

Porovnání českých a čínských odrůd ječmene s ohledem na technologicky významné polyfenolové látky

A Comparison of Czech and Chinese Varieties of Barley with Regards to Technologically Important Polyphenolic Substances

Marcel KARABÍN, Štěpán HALAMA, Lukáš JELÍNEK, Deliang WANG*, Pavel DOSTÁLEK

Ústav biotechnologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, Praha 6, 166 28 / *Department of Biotechnology, Institute of Chemical Technology Prague, Technická 5, Praha 6, 166 28, Czech Republic*

*China National Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing, China

e-mail: karabinm@vscht.cz

Recenzovaný článek / *Reviewed paper*

Karabín, M. – Halama, Š. – Jelínek, L. – Wang, D. – Dostálek, P.: Porovnání českých a čínských odrůd ječmene s ohledem na technologicky významné polyfenolové látky. Kvasny Prum. 59, 2013, č. 12, s. 346–351

Práce byla věnována nalezení rozdílů v množství a zastoupení některých významných polyfenolových látek ve vzorcích ječmene pěstovaného v České republice a v Čínské lidové republice. Zmíněné vzorky se lišily ve vyšším celkovém množství sledovaných polyfenolů v čínských ječmenech i v zastoupení některých vybraných skupin polyfenolů. Zde největší rozdíl spočíval ve výrazně vyšším (téměř dvojnásobném) zastoupení prokyanidinu B3 a katechinu ve volné frakci a kyselin *p*-kumarové a ferulové ve frakci vázané. Je tedy možno konstatovat, že specifické podmínky pěstování, stejně jako odrůdová odlišnost ječmenů mohou být zdrojem některých technologicky významných odlišností, které by mohly mít vliv na kvalitu piva vyrobeného za použití konkrétní suroviny.

Karabín, M. – Halama, Š. – Jelínek, L. – Wang, D. – Dostálek, P.: A comparison of Czech and Chinese varieties of barley with regards to technologically important polyphenolic substances. Kvasny Prum. 59, 2013, No. 12, p. 346–351

The aim of this study was to find differences in the quantity and presence of selected polyphenolic substances in barley grown in the Czech Republic and in the People's Republic of China. The barley samples from China had a higher total amount of the polyphenols studied and a significantly higher amount of some specific groups of polyphenols. The most distinct differences were the significantly higher amount of procyanidin B3 and catechin in the free fractions (almost double) and of *p*-coumaric and ferulic acids in the bound fractions. Therefore, the specific conditions of cultivation's well as dissimilarity of barley varieties could be the source of the technologically significant differences that could have an impact on the beer quality.

Karabín, M. – Halama, Š. – Jelínek, L. – Wang, D. – Dostálek, P.: Der Vergleich von tschechischen und chinesischen Gerstensorten mit Rücksicht auf die bedeutende Polyphenolstoffe. Kvasny Prum. 59, 2013, Nr. 12, S. 346–351

Der Artikel befasst sich mit dem Vergleich der Menge und Vertretung einiger bedeutenden Polyphenolsubstanzen in der Tschechischen Republik und in der Volksrepublik China aufgewachsen Gerstenmustern. Die erwähnten Muster unterschieden sich in der höheren Gesamtmenge an verfolgte Polyphenole in den chinesischen Gersten und in der Vertretung von einigen ausgesuchten Polyphenolgruppen. Da der größte Unterschied war in einer bedeutend höheren (fast doppelt) Vertretung des Prokyanidins B3 und Katechins in der freien Fraktion und *p*-Cumar- und Ferulasäure in der gebundenen Fraktion. Also es ist möglich zu konstatieren, dass die spezifische Bedingungen der spezifischen Anbaubedingungen und die Gerstensortenverschiedenheit eine Quelle von einigen technologisch bedeutenden Differenzen mit Einfluss auf die Qualität des unter Anwendung des konkreten Rohstoffs hergestellten Bieres seien könnten.

Klíčová slova: *polyfenoly, flavonoidy, ječmen, slad*

Keywords: *polyphenols, flavonoids, barley, malt*

1 ÚVOD

Polyfenolové látky jsou rozsáhlou skupinou sekundárních metabolitů rostlin, které se do piva dostávají prostřednictvím dvou základních surovin, ječmene (sladu) a chmele. Spektrum jejich vlastností, týkajících se pivovarské technologie a zejména vlastností hotového produktu, je velice široké. V minulosti se studium polyfenolových sloučenin soustřeďovalo zejména na jejich roli v procesu tvorby polyfenol-bílkovinných komplexů, a tím i na vliv polyfenolů na koloidní stabilitu piva (McMurrough et al., 1996a; McMurrough et al., 1996b; Parker, 2007; Aron a Shellhammer, 2010; Rehmanji et al., 2005) a možnosti selektivního odstraňování prekursorů vzniku zákalu (Leiper et al., 2005). Po zavedení moderních stabilizačních postupů, schopných odstranit z piva velkou část polyfenolů, byla tato problematika poměrně dlouhou dobu považována za vyřešenou a pozornost se posunula směrem k antioxidačním vlastnostem polyfenolů (Rice-Evans et al., 1996; Pietta, 2000; Dvořáková et al., 2008a), ať už s ohledem na tvorbu senzoricky nežádoucích produktů, zejména karbonylů (Vandehaegen et al., 2006; Mikyška et al., 2011), nebo na antikancerogenní vlastnosti této skupiny látek (Gerhäuser, 2005; Ramos, 2007). Moderní analytické postupy také umožnily identifikaci a přesnou kvantifikaci konkrétních polyfenolů (Dvořáková et al., 2008b). Významný pokrok v této oblasti znamenal značný posun od snahy odstraňovat

1 INTRODUCTION

Polyphenolic substances from a diverse group of secondary metabolites of plants that pass into the beer from two raw materials: barley (malt) and hops. The range of their properties with regards to beer technology and especially to the quality of the final product is wide. In the past, polyphenols were often studied mainly with regards to their significance in the process of the formation of polyphenols-protein complexes which influence the colloidal stability of beer (McMurrough et al., 1996a; McMurrough et al., 1996b; Parker, 2007; Aron and Shellhammer, 2010; Rehmanji et al., 2005) and to the possible selective removal of these haze-active precursors from beer (Leiper et al., 2005). This matter was considered as solved with the introduction of modern stabilization methods able to remove a large part of the polyphenols. Lately, the antioxidation properties of polyphenols gained interest (Rice-Evans et al., 1996; Pietta, 2000; Dvořáková et al., 2008a), particularly with regard to the formation of sensory undesirable compounds (Vandehaegen et al., 2006; Mikyška et al., 2011) as well as anticancerogenic properties of polyphenols (Gerhäuser, 2005; Ramos, 2007). Moreover, the advanced analytical methods enabled the identification and a precise quantification of particular polyphenols (Dvořáková et al., 2008b). The development in this field caused a shift away from efforts to remove as much of the polyphenols as possible during the stabi-

Tab. 1 Seznam analyzovaných odrůd / The list of varieties analysed

Místo pěstování / Region of cultivation	Seznam odrůd / List of varieties analysed
ČR-Kroměříž / CZ-Kromeriz	Aksamit, Blaník, Bojos, Jersey, Kangoo, Malz, Sebastian
Čína / China	Hua 2759, Chuannong Da 73, Ken 7, Kong Yiu 13-01

Tab. 2 Vlnové délky použité pro kvantifikaci jednotlivých polyfenolů / The wavelenghts used for the quantification of single polyphenols

Vlnová délka / Wavelength (nm)	Polyfenol / Polyphenols
253	protokatechová k., p-hydroxybenzoová k., vanilová k., ellagová k. / <i>procatechuic acid, p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, ellagic acid</i>
280	gallová k., prodelfinidin B3, prokyanidin B3, catechin, vanilin, trans-skořicová k. / <i>gallic acid, prodelphinidin B3, procyanidin B3, catechin, vanillin, trans-cinnamic acid</i>
306	p-kumarová k. / <i>p-coumaric acid</i>
330	káвовá k., ferulová k., sinapová k. / <i>caffeic acid, ferulic acid, sinapic acid</i>

během stabilizace co možná největší podíl polyfenolových látek. Nejnovější práce (Steiner et al., 2011; Aron a Shellhammer, 2010) na toto téma se věnují studiu vlastností konkrétních chemických sloučenin (polyfenolů i bílkovin), odpovědných za vznik koloidního zákalu, tak, aby bylo možno jeho vzniku předcházet za současného zachování ostatních pozitivních technologických vlastností polyfenolů.

Přestože ječné, respektive sladové polyfenoly tvoří většinu polyfenolů obsažených v pивu (Gerhäuser, 2005; Vanderhaegen et al., 2006), v minulosti byly studovány zejména polyfenoly izolované z chmele. Obě skupiny polyfenolů obsahují sice až na výjimky tytéž látky, jejich relativní zastoupení se však ve chmelu a sladu značně liší. Kromě toho existují některé významné skupiny polyfenolů (prenylované flavonoidy), které se vyskytují jen ve chmelu (Stevens a Page, 2004), nebo je jich naopak výrazně více ve sladu, což se týká například kyseliny ferulové nebo některých proanthokyanogenů (Hernanz et al., 2001; Dvořáková et al., 2008a). Významný podíl sladových polyfenolů se navíc vyskytuje ve vázané formě, nejčastěji jako glykosidy (Ferrerres et al., 2009), fenolové kyseliny jsou také často vázány na ostatní složky zrna esterovou vazbou (Verardo et al., 2008). Proto je také izolace a purifikace ječných polyfenolů ve srovnání s chmelovými výrazně obtížnější. Celý proces je značně časově náročný, spočívá nejčastěji v alkalické hydrolyze nebo více-násobné extrakci organickými rozpouštědly, vyžaduje řadu následných purifikačních kroků, které umožňují oddělení problematických látek, jako jsou polysacharidy, lipidy a bílkoviny (Ehrenbergerová et al., 2012; Dvořáková et al., 2008b). Na druhou stranu umožňují některé tyto postupy stanovení podílu konkrétních polyfenolů v jednotlivých dříve zmiňovaných frakcích (volné, vázané, esterifikované) a tím poskytují, ve srovnání s chmelovými, širší spektrum informací o této významné skupině látek.

Lze předpokládat, že množství a zastoupení jednotlivých polyfenolů a jejich skupin v ječmeni bude z velké části určeno odrůdou, místem a způsobem jejich pěstování (Mikyška et al., 2010). Vzhledem k tomu, že některé skupiny polyfenolových sloučenin, zejména flavan-3-oly a proanthokyanogeny, jsou spoluodpovědné za zhoršování koloidní stability piva (McMurrough et al., 1996a; McMurrough et al., 1996b; Parker, 2007; Aron a Shellhammer, 2010), mohla by znalost vztahu mezi odrůdou, agrotechnickými parametry a obsahem polyfenolových sloučenin v budoucnu významně přispět k zajištění vysoké kvality vyráběného produktu.

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Analyzované vzorky ječmene

Byly analyzovány 4 čínské odrůdy a 7 odrůd tuzemských ze sklizně 2011, seznam odrůd je uveden v tab. 1. Vzorky tuzemských odrůd

lization process. The latest studies from Steiner et al. (2011) and Aron and Shellhammer (2010) are focused on particular haze-active substances such as polyphenols and proteins with the intention of finding a way to avoid the haze and simultaneously preserving other positive technological properties of the polyphenols.

In the past, polyphenols from hops were primarily studied despite the fact that most of the polyphenols in beer originate from barley or malt (Gerhäuser, 2005; Vanderhaegen et al., 2006). With a few exceptions both raw materials contain the same compounds but their relative contents in hops differ considerably from those in malt or barley. Furthermore, hops alone contains an important group of polyphenols namely the prenylated flavonoids (Stevens and Page, 2004). On the other hand, malt contains significantly more ferulic acid and some proanthocyanidins (Hernanz et al., 2001; Dvořáková et al., 2008a). A significant part of malt polyphenols are bound, mostly to glycosides (Ferrerres et al., 2009). The phenolic acids are often bound to other parts of barley grain by an ester bonds (Verardo et al., 2008). Therefore, the separation and purification of barley polyphenols is more difficult when compared with hops polyphenols. The whole procedure is rather time consuming beginning with an alkali hydrolysis or multiple extractions with organic solvents followed by a number of purification steps which allow the removal of interfering substances such as polysaccharides, lipids and proteins (Ehrenbergerová et al., 2012; Dvořáková et al., 2008b). On the other hand, some of these procedures allow a quantitative determination of particular polyphenols in previously mentioned fractions (free, bound and esterified). This provides a wider range of information about this important group of compounds when compared with hops polyphenols.

It can be assumed that the presence and quantity of particular polyphenols and their groups will largely depend on the barley variety and the method of cultivation (Mikyška et al., 2010). Considering the fact that different groups of polyphenolic compounds (particularly flavan-3-ols and proanthocyanidins) have a negative impact on the colloidal stability of beer (McMurrough et al., 1996a; McMurrough et al., 1996b; Parker 2007; Aron and Shellhammer, 2010), knowledge about the relationship between the variety, the agrotechnological parameters and the contents of polyphenols in barley could add considerably to a higher quality of the product.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Barley analysed

Four Chinese barley varieties and seven Czech barley varieties from the 2011 crop were analysed. The list of the varieties is given in Tab. 1. The Czech barley was grown in the Krom říž region and the barley samples were provided by the Agricultural Research Institute Kromeriz, Ltd.

2.2 Separation of the individual polyphenols fractions

For the separation of the free, bound and esterified fractions of polyphenols a modified method, originally used for the separation of phenolic acids from oil seeds, was used (Krygier et al., 1982). Firstly, the lipids were removed from the ground sample of barley or from malt by extraction with hexane. Secondly, the sample was repeatedly extracted with a mixture of acetone and water. The liquid part was collected in a heart shaped flask and used for the isolation of the free and esterified polyphenols. The residue was used for the isolation of bound polyphenols.

Isolation of the free polyphenols

The acetone was removed from the liquid extract in an evaporator at 35 °C and the water soluble part was extracted several times with ethyl acetate. The organic phase was collected in a heart shaped flask and dried in the evaporator at 35 °C. The remaining water soluble phase was used for the isolation of the esterified polyphenols.

Isolation of the esterified polyphenols

The water soluble part was subjected to an alkaline hydrolysis with NaOH at room temperature and then acidified with HCl to a pH < 2. Subsequently, the solution was extracted several times with ethyl acetate. The organic phase was dried in the evaporator under the same conditions as for the free polyphenols.

Isolation of the bound polyphenols

The residue from the primary extraction was subjected to an alkaline hydrolysis with NaOH, then acidified with HCl to a pH = 2

byly vypěstovány v oblasti Kroměříž a byly dodány ze Zemědělského výzkumného ústavu Kroměříž s.r.o.

2.2 Izolace jednotlivých frakcí polyfenolů

Pro izolaci volných, vázaných a esterifikovaných polyfenolů byla použita modifikovaná metoda, která byla původně navržena pro izolaci fenolových kyselin z olejnatých semen (Krygier et al., 1982). Ze vzorku namletého ječmene (sladu) byly nejprve odstraněny lipidové složky extrakcí hexanem. Následně byl vzorek opakovaně extrahován směsí aceton:voda a odstředěn. Kapalný podíl (hrubý extrakt) byl shromážděn v baňce a použit k izolaci volných a esterifikovaných polyfenolů, reziduum bylo použito k izolaci vázaných polyfenolů.

Izolace volných polyfenolů

Z hrubého extraktu byl na vakuové odparce při 35 °C odstraněn aceton a zbylý vodný podíl byl opakovaně extrahován etylacetátem. Organická fáze byla shromážděna v srdcové baňce a odpařena na vakuové odparce při 35 °C do sucha. Zbylý vodný podíl byl použit k izolaci esterifikovaných polyfenolů.

Izolace esterifikovaných polyfenolů

Zbylý vodný podíl po izolaci volných polyfenolů byl alkalicky hydrolyzován pomocí NaOH za pokojové teploty a následně okyselen HCl na pH < 2. Takto upravený roztok byl opakovaně extrahován etylacetátem. Organická fáze byla poté za stejných podmínek jako volné polyfenoly odpařena do sucha.

Izolace vázaných polyfenolů

Reziduum po primární extrakci bylo podrobeno alkalické hydrolyze pomocí NaOH. Hydrolyzát byl poté okyselen HCl na pH 2 a odstředěn. Získaný kapalný podíl byl opakovaně extrahován etylacetátem za vzniku emulze, kterou bylo nutné odstředit. Organická fáze byla po každé extrakci odebírána pomocí pipety a shromážděna v srdcové baňce. Obsah srdcové baňky byl za stejných podmínek jako při izolaci volných a esterifikovaných polyfenolů odpařen do sucha.

2.3 Stanovení obsahu polyfenolů metodou HPLC-DAD

Pro stanovení polyfenolů byl využit kapalinový chromatograf s detektorem diodového pole (HPLC-DAD) Agilent 1100 Series. Vzorky jednotlivých frakcí byly připraveny výše uvedeným postupem a po odpaření byl obsah baněk pomocí ultrazvuku rozpuštěn v 1 ml okyseleného methanolu a přefiltrován přes PTFE mikrofiltr do vialek. Pro dělení látek byla použita kolona Eclipse XDB (150x4,6 mm, 5 µm) s použitím binární gradientové eluce, přičemž mobilní fáze sestávala z methanolu (5 až 50 obj. %) a demineralizované vody. Obě složky mobilní fáze byly okyseleny pomocí kyseliny octové na pH 3. Objem nástřiku vzorku byl 20 µl, teplota kolony 40 °C a průtok mobilní fáze 1 ml/min.

Detekce pomocí DAD detektoru byla provedena v celé šíři UV spektra a identifikace jednotlivých polyfenolů vycházela z retenčních časů zjištěných analýzou čistých standardů jednotlivých polyfenolů a jejich charakteristických absorpčních spekter. Kvantifikace byla prováděna pomocí vnější kalibrace, při vlnových délkách 253, 280, 306 a 330 nm v závislosti na absorpčním maximu jednotlivých polyfenolů (tab. 2). Celkem bylo v různých frakcích nalezeno a kvantifikováno 13 polyfenolových sloučenin (tab. 3).

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Výsledky stanovení jednotlivých polyfenolových sloučenin ve třech frakcích (volné, vázané, esterifikované) jsou uvedeny v tab. 4 a 5. U všech vzorků jsou jasné patrné rozdíly v zastoupení některých polyfenolů v jednotlivých frakcích. Volná frakce je tvořena především flavan-3-oly (catechin) a proanthocyanogeny (prodelfinidin B3 a prokyanidin B3), obsah fenolových kyselin je v této frakci velmi nízký a pohybuje se i v případě dominantní ferulové kyseliny maximálně v rozmezí 0,2–0,3 mg/100g u vzorků tuzemských odrůd, ve vzorcích ječmene pěstovaného v Číně je obsah většiny analyzovaných kyselin v této frakci o něco vyšší. Esterifikovaná frakce je podle předpokladu tvořena prakticky výhradně fenolovými kyselinami. Výjimkou je catechin, u kterého existuje předpoklad, že se na esterových vazbách podílí svými hydroxylovými skupinami za vzniku struktur typu gallo catechinů, catechingalátů případně catechiferulátů, jejichž výskyt byl prokázán v ječmeni i dalších rostlinách (Whittle et al., 1999; Sanz et al., 2010; Yesil-Celiktas et al., 2009). Vázaná frakce zkoumaných vzorků je tvořena převážně glykosidy jednotlivých polyfeno-

Tab. 3 Zkratky polyfenolových sloučenin používané v následujících tabulkách / Abbreviations for the polyphenolic compounds used in the following tables

Polyfenol / Polyphenols	Zkratka / Abbreviation
protocatechová k. / <i>procatechuic acid</i>	prot
para-hydroxybenzoová k. / <i>para-hydroxybenzoic acid</i>	p-hyd
vanilová / <i>vanillic acid</i>	va
ellagová k. / <i>ellagic acid</i>	ella
gallová k. / <i>gallic acid</i>	gal
prodelfinidin B3 / <i>prodelfinidin B3</i>	prod B3
prokyanidin B3 / <i>procyanidin B3</i>	prok B3
catechin / <i>catechin</i>	kat
trans-skořicová k. / <i>trans-cinnamic acid</i>	t-sko
kávoová k. / <i>caffeic acid</i>	kav
ferulová k. / <i>ferulic acid</i>	fer
sinapová k. / <i>sinapic acid</i>	sin
para-kumarová k. / <i>para-coumaric acid</i>	p-kum

and centrifuged. The liquid part obtained was extracted several times with ethyl acetate. An emulsion was formed which must have been centrifuged. The organic phase was sampled after each extraction with a pipette, collected in a heart shaped flask and dried in the evaporator under the same conditions as for the free and esterified polyphenols.

2.3 Determination of the polyphenols content by HPLC-DAD

For the determination of the polyphenols a high-performance liquid chromatograph equipped with a diode array detector (HPLC-DAD) Agilent 1100 Series and a column Eclipse XDB; 150 cm x 4.6 mm i.d. and 5 µm film thickness (all Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used. Samples of the individual fractions were prepared according to the methods described above. The contents of the heart shaped flasks were dissolved in 1 ml of acidified methanol using an ultrasonic bath and filtered through a PTFE micro filter into vials. For the separation binary gradient elution was used. The mobile phase consisted of methanol (5 to 50% vol.) and deionized water. Both components of the mobile phase were acidified with acetic acid to a pH = 3. The injection volume was 20 µl, the column temperature was 40 °C and the flow rate of the mobile phase was 1 ml/min. The detection with DAD accommodated the entire UV/VIS spectrum. The identification of the individual polyphenols was based on their retention times and their characteristic absorption spectra found from the analysis of polyphenols standards. For the quantification an external calibration at wavelengths 253, 280, 306 and 330 nm depending on the absorption maximum of individual polyphenols was used (Tab. 2). In total 13 polyphenolic compounds from different fractions were detected and quantified (Tab. 3).

3 RESULTS AND DISCUSSION

The results for the determination of the polyphenolic compounds in all three fractions are given in Tab. 4 and 5. All samples clearly show differences in the contents of individual polyphenols in the fractions analysed. The free fraction contains mainly flavan-3-ols (catechins) and proanthocyanidins (prodelfinidin B3 and procyanidin B3). The content of phenolic acids in this fraction is very low. Even the content of the dominant ferulic acid in the home-grown varieties was only 0.2 to 0.3 mg/100 g. The content of the acids analysed in samples of barley grown in China is slightly higher. The esterified fraction contains almost solely phenolic acids with exception of catechin. As assumed, catechin forms ester bonds through its hydroxyl groups to make compounds with structures such as gallo catechins, catechin gallates or catechin ferulates which were found in barley and in other plants (Whittle et al., 1999; Sanz et al., 2010; Yesil-Celiktas et al., 2009). The bound fractions contained mainly glycosides of the individual polyphenols. Predominant were the phenolic acids such as ferulic, sinapic and p-coumaric acids.

The amount of flavonoids analysed in the samples made up about 20–30% rel. of the total polyphenols content. The previous studies of Goupy et al. (1999) mention a significantly higher amount of these

Tab. 4 Obsah polyfenolů ve vzorcích odrůd ječmene z pěstební oblasti Kroměříž, ročník 2011 (mg/100g) /
The contents of polyphenols in the samples of the barley varieties grown in the Kromeriz region in 2011 (mg/100g)

Ječmen 2011 Kroměříž / Barley Kromeriz 2011								
Frakce / Fraction	Polyfenol / Polyphenols	Aksamit	Blaník	Bojos	Jersey	Kangoo	Malz	Sebastian
Volná / Free	p-hyd	n.d.	0.05	0.05	0.05	0.05	n.d.	0.05
	va	0.05	0.07	0.06	0.05	0.05	0.04	0.06
	prod B3	2.70	2.77	2.02	1.70	2.22	2.25	2.28
	prok B3	9.44	6.97	9.01	6.51	7.07	7.06	6.08
	kat	4.50	1.44	2.28	1.98	1.75	2.04	1.16
	van	0.07	0.14	0.10	0.09	0.10	0.07	0.12
	fer	0.16	0.28	0.23	0.25	0.20	0.21	0.24
	p-kum	0.07	0.10	0.11	0.10	0.11	0.14	0.09
Esterifikovaná / Esterified	prot	0.05	0.06	0.05	0.04	0.04	0.04	0.06
	p-hyd	0.11	0.15	0.13	0.13	0.13	0.15	0.14
	va	0.23	0.20	0.20	0.17	0.20	0.11	0.17
	kat	0.58	0.40	0.38	0.45	0.44	0.53	0.48
	t-sko	n.d.	0.02	n.d.	0.02	0.02	n.d.	0.02
	kav	n.d.	n.d.	0.10	n.d.	0.12	0.13	n.d.
	fer	0.61	0.93	0.76	1.23	1.15	1.09	1.29
	sin	0.33	0.46	0.60	0.60	0.63	0.80	0.54
Vázaná / Bound	p-kum	0.09	0.13	0.10	0.27	0.15	0.13	0.14
	prot	0.09	0.05	0.05	0.06	0.05	0.06	0.06
	p-hyd	0.12	0.10	0.10	0.12	0.12	0.13	0.11
	va	0.29	0.27	0.21	0.22	0.26	0.19	0.24
	kat	0.62	0.26	0.54	0.52	0.47	0.43	0.27
	van	0.27	0.23	0.28	0.30	0.35	0.29	0.23
	kav	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	fer	23.56	27.26	20.89	25.69	28.72	23.00	30.94
Σ polyfenolů / Σ polyphenols	sin	3.41	3.25	3.98	3.89	4.33	3.95	3.67
	p-kum	6.35	4.10	3.25	6.14	4.34	5.81	4.54
		53.7	49.8	45.5	50.6	53.2	48.6	53.1

n.d. – nebyl detekován / n.d. – not detected

lů. Dominantními zástupci jsou fenolové kyseliny ferulová, sinapová a p-kumarová.

Podíl sledovaných flavonoidů ve vzorcích představuje přibližně 20 až 30 rel. % z celkového množství polyfenolů, v dřívějších pracích (Goupy et al., 1999) se uvádí výrazně vyšší podíl těchto sloučenin (60–70 rel. %), nicméně většina těchto studií vychází z izolačních technik, vhodných primárně pro izolaci polyfenolů volné frakce, což získané výsledky značně ovlivňuje. Obsah ferulové kyseliny je oproti dříve publikovaným údajům (Ehrenbergerová et al., 2012; Běláková et al., 2010) nižší, je ovšem třeba zdůraznit, že zmiňované práce se lišily v použité metodice přípravy vzorku. Podíl dominantních kyselin vázané frakce naproti tomu poměrně přesně odpovídá dříve publikovaným výsledkům (Dvořáková, 2008b).

V rámci souboru vzorků českých odrůd byly nalezeny jen malé rozdíly v zastoupení jednotlivých polyfenolů. Odrůdy Bojos a Aksamit se odlišovaly výrazně vyšším obsahem prokyanidinu B3 (9,01 respektive 9,44 mg/100g), což představuje oproti ostatním zkoumaným odrůdám hodnoty vyšší přibližně o polovinu. Obě odrůdy obsahovaly ve volné frakci také vyšší koncentrace katechinu, v případě odrůdy Aksamit více než dvojnásobně ve srovnání s průměrem. Naproti tomu obsahovaly vzorky těchto odrůd nízké množství ferulové kyseliny v esterifikované (Bojos – 0,76 mg/100g; Aksamit – 0,61 mg/100g; průměr – 1,00 mg/100g) i vázané frakci (Bojos – 23,56 mg/100g; Aksamit – 20,89 mg/100g; průměr 25,81 mg/100g). Určité rozdíly byly zjištěny i v obsazích p-kumarové kyseliny. Zatímco ječmeny odrůd Blaník, Bojos, Kangoo a Sebastian obsahovaly tohoto polyfenolu maximálně 4,5 mg/100g, v ostatních třech odrůdách (Aksamit, Jersey a Malz) byly zjištěny obsahy okolo 6 mg/100g nebo vyšší.

Při srovnání vzorků českých odrůd s čínskými je na první pohled patrný rozdíl už v celkovém obsahu sledovaných polyfenolů. Průměrný

obsah polyfenolů činí 50,6 mg/100g u českých odrůd a 75,1 mg/100g u čínských odrůd. Dominantními zástupci jsou fenolové kyseliny ferulová, sinapová a p-kumarová. Podíl sledovaných flavonoidů ve vzorcích představuje přibližně 20 až 30 rel. % z celkového množství polyfenolů, v dřívějších pracích (Goupy et al., 1999) se uvádí výrazně vyšší podíl těchto sloučenin (60–70 rel. %), nicméně většina těchto studií vychází z izolačních technik, vhodných primárně pro izolaci polyfenolů volné frakce, což získané výsledky značně ovlivňuje. Obsah ferulové kyseliny je oproti dříve publikovaným údajům (Ehrenbergerová et al., 2012; Běláková et al., 2010) nižší, je ovšem třeba zdůraznit, že zmiňované práce se lišily v použité metodice přípravy vzorku. Podíl dominantních kyselin vázané frakce naproti tomu poměrně přesně odpovídá dříve publikovaným výsledkům (Dvořáková, 2008b).

The amount of single polyphenols in the samples of the Czech barley varieties varied only slightly. The Bojos and Aksamit varieties contained significantly larger amounts of procyanidin B3, 9.01 and 9.44 mg/100 g respectively. It was about 50% more than in other varieties analysed. The free fraction from both varieties also contained a higher concentration of catechin: the Aksamit variety even had twice the amount of catechin in comparison to the average amount of the all varieties. Then again, these varieties contained a low amount of ferulic acid in both, the esterified and the bound fractions: namely 0.76 mg/100 g for Bojos and 0.61 mg/100 g for Aksamit when compared to an average of 1.00 mg/100 g for the esterified fraction and 23.56 mg/100 g for Bojos and 20.89 mg/100 g for Aksamit when compared to an average of 25.81 mg/100 g for the bound fraction. Some differences were also found in the contents of p-coumaric acid. The Blaník, Bojos, Kangoo and Sebastian barley varieties contained a maximum of 4.5 mg/100 g. The other varieties, Aksamit, Jersey and Malz contained about 6 mg/100 g of p-coumaric acid or more.

When comparing the samples of the Czech and Chinese varieties, the main difference is the total amount of polyphenols studied. The average content in the Chinese varieties was 75.1 mg/100 g and in the Czech varieties 50.6 mg/100 g. The most significant differences were in the contents of the proanthocyanidins and the flavan-3-ols (catechin). In

Tab. 5. Obsahy polyfenolů ve vzorcích čínského ječmene, ročník 2011 (mg/100g) / The contents of polyphenols in the samples of the barley varieties grown in China and harvested in 2011 (mg/100g)

Frakce / Fraction	Polyfenol / Polyphenols	2011			
		Hua 2759	Chuannong Da 73	Kong Yiu 13-01	Ken 7
Volná / Free	p-hyd	0.11	0.11	0.11	0.08
	va	0.11	0.10	0.16	0.09
	prod B3	4.12	3.21	2.92	2.50
	prok B3	14.60	11.20	10.20	12.40
	kat	5.25	6.38	3.88	5.38
	van	0.24	0.17	0.26	0.18
	t-sko	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	kav	n.d.	n.d.	0.11	n.d.
	fer	0.33	0.21	0.28	0.42
	p-kum	0.20	0.14	0.22	0.19
Esterifikovaná / Esterified	prot	0.13	0.09	0.07	0.08
	p-hyd	0.26	0.21	0.30	0.21
	va	0.52	0.57	0.77	0.46
	prok B3	1.65	0.68	1.32	1.36
	kat	0.78	0.31	0.35	0.30
	t-sko	n.d.	n.d.	0.02	0.03
	kav	0.16	0.29	0.24	0.13
	fer	1.21	1.47	1.58	1.31
	sin	0.70	0.65	0.76	0.59
	p-kum	0.59	0.59	0.63	0.19
Vázaná / Bound	prot	0.06	0.05	n.d.	0.06
	p-hyd	0.20	0.16	0.09	0.09
	va	0.33	0.22	0.29	0.23
	kat	1.67	1.05	0.85	0.76
	van	0.39	0.39	0.34	0.25
	kav	0.12	0.11	n.d.	n.d.
	fer	37.90	35.60	33.90	25.70
	sin	2.97	3.69	3.43	3.32
	p-kum	15.9	9.61	6.03	7.51
Σ polyfenolů / Σ polyphenols		90.5	77.2	69.1	63.8

n.d. – nebyl detekován / n.d. – not detected

obsah v čínských odrůdách byl 75,1 mg/100g, v českých 50,6 mg/100g. Nejvýznamnější rozdíly jsou v obsazích proanthokyanogenů a flavan-3-olů (katechin). Množství prokyanidinu B3 bylo ve vzorcích čínských odrůd oproti českým v průměru téměř dvojnásobné, výskyt této látky byl v poměrně velkém množství (0,68 až 1,65 mg/100g) prokázán dokonce v esterifikované frakci, ve které se u českých odrůd nevyskytoval vůbec. Také katechinu ve volné frakci bylo nalezeno v čínských odrůdách více než dvojnásobné množství. Jediným jednoznačným rozdílem, týkajícím se zastoupení sledovaných polyfenolů v esterifikované frakci, byl více než dvakrát vyšší obsah p-hydroxybenzoové kyseliny. Ve vázané frakci se soubory vzorků lišily nejvíce v obsahu p-kumarové kyseliny, který u tří ze čtyř vzorků přesahoval hranici 7,5 mg/100g, u odrůdy Hua dosahoval dokonce téměř 16 mg/100g, což odpovídá trojnásobku průměru u českých odrůd. Také obsah ferulové kyseliny byl v čínských vzorcích přibližně o třetinu vyšší.

Celkové hodnocení významu zjištěných rozdílů na technologické parametry sledovaných odrůd je značně obtížné. Ke vzorkům českého ječmene nebyl získán odpovídající vzorek sladu ani žádné výsledky základních stanovení, není tedy možné posoudit, zda se jednalo o ječmen sladovnícké kvality. V důsledku výrazně vyššího obsahu anthokyanogenů a zřejmě i dalších látek flavonoidního charakteru, které jsou spoluodpovědné za problémy související s koloidní stabilitou piva, je možno předpokládat, že stabilita a trvanlivost piva vyrobeného ze sladů odrůd s podobným profilem polyfenolových sloučenin bude nižší. Bohužel taková piva nebyla k dispozici, takže nebylo možno tento předpoklad ověřit. Vyšší množství polyfenolových látek v ječmeni by naopak mohla přinášet výhody ve vztahu k senzorické kvalitě piva, pokud by bylo dosaženo většího množství polyfenolů i ve sladu.

the Chinese varieties almost double the amount of procyanidin B3 was found. Unlike the esterified fractions of the Czech barley samples which did not contain any procyanidin B3 the esterified fractions of the Chinese varieties contained quite a large amount of this compound, namely from 0.68 to 1.65 mg/100 g. The amount of catechin in the free fraction of the Chinese barley samples was also more than double. A further significant difference between the esterified fractions from the Czech and from the Chinese barley was the content of p-hydroxybenzoic acid; more than double in the Chinese samples. The bound fractions from the Chinese samples differ mainly in the content of p-coumaric acid. Three out of four samples contained more than 7.5 mg/100 g and the variety Hua even contained 15.9 mg/100 g of this compound. This is three times the average of the Czech varieties. The contents of ferulic acid in the Chinese samples were also approximately one third higher.

A general evaluation of differences between the Czech and the Chinese barley varieties and their impact on the technological parameters is very difficult. The Chinese samples did not include any corresponding samples of malt nor any results from basic analysis. Therefore, it was impossible to evaluate whether the Chinese barley varieties were suitable for beer production. Due to the significantly higher content of anthocyanogens and probably also other flavonoids responsible for lower colloidal stability of the beer it could be assumed that the stability and the shelf life of the beer made with the use of these varieties will be lower. Nevertheless, this assumption could not be verified since no beers produced from the investigated barley varieties were available. On the contrary, the higher total amount of polyphenolic substances in barley could be favourable for the sensory quality stability of the beer, as long as higher content of polyphenols should be reached in malt.

4 ZÁVĚR

Byly prováděny srovnávací analýzy vybraných odrůd ječmenů pěstovaných v České republice a v Čínské lidové republice. Tyto testy byly zaměřeny na nalezení případných rozdílů v množství a zastoupení vybraných polyfenolů a jejich skupin ve třech frakcích – volné, vázané a esterifikované.

Vzorky čínského ječmene se vyznačovaly vyšším průměrným celkovým obsahem sledovaných polyfenolů (75,1 mg/100g oproti 50,6 mg/100g u českých odrůd). Tento rozdíl byl způsoben zejména výrazně vyšším obsahem prokyanidinu B3 a katechinu ve volné frakci, p-hydroxybenzoové kyseliny v esterifikované frakci, a zejména ferulové a p-kumarové kyseliny ve frakci vázané. V rámci souboru českých odrůd, které byly pěstovány ve stejné oblasti, byly rozdíly poměrně malé, významně se odlišovaly pouze odrůdy Bojos a Aksamit, opět zejména v důsledku odlišností v zastoupení prokyanidinu B3 ve volné frakci.

Tento screening poměrně širokého spektra polyfenolových látek, které se v obilce vyskytují v různých formách, je třeba vnímat jako úvodní práci, která by v budoucnu mohla přinést řadu cenných informací týkajících se vztahů mezi odrůdou, podmínkami pěstování a obsahem polyfenolových sloučenin a tím přispět ke zlepšení organoleptických vlastností piva.

PODĚKOVÁNÍ

Autoři děkují MŠMT ČR, projekt KONTAKT ME10110, za finanční podporu.

4 CONCLUSIONS

The comparative analyses of specific barley varieties cultivated in the Czech Republic and the People's Republic of China were carried out. The aim of this study was to find possible differences in the quantity and the relative contents of selected polyphenols and their groups in three fractions, namely in free, bound and esterified fractions.

The average total average content of the studied polyphenols in the samples of Chinese barley was higher, (75.1 mg/100 g compared to 50.6 mg/100 g for the Czech barley). This difference was due to a significantly higher content of procyanidin B3 in the free fractions, of p-hydroxybenzoic acid in the esterified fractions and primarily of ferulic and p-coumaric acids in the bound fractions. The differences between the samples of Czech barley cultivated in the same region were relatively small. Significant differences especially in the amount of procyanidin B3 were only found in the free fractions from the Bojos and Aksamit varieties.

This screening of rather a wide range of polyphenolic compounds found in different forms in caryopsis is the introductory study which should bring an amount of valuable information about the relationship between the variety, the cultivation conditions and the content of polyphenols. This knowledge should contribute to an improvement in the organoleptic properties of beer.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (KONTAKT ME10110)

Translated by Eva Paterson

LITERATURA / REFERENCES

- Aron, P. M., Shellhammer, T. H., 2010: A discussion of polyphenols in beer physical and flavour stability. *J. Inst. Brew.*, 116(4): 369–380.
- Běláková, S., Benešová, K., Mikulíková, R., Svoboda, Z., 2010: Monitoring of changes of ferulic acid content in brewing materials using the UPLC with PDA detector. *Kvasny Prum.*, 56(6): 266–269.
- Dvořáková, M., Moreira, M. M., Dostálek, P., Skulílová, Z., Guido, L. F., Barros, A. A., 2008a: Characterization of monomeric and oligomeric flavan-3-ols from barley and malt by liquid chromatography-ultraviolet detection-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr., A*, 1189(1–2): 398–405.
- Dvořáková, M., Douanier, M., Jurková, M., Kellner, V., Dostálek, P., 2008b: Comparison of antioxidant activity of barley (*Hordeum vulgare* L.) and malt extracts with the content of free phenolic compounds measured by high performance liquid chromatography coupled with coulArray detector. *J. Inst. Brew.*, 114(2): 150–159.
- Ehrenbergerová, J., Prokopcová, Z., Běláková, S., Cerkal, R., Pluháčková, H., Vaculová, K., Smutná, P., 2012: Variability in Free and Total Ferulic Acid Content in Spring Barley Caryopses. *Kvasny Prum.*, 58(7–8): 201–208.
- Ferreres, F., Krskova, Z., Goncalves, R. F., Valentao, P., Pereira, J. A., Dusek, J., Martin, J., Andrade, P. B., 2009: Free water-soluble phenolics profiling in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 57(6): 2405–2409.
- Gerhäuser, C., 2005: Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *Eur. J. Cancer*, 41: 1941–1954.
- Goupy, P., Hugues, M., Boivin, P., Amiot, J. M., 1999: Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *J. Sci. Food Agric.*, 79(12): 1625–1634.
- Krygier K., Sosulski F., Hogge L., 1982: Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. *J. Agric. Food Chem.*, 30(2): 330–334.
- Leiper, A. K., Stewart, G. G., McKeown, P. I., Nock, T., Thompson J. M., 2005: Optimising beer stabilisation by the selective removal of tannoids and sensitive proteins. *J. Inst. Brew.*, 111(2): 118–127.
- McMurrough, I., Madigan, D., Kelly, J. R., Smyth, R. M., 1996a: The role of flavanoid polyphenols in beer stability. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 54(3): 141–148.
- McMurrough, I., Madigan, D., Smyth, R. M., 1996b: Semipreparative chromatographic procedure for the isolation of dimeric and trimeric proanthocyanidins from barley. *J. Agric. Food Chem.*, 44(7): 1731–1735.
- Mikyška, A., Prokeš, J., Běláková, S., Škach, J., Hašková, D., 2010: The influence of barley origin and malting technology on ferulic acid content in barley and malt. *Kvasny Prum.*, 56(3): 145–151.
- Mikyška, A., Krofta, K., Hašková, D., Čulík, J., Čejka, P., 2011: The influence of hopping on formation of carbonyl compounds during storage of beer. *J. Inst. Brew.*, 117(1): 47–54.
- Parker, K. D., 2007: The study of haze formation in freshly packaged and stored beers. *Tech. Q. Master. Brew. Assoc. Am.*, 44(1): 23–28.
- Pietta, G. P., 2000: Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 63(7): 1035–1042.
- Ramos, S., 2007: Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J. Nutr. Biochem.*, 18(7): 427–442.
- Rehmanji, M., Gopal, Ch., Mola, A., 2005: Beer stabilization technology – clearly a matter of choice. *Tech. Q. Master. Brew. Assoc. Am.*, 42(4): 332–338.
- Rice-Evans, A. C., Miller, J. N., Paganja, G., 1996: Structure – antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med.*, 20(7): 933–956.
- Sanz, M., Fernandez de Simon, B., Esteruelas, E., Munoz, A. M., Cadahia, E., Hernandez, M. T., Estrella, I., Martinez, J., 2012: Polyphenols in red wine aged in acacia (*Robinia pseudoacacia*) and oak (*Quercus petraea*) wood barrels. *Anal. Chim. Acta*, 732: 83–90.
- Steiner, E., Gastl, M., Becker, T., 2011: Protein changes during malting and brewing with focus on haze and foam formation: a review. *Eur. Food Res. Technol.*, 232(2): 191–204.
- Stevens, J. F., Page, J. E., 2004: Xanthohumol and related prenyl-flavonoids from hops and beer: to your good health!, *Phytochem.*, 65(10): 1317–1330.
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H., Derdelinckx, G., 2006: The chemistry of beer aging – a critical review. *Food Chem.*, 95(3): 357–381.
- Verardo, V., Bonoli, M., Marconi, E., Caboni, M. F., 2008: Distribution of bound hydroxycinnamic acids and their glycosyl esters in barley (*Hordeum vulgare* L.) air-classified flour: Comparative study between reversed phase-high performance chromatography-mass spectrometry (RP-HPLC/MS) and spectrophotometric analysis. *J. Agric. Food. Chem.*, 56(24): 11900–11905.
- Yesil-Celiktas, O., Ganzera, M., Akgun, I., Sevimli, C., Korkmaz, K. S., Bedir, E., 2009: Determination of polyphenolic constituents and biological activities of bark extracts from different Pinus species. *J. Sci. Food Agric.*, 89(8): 1339–1345.