



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ZMĚNY AKTIVIT ENZYMŮ V OVOCI V PRŮBĚHU DLOUHODOBÉHO UCHOVÁVÁNÍ

CHANGES OF ENZYME ACTIVITIES IN FRUITS DURING LONG-TERM STORAGE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. JITKA FERDOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0352/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Jitka Ferdová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Změny aktivit enzymů v ovoci v průběhu dlouhodobého uchovávání

Zadání diplomové práce:

1. Rešerše - přehled možností uchovávání a skladování ovoce, přehled nutričně významných složek ovoce s důrazem na antioxidanty.
2. Optimalizace metod zpracování vzorků, extrakce a stanovení aktivních látek v ovoci - zejména enzymových a nízkomolekulárních antioxidantů.
3. Analýza změn sledovaných parametrů v různých druzích ovoce v průběhu uchovávání.
4. Vliv podmínek uchovávání na nutriční hodnotu ovoce.

Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2010

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Jitka Ferdová
Student(ka)

doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V této diplomové práci byly studovány změny aktivit antioxidantních enzymů a změny obsahu nízkomolekulárních antioxidantů v různých druzích ovoce při dlouhodobém skladování.

V teoretické části jsou popsány jednotlivé nízkomolekulární antioxidanty a antioxidantní enzymy. Také jsou zde shrnuty příčiny kažení ovoce a používané způsoby konzervace.

Jako vzorky byly použity zejména běžné lokální druhy ovoce - jablka červená a zelená, broskve, švestky a hrozny. Ovoce bylo skladováno dlouhodobě (několik měsíců) jednak v nezpracovaném stavu v laboratoři, ve sklepě, v lednici a v mrazícím boxu. U uchovávání mražením byly testovány různé způsoby přípravy a zpracování ovoce na aktivity enzymů a obsah nízkomolekulárních látek. Zkrácená analýza byla provedena rovněž v borůvkách, brusinkách, malinách a jahodách. U skladovaného ovoce byly sledovány skupinové parametry - celková antioxidantní aktivita, obsah sušiny, vitamínu C, celkových flavonoidů a polyfenolů spektrofotometricky. Stanovení individuálních flavonoidů a katechinů bylo provedeno pomocí RP/HPLC/UV-VIS a on-line LC/PDA/ESI-MS. Aktivity antioxidantních enzymů – superoxiddismutasy (SOD), katalasy, polyfenoloxidas (PPO) a lipoxygenasy (LOX) byly stanoveny spektrofotometricky. Z důvodu napadení některých vzorků plísněmi byla provedena povrchová mikroskopie a kultivace vzdušné i povrchové mikroflóry.

Vliv podmínek uchovávání na zachování biologických vlastností je podmíněn druhem ovoce. Obecně nejšetrnějším způsobem dlouhodobého uchovávání je mražení, avšak u velkých plodů dochází často k senzorickým změnám. Dlouhodobé uchovávání v regulovaném teplotním režimu nebo v regulované atmosféře je vhodné pro plody s delší udržitelností, v těchto plodech se udrží déle stabilní hladiny antioxidantních enzymů. Některé z těchto enzymů působí synergisticky. Zatímco na začátku uchovávání lze např. v plodech jablek nalézt vysoké hladiny SOD a LOX, u přezrálých nebo poškozených plodů jsou naopak vyšší hladiny katalázy a PPO. Hladiny nízkomolekulárních antioxidantů v plodech v průběhu uchovávání kolísají, ale obecně vykazují vzrůstající tendenci s rostoucí délkou uchovávání.

ABSTRACT

This study is focused on study of changes of enzyme and low-molecular weight antioxidants in different fruits during long-term storage.

In theoretical part individual low-molecular weight antioxidants and enzymes are described. The main causes of fruit decay and some possibilities of fruit preservation and storage are summarized.

As biological material some common fruits were chosen - green and red apples, peaches, plums and white grapes. The fruits were stored in laboratory, cellar, in refrigerator and in freezer. In freezing experiments some ways of fruit preparation and processing were tested and their influence on fruit antioxidant status was compared. Shortened storage experiment was applied on blueberries, cranberries, raspberries and strawberries too. In fruits some group parameters – total antioxidant status, dry mass content, ascorbate level, total flavonoids and total phenolics were analyzed spectrophotometrically. Individual flavonoids and phenolics were determined by RP-HPLC/UV-VIS and on-line LC/PDA/ESI-MS. Antioxidant enzyme activities (superoxide dismutase SOD, catalase CAT, polyphenol oxidase PPO and lipoxygenase LOX) were measured by spectrophotometry. The surface microscopy and cultivation of moulds from fruit surface were performed too.

Influence of storage conditions on biological activities is dependent on fruit sort. Freezing is the most suitable procedure for long-term storage without significant changes of active substance content. Long-term storage in controlled temperature conditions and/or atmosphere is usable for fruits with longer storage period. In these fruits stable levels of antioxidant enzymes are stored for relatively long time. Some of enzymes act synergistically. Enzyme activities differed according to storage phase; at the beginning mainly high SOD and LOX activities were observed. CAT and PPO are probably activated as defence systems in ripened and/or damaged fruits. Levels of total as well as individual low molecular weight antioxidants varied during storage in all sorts, generally, increased course with longer storage period can be observed.

KLÍČOVÁ SLOVA

ovoce, skladování, mražení, antioxidanty, celková antioxidační aktivita, antioxidační enzymy, SOD, katalasa, PPO, LOX.

KEYWORDS

Fruit, freezing, long-term storage, antioxidants, total antioxidant status, antioxidant enzymes, SOD, catalase, PPO, LOX.

FERDOVÁ, J. *Změny aktivit enzymů v ovoci v průběhu dlouhodobého uchovávání*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 142 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis diplomanta

Chtěla bych především poděkovat Doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za vedení a pomoc při vzniku této práce, dále Ing. Kateřině Duroňové a Ing. Kateřině Pařilové za pomoc při získání experimentálních dat a při zpracování výsledků. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodičům za podporu při celém studiu.

OBSAH

1	Úvod.....	10
2	Teoretická část.....	11
	2.1 Nepříznivé vlivy radikálů na lidský organismus	11
	2.1.1 Poškození buněk a biomolekul volnými radikály	11
	2.1.2 Obrana organismu proti radikálům.....	11
	2.1.2.1 Primární antioxidační systém.....	12
	2.1.2.2 Sekundární antioxidační systém.....	12
	2.1.2.3 Terciární antioxidační systém	12
	2.2 Vybrané nízkomolekulární antioxidy.....	12
	2.2.1 Kyselina askorbová	12
	2.2.2 Tokoferoly.....	13
	2.2.3 Karotenoidy.....	13
	2.2.4 Polyfenoly	13
	2.2.5 Glukosinoláty	13
	2.2.6 Porfyriny	14
	2.3 Enzymy	14
	2.3.1 Enzymová specifita	14
	2.3.2 Rozdělení enzymů	14
	2.3.3 Některé významné antioxidační enzymy	15
	2.3.3.1 Superoxiddismutasa (SOD).....	15
	2.3.3.2 Peroxidasa	15
	2.3.3.3 Katalasa (CAT).....	16
	2.3.3.4 Polyfenoloxidas (PPO).....	16
	2.3.3.5 Lipoxygenasa (LOX)	16
	2.4 Metody stanovení aktivních látek v ovoci	17
	2.4.1 Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	17
	2.5 Příčiny nežádoucích změn a znehodnocování potravin	18
	2.5.1 Změny mikrobiální	18
	2.5.2 Změny enzymatické.....	19
	2.6 Způsoby konzervování potravin	19
	2.6.1 Metody fyzikální	19
	2.6.2 Metody chemické	19
	2.6.3 Metody biologické.....	19
	2.7 Přehled výsledků některých studií zaměřených na dlouhodobé uchování ovoce.....	20
	2.7.1 Vliv mražení na obsah polyfenolů v impregnovaných vakuově ošetřených plodech jablek	20
	2.7.2 Obsah fenolů a antioxidační kapacita versus přijetí máčených a vakuově impregnovaných mražených nektarinek konzumenty.....	21
	2.7.3 Vliv osmotické dehydratace a mražení na profil těkavých látek v nakrájených plodech kiwi	21
	2.7.4 Změny antioxidační aktivity a celkových polyfenolů během skladování ve vybraných druzích ovoce.....	22
	2.7.5 Vliv podmínek mražení na kvalitu plodů palmy Areca.....	23
3	Experimentální část.....	25

3.1	Použité chemikálie a přístroje	25
3.2	Zpracování vzorku na jednotlivá stanovení	27
3.3	Skladování vzorků	28
3.4	Stanovení sušiny	29
3.5	Stanovení celkové antioxidační aktivity	29
3.6	Stanovení nízkomolekulárních antioxidantů	30
3.6.1	Obsah vitamínu C	30
3.6.2	Celkové polyfenoly	30
3.6.3	Celkové flavonoidy	31
3.7	Stanovení flavonoidů a katechinů pomocí HPLC	31
3.7.1	Výběr kolony a zpracování vzorku.....	31
3.7.2	Ověření analýzy fenolických látek na LC/PDA/ESI-MS	32
3.7.3	Stanovení flavonoidů metodou HPLC/UV-VIS.....	32
3.7.4	Stanovení katechinů metodou HPLC/UV-VIS	33
3.8	Stanovení antioxidačních enzymů	34
3.8.1	Stanovení SOD	34
3.8.2	Stanovení katalasy	35
3.8.3	Stanovení PPO.....	35
3.8.4	Stanovení LOX.....	36
3.9	Kultivace mikroorganismů	36
3.9.1	Kultivace plísní z ovoce.....	36
3.9.2	Kultivace vzdušné mikroflóry	37
3.9.3	Zjištění povrchové mikroflóry	37
3.9.4	Mikroskopie plísní.....	37
4	Výsledky	38
4.1	Zpracování biologického materiálu (vzorků pro 2. studii)	39
4.2	Stanovení sušiny v plodech.....	41
4.2.1	Výsledky studie 1 - Vliv různých skladovacích teplot na hodnotu sušiny ...	41
4.2.2	Výsledky studie 2 - Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na obsah sušiny.....	42
4.3	Stanovení celkové antioxidační aktivity	44
4.3.1	Výsledky studie 1 - Vliv různých skladovacích teplot na hodnotu TAS.....	44
4.3.2	Výsledky studie 2 - Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na hodnoty TAS	45
4.4	Obsah vitamínu C	48
4.4.1	Výsledky studie 1 - Vliv různých skladovacích teplot na obsah vitamínu C	49
4.4.2	Výsledky studie 2 - Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na obsah vitamínu C	50
4.5	Celkové polyfenoly.....	53
4.5.1	Výsledky studie 1 - Vliv různých skladovacích teplot na hodnotu celkových polyfenolů.....	53
4.5.2	Výsledky studie 2 - Vliv různé formy zpracování plodů s následujícím zamražením na obsah celkových polyfenolů	55
4.6	Celkové flavonoidy.....	57

4.6.1	Výsledky studie 1 - Vliv různých skladovacích teplot na hodnotu celkových flavonoidů.....	57
4.6.2	Výsledky studie 2 - Vliv různého způsobu zpracování plodů s následným zamražením na obsah celkových flavonoidů.....	59
4.7	Srovnání obsahu nízkomolekulárních látek v jednotlivých druzích ovoce před skladování či zpracováním.....	61
4.8	Stanovení flavonoidů a katechinů pomocí HPLC	63
4.8.1	Výběr kolony.....	63
4.8.2	Testování podmínek hydrolyzy pro měření katechinů v ovoci.....	64
4.8.3	Ověření analýzy katechinů a flavonoidů metodou LC/PDA/ESI-MS.....	65
4.8.4	HPLC stanovení flavonoidů a katechinů v rámci dvou experimentálních sérií	66
4.8.4.1	Katechin	67
4.8.4.2	Epikatechin.....	68
4.8.4.3	Katechin-galát	69
4.8.4.4	Epikatechin-galát	70
4.8.4.5	Rutin.....	72
4.8.4.6	Morin	73
4.8.4.7	Quercetin.....	74
4.8.4.8	Kaempferol.....	76
4.8.4.9	Prokyanidin	77
4.8.4.10	Kyselina chlorogenová.....	79
4.8.4.11	Floridzin	80
4.8.5	Srovnání obsahu flavonoidů a katechinů	81
4.9	Sledování enzymových antioxidantů – superoxidodismutasa (SOD)	83
4.9.1	Výsledky studie 1 -Vliv různých skladovacích teplot na obsah SOD.....	83
4.9.2	Výsledky studie 2 - Vliv různého způsobu zpracování plodů s následným zamražením na aktivitu SOD.....	85
4.10	Katalasa.....	91
4.10.1	Výsledky studie 1 - Vliv různých teplot skladování na aktivitu katalasy.....	91
4.10.2	Výsledky studie 2 - Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na aktivity katalasy	94
4.11	Polyfenoloxidasa	98
4.11.1	Výsledky studie 1 - Vliv různých teplot skladování na aktivitu PPO	98
4.11.2	Výsledky studie 2 - Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na aktivitu PPO.....	100
4.12	Lipoxygenasa.....	105
4.12.1	Výsledky série 1 - Vliv různých teplot skladování na aktivitu LOX	105
4.12.2	Výsledky série 2 - Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na aktivitu LOX.....	107
4.13	Vzájemné porovnání stanovených enzymů v jednotlivých odrůdách	111
4.14	Kultivace mikroorganismů.....	113
4.14.1	Kultivace plísní z ovoce.....	113
4.14.2	Kultivace vzdušné mikroflóry.....	113
4.14.3	Kultivace povrchové mikroflóry	113
5	Diskuze.....	115

6	Závěry	119
7	Použité zdroje	121
8	Seznam použitých zkratek.....	124
9	Přílohy	125

1 ÚVOD

Čerstvé ovoce obsahuje zdraví prospěšné a nutričně významné látky, jako jsou minerály, vitamin A, C a E, vlákninu, foláty, karotenoidy a další fytochemické látky (glukosinoláty, flavonoidy, fenolové kyseliny, lykopen,...). Důležitými složkami jsou právě antioxidanty, které brání lidský organismus proti účinkům volných radikálů a potažmo proti oxidačnímu stresu [1].

Pro dlouhodobější uchovu a pro zajištění přísunu po celý rok je nutné ovoce vhodně skladovat a konzervovat. Nejdůležitější je zabránit v činnosti mikroorganismům, které by rozkládaly a znehodnocovaly potravinu, a zabránit v činnosti enzymům [2]. Zpracování ovoce, jako je loupání, vaření, lisování, sušení či mražení, může mít za následek snížení či naopak zvýšení obsahu antioxidantních látek. Jelikož se tyto procesy užívají v konzervářské praxi, zkoumá se vliv jednotlivých údržných praktik na obsah nutričně významných a zdraví prospěšných látek.

Jedny z nejstarších způsobů konzervace jsou změna teploty a odnámání vody z matrice potraviny. V domácnostech jsou nejčastější údržné techniky: zavařování, skladování ovoce při snížené teplotě (ve sklepě, v chladničce), mražení nebo sušení ovoce.

Vlivem mražení ztrácí ovoce přirozený vzhled, barvu, vůni, konzistenci. Na potlačení těchto změn se může užít impregnace povrchu plodů před vlastním zmražením. Příkladem může být potlačení činnosti polyfenoloxidas, která v ovoci způsobuje nežádoucí hnědé zabarvení, přidávkem kyseliny askorbové do ošetřující roztoku.

Na vzhled a stav ovoce má také vliv rychlost zmrazení a rozmrazání. Během procesu mražení dochází k tvorbě krystalků ledu. Pokud je tento proces veden rychle, tvoří se ve větším počtu malé krystalky. Naopak pomalé mrznutí způsobuje tvorbu velkých krystalů s menším počtem. Ty pak způsobují svou velikostí větší porušení pletiv a tím větší úniky vody z matrice.

Tato práce se zabývá některými z možností skladování ovoce. Zkoumá změny obsahu některých antioxidantů a antioxidantních enzymů. Klade si za cíl přehledně shrnout formy zpracování ovoce a diskutovat jejich jednotlivé výhody a nevýhody vztahované na obsah a aktivitu antioxidantních látek.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Nepříznivé vlivy radikálů na lidský organismus

Denně na lidský organismus působí spousta nepříznivých vlivů, ať už díky životnímu stylu (kouření, pití alkoholu,...) nebo vlivem běžných činností potřebných k přežití (dýchání, stravování,..).

Pro všechny aerobní organismy je kyslík esenciálním prvkem. Při oxidačních reakcích se uvolňují nežádoucí volné kyslíkové radikály, které se s největší pravděpodobností podílí na vzniku řady degenerativních onemocnění a na biologickém stárnutí. Proto se organismus chrání víceúrovňovým antioxidačním systémem. Mnoho tzv. antioxidantů si člověk dokáže vyrobit, některé musí přijímat jako složky potravy [3].

Jako volné radikály se označují molekuly, atomy nebo jejich fragmenty, které mají jeden nebo více nepárových elektronů a jsou schopny samostatné existence [4]. Příkladem jsou: superoxidový radikál ($\cdot\text{O}_2^-$), hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$), alkoxylový radikál ($\cdot\text{OR}$), peroxylový radikál ($\cdot\text{OOR}$), oxid dusnatý ($\cdot\text{NO}$), atd. Jelikož mají lichý počet elektronů, jsou vysoce reaktivní a mohou iniciovat řadu řetězových reakcí v organismu. Navíc mají schopnost poškozovat důležité buňky (např. DNA) a buněčné membrány [5].

2.1.1 Poškození buněk a biomolekul volnými radikály

Princip vzniku komplexní choroby spočívá v mnohonásobném narušení struktur a funkcí buněk a biomolekul. Poškození buněk chemickými oxidanty může probíhat dvěma mechanismy:

- přímo: hydrofilní chemická látka se váže přímo na biomolekulu nebo organelu,
- nepřímo: lipofilní chemická látka se v těle transformuje na toxickou formu a ta následně reaguje s biomolekulami.

Biomolekuly lipidů jsou nejčastěji poškozeny peroxidací polynenasycených mastných kyselin, při které vznikají karcinogenní aldehydy, hydroperoxydy a řada dalších nežádoucích látek. Poškození lipidů vede ke znehodnocení funkce a integrity biomembrán.

U bílkovin jsou nejvíce náchylné na působení volných radikálů postranní řetězce aminokyselin. Při změně struktury bílkovin vznikají autoimunitní reakce. K dalšímu znehodnocování proteinů dochází rovněž peroxidací.

Hydroxylový radikál reaguje s nukleovými kyselinami. Změny v těchto molekulách působí chybné párování bází při syntéze DNA a RNA a tím mutace v genetické informaci, případně karcinogenezi [6].

2.1.2 Obrana organismu proti radikálům

Organismus musí mít systém, který mu pomůže vyrovnat se s poškozením způsobeným volnými radikály, tzv. systém antioxidační obrany. Za antioxidant se může považovat každá látka, která brání reakci reaktivního metabolitu s jinou látkou za vzniku relativně stabilních netoxických produktů [5].

Antioxidační obranu lze rozdělit na zprostředkovanou enzymy nebo nízkomolekulárními látkami a dále na primární, sekundární a terciární.

2.1.2.1 Primární antioxidační systém

Úkolem primárních antioxidantů je bránění vzniku nových reaktivních metabolitů kyslíku. Principem je eliminace iontů přechodných kovů, chelatace nebo inhibice enzymů, které katalyzují tvorbu nových radikálů. Nejdůležitější primární antioxidanty se nacházejí v krevní plazmě (například transferin, laktoferin, ceruloplazmin, albumin, ferritin) [7].

2.1.2.2 Sekundární antioxidační systém

Funkcí sekundárních antioxidantů je odstraňovat již vzniklé volné radikály. Dle mechanismu účinku se sekundární antioxidanty dělí na scavengery (přeměňují volné radikály na neradikálové molekuly), trappery (přeměňují radikály na relativně stabilnější reaktanty) a quencherly (přímo zhasí volné radikály). Z biologického hlediska lze rozdělit na enzymy a nízkomolekulární látky. Mezi nízkomolekulární sekundární antioxidanty se řadí například vitaminy (hydrofilní – B, C, H, U i lipofilní – A, D, E, K, karotenoidy), flavonoidy, polyfenoly, porfyriny, glukosinoláty, koenzym Q, glutathion, bilirubin, kyselina močová, atd [8].

2.1.2.3 Terciární antioxidační systém

Terciární antioxidanty odstraňují nebo opravují již poškozené biomolekuly a buněčné složky. Celý terciární systém se skládá z třech skupin enzymů:

- a) opravné enzymy DNA: tyto enzymy mohou opravit poškozený úsek DNA, odstranit nebo obnovit jeho funkci.
- b) proteolytické enzymy: katalyzují hydrolýzu peptidových vazeb v proteinech a to buď uvnitř molekuly (endoproteasy) nebo na konci řetězce (exoproteasy). Mezi nejznámější proteolytické enzymy patří pepsin, trypsin, chymotrypsin, papain, bromelin.
- c) lipolytické enzymy: tato skupina enzymů štěpí poškozené lipidy podobně jako proteolytické enzymy defektní proteiny [9, 10].

2.2 Vybrané nízkomolekulární antioxidanty

Řada nízkomolekulárních antioxidantů patří mezi vitaminy nebo provitaminy. Vitaminy jsou nízkomolekulární organické sloučeniny, jejichž množství v organismu je malé, ale mají významné biologické účinky. Lidský organismus si je ve většině případů neumí syntetizovat, jsou pro něj esenciální. Mohou je však syntetizovat některé mikroorganismy, které osidlují vnitřní orgány člověka (například střevní bakterie). Vitaminy lze rozdělit podle afinity k vodě do dvou skupin, na hydrofilní a lipofilní (A, D, E, K).

Provitaminy jsou látky, které samy nevykazují fyziologické účinky, ale mohou sloužit jako prekurzory syntézy vitaminů [11].

2.2.1 Kyselina askorbová

Kyselina askorbová je základní biologicky aktivní sloučeninou vitamínu C. Má čtyři stereoisomery, aktivitu však vykazuje pouze kyselina L-askorbová. Největší výskyt této látky byl zjištěn v ovoci a zelenině (zvláště pak v pomerančích či rajčatech), naopak maso, vejce a mléko jsou jako zdroj tohoto vitamínu velmi chudé. Vitamin C je citlivý na světlo a teplo, proto se úpravou nebo konzervací pokrmu ztrácí.

Kyselina askorbová se podílí především na biosyntéze kolagenu v organismu, dále na syntéze prostaglandinů a mukopolysacharidů. Stimuluje transport sodných a draselných iontů, metabolismus cholesterolu, atd. K antioxidantům se řadí především díky reakcím s aktivními formami kyslíku. Zabezpečuje ochranu vitamínu E či kyseliny listové před oxidací a chrání lipidy v membránách [12, 13, 14].

2.2.2 Tokoferoly

Tokoferoly jsou deriváty chromanu, které tvoří vitamin E. Jejich společným základem jsou tokol a tokotrienol. Tento vitamin chrání nenasycené mastné kyseliny u eukaryotických buněk před poškozením volnými radikály. Dále hlídá integritu biomembrán (cytoplasmatických i organelových) a zabráňuje peroxidaci lipoproteinů. Má lipofilní povahu, a proto musí být v krvi transportován pomocí LDL.

Hlavním zdrojem jsou rostlinné lipidy, dále také v menší míře maso, ovoce, zelenina [8, 14].

2.2.3 Karotenoidy

Karotenoidy jsou žluté, oranžové a výjimečně také žluto-zelené a červené rostlinné pigmenty. Jsou převážně lipofilní povahy a produkují je houby, řasy, mikroorganismy i živočichové. Za svoji barevnost vděčí řetězci konjugovaných dvojných vazeb. Dělí se na dvě hlavní skupiny, na karoteny a xantofyly (kyslíkaté sloučeniny odvozené od karotenů). Nejvýznamnější jsou lutein, lykopen, β -karoten, α -karoten, astaxanthin a kryptoxanthin. β -karoten je výchozí strukturou pro vznik retinolu, který je obsažen ve vitamínu A.

Mají lipofilní povahu, proto by měly být přijímány v potravě společně s tuky. Působí podobně jako tokoferoly. Zháší singletový kyslík i jiné volné radikály a mají také antikancerogenní vlastnosti [14].

2.2.4 Polyfenoly

V rostlinách se vyskytují strukturně velmi různé fenolové sloučeniny. Běžnými polyfenoly jsou: flavonoidy, fenolové kyseliny a ligniny. Tyto látky chrání lipoproteiny s nízkou hustotou před oxidační modifikací (zásadní význam při rozvoji aterosklerózy), snižují riziko infarktu myokardu (prevence tvorby krevních sraženin) a také se uvažuje o jejich možném antikancerogenním účinku [15, 16].

Z celkového příjmu polyfenolů ve stravě tvoří asi dvě třetiny flavonoidy. Základní struktury flavonoidů jsou: katechiny, leukoanthokyanidiny, flavanony, flavanonoly, flavony, flavonoly, anthokyanidiny, chalkony a dihydrochalkony, aurony a izoflavonoidy. Tato skupina látek má široké uplatnění v antioxidantním systému. Zlepšují vstřebávání minerálů a vitamínů, jsou antikancerogenní, snižují tvorbu oxidovaných lipoproteinů a lipidů, ničí volné radikály, mohou vázat a inaktivovat některé prooxidační kovové ionty, atd [17, 18].

2.2.5 Glukosinoláty

Glukosinoláty tvoří významnou skupinu sekundárních metabolitů mnoha rostlin. Jsou zodpovědné za typické štiplavé aroma křenu, ředkve, hořčice, semen řepky, některého koření, atd. Zájem o ně vychází z epidemiologického a experimentálního pozorování. To dokazuje, že

brukvovitá zelenina (hlávkové zelí, kapusta, brokolice) poskytuje mimořádně silnou ochranu proti rakovině plic a gastrointestinálního traktu [19, 20].

2.2.6 Porfyriny

Mezi deriváty porfyriu se řadí chlorofyl, hemoglobin a některé enzymy. Jsou schopné vychytávat kyslíkové radikály. Tyto radikály produkují mutageny, proto jsou porfyriny velmi účinným antimutagenem (v některých testech dokonce silně předčily kyselinu askorbovou, tokoferol, glutathion, atd.) [21].

2.3 Enzymy

Z chemického hlediska jsou enzymy bílkovinné makromolekuly, které mají schopnost katalyzovat chemické reakce (snižují aktivační energii reakce), neposunují ovšem rovnováhu ve prospěch produktů ani reaktantů. Ve srovnání s chemickými katalyzátory mají enzymy mnohem vyšší specifitu k substrátům a tvoří také specifitější produkty (minimalizace vedlejších produktů) [22].

2.3.1 Enzymová specifita

Důležitou vlastností enzymů je jejich specifita pro daný substrát nebo reakci. Ta je dána architekturou aktivního místa a nekovalentními vazbami.

Reakční specifita znamená, že je enzym schopen vázat substrát, který může podléhat několika reakcím s různými produkty. Reakčně specifický enzym katalyzuje právě jednu z možných reakcí. Většina enzymů urychluje pouze jeden typ reakce. Existují však i enzymy, které katalyzují současně více typů chemických přeměn substrátu (př. RUBISCO – karboxylasa a oxygenasa).

Substrátová specifita může být široká (například hexokinasa katalyzuje fosforylaci manósy, glukósy i fruktósy ve svalech) nebo úzká. Dále se klade důraz i na stereospecifitu (u chirálních molekul) a geometrickou substrátovou specifitu. Geometricky specifické enzymy mohou být absolutní (ureasa) nebo skupinově selektivní [23].

2.3.2 Rozdělení enzymů

Enzymy jsou klasifikovány a pojmenovány podle povahy chemické reakce, kterou katalyzují. Jsou rozděleny do šesti hlavních tříd, které se dále dělí na podtřídy a kategorie podle typu kofaktoru, struktury substrátů a průběhu katalyzované reakce [22].

•Oxidoreduktasy

Oxidoreduktasy katalyzují oxidačně-redukční reakce mezi molekulami. Jsou jednou z nejpočetnějších tříd enzymů. Principem katalýzy je buď přenos elektronů nebo atomů vodíku, případně inkorporace kyslíku do substrátu [21]. Podtřídy oxidoreduktas jsou dehydrogenasy (katalyzátory oxidace alkoholu na aldehyd), oxidasy (katalýza vzniku kyslíku z peroxidu vodíku), oxygenasy a peroxidasy. Jako kofaktory se uplatňují hem, glutathion, benzochinony, kyselina lipoová, biopterin, flavinové nukleotidy, atd [23].

•*Transferasy*

Transferasy jsou enzymy, které přenáší skupiny atomů mezi molekulami. Účastní se řady biosyntetických dějů [24]. Podskupinami transferas jsou aminotransferasy (zajišťují přenos aminoskupiny z aminokyseliny na ketokyselinu) a kinasy (umožňují přenos fosfátové skupiny na akceptor s hydroxy- nebo aminoskupinou). Jako kofaktory u těchto enzymů působí ATP, koenzym A, biotin, thiamin pyrofosfát, pyridoxalfosfát,...[23].

•*Hydrolasy*

Hydrolasy katalyzují štěpení vazeb za účasti vody. Tyto enzymy pracují bez kofaktoru [23].

•*Lyasy*

Lyasy se podílejí na štěpení a vzniku vazeb C-C, C-O, C-N bez účasti vody. Zajišťují odstranění skupin za vzniku dvojných vazeb [24]. Jako kofaktor působí například acetyl-CoA [23].

•*Isomerasy*

Isomerasy působí stechiometrické změny uvnitř molekul, intramolekulární oxidačně-redukční reakce a přenosy skupin. Je to nejméně početná skupina enzymů [24].

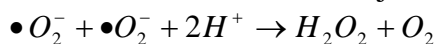
•*Ligasy*

Ligasy jsou enzymy, které katalyzují syntézu energeticky náročných vazeb C-C, C-O, C-N za současně rozkladu látky uvolňující energii. Tvorba vazeb je spojena s hydrolýzou ATP [24].

2.3.3 Některé významné antioxidační enzymy

2.3.3.1 *Superoxiddismutasa (SOD)*

Superoxiddismutasa se řadí mezi oxidoreduktasy a nachází se ve všech aerobních organismech. Odstraňuje vysoce toxický a reaktivní superoxidový radikál, který vzniká rozpadem molekulárního kyslíku. Mechanismus eliminace je následující:



SOD sekundárně zabraňuje například peroxidaci lipidů, degradaci polysacharidů a inaktivaci jiných důležitých enzymů.

Dle chemické struktury patří do skupiny tzv. metaloproteinů. Obsahuje dva atomy Zn^{2+} (nutné pro strukturní stabilitu) a dva atomy Cu^{2+} (nutné pro enzymatickou aktivitu). Optimum pH se pohybuje v rozmezí 5,5–9,5. Inhibitory jsou HCN, EDTA při pH = 3,8.

Na stanovení aktivity tohoto enzymu se využívají různé techniky, například polarografie, luminiscence a spektrofotometrie [24].

2.3.3.2 *Peroxidasa*

Peroxidasa je metaloenzym, který má v prostetické skupině obsažen ferriprotoporfyrin (popřípadě jeho deriváty, například zelené heminy).

Peroxidasa je oxidoreduktasa katalyzující nesespecifický rozklad peroxidu vodíku za přítomnosti vhodných donorů vodíku (kyseliny askorbové, polyfenolů atd.) [24].

Vyskytuje se hlavně v rostlinných materiálech. Společně s katalasovou aktivitou může být využívána jako indikátor metabolické aktivity [25] a ukazatel znečištění životního prostředí [26]. Při stanovení peroxidasové aktivity je nutné nejdříve eliminovat aktivitu katalasy [24].

2.3.3.3 *Katalasa (CAT)*

Katalasa je heminový protein (oxidoreduktasa) obsahující v prostetické skupině čtyři ferriprotoporfyrinové zbytky pevně vázané na bílkovinu. Rozkládá peroxid vodíku a také katalyzuje oxidaci vodíkových donorů (alkoholů, fenolů, aminokyselin).

Jejími inhibitory jsou H_2S , HCN , CO , NaN_3 , některé kovové ionty (Cu^{2+} , Pb^{2+}), peroxid vodíku o menší koncentraci než 0,1 mol/l a kyselina mravenčí. Optimální pH leží mezi hodnotami 6,8–7,5.

Aktivita katalasy se dá stanovit různými metodami, například fotometricky, volumetricky a titračně [24].

2.3.3.4 *Polyfenoloxidas (PPO)*

Polyfenoloxidas jsou oxidoreduktasy. Jejich triviální název skrývá dva funkčně rozdílné enzymy, a to fenoloxidasu a lakasu. PPO patří do skupiny metaloenzymů, jejich katalytická schopnost závisí na přítomnosti iontu mědi.

Fenoloxidasa (jinými názvy tyrosinasa, cresolasa, katecholoxidasa, fenolasa, o-difenoloxidasa) přeměňuje tyrosin na DOPA (dihydroxyfenylalanin) a oxiduje jej na chinon. Řadou následných reakcí, které probíhají z části spontánně (bez enzymové katalýzy), vzniká nakonec černý nebo hnědočerný melanin. Produkt oxygenace (difenol) je současně donorem vodíku. Většina fenoloxidas může provádět i samotnou oxidaci difenolů bez spřažené hydroxylace. Tento pochod se označuje jako katecholasový účinek, neboť se oxidují deriváty pyrokatechinu (při tomto ději se tvoří voda). Obecně lze říci, že fenoloxidas oxidují fenolové sloučeniny obsahující ortho-OH skupiny [24].

Fenoloxidasa byla prokázána již v roce 1937 v bramborách a dalších vyšších rostlinách. Přítomnost enzymu se projevuje tím, že se řezná plocha rostlinné tkáně barví tmavě (enzymatické hnědnutí). Tím se také vytvoří ochrana oxidovanou vrstvou proti vniknutí mikroorganismů do hlubší tkáně.

Lakasa získala svůj název podle japonského stromu laka (*Rhus vernicifera*), který je jeho hlavním zdrojem. Od fenoloxidas se odlišuje substrátovou specifitou a citlivostí vůči společným inhibitorům, jako jsou CO , polyvinylpyrolidon a kationaktivní detergenty. V ovoci a zelenině se vyskytuje méně než fenoloxidasa [24].

2.3.3.5 *Lipoxygenasa (LOX)*

Lipoxygenasa je široce zastoupena v rostlinné říši. Katalyzuje oxidaci nenasycených mastných kyselin s více dvojnými vazbami, které obsahují cis-1,4-pentadienovou skupinu. Tím vznikají řetězovou reakcí peroxidy nenasycených mastných kyselin, které se štěpí na karbonylové sloučeniny (aldehydy, ketony) nebo mastné kyseliny s krátkými řetězci. Vytváří se sloučeniny s charakteristickými vůněmi a chutěmi.

Mezi substráty lipoxygenasy patří nutričně významné esenciální mastné kyseliny jako linolová, linolenová a arachidonová. Mohou být oxidovány i acylglyceroly a další estery zmíněných mastných kyselin. Může však probíhat i autooxidace bez intervence lipoxygenasy působením vyšších teplot, světla, těžkých kovů a peroxidů [24].

2.4 Metody stanovení aktivních látek v ovoci

Na stanovení aktivních látek v ovoci je možno užít řadu metod, jejichž výběr je vesměs podmíněn chemickým charakterem stanovované látky. Jelikož ovoce je směsná matrice a obsahuje celou řadu látek, je nutné před vlastní analýzou tyto sloučeniny od sebe co nejlépe oddělit. K tomu se může s výhodou využít vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC).

2.4.1 Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC)

V kapalinové chromatografii je mobilní fáze kapalina. O separaci složek rozhodují nejen interakce se stacionární fází, ale i velmi výrazně použitá mobilní fáze. Čas, který stráví analyt ve stacionární nebo v mobilní fázi, závisí na jeho afinitě ke každé z nich. Vzorek není nutné převádět na plyn, jako tomu je u plynové chromatografie, proto se mohou s výhodou analyzovat i tepelně nestálé a netěkavé sloučeniny [27].

HPLC má kolonové uspořádání. Celé zařízení se skládá z čerpadla, směšovacího zařízení, dávkovacího zařízení, kolony uložené případně v termostatu a z detektoru [27].

Čerpadla pro HPLC jsou pístová nebo membránová. V případě užití jednočinného pístového čerpadla by docházelo ke vzniku nežádoucích rázů, z toho důvodu se užívají dvojitá čerpadla, jednočinná zapojená v sérii nebo čerpadla s více písty. Materiál, z kterého jsou tato zařízení vyrobena, nesmí být narušován používanou mobilní fází a nesmí do ní uvolňovat žádné látky či nečistoty [27].

Směšovací zařízení slouží k míchání různých mobilních fází v určeném poměru. Složení mobilní fáze může být po celou dobu analýzy stejné (izokratická eluce) nebo se může s časem měnit (gradientová eluce) [27].

Jako dávkovací zařízení může sloužit injekční stříkačka. Tento typ dávkování má však jisté nevýhody: netěsnosti, problémy s udržením tlaku... Injekční zařízení může být ovládáno ručně nebo automaticky. V současné době bývají injekční systémy nahrazeny obtokovým dávkovacím kohoutem. Toto zařízení je vybaveno dávkovací smyčkou, do které se vstříkuje vzorek pomocí injekční stříkačky [27].

Kolony jsou většinou zhotoveny z nerezové oceli a obsahují náplň, přes kterou prochází mobilní fáze se vzorkem. K separaci se užívá malých zrníček sorbentu v koloně, proto se musí užít vyššího tlaku, aby byl docílený požadovaný průtok. Jako ochrana hlavní kolony slouží předkolona. Umisťuje se většinou mezi dávkovací zařízení a hlavní kolonu. Chrání ji před zanesením nečistotami, nerozpustnými materiály či bublinkami vzduchu. Způsobuje malé rozšíření a posunutí pásů v chromatogramu [27].

Pokud se analýza neprovádí za laboratorní teploty, je kolona ještě uložena v termostatu.

Detektor v kapalinové chromatografii by měl být selektivní pro analyt a málo citlivý na mobilní fázi. Průtočná celá detektoru musí snést tlak mobilní fáze a udržet těsnost. Nejčastěji jsou fotometrický, refraktometrický a fluorescenční detektor [27].

Spektrofotometrické detektory jsou založeny na principu absorpce záření. Kvantitativní vyhodnocení je založeno na Lambert-Beerově zákoně:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

kde A je absorbance, ϵ je molární absorpční koeficient ($\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), c je molární koncentrace ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a l je tloušťka kyvety (cm). Platnost Lambert-Beerova zákona je nutným předpokladem pro jakékoliv spektrofotometrické měření. Podle konstrukčního typu se mohou rozdělit detektory na čtyři typy:

- detektor s fixní vlnovou délkou
- detektor s měnitelnou vlnovou délkou
- detektor s programovatelnou vlnovou délkou (měnitelnou během analýzy)
- detektory diodového pole (PDA, DAD).

PDA snímají celé spektrum bez přerušení chromatografické separace. Tyto detektory umožňují ve spolupráci s řídicí jednotkou (počítačem) detekci látky při jakékoliv zvolené vlnové délce, umožňují porovnávat snímaná spektra s knihovnou spekter, vypočítají čistotu píku (identifikace látky) [28].

Zajímavým detektorem v kapalinové chromatografii je hmotnostní detektor. Měří ionty v plynném stavu. Nejdříve musí být tedy vygenerované ionty sledovaných atomů či molekul. Následně dochází k separaci iontů dle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Výsledkem metody je záznam iontů vzniklých ze zkoumaného vzorku, tzv. hmotnostní spektrum, na kterém je v závislosti na rostoucí hodnotě m/z vynášeno absolutní nebo relativní zastoupení iontů [29].

2.5 Příčiny nežádoucích změn a znehodnocování potravin

Je obecně známo, že jakékoliv potravina podléhá po kratší nebo delší době změnám, až se úplně znehodnotí. Příčiny těchto změn jsou především dvojího původu: mikrobiální a enzymatické [30].

2.5.1 Změny mikrobiální

Mikroorganismy organickou hmotu rozkládají nebo přeměňují (buď na látky úplně jednoduché nebo na látky energeticky chudší). Tyto změny působí bakterie a pravé houby (kvasinky a plísňe). Na ovoce a zeleninu se dostávají prostřednictvím hmyzu a jiných živočichů, prachem a přímým stykem se zemí. Typičtí rostlinní saprofyti se na povrchu zdravé a živé rostliny nemnoží, pouze čekají na zlepšení podmínek k množení (pokud k nim v dohledné době nedojde, jsou spláchnuty deštěm). Vzhledem ke kyselému pH ovoce, na něm vegetují převážně plísňe a kvasinky [31].

Mikroorganismy potřebují ke své výživě živiny, tj. hlavně cukry, bílkoviny a jiné látky. Nároky na výživu se různí. Všechny však požadují určité množství vody a čím více je v potravine vody, tím snadněji ji rozkládají [30].

Posklizňový rozklad zahajují plísňe, které dobře pronikají do pletiv, i když jsou poměrně kyselé. Intenzita, rychlost i kvalitativní průběh posklizňového rozvoje mikrobiální mikroflóry se řídí za jinak stejných okolností stupněm celkového poškození, skladovací teplotou a specifickou odolností plodů [31].

Mnohé druhy plísni a patogenních hub napadají ovoce nejen po sklizni, ale i na stromech, či ve formě hotového výrobku [32]. *Mucor piriformis* povléká shnilá jablka a hrušky. Plody jí napadené voní estery. *Mucor racemosus*, který má značnou kvasnou schopnost, napadá švestky a slivy. *Mucor mucedo* je nejznámější, tvoří bělavé chomáčkovité povlaky na substrátu [32]. *Rhizopus nigricans* a četné jeho příbuzné druhy vylučují řadu enzymů. Některé z nich zkvašují škrob přímo na alkohol bez předchozího zcukření (*Mucor Rouxii*). Napadají měkké ovoce a ve velmi krátké době ho úplně ničí [32]. *Aspergillus glaucus* tvoří

modrozelené povlaky, *Aspergillus niger* hnědočerné až černé. Vyskytují se hlavně na ficích a datlích [32]. *Penicilium glaucum* je modrozelená štětičkovitá plíseň. Tvoří barevné povlaky páchnoucí zatuchlinou [32].

Monilia má kvasnou schopnost podobně jako rod *Aspergillus* a *Torula*. Hnilobná *Monilia fructigena* napadá v soustředných kruzích jádrové ovoce (jablka, hrušky). *Monilia cinerea* kazí ovoce peckové, *Monilia laxa* škodí broskvím a meruňkám [32].

2.5.2 Změny enzymatické

Je známé značné množství enzymů, které jsou užitečné a nezbytné pro život buňky a pletiv. Pro konzervování jsou však většinou škodlivé. Podobně jako mikroorganismy potřebují enzymy pro svou funkci optimální teplotu. Nízká teplota jejich aktivitu brzdí, vysoká je přímo inaktivuje [30].

2.6 Způsoby konzervování potravin

Úkolem konzervace je zabránit v činnosti nežádoucím enzymům a mikroorganismům. Toho lze docílit úpravou prostředí, inaktivací enzymů či usmrcením mikroorganismů [30].

Metody uchování potravin lze rozdělit na metody fyzikální, chemické a biologické [30].

2.6.1 Metody fyzikální

Při použití fyzikálních konzervačních metod se do potraviny nepřidávají žádné cizorodé látky. Činnost mikroorganismů a enzymů se omezuje různými zásahy fyzikální povahy:

- vysoká teplota:** Mikroorganismy se vysokou teplotou usmrcují, enzymy inaktivují. Čím je teplota vyšší, tím rychleji se ničí.
- nízká teplota:** Nízká teplota zpomaluje činnost mikroorganismů a enzymů. Při teplotě 0°C se zastavují veškeré životní pochody.
- sušení:** Je to starý konzervační způsob, kdy se odpařením vody sníží její obsah natolik, že zde nemohou vegetovat mikroorganismy.
- zahušťování cukrem:** Provádí se při výrobě pomazánek (marmelád, džemů, rosolů), proslazených výrobků a sirupů. Snižuje se obsah vody a roste osmotický tlak, čímž se opět zabraňuje v činnosti mikroorganismům [30].

2.6.2 Metody chemické

Tyto metody se využívají častěji při konzervování zeleniny než ovoce. Oproti klasické sterilaci mají tyto techniky řadu nevýhod. Je to především zhoršená chuť a nedostatečná inaktivace enzymů, což se projeví změnou barvy, vůně a konzistence. Z tohoto důvodu je doporučováno zeleninu před konzervováním nálevy krátce povařit. Patří sem také konzervace solí a kyselinou octovou [30].

2.6.3 Metody biologické

Zde se využívá činnosti mikroorganismů. Jedná se především o:

- alkoholové kvašení:** Dochází k přeměně cukru kvasinkami na alkohol. Tato metoda se používá u výroby ovocných a hroznových vín, ovocných kvasů a pálenky.
- mléčné kvašení:** Zde se využívá přeměna cukru na kyselinu mléčnou, která má částečné konzervační účinky. Takto se mohou konzervovat především okurky a zelí [30].

2.7 Přehled výsledků některých studií zaměřených na dlouhodobé uchovávání ovoce

Problematika dlouhodobějšího uchování ovoce je velmi diskutovaným tématem. Hlavním důvodem je sezónnost produkce tuzemských surovin (jablka, hrušky, švestky,...), ale také dlouhá doba transportu plodů s exotických zemí (mango, mandarinky, pomeranče, banány...), při kterém dochází ke značným ztrátám. Díky prodlevě během dopravy se tak musí plody sklízet ještě před obdobím zralosti, což se podepisuje na chutnosti a celkovém organoleptickém profilu.

Postupem času byly vyvinuty nejrůznější metody zpracování za účelem delší úchovy. Otázkou však zůstává, kolik si daný plod zachová ze své původní výživové hodnoty, je-li podroben nějakému konzervačnímu zásahu.

Jedním z možných postupů úchovy je i mražení. Vliv nízké teploty na obsah nutričních látek je předmětem intenzivních studií. Hlavní nevýhodou je nehezký vzhled a narušení struktury matrice. Ovoce, díky obsahu PPO, na řezu hnědne a tato změna je přijímaná spotřebiteli velice negativně. Bohužel v domácích podmínkách, kde není k dispozici zařízení pro velmi rychlé zmrazení, se těmto změnám nelze vyhnout. Jedním z možných způsobů eliminace hnědnutí může být máčení celých plodů či jejich částí v impregnačním roztoku. Ošetření je závislé jednak na pórovitosti povrchu plodu, tak na délce impregnace i na objemu roztoku [33].

2.7.1 Vliv mražení na obsah polyfenolů v impregnovaných vakuově ošetřených plodech jablek

Tým vědců z Boloňské university v Itálii testoval v laboratorních podmínkách, jaký vliv má na obsah polyfenolů v jablkách impregnace a vakuové ošetření před vlastním procesem mražení [1]. Zaměřili se na dvě odrůdy: Granny Smith a Stark Delicious. Plody nejdříve nakrájeli na stejné plátky a ty následně ponořili do roztoku glukosy, sacharosy, kyseliny askorbové, chloridu vápenatého a chloridu sodného. Po 30 minutách louhování ve vakuu byly plátky vyprány ve vodě, osušeny a zmrazeny tekutým dusíkem. Při -18°C byly vzorky skladovány 12 měsíců. Jako kontrolní vzorky jim sloužily plátky jablek, které byly také zmrazeny, ale bez předchozí úpravy [1].

Byly zjištěny následující výsledky:

- obsah sušiny se po dobu 12 měsíců nezměnil.
- obsah celkových polyfenolů v ošetřených plodech vzrostl. U kontrolních vzorků se objevily odlišnosti mezi odrůdami. Obsah sice u obou vzrostl, ale u Granny Smith byl nárůst největší ze všech vzorků, u druhé odrůdy ne tak dramatický.
- u katechinů byl zaznamenán nejvyšší nárůst u (+)-katechinu ve srovnání s (-)-epikatechinem a dalšími prokyanidiny.
- nárůst flavan-3-olu byl pozorován s poklesem pH. Ve vzorcích obecně došlo k poklesu flavanolů i hydroxycinamové kyseliny [1].

Z tohoto měření vyplývá hypotéza, že k nárůstu fenolických látek dochází pravděpodobně vlivem hydrolýzy polymerních fenolů. U některých druhů fenolů byl však zaznamenán i pokles. Ten byl způsoben nejspíš aktivitou polyfenoloxidas. Tento enzym je bržděn jak při nízké teplotě skladování (-18°C), tak přidávkem kyseliny askorbové v impregnačním roztoku [1].

2.7.2 Obsah fenolů a antioxidační kapacita versus přijetí máčených a vakuově impregnovaných mražených nektarinek konzumenty

Stejný tým vědců jako v předchozím odstavci studoval obsah fenolů a antioxidační kapacitu mražených nektarinek [33]. Plody byly nakrájeny na měsíčky a podrobeny různému zásahu před vlastním procesem mražení. Jedna skupina byla máčena v impregnačním roztoku fruktosy, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, kyseliny askorbové a NaCl po dobu 15 minut (SK). Druhá byla ponořena do stejného ošetřujícího roztoku ale ve vakuu (IV). Poslední skupina nijak ošetřena před mražením nebyla (NT). Vzorky byly uchovány v mrazničce po dobu jednoho měsíce [33].

Před vlastní analýzou byly nektarinky rozmrazovány po dobu 4 h při teplotě 18°C. Byly zjištěny tyto výsledky:

- obsah sušiny, který byl vztažen k hodnotám získaným z čerstvých vzorků, byl v NT vzorcích nezměněn. V obou máčených variantách vzrostl.
- titrační kyselost se v SK a IV vzorcích snížila. To se zřejmě dá vysvětlit tím, že plyn obsažený v pórech ovoce byl nahrazen cukerným roztokem (hlavně v IV, kde byl umožněn rychlejší přestup hmoty), což pravděpodobně vedlo k vylouhování některých látek (např. organických kyselin) do roztoku.
- antioxidační kapacita v IV plátcích byla vyšší než v čerstvých nektarinách. Tohoto efektu bylo nejspíš docíleno vlivem přídavku kyseliny askorbové v ošetřujícím roztoku. Tato kyselina je významným antioxidantem. Pozorovaný jev nebyl tak výrazný v SK vzorcích pravděpodobně proto, že ve vakuu se adsorbovalo více kyseliny do povrchové vrstvy plodů než tomu bylo u obyčejného máčení.
- obsah chlorogenové a neochlorogenové kyseliny v IV měsíčkách byl srovnatelný jako v čerstvém ovoci, u SK a NT nektarinek však klesl (u NT výrazněji).
- ze sensorického hlediska byla hodnocena tuhost, sladkost, aroma, retronasální aroma a celkový vzhled v porovnání s čerstvými vzorky. Jako nejlepší byly vyhodnoceny plody IV, následně SK. NT byly shledány jako nevyhovující [33].

Z celého pokusu vyplývá zřejmý ochranný vliv kyseliny askorbové jak po nutriční, tak i po vzhledové stránce. Ve vakuu je podpořen její přestup do povrchu plodů a tím je posílen i její pozitivní vliv [33].

2.7.3 Vliv osmotické dehydratace a mražení na profil těkavých látek v nakrájených plodech kiwi

Vědci na universitě ve Valencii zjistili, že se při běžném mražení plátků kiwi ztrácí významný podíl důležitých látek z plodů [34]. Proto zkoušeli vliv osmotické dehydratace před zmrazením. K analýze užili plody kiwi nakrájené na stejné plátky. Vzorky byly ošetřeny před uložením v mrazničce různě koncentrovanými roztoky sacharózy (45° a 65° Brix). Každá skupina pak byla ještě rozdělena na máčení při laboratorním tlaku (OD) a ve vakuu (PVOD). Vznikly tak čtyři skupiny vzorků (45OD, 45PVOD, 65OD, 65PVOD), které byly uchovány při -18°C po dobu 30 dnů v polyetylenových uzavřených sáčkách [34].

Před analýzou byly vzorky rozmrazovány při 8°C po dobu 10 hodin. Jako kontrolní vzorky byly analyzovány čerstvé plody. Byly zjištěny tyto výsledky:

- došlo ke ztrátám vody a k nárůstu obsahu sušiny ve všech vzorcích.

- v čerstvých vzorcích bylo identifikováno a kvantifikováno dvanáct těkavých látek (hl. estery, dále alkoholy, aldehydy a furan), které mohou také sloužit k identifikaci původu plodů. V obou atmosférách (OD i PVOD) byl zaznamenán pokles jednoho aldehydu a dvou alkoholů, které udávají charakteristický profil čerstvosti a zelenosti plodů. Výraznější byl v plodech ošetřených při laboratorním tlaku (OD).

- naopak byl pozorován nárůst esterových sloučenin, které jsou zodpovědné za vůni kiwi [34].

Bylo zjištěno, že osmotický stres znamená urychlení zrajících procesů na buněčné úrovni společně se zvětšením enzymové aktivity. Při PVOD ošetření chybí kyslík v mezibuněčném prostoru plodů, což vede k limitaci enzymů zodpovědných za vývoj těkavých látek a oxidaci [34].

2.7.4 Změny antioxidační aktivity a celkových polyfenolů během skladování ve vybraných druzích ovoce

Skladování je jedním z důležitých faktorů pro zachování nutriční hodnoty ovoce. V následujícím pokusu se vědci zabývali antioxidační aktivitou a obsahem celkových polyfenolů v ovoci dostupném v Thajsku, jako je například mango, banány, guava, papája, makiang, maluod...(Obr.1) [35]. Parametry byly zkoumány v ovoci uloženém v mrazničce při -20°C po dobu 1, 2 a 3 měsíců. Toto ovoce bylo před zmrazením rozmixováno. Dalším typem úchovy bylo skladování nehomogenizovaného ovoce v lednici při 4-6°C, analýza probíhala v 0., 3., 6. a 10. dni od uložení [35].



Obr.1: Guava, makiang, maluod [36, 37, 38]

Byly zjištěny tyto poznatky:

- každý druh ovoce se lišil v hodnotě antioxidační aktivity a v obsahu celkových polyfenolů. Rozdíly byly pozorovány i mezi jednotlivými kusy stejného druhu v závislosti na různém způsobu kultivace rostlin, zralosti, podmínkách sklizně, ročním období, atd.

- obsah vlhkosti ve vybraných plodech z mrazničky se po celou dobu skladování neměnil.
- při měření antioxidační aktivity byly použity dvě metody stanovení (ORAC a FRAP). Při měření první metodou byl zaznamenán prudký pokles v průběhu prvních dvou týdnů v guavě. Při dalším skladování antioxidační aktivita stále klesala, ale ne už tak výrazně. V makiangu byla aktivita víceméně stabilní. Při měření druhou metodou byly zjištěny výsledky odlišné. V guavě nebyl zaznamenán pokles, v makiangu a v maluodu antioxidační aktivita klesla.

- obsah celkových polyfenolů v mražené guavě postupně klesal, v maluodu a makiangu ne.

- obsah vlhkosti se v ovoci uloženém v lednici po celou dobu pokusu neměnil.
- antioxidační aktivita v guavě uložené v chladničce měla vzrůstající tendenci a to při měření oběmi metodami. V makiangu a v maluodu aktivita klesala nejprve pozvolna, pak rychleji.
- obsah celkových polyfenolů u ovoce uchovávaného v chladničce byl stabilní po celou dobu pokusu [35].

Z pokusu vyplývá, že každý druh ovoce je odlišný. Dokonce i jednotlivé plody z téhož druhu se mohou lišit v hodnotách antioxidační aktivity a obsahu polyfenolů. Zjištěné výsledky jsou závislé také na použité metodě měření. Výsledky změny aktivity během skladování se lišily při měření metodou ORAC a FRAP. To bylo zapříčiněno nejspíš odlišným principem metody. Zatímco metoda ORAC měří úbytek fluorescence, metoda FRAP měří intenzitu modrého zbarvení. To vzniká redukcí železitého komplexu pomocí antioxidantů ve vzorku [35].

2.7.5 Vliv podmínek mražení na kvalitu plodů palmy Areca

Palma Areca se zařazuje do skupiny subtropických palm. Produkuje plody (Obr. 2), které obsahují významné nutriční látky (například mastné kyseliny a aminokyseliny). Byl zkoumán vliv mražení pomocí tekutého dusíku na kvalitu těchto plodů s cílem zachování čerstvosti, barvy, vůně a nutriční hodnoty [39]. Rychlé zmražení, kterého se dusíkem dosáhne, je jedním z významných faktorů zachování kvality plodů společně s ošetřením materiálu před vlastním mražením, s operacemi prováděnými se zmrzlou maticí a s podmínkami transportu a tání [39].



Obr. 2: Plody palmy Areca [40]

Před mražením vzorků byly užity některé ošetřující kroky: blanšírování ovoce po dobu 10 minut v horké vodě nebo v horkém roztoku sody, mikrovlnné ošetření, máčení v impregnačním roztoku siřičitanu sodného a kyseliny citrónové, vakuové zabalení... Ošetřené vzorky byly umístěny do chladicího boxu a rychle zmrazeny tekutým dusíkem. Po dobu dalších pěti hodin byly dále chlazeny. Pro tání byly testovány dvě varianty. Jednou byl rychlý mikrovlnný ohřev, druhou postupné rozmraznutí ve vodní lázni [39].

Výsledky vyšly následovně:

- mikrovlnné ošetření bylo užito za účelem inaktivace enzymů a mikroorganismů. V porovnání s tepelným ošetřením má tento způsob řadu výhod, například kratší čas zákroku nebo rychlejší denaturace proteinů. Při užití nižšího výkonu (314 W) byla zachována barva šťávy a vnitřku plodu-světle zelená, která vydržela ještě dvě hodiny po rozmražení. Toto však platilo pouze pro dobu ošetření v mikrovlnné troubě do 3 minut

ohřevu. Po protažení časového intervalu ošetření nad 3 minuty se změnila barva plodu před mražením na tmavě žlutou. Tato barva vydržela pak také dvě hodiny po rozmražení. Při použití vyššího výkonu (446W) se barva změnila již po aplikování doby ohřevu více jak 0,5 minut. Toto zbarvení zůstalo stabilní ještě tři hodiny po rozmražení.

- ošetřující roztok siřičitanu sodného byl použit pro jeho schopnost stabilizovat barvu ovoce a zeleniny. Byly použity pouze nízké koncentrace vzhledem k nutnosti minimálních residuí v plodech. Byl hodnocen vzhled ovoce po 3,5 hodinách od rozmražení. Akceptována byla barva ovoce u plodů ošetřených nejvyšší použitou koncentrací, nižší koncentrace byly přijatelné pouze s výhradami.

- impregnace kyselinou citrónovou byla zkoušena pro možnou schopnost úchovy významných organoleptických látek. Byly užity různé koncentrace i různé doby máčení. Jako nejvhodnější doba se ukázal čas 5 minut louhování a nejpřijatelnější koncentrace byla 2,5%.

- byl také testován vliv vakua na vzhled ovoce. Čím vyšší stupeň vakua použili, tím prospěšnější byl vliv. Na druhou stranu se však vzhled začal lišit od běžného barevného profilu čerstvého ovoce. Nejvýhodněji proto vyšel pokus s vakuovou impregnací plodů v 2,0% kyselině citrónové pro zachování dobré barvy. Barva pak byla stabilní ještě 4 hodiny po rozmražení, kvalitativní a strukturní analýza je předmětem dalšího bádání.

- byl zkoušen i vliv rychlého mražení tekutým dusíkem na texturu plodů. Ovoce bylo napřed ošetřeno roztokem 2,5% kyseliny citrónové s 0,3% CaCl_2 nebo pouze 2,5% roztokem kyseliny citrónové. Vzorky byly po impregnaci zmrazeny tekutým dusíkem. Jako srovnávací materiál sloužily plody mražené pouze v mrazícím boxu. Analýza byla provedena s ovocem po 4 hodinách od vytažení z mrazícího zařízení. Ve všech případech došlo k podstatné změně textury plodů, převážně pak ke ztrátě tvrdosti. U rychle zmražených vzorků byly změny méně výrazné, zejména po ošetření impregnačním roztokem s CaCl_2 . Oddělování jednotlivých vrstev vnitřku plodů nebylo pozorováno.

- byl srovnáván také obsah chlorofylu A a B v plodech při užití jednotlivých mrazících technik. Ovoce bylo před mražením impregnováno roztokem 2,5% kyseliny citrónové s 0,3% CaCl_2 nebo pouze 2,5% roztokem kyseliny citrónové. Mražení bylo provedeno buď tekutým dusíkem nebo pouze za užití chladícího boxu. Obsah chlorofylů v ovoci mraženém klasicky klesl, v ovoci mraženém tekutým dusíkem vzrostl [39].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie a přístroje

Speciální a standardní chemikálie

Acetonitril ULC/MS (Biosolve, USA)

Agar (Himedia, ČR)

Folin-Ciocalteuovo činidlo (řa RNDr. Jan Kulich, Hradec Králové, ČR)

Kyselina askorbová (Sigma-Aldrich, ČR)

Metanol G CHROMASOLV (Sigma-Aldrich, ČR)

Nutrient Broth w/1% Peptone (Himedia, ČR)

Polyvinylpyrolidon (Sigma-Aldrich, ČR)

Triton X-100 (Serva, D)

2,6-dichlorindofenol (Serva, D)

4-metylkatechol (Sigma-Aldrich, ČR)

Ostatní použité chemikálie byly vesměs čistoty p.a. a byly získány od běžných distributorů.

Standardy

- (-)-epikatechin (Sigma-Aldrich, ČR)
- (-)-epikatechin gallat (Sigma-Aldrich, ČR)
- floridzin (Sigma-Aldrich, ČR)
- chlorogenová kyselina (Sigma-Aldrich, ČR)
- kaempferol (Fluka, ČR)
- (-)-katechin (Sigma-Aldrich, ČR)
- (-)-katechin gallat (Sigma-Aldrich, ČR)
- morin (Sigma-Aldrich, ČR)
- prokyanidin (Sigma-Aldrich, ČR)
- quercetin (Sigma-Aldrich, ČR)
- rutin (Sigma-Aldrich, ČR)

Kity

„Envirocheck Contact YM(R) kit“, Mercury Lab (Izrael)

„Ransod kit“, Randox Laboratories (USA)

„Total antioxidant status kit“, Randox Laboratories (USA)

Přístroje

Analytické váhy (AND HR-120)

Centrifuga (Hettich zentrifugen Mikro 200, D)

Centrifuga (Janetzki T23, Polsko)

Sestava HPLC (Ecom spol. s.r.o., ČR)

– Termostat - LCO 102 LONG

– Pumpa, programátor gradientu - Beta 10

- Detektor - LCD 2084
- Degaser - DG 3014

Inkubátor (LTE scientific, UK)

LC/PDA/ESI-MS soustava:

- Pumpa MS Pump Plus Finnigan SURVEYOR (Švýcarsko)
- Termostat LCO 101, Column Oven
- PDA Plus Detektor Finnigan SURVEYOR (Švýcarsko)
- Hmotnostní spektrometr LCQ Advantage MAY, Finnigan (USA):
elektrospray ionization (ESI)
ion trap (IT)
software Xcalibur

Mrazicí box (Samsung-Calex, ČR)

Mikroskop optický (Intraco micro, ČR)

Mixér tyčový (Braun, ČR)

Očkovací box (Bioair instruments)

Odšťavňovač (Rohnson, ČR)

Předvážky (Kern 440-43)

Spektrofometr Helios γ (Unicam, VB)

Spektrofotometr UV/VIS Helios α (Unicam, VB)

Trouba elektrická (Premed G-100/250, Polsko)

Třepačka (Labicom s.r.o. RS 10 basic, ČR)

Ultrazvuk (Powersonic PS 02000, SR)

Vakuová odparka (Ika labortechnik HB4 basic, D)

Počítačové programy

- Clarity (ovládání HPLC/UV-VIS)
- Excalibur (ovládání LC/MS, PDA)
- Lucía (ovládání optického mikroskopu)
- Vision (ovládání spektrofotometru Helios α)

Materiál

Měření bylo prováděno s broskvemi, švestkami, bílými hrozný a s červenými a zelenými jablky (Obr. 3). Část analýz byla uskutečněna i v borůvkách, jahodách, brusinkách a v malinách. Všechny vzorky byly nakoupeny v místním supermarketu bez znalosti délky skladování ve skladu, doby a podmínek sklizně. Broskve byly odrůdy Ruby Rich a pocházely z Itálie. Ze stejné země byly přivezeny i hrozny. Švestky byly vypěstovány v České republice. Jablka byly odrůd Golden Delicious a Idared, oboje pocházely z České republiky. Borůvky byly přivezeny z Chile, brusinky z USA, maliny ze Španělska a jahody z Maroka.

Pro srovnání naměřených hodnot byly zakoupeny komerčně mražené švestky nakrájené na půlky a vypeckované od výrobce Agrimex Vestec a.s. Další informace o složení případně povrchové impregnaci před mražením nebyly poskytnuty. Hodnoty získané z těchto plodů byly porovnávány s hodnotami z měřených vzorků švestek upravených do formy měsíčku bez a s impregnací.

Dále byla změřena komerčně mražená jahodová dřev také od výrobce Agrimex Vestec a.s. Zde bylo uvedeno složení: jahodový protlak min. 80%, cukr min. 10%, voda. Hodnoty

získané z měření této dřene byly taktéž porovnány s vlastními vzorky (jahodovou dřeni slazenou a neslazenou).



Obr. 3: Příklad měřených vzorků

3.2 Zpracování vzorku na jednotlivá stanovení

Před stanovením jednotlivých charakteristik bylo vždy nutné upravit vzorky do takové formy, která by vyhovovala požadovanému stanovení a současně by daný parametr byl stabilní. Zpracování záleželo hlavně na velikosti a struktuře plodu.

Každý vzorek byl nejprve zvážen. Část byla odebrána na stanovení sušiny. Dále byl odebrán podíl na stanovení vitamínu C titrační metodou. Z větších plodů (jablka, broskve) byly odkrojeny čtyři malé měsíčky, každý z jedné čtvrtiny plodu. Především se tak možným nesrovnalostem v různě zralých částech ovoce. U švestek byla užitá na toto měření vždy půlka plodu. U hroznů byl vybrán průměrný vzorek různě zralých kuliček, které byly následně zpracovány celé.

Další částí měření bylo stanovení nízkomolekulárních látek. Ty byly určovány ve šťávě. Reprezentativní část plodu ovoce (postup stejný jako u přípravy vzorku na stanovení vitamínu C) byla rozmělněna pomocí odšťavňovače. Jelikož nebyla získána čirá šťáva, musela být drť centrifugována na 12 000 ot./min po dobu 10 minut. Supernatant byl nalit do Eppendorfových zkumavek a rychle zmražen.

Dále bylo nutné zpracovat vzorky pro stanovení enzymů. Reprezentativní část ovoce byla rozmělněna v třecí misce s polyvinylpyrolidonem a Tritonem X-100. Pak následovalo rychlé zmražení tekutým dusíkem. Při tomto kroku bylo také dosaženo práškové konzistence směsi a důsledné homogenizace. Hmota byla převedena do zkumavek a uchována dále v mrazničce.

Jedním bodem analýzy bylo stanovení katechinů a flavonoidů pomocí HPLC s UV/VIS-detektorem. Byly vyzkoušeny kolony s různou náplní a také různé podmínky eluce. Účelem bylo zjištění nejvhodnějších podmínek pro stanovování katechinů a flavonoidů. U prvně zmiňovaných byla užívána čerstvá šťáva získaná stejným postupem jako u stanovení nízkomolekulárních antioxidantů (viz výše). Ta byla smíchána s mobilní fází a přímo nastříknuta na kolonu. Pro stanovení flavonoidů touto metodou byla použita reprezentativní část ovoce, která byla rozmačkána v kyselině chlorovodíkové za účelem hydrolyzy glykosidických vazeb. Po 20 minutách v chladu a temnu byla směs centrifugována na 10 000 ot./min po dobu deseti minut a filtrát byl extrahován etylacetátem. Extrakt byl odpařen na

vakuové odparce, suchý podíl byl rozpuštěn v metanolu. Takto upravený vzorek byl nastříknut na kolonu.

3.3 Skladování vzorků

Vzhledem k zadanému tématu byl zkoumán jak vliv různých teplot, tak vliv různého zpracování na aktivity enzymů a obsah nízkomolekulárních antioxidantů.

Z hlediska vlivu různých teplot skladování na obsah aktivních látek byly použity následující skladovací teploty:

- stabilní laboratorní teplota 18°C.
- skladování ve sklepě rodinného domu. Teplota a vlhkost se pohybovaly v závislosti na venkovní teplotě. Tento typ skladování simuloval běžné uchování ovoce spotřebiteli.
- uchování v chladničce při 5-8°C.
- skladování v mrazícím zařízení při teplotě -18°C.

U prvních třech byl pokus veden po dobu osmi týdnů. Odběr byl prováděn každý druhý týden. Výjimka nastala u jablek zelených a červených. U nich byly odběry prováděny každý týden po dobu sedmi týdnů (vyjma šestého).

Při uchování v mrazničce byl zkoumán i vliv různého zpracování. Bylo provedeno mražení:

- celých plodů bez úpravy pro obě odrůdy jablek, pro broskve, švestky, hrozny, borůvky, brusinky, maliny a jahody.
- celých plodů po impregnaci. V případě hroznů, borůvek, brusinek, malin a jahod se impregnační roztok skládal z 50% sacharózy. Doba naložení byla pět hodin [41].
- nakrájených měsíčků bez úpravy. Tento typ zpracování byl vybrán pro větší plody (jablka, švestky). Jablko bylo zbaveno jádřince, rozpůleno a každá půlka byla rozdělena na pět stejných měsíčků. Ty byly ještě příčně přepůleny. Švestky byly vypeckovány a rozděleny na čtyři měsíčky.
- nakrájených měsíčků s impregnací. Byly užity stejné druhy ovoce jako v předchozím bodě. Jablka byla ponořena na 30 minut do ošetřujícího roztoku, který se skládal z 37,9% glukózy; 15,2% sacharózy; 1% kyseliny askorbové; 0,25% chloridu vápenatého a 0,25% chloridu sodného. Švestky byly ponořeny na pět hodin v 50% roztoku sacharózy. [1, 41]
- dřeně bez přídavku sacharózy. Všechny druhy kromě broskví byly uchovány i v podobě dřeně. Plody byly nakrájeny, případně vypeckovány a rozmixovány na dřeň.
- dřeně s přídavkem sacharózy v množství 10 gramů sacharózy na 100 gramů dřeně.

Celé plody a měsíčky byly po opracování zabaleny do plastových uzavíratelných sáčků a vloženy do mrazničky. Dřeně byly uloženy v malých plastových kelímcích opatřených alobalovým víčkem a také vloženy do mrazničky. Tento test byl prováděn po dobu dvou měsíců, odběr byl veden v nultém, čtvrtém a osmém týdnu od zamražení.

Před vlastní analýzou bylo nutné vzorky pečlivě rozmrazit. Naskytla se otázka, kde při dlouhém rozmrazování nedojde k výrazným ztrátám aktivit některých enzymů, zvláště pak polyfenoloxidasy. Proto byl proveden test závislosti aktivit enzymů na délce rozmrazování (viz 4.1). Byla testována neslazená dřeň a neimpregnovaný měsíček, obojí od jablka zeleného. Byla měřena aktivita PPO, SOD a CAT po půl hodinovém tání při laboratorní teplotě, po 4 h tání při laboratorní teplotě a po 5,5 h tání při teplotě v chladničce.

3.4 Stanovení sušiny

Sušina byla stanovována u všech vzorků gravimetrickou metodou. Nejprve byla oddělena část ovoce k tomuto stanovení určená. Po nakrájení na menší kousky bylo ovoce zváženo a následně umístěno do sušárny. Při 60°C bylo sušeno po dobu čtyř hodin. Po usušení bylo ovoce vyjmuto, ochlazen na laboratorní teplotu a znovu zváženo. Obsah sušiny byl vztažen na gram jedlého podílu ovoce.

3.5 Stanovení celkové antioxidační aktivity

Celková antioxidační aktivita (ABTS) byla stanovena pomocí kitu TAS od firmy Randox. Kit obsahoval roztok pufru, roztok chromogenu a substrát se standardem v práškové formě.

Princip:

Principem bylo sledovat inhibici přeměny chromogenu pomocí substrátu. Substrát obsahoval radikály, které reagovaly s chromogenem, což se projevilo vzrůstem absorbance dané směsi. Čím vyšší byla absorbance, tím byl přidán vzorek menším antioxidantem, jelikož nebyl schopen dostatečně vychytat radikály působící na chromogen.

Forma vzorku:

Na stanovení celkové antioxidační aktivity byla užívána zamražená šťáva (viz kapitola 3.2).

Postup:

Nejprve byly převedeny práškové chemikálie do roztoku dle návodu od výrobce. Následně byla do zúžené kyvety pipetována tato množství roztoků a činidel:

	blank	standardní vzorek	vzorek ovoce
deionizovaná voda	10 μ l	8 μ l	8 μ l
standard	-	2 μ l	-
ovocná šťáva	-	-	2 μ l
chromogen	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml

Po napipetování blanku do kyvety byla měřena A_1 na spektrofotometru Helios γ proti vzduchu při $\lambda = 600$ nm. Pak bylo přidáno 100 μ l substrátu a po třech minutách od tohoto přídatku byla změřena A_2 . Stejně bylo postupováno i v případě standardního vzorku a vzorku ovoce.

Výpočet:

Hodnota celkové antioxidační aktivity byla spočítána podle následujících vzorců:

$$faktor = \frac{C_{s \text{ tan dardu}}}{(\Delta A_{blank} - \Delta A_{s \text{ tan dárního vzorku}}) \cdot 5}$$

$$ABTS = faktor \cdot (\Delta A_{blank} - \Delta A_{vzorku \text{ jablek}}) \cdot 5$$

ΔA bylo vypočítáno jako rozdíl $A_2 - A_1$ daného vzorku. Jelikož byly roztoky 5x ředěny deionizovanou vodou, bylo nutno provést korekci na toto ředění (uvedené vzorce jsou již ve finálním tvaru, tzn. se zahrnutím korekce). Výsledná hodnota pak byla přepočítána na obsah celkových antioxidantů v gramu jedlého podílu.

3.6 Stanovení nízkomolekulárních antioxidantů

Z celé široké skupiny těchto látek byly stanovovány následující parametry: obsah vitamínu C titračně, celkové polyfenoly a celkové flavonoidy spektrofotometricky a individuální fenolické látky chromatograficky.

3.6.1 Obsah vitamínu C

Princip:

Vitamin C reaguje s fialovým činidlem 2,6-dichlorindofenolem za vzniku lososově růžového roztoku. Obsah tohoto vitamínu ve vzorku se stanovuje titračně.

Forma vzorku:

Na toto stanovení byla použita malá část ovoce, která byla po odkrojení z celého plodu rozmačkána v 2% HCl. Směs byla zfiltrována, filtrát byl doplněn na objem 25 ml pomocí HCl.

Postup:

Nejprve byl připraven standard rozpuštěním 25 mg kyseliny askorbové v 25 ml 2% HCl. Z tohoto roztoku byl pipetován 1 ml do titrační baňky a titrován odměrným roztokem 0,5 mM 2,6-dichlorindifenuolu do lososově růžového zbarvení.

Následně byl stanoven obsah vitamínu C ve vzorku. Filtrát doplněný na objem 25 ml byl kvantitativně převeden do titrační baňky a následně titrován stejným činidlem.

Výpočet:

Výpočet byl proveden klasickou přímou úměrou, kdy bylo dosazeno do poměru množství činidla spotřebovaného na titraci standardu a množství činidla spotřebovaného na titraci vzorku. Výsledek byl přepočten na obsah vitamínu C v gramu jedlého podílu ovoce.

3.6.2 Celkové polyfenoly

Princip:

Vzorek reaguje se žlutým Folin–Ciocaltauovým činidlem. Změna zbarvení je sledována spektrofotometricky. Následně je tato změna porovnávána se změnou způsobenou standardním roztokem kyseliny gallové.

Forma vzorku:

Na stanovení celkových polyfenolů byla užívána zamražená šťáva (viz kapitola 3.2).

Postup:

Do zkumavky byl pipetován 1 ml Folin-Ciocaltauova činidla (desetkrát zředěného), 1 ml vody a 50 μ l vzorku ovoce. Směs byla důkladně promíchána. Po pěti minutách byl přidán 1 ml nasyceného roztoku Na_2CO_3 , směs ve zkumavce byla opět promíchána a ponechána 15 minut v klidu. Po inkubační době byla měřena absorbance na spektrofotometru Helios γ při $\lambda=750$ nm proti blanku (postup namíchání byl totožný s postupem přípravy vzorku, pouze místo ovocné šťávy bylo přidáno 50 μ l vody).

Výpočet:

Pro výpočet byla použita rovnice lineární regrese získaná z kalibrační křivky pro kyselinu gallovou. Byla získána koncentrace celkových polyfenolů v mililitru šťávy, která byla přepočtena na gram jedlého podílu.

3.6.3 Celkové flavonoidy

Princip:

Změna zabarvení roztoků vyvolaná přítomností flavonoidů ve vzorku je měřena spektrofotometriky a porovnána se změnou způsobenou standardním roztokem katecholu.

Forma vzorku:

Na stanovení celkových polyfenolů byla užívána zamražená šťáva (viz kapitola 3.2).

Postup:

Do zkumavky bylo pipetováno 0,5 ml ovocné šťávy, 1,5 ml vody a 0,2 ml 5% NaNO₂. Směs byla promíchána. Po pěti minutách bylo přidáno 0,2 ml 10% AlCl₃, směs byla zamíchána a nechala se v klidu stát 5 minut. Pak bylo přidáno 1,5 ml 1 M NaOH a 1 ml vody, roztok byl naposledy promíchán a po inkubační době 15 minut byla měřena absorbance na spektrofotometru Helios γ při $\lambda = 510$ nm proti fyziologickému roztoku.

Výpočet:

Pro výpočet byla použita rovnice lineární regrese získaná z kalibrační křivky pro katechol. Byla získána koncentrace celkových flavonoidů v mililitru šťávy, která musela být přepočtena na gram jedlého podílu.

3.7 Stanovení flavonoidů a katechinů pomocí HPLC

3.7.1 Výběr kolony a zpracování vzorku

První část pokusu (studium vlivu teploty skladování na obsah aktivních látek v plodech broskví, švestek a hroznů) byla provedena na koloně Biospher PSI 200 C 18 7 μ m (Labio a.s.), 4,6 x 150 mm. Současně byla používána příslušná předkolona, aby se zabránilo zničení kolony. Vlivem dlouhodobého používání však byla kolona přesto poškozena a nemohla být k druhé části pokusu (vliv způsobu zpracování vzorků jablek, švestek a hroznů s následnou úchovou v mrazničce na obsah biologicky aktivních látek) použita. Bylo tedy nutné zjistit, která z dalších dostupných kolon bude nejvhodnější.

K dispozici byly tyto kolony:

- Zorbax Eclipse XDB-C 18 (Agilent Technologies), 4,6 x 150 mm 5-Micron
- Kinetex 2,6 μ C 18 100A (Phenomenex), 4,6 x 150 mm
- Kinetex 2,6 μ HILIC 100A (Phenomenex), 4,6 x 150 mm.

Na všechny kolony byly nastříknuty reprezentativní testovací vzorky (jablka zelená, červená a hrozny), které byly zpracovány následovně:

- na stanovení flavonoidů byly vzorky připraveny dle optimalizovaných postupů v laboratoři (viz kapitola 3.2)
- na analýzu katechinů byl užit postup přípravy popsáný v kapitole 3.2
- byl také zkoušen vliv hydrolyzy při stanovení katechinů. Ovoce bylo nejdříve rozmačkáno v třecí misce s 1 M HCl a uloženo na 20 min do chladu a temna. Další postup zpracování se pak nelišil od běžného zpracování vzorku na katechiny (kap. 3.2). Podmínky eluce byly nastaveny jako při vlastním měření (viz kapitola 3.7.3 a 3.7.4).

Byla porovnáována kvalita dělení směsných katechinů a flavonoidů a také úroveň rozdělení a odezvy u katechinů zpracovaných se zahrnutím hydrolyzy nebo bez ní.

3.7.2 Ověření analýzy fenolických látek na LC/PDA/ESI-MS

Formu zpracování vzorků a užití izokratické eluce bylo také nutné ověřit na LC/PDA/ESI-MS (Thermo Scientific, USA). K analýze byly opět užita jablka zelená, červená a hrozny. Ovoce bylo zpracováno stejnými způsoby, jaké jsou popsány v předchozí kapitole.

Pro toto měření bylo optimalizováno složení mobilní fáze:

- měření katechinů: 1% vodný roztok kyseliny octové s metanolem v poměru 55:45.
- měření flavonoidů: 1% vodný roztok kyseliny octové s metanolem a s acetonitrilem v poměru 50:30:20.
- zjištění kvality separace při nastavení gradientové eluce: viz Tabulka 1.

Tabulka 1: Složení mobilní fáze v jednotlivých časových úsecích gradientové eluce

		časový úsek	mobilní fáze: 1% kyselina octová - acetonitril
1.	lineární gradient	3 min	60-57 % kyselina octové : 40-43 % acetonitrilu
2.	lineární gradient	20 min	57-55 % kyselina octové : 43-45 % acetonitrilu
3.	lineární gradient	10 min	55-45 % kyselina octové : 45-55 % acetonitrilu
4.	izokratický průtok	20 min	45 % kyselina octové : 55 % acetonitrilu

Pro měření byla použita kolona Zorbax Eclipse XDB-C 18 (Agilent Technologies), 4,6 x 150 mm 5-Micron

Hmotnostní analyzátor byl naladěn na epikatechin. Příslušný ion ($m/z = 291$) byl zjištěn v kladném módu. Parametry ladící metody byly následující:

- množství sušícího plynu: 40 arb
- napětí na kapiláře ESI: 5 kV
- teplota na vstupní kapiláře: 250°C
- napětí na vstupní kapiláře: 40 V

Podmínky eluce byly vedeny při 30°C izokraticky i gradientově. Průtok byl nastaven na 0,5 ml/min. Analýza trvala 53 minut.

Byl porovnáván účinek separace směšného vzorku při nastavené gradientové a izokratické eluci. Dále také vliv hydrolyzy na kvalitu dělení a obsah katechinů ve vzorku.

Na vyhodnocení a zpracování všech dat získaných z LC/PDA/ESI-MS byl použit software Excalibur.

3.7.3 Stanovení flavonoidů metodou HPLC/UV-VIS

Forma vzorku:

Na stanovení flavonoidů touto metodou byl používán etylacetátový extrakt, který byl po odpaření rozpouštědla rozpuštěn v 1 ml metanolu (bližší popis postupu viz kapitola 3.2). Vzorek byl dále přefiltrován přes mikrofiltr a centrifugován (10 000 ot./min po dobu 2 minut).

Používaná kolona:

- Pro první linii pokusu (vliv teploty na obsah biologicky aktivních látek v ovoci) byla použita kolona Biospher PSI 200 C 18 7 μ m (Labis a.s.), 4,6 x 150 mm.
- Pro druhou linii pokusu (vliv způsobu zpracování s následnou úchovou v mrazničce na obsah biologicky aktivních látek v ovoci) byla použita kolona Zorbax Eclipse XDB-C 18 (Agilent Technologies), 4,6 x 150 mm 5-Micron.

Podmínky eluce:

Eluce byla vedena izokraticky při teplotě 30°C. Průtok byl nastaven na 0,75 ml/min. Jako mobilní fáze sloužila směs metanolu/acetonnitrilu/okyselené vody v poměru 20/30/50. Detekce probíhala při $\lambda = 370$ nm.

Postup:

Vzorek byl vpraven do dávkovací smyčky pomocí Hamiltonovy injekční stříkačky. Byla používána dávkovací smyčka s objemem 20 μ l. Po otevření ventilu do polohy INJECT byla spuštěna analýza. Vzorek putoval s mobilní fází na kolonu, před kterou byla umístěna ještě příslušná předkolona. Jednotlivé rozdělené složky byly změřeny pomocí spektrofotometrického detektoru při $\lambda = 370$ nm.

Vyhodnocení:

Nejdříve byly zhotoveny kalibrační křivky jednotlivých standardů (viz kapitola 4.8.4). Dále byly určeny konkrétní flavonoidy na základě srovnání retenčních časů se standardními vzorky. Z plochy píku jednotlivých flavonoidů byla vypočítána jejich koncentrace ve vzorku (výpočtem z rovnice lineární regrese kalibračních křivek). Tato hodnota byla přepočítána na gram jedlého podílu ovoce. Na vyhodnocení a zpracování dat byl použit software Clarity.

3.7.4 Stanovení katechinů metodou HPLC/UV-VIS

Forma vzorku:

Na stanovení katechinů metodou HPLC/UV-VIS byla používána vymačkaná ovocná šťáva smíchaná se stejným množstvím mobilní fáze (bližší popis postupu viz kapitola 3.2). Vzorek byl dále přefiltrován přes mikrofiltr a centrifugován (10 000 ot./min po dobu 2 minut).

Používaná kolona:

- Pro první linii pokusu (vliv teploty na obsah biologicky aktivních látek v ovoci) byla použita kolona Biospher PSI 200 C 18 7 μ m (Labió a.s.), 4,6 x 150 mm.
- Pro druhou linii pokusu (vliv způsobu zpracování s následnou úchovou v mrazničce na obsah biologicky aktivních látek v ovoci) byla použita kolona Zorbax Eclipse XDB-C 18 (Agilent Technologies), 4,6 x 150 mm 5-Micron.

Podmínky eluce:

Eluce byla vedena izokraticky při teplotě 30°C. Průtok byl nastaven na 0,75 ml/min. Jako mobilní fáze sloužila směs metanolu/vody v poměru 45/55. Detekce probíhala při $\lambda = 280$ nm.

Postup:

Vzorek byl vpraven do dávkovací smyčky pomocí Hamiltonovy injekční stříkačky. Byla používána dávkovací smyčka s objemem 20 μ l. Po otevření ventilu do polohy INJECT byla spuštěna analýza. Vzorek putoval s mobilní fází na kolonu, před kterou byla umístěna ještě příslušná předkolona. Jednotlivé rozdělené složky byly změřeny pomocí spektrofotometrického detektoru při $\lambda = 280$ nm.

Vyhodnocení:

Nejdříve byly zhotoveny kalibrační křivky jednotlivých standardů (viz kapitola 4.8.4). Dále byly určeny konkrétní katechiny na základě srovnání retenčních časů se standardními vzorky. Z plochy píku jednotlivých katechinů byla vypočítána jejich koncentrace ve vzorku (výpočtem z rovnice lineární regrese kalibračních křivek). Tato hodnota byla přepočítána na gram jedlého podílu ovoce. Na vyhodnocení a zpracování dat byl použit software Clarity.

3.8 Stanovení antioxidačních enzymů

Byly stanovovány tyto čtyři enzymy: superoxidodismutasa (SOD), katalasa (CAT), lipoxygenasa (LOX) a polyfenoloxidas (PPO).

3.8.1 Stanovení SOD

Na stanovení SOD byl k dispozici kit Ransod od firmy Randox. Tato souprava se používá na stanovení SOD ve vzorcích krve při teplotě 37°C. Z opakovaných pokusů bylo zjištěno, že se tento kit dá použít i při laboratorní teplotě a na stanovení SOD ve vzorku ovoce. Navíc byla tato alternativa již testována na vzorcích ječného zrna [42].

Princip:

Xanthinoxidasa generuje z xanthinu superoxidový radikál, který reaguje s 2-(4-iodofenyl)-3-(4-nitrofenol)-5-fenyltetrazolium chloridem za vzniku červeně zbarveného roztoku formazanu. SOD vychytává vzniklé superoxidové radikály a brání tak tvorbě červeného komplexu.

Forma vzorku:

0,1 g dusíkem mraženého ovoce (podrobnější postup viz kapitola 3.2) bylo rozpuštěno v 1 ml fosfátového pufru. Směs byla centrifugována na 12 000 ot./min po dobu deseti minut. Na stanovení bylo použito 50 µl supernatantu.

Postup:

Nejprve byly převedeny práškové chemikálie z kitu do roztoku dle návodu od výrobce. Do kvety bylo pipetováno výše zmiňované množství vzorku a 1,7 ml substrátu [směs xanthinu a 2-(4-iodofenyl)-3-(4-nitrofenol)-5-fenyltetrazolium chloridu]. Obsah byl dobře promíchán a nakonec bylo přidáno 250 µl xanthinoxidasy. Byla změřena absorbance roztoku na spektrofotometru Helios γ při $\lambda = 505$ nm proti vzduchu po 30 sekundách (A_1) a pak po třech minutách (A_2) od přidavku enzymu.

Obdobně se postupovalo i v případě měření absorbance korekce na přítomnost rozpouštědla (S_1), pouze místo vzorku ovoce bylo do kvety pipetováno 50 µl rozpouštědla Ransod.

Výpočet:

Nejprve byla vypočtena procenta inhibice příslušející danému roztoku:

$$\Delta A_{\text{vzorku} / \text{min}} = \frac{A_2 - A_1}{3}$$
$$\Delta A_{S_1 / \text{min}} = \frac{A_2 - A_1}{3}$$
$$\% \text{ inhibice} = 100 - \frac{\Delta A_{\text{vzorku} / \text{min}} \cdot 100}{\Delta A_{S_1 / \text{min}}}$$

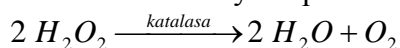
50% inhibice odpovídala jedné mezinárodní jednotce SOD. Přímou úměrou byla vypočítána aktivita SOD v mezinárodních jednotkách i v katelech v 0,1 g dusíkem mraženého ovoce. Tato hodnota byla přepočítána na aktivitu v mezinárodních jednotkách i v katelech v gramu jedlého podílu.

3.8.2 Stanovení katalasy

Na zjištění aktivity enzymu katalasy bylo vybráno spektrofotometrické stanovení pomocí peroxidu vodíku [4].

Princip:

Do roztoku peroxidu vodíku o známé koncentraci byl přidán vzorek obsahující enzym katalasu. Katalasa mění peroxid vodíku na vodu a kyslík podle následující reakce:



Byl měřen úbytek koncentrace peroxidu vodíku v roztoku v závislosti na čase.

Forma vzorku:

0,1 g dusíkem mraženého ovoce (podrobnější postup viz kapitola 3.2) bylo rozpuštěno v 1 ml fosfátového pufru. Směs byla centrifugována na 12 000 ot./min po dobu deseti minut. Na stanovení bylo použito 0,1 ml supernatantu.

Postup:

Do kyvety bylo pipetováno 2,9 ml fosfátového pufru (zjištění korekce na absorpci pufru) nebo roztoku peroxidu (zjištění vlastní aktivity CAT). Následně byl přidán 0,1 ml vzorku. Byla měřena absorbance po 1 minutě od přidavku enzymu na spektrofotometru Helios α při $\lambda = 240$ nm proti fosfátovému pufru.

Výpočet:

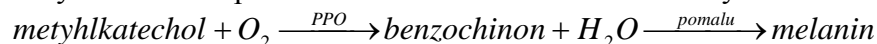
K výpočtu byl použit Lambert-Beerův zákon ($A = l \cdot c \cdot \varepsilon$), kde l byla tloušťka kyvety v centimetrech, c byla molární koncentrace v molech na litr a ε byl molární absorpční koeficient. Z absorbance byla vypočtena konečná koncentrace peroxidu po působení enzymu. Z rozdílu počáteční a konečné koncentrace peroxidu bylo vypočteno látkové množství přeměněného substrátu, z kterého byla zjištěna aktivita enzymu v připraveném roztoku. Přímou úměrou byla vypočtena aktivita náležící jednomu gramu jedlého podílu ovoce.

3.8.3 Stanovení PPO

Práce s tímto enzymem je značně náročná, jelikož rychle reaguje se vzdušným kyslíkem a oxiduje. Na jeho stanovení byla použita spektrofotometrická metoda po reakci s 4-metylkatecholem [43].

Princip:

Roztok metylkatecholu reaguje s kyslíkem a PPO za vzniku oranžového roztoku benzochinonu, který se následně pomalou reakcí s vodou mění na hnědý melanin:



Měří se spektrofotometricky změna koncentrace metylkatecholu.

Forma vzorku:

0,01 -0,1 g dusíkem mraženého ovoce (podrobnější postup viz kapitola 3.2) bylo rozpuštěno v 1 ml fosfátového pufru. Směs byla centrifugována na 12 000 ot./min po dobu deseti minut. Na stanovení byl použit 1 ml supernatantu.

Postup:

1 ml vzorku byl pipetován do kyvety s 2 ml metylkatecholu. Byla měřena absorbance roztoku na spektrofotometru Helios α při $\lambda = 400$ nm proti fosfátovému pufru po 30 sekundách (A_1) a po 2,5 minutách (A_2) od přidání enzymu (vzorku).

Výpočet:

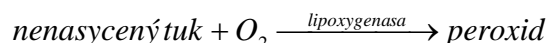
K výpočtu byl použit Lambert-Beerův zákon. Byl vypočítán rozdíl absorbance vzorku po 30 sekundách a po 2,5 minutách působení enzymu a od této hodnoty byl odečten rozdíl

absorbance methylkatecholu, jehož rozklad byl způsoben vzdušným kyslíkem (experimentálně změřeno). Ze získané hodnoty byla vypočtena za pomoci molárního absorpčního koeficientu koncentrace a následně látkové množství úbytku methylkatecholu. Z této hodnoty byla vyjádřena aktivita enzymu v mezinárodních jednotkách a v kataltech v jednom gramu jedlého podílu.

3.8.4 Stanovení LOX

Princip:

Lipoxygenasa je enzym, který katalyzuje oxidační změnu nenasyceného tuku na příslušný peroxid:



Spektrofotometricky byl měřen nárůst koncentrace peroxidu.

Forma vzorku:

0,1-0,5 g dusíkem mraženého ovoce (podrobnější postup viz kapitola 3.2) bylo rozpuštěno v 1 ml acetátového pufru. Směs byla centrifugována na 12 000 ot./min po dobu deseti minut. Na stanovení bylo použito 50 μ l supernatantu.

Postup:

Nejprve byly připraveny reakční roztoky: roztok kyseliny borité o pH=9 (A) a roztok kyseliny linolenové (B). Pak byla zhotovena směs (C) z 5 ml B a 30 ml A. Do kyvety bylo pipetováno 0,95 ml A, 2 ml C a 50 μ l vzorku. Byla měřena absorbance na spektrofotometru Helios α při $\lambda = 234$ nm ihned (A1) a po jedné minutě (A2) od přidavku enzymu (vzorku). Jako blank sloužila směs 1 ml A a 2 ml C.

Výpočet:

Nejprve byl vypočten rozdíl obou absorbancí (A2-A1). Tato hodnota byla dosazena do Lambert-Beerova zákona, ze kterého byla za pomoci molárního absorpčního koeficientu vyjádřena změna koncentrace kyseliny linolenové. Z této hodnoty byla zjištěna aktivita enzymu v mezinárodních jednotkách a v kataltech v jednom gramu jedlého podílu ovoce.

3.9 Kultivace mikroorganismů

Při pokusu zjištění vlivu teplot na aktivitu enzymů a obsah nízkomolekulárních látek došlo na měřených broskvích a švestkách (skladovaných v laboratoři a ve sklepě) k rychlému nárůstu plísně během prvních čtrnácti dní pokusu. Vzorky se tak staly pro další analýzu nepoužitelné. Byla proto udělána kultivace, mikroskopie a určení povrchové a vzdušné mikroflóry.

3.9.1 Kultivace plísní z ovoce

Kultivace probíhala na tuhém i na tekutém médiu. Byla připravena následující tekutá média:

- 2,4 g bramborového škrobu do 100 ml vody
- 2,5 g NB do 100 ml vody
- 2,5 g NB, 1 g glukosy do 100 ml vody.

Tuhá média měla stejná složení, jen ještě obsahovala 2 g agaru. Po sterilaci byla média s agarem nalita do Petriho misek v očkovacím boxu. Tekutá média zůstala v Erlenmayerových baňkách, ve kterých probíhala sterilace.

Nejprve bylo provedeno zaočkování tekutých živných médií. Z napadených broskví skladovaných v laboratoři a ve sklepě byly odebrány sterilními štětičkami reprezentativní vzorky plísní a vloženy do jednotlivých baněk s médiem. Kultivace probíhala při laboratorní teplotě na třepačce po dobu jednoho týden. Po rozmnožení a rozrostení bylo provedeno zaočkování tuhých médií 1 ml tohoto tekutého média s narostlou plísní. Tuhé agary byly kultivovány v termostatu při teplotě 28°C.

3.9.2 Kultivace vzdušné mikroflóry

Pro zjištění, zda byla plíseň zavlečena na ovoce již v obchodní síti nebo až při manipulaci během pokusu, byla provedena kultivace vzdušné mikroflóry v místech skladování ovoce. Byla připravena tuhá média se stejným složením jako v bodě 3.9.1. Po nalití do Petriho misek a vychladnutí, byly misky ponechány 48 hodin otevřené poblíž místa, kde bylo předtím umístěno ovoce pro analýzu (jmenovitě v laboratoři, ve sklepě a v lednici). Po uplynutí této inkubační doby byly misky zavřeny a inkubovány v termostatu při teplotě 28°C po dobu jednoho týdne.

3.9.3 Zjištění povrchové mikroflóry

Dále byla zkoumána vlastní přirozená povrchová mikroflóra ovocných vzorků (broskví a švestek). Byly použity plody skladované jak v laboratoři tak ve sklepě i v lednici. Na stanovení byl použit Envirochech Contact YM(R) kit pro zjištění bakterií, kvasinek a plísní.

Postup:

Plod ovoce byl uchopen ve sterilní rukavici do dvou prstů. Pak byla vyjmuta kontaktní část kitu pro stanovení bakterií ze zkumavky (malý umělohmotný plátek, který z obou stran obsahoval kultivační médium). Obě strany plátku byly přitisknuty jemně ale důkladně na povrch plodu. Nakonec byla kontaktní část opět vrácena do zkumavky. Stejným postupem bylo provedeno sejmutí povrchové mikroflóry pro stanovení kvasinek a plísní.

Po zaočkování byly zkumavky s plátky umístěny do inkubátoru. V případě bakterií byla teplota nastavena na 35°C, v případě kvasinek a plísní na 28°C.

Vyhodnocení:

Kit na stanovení bakterií byl vyhodnocován po 24 h a 48 h od zaočkování. Kit na stanovení kvasinek a plísní byl odečítán po 24 h, 48 h a 6 dnech od naočkování. Zjištěné hodnoty byly v jednotkách KBE/cm² (kolonie tvořící jednotku na cm²).

3.9.4 Mikroskopie plísní

Po kultivaci plísní byl proveden morfologický popis vzhledu kolonií na tuhých médiích a také mikroskopie pomocí optického mikroskopu. Byly mikroskopovány všechny vzorky z tuhých médií (kultivované plísně z ovoce, kultivované plísně pro zjištění vzdušné mikroflóry). Byly pořízeny fotografie mikroskopické struktury za využití programu Lucia Image.

4 VÝSLEDKY

V rámci předložené práce byly prováděny dva dlouhodobé uchovávací pokusy.

V první sérii experimentů byl zkoumán vliv různých skladovacích teplot na změny obsahu biologicky aktivních látek v ovoci. Jako materiál byly užity jablka červená a zelená (sledovány pouze enzymové antioxidanty), broskve, švestky a hrozny (sledovány enzymové i neenzymové antioxidanty). Plody byly uloženy po dobu osmi týdnů v laboratoři s kontrolovanou teplotou, ve sklepě a v lednici. Dále byly uchovány v mrazničce po dobu 17. týdnů ve formě celých povrchově neošetřených plodů (Obr. 4).



Obr. 4: Broskve mražená ve formě celého plodu po rozmrznutí a nakrojení

Ve druhé sérii pokusů byl zkoumán vliv zpracování a ošetření ovoce, které pak bylo uloženo do mrazničky, na obsah biologicky aktivních látek. Test byl proveden s těmito plody: jablka červená a zelená, švestky a hrozny (stanoveny enzymové i neenzymové antioxidanty). Částečně byly stanoveny i borůvky, brusinky, maliny a jahody (měřeny pouze enzymové antioxidanty). Ovoce bylo v mrazničce uchováváno po dobu 8. týdnů. Jako formy zpracování byly voleny: nepracované celé plody, impregnované celé plody, měsíčky, impregnované měsíčky, dřev a proslazená dřev (podrobnější popis viz kapitola 3.3).

Při skladování broskví, švestek a hroznů v laboratoři a ve sklepě došlo k nepředpokládanému rychlému zplsnivění plodů (viz Obr. 5). Broskve v laboratoři a ve sklepě vydržely 14 dní, švestky 4 týdny a hrozny v laboratoři 4 týdny a ve sklepě 6 týdnů. V okamžiku napadení plodu plísní byla inkubace vždy ukončena. Byla provedena také kultivace a mikroskopie plísní z ovoce, dále stanovení povrchové a vzdušné mikroflóry.



Obr. 5: Plísňí napadené broskve uložené v laboratoři druhý týden od zahájení pokusu

4.1 Zpracování biologického materiálu (vzorků pro 2. studii)

Vzorky v této sérii pokusu byly uchovány v mrazničce. Při stanovení sledovaných látek však bylo nutné pracovat s rozmraženou matricí. Délka a způsob tání mají podstatný vliv na obsahy jednotlivých analyzovaných látek, zvláště pak na aktivity měřených enzymů. Tento proces musel být tudíž optimalizován se zaměřením na co nejmenší ztráty aktivit měřených enzymů.

Na pokus byla použita dřevň nesladká a měsíček bez impregnace, obojí od jablka zeleného.

- vzorky byly ponechány při laboratorní teplotě dokud nedošlo k viditelnému rozmrazení (přibližně půl hodiny dle velikosti vzorku, Obr. 6).



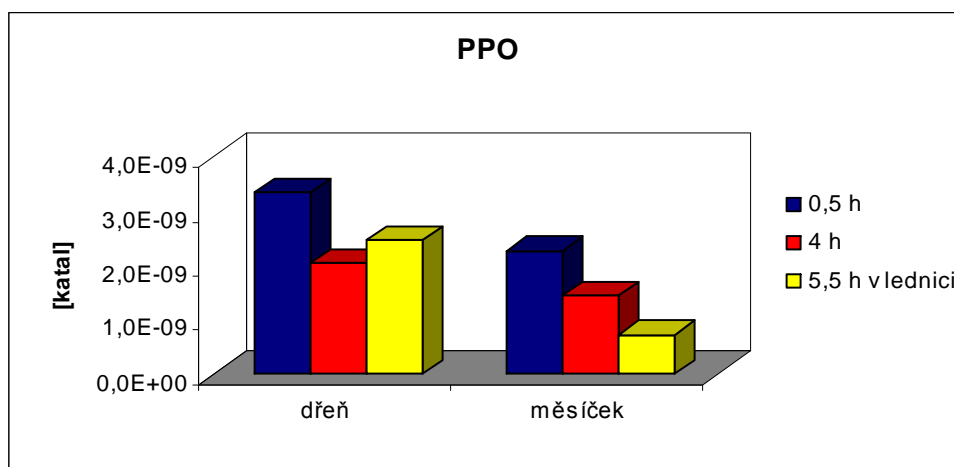
Obr. 6: Vzorky po půl hodině od vyjmutí z mrazničky

- vzorky byly ponechány čtyři hodiny při laboratorní teplotě.
- vzorky byly uloženy po vyjmutí z mrazničky do ledničky a tam ponechány pět a půl hodiny (Obr.7).

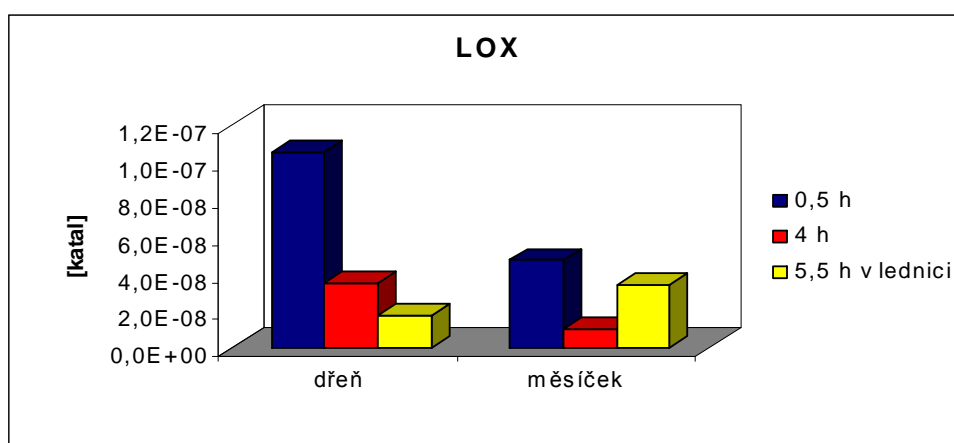


Obr. 7: Vzorky po 5,5 h od vyjmutí z mrazničky

V následujících dvou grafech jsou příklady závislosti aktivity PPO (Graf 1) a aktivity LOX (Graf 2) na podmínkách a délce rozmrazování.



Graf 1: Srovnání aktivit PPO v jablečné dřeni a v měsíčku jablka v závislosti na podmínkách rozmrazování



Graf 2: Srovnání aktivit LOX v jablečné dřeni a v měsíčku jablka v závislosti na podmínkách rozmrazování

Jako nejlepší postup rozmrazování z hlediska zachování aktivit enzymů bylo vyhodnoceno tání zmrzlé matrice po dobu cca půl hodiny při laboratorní teplotě (ten byl také dále užíván při měření experimentálních dat). U dalších dvou zbývajících postupů nelze jednoznačně říci, který zachovával vyšší aktivity enzymů. Objevily se odlišnosti v závislosti na formě zpracování plodu a druhu enzymu.

4.2 Stanovení sušiny v plodech

Sušina byla stanovena gravimetricky a výsledky byly vyjádřeny jako gram vztažený na gram jedlého podílu ovoce.

4.2.1 Výsledky studie 1 - Vliv různých skladovacích teplot na hodnotu sušiny

Změny obsahu sušiny a dalších enzymových i neenzymových antioxidantů v závislosti na teplotě uchovávání byly sledovány u 3 druhů ovoce (švestky, hrozny, broskve) uchovávaných při 3 různých teplotách (laboratoř, sklep, lednice) a orientačně i zmražením celých plodů. V dalším textu jsou srovnány výsledky sušiny plodů v rámci 1. studie.

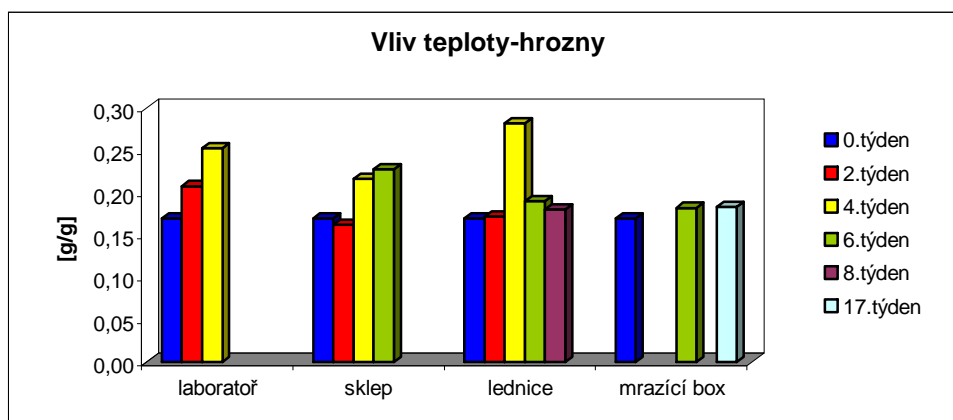
Tabulka 2: Naměřené hodnoty obsahu sušiny na gram jedlého podílu v ovoci skladovaném při různých teplotách

ovoce	místo skladování	obsah sušiny [g/g]					
		0. týden	2. týden	4. týden	6. týden	8. týden	17. týden
broskve	laboratoř	0,1559	0,1428	-	-	-	
	sklep		0,1446	-	-	-	
	lednice		0,1340	0,5644	0,1845	0,2681	
	mrazicí box				0,1685		0,1469
hrozny	laboratoř	0,1698	0,2077	0,2529	-	-	
	sklep		0,1622	0,2166	0,2275	-	
	lednice		0,1719	0,2820	0,1898	0,1802	
	mrazicí box				0,1821		0,1835
švestky	laboratoř	0,1365	0,1089	0,1394	-	-	
	sklep		0,0908	0,1141	-	-	
	lednice		0,1114	0,2693	0,1630	0,1096	
	mrazicí box				0,1481		0,1017

Při skladování ovoce v laboratoři a ve sklepě kolísal obsah sušiny kolem střední hodnoty u broskví a švestek, u hroznů byl zaznamenán mírný nárůst.

Při uložení plodů v lednici byl zjištěn velký vzrůst obsahu sušiny ve čtvrtém týdnu skladování. To mohlo být způsobeno nastartováním obraného mechanismu (zvýšení osmotického tlaku v tkáních) na prodloužení údržnosti, nebo také chybou měření. Další vývoj při této teplotě měl u broskví vzrůstající tendenci, u švestek a hroznů obsah sušiny kolísal kolem střední.

V mrazničce hodnota sušiny u broskví a hroznů kolísala, u švestek v posledním týdnu mírně poklesla.



Graf 3: Vliv různých skladovacích teplot na obsah sušiny v hroznech

Ze získaných výsledků je patrné, že u větších plodů byla hodnota sušiny po dobu uchovávání relativně stabilní ve všech prostředích a představovala přibližně 15 % hmotnosti plodů. U hroznů byl obsah sušiny poněkud vyšší a významně se lišily změny v závislosti na teplotě uchovávání – zatímco v laboratoři vzrostly hodnoty sušiny za 4 týdny až na cca 25%, v chladnějším prostředí a v mrazničce byly hodnoty v podstatě stabilní a nelišily se příliš od výchozí hodnoty. Toto zjištění má kromě praktického významu i další využití: pokud nedochází k významným změnám sušiny v rámci dlouhodobé studie, není třeba korigovat hodnoty parametrů zjištěné v gramu jedlého podílu na gram sušiny z hlediska případné odlišné interpretace výsledků.

4.2.2 Výsledky studie 2 - Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na obsah sušiny

Obsah sušiny byl sledován i ve druhé sérii experimentů zaměřených na sledování změn v ovoci v průběhu uchovávání mražením s různým způsobem opracování vzorku. Test byl proveden s 3 druhy ovoce: jablka červená a zelená, švestky a hrozny. Ovoce bylo v mrazničce uchováno po dobu 8. týdnů. Jako formy zpracování byly voleny: neopracované celé plody, impregnované celé plody, měsíčky, impregnované měsíčky, dřeň a proslazená dřeň (kap. 3.3). V dalším textu jsou srovnány výsledky sušiny plodů v rámci 2. studie

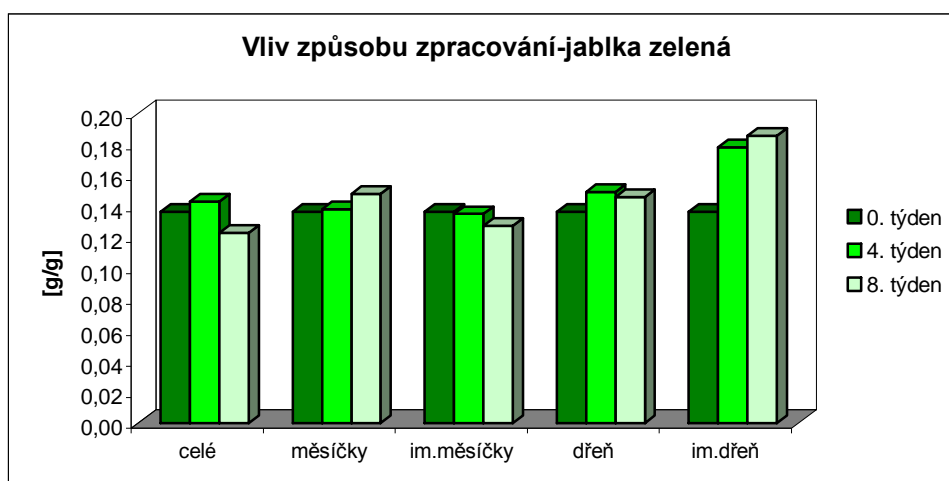
U jablek zelených a červených obsah sušiny kolísá kolem střední hodnoty u všech forem zpracování kromě proslazených dření. V nich byl zaznamenán nárůst obsahu sušiny na gram jedlého podílu jablka.

V hroznech a švestkách byl naměřen vzrůst obsahu sušiny. Mírná odchylka nastala u hroznové neslazené dřeni a švestkové slazené dřeni. Zde hodnota v osmém týdnu mírně poklesla oproti hodnotě naměřené v týdnu čtvrtém, stále však byla vyšší než hodnota prvního měření.

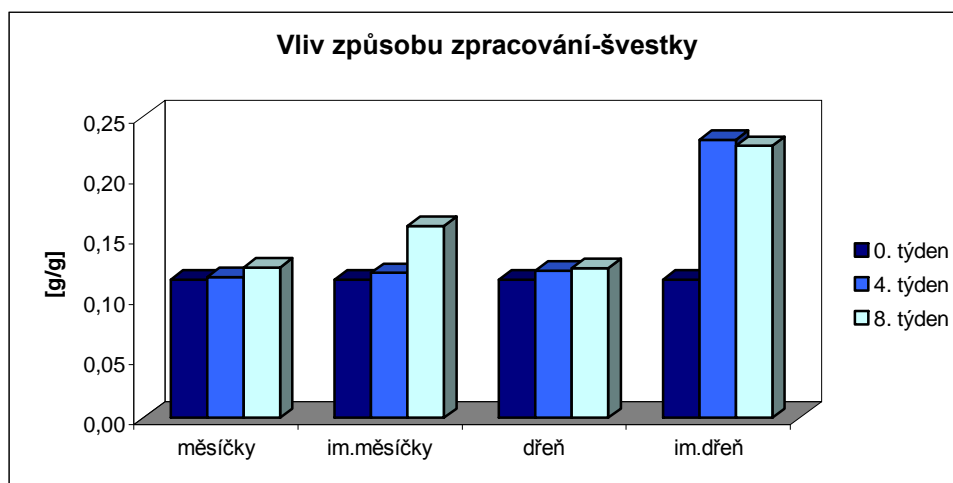
Hodnoty jsou přehledně shrnuty viz Tabulka 3. Jako příklad jsou níže uvedeny grafy závislosti obsahu sušiny na čase v jablkách zelených a ve švestkách.

Tabulka 3: Naměřené hodnoty obsahu sušiny na gram jedlého podílu v různě zpracovaném ovoci uchovaném v mrazničce

ovoce	forma zpracování	obsah sušiny [g/g]		
		0. týden	4. týden	8. týden
jablka zelená	celé plody	0,1363	0,1428	0,1226
	měsíčky		0,1378	0,1478
	impregnované měsíčky		0,1348	0,1273
	dřeň		0,1490	0,1456
	proslazená dřeň		0,1778	0,1853
jablka červená	celé plody	0,1520	0,1231	0,1441
	měsíčky		0,1390	0,1448
	impregnované měsíčky		0,1764	0,1443
	dřeň		0,1372	0,1395
	proslazená dřeň		0,2181	0,2250
hrozny	celé plody	0,1148	0,1168	0,1248
	impregnované celé plody		0,1202	0,1592
	dřeň		0,1219	0,1242
	proslazená dřeň		0,2305	0,2256
švestky	měsíčky	0,0706	0,0816	0,0986
	impregnované měsíčky		0,1360	0,1421
	dřeň		0,0875	0,0802
	proslazená dřeň		0,1534	0,1706



Graf 4: Vliv různého způsobu zpracování s následným mražením na obsah sušiny v zelených jablkách



Graf 5: Vliv různého způsobu zpracování s následným mražením na obsah sušiny ve švestkách

Pro porovnání byl také změřen obsah sušiny v komerčně mražených švestkách (0,1532 g/g). To by naznačovalo, že se jedná o mražené půlky ošetřené impregnačním roztokem, i když na obale nebyl takovýto způsob opracování uveden.

Ani v průběhu druhé série experimentů nebyly zjištěny významné odchylky v hodnotách sušiny v průběhu uchovávání, zjištěné rozdíly pravděpodobně neovlivní interpretaci výsledků analýzy antioxidantů.

4.3 Stanovení celkové antioxidační aktivity

Postupem uvedeným v kapitole 3.5 byla provedena analýza celkové antioxidační aktivity ve všech vzorcích v rámci obou studií pomocí kitu TAS od firmy Randox. Výsledky byly přepočítány na μmol na gram jedlého podílu ovoce.

4.3.1 Výsledky studie 1 - Vliv různých skladovacích teplot na hodnotu TAS

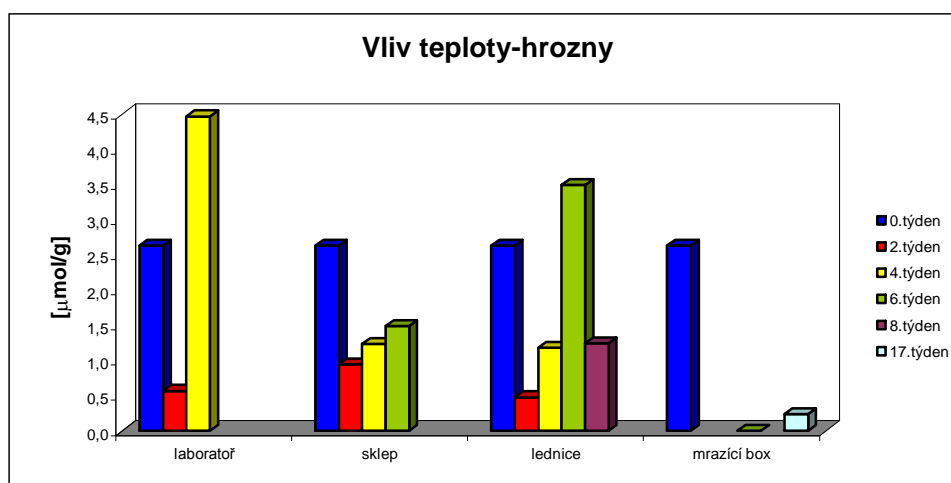
Hodnoty celkové antioxidační aktivity v závislosti na teplotě uchovávání byly sledovány u 3 druhů ovoce (švestky, hrozny, broskve) uchovávaných při 3 různých teplotách (laboratoř, sklep, lednice) a orientačně i zmražením celých plodů. Na stanovení byla použita vylisovaná ovocná šťáva. V dalším textu jsou srovnány výsledky ABTS v plodech v rámci 1. studie.

Ze vzorků skladovaných v lednici je patrné, že celková antioxidační aktivita vykazuje v závislosti na čase sinusovou křivku. U ostatních skladovacích teplot to není tak zřejmé, protože vzorky nevydržely v použitelném stavu tak dlouhou dobu. Oproti hodnotě naměřené při započetí analýzy nastal v druhém týdnu měření prudký pokles aktivity. Následně byl pozorován opětovný nárůst ABTS (kromě mražených švestek, kde pokles pokračoval), hodnoty však až na výjimky nepřesáhly hodnotu z nultého týdne (viz. Tabulka 4, Graf 6).

Tabulka 4: : Naměřené hodnoty ABTS na gram jedlého podílu v ovoci skladovaném při různých teplotách

ovoce	místo skladování	ABTS [$\mu\text{mol/g}$]					
		0. týden	2. týden	4. týden	6. týden	8. týden	17. týden
broskve	laboratoř	0,6785	0,2935	-	-	-	
	sklep		0,1677	-	-	-	
	lednice		0,1328	0,3278	1,4930	0,2811	
	mrazicí box				*		0,4844
hrozny	laboratoř	2,6385	0,5689	4,4767	-	-	
	sklep		0,9482	1,2350	1,4907	-	
	lednice		0,4768	1,1835	3,5000	1,2475	
	mrazicí box				*		0,2356
švestky	laboratoř	5,1084	0,4898	1,2097	-	-	
	sklep		1,9591	1,0863	-	-	
	lednice		1,1751	1,6047	4,3484	1,5043	
	mrazicí box				2,8883		1,1050

Pozn.: * pod dolní detekční hranicí kitu TAS



Graf 6: Vliv různých skladovacích teplot na celkovou antioxidační aktivitu hroznů v závislosti na čase

Výše zmiňovaný pokles v druhém týdnu mohl nastat vlivem manipulace s plody (operace při zakládání analýzy, teplotní šok při změně skladování), případně také chybou měření. Proto je možno z celkového pohledu říci, že hodnota ABTS v závislosti na čase spíše roste.

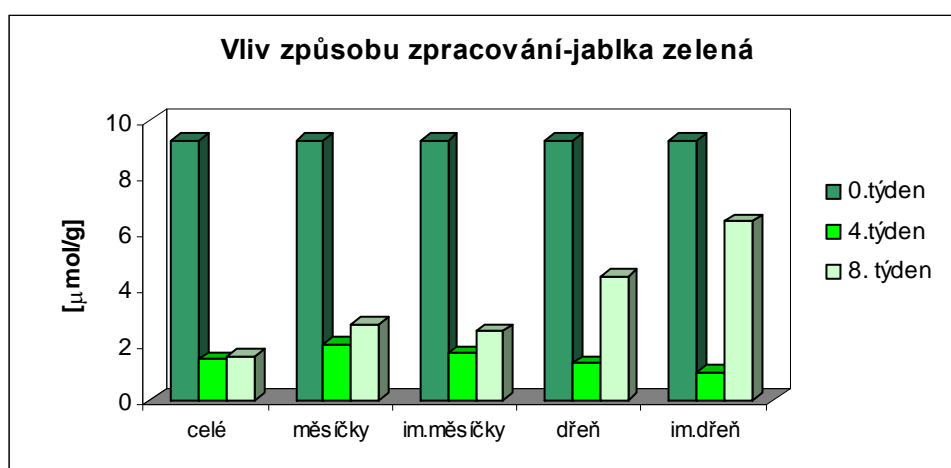
4.3.2 Výsledky studie 2 - Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na hodnoty TAS

Hodnota ABTS byla sledována i ve druhé sérii experimentů zaměřených na sledování změn v ovoci v průběhu uchovávání mražením s různým způsobem opracování vzorku. Test byl proveden s 3 druhy ovoce: jablka červená a zelená, švestky a hrozny. Ovoce bylo v mrazničce uchováno po dobu 8. týdnů. Jako formy zpracování byly voleny: neopracované

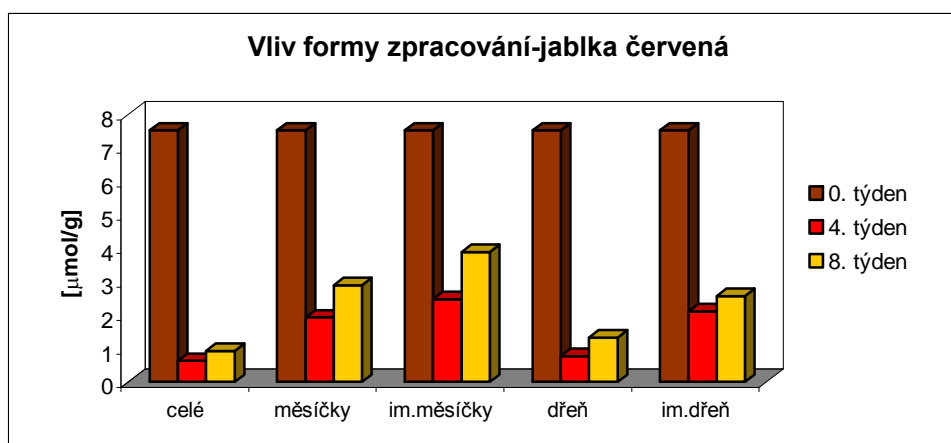
celé plody, impregnované celé plody, měsíčky, impregnované měsíčky, dřeň a proslazená dřeň (kap. 3.3). Na stanovení ABTS byla vždy použita vylisovaná ovocná šťáva získaná z rozmrazených vzorků. V dalším textu jsou srovnány naměřené výsledky ABTS v plodech v rámci 2.studie.

Z naměřených hodnot u všech druhů ovoce a u všech forem opracování vyplývá sinusová závislost jako u výše zmiňovaného pokusu.

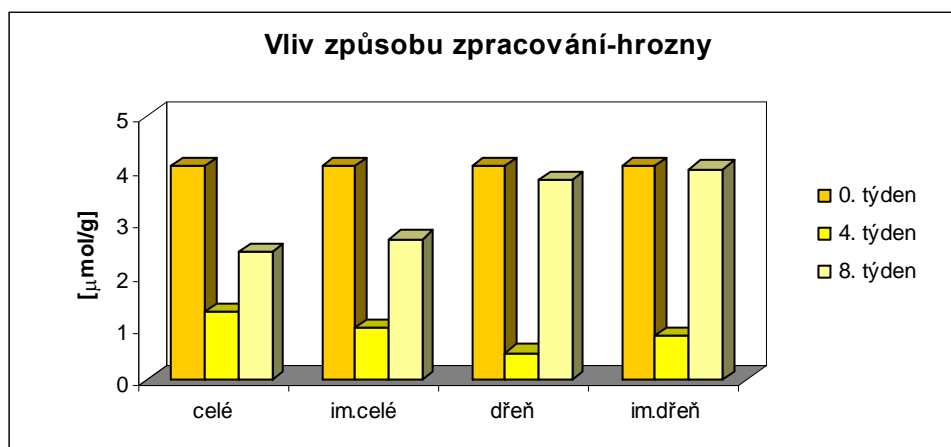
Také zde byl pozorován výrazný pokles aktivit u druhého měření. Žádná hodnota naměřená v osmém týdnu nepřesáhla hodnotu ABTS naměřenou v týdnu nultém. U jablek a švestek se projevila výrazný pokles celkové antioxidační aktivity (nízké hodnoty ve 4. a 8. týdnu), u hroznů se hodnota zjištěná v osmém týdnu blížila hodnotám naměřeným při započítání pokusu. Všechna naměřená data jsou shrnuta viz Tabulka 5. Grafy pro jednotlivé druhy ovoce měřené v této linii pokusu jsou uvedeny před tabulkou.



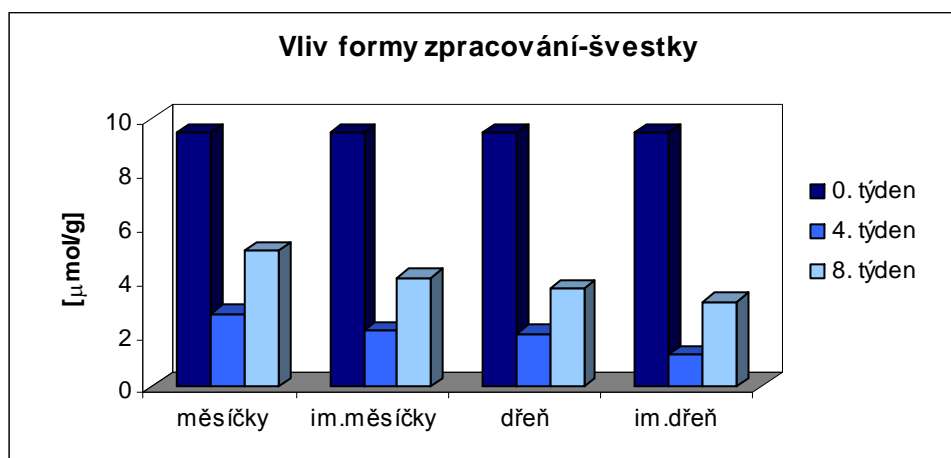
Graf 7: Vliv různého způsobu zpracování na celkovou antioxidační aktivitu v zelených jablkách v závislosti na čase



Graf 8: Vliv různého způsobu zpracování na celkovou antioxidační aktivitu v červených jablkách v závislosti na čase



Graf 9: Vliv různé formy zpracování na celkovou antioxidační aktivitu v hroznech v závislosti na čase



Graf 10: Vliv různé formy zpracování na celkovou antioxidační aktivitu ve švestkách v závislosti na čase

Tabulka 5: Naměřené hodnoty ABTS na gram jedlého podílu v různě zpracovaném ovoci, které bylo následně zmrazeno – 1. část

ovoce	forma zpracování	ABTS [$\mu\text{mol/g}$]		
		0. týden	4. týden	8. týden
jablka zelená	celé plody	9,2845	1,4726	1,5932
	měsíčky		1,9950	2,7022
	impregnované měsíčky		1,6824	2,4787
	dřeň		1,3245	4,4237
	proslazená dřeň		0,9967	6,3920

Tabulka 5: Naměřené hodnoty ABTS na gram jedlého podílu v různě zpracovaném ovoci, které bylo následně zmrazeno –2. část

ovoce	forma zpracování	ABTS [$\mu\text{mol/g}$]		
		0. týden	4. týden	8. týden
jablka červená	celé plody	7,5195	0,6293	0,9250
	měsíčky		1,9336	2,8945
	impregnované měsíčky		2,4715	3,8898
	dřeň		0,7757	1,3326
	proslazená dřeň		2,1139	2,5683
hrozny	celé plody	4,0576	1,2893	2,4206
	impregnované celé plody		0,9983	2,6676
	dřeň		0,5152	3,7770
	proslazená dřeň		0,8373	3,9954
švestky	měsíčky	9,4797	2,7362	5,0799
	impregnované měsíčky		2,0832	4,0573
	dřeň		1,9762	3,6463
	proslazená dřeň		1,2181	3,1827

Je možné říci, že vlivem zmrazení plodu dochází k výraznému poklesu ABTS oproti čerstvým vzorkům. Při dalším uchovávání v mrazničce celková antioxidační hodnota narůstá. Dále se zdá, že má impregnace pozitivní vliv, a to jak po stránce zmírnění zmiňovaného poklesu, tak i při dalším vývoji (vzrůstu ABTS). Tento jev je nejlépe viditelný u hroznů, speciálně u dřeni. Velký pokles ABTS je pozorovatelný hlavně u plodů, které byly zdlouhavě zpracovávány (jablka a švestky krájením), zatímco hrozny, s nimiž se manipulovalo minimálně, zachovávají podstatně vyšší podíl v hodnotě ABTS.

Byla také změřena hodnota celkové antioxidační aktivity v komerčně mražených půlkách švestek (6,5554 $\mu\text{mol/g}$). Tato hodnota je blíže hodnotě zjištěné u švestkových čtvrtek bez impregnace. Není však jisté, jak dlouho jsou ony komerční švestky zmrazeny. Není tedy stále vyloučeno, že by nebyly impregnovány.

Poněvadž byly všechny hodnoty ABTS měřeny jen jednou (z důvodu vysoké ceny soupravy), mohou být zatíženy větší chybou než hodnoty ostatních parametrů, které byly analyzovány opakovaně.

4.4 Obsah vitamínu C

Vitamin C byl měřen titračně dle postupu uvedeného v odstavci 3.6.1. Zjištěná spotřeba titračního činidla (2,6-dichlorindofenolu) byla porovnána se spotřebou činidla na titraci známého množství standardu (kyseliny askorbové). Zjištěné hodnoty byly přepočítány na gram jedlého podílu ovoce.

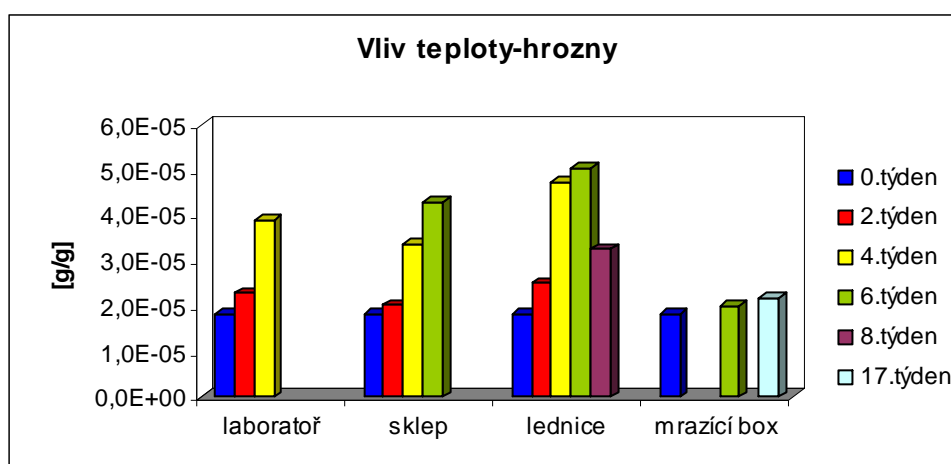
4.4.1 Výsledky studie 1 - Vliv různých skladovacích teplot na obsah vitamínu C

Hodnoty vitamínu C v ovoci zjištěné touto metodou v závislosti na teplotě uchovávání byly sledovány u 3 druhů ovoce uchovávaných při 3 různých teplotách (laboratoř, sklep, lednice). Pro toto měření byl použit malý podíl ovoce, který byl po zpracování z HCl titrován odměrným roztokem. V dalším textu jsou srovnány hodnoty vitamínu C v plodech v rámci 1. studie.

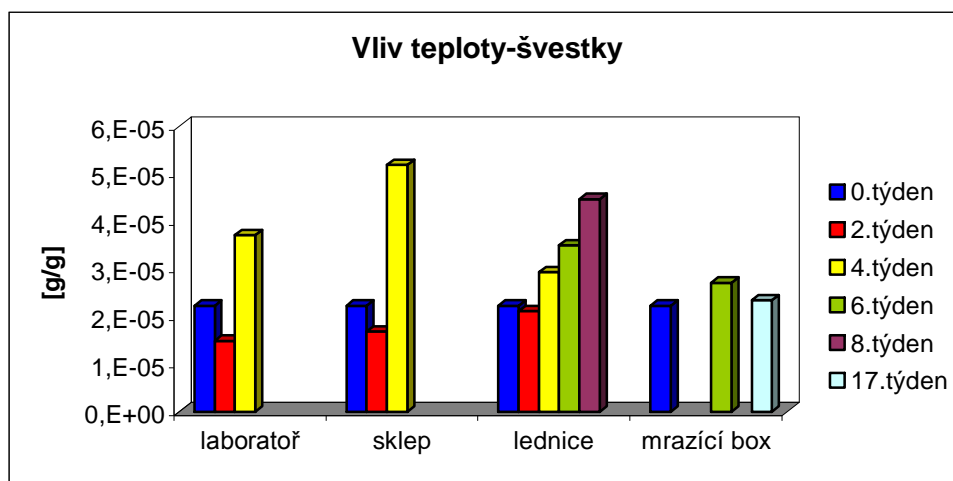
V Tabulka 6 jsou vypsána všechna vypočtená data závislosti hodnot vitamínu C na čase při skladování ovoce v různých teplotních režimech. Graficky je tato závislost ukázána na hroznech a švestkách (Graf 11, Graf 12).

Tabulka 6: Naměřené hodnoty vitamínu C na gram jedlého podílu v ovoci skladovaném při různých teplotách

ovoce	místo skladování	Vitamin C [g/g]					
		0. týden	2. týden	4. týden	6. týden	8. týden	17. týden
broskve	laboratoř	3,79E-05	2,57E-05	-	-	-	
	sklep		2,46E-05	-	-	-	
	lednice		2,07E-05	2,13E-05	2,62E-05	1,87E-05	
	mrazicí box				2,43E-05		1,30E-05
hrozny	laboratoř	1,82E-05	2,30E-05	3,91E-05	-	-	
	sklep		2,04E-05	3,37E-05	4,30E-05	-	
	lednice		2,52E-05	4,74E-05	5,04E-05	3,26E-05	
	mrazicí box				2,01E-05		2,19E-05
švestky	laboratoř	2,23E-05	1,49E-05	3,71E-05	-	-	
	sklep		1,68E-05	5,19E-05	-	-	
	lednice		2,11E-05	2,94E-05	3,49E-05	4,47E-05	
	mrazicí box				2,71E-05		2,34E-05



Graf 11: Vliv různých skladovacích teplot na hodnoty vitamínu C v hroznech v závislosti na čase



Graf 12: Vliv různých skladovacích teplot na hodnoty vitamínu C ve švestkách v závislosti na čase

Z průběhu změn hodnot kyseliny askorbové je patrné, že ve většině prostředí jeví s rostoucí dobou uchovávání spíše mírně vzrůstající trend, podobně jako hodnoty celkové antioxidační aktivity. Jde zřejmě o změny v plodech spojené s procesem dozrávání a stárnutí.

4.4.2 Výsledky studie 2 - Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na obsah vitamínu C

Hodnota vitamínu C byla sledována i ve druhé sérii experimentů zaměřených na sledování změn v ovoci v průběhu uchovávání mražením s různým způsobem opracování vzorku. Test byl proveden s 3 druhy ovoce: jablka červená a zelená, švestky a hrozny. Pro toto měření byl použit malý podíl ovoce (případně menší množství dřevě), který byl po zpracování z HCl titrován odměrným roztokem. V dalším textu jsou srovnány naměřené hodnoty vitamínu C v plodech v rámci 2. studie. Zjištěné výsledky jsou přehledně shrnuty viz Tabulka 7.

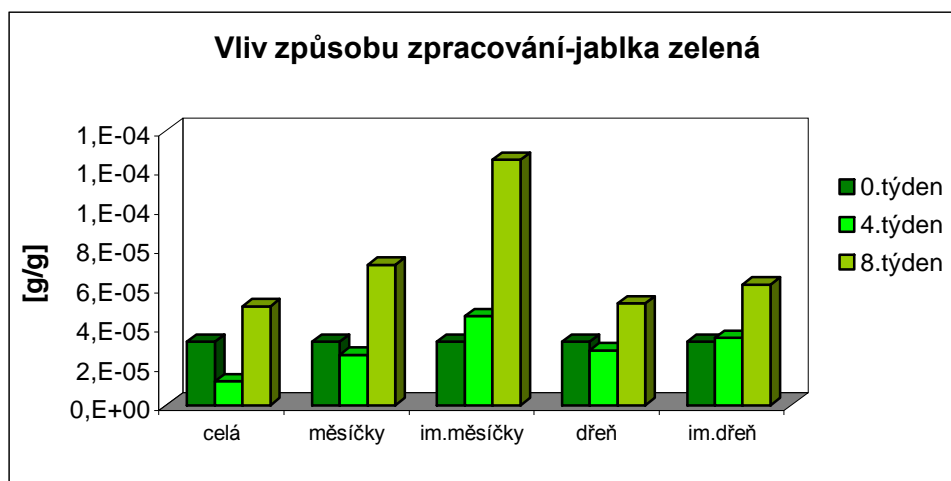
Tabulka 7: Naměřené hodnoty vitamínu C na gram jedlého podílu v ovoci zpracovaném různými způsoby a následně zamraženém – 1. část

ovoce	forma zpracování	Vitamin C [g/g]		
		0. týden	4. týden	8. týden
jablka zelená	celé plody	3,23E-05	1,22E-05	5,05E-05
	měsíčky		2,58E-05	7,16E-05
	impregnované měsíčky		4,54E-05	1,25E-04
	dřeň		2,80E-05	5,20E-05
	proslazená dřevě		3,44E-05	6,15E-05

Tabulka 7: Naměřené hodnoty vitamínu C na gram jedlého podílu v ovoci zpracovaném různými způsoby a následně zamraženém – 2. část

ovoce	forma zpracování	Vitamin C [g/g]		
		0. týden	4. týden	8. týden
jablka červená	celé plody	7,10E-05	2,67E-05	4,07E-05
	měsíčky		1,75E-05	8,78E-05
	impregnované měsíčky		9,52E-05	7,29E-05
	dřeň		3,24E-05	7,16E-05
	proslazená dřeň		2,75E-05	6,13E-05
hrozny	celé plody	2,41E-05	2,66E-05	4,79E-05
	impregnované celé plody		1,80E-05	4,42E-05
	dřeň		3,29E-05	4,88E-05
	proslazená dřeň		1,98E-05	3,43E-05
švestky	měsíčky	1,70E-05	1,11E-05	3,34E-05
	impregnované měsíčky		2,38E-05	2,31E-05
	dřeň		2,34E-05	5,88E-05
	proslazená dřeň		1,89E-05	3,91E-05

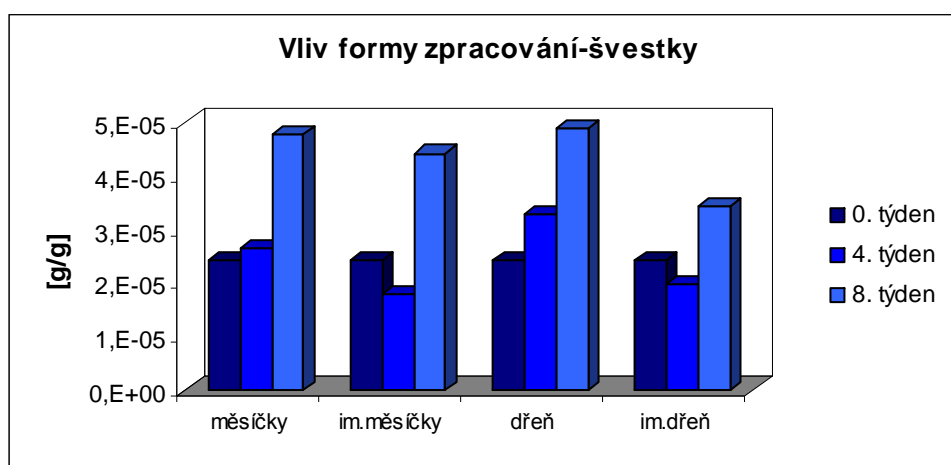
V hodnotách vitamínu C v ovoci po zamražení byly také nalezeny odchylky. U jablek zelených, hroznů a švestek byly naměřeny vyšší hodnoty obsahu tohoto vitamínu, u jablek červených u některých forem opracování nižší, u jiných zase vyšší. V zelených jablkách měla závislost sinusový tvar, kromě hodnot vitamínu v impregnovaných měsíčkách a proslazené dřeni, kde rostla lineárně (viz Graf 13).



Graf 13: Vliv způsobu zpracování na hodnoty vitamínu C v zelených jablkách v závislosti na

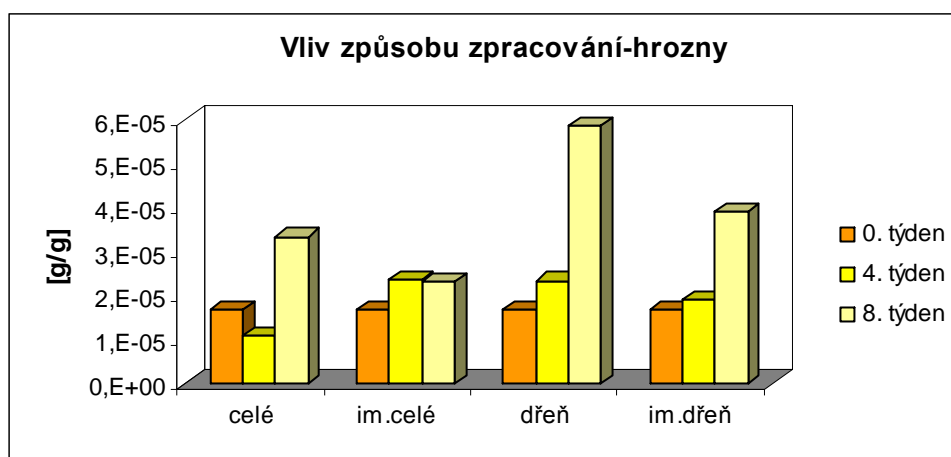
Závislost v jablkách červených měla sinusový tvar ve všech formách opracování. Hodnota vitamínu C ve čtvrtém týdnu byla nižší než v nultém, výjimku tvořily impregnované měsíčky, kde byla naopak vyšší. To bylo zřejmě dáno obsahem kyseliny askorbové v impregnačním roztoku, kdy nejspíš došlo k její sorpci do plodů a tím k navýšení zjištěných hodnot vitamínu C. Hodnota tohoto vitamínu pak v osmém týdnu nadále rostla (až na impregnované měsíčky), v některých případech byla i vyšší než ta z týdnu nultého. V ošetřených měsíčcích hodnota klesla oproti čtvrtému týdnu, převýšila však hodnotu při zahájení pokusu. Může se tedy shrnout, že hodnoty vitamínu C v červených jablkách rostou kromě impregnovaných měsíčků, kde klesají.

U švestek byl pozorován jednoznačný nárůst hodnoty vitamínu C. V impregnovaných měsíčcích a v proslazených dřevích měla závislost sinusový tvar, v dalších dvou formách lineární tvar (Graf 14).



Graf 14: Vliv způsobu zpracování na hodnoty vitamínu C ve švestkách v závislosti na čase

U hroznů také došlo k navýšení hodnoty vitamínu C. V celých plodech a v celých impregnovaných plodech sinusovou a v dřevích a proslazených dřevích lineární závislostí (Graf 15).



Graf 15: Vliv způsobu zpracování na hodnoty vitamínu C v hroznech v závislosti na čase

Byla také změřena hodnota vitamínu C v komerčně mražených švestkách pro porovnání (1,71E-05 g/g). Tento údaj se blíží hodnotě změřené pro měsíčky švestek bez impregnace.

Nárůst zjištěných hodnot souvisí pravděpodobně s uvolněním tohoto vitamínu z tkání, případně s důkladnější homogenizací po rozmražení plodů. Také to může být prostředek pro prodloužení údržnosti plodů.

4.5 Celkové polyfenoly

Postupem, který byl popsán v odstavci 3.6.2 byla provedena analýza celkových polyfenolů. Nejdříve však byla změřena kalibrační křivka pro rozsah koncentrací kyseliny gallové 0,11-0,53 mg/ml. Z rovnice lineární regrese této přímky:

$$A = 1,4974 \cdot c$$

byla zjištěna hodnota celkových polyfenolů ve vzorku. Získané výsledky byly přepočteny na mg obsahu celkových polyfenolů v gramu jedlého podílu ovoce.

4.5.1 Výsledky studie 1 - Vliv různých skladovacích teplot na hodnotu celkových polyfenolů

Hodnoty celkových polyfenolů v závislosti na teplotě uchovávání byly sledovány u 3 druhů ovoce (švestky, hrozny, broskve) uchovávaných při 3 různých teplotách (laboratoř, sklep, lednice) a orientačně i zmražením celých plodů. Na stanovení byla použita vylisovaná ovocná šťáva. V dalším textu jsou srovnány výsledky v rámci 1. studie. Pro lepší přehlednost byla zařazena Tabulka 8.

Tabulka 8: Naměřené hodnoty celkových polyfenolů na gram jedlého podílu v ovoci skladovaném při různých teplotách

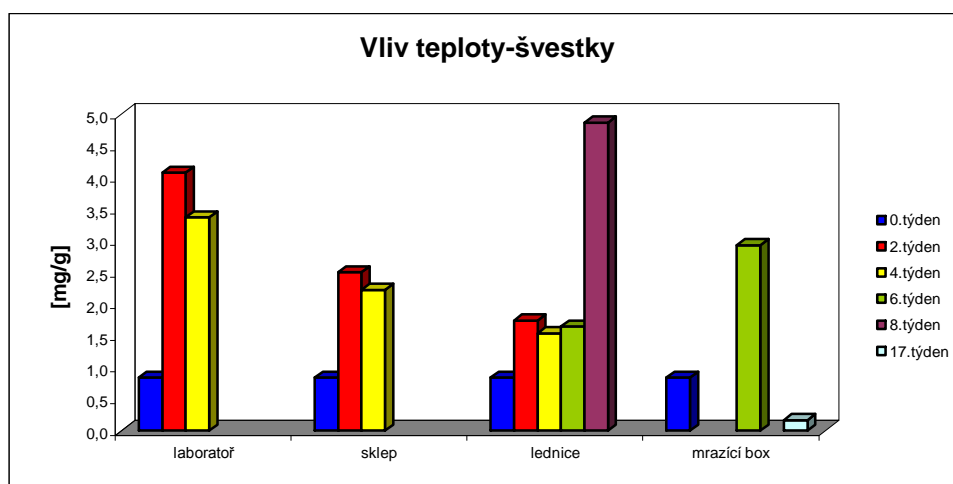
ovoce	místo skladování	Celkové polyfenoly [mg/g]					
		0. týden	2. týden	4. týden	6. týden	8. týden	17. týden
broskve	laboratoř	1,3530	1,6943	-	-	-	
	sklep		1,3866	-	-	-	
	lednice		1,2251	4,0180	2,1846	2,7718	
	mrazicí box				0,4221		*
hrozny	laboratoř	1,7963	1,0176	2,8406	-	-	
	sklep		1,8528	1,0623	1,4343	-	
	lednice		1,2213	0,7180	0,7025	0,8226	
	mrazicí box				0,5769	-	0,0706
švestky	laboratoř	0,8407	4,0780	3,3710	-	-	
	sklep		2,5068	2,2283	-	-	
	lednice		1,7435	1,5420	1,6490	4,8737	
	mrazicí box				2,9318		0,1660

pozn.: * pod dolní hranicí detekce

Závislost obsahu celkových polyfenolů v ovoci skladovaném při různých teplotách nelze zcela jednoznačně sumarizovat. U broskví skladovaných po dobu 14 dní v laboratoři a ve sklepě hodnoty polyfenolů kolísaly kolem střední hodnoty. V lednici z celkového pohledu

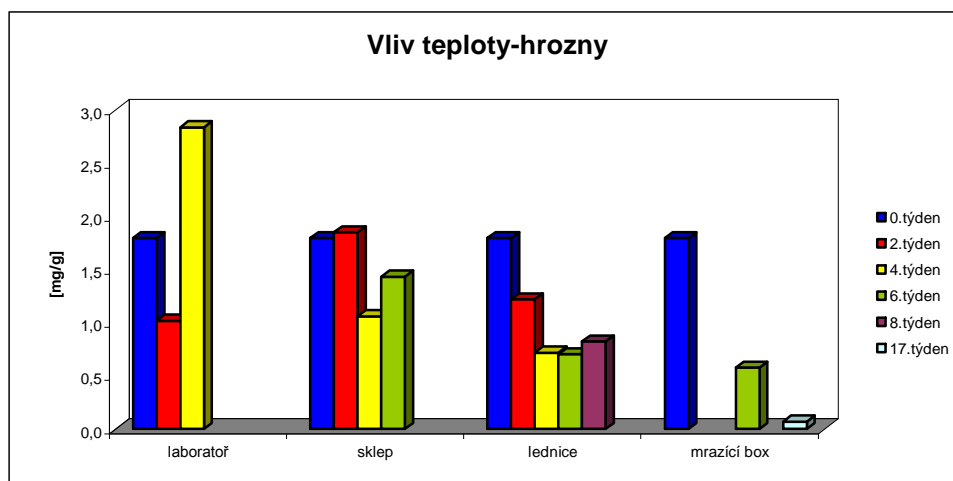
došlo k nárůstu, závislost měla sinusový průběh. V mrazničce zjištěné hodnoty celkových polyfenolů lineárně klesaly.

U švestek byl zaznamenán sinusový průběh závislosti celkových polyfenolů na čase s rostoucí tendencí při skladování v laboratoři, ve sklepě i v lednici. U plodů z mrazničky nelze jednoznačně říci, zda se jedná o kolísavý nárůst či pokles. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny v laboratoři a ve sklepě v druhém týdnu skladování, v lednici v týdnu osmém a v mrazničce v týdnu šestém (Graf 16).



Graf 16: Vliv různých skladovacích teplot na obsah celkových polyfenolů ve švestkách v závislosti na čase

V hroznech skladovaných v laboratoři se nejprve projevil pokles a následně vzrůst hodnoty polyfenolů oproti hodnotě v nultém týdnu. Při skladování ve sklepě došlo ke kolísavému poklesu polyfenolů. U plodů z lednice a z mrazničky byl zaznamenán lineární pokles (v lednici byla mírně odchýlena hodnota v osmém týdnu měření).



Graf 17: Vliv různých skladovacích teplot na obsah celkových polyfenolů v hroznech v závislosti na čase

V souhrnu byl pozorován v hroznech plynulý pokles hodnot celkových polyfenolů, u broskví stagnace a u švestek nejprve přírůstek a následně pokles. Tyto hodnoty a jejich změny evidentně závisí na druhu ovoce a zastoupení jednotlivých fenolických látek tvořících celkovou hladinu, dále na stupni zralosti plodu před uchováním a na typu tkáně, případně na roli fenolických látek v průběhu dozrávání a stárnutí plodů.

4.5.2 Výsledky studie 2 - Vliv různé formy zpracování plodů s následujícím zamražením na obsah celkových polyfenolů

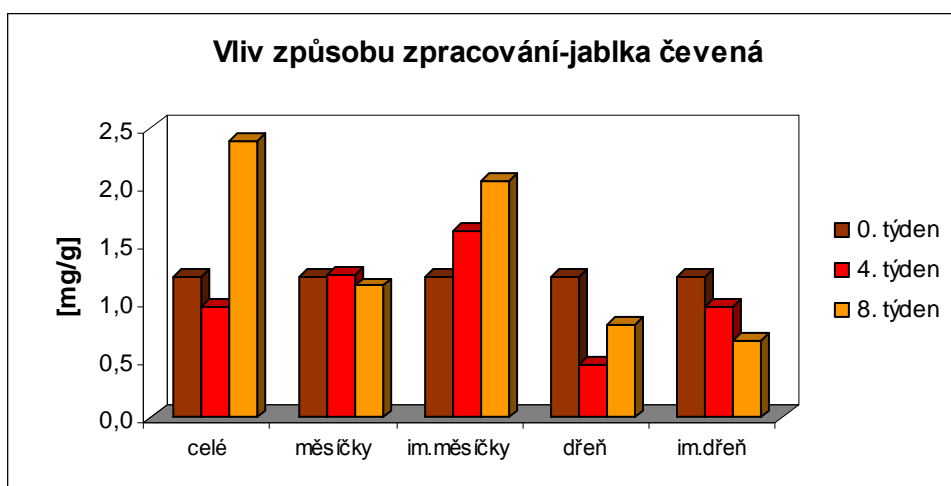
Hodnota celkových polyfenolů byla sledována i ve druhé sérii experimentů zaměřených na sledování změn v ovoci v průběhu uchovávání mražením s různým způsobem opracování vzorku (kap. 3.3). Na stanovení byla vždy použita vylisovaná ovocná šťáva získaná z rozmrazených vzorků. V dalším textu jsou srovnány naměřené výsledky celkových polyfenolů v plodech v rámci 2.studie. Nejprve byla vložena přehledná tabulka (Tabulka 9)

Tabulka 9: Naměřené hodnoty obsahu celkových polyfenolů na gram jedlého podílu v ovoci zpracovaném různými způsoby s následným uchováním v mrazničce

ovoce	forma zpracování	Celkové polyfenoly [mg/g]		
		0. týden	4. týden	8. týden
jablka zelená	celé plody	1,2209	1,1406	1,0010
	měsíčky		1,1987	1,7855
	impregnované měsíčky		1,2045	3,3933
	dřeň		0,9504	0,2522
	proslazená dřeň		0,6610	0,4634
jablka červená	celé plody	1,2107	0,9567	2,3932
	měsíčky		1,2292	1,1392
	impregnované měsíčky		1,6137	2,0449
	dřeň		0,4601	0,8039
	proslazená dřeň		0,9542	0,6642
hrozny	celé plody	0,7332	0,5479	0,5308
	impregnované celé plody		0,4137	0,8760
	dřeň		0,3466	0,2285
	proslazená dřeň		0,4227	0,3286
švestky	měsíčky	2,1569	1,2000	0,9011
	impregnované měsíčky		1,4037	1,0219
	dřeň		0,5403	0,5226
	proslazená dřeň		1,5273	1,0448

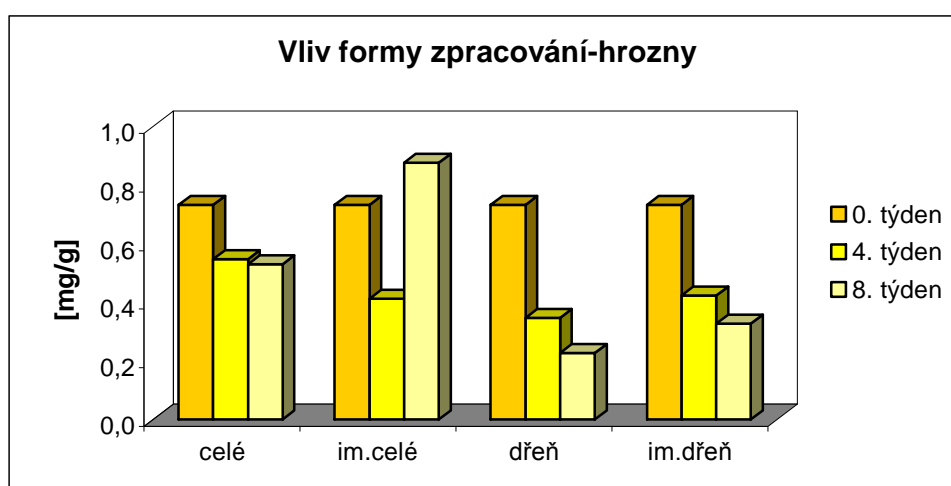
V jablkách zelených byl zaznamenán pokles obsahu celkových polyfenolů v případě zamražených celých plodů, dřeně a impregnované dřeně. V měsíčkách a impregnovaných měsíčkách došlo ve čtvrtém týdnu k minimálnímu poklesu a v týdnu osmém k nárůstu hodnoty polyfenolů.

U červených jablek byl zaznamenán lineární pokles celkových polyfenolů pro případ proslazené dřeně. Naopak v impregnovaných měsíčkách byl pozorován lineární nárůst. Ostatní formy zpracování vykazovaly sinusovou závislost. V celých plodech byl naměřen nejdříve pokles, následně pak nárůst hodnot až nad hodnotu naměřenou při zahájení pokusu. Ve dřeni byl pozorován také pokles s následným vzrůstem, ten však nepřesáhl prvne naměřenou hodnotu v nultém týdnu. V měsíčkách celkové polyfenoly kolísaly kolem střední hodnoty (viz Graf 18).



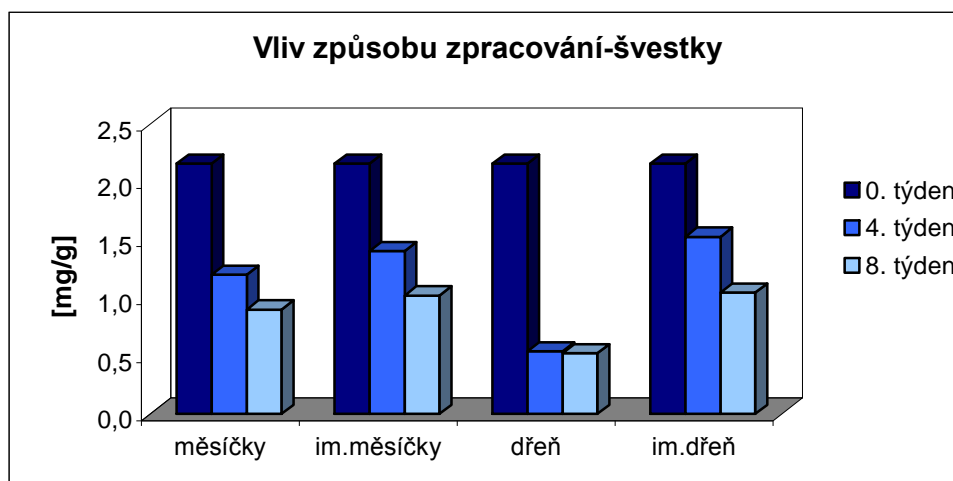
Graf 18: Vliv různého způsobu zpracování na hodnotu celkových polyfenolů v červených jablkách v závislosti na čase

V hroznech byl pozorován lineární pokles celkových polyfenolů ve všech formách opracování, pouze u impregnovaných celých plodů se odchýlila hodnota v osmém týdnu. Místo očekávaného poklesu vzrostla a to až nad hodnotu měření v nultém týdnu (Graf 19).



Graf 19: Vliv různého způsobu zpracování na hodnotu celkových polyfenolů v hroznech v závislosti na čase

U švestek byl naměřen lineární pokles obsahu celkových polyfenolů ve všech formách opracování (viz Graf 20) .



Graf 20: Vliv různého způsobu zpracování na obsah celkových polyfenolů ve švestkách v závislosti na čase

Pro porovnání byla také změřena hodnota celkových polyfenolů v komerčně mražených švestkách (1,9432 mg/g). Tento údaj je blíží impregnovaným měsíčkům než neopracovaným.

Ze zjištěných hodnot vyplývá, že v mrazničce v ovoci neprobíhají významnější procesy a na rozdíl od normální teploty nastávají v plodech minimální změny nebo spíše ztráty. Přesně tento průběh vidíme u celkových polyfenolů, jejichž hodnoty postupně klesají s délkou skladování. Tyto výsledky také korespondují s klesajícím trendem zjištěným v případě ABTS.

4.6 Celkové flavonoidy

Jako část z celkových polyfenolů byl měřen obsah celkových flavonoidů. Při měření byl použit postup popsáný v kapitole 3.6.3. Nejdříve však byla naměřena kalibrační křivka pro rozsah koncentrací katecholu 0,5-3 mg/ml. Z ní byla získána rovnice lineární regrese:

$$A = 3,1541 \cdot c ,$$

ze které byla následně vyjádřena hodnota celkových flavonoidů ve vzorku. Výsledky měření byly přepočítány na mg celkových flavonoidů v gramu jedlého podílu ovoce.

4.6.1 Výsledky studie 1 - Vliv různých skladovacích teplot na hodnotu celkových flavonoidů

Hodnoty celkových flavonoidů v závislosti na teplotě uchovávání byly sledovány u 3 druhů ovoce (švestky, hrozny, broskve) uchovávaných při 3 různých teplotách (laboratoř, sklep, lednice) a orientačně i zmražením celých plodů. Na stanovení byla použita vylisovaná ovocná šťáva. V dalším textu jsou srovnány výsledky celkových flavonoidů v plodech v rámci 1. studie. Prvně je pro srovnání vložena Tabulka 10.

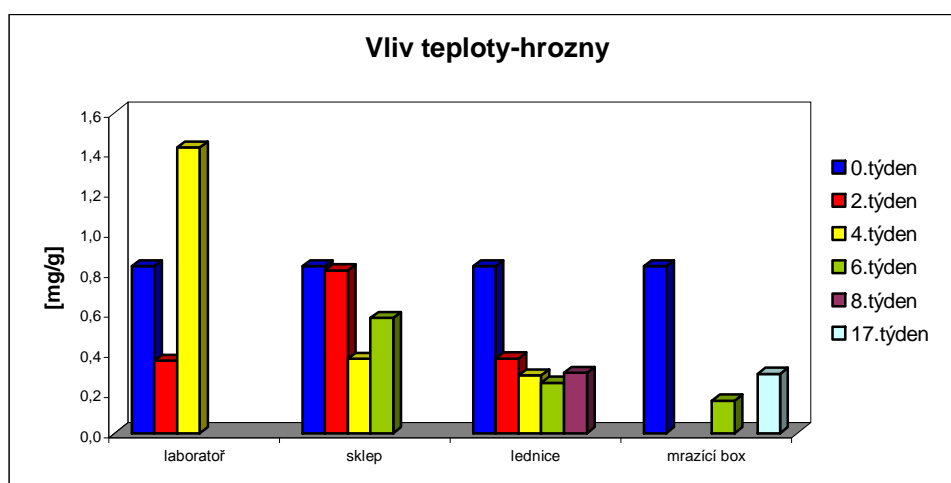
Tabulka 10: Naměřené hodnoty celkových flavonoidů na gram jedlého podílu v ovoci skladovaném při různých teplotách

ovoce	místo skladování	Celkové flavonoidy[mg/g]					
		0. týden	2. týden	4. týden	6. týden	8. týden	17. týden
broskve	laboratoř	0,4313	0,5210	-	-	-	
	sklep		0,4111	-	-	-	
	lednice		0,3724	1,1489	0,4062	1,2767	
	mrazicí box				0,3198		0,1578
hrozný	laboratoř	0,8326	0,3614	1,4275	-	-	
	sklep		0,8128	0,3704	0,5765	-	
	lednice		0,3726	0,2880	0,2518	0,3008	
	mrazicí box				0,1625	-	0,2961
švestky	laboratoř	1,1504	3,7197	1,8563	-	-	
	sklep		2,7951	1,4904	-	-	
	lednice		2,0784	1,9479	2,0676	4,6075	
	mrazicí box				1,8286		1,5244

Při sledování hodnot celkových flavonoidů v plodech broskví byly zjištěny následující závislosti. Během čtrnácti dní skladování v laboratoři a ve sklepě hodnoty flavonoidů kolísaly kolem střední hodnoty. V mrazničce po celou dobu analýzy docházelo k úbytku celkových flavonoidů. Při skladování v lednici měla závislost sinusový tvar s mírnou stoupající tendencí. Výrazně odchýleny v pozitivním směru byly hodnoty naměřené ve čtvrtém a osmém týdnu.

U švestek byl zaznamenán kolísavý nárůst celkových flavonoidů u všech sledovaných teplot. V plodech skladovaných v laboratoři a ve sklepě byla výrazně odchýlena v pozitivním směru hodnota zjištěná v druhém týdnu skladování.

U hroznů byla naopak zjištěna klesající kolísavá tendence v plodech uložených ve sklepě, v lednici a v mrazničce. Hodnoty získané z hroznů skladovaných v laboratoři jde obtížně hodnotit. Hodnota v druhém týdnu skladování je výrazně nižší než ta z nultého týdne. Další týden zase výrazně stoupla oproti hodnotě při zahájení pokusu. Nelze proto jednoznačně říci, zda závislost klesá či stoupá (viz Graf 21).



Graf 21: Vliv různých teplot skladování na obsah celkových flavonoidů v hroznech v závislosti na čase

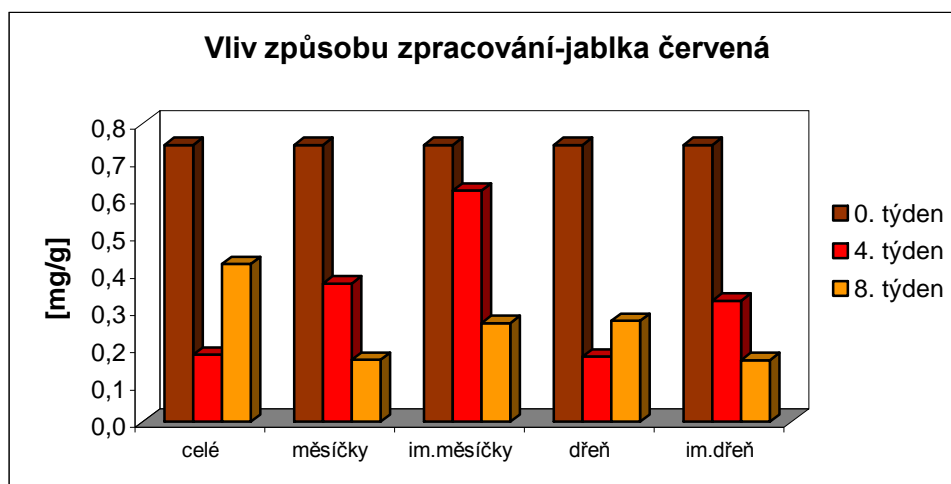
Průběh závislosti hodnot celkových flavonoidů na čase u různých skladovacích teplot má různý průběh (mírně kolísavý, stagnující, klesající nebo vzrůstající) v závislosti na typu ovoce. Změny těchto hodnot jsou do značné míry podobné změnám celkových polyfenolů.

4.6.2 Výsledky studie 2 - Vliv různého způsobu zpracování plodů s následným zamražením na obsah celkových flavonoidů

Celkové flavonoidy byly také sledovány ve druhé sérii experimentů zaměřených na sledování změn v ovoci v průběhu uchovávání mražením s různým způsobem opracování vzorku (kap. 3.3). Na stanovení celkových flavonoidů byla vždy použita vylisovaná ovocná šťáva získaná z rozmrazených vzorků. V dalším textu a v Tabulka 11 jsou srovnány naměřené výsledky v rámci 2.studie.

U jablek zelených byl ve všech formách zpracování plodu zaznamenán pokles hodnot celkových flavonoidů. Závislost měla sinusový tvar, kromě zpracování jablka do podoby dřeně. Zde hodnoty lineárně klesaly. Úbytek byl zřetelný u všech forem kromě měsíčků, kde došlo jen k menšímu poklesu celkových flavonoidů přepočtených na gram jedlého podílu ovoce.

V jablkách červených také došlo k poklesu. V měsíčkách, impregnovaných měsíčkách a v proslazené dřeni měla závislost hodnot celkových flavonoidů na čase lineární tvar, ve zbylých dvou sinusový (viz Graf 22).



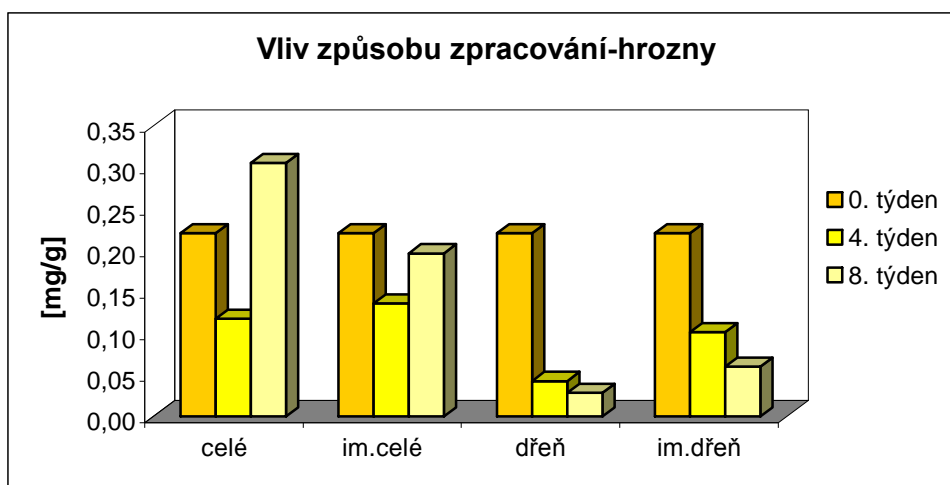
Graf 22: Vliv různého způsobu zpracování na hodnotu celkových flavonoidů v jablkách červených v závislosti na čase

Tabulka 11: Naměřené hodnoty celkových flavonoidů na gram jedlého podílu v různě zpracovaném ovoci, které bylo následně uchováváno v mrazničce

ovoce	způsob zpracování	Celkové flavonoidy[mg/g]		
		0. týden	4. týden	8. týden
jablka zelená	celé plody	0,7581	0,2640	0,2841
	měsíčky		0,5957	0,7153
	impregnované měsíčky		0,3526	0,3783
	dřeň		0,2478	0,0863
	proslazená dřeň		0,1812	0,2288
jablka červená	celé plody	0,7422	0,1798	0,4230
	měsíčky		0,3705	0,1664
	impregnované měsíčky		0,6201	0,2646
	dřeň		0,1749	0,2707
	proslazená dřeň		0,3247	0,1658
hrozny	celé plody	0,2204	0,1174	0,3050
	impregnované celé plody		0,1358	0,1962
	dřeň		0,0425	0,0284
	proslazená dřeň		0,1015	0,0600
švestky	měsíčky	1,6877	0,6779	0,6629
	impregnované měsíčky		0,6868	0,4326
	dřeň		0,4570	0,4530
	proslazená dřeň		0,7741	0,6978

Celkové flavonoidy ve švestkách ubývaly ve všech formách zpracování lineárně.

V hroznech byl také pozorován vesměs úbytek flavonoidů, ve dřeni a proslazené dřeni lineární, v impregnovaných celých plodech sinusový. Plody bez impregnace vykazovaly také sinusovou závislost hodnot celkových flavonoidů na čase, ve čtvrtém týdnu byl naměřen pokles (asi na polovinu původní hodnoty), v osmém týdnu byl změřen naopak nárůst flavonoidů oproti hodnotě při zahájení pokusu (viz Graf 23).



Graf 23: Vliv různého způsobu zpracování na obsah celkových flavonoidů v hroznech v závislosti na čase

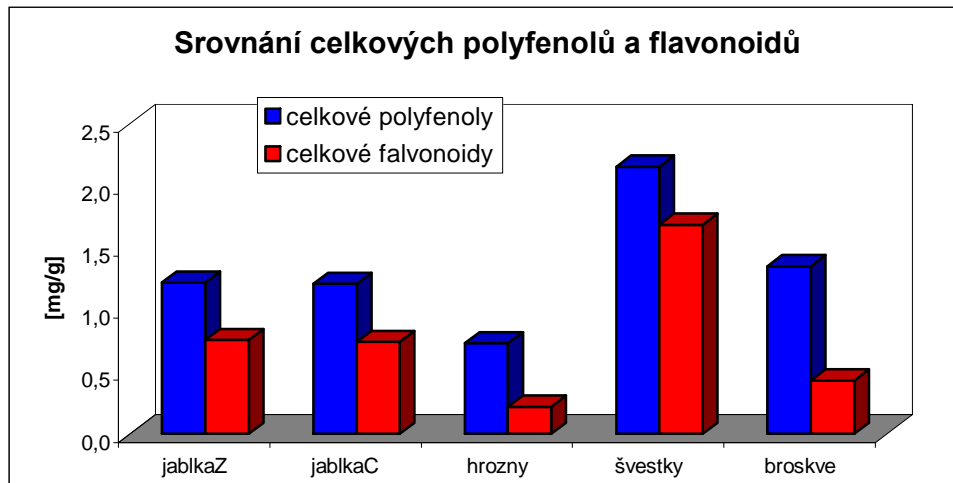
Pro srovnání byla také změřena hodnota celkových flavonoidů v komerčně mražených švestkách (1,8192 mg/g). Tato hodnota je asi dvakrát vyšší než hodnoty získané z vlastních vzorků. Nejvíce se blíží obsahu celkových flavonoidů v čerstvých plodech švestek.

Hodnoty celkových flavonoidů pro vzorky zpracované různými způsoby a následně uchované v mrazničce měly spíše klesající tendenci. U některých druhů ovoce a forem zpracování byl tento směr lineární, u jiných zase kolísavý. Zjištěné závislosti odpovídají úbytku celkových polyfenolů v měřených vzorcích.

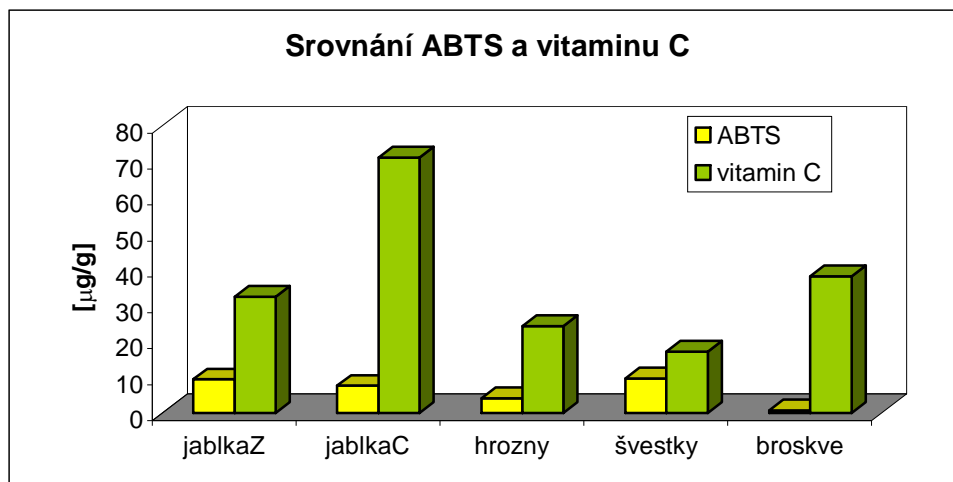
4.7 Srovnání obsahu nízkomolekulárních látek v jednotlivých druzích ovoce před skladování či zpracováním

V této kapitole byly srovnány hodnoty ABTS, vitamínu C, celkových polyfenolů a flavonoidů v čerstvých vzorcích ovoce (tzn. hodnot z nultého týdne) před zahájením skladování nebo před zpracováním do různých forem. Byly srovnávány čtyři druhy ovoce: jablka (červená i zelená), broskve, švestky a hrozny. Měření byla provedena ihned po přinesení vzorků do laboratoře, bez povrchové či jiné úpravy před uložením do různých skladovacích teplot. Toto srovnání slouží pro zjištění obsahu jednotlivých antioxidačních zástupců a dále na zjištění případných výrazných odlišností v průběhu uchování plodů mezi různými druhy.

Hodnoty ABTS a obsahy vitamínu C musely být vyneseny do zvláštního grafu, jelikož vedle obsahu celkových polyfenolů a flavonoidů nebyly ve srovnání patrné (viz Graf 24 a Graf 25).



Graf 24: Srovnání obsahu celkových polyfenolů a flavonoidů v různých druzích ovoce



Graf 25: Srovnání ABTS a obsahu vitamínu C v různých druzích ovoce

Pro lepší orientaci a přehlednost průběhu změn biologicky aktivních látek v měřených druzích ovoce, ve všech skladovacích teplotách a ve všech možných formách zpracování, byly vytvořeny grafické tabulky (viz Příloha 2 a Příloha 3). Šipkami jsou vyznačeny stoupající či klesající směry, případně kolísání.

Ve většině měřených plodů tvořily celkové flavonoidy cca dvě třetiny obsahu celkových polyfenolů (kromě hroznů a broskví, kde tvořily třetinu jednu). Nejvyšší hodnoty těchto látek byly zjištěny ve švestkách, naopak nejnižší v hroznech. Jablka červená a zelená měla obsahy těchto antioxidantů téměř stejný. V průběhu skladování ve všech typech teplot a ve všech typech zpracování před mražením byl sledován postupný úbytek hodnot celkových flavonoidů a polyfenolů.

V první studii (vlivu teploty skladování na obsah biologicky aktivních látek) došlo k výraznějšímu poklesu pouze u hroznů skladovaných v lednici (jak v obsahu celkových polyfenolů, tak v obsahu celkových flavonoidů). Ostatní poklesy nebyla tak patrné (spíše vůbec). Obsahy obou druhů látek klesaly víceméně stejně. Při druhé studii (vlivu způsobu zpracování před vlastním mražením na obsah biologicky aktivních látek) byly poklesy celkových flavonoidů viditelné u všech způsobů zpracování i u všech druhů ovoce. Celkové polyfenoly pak nejvýrazněji klesaly pouze u hroznů a švestek.

V obsahu vitamínu C vynikaly pro změnu jablka červená. Nižší obsah tohoto vitamínu byl zaznamenán ve švestkách a hroznech. Nejnižší hodnotu celkové antioxidační aktivity měly broskve (viz Graf 25).

Jak již bylo zmíněno, hodnota ABTS ve vzorcích z první studie postupně rostla, ve vzorcích z druhé studie rostla po prvotním prudkém poklesu. Stejný trend je viditelný i v hodnotách vitamínu C. Zatímco u vzorků skladovaných při mírnějších teplotách (laboratoř, sklep a lednice) je vidět pozvolný nárůst, u vzorků po zmražení je evidentní prvně pokles a následně vzestup. Tento pokles však není tak zřetelný jako u ABTS ve stejně skladovaných vzorcích. Dá se tedy říci, že v antioxidantech, jejichž hodnoty v prvních čtyřech týdnech poklesly, je jen částečně zastoupen vitamin C. Větší podíl na tomto poklesu budou mít pravděpodobně celkové polyfenoly a některé enzymy.

Z hlediska těchto čtyř parametrů se jeví jako nejlepší skladovací podmínky mírnější teploty skladování než velmi nízké teploty pro zachování biologické hodnoty ovoce. Na druhou stranu ovoce je nejdéle údržné právě v mražené formě, naopak při laboratorní teplotě je rychle napadáno plísněmi (viz dále). Jistý kompromis může být úchova v ledničce, kde se plísním nedaří tak dobře kolonizovat ovocný materiál a změny nejsou ještě tak výrazné jako u skladování v mrazničce.

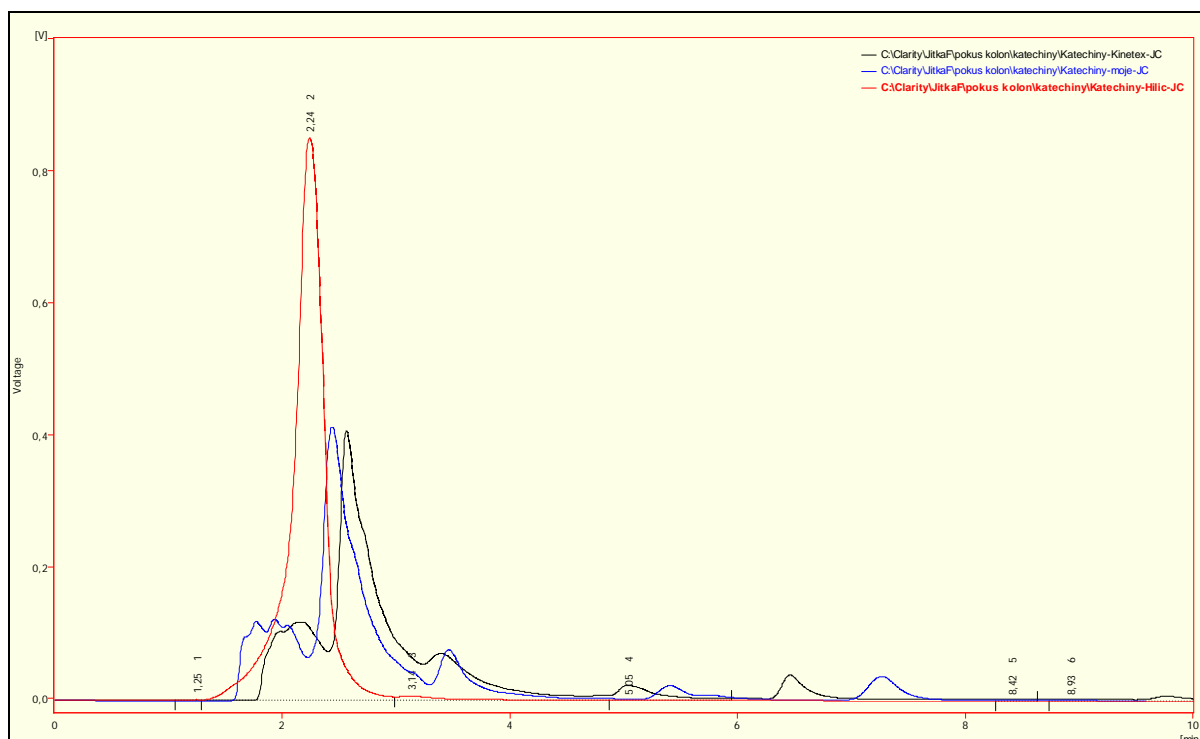
4.8 Stanovení flavonoidů a katechinů pomocí HPLC

Další součástí analýzy bylo stanovení katechinů a flavonoidů v obou studiích za použití instrumentální techniky HPLC/UV-VIS. Původní kolona (Biospher PSI 200 C 18 7 μm (Labio a.s.), 4,6 x 150 mm), na které byla analyzována první studie (sledování vlivu skladovacích teplot na obsah aktivních látek v plodech broskví, švestek a hroznů), nemohla být dále používána. Z tohoto důvodu musela být nalezena vhodná alternativa.

4.8.1 Výběr kolony

Byly testovány tři nové chromatografické kolony (viz kapitola 3.7.1). Vzorky, které byly k tomuto testování použity, byly kromě vybraných standardů: jablka zelená, jablka červená a hrozny. Byla zjišťována kvalita separace směsného vzorku při měření flavonoidů, katechinů a hydrolyzovaných katechinů.

Na Obr. 7 je ukázáno výsledné srovnání pro vzorek jablek červených, ve kterém byly stanovovány katechiny podle postupu a nastavených podmínek, jako jsou popsány v kapitole 3.7.4. Měření bylo provedeno na třech kolonách, popsáných v kapitole 3.7.1.



Obr. 8: Příklad porovnání kvality dělení u tří různých kolon (katechiny-jablka červená)

Červenou barvou je vyznačen chromatogram získaný za použití kolony Kinetex 2,6 μ HILIC 100A (Phenomenex). Na této koloně se směsný vzorek vůbec nerozdělil, v chromatogramu je patrný pouze jeden velký pík. Kolona byla shledána nevhodnou.

Černou barvou je vyznačen chromatogram získaný při použití kolony Kinetex 2,6 μ C18 100A (Phenomenex) a modrou barvou chromatogram z kolony Zorbax Elipse Plus XDB-C18 (Agilent). Tyto dva záznamy si jsou dosti podobné, avšak vzhledem k větší podobnosti typu stacionární fáze (identické zrnění a délka) byla v dalších srovnávacích analýzách v rámci série 2 rutinně používána kolona Zorbax Eclipse Plus XDB-C18. Detailní pohled na černý a modrý chromatogram je uveden v přílohách (viz Příloha 6). Dále jsou v přílohách uvedeny některé další chromatogramy pro jiné druhy ovoce a jiné měřené látky (viz Příloha 7 a Příloha 8).

4.8.2 Testování podmínek hydrolýzy pro měření katechinů v ovoci

Katechiny byly měřeny postupem optimalizovaným zejména pro nápoje (viz kapitola 3.7.4), který se provádí přímo ve vodném extraktu bez zařazení hydrolýzy případných glykosidově vázaných forem katechinů. Cílem tohoto typu analýzy bylo vždy kromě jednoduchého zpracování vzorku analyzovat přírodní materiály v co nejpřirozenější formě tak, jak jsou přijímány do organismu. Ve vzorcích ovoce by však mohl být výskyt glykosidicky vázaných katechinů vyšší, proto byla hydrolýza testována na vybraných vzorcích. Vzorky (jablka zelená, červená a hrozny) byly zpracovány jak s použitím hydrolýzy, tak bez ní. Měření probíhalo v první fázi na HPLC/UV-VIS za použití tří výše zmiňovaných kolon:

- na koloně Kinetex 2,6 μ HILIC 100A nedocházelo k separaci katechinů ani po provedené hydrolýze vzorků.

- na koloně Kinetex 2,6 μ C18 100A proběhla separace katechinů úspěšně; po hydrolyze byly zaznamenány větší plochy píků oproti nehydrolyzované verzi, dělení směsi však nebylo v některých případech tak kvalitní jako u nehydrolyzovaného vzorku (viz Příloha 9 a Příloha 10)

- na koloně Zorbax Eclipse XDB-C18 byla u hydrolyzovaných vzorků také zjištěna větší plocha některých píků, u některých píků zase nižší hodnota, kvalita separace však byla lepší u vzorků bez hydrolyzy (viz Příloha 11).

Celkově bylo zjištěno, že vliv hydrolyzy vzorků při zpracování biologického materiálu se liší v závislosti na druhu ovoce. U stanovení katechinů dochází ke změnám v některých částech chromatogramu, zejména ke vzrůstu plochy píku s retenčním časem cca 2 min a k významnému poklesu píku v cca 3 min. Lze odhadnout, že se jedná o uvolněné aglykony a jejich glykosidické formy a že tedy výsledky zejména individuálních katechinů a epikatechinů u jablek mohou být nižší než odpovídá realitě. U hroznů a broskví je rozdíl v odezvě po hydrolyze podstatně nižší (viz Příloha 9)

Je třeba zdůraznit, že skupina flavonoidů byla analyzována výhradně s hydrolyzou (viz kapitola 3.7.3). Pro ověření a verifikaci jednotlivých derivátů byla dále provedena analýza pomocí LC/PDA/ESI-MS (Thermo Scientific).

4.8.3 Ověření analýzy katechinů a flavonoidů metodou LC/PDA/ESI-MS

Na toto stanovení byla užívána pouze kolona Zorbax Eclipse XDB-C18. Jako modelové vzorky byly použity jablka zelená a červená a hrozny. Ovoce bylo upraveno pro měření jak postupem zahrnujícím hydrolyzu, tak postupem bez ní (viz kapitola 3.7.3 a 3.7.4).

Byl získán chromatogram z detektoru PDA, na kterém bylo určeno několik píků pomocí standardů a absorpčních spekter. Vzorky byly následně v on-line režimu analyzovány pomocí MS spektrometrie. Výstupem z MS detektoru bylo spektrum jednotlivých látek reprezentovaných určitým poměrem hmotnosti a náboje (názorná ukázka vyhodnocovacího programu Excalibur s výstupy jak z PDA tak z MS – viz Příloha 12). V přílohách jsou uvedeny rovněž chromatogramy a spektra pro měřené vzorky pro lepší srovnání vlivu hydrolyzy či gradientové a izokratické eluce (viz Příloha 13, Příloha 14, Příloha 15, Příloha 16).

Jak již bylo zmíněno, u některých píků chromatogramu katechinů dochází po hydrolyze ke změnám. Lze se však domnívat, že pro srovnávací analýzu individuálních zástupců je realizovaný postup přijatelný, pokud se jasně uvede způsob zpracování vzorků, aby nedošlo k mylnému porovnávání ploch píků získaných z těchto odlišných postupů přípravy. Z přílohy 13 rovněž vyplývá, že gradientová eluce katechinů poskytuje poněkud lepší separaci než eluce izokratická (s výjimkou plodů hroznů). S ohledem na množství analýz a dostupnost přístrojů však nebylo možné zpracovávat celé série vzorků pomocí gradientové eluce, byla tedy použita jednodušší izokratická varianta.

Z látek, které byly stanovovány ve vzorcích metodou HPLC/UV-VIS, byly metodou LC/ESI-MS identifikovány tyto:

- (-)-katechin a (-)-epikatechin pouze při podmínkách gradientové eluce ve vzorcích jablka zeleného (zpracování vzorků na katechiny bez provedené hydrolyzy a na flavonoidy) a hroznů (zpracování vzorků na flavonoidy).
- (-)-katechin-galát a (-)-epikatechin-galát pouze ve vzorcích zpracovaných na katechiny po provedené hydrolyze ve vzorcích jablka zelených (při izokratické eluci) a jablek červených (při gradientové eluci).

- kyselina chlorogenová pouze při podmínkách gradientové eluce ve vzorcích jablek červených (zpracovaných na měření katechinů bez hydrolyzy a na měření flavonoidů), v jablkách zelených (zpracovaných na měření katechinů bez hydrolyzy) a hroznů (zpracovaných na měření flavonoidů).
- morin a quercetin pouze u vzorku jablka zeleného zpracovaného na měření katechinů po hydrolyze při izokratické eluci.
- rutin při izokratické eluci ve vzorcích jablek zelených (zpracovaných na měření hydrolyzovaných katechinů a flavonoidů), při gradientové eluci v hroznech (úprava na flavonoidy) a v jablkách zelených (úprava na nehydrolyzované katechiny).
- kaempferol ve vzorku jablka červeného zpracovaného na měření flavonoidů při izokratické eluci.

Další podrobnosti viz Příloha 13.

4.8.4 HPLC stanovení flavonoidů a katechinů v rámci dvou experimentálních sérií

Nejprve bylo nutné provést kalibrace za použití příslušných standardů. Byly získány kalibrační křivky, z nich byly vypočítány rovnice lineární regrese, které byly použity při výpočtu obsahu jednotlivých flavonoidů a katechinů ve vzorku (viz Tabulka 12).

Tabulka 12: Rovnice lineární regrese z kalibračních křivek pro jednotlivé standardy

standard	rozsah koncentrací [µg/ml]	kolona Biospher PSI 200 C 18 7 µm	kolona Zorbax Eclipse XDB-C18
(-)-katechin	100-460	$A = 96,526.c$	$A = c/0,0173$
(-)-epikatechin	200-730	$A = 129,226.c$	$A = c/0,0228$
(-)-katechin-galát	50-250	$A = 125,62.c$	$A = c/0,006$
(-)-epikatechin-galát	50-380	$A = 251,4.c$	$A = c/0,0096$
prokyanidin	50-300	$A = 30,260.c$	$A = c/0,0589$
kyselina chlorogenová	125-625	$A = 70,73.c$	$A = c/0,0576$
rutin	30-140	$A = 94,292.c$	$A = c/0,0125$
morin	20-140	$A = 85,366.c$	$A = c/0,0077$
quercetin	15-60	$A = 255,94.c$	$A = c/0,003$
kaempferol	15-75	$A = 165,3.c$	$A = c/0,0032$
floridzin	390-5300	$A = 141,37.c$	$A = c/0,848$

Z katechinů byly sledovány tyto látky: (-)-katechin, (-)-epikatechin a jejich galáty. Z flavonoidů byly detekovány tyto sloučeniny: rutin, morin, quercetin, kaempferol, chlorogenová kyselina a floridzin. Výsledky jsou vyjádřeny jako µg dané látky na gram jedlého podílu ovoce. Na vyhodnocení a zpracování dat byl použit program Clarity. V přílohách jsou uvedeny příklady některých chromatogramů (viz

Příloha 17 a Příloha 18).

V první linii měření byly měřeny hodnoty jednotlivých katechinů a flavonoidů v závislosti na teplotě uchovávání. Byly sledovány u 3 druhů ovoce (švestek, hroznů, broskví) uchovávány při 3 různých teplotách (laboratoř, sklep, lednice) a orientačně i ve formě zmražených celých plodů. Postup měření a podmínky eluce se shodují s údaji v kapitolách 3.7.3 a 3.7.4.

V druhé linii měření byly měřeny změny hodnot jednotlivých katechinů a flavonoidů v ovoci v průběhu uchovávání mražením s různým způsobem opracování vzorku. Test byl proveden s 3 druhy ovoce: jablka červená a zelená, švestky a hrozny. Ovoce bylo v mrazničce uchováno po dobu 8. týdnů. Jako formy zpracování byly voleny: neopracované celé plody, impregnované celé plody, měsíčky, impregnované měsíčky, dřeň a proslazená dřeň (kapitola 3.3). Vzorky byly zpracovány a měřeny dle podmínek uvedených v kapitolách 3.7.3 a 3.7.4.

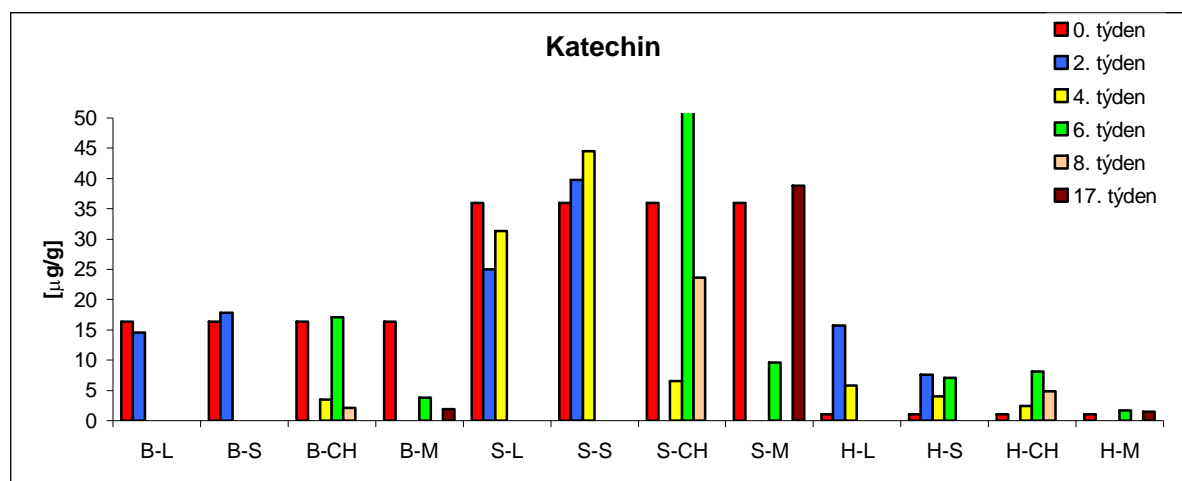
4.8.4.1 Katechin

Výsledky studie 1- Vliv různé teploty skladování na obsah katechinu:

U broskví došlo ke zvýšení obsahu katechinu v plodech skladovaných ve sklepě a v chladničce (zde hodnoty silně kolísaly), u vzorků z laboratoře a z mrazničky byl zjištěn pokles.

Ve švestkách stoupl obsah této látky v plodech uchovaných ve sklepě, lednici a mrazničce (u posledních dvou zmiňovaných hodnoty silně kolísaly). Pokles byl zaznamenán ve švestkách skladovaných při laboratorní teplotě.

V hroznech byl pozorován nárůst obsahu katechinu u všech typů skladovacích teplot (viz. Graf 26).

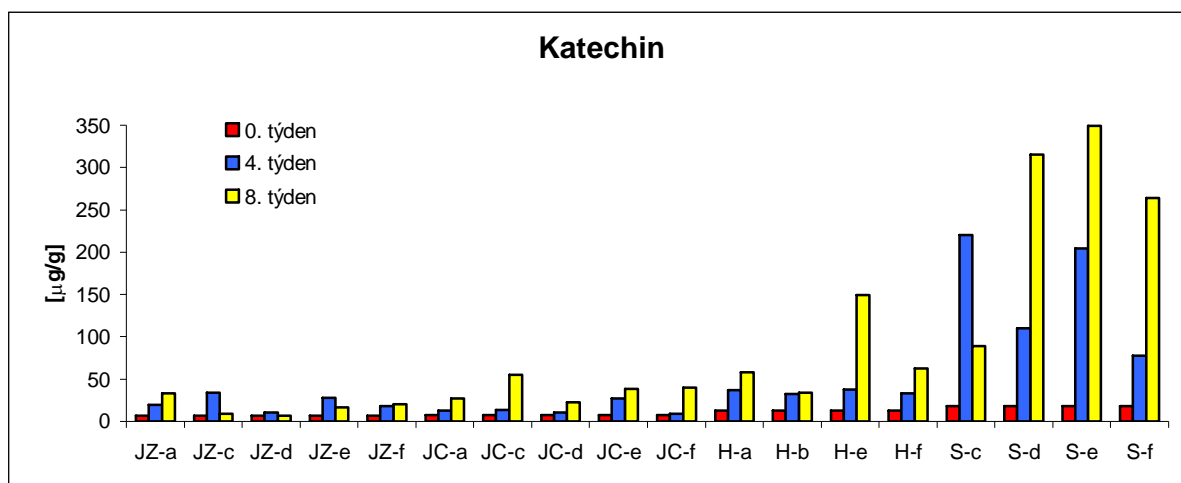


Graf 26: Vliv různých skladovacích teplot na obsah katechinu v gramu jedlého podílu ovoce

Kolísavý druhově specifický průběh odpovídá kolísání celkových fenolických látek (srovnáno s výsledky z kapitoly 4.5).

Výsledky studie 2 - Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na obsah katechinu

U všech druhů, které byly podrobeny tomuto pokusu (jablka zelená, jablka červená, hrozny a švestky) byl zaznamenán nárůst obsahu katechinu v průběhu skladování. U některých forem zpracování byl lineární, u jiných kolísavý. V nultém týdnu skladování byl obsah této látky podobný ve všech druzích ovoce. Na konci pokusu hodnoty změřené ve švestkách výrazně převyšovaly všechny ostatní druhy (viz Graf 27).



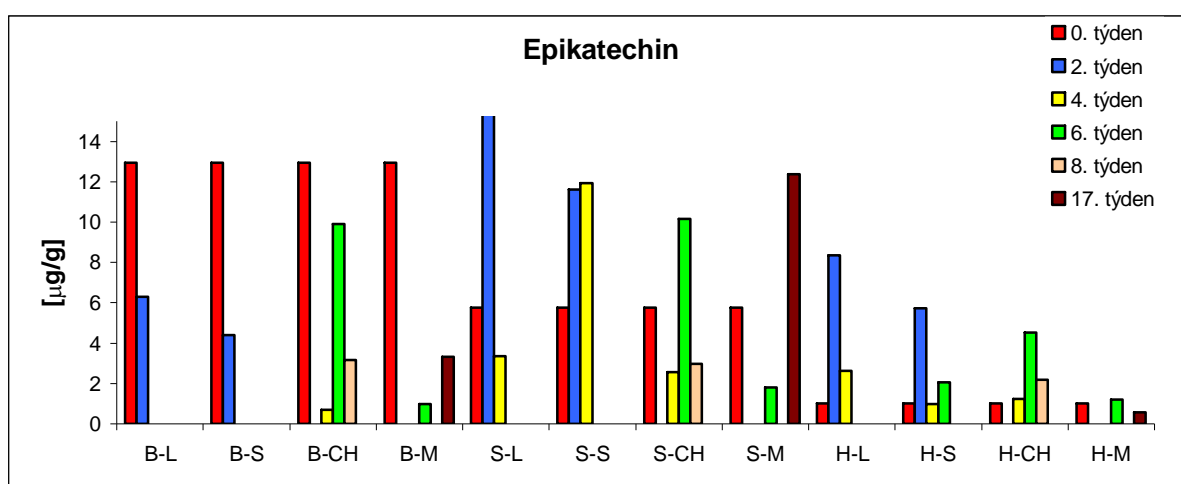
Graf 27: Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na obsah katechinu v gramu jedlého podílu ovoce

Zvýšené hodnoty jsou pravděpodobně způsobeny tím, že došlo k postupnému uvolnění katechinů z vázaných forem nebo k částečné destabilizaci biologického materiálu v průběhu mražení spojené s uvolněním z vázaných forem při rozpražení a zpracování.

4.8.4.2 Epikatechin

Výsledky série 1 - Vliv různé teploty skladování na obsah epikatechinu:

U broskví byl naměřen ve všech plodech skladovaných při různých teplotách pokles obsahu epikatechinu na gram jedlého podílu ovoce.



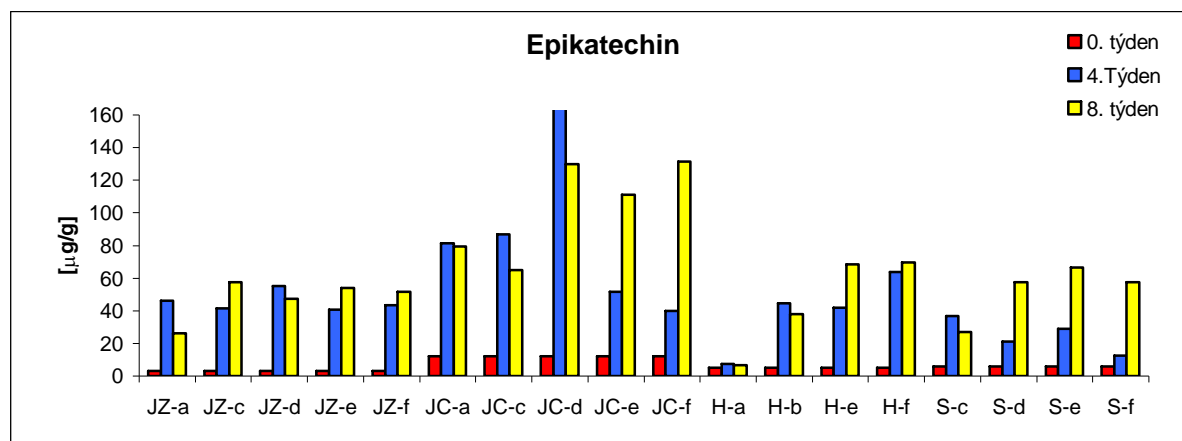
Graf 28: Vliv různých skladovacích teplot na obsah epikatechinu v gramu jedlého podílu ovoce

U švestek a hroznů byl pozorován naopak vzestup této látky vlivem skladování.

Všechny hodnoty silně kolísaly. Výrazně nižší obsah epikatechinu v nultém týdnu pokusu byl zjištěn oproti ostatním dvou druhům v plodech hroznů (viz Graf 28).

Výsledky série 2 - Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na obsah epikatechinu:

U všech měřených plodů a forem zpracování v tomto pokusu byl zjištěn velký nárůst obsahu epikatechinu v gramu jedlého podílu vlivem dlouhodobého skladování. U některých vzorků se tak dělo lineárně, u jiných kolísavě (viz Graf 29).



Graf 29: Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na obsah epikatechinu v gramu jedlého podílu ovoce

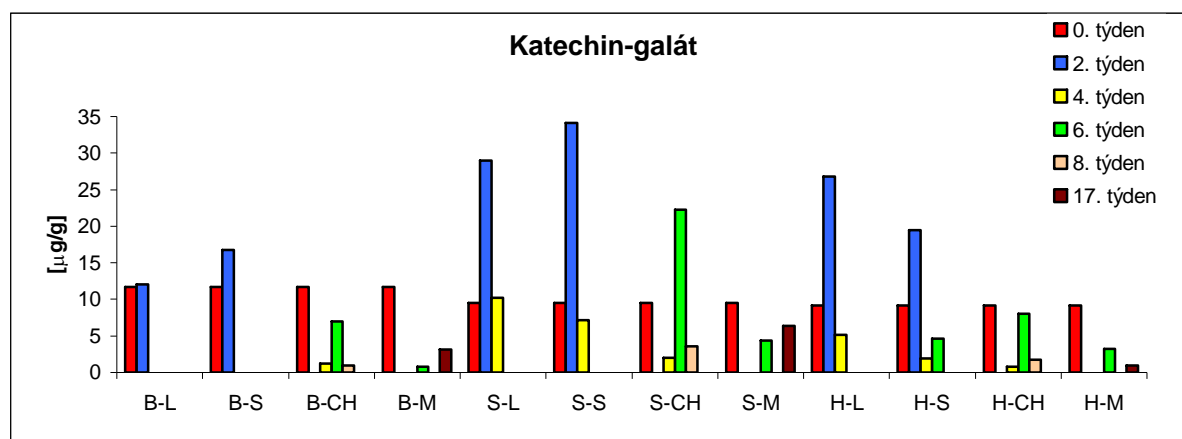
V rozporu s trendem zaznamenaným u hodnot celkových polyfenolů, které klesaly, se tyto již v počátku vysoké hodnoty dále zvyšovaly.

4.8.4.3 Katechin-galát

Výsledky série 1 - Vliv různých teplot skladování na obsah katechin-galátu:

U broskví skladovaných v laboratoři a ve sklepě byl naměřen malý přírůstek obsahu katechi-galátu. U dalších dvou skladovacích teplot katechin-galát vlivem skladování klesal.

Ve švestkách byl zjištěn přírůstek pouze u plodů uložených v laboratoři. U ostatních teplot byl pozorován spíše pokles obsahu katechin-galátu. (Hodnoty měření v druhém týdnu skladování však byly silně vychýleny v pozitivním směru.)



Graf 30: Vliv různých skladovacích teplot na obsah katechin-galátu v gramu jedlého podílu ovoce

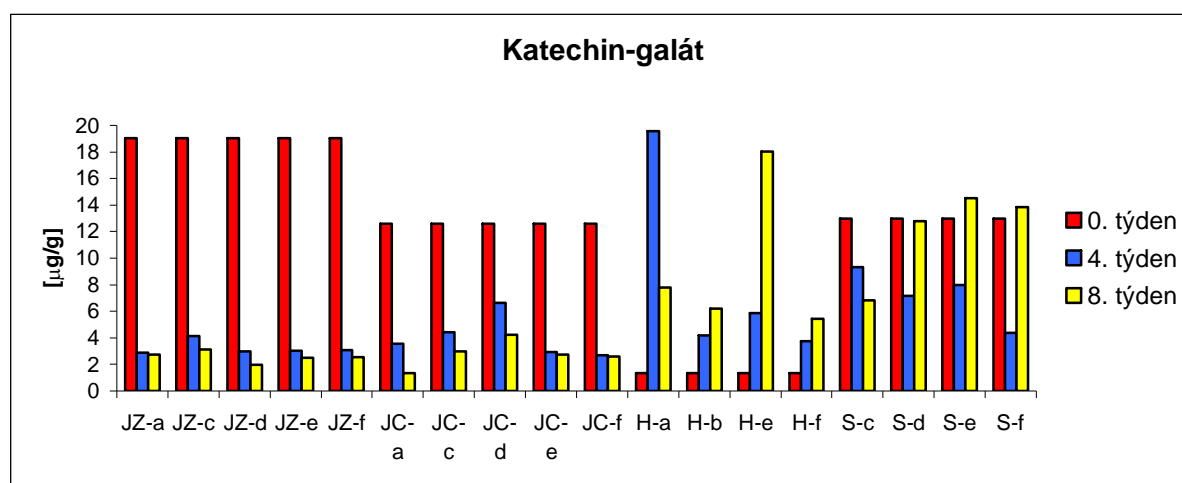
U hroznů byl zaznamenán pokles u plodů skladovaných při všech sledovaných teplotách. (Opět zde byla pozorována odchylka v druhém týdnu měření jako u švestek. Směr závislosti byl přesto ale spíše klesající-viz Graf 30).

Výsledky série 2 - Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na obsah katechin-galátu:

Při studiu vlivu formy zpracování s následnou úchovou v mrazničce bylo zjištěno, že nejvyšší obsah katechin-galátu v čerstvých plodech se nachází v jablkách zelených. Zde byl zaznamenán prudký pokles jeho obsahu vlivem dlouhodobého skladování v mrazničce u všech způsobů zpracování. Stejný úbytek byl sledován i u jablek červených.

Hrozny naopak vykazovaly přírůstek obsahu katechin-galátu v závislosti na čase (také ve všech druzích zpracování).

Ve švestkách se projevilo spíše kolísání obsahu této látky v závislosti na čase. Pouze u neimpregnovaných měsíčků byl zaznamenán pokles (viz Graf 31).



Graf 31: Vliv různé formy zpracování s následným zamražením na obsah katechin-galátu v gramu jedlého podílu ovoce

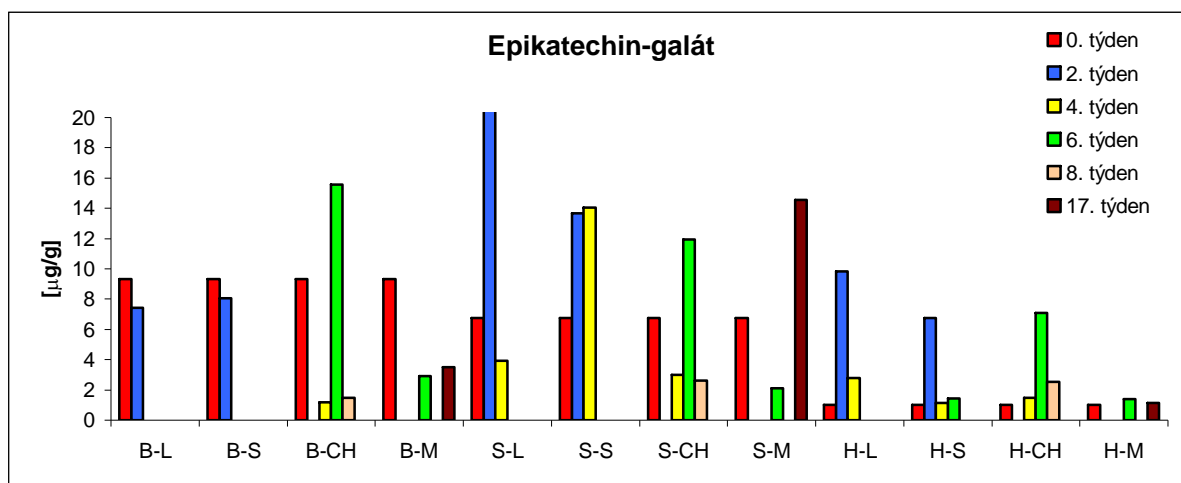
Zde by zaznamenána druhově specifická odezva. U některých nastal pokles v hodnotách katechin-galátu (velmi výrazný u jablek, méně výrazný u švestek). V hroznech byly detekovány zvyšující se hodnoty v průběhu uchování.

4.8.4.4 Epikatechin-galát

Výsledky série 1 - Vliv různých teplot skladování na obsah epikatechin-galátu:

U broskví byl změřen úbytek epikatechin-galátu v gramu jedlého podílu při skladování ve všech sledovaných teplotách.

Ve švestkách skladovaných ve sklepě byl zjištěn jednoznačný nárůst. Plody z chladničky vykazovaly pokles hodnoty epikatechin-galátu v závislosti na čase s pozitivně odchýlenou hodnotou v 6. týdnu pokusu. U ovoce z laboratoře a z mrazničky nelze jednoznačně říci, zda hodnota klesá či stoupá. Odchylky jsou patrné v obou směrech od hodnoty změřené při zahájení pokusu.

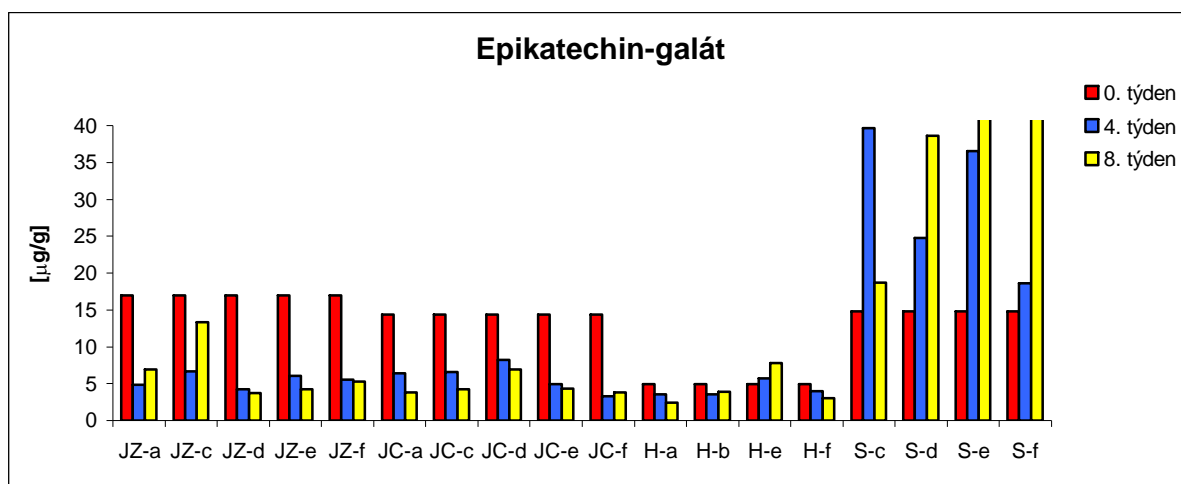


Graf 32: Vliv různých skladovacích teplot na obsah epikatechin-galátu v gramu jedlého podílu ovoce

V hroznech byla zjištěna stoupající tendence obsahu této látky v průběhu skladování. Pouze u plodů z mrazničky se projevilo spíše kolísání kolem střední hodnoty než evidentní chod (viz Graf 32).

Výsledky série 2 - Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na obsah epikatechin-galátu:

U plodů podrobených pokusu mražení plodů po různém zpracování byl zaznamenán výraznější pokles obsahu epikatechin-galátu v čase u obou druhů jablek (zelených i červených). Zelená jablka vykazovala při zahájení pokusu nejvyšší obsah této látky.



Graf 33: Vliv různé formy zpracování na obsah epikatechin-galátu v gramu jedlého podílu ovoce

V hroznech zpracovaných do podoby neslazené dřeně došlo k malému nárůstu obsahu epikatechin-galátu. U ostatních forem zpracování obsah poklesl, ne však tak výrazně jako u plodů jablek. Ve švestkách byl změřen jednoznačný nárůst obsahu epikatechin-galátu v čase (u neimpregnovaných měsíčků jevíla závislost kolísavý chod, u ostatních forem zpracování

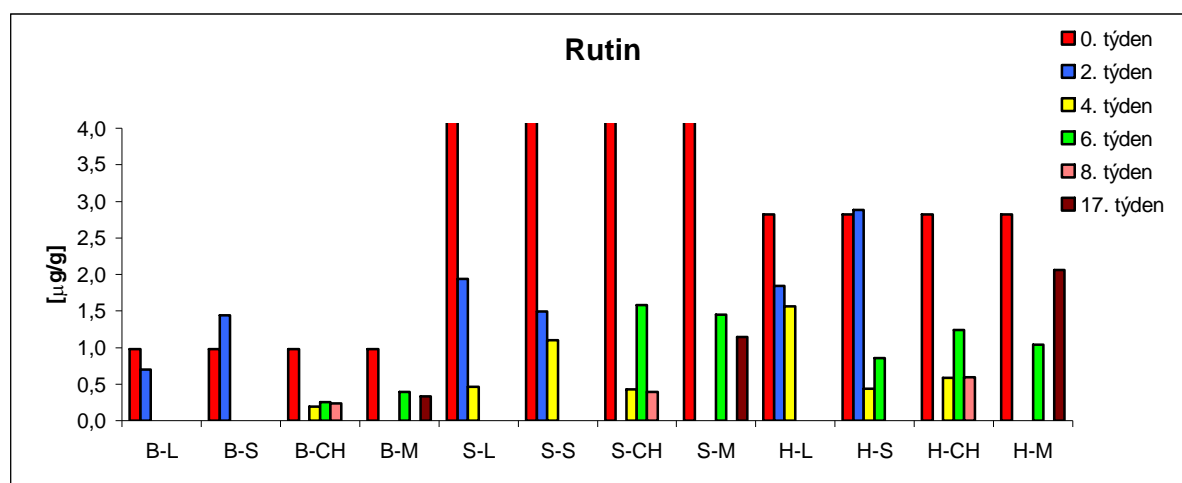
lineární). Na konci pokusu byly nejvyšší hodnoty této látky naměřeny právě v plodech švestek, kde mnohonásobně překračovaly hodnoty získané z ostatních plodů (viz Graf 33).

4.8.4.5 Rutin

Výsledky série 1 - Vliv různých teplot skladování na obsah rutinu:

Obsah rutinu v broskvích vlivem skladování v laboratoři, v ledničce a v mrazničce klesl. U plodů uchovaných ve sklepě byl zjištěn malý nárůst.

Ve švestkách obsah rutinu poklesl u všech skladovacích teplot. V plodech z laboratoře a ze sklepa byla závislost lineární, u ostatních teplot kolísavá.



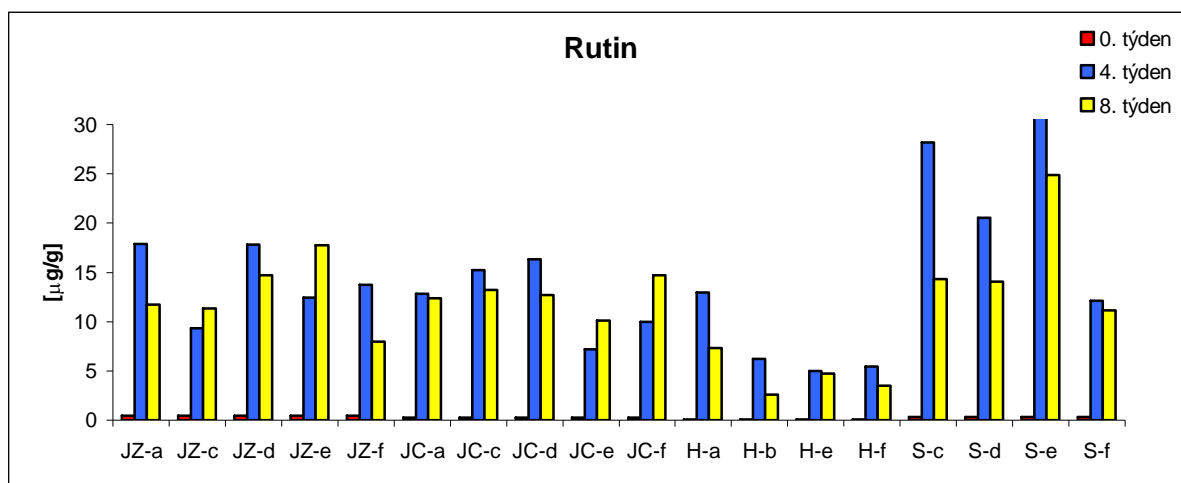
Graf 34: Vliv různých teplot skladování na obsah rutinu v gramu jedlého podílu ovoce

V hroznech byl pozorován také pokles obsahu rutinu, většinou se tak dělo kolísavým chodem.

Nejvyšší hodnoty této látky v nultém týdnu skladování byly zjištěny ve švestkách (viz Graf 34).

Výsledky série 2 - Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na obsah rutinu:

Při sledování rutinu v různě zpracovaných plodech jablek, švestek a hroznů byl zjištěn jednoznačný nárůst obsahu oproti prvně měřené hodnotě při zahájení pokusu. V osmém týdnu obsah většinou poklesl pod hodnotu ze čtvrtého týdne, stále však byl výrazně vyšší než na začátku měření. Nejvýraznější přírůstek byl zaznamenán u švestek, nejnižší u hroznů (viz Graf 35).

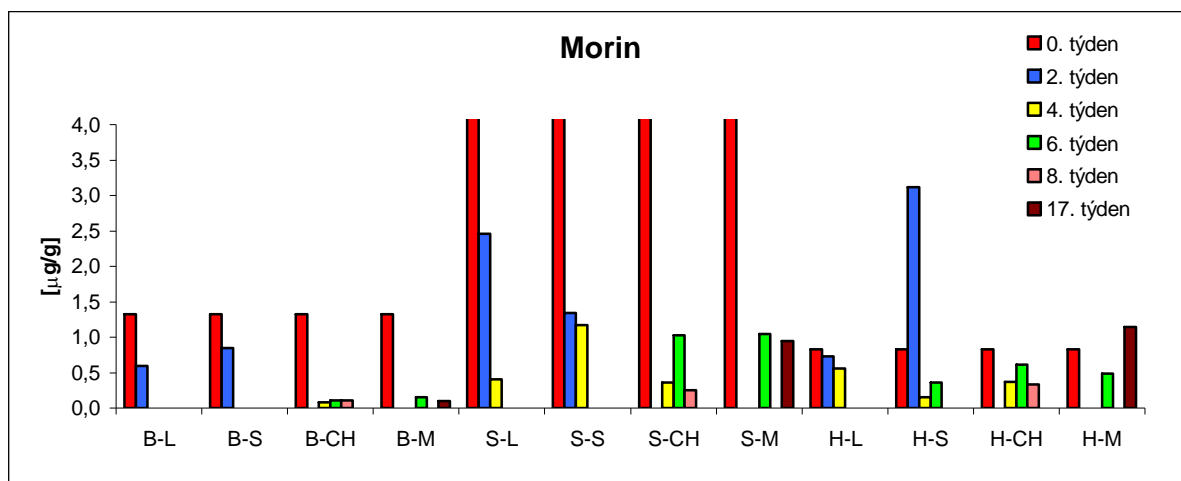


Graf 35: Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na obsah rutinu v gramu jedlého podílu ovoce

4.8.4.6 Morin

Výsledky série 1 - Vliv různých teplot skladování na obsah morinu:

Ve všech plodech podrobených této analýze a ve všech zkoumaných skladovacích teplotách byl naměřen pokles obsahu morinu (vyjma hroznů uchovávaných v mrazničce, kde obsah morinu nejdříve klesl, pak stoupl. Zde nelze jednoznačně říci, jaký směr závislost měla.). Snížení obsahu této látky se dělo většinou postupně v závislosti na délce skladování. Nejvyšší obsah v nultém týdnu pokusu byl zjištěn ve švestkách, nejnižší v hroznech (viz Graf 36).



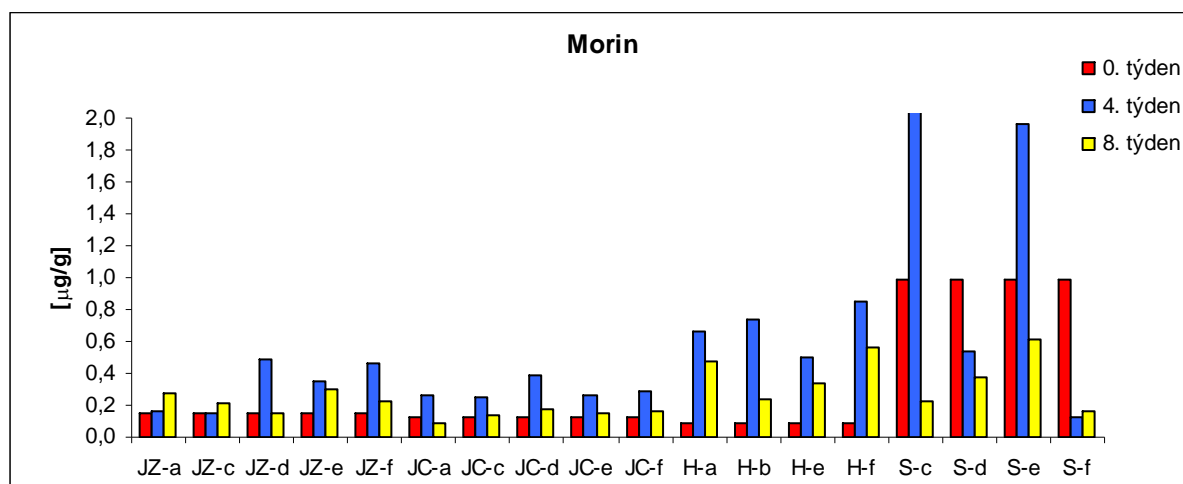
Graf 36: Vliv různých teplot skladování na obsah morinu v gramu jedlého podílu ovoce

Výsledky série 2 - Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na obsah morinu:

Lineární nárůst morinu v čase byl zaznamenán pouze u jablek zelených zpracovaných do podoby celých mražených plodů a měsíčků bez impregnace. U ostatních způsobů zpracování tohoto druhu ovoce byl změřen nárůst obsahu morinu ve čtvrtém týdnu proti hodnotě při zahájení analýzy, v osmém týdnu nastal opět pokles. Z celkového pohledu je možné říci, že

v dřenicích došlo k nárůstu obsahu této látky. V impregnovaných měsíčkách byly vyrovnány hodnoty z nultého a osmého týdne, obsah morinu zde kolísal.

U jablek červených byla vždy hodnota ve čtvrtém týdnu měření vyšší než v týdnu nultém, v osmém došlo ke zpětnému poklesu. Z celkového pohledu obsah morinu kolísavě stoupl v měsíčkách s impregnací i bez a v obou typech dření. Nepravidelný pokles byl zjištěn v celých mražených plodech.



Graf 37: Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na obsah morinu v gramu jedlého podílu ovoce

Hrozny vykazovaly u všech typů zpracování stejný tvar závislosti. Ve čtvrtém týdnu hodnota vzrostla, v osmém týdnu klesla (stále však byla vyšší než hodnota změřená v nultém týdnu pokusu). Obsah morinu zde tedy kolísavě rostl.

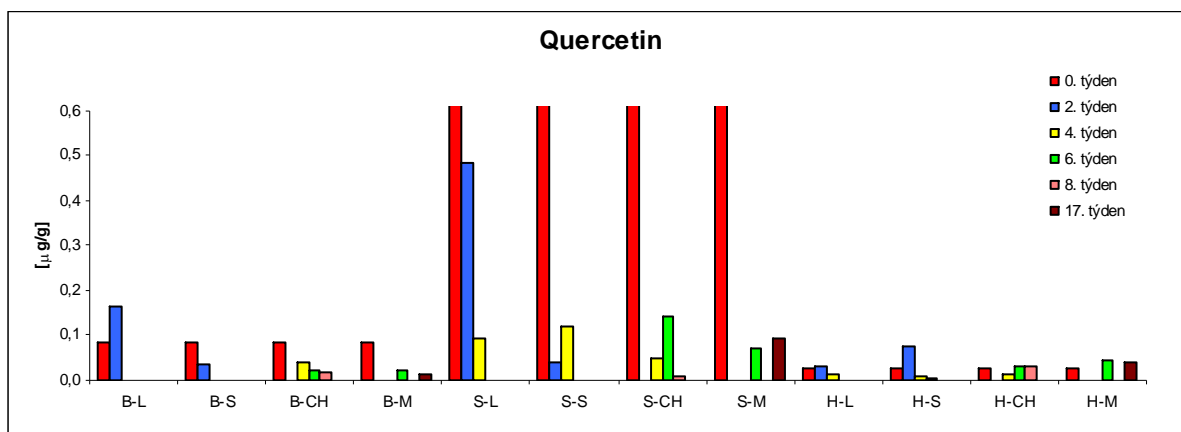
U švestek byl zjištěn pokles obsahu této látky v průběhu skladování u všech forem zpracování. U měsíčků bez ošetření a neslazených dření byla hodnota druhého měření vyšší než ta z měření prvního. Z celkového pohledu ale obsah klesl (viz Graf 37).

4.8.4.7 Quercetin

Výsledky série 1 - Vliv různých teplot skladování na obsah quercetinu:

Nejvyšší hodnota quercetinu v nultém týdnu pokusu byla zjištěna ve švestkách, nejnižší pak v hroznech.

Obsah této látky poklesl v plodech švestek u všech skladovacích teplot a u broskví v plodech uložených ve sklepě, lednici a mrazničce. V broskvích z laboratoře se projevil mírný nárůst.



Graf 38: Vliv různých teplot skladování na obsah quercetinu v gramu jedlého podílu ovoce

V hroznech uložených v laboratoři a ve sklepě byl zaznamenán kolísavý pokles a u plodů z mrazničky nárůst obsahu quercetinu. V hroznech z ledničky obsah kolísal. Obecně však v hroznech nebyly změny v koncentraci quercetinu nijak výrazné (viz Graf 38).

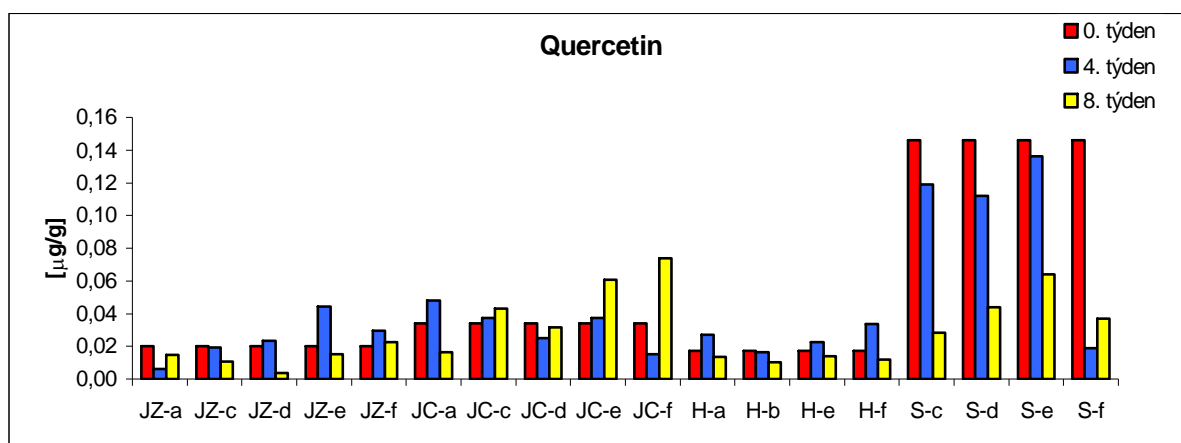
Výsledky série 2 - Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na obsah quercetinu:

U jablek zelených byl změřen pokles hodnoty quercetinu v celých plodech a v obou druzích měsíčků. V proslazené dřeni byl vidět mírný nárůst obsahu. V neimpregnované dřeni byla hodnota ve čtvrtém týdnu asi dvakrát vyšší než ta z týdne nultého, při třetím měření opět poklesla a to až pod hodnotu prvního měření. Z porovnání odchylek se dá říci, že zde obsah taktéž roste, ale velmi kolísavě.

U jablek červených byl zjištěn pokles obsahu této látky v celých plodech a v impregnovaných měsíčcích, nárůst pak v neošetřených měsíčcích a v neslazené dřeni. Směr závislosti v proslazené dřeni se nedá určit, obě hodnoty jsou dost odlehlé.

U hroznů se směr závislosti většinou také nedá určit (ze stejného důvodu jako u proslazené dřene červeného jablka), hodnoty kolísají. Pouze u impregnovaných celých plodů je viditelný pokles obsahu quercetinu v závislosti na délce skladování.

U švestek byl zjištěn nejvyšší obsah quercetinu v nultém týdnu pokusu ze všech měřených plodů. U tohoto druhu došlo vlivem skladování v mrazničce k evidentnímu poklesu koncentrace této látky (viz Graf 39).



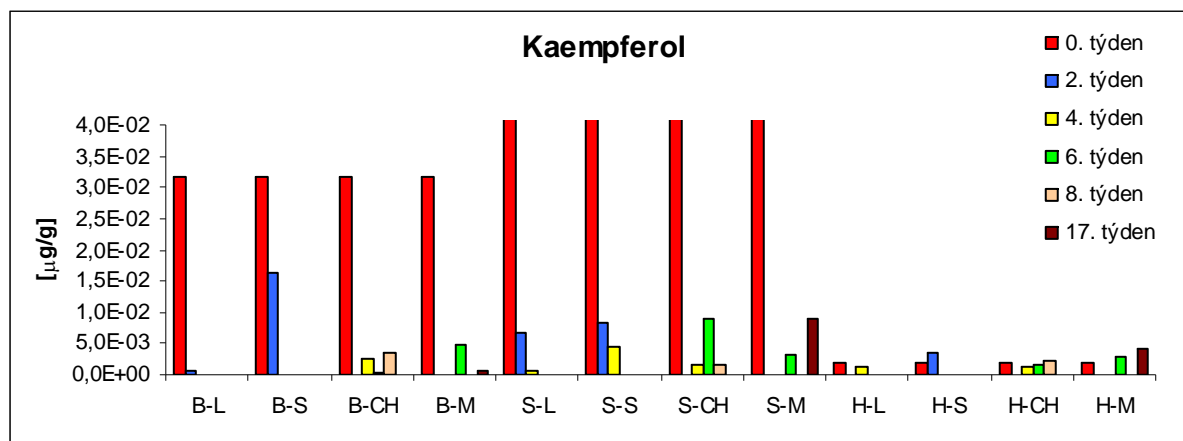
Graf 39: Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na obsah quercetinu v gramu jedlého podílu ovoce

U této látky byly vlivem uchování plodů v mrazničce zaznamenány poklesy případně stagnace hodnot. Obecně byl quercetin detekován ve velmi malém množství.

4.8.4.8 Kaempferol

Výsledky série 1 - Vliv různých teplot skladování na obsah kaempferolu:

Hodnoty kaempferolu v broskvích a švestkách v nultém týdnu analýzy byly výrazně vyšší než u hroznů. V těchto dvou druzích došlo k viditelnému poklesu koncentrace u všech skladovacích teplot.



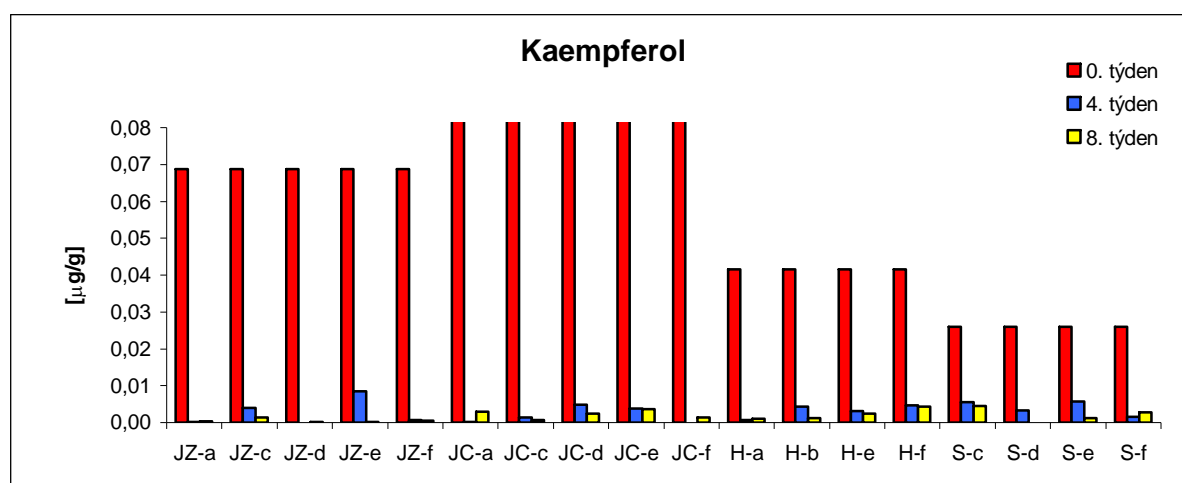
Graf 40: Vliv různých teplot skladování na obsah kaempferolu v gramu jedlého podílu ovoce

V hroznech uložených v laboratoři a ve sklepě byl zjištěn pokles obsahu kaempferolu. Mezi hodnotami naměřenými v plodech z ledničky byly jen velmi malé rozdíly. Po počátečním mírném poklesu obsah nejspíš roste. Růst byl zaznamenán i u plodů z mrazničky (viz Graf 40).

Výsledky série 2 - Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na obsah kaempferolu:

V nultém týdnu byly ve všech plodech zjištěny poměrně vysoké hodnoty kaempferolu. Nejvyšší v jablkách červených, pak v zelených. Nejnižší hodnoty byly zjištěny u švestek. Hodnoty kaempferolu u švestek v nultém týdnu se řádově shodují s hodnotami diskutovanými o odstavec výše. Není tomu tak ale u hodnot hroznů. Při tomto měření byly zjištěny daleko vyšší hodnoty koncentrace kaempferolu v hroznech v nultém týdnu měření než při analýze vlivu teplot. To je dáno tím, že byly zakoupeny odlišné vzorky na obě dvě analýzy. Obě měření probíhala v jiném ročním období a to se podepsalo i na kvalitě zakoupených vzorků.

Hodnota kaempferolu v průběhu uchování v mrazničce výrazně klesla u všech druhů ovoce a u všech forem zpracování (viz Graf 41).



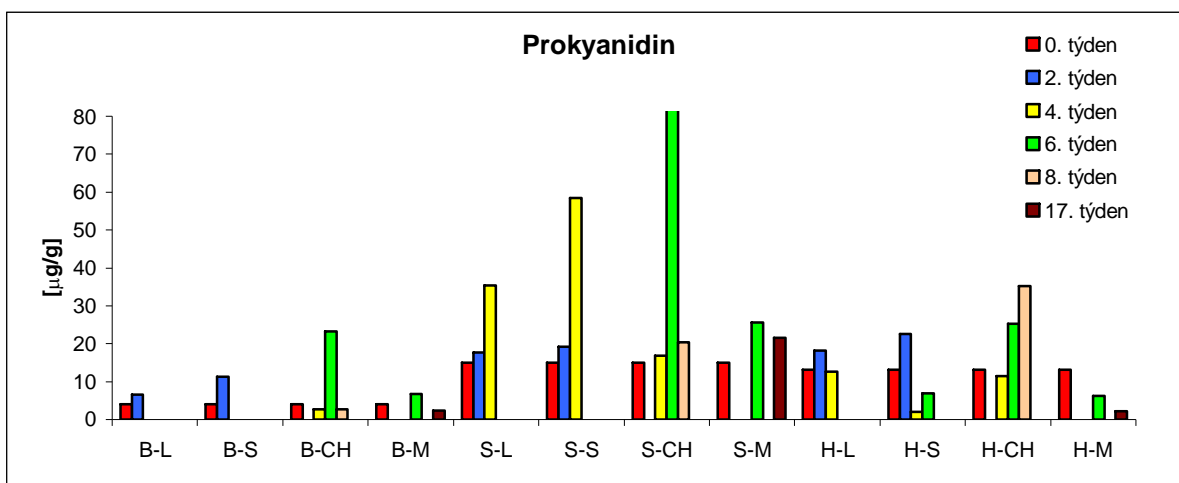
Graf 41: Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na obsah kaempferolu v gramu jedlého podílu ovoce

U kaempferolu byly zaznamenány významné poklesy jeho obsahu vlivem uchování v mrazničce u všech měřených druhů ovoce a u všech forem zpracování před mražením. Obecně je jeho zastoupení v ovoci velmi malé.

4.8.4.9 Prokyanidin

Výsledky série 1 - Vliv různých teplot skladování na obsah prokyanidinu:

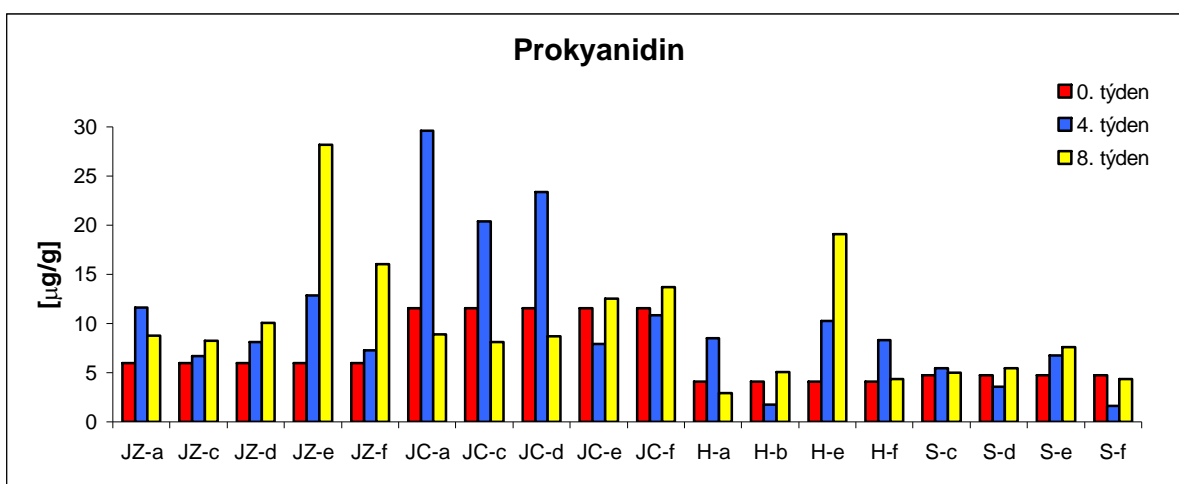
U hroznů skladovaných ve sklepě a u broskví z mrazničky byl zaznamenán kolísavý pokles. V hroznech z mrazničky byl také evidentní pokles prokyanidinu, stejně tak v broskvích uchovávaných v ledničce (zde byla výrazně pozitivně odchýlena hodnota zjištěná v šestém týdnu měření, celkový trend byl však klesající). Směr závislosti nelze určit v případě hroznů uložených v lednici. U všech ostatních vzorků hodnoty prokyanidinu v závislosti na čase rostly (viz Graf 42).



Graf 42: Vliv různých teplot skladování na obsah prokyanidinu v gramu jedlého podílu ovoce

Výsledky série 2 - Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na obsah prokyanidinu:

V tomto pokusu hodnoty prokyanidinu také povětšinou rostly. Samozřejmě se vyskytlo pár výjimek. U švestkové proslazené dřeně došlo ke kolísavému poklesu obsahu prokyanidinu. V červených jablkách zpracovaných do podoby celých plodů a obou typů měsíčků a u celých neimpregnovaných hroznů měla závislost v porovnání s ostatními plody a formami zpracování odlišný tvar. Hodnota zjištěná ve čtvrtém týdnu se výrazně zvýšila. V osmém týdnu pak byl zaznamenán obsah prokyanidinu naopak nižší než při prvním měření. Vzhledem k tomu, že pozitivní odchylka je větší než ta negativní, byl stanoven závěr, že v těchto vzorcích obsah prokyanidinu také roste (viz Graf 43).



Graf 43: Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na obsah prokyanidinu v gramu jedlého podílu ovoce

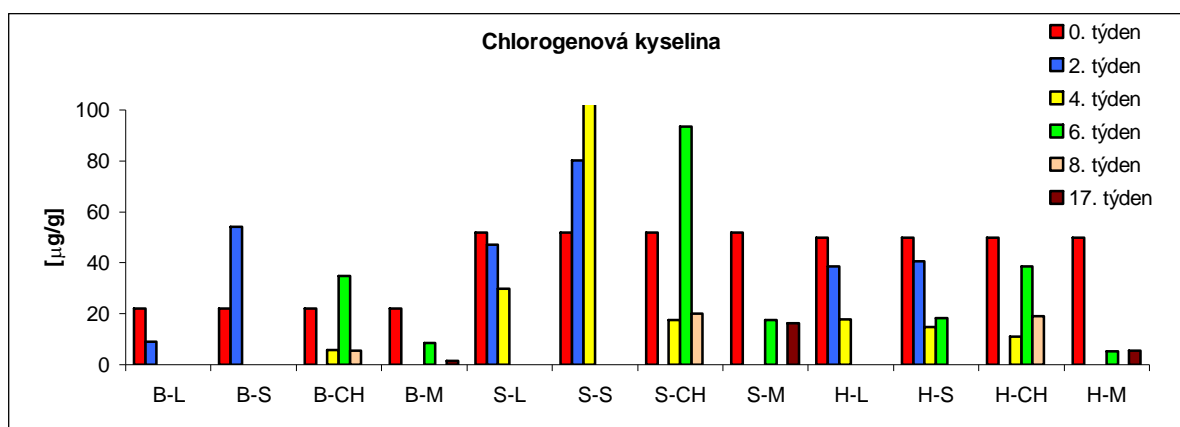
Prokyanidin byl detekován ve vyšší koncentraci už v čerstvých plodech před zahájením pokusu vlivu způsobu zpracování před mražením na obsah biologicky aktivních látek v ovoci. Během skladování se jeho koncentrace nadále zvyšovala.

4.8.4.10 Kyselina chlorogenová

Výsledky série 1 - Vliv různých teplot skladování na obsah kyseliny chlorogenové:

U broskví a švestek, které byly uloženy v laboratoři, ledničce a mrazničce, byl zjištěn pokles obsahu kyseliny chlorogenové na gram jedlého podílu ovoce. U vzorků skladovaných ve sklepě byl naměřen vzrůst koncentrace této látky (u švestek velmi výrazný).

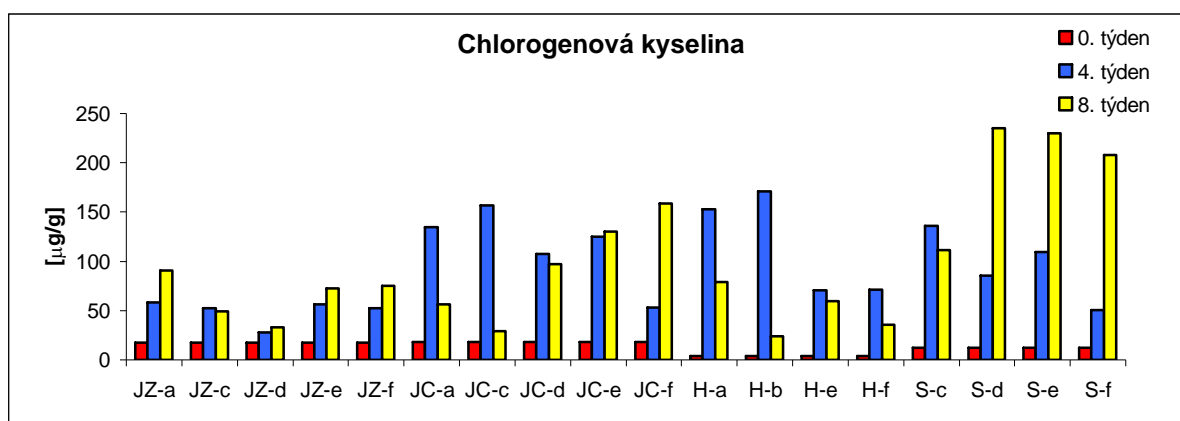
Ve všech vzorcích hroznů obsah kyseliny chlorogenové během skladování klesl (viz Graf 44).



Graf 44: Vliv různých teplot skladování na obsah kyseliny chlorogenové v gramu jedlého podílu ovoce

Výsledky série 2 - Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na obsah kyseliny chlorogenové:

Při sledování obsahu kyseliny chlorogenové ve vzorcích, které byly nejdříve různě zpracovány a pak skladovány v mrazničce, byl zjištěn velký nárůst. U všech hroznů, některých forem červených jablek a u švestkových měsíčků bez impregnace byla nejvyšší hodnota naměřena ve čtvrtém týdnu skladování. U ostatních vzorků v týdnu osmém (viz Graf 45).



Graf 45: Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na obsah chlorogenové kyseliny v gramu jedlého podílu ovoce

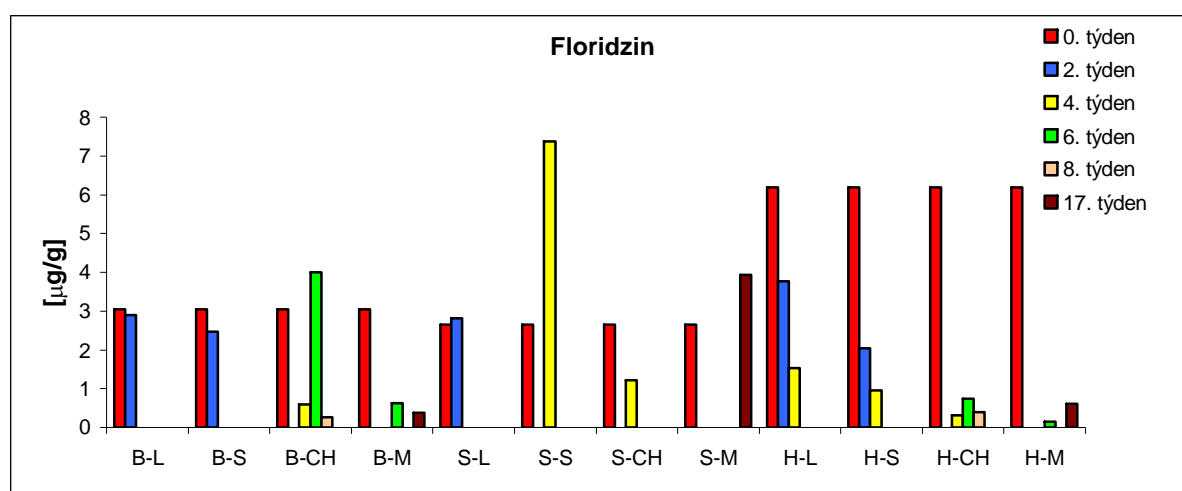
Kyselina chlorogenová byla detekována ve vyšší koncentraci již v čerstvých vzorcích před zahájením pokusu vlivu způsobu zpracování před mražením na obsah biologicky aktivních látek v ovoci. Během skladování se její koncentrace nadále zvyšovala.

4.8.4.11 Floridzin

Výsledky série 1 - Vliv různých teplot skladování na obsah floridzinu:

Ve všech vzorcích hroznů a broskví byl zaznamenán pokles této látky vlivem skladování. U hroznů byl velmi výrazný. U tohoto druhu ovoce byla také zjištěna nejvyšší naměřená hodnota floridzinu při zahájení pokusu ze všech vzorků. V plodech uložených v laboratoři (u broskví i ve sklepě) byl pokles mírnější, u ostatních skladovacích teplot prudší.

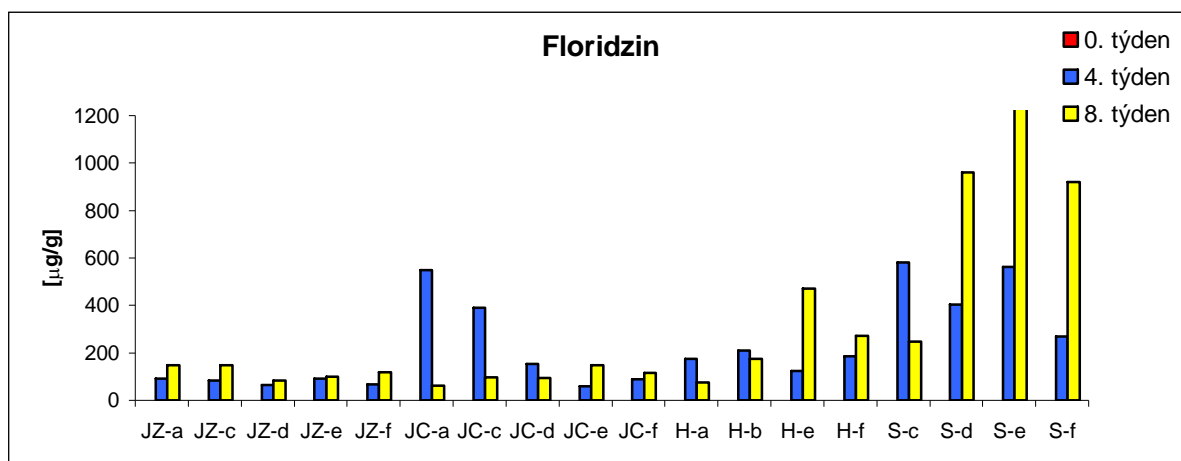
Obsah floridzinu ve švestkách uložených v chladničce klesal, u ostatních typů skladovacích teplot stoupal (u plodů uložených ve sklepě výrazně-viz Graf 46).



Graf 46: Vliv různých teplot skladování na obsah floridzinu v gramu jedlého podílu ovoce

Výsledky série 2 - Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na obsah floridzinu:

Vlivem úchovy vzorků v mrazničce obsah floridzinu stoupl ve všech druzích ovoce podrobených této analýze. V porovnání s hodnotami zjištěnými v dalších týdnech skladování, byl obsah floridzinu v čerstvých vzorcích nepatrný. U některých vzorků byl nárůst lineární, u dalších kolísavý. Výrazný propad hodnoty v osmém týdnu oproti hodnotě z týdnu čtvrtého byl zjištěn ve švestkových neopracovaných měsíčkách, dále v červeném jablku zpracovaném do podoby celých plodů a neimpregnovaných měsíčků (viz Graf 47).

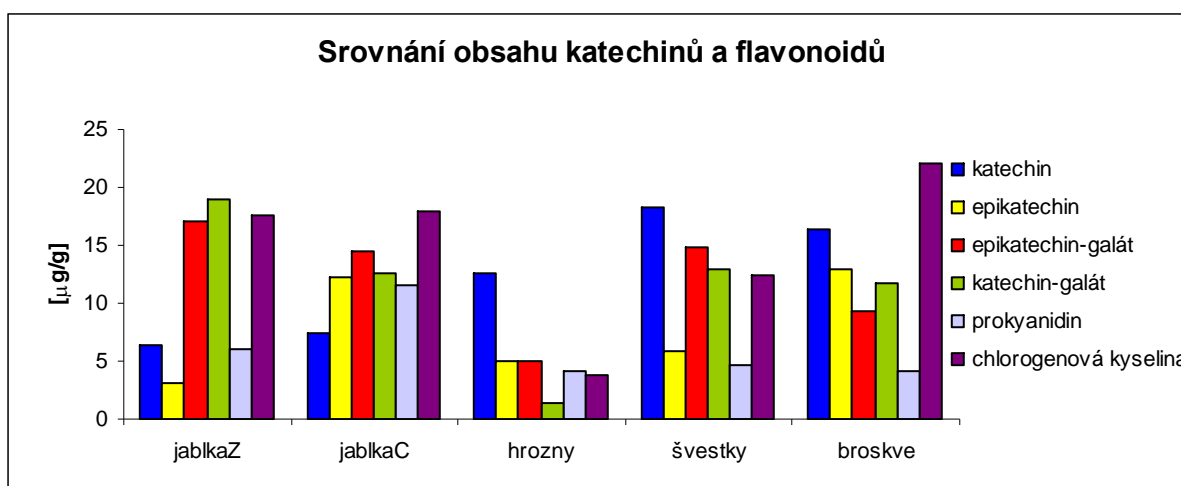


Graf 47: Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na obsah floridzinu v gramu jedlého podílu ovoce

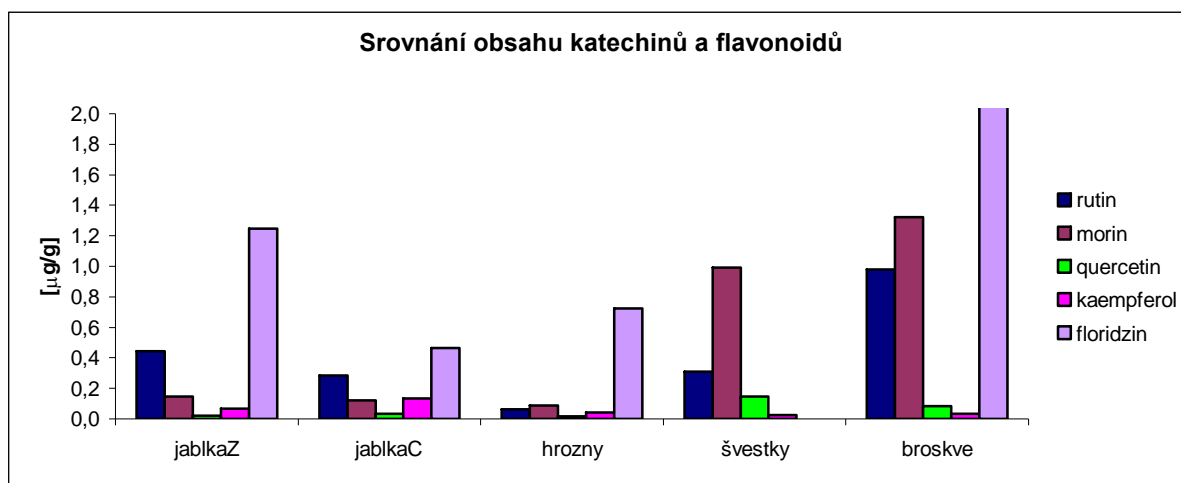
4.8.5 Srovnání obsahu flavonoidů a katechinů

Byly vzájemně srovnány hodnoty obsahu katechinů a flavonoidů v čerstvých vzorcích ovoce (tzn. hodnot z nultého týdne) před zahájením skladování nebo před zpracováním do různých forem. Byly srovnávány čtyři druhy ovoce: jablka (červená i zelená), broskve, švestky a hrozny. Měření byla provedena ihned po přinesení vzorků do laboratoře, bez povrchové či jiné úpravy před uložením do různých skladovacích teplot. Toto srovnání slouží pro zjištění obsahu jednotlivých antioxidačních zástupců a dále na zjištění případných výrazných odlišností v průběhu uchování plodů mezi různými druhy.

Byly vytvořeny dvě skupiny těchto látek. V jedné byly porovnány: katechin, epikatechin a jejich galáty, prokyanidin a chlorogenová kyselina (viz Graf 48). Tyto sloučeniny měly řádově vyšší zastoupení než látky ze skupiny druhé. V druhé skupině byly vzájemně zhodnoceny: rutin, morin, quercetin, kaempferol a floridzin (viz Graf 49).



Graf 48: Srovnání vybraných katechinů a flavonoidů v měřených druzích ovoce 1



Graf 49: Srovnání vybraných katechinů a flavonoidů v měřených druzích ovoce 2

Pro srovnání s hodnotami celkových flavonoidů a polyfenolů měřených spektrofotometrickou metodou (viz 4.7) je nutné podotknout, že celkové parametry jsou zastoupeny v obsahu jednotek mg/g, kdežto jednotlivé parametry měřené na HPLC jsou v zastoupení jednotek, maximálně desítek µg/g. I když byl tedy u většiny jednotlivých flavonoidů a katechinů zaznamenán nárůst hodnot (a zpravidla i velký) v průběhu skladování, přesto hodnoty celkových parametrů klesaly.

Nízké zastoupení flavonoidů a katechinů v porovnání s ostatními druhy ovoce bylo zjištěno v hroznech. V jablkách byl zjištěn vyšší obsah katechinů a epikatechinů než jejich galátů. V broskvích tomu bylo přesně naopak. U jablek, švestek a broskví byla také ve významné míře zastoupena kyselina chlorogenová. U hroznů zase hrál dominantní roli katechin.

Významně vyšší koncentrace floridzinu byly zjištěny v plodech jablek a také broskví. V broskvích byl ve větší koncentraci nalezen i morin a rutin.

Hodnoty quercetinu a kaempferolu byly v porovnání s ostatními ve velmi malých koncentracích.

U vzorků skladovaných v mrazničce byla zpravidla zaznamenána nějaká výraznější změna (ať už pozitivní nebo negativní) na začátku pokusu, další vývoj pak už většinou nebyl tak dramatický. Rozdíly mezi jednotlivými formami zpracování nebyly pozorovány, mezi jednotlivými druhy ovoce ano, ale směry závislosti byly většinou stejné.

U vzorků uložených při laboratorní teplotě, ve sklepě a v lednici byly pozorovány výrazné výkyvy (kolísavá závislost) v průběhu skladování. Signalizuje to rychleji probíhající metabolické procesy plodů. Rozdíly mezi takto naměřenými hodnotami v jedné sérii vzorků v průběhu skladování nebyly tak patrné jako u mražených verzí. To pouze potvrzuje domněnku, že se biologicky aktivní látky při mírnějších skladovacích teplotách tolik neničí jako v mrazničce, údržnost je ovšem podstatně omezena.

V přílohách (viz Příloha 4, Příloha 5) jsou vloženy tabulky, kde jsou přehledně graficky shrnuty závislosti jednotlivých katechinů a flavonoidů na čase. Šipkami jsou vyznačeny stoupající či klesající směry, případně kolísání, u každého druhu měřeného ovoce, u všech forem zpracování a u všech teplot skladování.

4.9 Sledování enzymových antioxidantů – superoxiddismutasa (SOD)

SOD byla stanovena pomocí kitu Ransod od firmy Randox. Vychytává superoxidové radikály, čímž brání vzniku červeného komplexu formazanu. Intenzita barevné změny je sledována spektrofotometricky.

Jelikož byl zmiňovaný kit finančně nákladný, byla provedena pouze jedna analýza v každém vzorku. Všechny naměřené hodnoty byly zpracovány tak, jak je uvedeno v části 3.8.1 a přepočítány na aktivitu v mezinárodních jednotkách (množství přeměněného substrátu v μ molech za jednotku času v minutách) a v kataltech (množství přeměněného substrátu v molech za jednotku času v sekundách) v gramu jedlého podílu ovoce.

4.9.1 Výsledky studie 1 -Vliv různých skladovacích teplot na obsah SOD

Aktivita SOD v závislosti na teplotě uchovávání byla sledována u 4 druhů ovoce (jablka zelená a červená, švestky, hrozny, broskve) uchovávaných při 3 různých teplotách (laboratoř, sklep, lednice) a orientačně i zmražením celých plodů. Na stanovení byla použita část ovoce zpracovaná s PVP a Tritonem X-100 pod tekutým dusíkem (viz 3.2). V dalším textu jsou srovnány výsledky aktivit v plodech v rámci 1.studie. Přehledně jsou data shrnuta v následujících dvou tabulkách.

Tabulka 13: Naměřené hodnoty aktivity SOD v kataltech na gram jedlého podílu v broskvích, švestkách a hroznech skladovaných při různých teplotách

ovoce	místo skladování	SOD [katal/g]					
		0. týden	2. týden	4. týden	6. týden	8. týden	17. týden
broskve	laboratoř	4,43E-08	1,71E-07	-	-	-	
	sklep		1,85E-07	-	-	-	
	lednice		1,61E-07	1,92E-06	9,72E-08	8,07E-08	
	mrazicí box				6,86E-08		1,13E-07
hrozny	laboratoř	2,85E-08	7,47E-08	1,59E-07	-	-	
	sklep		1,19E-07	1,59E-06	1,00E-07	-	
	lednice		9,45E-08	1,20E-06	1,12E-07	7,27E-08	
	mrazicí box				1,12E-08		5,89E-08
švestky	laboratoř	*	2,09E-07	1,38E-07	-	-	
	sklep		1,42E-07	1,43E-06	-	-	
	lednice		1,32E-07	1,01E-06	1,52E-07	9,58E-08	
	mrazicí box				1,08E-07		7,41E-08

pozn.: * pod dolní mezí detekce kitu

Tabulka 14: Naměřené hodnoty aktivity SOD v kataltech na gram jedlého podílu v jablkách zelených a červených skladovaných při různých teplotách

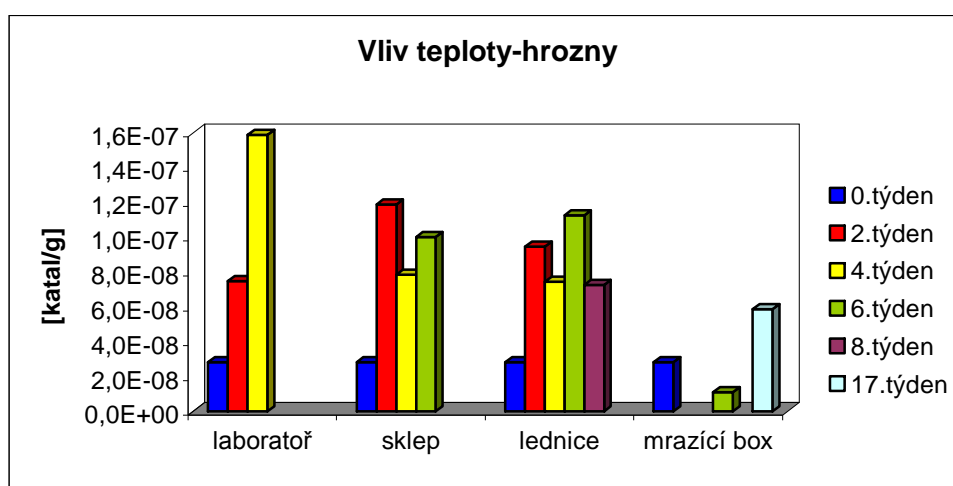
ovoce	místo skladování	SOD [katal/g]					
		1. týden	2. týden	3. týden	4. týden	5. týden	7. týden
jablka zelená	laboratoř	3,00E-08	6,54E-08	2,05E-08	4,87E-08	2,30E-08	8,24E-08
	sklep	6,75E-08	2,71E-08	*	6,42E-08	*	*
	lednice	1,74E-08	2,31E-08	4,10E-08	*	*	*
jablka červená	laboratoř	3,89E-08	7,46E-08	*	4,15E-08	1,49E-08	4,40E-08
	sklep	2,58E-08	5,72E-08	*	6,33E-08	5,84E-09	*
	lednice	3,11E-08	3,45E-08	4,26E-08	*	*	*

pozn.: * pod dolní mezí detekce kitu

U broskví skladovaných v laboratoři a ve sklepě byl pozorován nárůst aktivity SOD vztažené na gram jedlého podílu ovoce. Při dlouhodobějším měření plodů z lednice byla opět pozorována sinusová závislost. Zde byl zaznamenán prudký nárůst v druhém týdnu, pak aktivita SOD opět poklesla, stále však byla vyšší než na začátku pokusu. V plodech skladovaných v mrazničce aktivita SOD lineárně stoupala.

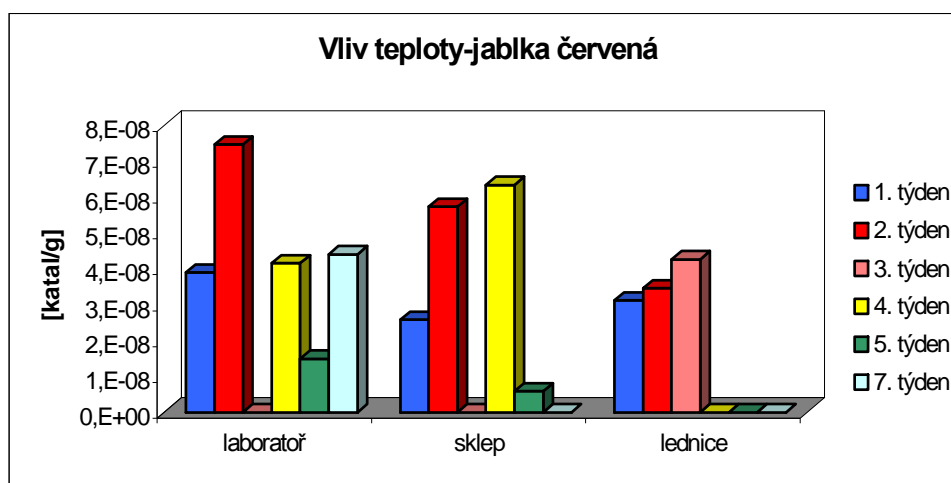
U švestek byla hodnota tohoto enzymu při zahájení pokusu pod dolní hranicí detekce kitu. Ve čtvrtém týdnu pak byl naměřen její prudký nárůst. Pro plody skladované v laboratoři a ve sklepě to byla dokonce nejvyšší zjištěná hodnota v průběhu celé doby měření. Závislosti aktivity SOD na čase vykazovaly ve všech skladovacích teplotách sinusový tvar a přírůstek.

I u hroznů měly dané závislosti kolísavý tvar a rostoucí tendenci. Pouze u plodů skladovaných v laboratoři aktivita SOD rostla lineárně (Graf 50).



Graf 50: Vliv různých skladovacích teplot na aktivitu SOD v hroznech v závislosti na čase

Sinusový tvar závislosti aktivity SOD na čase byl pozorován i u obou druhů jablek. Výjimku tvořily plody skladované v lednici. Zde byl u červené i zelené odrůdy naměřen lineární nárůst až do třetího týdne skladování, následně hodnoty aktivit klesly až pod hranici detekce kitu a tam zůstaly po celou zbývající dobu pokusu. Aktivita u jablek červených skladovaných v laboratoři a ve sklepě pozvolna rostla (Graf 51). U jablek zelených v laboratoři zvolna rostla, ve sklepě zase klesala.



Graf 51: Vliv různých skladovacích teplot na aktivitu SOD v jablkách červených v závislosti na čase

Superoxiddismutasa katalyzuje rozklad superoxidového radikálu, jeho aktivita roste u většiny vzorků 1.série s dobou uchovávání nezávisle na podmínkách ve srovnání s výchozí hodnotou.

4.9.2 Výsledky studie 2 - Vliv různého způsobu zpracování plodů s následným zamražením na aktivitu SOD

Aktivita SOD byla sledována i ve druhé sérii experimentů zaměřených na sledování změn v ovoci v průběhu uchovávání mražením s různým způsobem opracování vzorku. Test byl proveden s 7 druhy ovoce: jablky červenými a zelenými, švestkami a hrozný, borůvkami, brusinkami, malinami a jahodami. Ovoce bylo v mrazničce uchováváno po dobu 8. týdnů. Jako formy zpracování byly voleny: neopracované celé plody, impregnované celé plody, měsíčky, impregnované měsíčky, dřeň a proslazená dřeň (kap. 3.3). Na stanovení byla použita část ovoce zpracovaná s PVP a Tritonem X-100 pod tekutým dusíkem (viz 3.2). V dalším textu jsou srovnány výsledky aktivit v plodech v rámci 2.studie. Přehledně jsou data shrnuta ve dvou tabulkách (viz Tabulka 15 a Tabulka 16).

Tabulka 15: Naměřené hodnoty aktivit SOD na gram jedlého podílu ovoce (jablek zelených a červených, švestek a hroznů) zpracovaném různými způsoby a následně zamraženém – 1.část

ovoce	způsob zpracování	SOD [katal/g]		
		0. týden	4. týden	8. týden
jablka zelená	celé plody	1,45E-07	1,35E-07	1,89E-07
	měsíčky		1,25E-07	7,93E-08
	impregnované měsíčky		8,25E-08	8,91E-08
	dřeň		1,27E-07	1,80E-07
	proslazená dřeň		8,87E-08	8,70E-08

Tabulka 15: Naměřené hodnoty aktivit SOD na gram jedlého podílu ovoce (jablek zelených a červených, švestek a hroznů) zpracovaném různými způsoby a následně zamraženém – 2. část

ovoce	způsob zpracování	SOD [katal/g]		
		0. týden	4. týden	8. týden
jablka červená	celé plody	1,71E-07	1,59E-07	3,03E-08
	měsíčky		1,10E-07	7,90E-09
	impregnované měsíčky		1,92E-07	1,70E-07
	dřeň		8,04E-08	5,76E-08
	proslazená dřeň		8,30E-08	5,51E-08
hrozny	celé plody	*	8,91E-08	1,14E-07
	impregnované celé plody		9,76E-08	2,87E-08
	dřeň		7,18E-08	9,82E-08
	proslazená dřeň		4,49E-08	6,39E-08
švestky	měsíčky	2,50E-08	8,85E-08	8,09E-08
	impregnované měsíčky		3,69E-08	2,04E-07
	dřeň		6,36E-08	7,19E-08
	proslazená dřeň		7,25E-08	6,09E-08

pozn.: * pod dolní mezí detekce kitu

Tabulka 16: Naměřené hodnoty aktivit SOD na gram jedlého podílu ovoce (borůvek, brusinek, malin a jahod) zpracovaném různými způsoby a následně zamraženém – 1. část

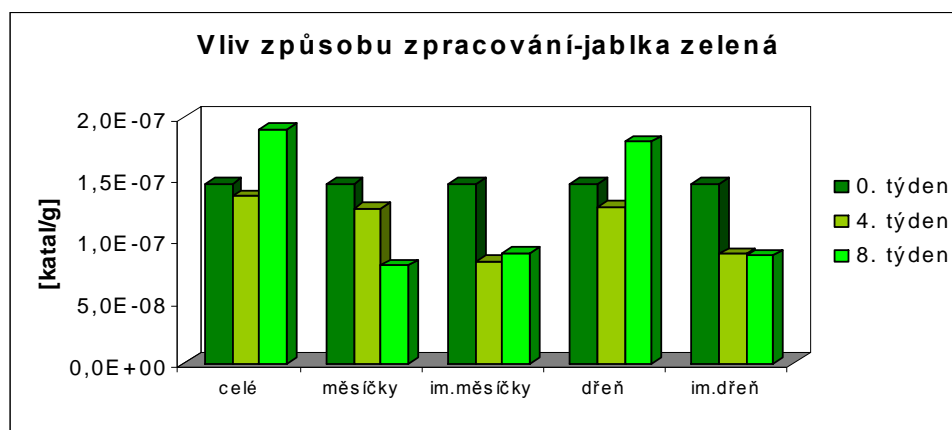
ovoce	způsob zpracování	SOD [katal/g]		
		0. týden	4. týden	8. týden
borůvky	celé plody	*	2,54E-07	1,53E-08
	impregnované celé plody		8,81E-08	*
	dřeň		2,10E-07	1,23E-07
	proslazená dřeň		1,42E-07	1,10E-07
brusinky	celé plody	4,85E-08	1,28E-07	*
	impregnované celé plody		1,46E-07	*
	dřeň		2,37E-07	2,13E-07
	proslazená dřeň		1,93E-07	1,59E-07

Tabulka 16: Naměřené hodnoty aktivit SOD na gram jedlého podílu ovoce (borůvek, brusinek, malin a jahod) zpracovaném různými způsoby a následně zamraženém – 2. část

ovoce	způsob zpracování	SOD [katal/g]		
		0. týden	4. týden	8. týden
jahody	celé plody	*	*	2,79E-08
	impregnované celé plody		*	4,50E-08
	dřeň		7,78E-08	9,27E-08
	proslazená dřeň		5,27E-08	1,23E-07
maliny	celé plody	*	2,62E-08	1,21E-07
	impregnované celé plody		1,83E-07	1,76E-08
	dřeň		9,76E-08	7,48E-08
	proslazená dřeň		4,25E-08	9,92E-08

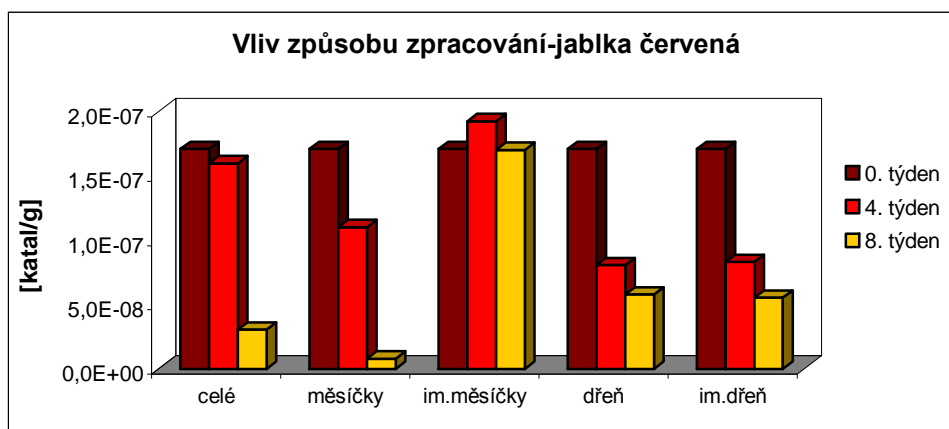
pozn.: * pod dolní mezí detekce kitu

V případě jablek zelených aktivita SOD v měsíčkách a proslazené dřeni pozvolna klesala. V impregnovaných měsíčkách byl pozorován pokles s kolísavým průběhem. U ostatních dvou forem zpracování měla závislost kolísavý průběh s pozvolným nárůstem. Hodnota v osmém týdnu byla v těchto plodech vyšší než ta v nultém (viz Graf 52).



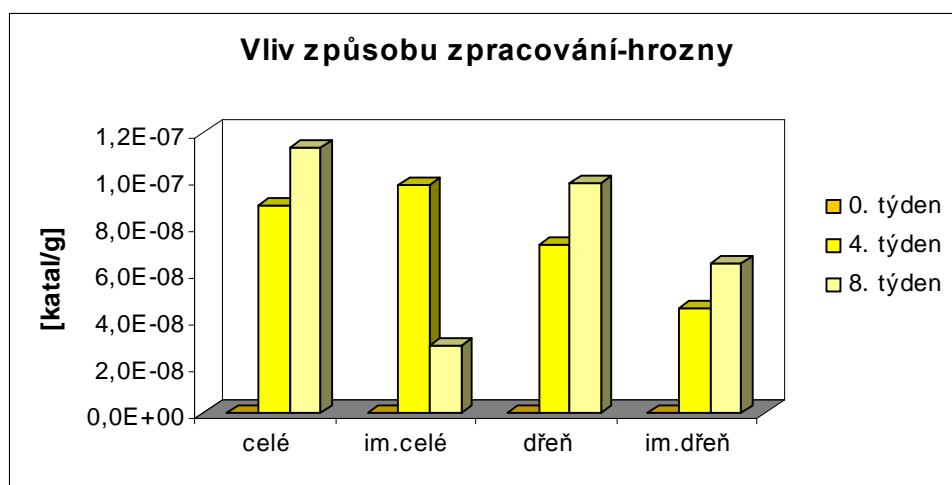
Graf 52: Vliv různého způsobu zpracování na aktivitu SOD v zelených jablkách v závislosti na čase

V jablkách červených byl zaznamenán zřetelný úbytek aktivity ve všech druzích zpracování až na impregnované měsíčky, kde aktivita SOD vztážená na gram jedlého podílu kolísala (Graf 53).



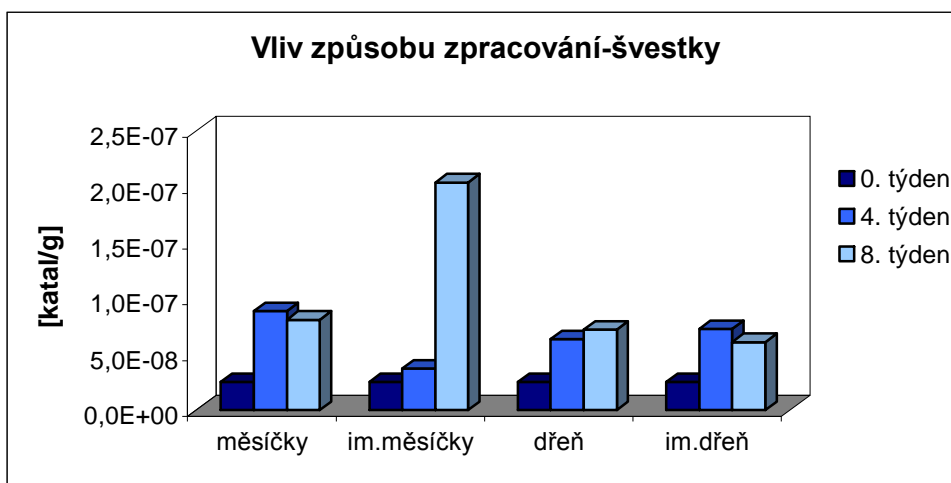
Graf 53: Vliv různého způsobu zpracování na aktivitu SOD v červených jablkách v závislosti na čase

Hodnota v nultém týdnu nebyla detekována pro hrozny. Vlivem skladování docházelo k nárůstu aktivity SOD lineárně v celých plodech bez ošetření a v obou typech dření, kolísavě v impregnovaných celých plodech. Zde byla hodnota ve čtvrtém týdnu vyšší, při následujícím měření v osmém týdnu však opět klesla (Graf 54).



Graf 54: Vliv různého způsobu zpracování na aktivitu SOD v hroznech v závislosti na čase

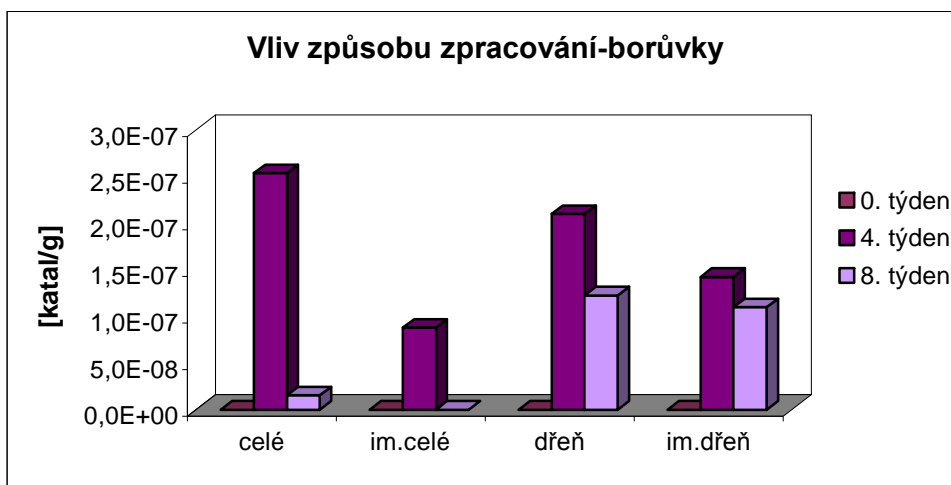
U švestek byl také pozorován nárůst aktivity, nejzřetelněji u impregnovaných měsíčků. U měsíčků bez impregnace a u proslazených dření byl zaznamenán kolísavý průběh. Hodnota v osmém týdnu v těchto vzorcích mírně poklesla oproti hodnotě v týdnu čtvrtém. Aktivita v ostatních dvou formách zpracování rostla lineárně (Graf 55).



Graf 55: Vliv různého způsobu zpracování na aktivitu SOD ve švestkách v závislosti na čase

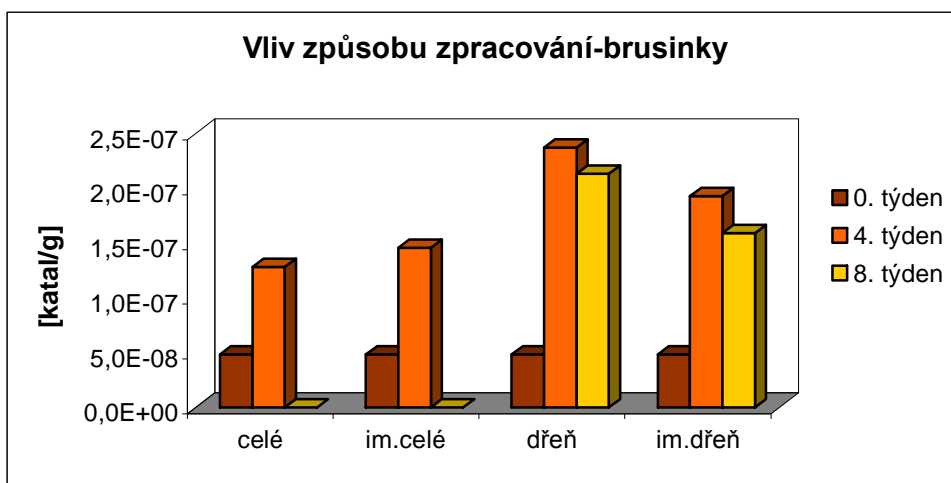
U menších měřených plodů (borůvky, brusinky, jahody, maliny) se častěji stávalo, že nebyla detekována hodnota aktivity SOD. Úprava postupu však nebyla možná (například zvětšení navážek), z důvodu vyšší barevnosti vzorků a měření ve VIS oblasti.

U borůvek byla hodnota aktivity SOD v nultém týdnu tak nízká, že nemohla být detekována. Ve čtvrtém týdnu došlo k podstatnému navýšení aktivity, která však v týdnu osmém opět klesla. V celých a celých impregnovaných plodech výrazně, v obou dřenicích mírněji (Graf 56).



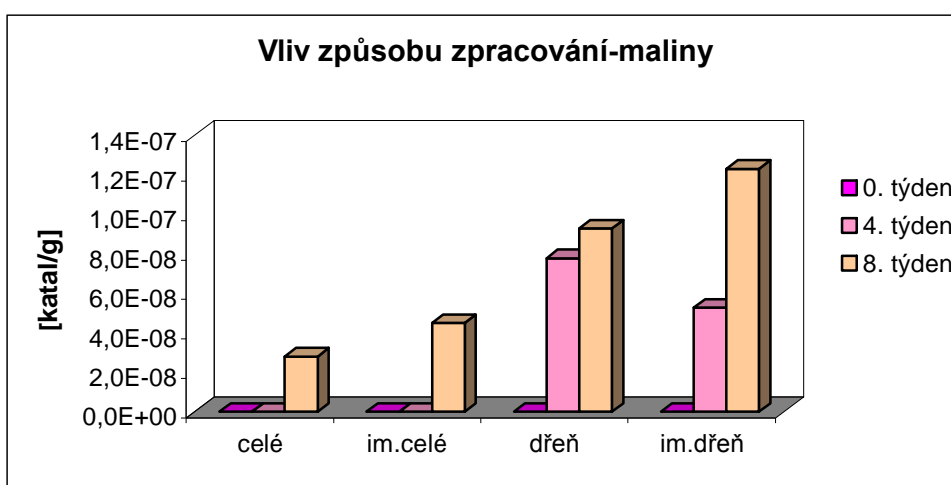
Graf 56: Vliv různého způsobu zpracování na aktivitu SOD v borůvkách v závislosti na čase

V brusinkách došlo během prvních čtyř týdnů k navýšení aktivity SOD přepočítané na gram jedlého podílu plodu. Během dalších čtyř týdnů hodnota opět poklesla. V případě dřeni a proslazených dřeni jen o malý díl (hodnota byla stále vyšší než hodnota v nultém týdnu), v případě celých plodů impregnovaných i neimpregnovaných byl pokles velmi výrazný. Nejenže poklesl pod úroveň aktivity v nultém týdnu, hodnoty byly dokonce pod dolní mezí detekce kitu (viz Graf 57).



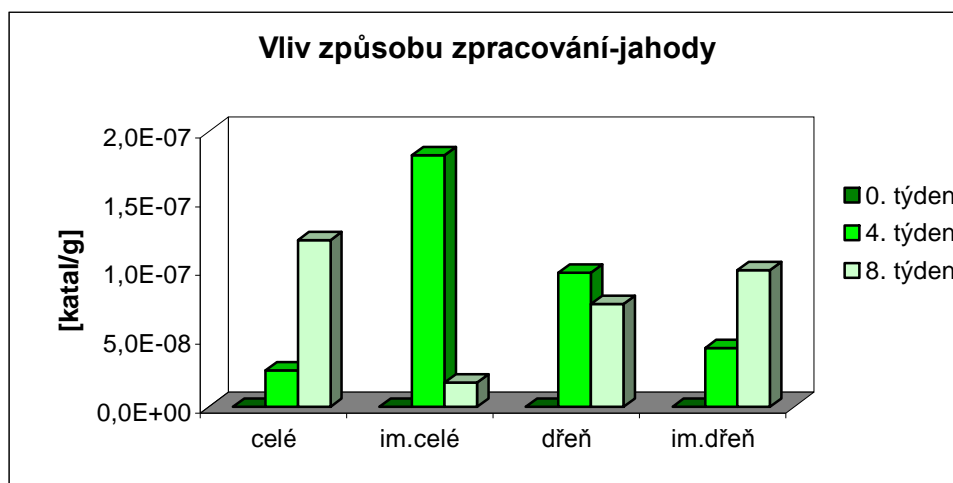
Graf 57: Vliv různého způsobu zpracování na aktivitu SOD v brusinkách v závislosti na čase

U malin byl zaznamenán postupný nárůst aktivity SOD. V nultém týdnu byla aktivita velmi nízká (nedetekovatelná) stejně jako v týdnu čtvrtém u celých plodů a plodů po impregnaci. V těchto formách byla zaznamenána relativně vysoká aktivita v osmém týdnu. U obou typů dření byla změřena vyšší aktivita již v týdnu čtvrtém (Graf 58).



Graf 58: Vliv různého způsobu zpracování na aktivitu SOD v malinách v závislosti na čase

V jahodách byla naměřena vrůstající aktivita SOD v závislosti na čase. U celých plodů a proslazených dření byl průběh nárůstu postupný, u impregnovaných celých plodů a neproslazených dření kolísavý (Graf 59).



Graf 59: Vliv různého způsobu zpracování na aktivitu SOD v jahodách v závislosti na čase

Pro srovnání byly změřeny hodnoty aktivit SOD v komerčně mražených švestkách ($2,35E-08$ katal/g) a v komerčně mražené jahodové dřeni ($5,95E-08$). Hodnota SOD ve švestkách odpovídá spíše hodnotě získané z impregnovaných měsíčků. Hodnota naměřená v zakoupené dřeni se blíží experimentální hodnotě z jahodové proslazené dřeni. To by odpovídalo informacím od výrobce, který uvedl minimální obsah cukru 10%.

Závěrem lze shrnout, že u většiny vzorků došlo po rozmražení k detekci podstatě vyšší aktivity SOD než na počátku experimentu. Důvodem může být mimo jiné i nešetrná manipulace se vzorkem na začátku pokusu, která vedla ke ztrátě aktivity a výchozí hodnoty byly zaznamenány jako falešně nižší.

4.10 Katalasa

Druhým stanovovaným enzymem v ovoci byla katalasa. Tento enzym katalyzuje rozklad peroxidu vodíku na kyslík a vodu. Postup i výpočet korespondovaly s odstavci stejného názvu v kapitole 3.8.2.

4.10.1 Výsledky studie 1 - Vliv různých teplot skladování na aktivitu katalasy

Aktivita CAT v závislosti na teplotě uchovávání byla sledována u 4 druhů ovoce (jablka zelená a červená, švestky, hrozny, broskve) uchovávaných při 3 různých teplotách (laboratoř, sklep, lednice) a orientačně i zmražením celých plodů. Na stanovení byla použita část ovoce zpracovaná s PVP a Tritonem X-100 pod tekutým dusíkem (viz 3.2). V dalším textu jsou srovnány výsledky aktivit v plodech v rámci 1.studie. Přehledně jsou data shrnuta v následujících dvou tabulkách.

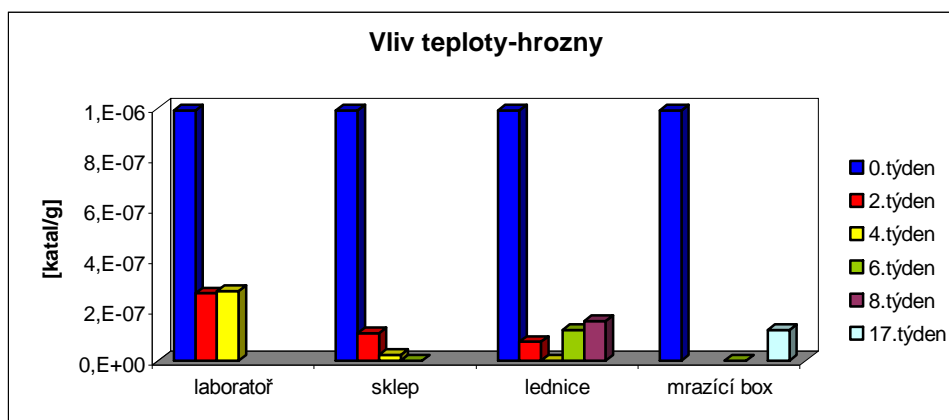
Tabulka 17: Naměřené hodnoty aktivity CAT v kataltech na gram jedlého podílu v broskvích, hroznech a švestkách skladovaných při různých teplotách

ovoce	místo skladování	CAT [katal/g]					
		0. týden	2. týden	4. týden	6. týden	8. týden	17. týden
broskve	laboratoř	1,36E-06	3,85E-07	-	-	-	
	sklep		2,01E-07	-	-	-	
	lednice		1,59E-07	1,55E-09	1,10E-07	1,10E-07	
	mrazicí box				3,65E-10		2,02E-07
hrozny	laboratoř	9,92E-07	2,67E-07	2,75E-07	-	-	
	sklep		1,09E-07	2,24E-08	1,25E-10	-	
	lednice		7,47E-08	1,03E-10	1,21E-07	1,58E-07	
	mrazicí box				1,49E-10		1,22E-07
švestky	laboratoř	1,50E-06	2,44E-07	1,82E-07	-	-	
	sklep		1,03E-07	1,89E-08	-	-	
	lednice		1,01E-07	9,65E-10	1,84E-07	1,31E-07	
	mrazicí box				5,46E-10		1,05E-07

Tabulka 18: Naměřené hodnoty aktivity CAT v kataltech na gram jedlého podílu v jablkách zelených a červených skladovaných při různých teplotách

ovoce	místo skladování	CAT [katal/g]					
		1. týden	2. týden	3. týden	4. týden	5. týden	7. týden
jablka zelená	laboratoř	6,86E-09	2,66E-08	2,15E-08	6,85E-08	4,30E-08	5,26E-08
	sklep	2,51E-08	9,17E-09	2,78E-08	9,00E-08	3,27E-08	6,01E-08
	lednice	1,99E-08	9,46E-09	4,50E-08	6,25E-08	4,17E-08	5,98E-08
jablka červená	laboratoř	1,91E-08	1,50E-08	5,24E-08	6,76E-08	5,51E-08	7,70E-08
	sklep	1,61E-08	4,13E-08	4,01E-08	7,51E-08	4,02E-08	8,98E-08
	lednice	3,01E-08	3,11E-09	4,42E-08	1,01E-07	5,10E-08	6,05E-08

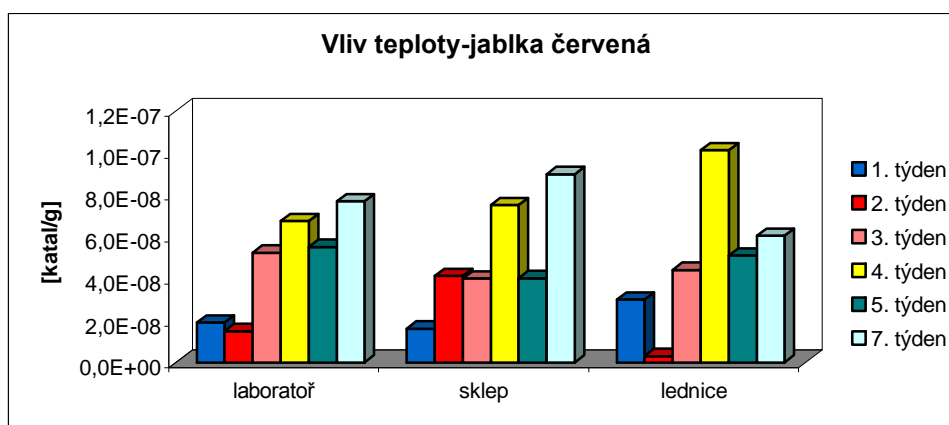
U broskví, švestek a hroznů byla velmi výrazná aktivita katalasy v prvním týdnu od založení pokusu. Tato hodnota je několikanásobně vyšší, než další naměřené aktivity během skladování. V druhém týdnu byly nejvyšší aktivity naměřeny v ovoci skladovaném v laboratoři, následně ve sklepě a pak v lednici. Další průběh byl nestejnorodý. Některé ovocné druhy vykazovaly nárůst, jiné zase pokles aktivity (př.: hrozny skladované ve sklepě - viz Graf 60).



Graf 60: Vliv různých skladovacích teplot na aktivitu CAT v hroznech v závislosti na čase

Dramatický úbytek aktivity CAT v průběhu prvních čtrnácti dní je podezřelý v porovnání s daty, která byla zjištěna při jiných měřeních (nárůst aktivity CAT 2,5x v mandarinkách vlivem náhlého ochlazení po třídní inkubaci plodů při 37°C) [44]. Zvláště, když se tomu dělo ve všech výše zmiňovaných plodech (respektive vzorcích, které byly analyzovány současně. Jablka červená a zelená byla skladována a měřena stejným způsobem, ale v jinou dobu než tomu bylo u těchto vzorků). Je možno říci, že daný propad nastal vlivem manipulace plodů při zakládání pokusu. Kdyby se vyloučila první hodnota měření jako odlehlá, byl by zaznamenán u hroznů skladovaných v laboratoři, v lednici a v mrazničce, u švestek skladovaných v ledničce a mrazničce a u broskví z mrazničky postupný nárůst aktivity. U ostatních forem by přetrvával klesající trend.

U obou druhů jablek byla naměřena vzrůstající závislost aktivity CAT na čase. Měla sinusový tvar a byla stejná u všech skladovacích teplot (viz Graf 61).



Graf 61: Vliv různých skladovacích teplot na aktivitu CAT v jablkách červených v závislosti na čase

4.10.2 Výsledky studie 2 - Vliv různé formy zpracování plodů s následných zamražením na aktivity katalasy

Aktivita CAT byla sledována i ve druhé sérii experimentů zaměřených na sledování změn v ovoci v průběhu uchovávání mražením s různým způsobem opracování vzorku. Test byl proveden s 7 druhy ovoce: jablky červenými a zelenými, švestkami a hrozny, borůvkami, brusinkami, malinami a jahodami. Ovoce bylo v mrazničce uchováváno po dobu 8. týdnů. Jako formy zpracování byly voleny: neopracované celé plody, impregnované celé plody, měsíčky, impregnované měsíčky, dřev a proslazená dřev (kap. 3.3). Na stanovení byla použita část ovoce zpracovaná s PVP a Tritonem X-100 pod tekutým dusíkem (viz 3.2). V dalším textu jsou srovnány výsledky aktivit v plodech v rámci 2.studie. Přehledně jsou data shrnuta v následujících dvou tabulkách..

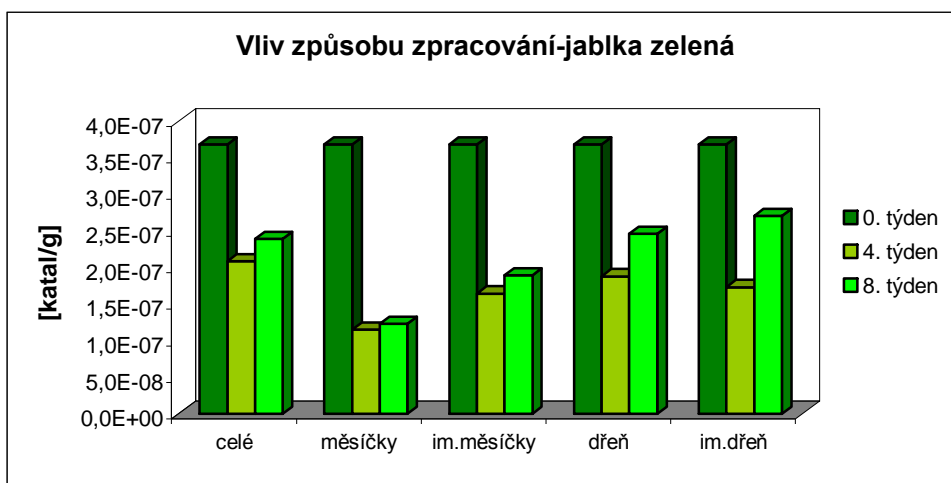
Tabulka 19: Naměřené hodnoty aktivit CAT na gram jedlého podílu u jablek zelených a červených, švestek a hroznů zpracovaných různými způsoby a následně zamražených

ovoce	způsob zpracování	CAT [katal/g]		
		0. týden	4. týden	8. týden
jablka zelená	celé plody	3,68E-07	2,08E-07	2,39E-07
	měsíčky		1,15E-07	1,23E-07
	impregnované měsíčky		1,64E-07	1,89E-07
	dřev		1,88E-07	2,46E-07
	proslazená dřev		1,73E-07	2,70E-07
jablka červená	celé plody	2,58E-07	5,96E-08	2,64E-07
	měsíčky		1,52E-07	1,94E-07
	impregnované měsíčky		1,30E-07	1,65E-07
	dřev		1,76E-07	1,16E-07
	proslazená dřev		1,77E-07	2,27E-07
hrozny	celé plody	1,87E-07	1,15E-07	1,42E-07
	impregnované celé plody		1,00E-07	4,81E-07
	dřev		1,48E-07	1,75E-07
	proslazená dřev		1,59E-07	7,96E-08
švestky	měsíčky	1,60E-07	1,94E-07	8,40E-08
	impregnované měsíčky		2,26E-07	1,73E-07
	dřev		1,79E-07	1,61E-07
	proslazená dřev		1,79E-07	7,05E-07

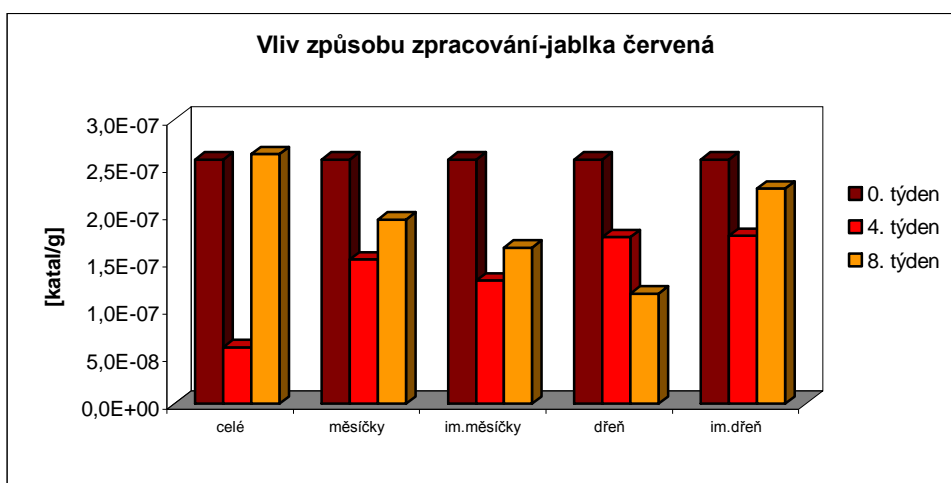
Tabulka 20: Naměřené hodnoty aktivit CAT na gram jedlého podílu u borůvek, brusinek, malin a jahod zpracovaných různými způsoby a následně zamražených

ovoce	způsob zpracování	CAT [katal/g]		
		0. týden	4. týden	8. týden
borůvky	celé plody	3,89E-07	1,58E-07	3,94E-07
	impregnované celé plody		2,36E-07	0,00E+00
	dřeň		3,59E-07	1,10E-07
	proslazená dřeň		2,44E-07	7,74E-08
brusinky	celé plody	2,17E-07	7,56E-07	1,12E-08
	impregnované celé plody		6,35E-07	0,00E+00
	dřeň		3,06E-07	1,98E-07
	proslazená dřeň		1,11E-07	0,00E+00
jahody	celé plody	2,71E-07	2,78E-07	1,15E-07
	impregnované celé plody		4,85E-07	9,36E-08
	dřeň		1,54E-07	0,00E+00
	proslazená dřeň		1,81E-07	0,00E+00
maliny	celé plody	2,52E-07	1,87E-07	1,75E-07
	impregnované celé plody		3,63E-07	7,12E-08
	dřeň		4,05E-07	1,44E-07
	proslazená dřeň		3,30E-08	9,29E-08

U obou druhů jablek byl zaznamenán stejný průběh závislosti. Ve čtvrtém týdnu byl naměřen pokles a v týdnu osmém opět vrůst aktivity CAT. Nárůst byl u různých forem zpracování různě velký, pouze u mražených celých jablek červených byla hodnota v osmém týdnu vyšší než hodnota při zahájení pokusu. Výjimku tvořila neslazená dřeň z jablek červených, kde v osmém týdnu došlo k poklesu aktivity CAT oproti týdnu čtvrtému. Jako příklad jsou níže uvedeny grafy závislosti aktivity CAT na čase v zelených a v červených jablkách (viz Graf 62 a Graf 63).



Graf 62: Vliv různého způsobu zpracování na aktivitu CAT v jablkách zelených v závislosti na čase

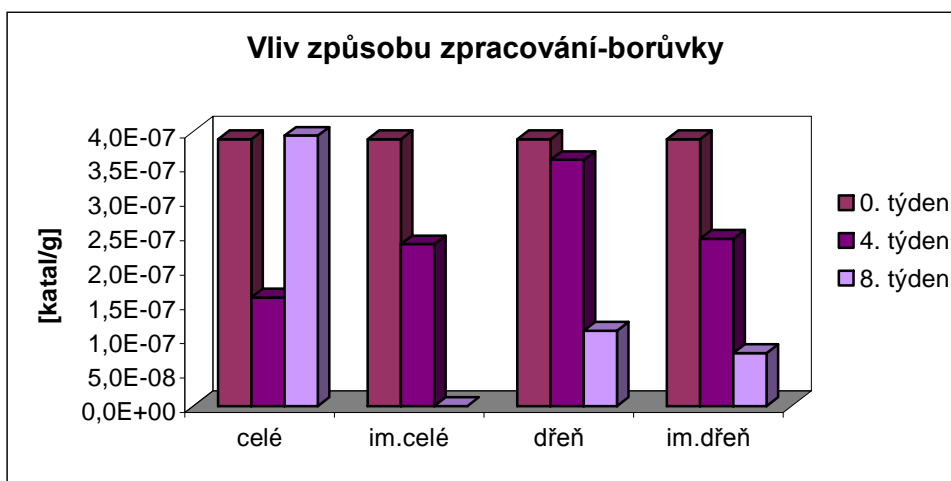


Graf 63: Vliv různého způsobu zpracování na aktivitu CAT v jablkách červených v závislosti na čase

U hroznů byla naměřena většinou sinusová závislost aktivity CAT na čase s pouze menšími rozdíly mezi hodnotami. Většinou byl zjištěn klesající trend. Odchytky nastaly u impregnovaných celých hroznů, kde byla pozorována kolísavá závislost se vzrůstající tendencí a dále u hroznové proslazené dřeně, kde měl pokles lineární tvar.

Ve švestkách aktivita CAT většinou kolísala kolem střední hodnoty. U měsíčků bez impregnace nastal mírný pokles v hodnotě v osmém týdnu (zde tedy nejspíš aktivita mírně kolísavě klesala). U proslazené dřeně byl vidět ztelný lineární nárůst aktivity CAT.

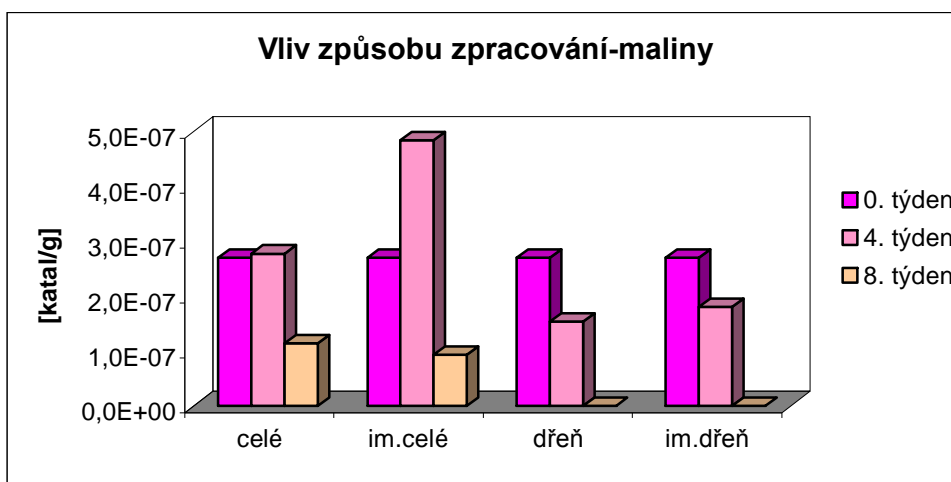
U borůvek mražených ve formě celých neopracovaných plodů byl zjištěn ve čtvrtém týdnu pokles aktivity CAT, v týdnu osmém však hodnota vystoupila až na úroveň měření při zahájení pokusu. Aktivita CAT zde kolísala. U ostatních forem zpracování byl zaznamenán postupný pokles aktivity (viz Graf 64).



Graf 64: Vliv různého způsobu zpracování na aktivitu CAT v borůvkách v závislosti na čase

U brusinek byl zjištěn u všech druhů zpracování pokles aktivity CAT v čase. Pouze u proslazené dřeni byl lineární, u ostatních forem měl kolísavý průběh. U celých plodů s impregnací i bez ní byla hodnota druhého měření výrazně odchylena v pozitivním směru od zbývajících dvou ostatních.

Malinové dřeň sladké i nesladké vykazovaly postupný pokles aktivity CAT v čase. U celých plodů s impregnací i bez ní měla závislost kolísavý průběh s klesající tendencí (Graf 65).



Graf 65: Vliv různého způsobu zpracování na aktivitu CAT v malinách v závislosti na čase

V mražených celých jahodách byl změřen postupný pokles aktivity CAT. U zbylých typů zpracování byla zjištěna sinusová závislost aktivity CAT na čase s klesajícím trendem.

Pro srovnání byla změřena aktivita katalasy v komerčně mražených švestkách ($4,15E-07$ katal/g) a v komerčně mražené jahodové dřeni ($1,99E-07$ katal/g). Vysoká hodnota zjištěná v prodáváných švestkách by spíše ukazovala na formu zpracování do podoby impregnovaných měsíčků. Jahodová dřeň se zase blíží v porovnání s měřenými vzorky neprosazené dřeni. V obou případech však jsou vzájemné odchylky mezi různými způsoby zpracování velmi malé a jelikož není údaj o tom, jak jsou dlouho komerční produkty zamrazeny, nelze jednoznačně říci, o jaký typ zpracování se jedná.

Závěrem lze shrnout, že u většiny vzorků hladina CAT naměřená v rozmražených vzorcích je nižší než hladina výchozí v celých plodech.

4.11 Polyfenoloxidas

Dále byl také stanoven enzym PPO. Tento enzym katalyzuje oxidační změnu metylkatecholu za vzniku oranžového roztoku benzochinonu. Spektrofotometricky s eměří úbytek metylkatecholu.

Práce s tímto enzymem byla náročná, jelikož jeho aktivita rychle na vzduchu klesala. I substrát (methylkatechol) na vzduchu oxidoval, proto musel být se vzorky skladován neustále v temnu a chladu. Postup a výpočet jsou uvedeny v kapitole 3.8.3.

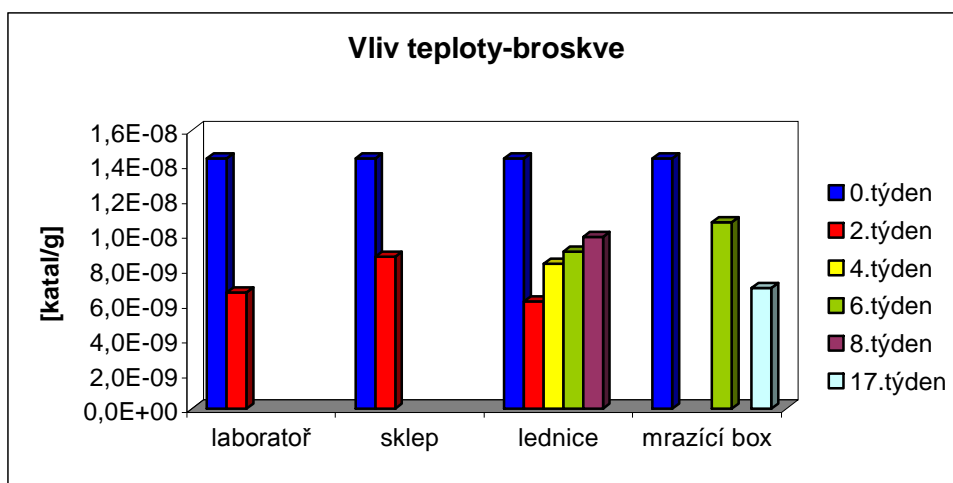
4.11.1 Výsledky studie 1 - Vliv různých teplot skladování na aktivitu PPO

Aktivita PPO v závislosti na teplotě uchovávání byla sledována u 3 druhů ovoce (švestky, hrozny, broskve) uchovávaných při 3 různých teplotách (laboratoř, sklep, lednice) a orientačně i zmražením celých plodů. Na stanovení byla použita část ovoce zpracovaná s PVP a Tritonem X-100 pod tekutým dusíkem (viz 3.2). V dalším textu jsou srovnány výsledky aktivit v plodech v rámci 1. studie. Přehledně jsou data shrnuta v následující tabulce.

Tabulka 21: Naměřené hodnoty aktivity PPO v kataltech na gram jedlého podílu v broskvích, hroznech, švestkách skladovaných při různých teplotách

ovoce	místo skladování	PPO [katal/g]					
		0. týden	2. týden	4. týden	6. týden	8. týden	17. týden
broskve	laboratoř	1,44E-08	6,67E-09	-	-	-	
	sklep		8,73E-09	-	-	-	
	lednice		6,18E-09	8,33E-09	9,02E-09	9,87E-09	
	mrazicí box				1,07E-08		6,94E-09
hrozny	laboratoř	4,78E-09	3,83E-09	3,03E-09	-	-	
	sklep		4,66E-09	4,28E-09	3,07E-09	-	
	lednice		4,81E-09	3,34E-09	3,26E-09	5,33E-09	
	mrazicí box				8,09E-09		5,90E-09
švestky	laboratoř	4,73E-09	8,87E-09	4,05E-09	-	-	
	sklep		1,20E-08	3,96E-09	-	-	
	lednice		7,14E-09	7,12E-09	1,22E-08	8,80E-09	
	mrazicí box				1,19E-08		1,07E-08

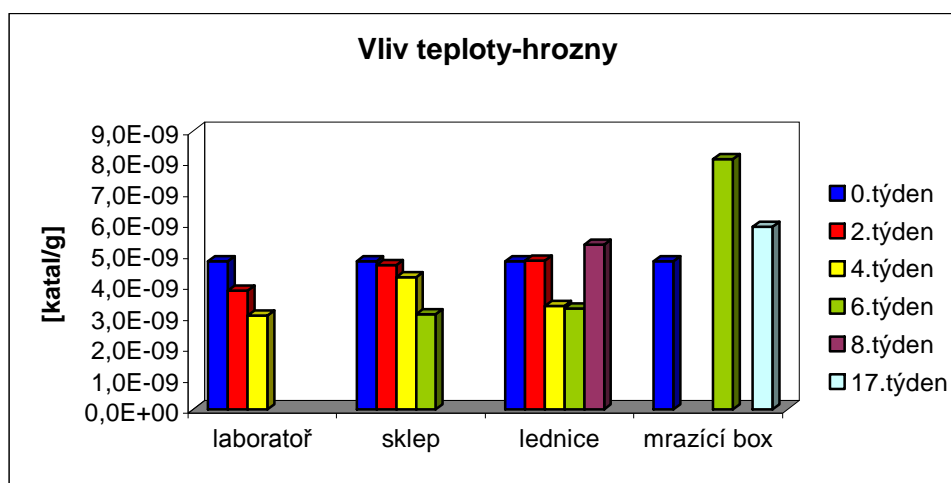
U broskví byla nejvyšší hodnota aktivity stanovena při zahájení pokusu. Při měření v druhém týdnu byl pak pozorován pokles. V plodech uložených v lednici docházelo v dalších týdnech k postupnému nárůstu aktivity PPO v gramu jedlého podílu ovoce (žádná hodnota však nedosáhla na hodnotu v nultém týdnu). V plodech uložených v mrazicím boxu aktivita postupně stále klesala (Graf 66).



Graf 66: Vliv různých skladovacích teplot na aktivitu PPO v broskvích v závislosti na čase

Švestky skladované v laboratoři a ve sklepě vykazovaly stejný tvar závislosti. Nejprve hodnota v druhém týdnu skladování vzrostla a při dalším měření byl zjištěn opět pokles a to až pod úroveň hodnoty zjištěné v nultém týdnu. Lze říci, že aktivita PPO zde klesala kolísavým průběhem. V lednici i v mrazícím boxu byl změřen nárůst aktivity. Odchytku tvořila vždy poslední stanovovaná hodnota (pro lednici v týdnu osmém, pro mrazící box v týdnu 17.), která mírně poklesla oproti očekávanému vzrůstu.

U hroznů byl zaznamenán jednoznačný pokles aktivity PPO u plodů skladovaných v laboratoři a ve sklepě. Plody uchované v lednici a v mrazničce jevíly nárůst aktivity PPO (u hroznů jen velmi mírný) s kolísavým průběhem (viz Graf 67).



Graf 67: Vliv různých skladovacích teplot na aktivitu PPO v hroznech v závislosti na čase

Polyfenoloxidasu v jablkách červených a zelených nebyla měřena z důvodu odlišného uspořádání pokusu.

Pokles PPO by mohl souviset mimo jiné i s růstem hladin některých individuálních fenolických látek v průběhu uchování (většinou se u nich hodnoty zvyšovaly). Hodnoty celkových polyfenolů v broskvích a ve švestkách stagnovaly oproti předpokládanému poklesu, což bylo způsobeno právě nedostatečnou činností PPO.

4.11.2 Výsledky studie 2 - Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na aktivitu PPO

Aktivita PPO byla sledována i ve druhé sérii experimentů zaměřených na sledování změn v ovoci v průběhu uchovávání mražením s různým způsobem opracování vzorku. Test byl proveden s 7 druhy ovoce: jablky červenými a zelenými, švestkami a hrozny, borůvkami, brusinkami, malinami a jahodami. Ovoce bylo v mrazničce uchováváno po dobu 8. týdnů. Jako formy zpracování byly voleny: neopracované celé plody, impregnované celé plody, měsíčky, impregnované měsíčky, dřev a proslazená dřev (kap. 3.3). Na stanovení byla použita část ovoce zpracovaná s PVP a Tritonem X-100 pod tekutým dusíkem (viz 3.2). V dalším textu jsou srovnány výsledky aktivit v plodech v rámci 2.studie. Přehledně jsou data shrnuta v následujících dvou tabulkách..

Tabulka 22: Naměřené hodnoty aktivit PPO na gram jedlého podílu u jablek zelených a červených, švestek a hroznů zpracovaných různými způsoby a následně zamražených

ovoce	způsob zpracování	PPO [katal/g]		
		0. týden	4. týden	8. týden
jablka zelená	celé plody	2,73E-09	1,71E-09	4,08E-09
	měsíčky		4,48E-09	2,40E-09
	impregnované měsíčky		5,06E-09	3,02E-09
	dřev		2,90E-09	6,31E-09
	proslazená dřev		4,57E-09	7,21E-09
jablka červená	celé plody	1,93E-09	2,81E-09	2,37E-09
	měsíčky		4,09E-09	2,69E-09
	impregnované měsíčky		6,19E-09	4,51E-09
	dřev		4,01E-09	8,07E-09
	proslazená dřev		3,81E-09	7,79E-09
hrozny	celé plody	3,28E-09	1,08E-08	3,69E-09
	impregnované celé plody		1,22E-08	5,33E-09
	dřev		1,36E-08	1,41E-08
	proslazená dřev		1,19E-08	1,28E-08
švestky	měsíčky	5,39E-09	6,78E-09	6,48E-09
	impregnované měsíčky		9,13E-09	3,26E-09
	dřev		8,25E-09	4,91E-09
	proslazená dřev		4,68E-09	6,96E-09

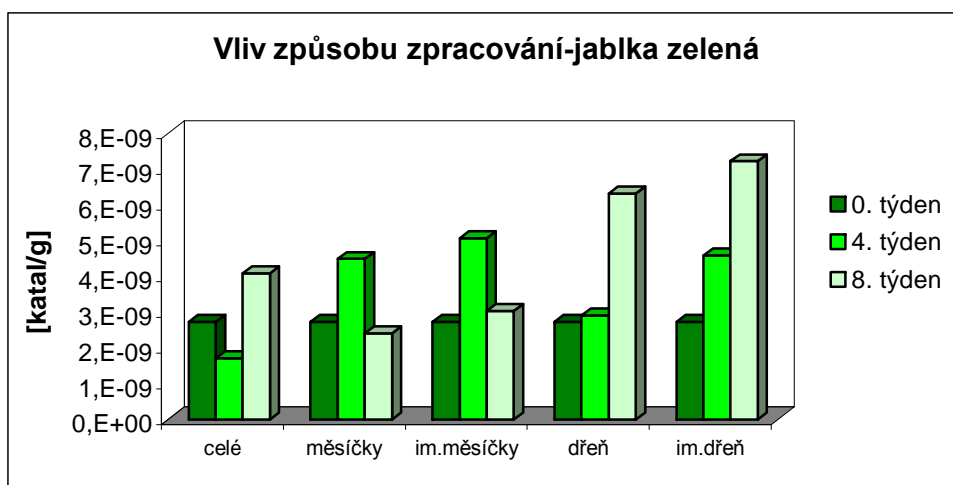
Tabulka 23: Naměřené hodnoty aktivit PPO na gram jedlého podílu u borůvek, brusinek, malin a jahod zpracovaných různými způsoby a následně zamražených

ovoce	způsob zpracování	PPO [katal/g]		
		0. týden	4. týden	8. týden
borůvky	celé plody	1,52E-09	4,83E-10	9,14E-10
	impregnované celé plody		3,92E-10	5,77E-10
	dřeň		8,61E-10	1,55E-09
	proslazená dřeň		7,37E-10	1,62E-09
brusinky	celé plody	2,30E-09	2,41E-10	2,22E-10
	impregnované celé plody		6,36E-10	1,37E-10
	dřeň		2,19E-10	1,52E-09
	proslazená dřeň		2,63E-10	4,01E-10
jahody	celé plody	4,16E-10	6,25E-10	2,25E-10
	impregnované celé plody		4,98E-10	1,24E-12
	dřeň		2,67E-10	2,69E-10
	proslazená dřeň		3,19E-10	7,46E-10
maliny	celé plody	2,47E-10	2,70E-10	2,87E-12
	impregnované celé plody		3,26E-10	1,35E-12
	dřeň		4,16E-10	4,00E-10
	proslazená dřeň		4,06E-10	1,38E-09

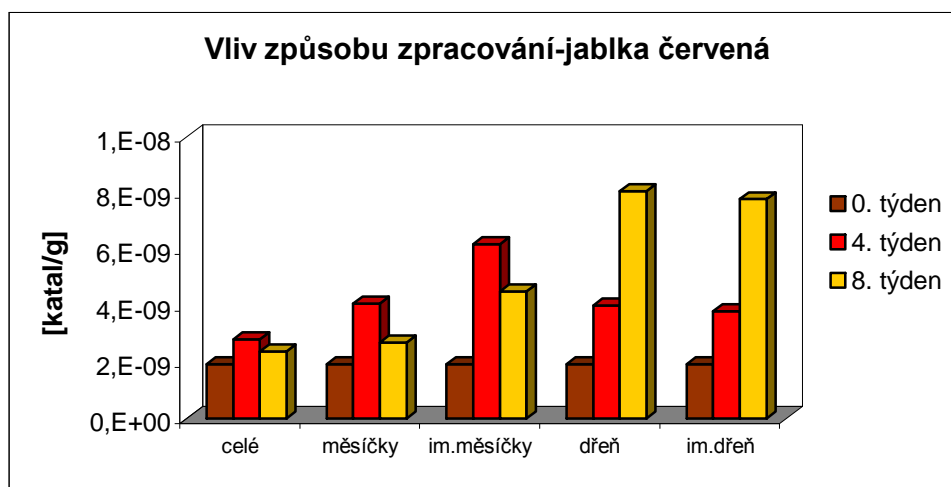
V obou typech dření jablek zelených docházelo k postupnému nárůstu aktivity PPO v čase. Vzrůst byl zaznamenán i v mražených celých plodech a v impregnovaných měsíčkách. Zde měla závislost však nepravidelný tvar. Hodnota zjištěná ve čtvrtém týdnu měla pro případ celých mražených plodů negativní odchylku, pro případ impregnovaných měsíčků pozitivní odchylku. Neimpregnované měsíčky vykazovaly kolísavý pokles aktivity PPO (Graf 68).

U jablek červených byl změřen vzrůst aktivity u všech forem zpracování. U obou typů dření byl nárůst postupný. U ostatních způsobů byla hodnota ve čtvrtém týdnu pozitivně odchýlena, závislost tedy měla kolísavý průběh (Graf 69).

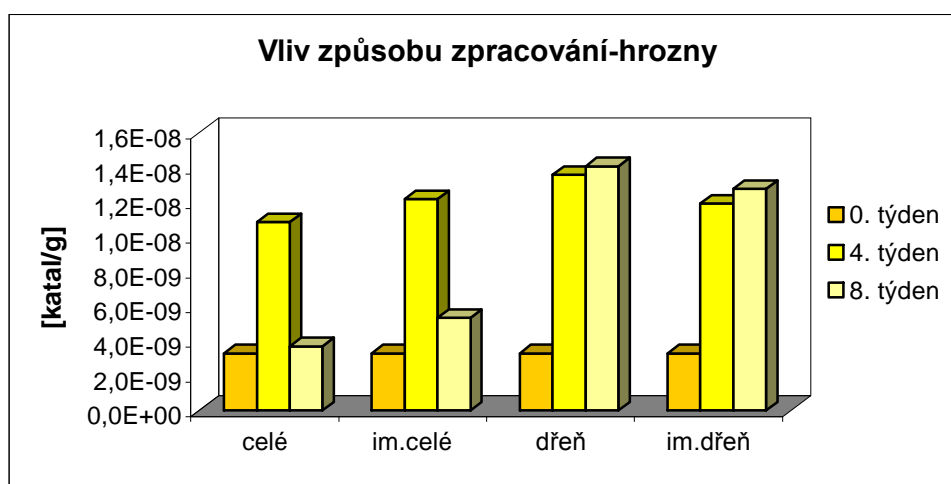
Aktivita PPO v hroznech vlivem skladování v mrazničce stoupala. U obou dření postupně, u celých plodů a impregnovaných celých plodů měla závislost sinusový tvar s výraznou pozitivní odchylkou ve čtvrtém týdnu (Graf 70).



Graf 68: Vliv různého způsobu zpracování na aktivitu PPO v zelených jablkách v závislosti na čase

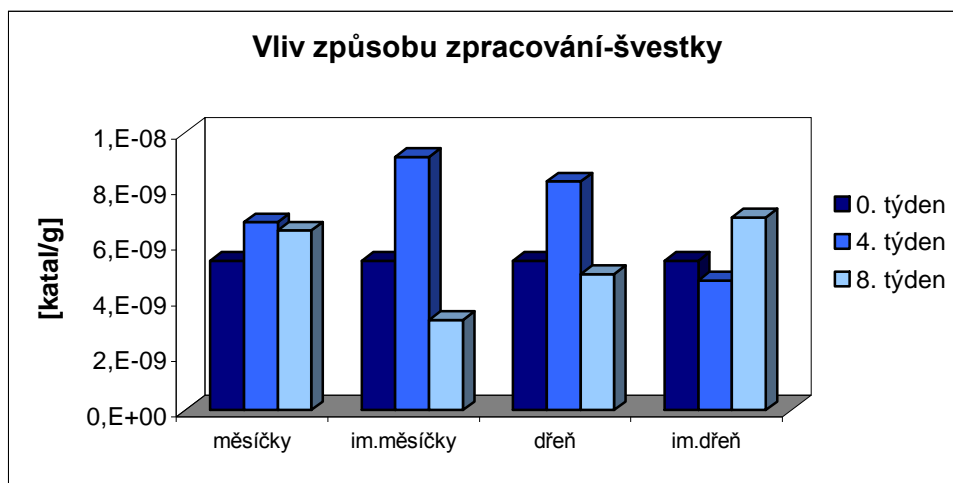


Graf 69: Vliv různého způsobu zpracování na aktivitu PPO v červených jablkách v závislosti na čase



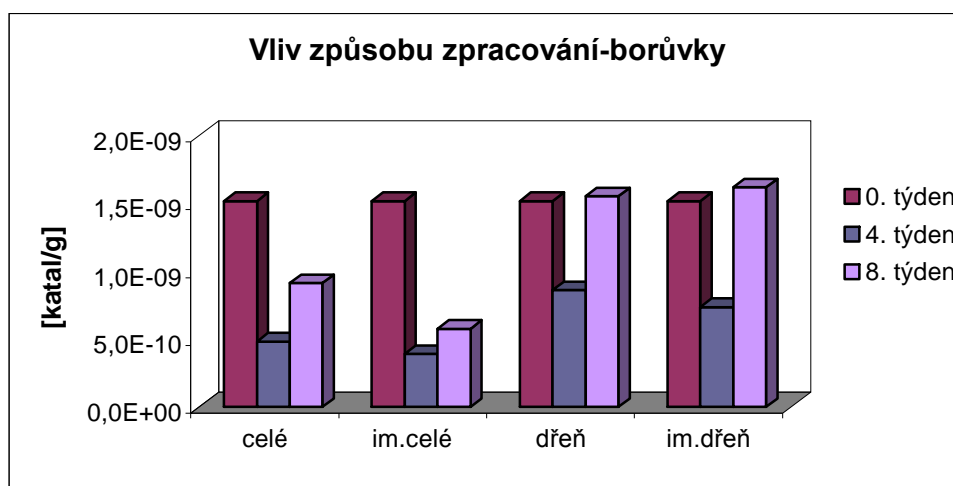
Graf 70: Vliv různého způsobu zpracování na aktivitu PPO v hroznech v závislosti na čase

Ve švestkách nelze souhrnně říci, zda aktivita stoupá či klesá. V impregnovaných měsíčcích a v neslazené dřeni aktivita z celkového pohledu poklesla. Závislost měla sinusový tvar s nejvyšší hodnotou ve čtvrtém týdnu. U sladkých dření a neimpregnovaných měsíčků aktivita PPO kolísavě stoupala (viz Graf 71).



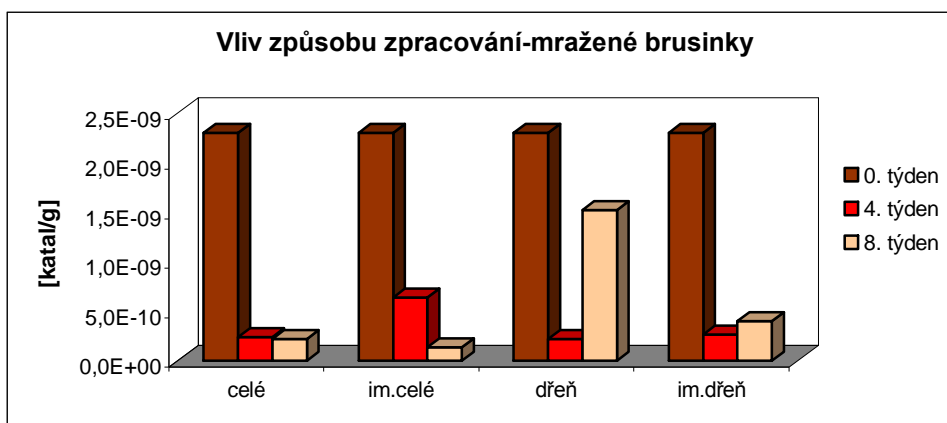
Graf 71: Vliv různého způsobu zpracování na aktivitu PPO ve švestkách v závislosti na čase

V borůvkách byla naměřena sinusová závislost aktivity PPO na čase ve všech formách zpracování (výrazný pokles nastal při druhém měření). Mírnou stoupající tendenci měla závislost aktivity PPO v obou typech dření, viditelnou klesající závislost vykazovaly celé mražené plody s impregnací i bez ní (viz Graf 72).



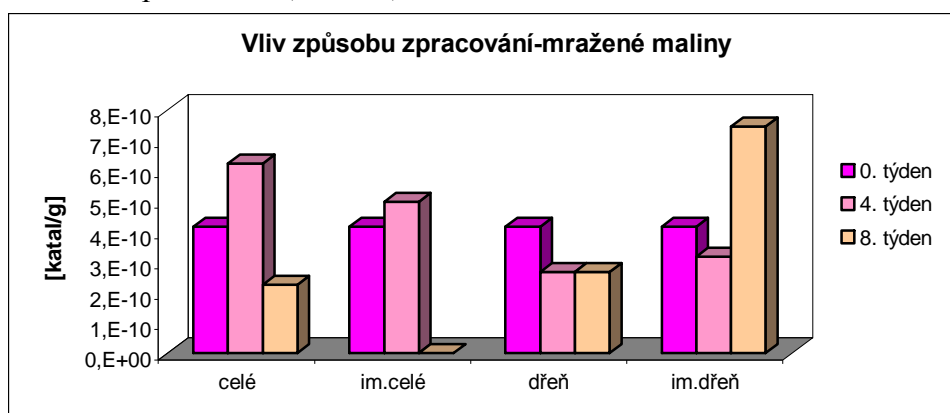
Graf 72: Vliv různého způsobu zpracování na aktivitu PPO v borůvkách v závislosti na čase

V brusinkách došlo k poklesu aktivity PPO na gram jedlého podílu ovoce. U celých plodů s impregnací i bez ní se tak dělo postupně, u obou forem dření byla závislost sinusová (Graf 73).



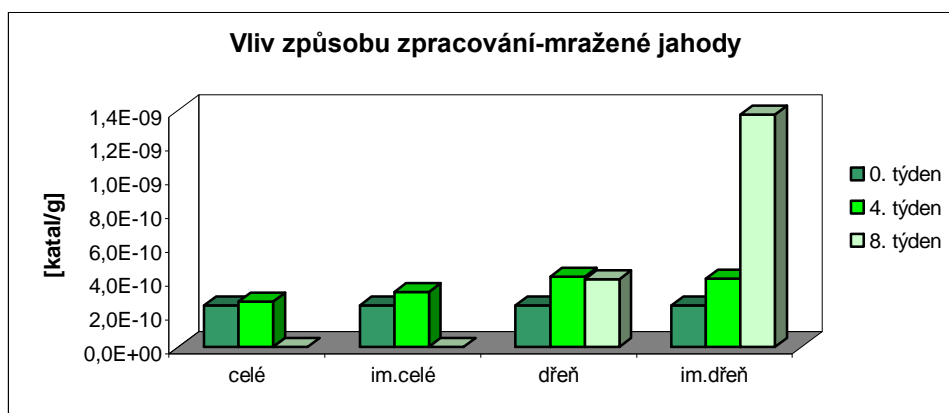
Graf 73: Vliv různého způsobu zpracování na aktivitu PPO v brusinkách v závislosti na čase

V malinách byla závislost kolísavá ve všech formách zpracování. V celých plodech, celých impregnovaných plodech a v neslazené dřeni byl změřen pokles aktivity PPO na čase, ve slazené dřeni naopak nárůst (Graf 74).



Graf 74: Vliv různého způsobu zpracování na aktivitu PPO v malinách v závislosti na čase

U jahod byla naměřena v celých plodech a v celých plodech po impregnaci stejná závislost aktivity PPO na čase jako u plodů malin se stejnou formou zpracování. V dřenicích aktivita stoupala (v neslazené kolísavě, ve slazené lineárně - Graf 75).



Graf 75: Vliv různého způsobu zpracování na aktivitu PPO v jahodách v závislosti na čase

Pro porovnání byla změřena aktivita PPO také v komerčně mražených půlkách švestek ($6,58E-09$ katal/g) a v komerčně mražené jahodové dřeni ($2,20E-10$ katal/g). Hodnota švestek se velmi blíží hodnotám získaným z neimpregnovaných měsíčků. Komerční mražená jahodová dřev je zase podobná neprosladenému měřenému vzorku.

Z celkového pohledu aktivita PPO stoupala u hroznů a obou druhů jablek. U švestek a malý plodů (jako borůvky, brusinky, maliny a jahody) spíše stagnovala, případně vzortla až ke konci uchovávání. To se také projevilo na obsahu jednotlivých polyfenolických látek detekovaných metodou HPLC, kdy se švestky většinou lišily v obsahu jednotlivých zástupců od ostatních druhů měřených touto metodou (oba druhy jablek a hrozny).

4.12 Lipoxygenasa

Posledním antioxidačním enzymem, který byl měřen, byla lipoxygenasa. Tento enzym katalyzuje oxidační změnu nenasyceného tuku na příslušný peroxid, měří se spektrofotometricky úbytek peroxidu. Úprava vzorku, postup měření a výpočty jsou uvedeny v kapitole 3.8.4.

4.12.1 Výsledky série 1 - Vliv různých teplot skladování na aktivitu LOX

Aktivita LOX v závislosti na teplotě uchovávání byla sledována u 4 druhů ovoce (jablka zelená a červená, švestky, hrozny, broskve) uchovávaných při 3 různých teplotách (laboratoř, sklep, lednice) a orientačně i zmražením celých plodů. Na stanovení byla použita část ovoce zpracovaná s PVP a Tritonem X-100 pod tekutým dusíkem (viz 3.2). V dalším textu jsou srovnány výsledky aktivit v plodech v rámci 1. studie. Přehledně jsou data shrnuta v následujících dvou tabulkách.

Tabulka 24: Naměřené hodnoty aktivity LOX v katalch na gram jedlého podílu v broskvích, hroznech a švestkách skladovaných při různých teplotách

ovoce	místo skladování	LOX [katal/g]					
		0. týden	2. týden	4. týden	6. týden	8. týden	17. týden
broskve	laboratoř	$8,71E-08$	$9,78E-08$	-	-	-	
	sklep		$4,45E-08$	-	-	-	
	lednice		$5,55E-08$	$6,45E-08$	$3,84E-08$	$5,02E-08$	
	mrazicí box				$1,31E-07$		$1,03E-07$
hrozny	laboratoř	$9,01E-08$	$6,31E-08$	$5,68E-08$	-	-	
	sklep		$5,41E-08$	$7,70E-08$	$6,09E-08$	-	
	lednice		$4,50E-08$	$7,18E-08$	$2,92E-07$	$2,22E-08$	
	mrazicí box				$1,18E-07$		$5,42E-08$
švestky	laboratoř	$1,02E-07$	$3,77E-08$	$9,86E-08$	-	-	
	sklep		$5,76E-08$	$1,09E-07$	-	-	
	lednice		$5,56E-07$	$7,93E-08$	$2,99E-07$	$2,14E-07$	
	mrazicí box				$1,82E-07$		$6,01E-08$

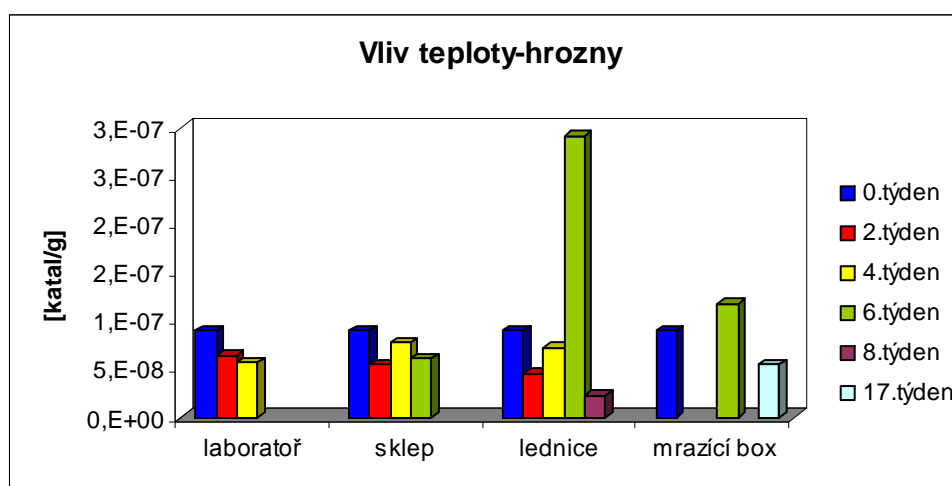
Tabulka 25: Naměřené hodnoty aktivity LOX v kataltech na gram jedlého podílu v jablkách zelených a červených skladovaných při různých teplotách

ovoce	místo skladování	LOX [katal/g]					
		1. týden	2. týden	3. týden	4. týden	5. týden	7. týden
jablka zelená	laboratoř	3,22E-08	1,16E-08	2,60E-08	2,39E-08	1,52E-08	3,05E-08
	sklep	3,10E-08	1,04E-08	1,56E-08	8,68E-09	3,95E-09	1,36E-08
	lednice	3,30E-08	1,20E-08	7,83E-09	5,50E-09	5,73E-09	1,11E-08
jablka červená	laboratoř	3,69E-08	3,76E-08	1,33E-08	9,24E-09	4,89E-09	1,14E-08
	sklep	7,52E-09	3,44E-08	4,22E-08	6,76E-09	7,80E-09	1,25E-08
	lednice	5,06E-08	1,53E-08	1,45E-08	5,64E-09	1,58E-08	1,87E-08

Lipoxygenasajevila u všech druhů ovoce značně kolísavý chod. U broskví skladovaných čtrnáct dní v laboratoři byl zaznamenán nárůst, u plodů ze sklepa zase pokles (také během dvou týdnů). V broskvích z lednice byl pozorován kolísavý úbytek, v plodech z mrazničky kolísavý přírůstek aktivity LOX.

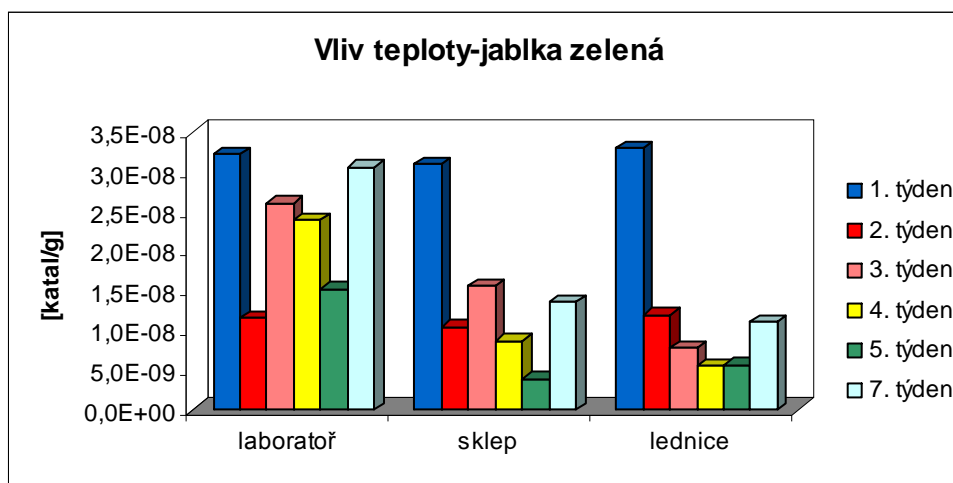
Ve švestkách z laboratoře a z lednice bylo pozorováno kolísání aktivity LOX kolem střední hodnoty. U plodů z ledničky a mrazničky se projevila vzrůstající tendence závislosti LOX na čase s kolísavým průběhem.

Aktivity LOX u hroznů skladovaných v laboratořijevila postupný pokles. U plodů ze sklepa byl zjištěn také pokles ale s kolísavým průběhem. Hrozny skladované v lednici a v mrazničce vykazovaly nejednoznačnou závislost. Při měření byly zjištěny hodnoty jak s výrazně pozitivní, tak s výrazně negativní odchylkou. Nelze proto 100% říci, zda aktivita v těchto plodech klesá či roste (viz Graf 76).



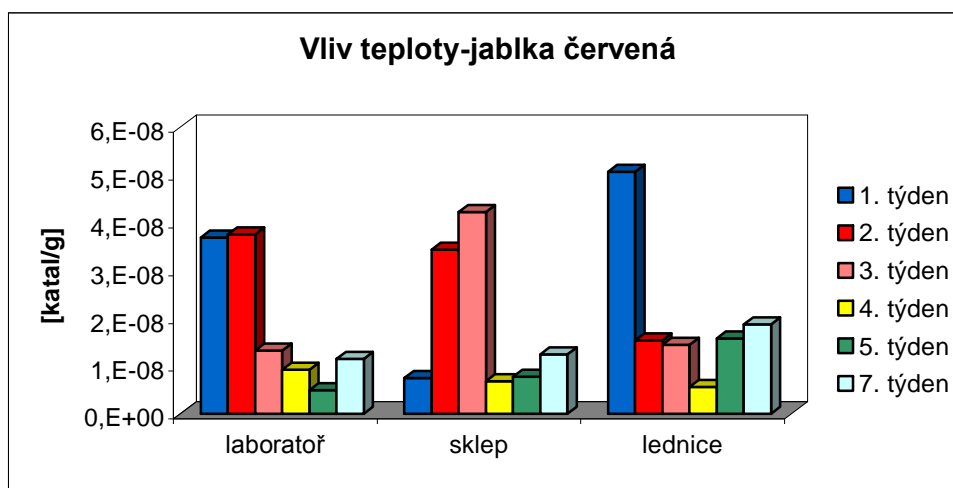
Graf 76: Vliv různých skladovacích teplot na aktivitu LOX v hroznech v závislosti na čase

U jablek zelených byl pozorován pokles aktivity LOX v závislosti na čase s kolísavým chodem u všech typů skladovacích teplot (viz Graf 77).



Graf 77: Vliv různých skladovacích teplot na aktivitu LOX v jablkách zelených v závislosti na čase

V jablkách červených byl zjištěn při skladování v laboratoři a v lednici pokles aktivity LOX s kolísavým chodem. U plodů uchovávaných ve sklepe se vyskytly jak výrazně pozitivní, tak výrazně negativní odchylky. Nelze tudíž jednoznačně určit klesající či stoupající tendenci (Graf 78).



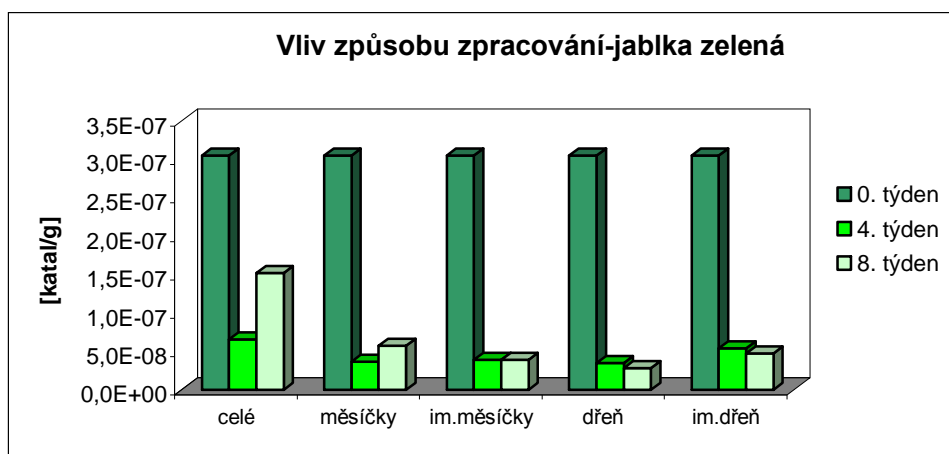
Graf 78: Vliv různých skladovacích teplot na aktivitu LOX v jablkách červených v závislosti na čase

4.12.2 Výsledky série 2 - Vliv různé formy zpracování plodů s následným zamražením na aktivitu LOX

Aktivita LOX byla sledována i ve druhé sérii experimentů zaměřených na sledování změn v ovoci v průběhu uchování mražením s různým způsobem opracování vzorku (kap. 3.3). Na stanovení byla použita část ovoce zpracovaná s PVP a Tritonem X-100 pod tekutým dusíkem (viz 3.2). V dalším textu jsou srovnány výsledky aktivit v plodech v rámci 2.studie. Přehledně jsou data shrnuta v následujících dvou tabulkách.

Tabulka 26: Naměřené hodnoty aktivity LOX na gram jedlého podílu u jablek zelených a červených, švestek a hroznů zpracovaných různými způsoby a následně zamražených

ovoce	způsob zpracování	LOX [katal/g]		
		0. týden	4. týden	8. týden
jablka zelená	celé plody	3,05E-07	6,55E-08	1,52E-07
	měsíčky		3,65E-08	5,74E-08
	impregnované měsíčky		3,92E-08	3,89E-08
	dřeň		3,48E-08	2,82E-08
	proslazená dřeň		5,45E-08	4,74E-08
jablka červená	celé plody	1,07E-07	1,72E-07	1,02E-07
	měsíčky		9,62E-08	1,03E-07
	impregnované měsíčky		3,42E-08	1,07E-07
	dřeň		2,95E-08	5,32E-08
	proslazená dřeň		4,01E-08	3,25E-08
hrozny	celé plody	6,53E-08	3,07E-08	4,09E-08
	impregnované celé plody		4,39E-08	5,08E-08
	dřeň		1,33E-08	3,54E-08
	proslazená dřeň		3,81E-08	3,90E-08
švestky	měsíčky	6,20E-08	3,09E-08	2,87E-08
	impregnované měsíčky		2,79E-08	4,07E-08
	dřeň		2,31E-08	1,19E-08
	proslazená dřeň		5,13E-08	6,30E-08



Graf 79: Vliv různého způsobu zpracování na aktivitu LOX v jablkách zelených v závislosti na čase

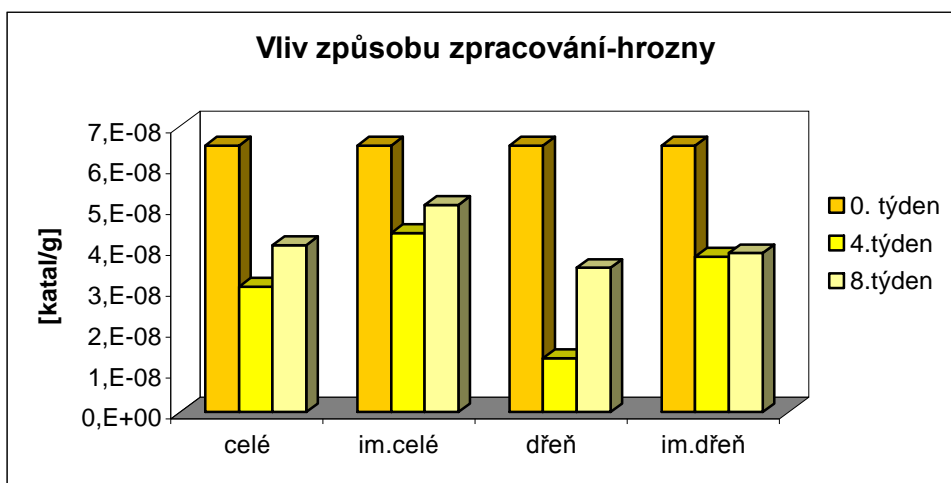
Tabulka 27: Naměřené hodnoty aktivity LOX na gram jedlého podílu u borůvek, brusinek, malin a jahod zpracovaných různými způsoby a následně zamražených

ovoce	způsob zpracování	LOX [katal/g]		
		0. týden	4. týden	8. týden
borůvky	celé plody	9,09E-08	2,13E-07	9,30E-08
	impregnované celé plody		7,50E-08	4,59E-08
	dřeň		6,41E-08	1,34E-07
	proslazená dřeň		3,66E-08	5,81E-08
brusinky	celé plody	4,73E-08	5,46E-08	1,12E-07
	impregnované celé plody		8,91E-08	1,36E-07
	dřeň		3,20E-07	6,64E-08
	proslazená dřeň		8,82E-08	1,70E-07
jahody	celé plody	3,16E-08	2,19E-07	1,24E-07
	impregnované celé plody		1,83E-07	2,95E-08
	dřeň		6,96E-08	7,98E-08
	proslazená dřeň		7,75E-08	3,63E-07
maliny	celé plody	7,71E-08	4,64E-07	5,97E-08
	impregnované celé plody		1,83E-07	2,12E-07
	dřeň		6,33E-08	8,79E-08
	proslazená dřeň		4,03E-08	1,37E-07

V jablkách zelených mražených ve formě celých plodů a měsíčků bez ošetření byl zaznamenán znatelný pokles aktivity LOX ve čtvrtém týdnu skladování. V osmém týdnu se hodnota opět mírně pozvedla, zůstala však pod úrovní prvně naměřené hodnoty v nultém týdnu. Lze tedy říci, že byl zaznamenán kolísavý pokles. U ostatních forem zpracování aktivita LOX klesala postupně (Graf 79).

U jablek červených byl zjištěn postupný pokles pouze u proslazených dření. U ostatních druhů zpracování byla zjištěna sinusová závislost. U obou typů měsíčků (s impregnací i bez ní) byl prvně pozorován pokles aktivity LOX, v osmém týdnu opět vzestup a to až na hodnotu zjištěnou v nultém týdnu. Lze tudíž říci, že v těchto druzích zpracování aktivita LOX v závislosti na čase kolísá. U celých mražených plodů došlo nejdříve k nárůstu aktivity lipoxygenasy, pak k poklesu až k hodnotě naměřené při zahájení pokusu. Opět je možné říci, že hodnota LOX kolísá. U neproslazených dření byl pozorován kolísavý pokles aktivity.

U hroznů aktivita LOX v závislosti na čase klesala u všech způsobů zpracování kolísavých průběhem (viz Graf 80).

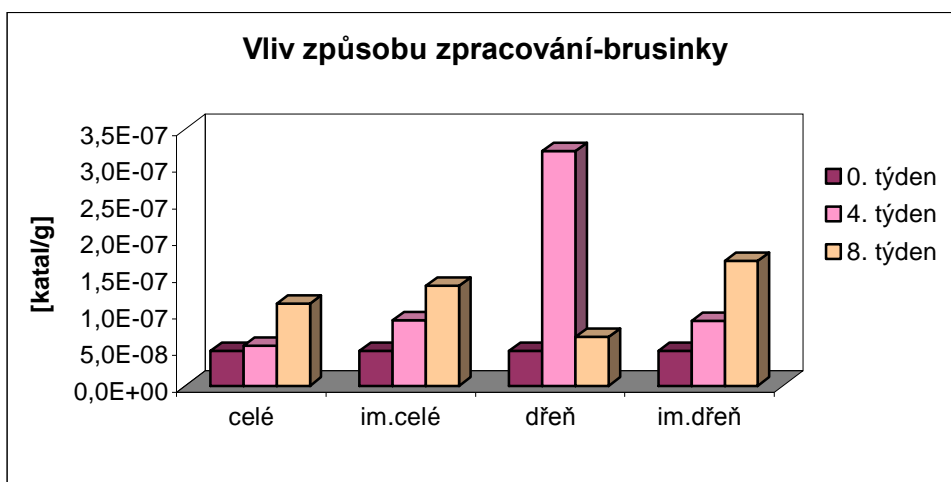


Graf 80: Vliv různého způsobu zpracování na aktivitu LOX v hroznech v závislosti na čase

Ve švestkách zpracovaných do formy měsíčků bez opracování a do neslazených dření aktivita postupně klesala. V impregnovaných měsíčcích byl pozorován taktěž pokles ale kolísavý. U impregnovaných dření aktivita LOX mírně vzrostla, opět nepravidelným chodem.

U celých impregnovaných borůvek se projevil postupný pokles aktivity tohoto enzymu. U impregnovaných dření byl pozorován také pokles ale kolísavě. U celých borůvek bez ošetření byl naměřen prudký vzestup aktivity LOX ve čtvrtém týdnu, v osmém byl pozorován opětovný pokles až k hodnotě naměřené v nultém týdnu. Závěrem je, že hodnota LOX v celých neimpregnovaných borůvkách kolísá. U neslazených dření hodnota aktivity nejprve klesla, pak stoupla v porovnání s hodnotou získanou v nultém týdnu. Jelikož byl nárůst větší než pokles, lze říci, že aktivita LOX kolísavě stoupla.

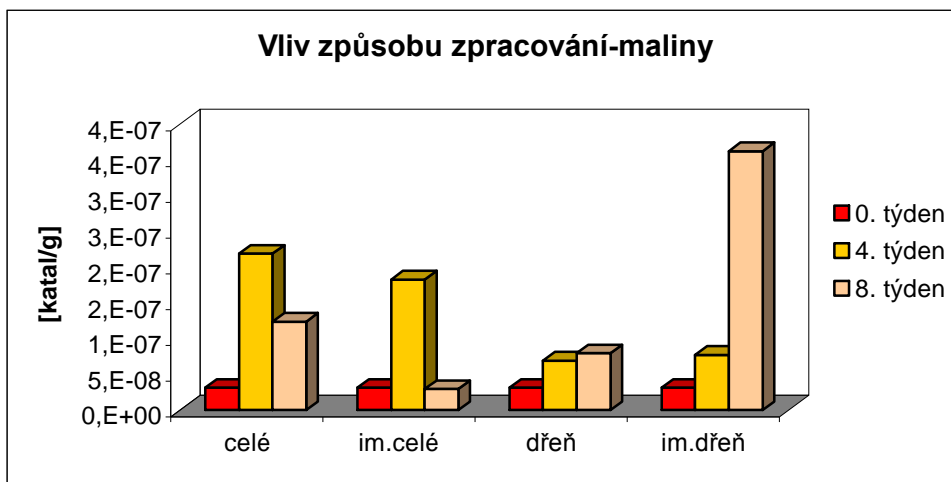
V brusinkách byl zjištěn nárůst aktivity ve všech formách zpracování. U celých plodů s impregnací i bez ní a v proslazených dřeních se tak dělo postupně, u nesladkých dření kolísavě (viz Graf 81).



Graf 81: Vliv různého způsobu zpracování na aktivitu LOX v brusinkách v závislosti na čase

V malinových dřeních (sladkých i nesladkých) postupně aktivita LOX v čase narůstala. V celých neošetřených malinách také rostla, ale nepravidelně. U impregnovaných celých

plodů hodnota aktivity nejprve vzrostla, pak poklesla až na úroveň hodnoty nultého týdne. Aktivita LOX v těchto plodech kolísala (Graf 82).



Graf 82: Vliv různého způsobu zpracování na aktivitu LOX v malinách v závislosti na čase

U celých impregnovaných jahod se projevilo postupné nárůst aktivity LOX v čase. Kolísavý vzestup byl naměřen v obou druzích dřeni. U celých neopracovaných jahod nejprve hodnota ve čtvrtém týdnu prudce vzrostla, v týdnu osmém pak výrazně klesla (až pod hodnotu prvního měření). V tomto případě nelze říci, jakou tendenci (klesající nebo rostoucí) závislost má.

Pro porovnání byla změřena hodnota aktivity lipoxygenasy v komerčně mražených švestkách ($6,04E-08$ katal/g) a v komerčně mražené jahodové dřeni ($1,10E-07$ katal/g). Hodnota švestek se blíží vzorkům upraveným do podoby impregnovaných měsíčků. Hodnota jahodové dřeni zase proslazené dřeni.

Trend hladin LOX ve větších plodech je v průběhu uchovávání spíše klesající, takže oxidační procesy v plodech budou zpomalené. V menších plodech aktivita spíše mírně roste.

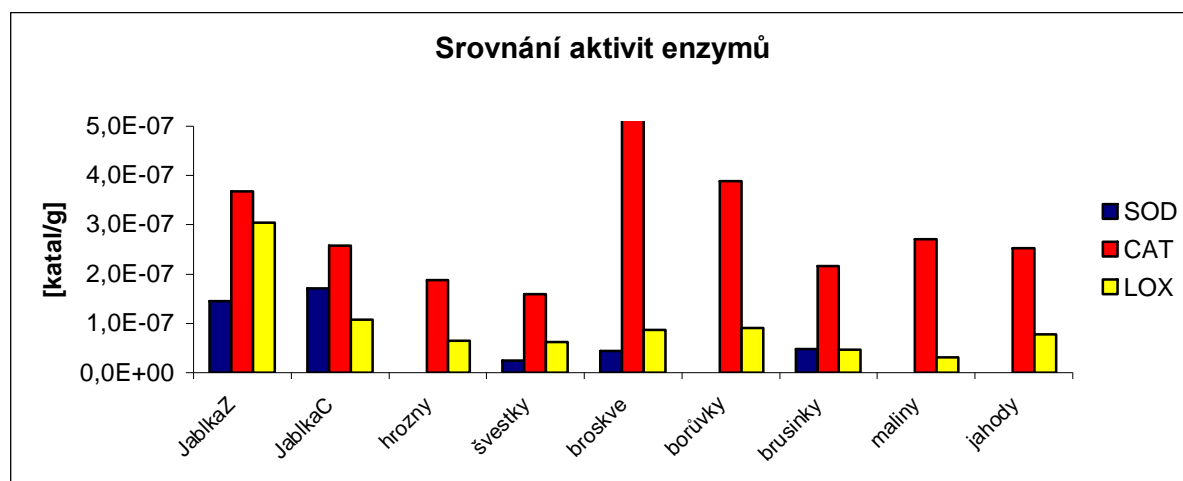
V přílohách (viz Příloha 1, Příloha 2, Příloha 3) jsou vloženy tabulky, kde jsou přehledně graficky shrnuty závislosti aktivit jednotlivých enzymů na čase. Šipkami jsou vyznačeny stoupající či klesající směry, případně kolísání, u každého druhu měřeného ovoce, u všech forem zpracování a u všech teplot skladování.

4.13 Vzájemné porovnání stanovených enzymů v jednotlivých odrůdách

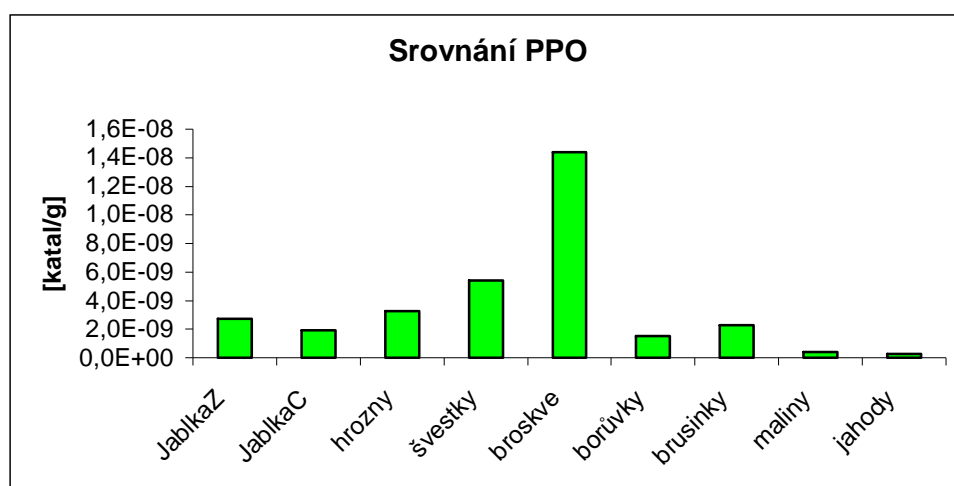
Byly vzájemně srovnány aktivity enzymů v čerstvých vzorcích ovoce (tzn. hodnot z nultého týdne) před zahájením skladování nebo před zpracováním do různých forem. Byly srovnávány čtyři druhy ovoce: jablka (červená i zelená), broskve, švestky a hrozny. Měření byla provedena ihned po přinesení vzorků do laboratoře, bez povrchové či jiné úpravy před uložením do různých skladovacích teplot. Toto srovnání slouží pro zjištění obsahu jednotlivých antioxidantů a dále na zjištění případných výrazných odlišností v průběhu uchování plodů mezi různými druhy ovoce.

Nejvyšší aktivitu měla katalasa (viz Graf 83). Na druhém místě byla ve většině případů lipoxygenasa. Polyfenoloxidas měla v poměru k ostatním enzymům velmi malou aktivitu (musela být vynesena i do samostatného grafu, aby byla ve srovnání vůbec patrná-viz Graf 84).

Malé plody (borůvky, brusinky, jahody a maliny) měly aktivitu PPO v porovnání s ostatními většími plody nízkou. Aktivita LOX byla vyšší pouze u zelených jablek, u ostatních plodů byla srovnatelná. Oba druhy jablek vynikaly i ve velikosti aktivity SOD proti ostatnímu ovoci. Jednoznačně nejvyšší hodnota CAT byla zjištěna v broskvích (v grafu musela být její hodnota uříznuta, aby byly lépe patrné ostatní enzymy s nižší aktivitou).



Graf 83: : Srovnání aktivit SOD, CAT a LOX v jednotlivých druzích ovoce



Graf 84: Srovnání aktivity PPO v jednotlivých druzích ovoce

Zjištěné aktivity SOD v ovoci většinou ještě stoupaly v průběhu uchování jak při mírně snížených teplotách (první série pokusu), tak při velmi nízkých teplotách a různých formách zpracování (druhá série pokusu). Vzrůst byl patrný a dobře viditelný u všech druhů ovoce.

Vysoké aktivity CAT v první linii pokusu (sledování vlivu teplot skladování) zjištěné v hroznech švestkách a broskvích vlivem tohoto typu skladování velmi výrazně poklesly. V jablkách naopak stouply. Vlivem zamražení plodů ovoce a zpracování do různých podob (druhá linie) se aktivita CAT také snížila, ale ne tolik.

Hodnoty LOX se podstatně mění v závislosti na teplotě skladování. V první sérii pokusu: čím nižší teplota na stupnici od pokojové až po teplotu v lednici, tím byl více viditelný pokles aktivity tohoto enzymu. Při uchování v mrazničce záleželo spíše na velikosti nadého plodu než na formě zpracování. U větších plodů (kromě jablek zelených) byly zjištěny menší rozdíly mezi hodnotami aktivity než tomu bylo u plodů malých. V malých plodech se projevilo spíše kolísání nebo nárůst, ve velkých jednoznačný pokles.

PPO je nejméně zastoupený enzym ze všech měřených. Dále je během skladování degradován v závislosti na teplotě skladování i na velikosti plodu. Malé plody ho po zmražení většinou ztrácejí, větší si ho udržují.

4.14 Kultivace mikroorganismů

V rámci první série experimentů při skladování broskví a švestek v laboratoři a ve sklepě došlo během 14 dní k nárůstu plísni na povrchu plodů. Napadené vzorky byly pro další měření biologicky aktivních látek nepoužitelné.

Byla provedena kultivace plísni z napadených broskví, dále zjištění povrchové a vzdušné mikroflóry a také mikroskopie vyrostlých plísni na tuhých médiích.

4.14.1 Kultivace plísni z ovoce

Postupem, který je uveden v odstavci 3.9.1, byly namnoženy na tekutých médiích plísně, které napadly vzorky v laboratoři a ve sklepě (viz Příloha 19).

Po rozkultivování plísni v tekutém médiu proběhlo přeočkování na tuhé agary (viz 3.9.1).

Na médiích zaočkovaných vzorkem z laboratoře narostly tři druhy plísni (fotky morfologických a mikroskopických znaků jsou uvedeny v přílohách-viz Příloha 20).

Na tuhém agaru, který byl naočkován vzorkem mikroorganismů z lednice, vyrostly pouze bakterie a kvasinky. Žádnou plíseň se nepodařilo nakultivovat.

4.14.2 Kultivace vzdušné mikroflóry

Postupem uvedeným v kapitole 3.9.2 byly připraveny tuhé agary se vzorkem vzdušné mikroflóry z míst, kde bylo skladováno ovoce pro analýzu.

Ukázka některých živných půd je uvedena v přílohách (viz Příloha 21). Po kultivaci byla provedena mikroskopie s popisem morfologií kolonií. Sledováním mikroskopických znaků bylo zjištěno, že vzorky obsahovaly pravděpodobně některé plísně rodu *Penicillium* a *Mucor*.

4.14.3 Kultivace povrchové mikroflóry

U broskví a švestek skladovaných v laboratoři, sklepě a v lednici byla provedena kultivace povrchové mikroflóry dle postupu uvedeném v kapitole 3.9.3.

V časovém intervalu, který je uveden v téže kapitole, bylo porovnáváno množství narostlých kolonií se standardem. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce a jsou přepočítány na KBE/cm² (kolonie tvořící jednotku na cm²).

Tabulka 25: Výsledky odečtu množství mikroorganismů na povrchu broskví a švestek skladovaných při různých teplotách [KBE/cm²]

	bakterie				kvasinky			plísně		
	1. strana		2. strana		24h	48h	6.den	24h	48h	6.den
	24h	48h	24h	48h						
B-P	0	17	3,5	58	0	0	3,5	0,6	2,3	2,3
B-S	17	17	3,5	3,5	0	17	17	0,6	2,3	2,3
B-L	0	3,5	3,5	3,5	0	3,5	3,5	0,6	0,6	0,6
S-P	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	0,6	2,3	2,3
S-S	3,5	3,5	17	17	3,5	58	58	0	0	0
S-L	3,5	3,5	3,5	3,5	0	0	0	2,3	2,3	2,3

Byla zjištěna převážně přítomnost bakterií a kvasinek. Plísně se ve složení povrchové mikroflóry uplatňovaly v menší míře.

5 DISKUZE

Náplní této práce bylo sledovat aktivitu vybraných enzymů a obsah zvolených nízkomolekulárních antioxidantů v závislosti na způsobu a délce skladování.

Celá práce může být rozdělena do dvou částí realizovaných jako dva dlouhodobé experimenty. V první sérii byl pozorován vliv teploty skladování celých plodů na výše zmiňované parametry. Byly voleny takové způsoby, které jsou běžné v každé domácnosti: úchova při pokojové teplotě, ve sklepě, v lednici a v mrazničce. Jako materiál byly vybrány nejběžnější druhy ovoce – jablka, švestky, broskve a hrozny.

Druhá série experimentů byla zaměřena na změny v plodech v průběhu uchovávání mražením. Byly testovány stejné typy větších plodů jako v první sérii a k tomu ještě skupina drobného ovoce. Poněvadž mražení je více invazivní, byl zkoumán i vliv různého zpracování ovoce před uložením do mrazničky. Opět byly voleny takové způsoby opracování, které jsou běžně proveditelné v domácnostech: mražení celých plodů, nakrájených plodů na menší části (měsíčky) a zpracování do podoby dřeně. Byl také zkoušen vliv povrchové impregnace. Ošetření povrchů plodů se praktikuje spíše ve výrobních závodech a provádí se hlavně za účelem udržení či zlepšení vzhledu (případně i chuti). Při této práci byly používány impregnační roztoky obsahující zejména kyselinu askorbovou a sacharózu.

Jak již bylo zmíněno, jako vzorky bylo zvoleno ovoce, které je lokálně pěstováno a rovněž dostupné v obchodní síti po celý rok: jablka, broskve, švestky, hrozny. Z jablek byla měřena jak odrůda červená, tak odrůda zelená, aby mohly být porovnány rozdíly i mezi nimi. Část měření (hlavně stanovení aktivit enzymů) pak probíhala i v borůvkách, brusinkách, jahodách a malinách.

Před vlastní diskuzí o naměřených výsledcích je nutné podotknout, že ovoce je živá tkáň a je proto velmi složité vyvozovat nějaké striktní závěry. Měření bylo sice prováděno z průměrného vzorku, ale i tak nemohly být podchyceny všechny vlivy jako například vliv ročního období, místa růstu či období sklizně.

Jedním z důležitých faktorů pro spotřebitelskou přijatelnost dlouhodoběji skladovaných plodů ovoce je čerstvý vzhled, dobrá chuť a vůně. To do značné míry závisí na obsahu vody v plodech. Pokusně bylo zjištěno, že při skladování ovoce při pokojové či mírně snížené teplotě (ve sklepě či ve chladničce) obsah sušiny a tím i obsah vody v ovoci kolísá (vztaženo na gram jedlého podílu). Pokud je ovoce zmrazeno, dochází ke ztrátám obsahu vody. Tento jev je pochopitelný. Voda obsažená v plodech zmrzne a potrhá tkáň ovoce, čímž se zničí bariéra proti úniku šťávy. Tento jev však nebyl nijak výrazný a nejspíš by neovlivnil interpretaci výsledků analýzy antioxidantů. Proto nebyly dané výsledky vztahovány na gram sušiny, nýbrž na gram jedlého podílu ovoce. Druhým důvodem byla možnost srovnání s literárními zdroji, protože v dostupných pracích s podobně zaměřenou tematikou používají srovnání právě na gram jedlého podílu, nikoli na gram sušiny [34, 35]. Podobné průběhy závislosti obsahu sušiny na gram jedlého podílu byly zjištěny i při provádění jiných pokusů (viz 2.7.1, 2.7.2 a 2.7.4) [1, 33, 35].

Při měření celkové antioxidační aktivity byl zjištěn u všech vzorků, které byly měřeny, při všech teplotách skladování a všech formách zpracování před zmražením, prudký pokles hodnoty proti hodnotě zjištěné v čerstvých plodech. S velkou pravděpodobností se tak stalo

vlivem teplotního šoku při změně skladovacích podmínek nebo vlivem zásahu do integrity plodu v druhé části pokusu. Tento jev je právě dobře viditelný ve zmiňované druhé linii měření. U plodů, do kterých nebylo příliš zasahováno krájením (hrozny) je vidět pokles hodnot ABTS méně než u plodů, které byly náročněji zpracovány (jablka i švestky). Pozitivní vliv na ztráty ABTS má pak také použitá impregnace plodů před vlastním zamražením. Celkově lze shrnout, že hodnota celkové antioxidační aktivity během skladování roste jak při mírně snížených teplotách (pokojová, ve sklepě, v lednici), tak i při mražení vzorků. Tento závěr je vcelku pochopitelný, jelikož ovoce má antioxidační látky pro potřeby vlastní ochrany před poškozením, ke kterému vlivem skladování dochází. Vzrůstající trend hodnot ABTS na délce skladování byl dokumentován i v literatuře [33], kde byly jako vzorky použity impregnované měsíčky nektarinek. Počáteční výkyv hodnoty celkové antioxidační aktivity byl zaznamenán v jiném experimentu [35], zde jako vzorky sloužily některé tropické druhy ovoce nejen ve formě celých plodů, nýbrž i jejich homogenizované formy (dřeně).

Obecný trend změn hodnot vitamínu C na délce skladování je vzrůstající, podobně jako u ABTS. V impregnovaných měsíčkách jablek, které byly následně uchovány v mrazničce po dobu 8 týdnů, hodnoty tohoto vitamínu rostly výrazněji. To bylo pravděpodobně dáno obsahem kyseliny askorbové v impregnačním roztoku (kyselina se naadsorbovala do tkání jablek a pak zvyšovala hodnoty vitamínu C při titračním stanovení). Ke stejnému závěru došli i vědci z Boloňské univerzity při měření impregnovaných nektarinek [33].

V některých plodech ovoce byl pozorován antagonismus mezi obsahem celkových polyfenolů a flavonoidů a obsahem vitamínu C. Obsah vitamínu C povětšinou stoupal (viz výše). Jak bylo zmíněno v teoretické části této práce, je vitamin C potřeba nejen na obranu organismu před volnými radikály (i když je výborným antioxidantem). Je také důležitý pro syntézu různých biogenních látek a pro fungování celého organismu. V ovoci je vesměs vitamin C obsažen ve vysokém množství a lze předpokládat, že při aktivaci obranných mechanismů proti volným radikálům se jeho obsah zvyšuje. Fenolické látky představují heterogenní skupinu látek, některé se mohou působením oxidantů transformovat nebo degradovat, proto je pozorován úbytek jejich celkového obsahu. Mírný nárůst jejich obsahu byl však zaznamenán například v plodech švestek, skladovaných v laboratoři, lednici a ve sklepě. Tento jev může být vysvětlen tím, že se některé ovoce „připravuje“ na strádání během skladování a tvoří si obranné látky takzvaně do zásoby. V mražených plodech žádná syntéza nejspíše probíhat nebude, nárůst těchto látek tak může být způsoben uvolňováním vázaných forem z tkání.

Pokles v obsahu celkových polyfenolů byl zaznamenán také v literatuře u mražených plodů v práci popsané v bodě 2.7.4 [35].

Nejšetrnější změny v obsahu celkových polyfenolů, flavonoidů, hodnoty ABTS a vitamínu C byly zjištěny při skladování ovoce po dobu 2 měsíců při mírně snížených teplotách. Ze skladovaných druhů projevíly překvapivě vysokou stabilitu hrozny, v lednici si zachovaly nutriční i sensorické vlastnosti po dobu cca 6 týdnů. Při mražení pak dochází k výrazným změnám v obsahu výše uvedených látek.

Obsahem této práce byla dále optimalizace analýzy katechinů a flavonoidů instrumentální technikou HPLC. Flavonoidy byly analyzovány v hydrolyzovaných vzorcích, zatímco pro katechiny byla používána extrakce vodou, což je postup používaný pro některé nápoje a rostlinné šťávy [33]. Proto byl testován mimo jiné vliv hydrolýzy vzorku na obsah a množství katechinů. Po hydrolýze byly zaznamenány vyšší plochy některých piků v chromatogramu.

Po ověření na LC/PDA/ESI-MS bylo zjištěno, že se tak děje vlivem nárůstu především množství jednotlivých katechinů, hydrolyza zřejmě způsobila rozklad glykosidů a uvolnění jednotlivých aglykonů z vázaných forem. Vzhledem k tomu, že část vzorků (1.série) byla analyzována ještě před testováním hydrolyzy a změny se neprojeví stejně výrazně u všech druhů ovoce a u všech frakcí, byl používán postup bez zařazené hydrolyzy. Testována dále byla rovněž gradientová eluce, která vycházela lépe pro některé druhy ovoce, př. jablka červená i zelená (jak pro katechiny, tak pro flavonoidy), avšak u hroznů při měření katechinů byla zase výrazně lepší eluce izokratická. S ohledem na jednoduchost a dobu analýzy a rovněž na srovnávací charakter experimentů byla v obou studiích používána k analýze flavonoidů i katechinů optimalizovaná izokratická eluce.

Při sledování závislosti obsahu jednotlivých katechinů a flavonoidů na čase u různě skladovaných plodů, byl pozorován většinou podobný trend závislosti dané látky ve všech druzích ovoce (př.: nárůst obsahu kyseliny chlorogenové ve všech druzích a formách ovoce skladovaného v mrazničce). I když individuální antioxidanty většinou rostly, celkové parametry v průběhu skladování klesaly. Nutné je podotknout, že nárůst individuálních látek byl v jednotkách (maximálně desítkách) $\mu\text{g/g}$, kdežto celkové parametry jsou uvedeny v jednotkách mg/g . Katechiny a flavonoidy měřené v této práci na HPLC většinou rostly, to znamená, že obsah jiných látek, které nebyly podrobeny detekci v tomto pokusu klesal.

Nárůst katechinů byl zjištěn v souladu s jinými pracemi zabývajícími se obsahem antioxidantů v ovoci [1]. V této práci byl však stanoven v rozporu s jinou [33] nárůst hodnoty kyseliny chlorogenové. Ve zmiňované práci měřily různě upravené a mražené nektarinky. Při srovnání s mraženými vzorky v této práci je vidět, že vzrůst obsahu této kyseliny sice zaznamenán byl, ale u větších plodů jako jsou jablka pouze menší. Na druhou stranu u menších plodů (švestky, hrozny) došlo k výraznějšímu zvýšení hladiny kyseliny chlorogenové. Z toho vyplývá, že každé ovoce (také v závislosti na velikosti) užívá jiné způsoby obrany před poškozením a jinou kombinaci látek zapojených do stresové odezvy.

Při srovnání jednotlivých katechinů a flavonoidů lze opět dojít k názoru, že mražení sice výrazně prodlouží údržnost ovoce, nicméně výrazněji poškodí samotné ovoce ve smyslu redukce obsahu aktivních látek.

Antagonismus v působení byl pozorován i v činnosti antioxidantních enzymů. Zde se však projevila výrazněji závislost na podmínkách skladování a také na druhu ovoce.

Nejprve bylo nutné otestovat podmínky rozmrazování vzorků tak, aby byly co nejvíce zachovány aktivity enzymů. Pokusně bylo zjištěno jako nejlepší postup rozmrazování cca půl hodiny při laboratorní teplotě. Při pokusech popsanych v literatuře [1, 33, 34, 35] používali dobu tání podstatně delší. Tito autoři však neměřili ve svých vzorcích enzymovou aktivitu a nízkomolekulární látky nereagují tak rychle jako právě enzymy. Zde byl volen kompromis mezi zachováním aktivit enzymů a nezbytnou dobou tání ovocné tkáně.

Nárůst aktivity SOD byl zjištěn v průběhu skladování za různé teploty ve všech druzích ovoce. Antagonisticky vůči SOD působila CAT v broskvích, švestkách a v hroznech. V plodech jablek její aktivita také stoupla. U PPO a u LOX byl zjištěn vesměs pokles aktivit. U PPO byl předpoklad již před zahájením měření, že její aktivita bude klesat. Je to obranný enzym, který chrání plod ovoce při mechanickém poškození (projeví se zhnědnutím například na řezu) a před ničením oxidací.

Při pokusu s mraženými vzorky zpracovanými do různé podoby byla u malých plodů (borůvky, brusinky, maliny a jahody) zaznamenána stejná závislost u všech plodů: aktivita

SOD a LOX stoupala a aktivita CAT a PPO klesala s dobou zmražení. U větších plodů se trendy lišily. U obou druhů jablek stoupala aktivita pouze u PPO, zatímco aktivity ostatních enzymů klesaly. U hroznů a švestek rostla aktivita kromě PPO také u SOD.

Tyto poznatky opět ukazují na to, že v živých organizmech je složitý systém obrany před poškozením tkání. Řada obranných látek působí synergisticky, řada antagonisticky, takže při poklesu jedné látky může dojít k nárůstu jiné, aby byla stále zachována dostatečná ochrana plodu před zničením. Současně jsou s aktivitami enzymů propojeny i aktivity nízkomolekulárních obranných systémů. Souvislost mezi poklesem aktivity PPO a nárůstem obsahu individuálních polyfenolických látek byla dobře viditelná např. v plodech švestek uchovaných v mrazničce při druhé sérii pokusu.

Žádný v výše pospaných antioxidačních systémů nedokázal zabránit růstu mikroorganismů na plodech broskví a švestek uložených v laboratoři a ve sklepě. Vzorky se tak staly pro další měření nepoužitelné. Na otázku, kde došlo ke kontaminaci (zda ještě v obchodní síti či až v laboratoři) odpověděla kultivace samotných plísňů z napadených plodů a také zjištění povrchové a vzdušné mikroflóry. Na povrchu nenapadených plodů byly zjištěny spíše kvasinky a bakterie, než plísně. Kultivace vzdušné mikroflóry však poskytla širokou paletu různých druhů plísňů. Plísně získané z napadených plodů a plísně nakultivované ze vzdušné mikroflóry si byly morfologicky i mikroskopicky velmi podobné. Závěrem tedy je, že plody byly infikovány až při manipulaci v laboratoři, případně ve sklepě. Vlivem vysokého obsahu vody byly broskve a švestky vhodným substrátem pro růst těchto mikroorganismů. U hroznů k nákaze nedošlo. Mohlo tomu být z důvodu silnější voskovité slupky (proti broskvím a švestkám) nebo pravděpodobněji postřikem, který na ně byl jistě aplikován před transportem nebo sklizní právě na potlačení těchto mikroskopických škůdců. V lednici plody napadeny nebyly, i když test na obsah plísňů nakultivovaných ze vzduchu v místě skladování plodů byl pozitivní. To mohlo být způsobeno vlivem nižší teploty, při které se plísňům nedaří tak dobře jako při běžné pokojové teplotě.

Na základě všech získaných výsledků nelze stanovit nějaké obecné doporučení ohledně skladování ovoce typu: čím nižší teplota skladování, tím lepší. Ovoce sice při nižší teplotě vykazovalo delší dobu údržnosti a lepší senzorní vlastnosti, avšak obsah aktivních látek spíše klesal. U plodů, které byly skladovány v mrazničce, měly závislosti dost podobný tvar, většinou doprovázený velkým poklesem (nebo naopak vzrůstem) hodnoty po zamražení proti hodnotě zjištěné v čerstvém ovoci. K tomu docházelo nejspíše díky hrubému rozrušení tkáně plodů. Proti čerstvému ovoci tak mražené ovoce ztrácí jednorázově při zpracování na obsahu biologicky aktivních látek, což lze považovat za obecný fakt.

Při uchování plodů ovoce v mírnějších teplotních režimech (laboratorní teplota, sklep, lednice) nedochází k takovým ztrátám biologicky účinných látek, nicméně údržnost je velmi omezena a zkrácena. Hlavním rizikem je napadení plísňemi. Jako kompromis může být považováno uchování v lednici, kdy ještě nejsou negativní změny tak prokazatelné a zároveň je ovoce chráněno proti plísňům sníženou teplotou.

6 ZÁVĚRY

V této práci byl zkoumán vliv dlouhodobého skladování na obsah biologicky aktivních složek v plodech ovoce. Byly analyzovány vzorky broskví, švestek, červených a zelených jablek, hroznů a částečně také borůvky, brusinky, jahody a maliny. Jako skladovací teploty byly zvoleny: laboratorní teplota, teplota ve sklepě rodinného domu, teplota v chladničce a v mrazničce. Další částí pokusu bylo studium vlivu zpracování ovoce s následným uchováním v mrazničce na obsah nízkomolekulárních látek a aktivitu antioxidantních enzymů.

Hlavní závěry práce:

- Obsah sušiny v plodech uložených v laboratoři nebo v atmosféře se sníženou teplotou kolísá jen mírně. U vzorků skladovaných v mrazničce byl zaznamenán slabý pokles.
- Hladina celkové antioxidační aktivity výrazně poklesla ve všech analyzovaných druzích ovoce vlivem manipulace s plody při zakládání experimentů a vlivem teplotního šoku při změně teploty skladování. Při dalším sledování její hodnota opět vzrostla. Celková antioxidační aktivita v průběhu skladování narůstá, což koresponduje i s trendem změn hladiny vitamínu C.
- Obsah vitamínu C u většiny vzorků v průběhu skladování vzrostl, což může být způsobeno změnami spojenými s dozráváním ovoce.
- Obsah celkových flavonoidů a polyfenolů většinou klesal s délkou uchovávání. U některých druhů ovoce byl pozorován opačný trend mezi obsahem vitamínu C a celkových flavonoidů a polyfenolů, je možné, že tyto látky se mohou ve tkáních vzájemně zastoupit.
- Pro stanovení katechinů a flavonoidů metodou HPLC/UV-VIS byly testovány kolony s třemi různými náplněmi. Jako nejlepší byla vybrána kolona Zorbax Eclipse XDB-C18.
- Flavonoidy byly analyzovány v hydrolyzovaných vzorcích po ethylacetátové extrakci. Testování hydrolýzy vzorků i pro stanovení katechinů metodou HPLC vede k uvolnění více druhů katechinů z glykosidicky vázaných forem ve tkáních, nedochází však k významnému nárůstu koncentrace převážně většiny derivátů. Postup analýzy katechinů je korektní i bez užití hydrolýzy, pouze tento fakt musí být uveden při zpracování a diskutování výsledků.
- Byl testován vliv gradientové či izokratické eluce na kvalitu dělení jednotlivých katechinů a flavonoidů. Pro každý druh ovoce i každou stanovovanou látku lze nalézt vhodnou korekci podmínek měření, pro srovnávací experimenty byla s ohledem na časovou zátěž vybrána optimalizovaná izokratická eluce..
- Obsah jednotlivých katechinů a flavonoidů se měnil s dobou uchovávání různě, a to jak v závislosti na podmínkách, tak i na druhu ovoce. Hodnoty celé skupiny látek však byly vždy vyváženy tak, že pokud byl u jednoho druhu zaznamenán pokles, u jiného derivátu došlo k vzestupu hodnoty. Plody si tak dlouhodobě udržovaly aktivní ochranu před nepříznivými vlivy spojenými se stresovými podmínkami.
- U jednotlivých antioxidačních enzymů byl také pozorován antagonismus či synergismus, v každém druhu ovoce však vzájemně spolupracovaly jiné druhy enzymů. Obecně byl zaznamenán pokles aktivity PPO vlivem skladování.
- Bylo zjištěno, že vzorky, které během čtrnácti dnů prvního pokusu zplesnivěly byly kontaminovány při manipulaci v prostoru uchovávání, ne v obchodní síti.

Z uvedených měření a výsledků je zřejmé, že ovoce je živý organismus, který se brání nepříznivým podmínkám komplexním regulovaným systémem antioxidační ochrany. Při nastavení vhodných podmínek lze docílit dlouhodobé úchovy bez výrazných ztrát na biologické a výživové hodnotě.

7 POUŽITÉ ZDROJE

- [1] BLANDA, Giampaolo, et al. Effect of frozen storage on the phenolic content of vakuüm impregnated Granny Smith and Stark Delicious apple cvv.. *European Food Research and Technology*. 2008, 5, s. 1229-1237. ISSN 1438-2377.
- [2] BALAŠTÍK, Jaroslav. *Konzervování potravin v domácnostech*. 1. Praha : Státní zemědělské nakladatelství, 1964. 303 s.
- [3] ZEIGER, E. Illusions of safety: antimutagens can be mutagens, and anticarcinogens can be carcinogens. *Mut. Research* 543, 2003. s. 191-194.
- [4] ABASSI, N. A., KUSHAD, M. M., ENDRESS, A. G. Active oxygen-scavenging enzymes activities in developing apple flowers and fruits. In *Scientia Horticulturae*, 1998. s. 183-194.
- [5] BAO, H., REN, H., ENDO, H., TAKAGI, Y., HAYASHI, T. Effects of heating and the addition of seasonings on the anti-mutagenic and anti-oxidative activities of polyphenols. *Mut. Research* 86, 2004. s. 517-524.
- [6] VITAGLIONE, P., FOGLIANO, V. Use of antioxidants to minimize the human health risk associated to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in food. *J. Chromatography B* 802, 2004. s. 189-199.
- [7] HALLIWELL, B. Protection against tissue damage in vivo by desferrioxamine: What is its mechanism of action?. *Free Radic. Biol. Med.* 7, 1986. s. 645-651.
- [8] ĎURAČKOVÁ, Z. *Volné radikály a antioxidanty v medicíně (I)*. Bratislava: Slovak Academic Press, 1998.
- [9] ROSYPAL, S. *Úvod do molekulární biologie II*. 2. vyd. Brno, 1997.
- [10] PEČ, P.: *Laboratorní cvičení z biochemie*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2000.
- [11] HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant: *Free Rad. Res. Comm.* 9, 1990. s. 1-32.
- [12] KLAUNING, J. E., XU, Y., ISENBERG, J. S. *The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis*: *Environ. Hlth Perspect.* 106, 1998. s. 289-295.
- [13] FUJIKI, H., et al. *Cancer inhibition by green tea*: *Mut. Research* 402, 1998. s. 307-310.
- [14] RAUSCHER, R., EDENHARDER, R., PLATT, K. L. *In vitro antimutagenic and in vivo anticlastogenic effects of carotenoids and solvent extracts from fruits and vegetables rich in carotenoids*: *Mut. Research* 413, 1998. s. 129-142.
- [15] ROEDING-PENMAN, A., GORDON, M. H. *Antioxidants properties of catechins and green tea extracts in model food emulsions*: *J. Agric. Food. Chem* 45, 1997. s. 4267-4270.
- [16] KURODA, Y. Bio-antimutagenic activity of green tea catechins in cultured Chinese hamster V79 cells: *Mut. Research* 361, 1996. s. 179-186.
- [17] CHEN, H., ZUO, Y., DENG, Y. *Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography*: *J. Chromatography A* 913, 2001. s. 387-395.
- [18] BLOCK, G. *A role for antioxidants in reducing cancer risk*: *Nutr. Rev.* 50, 1992.
- [19] POKORNY, J., YANISHLIEVA, N., GORDON, M. *Antioxidants in Food-Practical Applications*: Woodhead Publishing 380, 2001.
- [20] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*. 1. vyd. Tábor : Osis, 1999.

- [21] ODIN, A. P. *Antimutagenicity of the porphyrins and non-enzyme porphyrin-containing proteins*: Mut. Research 387, 1997. s. 55-68.
- [22] VOET, D., VOETOVA, J. G. *Biochemie*. 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, a. s., 1995.
- [23] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. upr. vyd. Praha: Akademie věd České republiky, 2002. 3 sv. (180, 135, 191 s.). ISBN 80-200-0600-1.
- [24] HAVLOVÁ, Pavla. *Hydrolytické a oxidoredukční enzymy ječného sladu (Studijní zpráva)*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1999. ISBN 80-7271-040-0.
- [25] NAG, PRATIMA, NAG, PARIMAL, PAUL, A. K., MUKHERJI, S. *Toxic action of zinc on growth and enzyme activities of rice oryza sativa L. Seedlings*. Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological [online]. 1984 [cit. 2008-05-16], s. 45-59.
- [26] SARKAR, R. K., BANERJEE, A., MUKHERJI, S. *Acceleration of peroxidase and catalase activities in leaves of wild dicotyledonous plants, as an indication of automobile exhaust pollution*. Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological [online]. 1986 [cit. 2008-05-16], s. 289-295.
- [27] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [28] [Http://www.hplc.cz](http://www.hplc.cz) [online]. 17. srpna 2007 [cit. 2010-04-27]. UV/VIS HPLC detektory. Dostupné z WWW: <http://www.hplc.cz/Teorie/UV_VIS_detector.html>.
- [29] [Http://cheminfo.chemi.muni.cz](http://cheminfo.chemi.muni.cz) [online]. 24.10.2001 [cit. 2010-04-27]. Hmotnostní spektrometrie. Dostupné z WWW: <http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/MS/ms.pdf>. [21*]
- [30] BALAŠTÍK, Jaroslav. *Konzervování potravin v domácnostech*. 2. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1964. 303 s.
- [31] KYZLINK, Vladimír. *Teoretické základy konzervace potravin*. Praha: Nakladatelství technické literatury, n. p., 1988. 510 s.
- [32] KAMENICKÝ, Karel. *Konzervace ovoce a zeleniny: Ovocnicko-zelinářské technologie*. 2. Praha: A. Neubert, 1941. 487 s.
- [33] BLANDA, Giampaolo, et al. Phenolic content and antioxidant capacity versus consumer acceptance of soaked and vacuum impregnated frozen nectarines. *European Food Research and Technology*. 2008, 1, s. 191-197. ISSN 1438-2377.
- [34] TALENS, P., et al. Influence of osmotic dehydration and freezing on the volatile profile of kiwi fruit. *Food research International*. 2003, 36, s. 635-642.
- [35] PATTHAMAKANOKPORN, Oruma, et al. Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2008, 21, s. 241-248.
- [36] *What's in Season?* [online]. 2010 [cit. 2010-04-30]. What's in Season?. Dostupné z WWW: <<http://michaelkhong.com/whatsinseason/fall.html>>.
- [37] *Lannaworld* [online]. 2008 [cit. 2010-04-30]. Dostupné z WWW: <<http://www.lannaworld.com>>.
- [38] *OK Nation* [online]. 2010 [cit. 2010-04-30]. Dostupné z WWW: <www.oknation.net>.
- [39] ZHANG, Min, et al. Effects of freezing conditions on quality of areca fruits. *Journal of Food Engineering*. 2004, 61, s. 393-397.

- [40] *Polynesian produce Stand* [online]. 2010 [cit. 2010-04-30]. Kugumaru Dwarf Palm Tree Ultra RARE Areca novohibernica. Dostupné z WWW: <www.vendio.com>.
- [41] BLANDA, Giampaolo, et al. Osmotic dehydrofreezing of strawberries : Polyphenolic content, volatile profile and consumer acceptance. *Food Science and Technology*. 2009, 42, s. 30-36.
- [42] BŘEZINOVÁ BELCREDI, N., EHRENBERGEROVÁ, J., PRÝMA, J., HAVLOVÁ, P. Stanovení aktivity enzymu superoxiddismutasy pomocí soupravy Ransod v rostlinném materiálu. *Chemické listy*, 101 (6), 2007. s. 504-508.
- [43] STEPHANE, M., et al. *Unfolding and refolding of active apple polyphenol oxidase*. In *Phytochemistry*., 1998. s. 1213-1217.
- [44] SALA, José M.; LAFUENTE, Maria T. Catalase in the Heat-Induced Chilling Tolerance of Cold-Stored Hybrid Fortune Mandarin Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999, 47 (6), s. 2410–2414.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

LDL	low density lipoprotein
SOD	superoxiddismutasa
CAT	katalasa
PPO	polyfenoloxidasa
LOX	lipoxygenasa
PDA,DAD	spektrofotometrický detektor diodového pole
ORAC	oxygen radical absorbance capacity
FRAP	ferric-reducing antioxidant power
HPLC	high performance liquid chromatography
LC	kapalinová chromatografie
ESI-MS	hmotnostní detektor s elektrosprejovou ionizační technikou
PVP	polyvinylpyroliden
ABTS	celková antioxidační aktivita
NB	Nutrient Broth w/1% Peptone
JZ-a	jablka zelená mražená ve formě celých plodů
JZ-c	jablka zelená mražená ve formě měsíčků bez impregnace
JZ-d	jablka zelená mražená ve formě měsíčků s impregnací
JZ-e	jablka zelená mražená ve formě dřene
JZ-f	jablka zelená mražená ve formě proslazené dřene
JC-a	jablka červená mražená ve formě celých plodů
JC-c	jablka červená mražená ve formě měsíčků bez impregnace
JC-d	jablka červená mražená ve formě měsíčků s impregnací
JC-e	jablka červená mražená ve formě dřene
JC-f	jablka červená mražená ve formě proslazené dřene
H-a	hrozny mražené ve formě celých plodů
H-b	hrozny mražené ve formě celých impregnovaných plodů
H-e	hrozny mražené ve formě dřene
H-f	hrozny mražené ve formě proslazené dřene
S-c	švestky mražené ve formě měsíčků bez impregnace
S-d	švestky mražené ve formě měsíčků s impregnací
S-e	švestky mražené ve formě dřene
S-f	švestky mražené ve formě proslazené dřene
B-L	broskve skladované v laboratoři
B-S	broskve skladované ve sklepě
B-CH	broskve skladované v chladničce
B-M	broskve skladované v mrazničce
H-L	hrozny skladované v laboratoři
H-S	hrozny skladované ve sklepě
H-CH	hrozny skladované v chladničce
H-M	hrozny skladované v mrazničce
S-L	švestky skladované v laboratoři
S-S	švestky skladované ve sklepě
S-CH	švestky skladované v chladničce
S-M	švestky skladované v mrazničce

9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Grafické shrnutí jednotlivých závislostí měřených látek A

	forma zpracování	SOD [katal/g]	CAT [katal/g]	PPO [katal/g]	LOX [katal/g]
Borůvky	celé	↑~	~	↓~	~
	im. celé	↑~	↓	↓~	↓
	dřeň	↑~	↓	↑~	↑~
	im. dřeň	↑~	↓	↑~	↓~
Brusinky	celé	↑~	↓~	↓	↑
	im. celé	↑~	↓~	↓	↑
	dřeň	↑~	↓~	↓~	↑~
	im. dřeň	↑~	↓	↓~	↑
Maliny	celé	↑	↓~	↓~	↑~
	im. celé	↑	↓~	↓~	~
	dřeň	↑	↓	↓~	↑
	im. dřeň	↑	↓	↑~	↑
Jahody	celé	↑	↓	↓~	x
	im. celé	↑~	↓~	↓~	↑
	dřeň	↑~	↓~	↑~	↑~
	im. dřeň	↑	↓~	↑	↑~

Vysvětlení použitých znaků pro toto i následující grafická shrnutí:

- ↑ vzrůst hodnot
- ↓ pokles hodnot
- ↑~ vzrůst hodnot s kolísavým chodem
- ↓~ pokles hodnot s kolísavým chodem
- ~ kolísání hodnot bez zjevného pozitivního či negativního směru závislosti
- x nelze určit závislost, hodnoty jsou příliš odchýlené
- v souboru hodnot byla vyloučena první naměřená hodnota jako odlehlá; v závorce je směr, jaká by měla závislost s touto hodnotou

Příloha 2: Grafické shrnutí jednotlivých závislostí měřených látek B

	místo skladování	obsah sušiny [g/g]	ABTS [$\mu\text{mol/g}$]	vitamin C [g/g]	celkové polyfenoly [mg/g]	celkové flavonoidy [mg/g]	SOD [katal/g]	CAT [katal/g]	PPO [katal/g]	LOX [katal/g]
Broskve	v laboratoři	~	x (↓)	↓	~	~	↑	x (↓)	↓	↑
	ve sklepě	~	x (↓)	↓	~	~	↑	x (↓)	↓	↓
	v lednici	↑~	↑~ (↓)	↓~	↑~	↑~	↑~	↓~ (↓~)	↓~	↓~
	v mrazničce	~	↑ (↓)	↓	↓	↓	↑	↑ (↓~)	↓	↑~
Švestky	v laboratoři	~	↑ (↓)	↑~	↑~	↑~	↑~	↓ (↓)	↓~	~
	ve sklepě	~	↑ (↓)	↑~	↑~	↑~	↑~	↓ (↓)	↓~	~
	v lednici	~	↑~ (↓)	↑~	↑~	↑~	↑~	↑~ (↓~)	↑~	↑~
	v mrazničce	↓~	↓ (↓)	↑~	x	↑~	↑~	↑ (↓~)	↑~	↑~
Hrozny	v laboratoři	↑	↑ (↓)	↑	x	x	↑	↑ (↓~)	↓	↓
	ve sklepě	↑	↑ (↓)	↑	↓~	↓~	↑~	↓ (↓)	↓	↓~
	v lednici	~	↑~ (↓)	↑~	↓	↓~	↑~	↑~ (↓~)	↑~	x
	v mrazničce	~	↑ (↓)	↑	↓	↓~	↑~	↑ (↓~)	↑~	x
Jablka zelená	v laboratoři						↑~	↑~		↓~
	ve sklepě						↓~	↑~		↓~
	v lednici						↑	↑~		↓~
	v mrazničce	~	↑ (↓~)	↑~	↓	↓~	↑~	↓~	↑~	↓~
Jablka červená	v laboratoři						↑~	↑~		↓~
	ve sklepě						↑~	↑~		x
	v lednici						↑	↑~		↓~
	v mrazničce	~	↑ (↓~)	↑~	↑~	↓~	↓	↑~	↑~	~

Příloha 3: Grafické shrnutí jednotlivých závislostí měřených látek C

	forma zpracování	obsah sušiny [g/g]	ABTS [$\mu\text{mol/g}$]	vitamin C [g/g]	celkové polyfenoly [mg/g]	celkové flavonoidy [mg/g]	SOD [katal/g]	CAT [katal/g]	PPO [katal/g]	LOX [katal/g]
Jablka zelená	měsíčky	~	↑ (↓~)	↑~	↑~	↓~	↓	↓~	↓~	↓~
	im. měsíčky	~	↑ (↓~)	↑~	↑~	↓~	↓~	↓~	↑~	↓
	dřeň	~	↑ (↓~)	↑~	↓	↓	↑~	↓~	↑	↓
	im. dřeň	↑	↑ (↓~)	↑	↓	↓~	↓	↓~	↑	↓
Jablka červená	měsíčky	~	↑ (↓~)	↑~	~	↓	↓	↓~	↑~	~
	im. měsíčky	~	↑ (↓~)	↑~	↑	↓	~	↓~	↑~	~
	dřeň	~	↑ (↓~)	↑~	↓~	↓~	↓	↓	↑	↓~
	im. dřeň	↑	↑ (↓~)	↓~	↓	↓	↓	↓~	↑	↓
Hrozny	celé	↑	↑ (↓~)	↑~	↓	↑~	↑	↓~	↑~	↓~
	im. celé	↑	↑ (↓~)	↑~	x	↓~	↑~	↑~	↑~	↓~
	dřeň	↑~	↑ (↓~)	↑	↓	↓	↑	↓~	↑	↓~
	im. dřeň	↑	↑ (↓~)	↑	↓	↓	↑	↓	↑	↓~
Švestky	měsíčky	↑	↑ (↓~)	↑	↓	↓	↑~	↓~	↑~	↓
	im. měsíčky	↑	↑ (↓~)	↑~	↓	↓	↑	~	↓~	↓~
	dřeň	↑	↑ (↓~)	↑	↓	↓	↑	~	↓~	↓
	im. dřeň	↑~	↑ (↓~)	↑~	↓	↓	↑~	↑	↑~	↑~

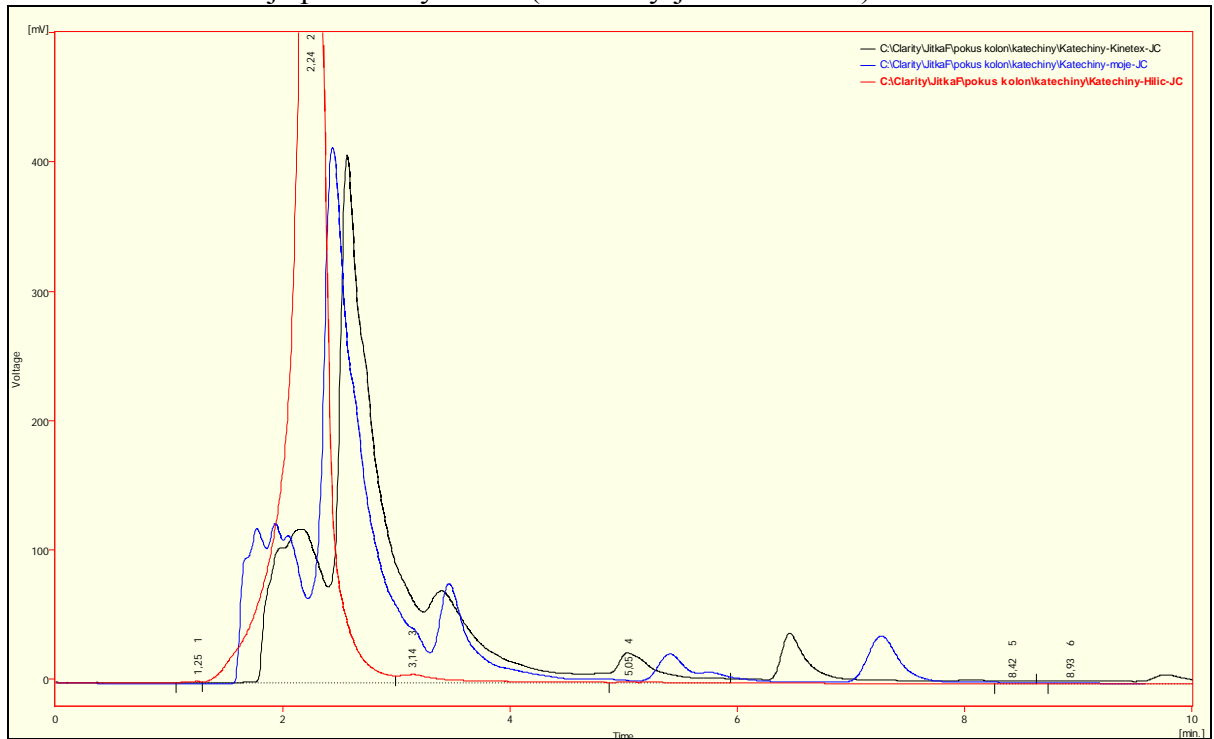
Příloha 4: Grafické shrnutí jednotlivých závislostí měřených látek D

	místo skladování	katechin [μg/g]	epikatechin [μg/g]	katechin-galát [μg/g]	epikatechin-galát [μg/g]	rutin [μg/g]	morin [μg/g]	quercetin [μg/g]	kaempferol [μg/g]	prokyanidin [μg/g]	chlorogenová kyselina [μg/g]	floridzin [μg/g]
Broskve	v laboratoři	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↑	↓	↑	↓	↓
	ve sklepě	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↑	↑	↓
	v lednici	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓
	v mrazničce	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓
Švestky	v laboratoři	↓	↑	↑	x	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑
	ve sklepě	↑	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑
	v lednici	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓
	v mrazničce	↑	↑	↓	x	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↑
Hrozny	v laboratoři	↑	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓
	ve sklepě	↑	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	v lednici	↑	↑	↓	↑	↓	↓	~	↑	x	↓	↓
	v mrazničce	↑	↑	↓	~	↓	x	↑	↑	↓	↓	↓

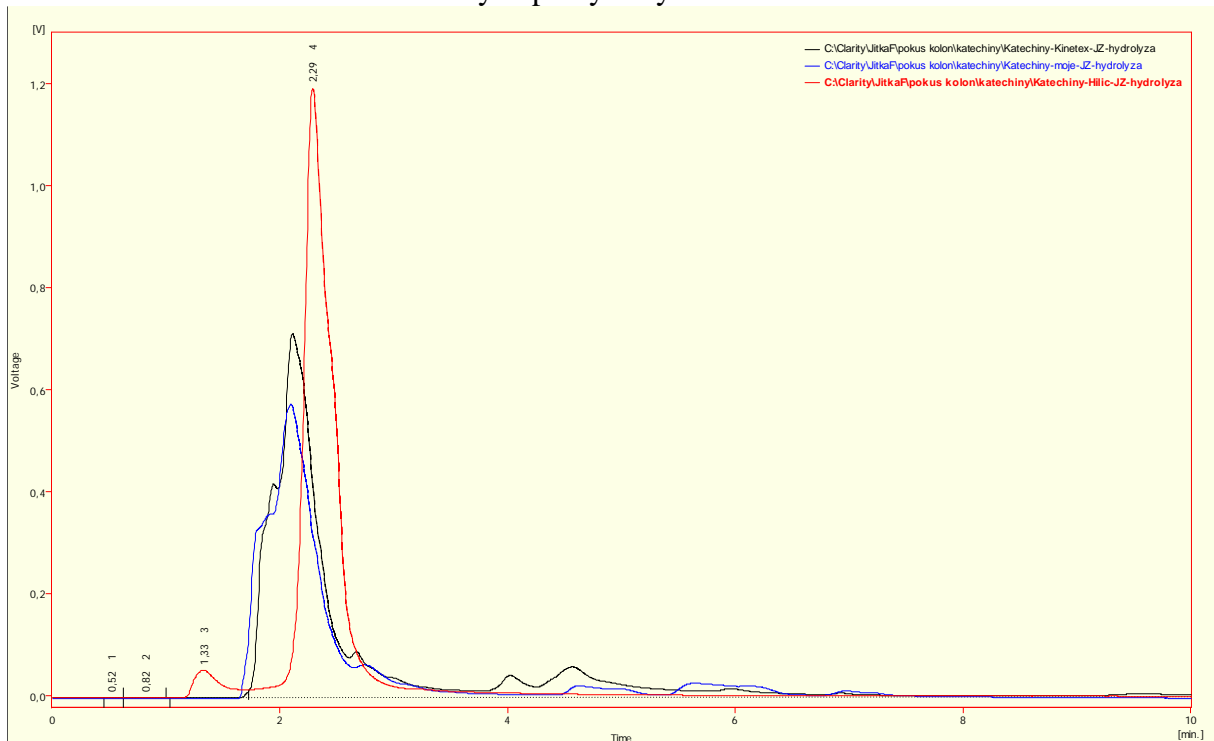
Příloha 5: Grafické shrnutí jednotlivých závislostí měřených látek E

	forma zpracování	katechin [μg/g]	epikatechin [μg/g]	katechin-galát [μg/g]	epikatechin-galát [μg/g]	rutin [μg/g]	morin [μg/g]	quercetin [μg/g]	kaempferol [μg/g]	prokyanidin [μg/g]	chlorogenová kyselina [μg/g]	floridzin [μg/g]
Jablka zelená	celé plody	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↑
	měsíčky	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↑
	im. měsíčky	↑	↑	↓	↓	↑	~	↓	↓	↑	↑	↑
	dřeň	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑
	im. dřeň	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑
Jablka červená	celé plody	↑	↑	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↑	↑	↑
	měsíčky	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑
	im. měsíčky	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↑
	dřeň	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑
	im. dřeň	↑	↑	↓	↓	↑	↑	~	↓	↑	↑	↑
Hrozny	celé	↑	↑	↑	↓	↑	↑	~	↓	↑	↑	↑
	im. celé	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↑
	dřeň	↑	↑	↑	↑	↑	↑	~	↓	↑	↑	↑
	im. dřeň	↑	↑	↑	↓	↑	↑	~	↓	↑	↑	↑
Švestky	měsíčky	↑	↑	↓	↑	↑	↓	↓	↓	↑	↑	↑
	im. měsíčky	↑	↑	~	↑	↑	↓	↓	↓	↑	↑	↑
	dřeň	↑	↑	~	↑	↑	↓	↓	↓	↑	↑	↑
	im. dřeň	↑	↑	~	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↑	↑

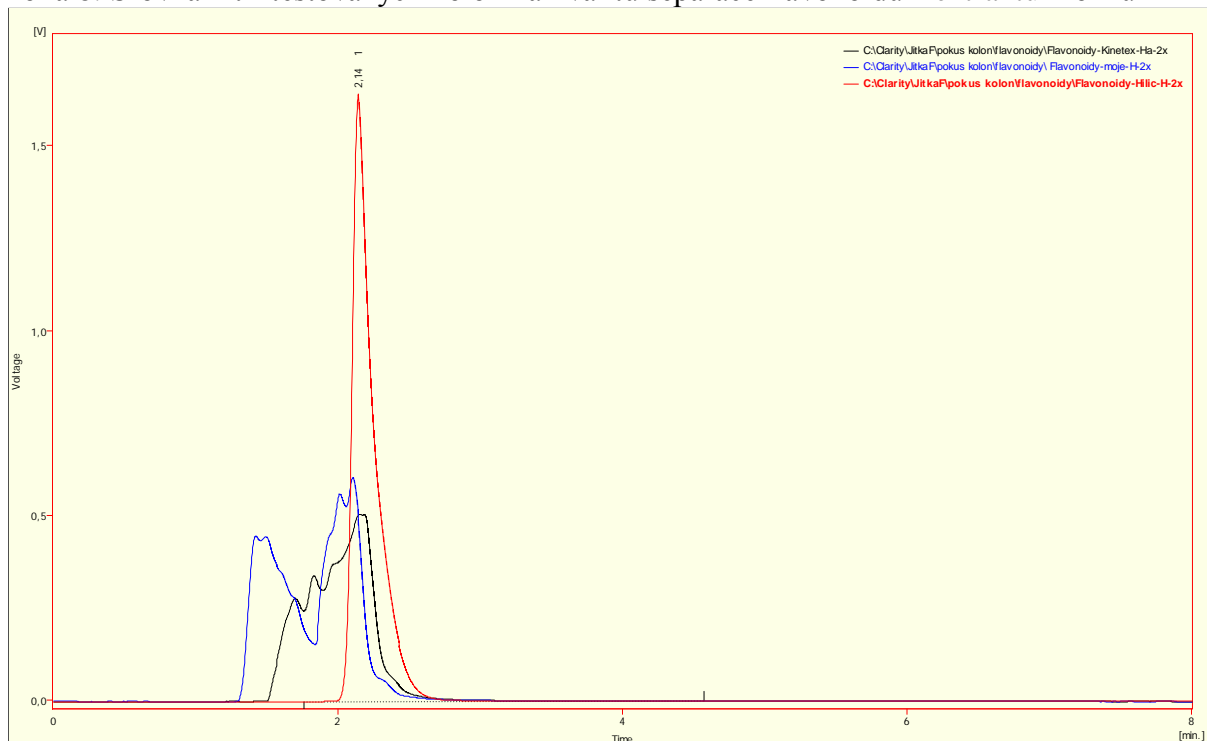
Příloha 6: : Detailní pohled na chromatogramy z tří testovaných kolon pro vyhodnocení nejlepší kvality dělení (katechiny-jablka červená)



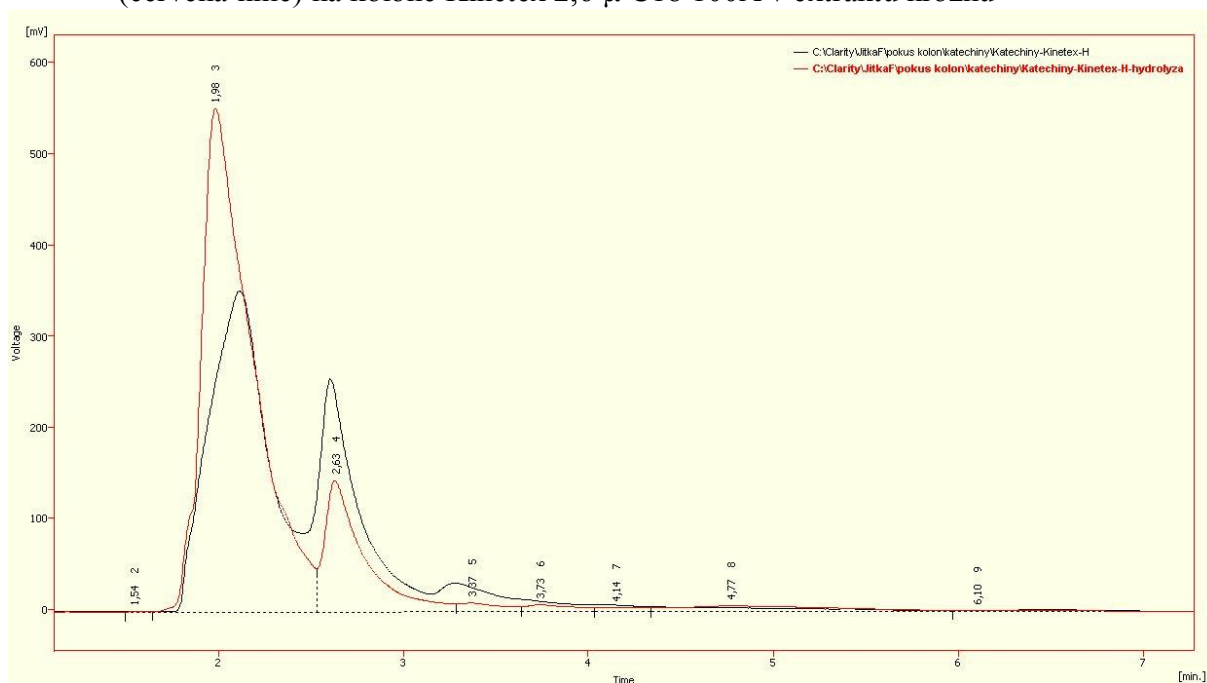
Příloha 7: Srovnání tří testovaných kolon na kvalitu dělení katechinů v extraktu z jablek zelených po hydrolyze



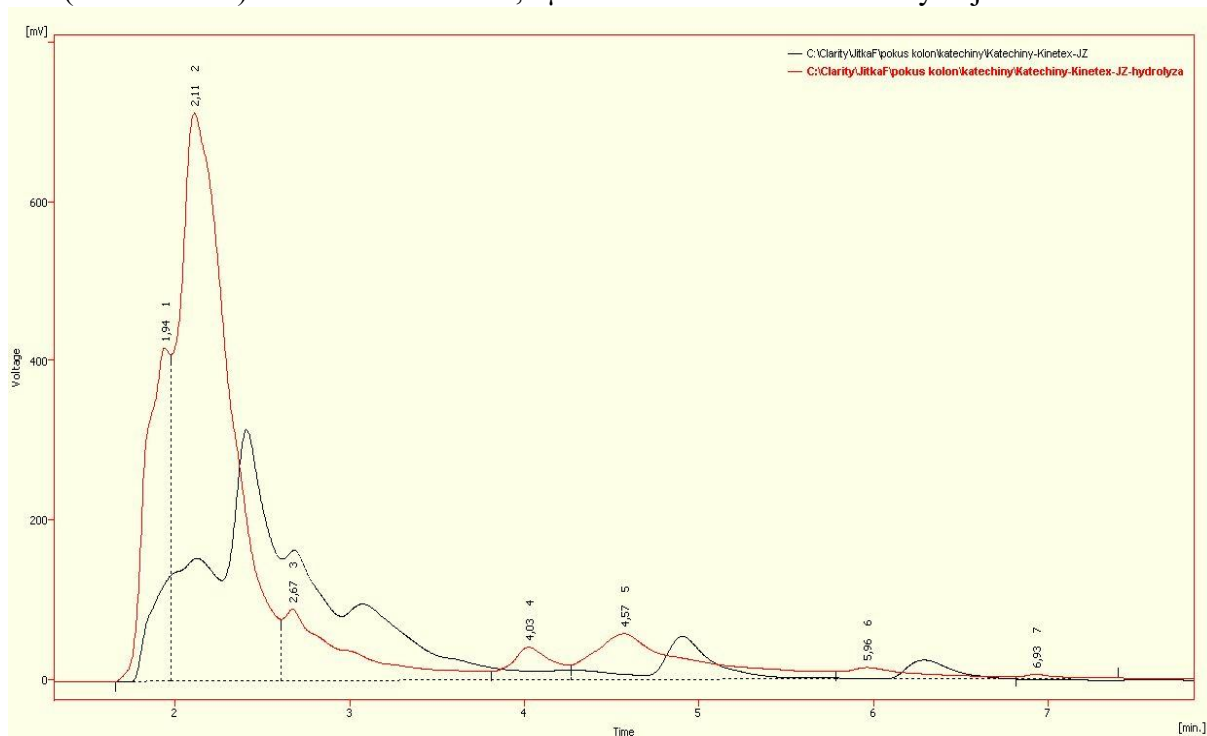
Příloha 8: Srovnání tři testovaných kolon na kvalitu separace flavonoidů z extraktu hroznů



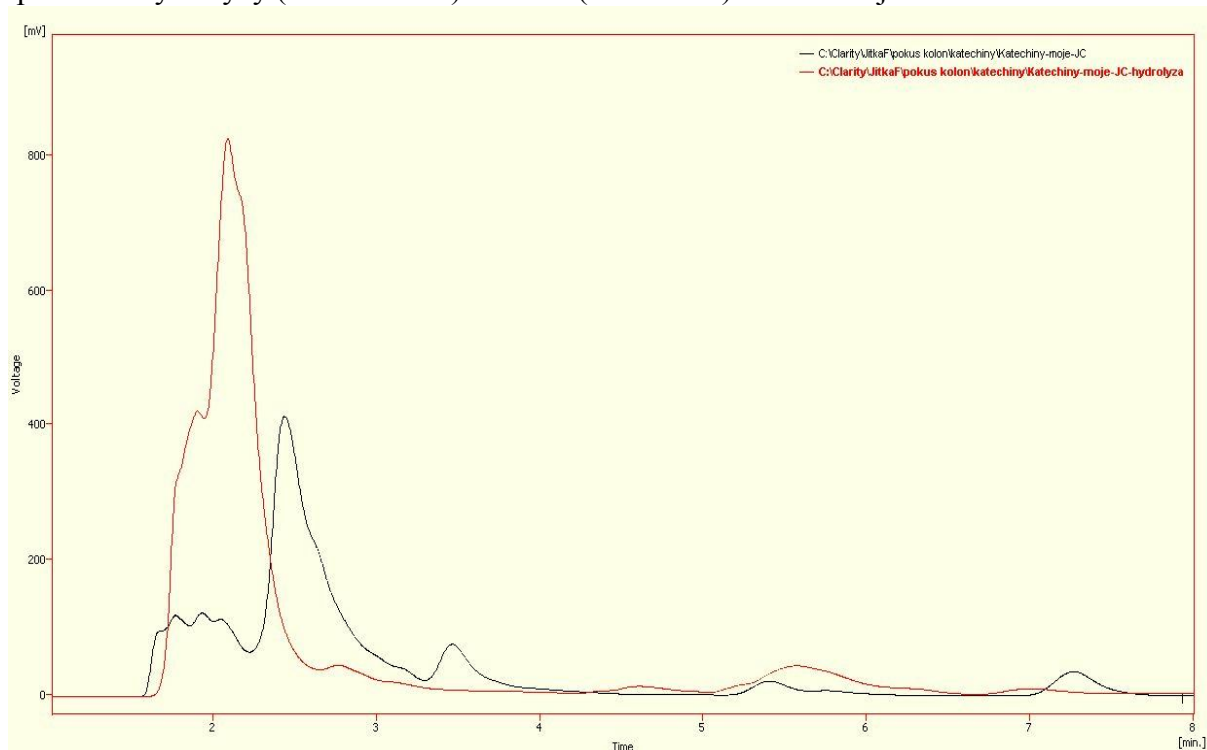
Příloha 9: Chromatogramy separace katechinů bez hydrolyzy (černá linie) a s hydrolyzou (červená linie) na koloně Kinetex 2,6 μ C18 100A v extraktu hroznů



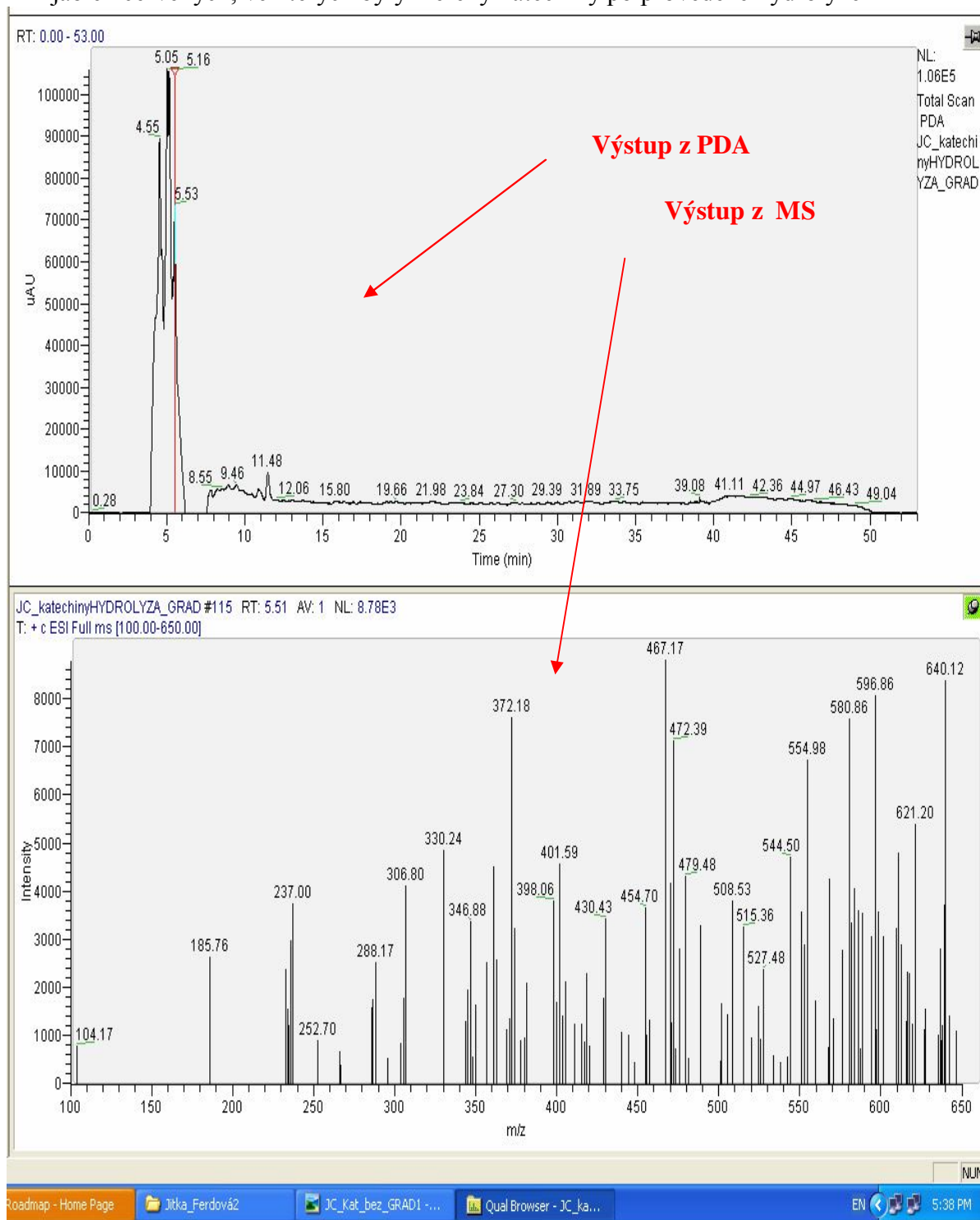
Příloha 10: Chromatogramy separace katechinů bez hydrolyzy (černá linie) a s hydrolyzou (červená linie) na koloně Kinetex 2,6 μ C18 100A v extraktu zelených jablek



Příloha 11: Chromatogramy separace katechinů na koloně Zorbax Eclipse XDB-C18 s použitím hydrolyzy (červená linie) a bez ní (černá linie) u extraktu jablka červeného



Příloha 12: Ukázka vyhodnocovacího programu k soustavě LC/PDA/ESI-MS pro vzorek jablek červených, ve kterých byly měřeny katechiny po provedené hydrolýze



Příloha 13: Srovnání identifikovaných látek ve vzorcích metodou LC/PDA/ESI-MS

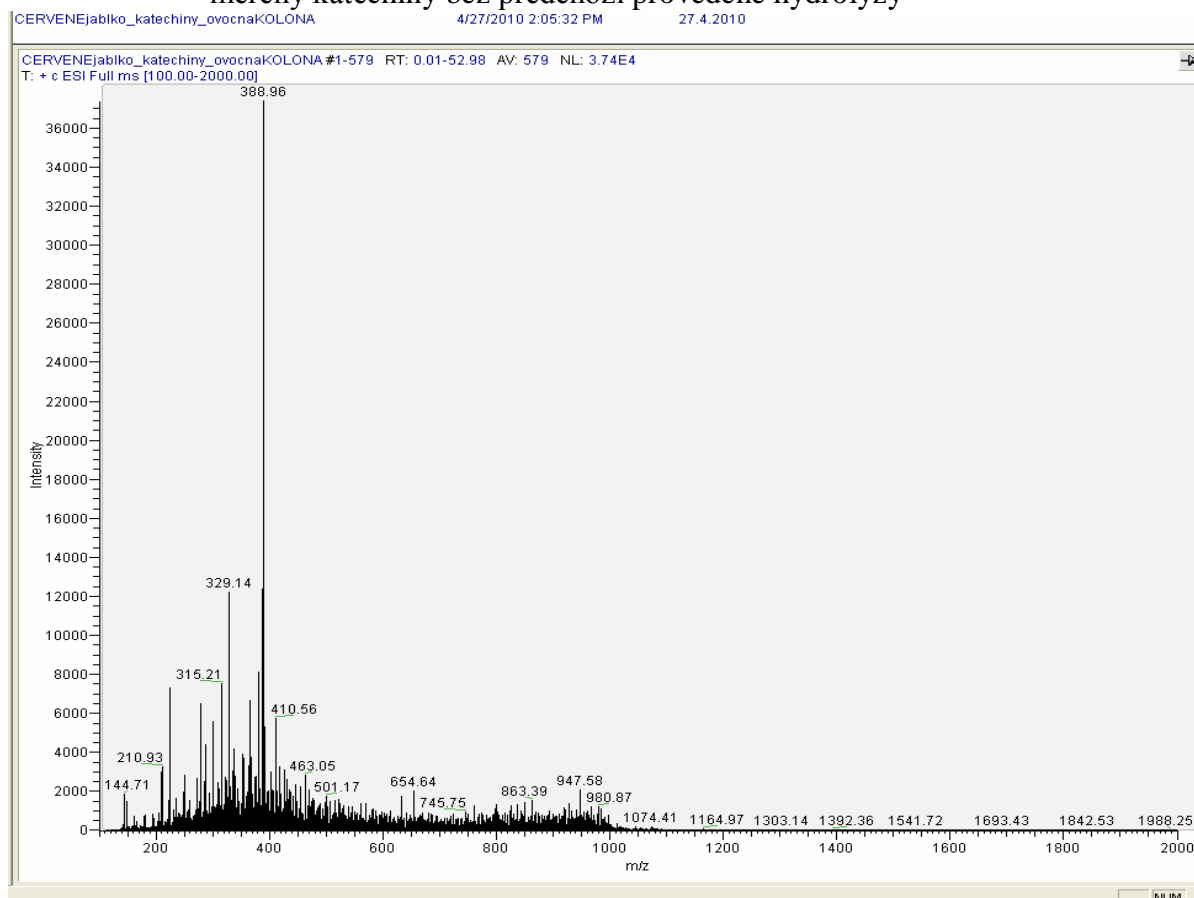
	RT [min]	počet m/z	známé látky z MS
H-K (ISO)	2,98	4	
	3,17	9	
	3,69	4	Kve 3,3'-dimetyler
	4,15	5	Kve 3,3'-dimetyler
H-K+ (ISO)	4,05	6	Kve 3,3'-dimetyler
	4,15	5	Kve 3,3'-dimetyler
JC-K (ISO)	3,14	4	Techtochrysin
	3,88	9	Isorhamnetin (Kve 3-metyler), xanthohumol C
	4,8	6	Isorhamnetin (Kve 3-metyler), Kve 3,3'-dimetyler
JC-K+ (ISO)	5,17	22	Eriodictyol
	5,6	18	Xanthohumol C
	6,12	12	Kve 3,3'-dimetyler
	7,12	19	p-kumarová kyselina, pinocembrin
	7,8	25	Kávová kyselina, 6-,8-prenylnaringenin (desmetylxanthohumol)
JZ-K (ISO)	2,95	8	
	3,13	10	Kávová kyselina
	4,15	10	Kve 3,3'-dimetyler
JZ-K+ (ISO)	2,58	12	Morin (quercetin, hesperetin), katechin-galát (epikatechin-galát), rutin
	2,88	11	6-,8-prenylnaringenin (desmetylxanthohumol)
H-K (G)	6,96	17	Kávová kyselina, xanthohumol
H-K+ (G)	9,47	21	Kávová kyselina
JC-K (G)	6,19	22	Techtochrysin, 8-methoxykaempferol, Isorhamnetin (Kve 3-metyler)
	7,53	24	Techtochrysin, kyselina chlorogenová
	8,4	24	6-,8-prenylnaringenin, xanthohumol B
JC-K+ (G)	4,55	24	Vanilinová kyselina, genkwanin, myricetin
	5,03	22	Vanilinová kyselina, pinocembrin, katechin-galát (epikatechin-galát)
	5,51	25	Eriodictyol, kve 3,3'-dimetyler
	11,47	27	Kávová kyselina, 5,7-di-O-Me-8-prenylnaringenin (4-O-metylxanthohumol)
JZ-K (G)	4,93	24	Apigenin (galangin), Kve 3,3'-dimetyler, xanthohumol C, prenylxanthohumol, rutin
	5,95	27	
	6,38	23	p-kumarová kyselina, 6-,8-prenylnaringenin (desmetylxanthohumol), 3-geranylchalconnaringenin (+ další deriváty naringeninu)
	11,75	28	Luteolin (kaempferol), katechin (epikatechin), kyselina chlorogenová , 5,7-di-O-Me-8-prenylnaringenin (4-O-metylxanthohumol), rutin , delphimidin
JZ-K+ (G)	2,76	15	

	RT [min]	počet m/z	známé látky z MS
H-F (ISO)	2,51	24	Salicylová kyselina, kávová kyselina, pinocembrin, kve 3,3'-dimetyleter, xanthohumol B (D)
	2,94	15	Kávová kyselina, chrysin, 5,7-di-O-Me-8-prenylnaringenin (4-O-metylxanthohumol)
H-F (G)	2,5	23	Vanilinová kyselina, genkwanin
	2,98	21	Pinocembrin, genkwanin, 6-,8-prenylnaringenin (desmetylxanthohumol), kyselina chlorogenová, rutin
	4,77	13	p-kumarová kyselina, vanilinová kyselina, katechin (epikatechin) , 6-,8-prenylnaringenin (desmetylxanthohumol)
	5,5	17	Techtochrysin, 6-,8-prenylnaringenin (desmetylxanthohumol), rutin
	5,87	15	Pinocembrin, xanthohumol C
	7,3	18	Kyselina galová, kea 3-metyleter, xanthohumol C
	8,25	18	Eriodictyol, 6-,8-prenylnaringenin (desmetylxanthohumol)
	11,91	22	Prenylxanthohumol
JC-F (ISO)	39,52	21	Salicylová kyselina, kávová kyselina, 8-methoxykaempferol, isorhamnetin (kve 3-metyleter), xanthohumol C a E
	41,16	22	Salicylová kyselina, kávová kyselina, luteolin (kaempferol), xanthohumol C
	44,75	30	
	46,51	18	Protokatechinová kyselina, genkwanin, kea 3-metyleter, isorhamnetin (kve 3-metyleter)
	48,75	25	Chrysin, kea 3-metyleter, 5,7-di-O-Me-8-prenylnaringenin (4-O-metylxanthohumol), 3-geranylchalconaringenin (+ další deriváty naringenin), delphimidin
	51,64	22	Kávová kyselina, kea 3-metyleter, isorhamnetin (kve 3-metyleter), prenylxanthohumol
JC-F (G)	4,46	17	p-kumarová kyselina, 8-methoxykaempferol
	5,35	14	Chlorogenová kyselina
	6,14	25	p-kumarová kyselina, xanthohumol C, chlorogenová kyselina
	9,08	25	Genkwanin, isorhamnetin (kve 3-metyleter), chlorogenová kyselina , delphimidin
	12,71	21	Chlorogenová kyselina
JZ-F (ISO)	5,94	20	p-kumarová kyselina, kve 3,3'-dimetyleter, 3-geranylchalconaringenin (+ další deriváty naringenin)
	7,15	19	Eriodictyol, kea 3-metyleter, xanthohumol E
	11,8	20	Kávová kyselina, xanthohumol E, rutin
JZ-F (G)	3,16	4	
	3,77	14	Katechin (epikatechin) , kea 3-metyleter, 6-,8-prenylnaringenin (desmetylxanthohumol), xanthohumol C
	4,14	18	Pinobanksin (naringenin), xanthohumol B (D)

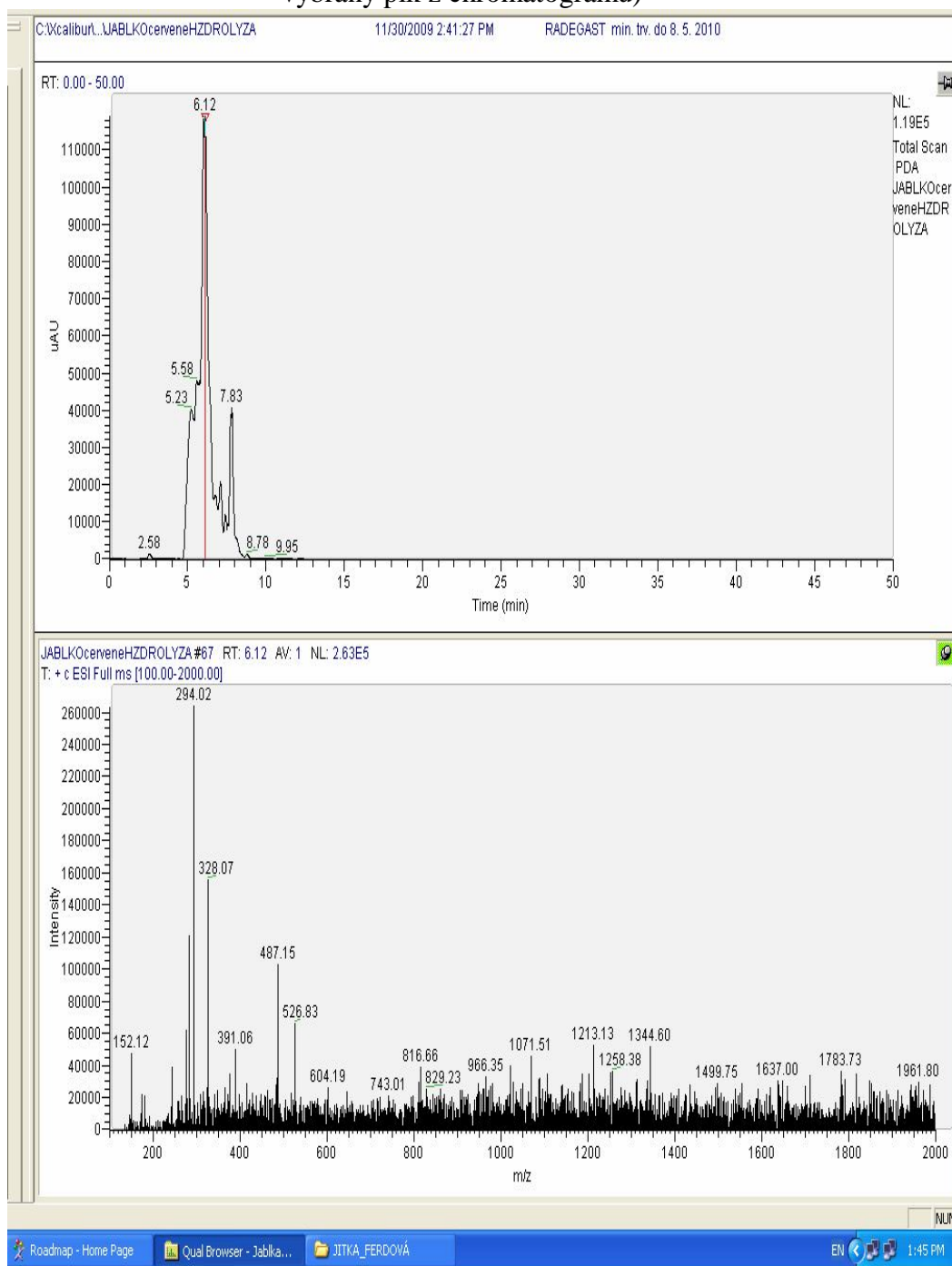
Vysvětlení použitých znaků pro výše uvedenou tabulku:

H	hrozny
JC	jablko červené
JZ	jablko zelené
-K	úprava vzorku a podmínky měření na katechiny
-K+	úprava vzorku a podmínky měření na hydrolyzované katechiny
-F	úprava vzorku a podmínky měření na flavonoidy
(ISO)	izokratické podmínky eluce
(G)	gradientové podmínky eluce
RT	retenční čas
počet m/z	počet naměřených hodnot (hmota/náboj) v jednom píku z PDA
tučné	hodnoty, které byly měřeny metodou HPLC v průběhu celého pokusu

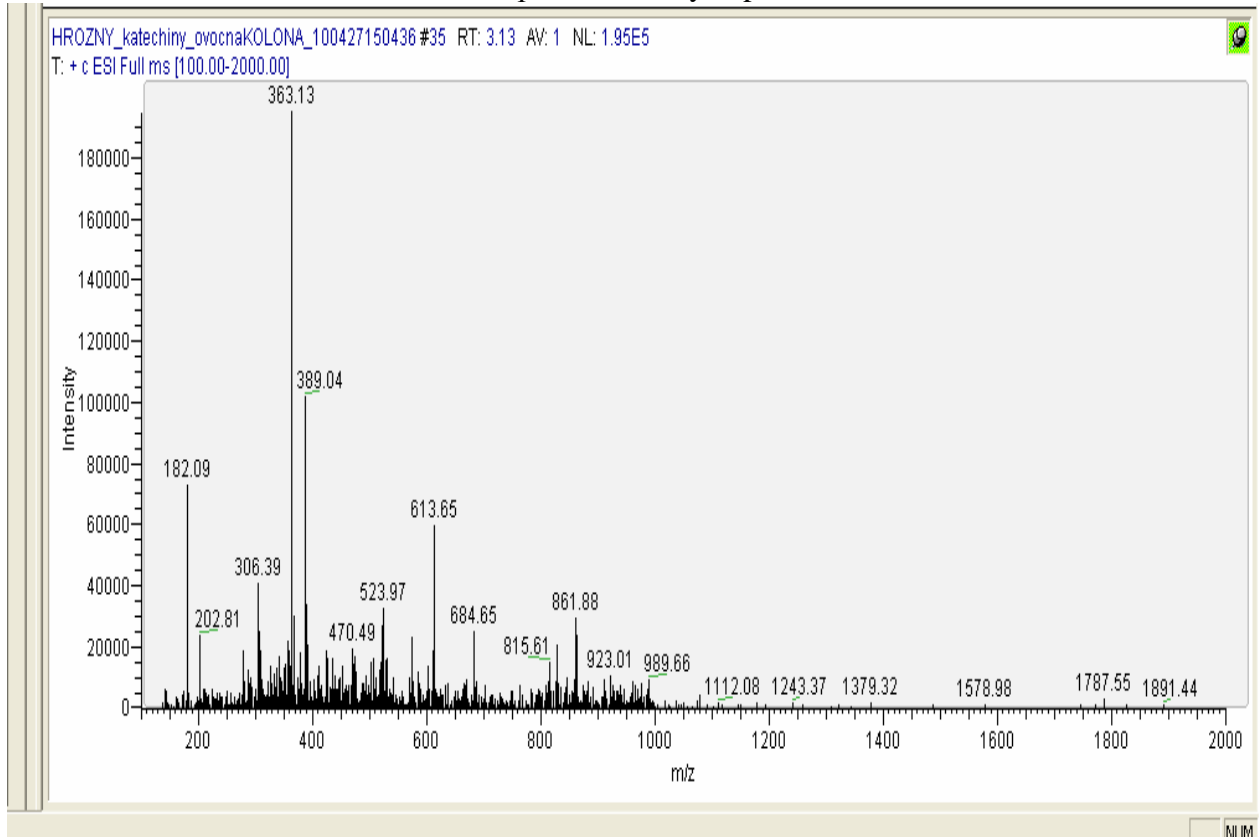
Příloha 14: Záznam hmotnostního spektra (full scan) jablka červeného, ve kterém byly měřeny katechiny bez předchozí provedené hydrolyzy



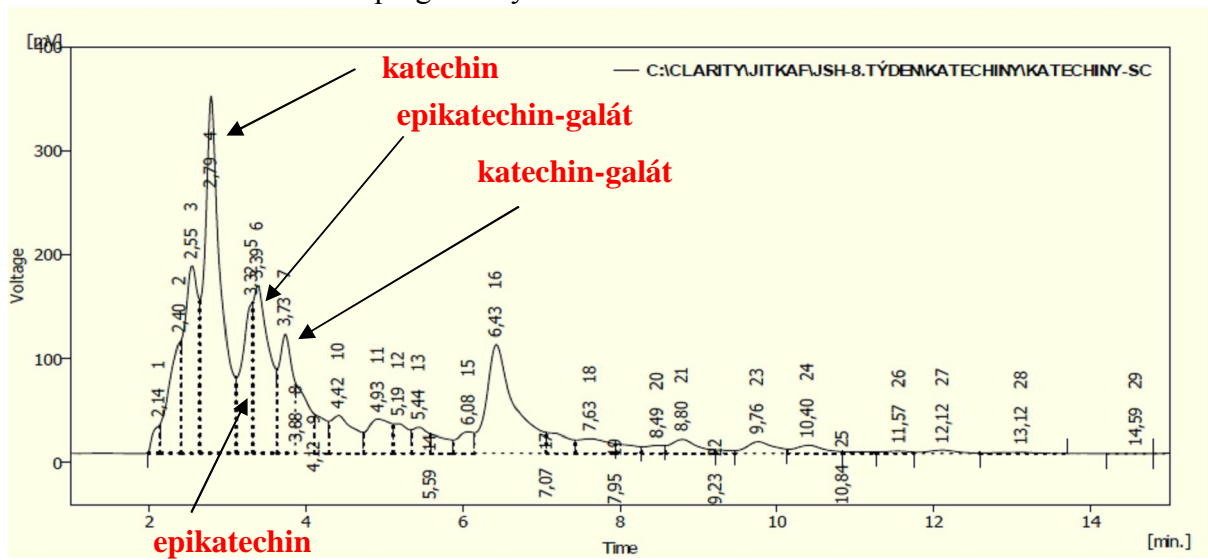
Příloha 15: Ukázka chromatogramu z PDA a hmotnostního spektra pro vzorek jablka červeného, ve kterém byly měřeny katechiny po provedení hydrolyzy (výběr m/z pro jeden vybraný pík z chromatogramu)



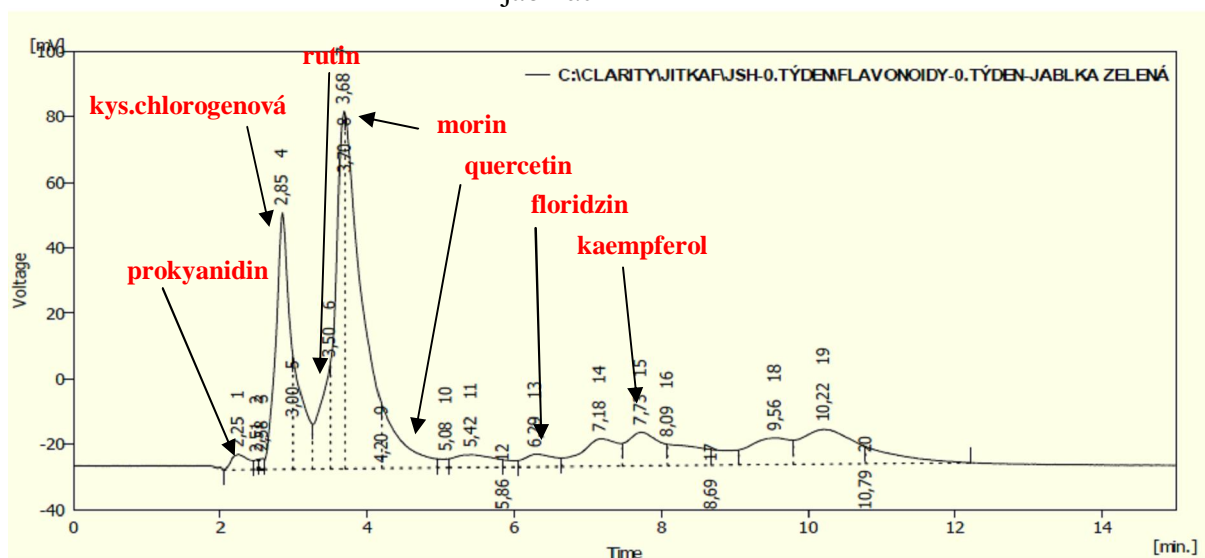
Příloha 16: Ukázka full scan MS spekter pro dělení nehydrolyzovaných katechinů ve vzorků hroznů při izokratických podmínkách



Příloha 17: Ukázka chromatogramu z HPLC/UV-VIS při měření katechinů v neimpregnovaných měsíčkách švestek



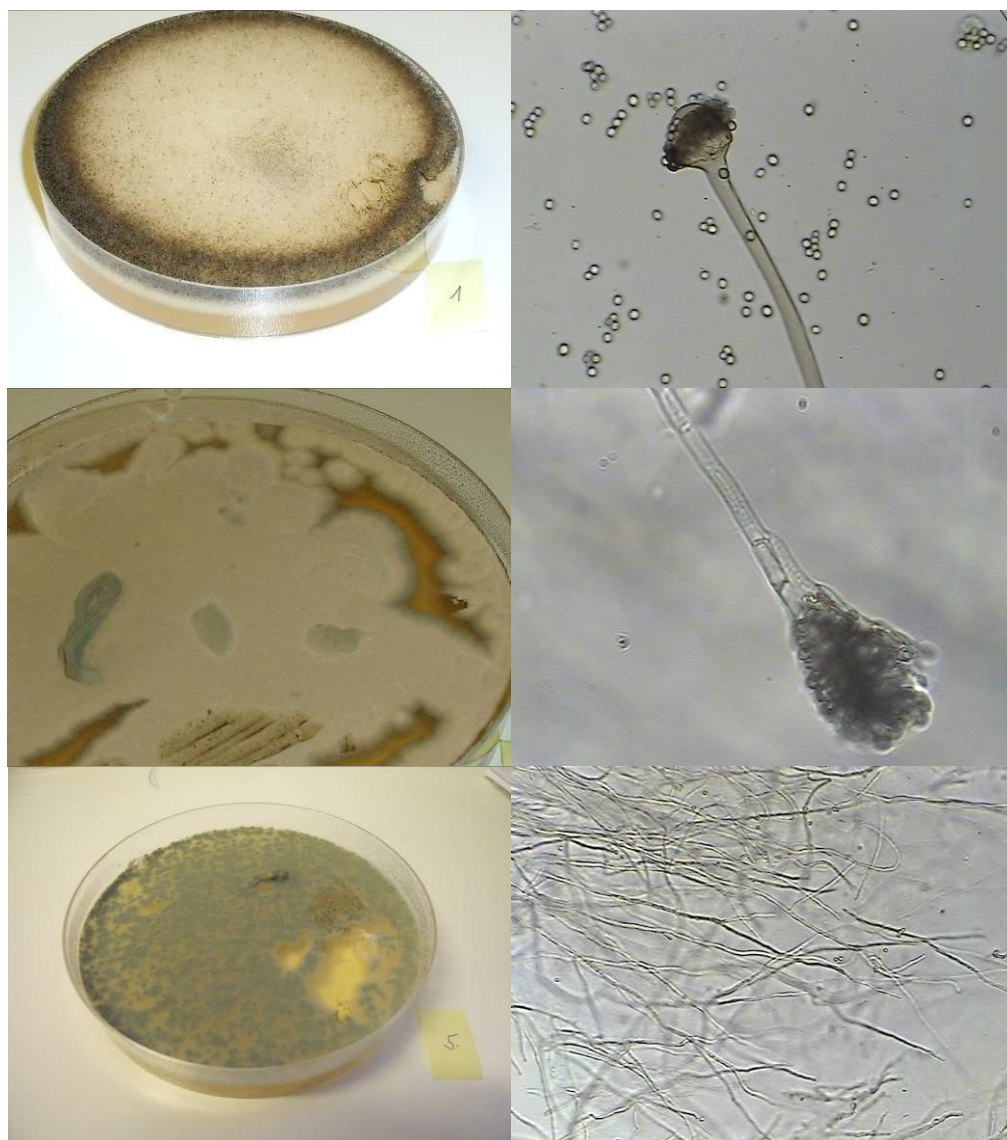
Příloha 18: Ukázka chromatogramu z HPLC/UV-VIS při měření flavonoidů zelených jablkách



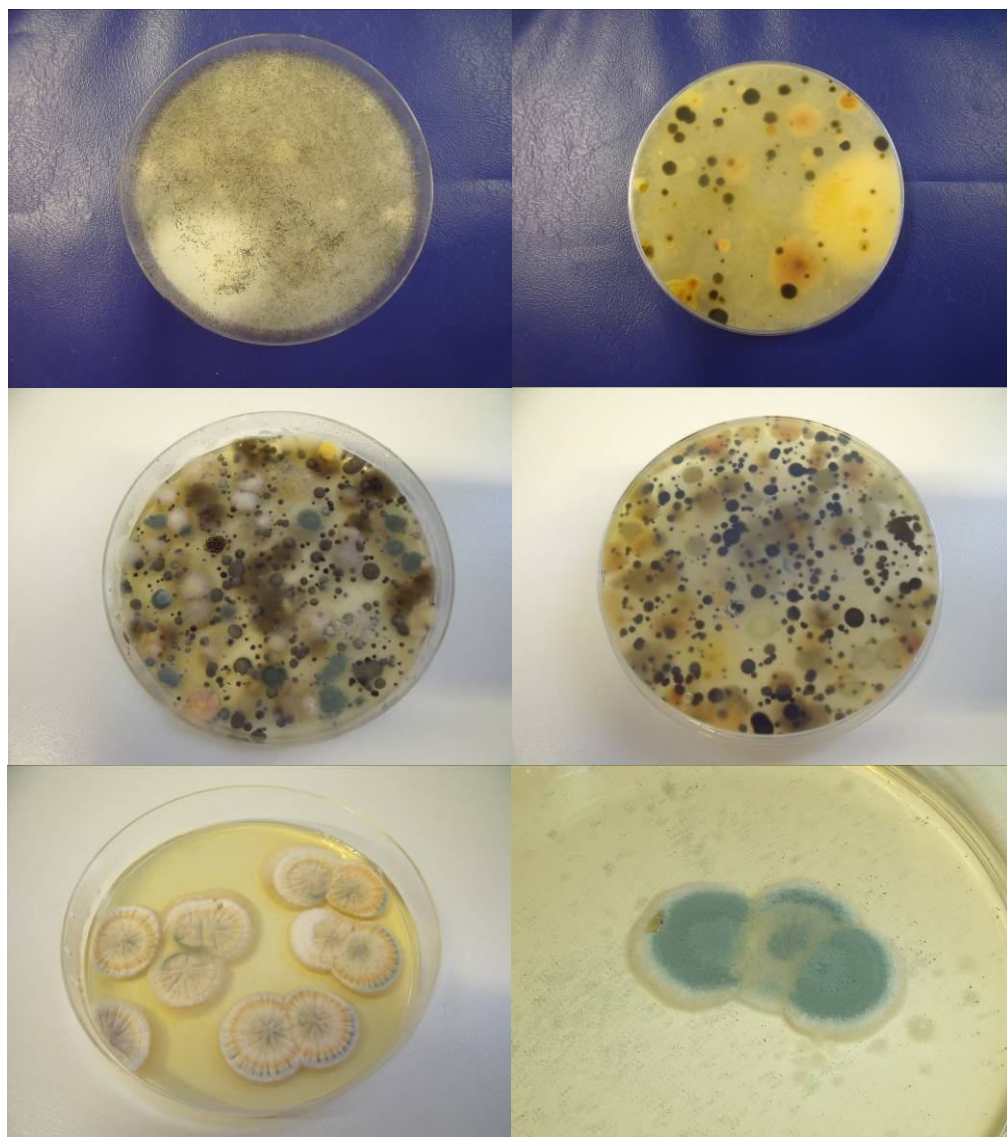
Příloha 19: Ukázka plísňe, která vyrostla na tekutém bramborovo-škrobovém médiu po zaočkování vzorkem z broskve skladované v laboratoři



Příloha 20: Morfologické a mikroskopické znaky plísňí narostlých na tuhých médiích po zaočkování vzorkem z broskve uložené v laboratoři



Příloha 21: Ukázka plísní, které narostly na tuhých médiích po expiraci na vzduchu v místech skladování vzorků (v laboratoři, ve sklepě, v lednici)



Poznámka: První miska byla expirována v laboratoři (obrázek vedle ní je pohled na tutéž misku zespodu). Druhá miska byla expirována ve sklepě (obrázek vedle ní je opět pohled zespodu). Na spodních dvou miskách jsou vyfoceny plísně narostlé na agarech expirovaných v lednici.

Příloha 22: Ukázky mycélií některých nakultivovaných plísní

