 $\pm$ 4,42 <sup>a</sup>	48,20 $\pm$ 0,78 <sup>a</sup>	165,22 $\pm$ 29,21 <sup>cd</sup>	5,04 $\pm$ 1,24 <sup>a</sup>
Varianta	K	1,28 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	81,22 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup>	80,06 $\pm$ 1,66 <sup>a</sup>	88,44 $\pm$ 7,26 <sup>a</sup>	43,64 $\pm$ 4,22 <sup>a</sup>	198,94 $\pm$ 67,04 <sup>a</sup>	3,62 $\pm$ 1,41 <sup>a</sup>
	Zn1	1,24 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	81,07 $\pm$ 0,71 <sup>a</sup>	80,16 $\pm$ 1,74 <sup>a</sup>	88,44 $\pm$ 6,75 <sup>a</sup>	43,02 $\pm$ 4,09 <sup>a</sup>	216,72 $\pm$ 90,17 <sup>a</sup>	3,44 $\pm$ 1,23 <sup>a</sup>
	Zn2	1,15 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	81,24 $\pm$ 0,62 <sup>a</sup>	80,10 $\pm$ 1,85 <sup>a</sup>	87,94 $\pm$ 7,78 <sup>a</sup>	43,44 $\pm$ 4,18 <sup>a</sup>	203,44 $\pm$ 78,80 <sup>a</sup>	3,69 $\pm$ 1,34 <sup>a</sup>

Pozn.  $s_d$  – směrodatná odchylka; K – kontrola, Zn1, Zn2 – ošetřeno zinečnatým hnojivem v růstové fázi DC 31, resp. DC 55. Průměry označené odlišnými písmeny představují statisticky významné rozdíly na 95% hladině významnosti.