

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

VLIV PODMÍNEK UCHOVÁVÁNÍ NA OBSAH BIOLOGICKY AKTIVNÍCH
SLOŽEK
V PLODECH JABLEK.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

JITKA DVOŘÁKOVÁ

BRNO 2008



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

VLIV PODMÍNEK UCHOVÁVÁNÍ NA OBSAH BIOLOGICKY AKTIVNÍCH SLOŽEK V PLODECH JABLEK.

INFLUENCE OF STORAGE CONDITIONS ON CONTENT OF BIOLOGICALLY ACTIVE
SUBSTANCES
IN APPLE FRUITS.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

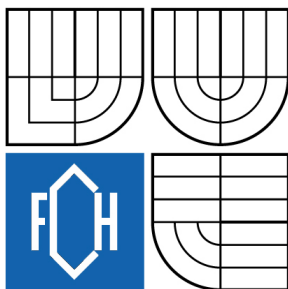
JITKA DVOŘÁKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2008



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce	FCH-BAK0178/2007	Akademický rok: 2007/2008
Ústav	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka)	Dvořáková Jitka	
Studijní program	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí bakalářské práce	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti bakalářské práce		

Název bakalářské práce:

Vliv podmínek uchovávání na obsah biologicky aktivních složek
v plodech jablek.

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše - přehled biologicky aktivních látek v jablcích, stabilita, metody stanovení.
2. Přehled způsobů dlouhodobého uchovávání jablek
3. Vliv ochranné atmosféry na obsah vybraných vitaminů, provitaminů a dalších aktivních látek v plodech jablek.

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.5.2008

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

Jitka Dvořáková
student(ka)

doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2007

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V předložené bakalářské práci jsou popsány antioxidanty vyskytující se ve stravě a jejich účinky na lidský organismus. Dále jsou shrnuty činitele znehodnocování plodů jablek v průběhu skladování a možnosti ochrany proti nim.

V praktické části byly nejprve kalibrovány a validovány metody stanovení enzymů superoxiddismutasy (SOD), katalasy a polyfenoloxidas (PPO) v jablkách. Po nalezení vhodných metod byly uvedené enzymy změřeny v jablkách zpracovaných pod tekutým dusíkem po 158 dnech skladování v normální nebo v modifikované atmosféře. Také byla provedena kvantitativní a kvalitativní analýza bílkovin v jablkách. Dále byly ve zamražené surové šťávě změřeny některé nízkomolekulární antioxidanty (celkové polyfenoly, celkové flavonoidy a vitamin C) a celková antioxidační aktivita. Tyto hodnoty byly porovnány s hodnotami naměřenými v plodech ihned po sklizni. V poslední části bylo provedeno umělé zaplísnění jablek a sledovala se úspěšnost uchycení mikroorganismů.

ABSTRACT

This study deals with antioxidants in diet and their effects on human organism. Further, it summarizes the agents affect the quality of apples in the course of long-term storage and it outlines the possibility of defence against them.

In the experimental part methods of determination of antioxidant enzymes superoxid dismutase (SOD), catalase and polyphenol oxidase (PPO) in apples were introduced. The enzymes were measured in apples tissues in liquid nitrogen after 158 days in normal or modified atmosphere. In Apple the quantitative and qualitative analysis of proteins was realized. Further, some low molecular antioxidants (total phenolics, total flavonoids and vitamin C) as well as total antioxidant status were measured in frozen raw juice. This values were compared with values from apples analyzed immediately after the harvesting. Artificial inoculation with fungi was made in the last part and the fruitfulness was observed.

KLÍČOVÁ SLOVA

Jablka, antioxidanty, celková antioxidační aktivita, antioxidační enzymy, SOD, katalasa, PPO, plísň

KEYWORDS

Apple, antioxidants, total antioxidant status, antioxidant enzymes, SOD, catalase, PPO, fungi

DVOŘÁKOVÁ, J. *Vliv podmínek uchování na obsah biologicky aktivních složek v plodech jablek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2007. 61 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis bakaláře

Chtěla bych především poděkovat Doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za vedení a pomoc při vzniku této bakalářské práce, dále Ing. Andree Haliénové za pomoc při stanovení enzymů v jablkách a ing. Kateřině Duroňové za pomoc při experimentální práci a při zpracování výsledků.

OBSAH

1	Úvod	8
2	Teoretická část	9
2.1	Nepříznivé vlivy radikálů na lidský organismus	9
2.1.1	Volné radikály	9
2.1.2	Poškození buňky a biomolekul volnými radikály	10
2.2	Obrana organismu proti radikálům	10
2.2.1	Primární antioxidační systém	10
2.2.2	Sekundární antioxidační systém	10
2.2.3	Terciární antioxidační systém	11
2.3	Některé nízkomolekulární antioxidanty	11
2.3.1	Kyselina askorbová	11
2.3.2	Tokoferoly	11
2.3.3	Karotenoidy	12
2.3.4	Polyfenoly	12
2.3.5	Glukosinoláty	12
2.3.6	Porfyriny	12
2.4	Enzymy	12
2.4.1	Aktivní centrum	13
2.4.2	Vazby enzymu se substrátem	13
2.4.3	Enzymová specifita	14
2.4.4	Rozdělení enzymů	14
2.4.5	Některé významné antioxidační enzymy	15
2.4.5.1	Superoxiddismutasa (SOD)	15
2.4.5.2	Peroxidasa	15
2.4.5.3	Katalasa	15
2.4.5.4	Polyfenoloxidas (PPO)	16
2.4.5.5	Lipxygenasa	16
2.5	Skladování jablek	16
2.5.1	Spotřeba kyslíku během zrání	17
2.5.2	Znehodnocení jablek	17
2.5.2.1	Nemikrobiální změny	18
2.5.2.2	Mikrobiální změny	18
2.5.3	Skládkové poruchy a choroby jablek	18
2.5.3.1	Fyziologické poruchy vznikající ve výsadbě	19
2.5.3.1.1	Hořká skvrnitost	19
2.5.3.1.2	Sklovitost jablek	19
2.5.3.1.3	Rozpad plodů odrůdy Spartan	20
2.5.3.2	Fyziologické poruchy vznikající ve skladu	20
2.5.3.2.1	Skládkové hnědnutí čili spála slupky	20
2.5.3.2.2	Chladové hnědnutí slupky a dužniny čili měkká spála slupky	20
2.5.3.2.3	Vnitřní rozpad plodů	20
2.5.3.2.4	Jonathanová skvrnitost	21
2.5.3.2.5	Jádrincové hnědnutí dužniny	21
2.5.3.2.6	Hnědnutí dužniny způsobené vysokou koncentrací CO ₂ nebo nedostatkem O ₂	21

2.5.3.3	Skládkové poruchy způsobené parazitickými houbami	21
2.5.3.3.1	Moniliová hniloba	21
2.5.3.3.2	Hořká (gloeosporiová) hniloba.....	21
2.5.3.3.3	Modrá penicilinová hniloba	22
2.5.3.3.4	Skládková strupovitost	22
2.5.4	Způsoby konzervace.....	22
2.5.4.1	Vylučování mikrobů z prostředí.....	22
2.5.4.1.1	Omezování kontaminace potravin mikroby	22
2.5.4.1.2	Ochuzování potravin o mikroby během zpracování	22
2.5.4.1.3	Úplné vylučování mikroorganismů z potravin.....	23
2.5.4.2	Přímá inaktivace mikrobů	23
2.5.4.2.1	Fyzikální zákroky	23
2.5.4.2.2	Chemické zákroky.....	23
2.5.4.3	Nepřímá inaktivace mikroorganismů	23
2.5.4.3.1	Konzervace fyzikální, příp. fyzikálně-chemickou, úpravou potravin....	23
2.5.4.3.2	Konzervace chemickou úpravou potravin.....	24
2.5.4.3.3	Konzervace biologickou úpravou potravin	24
3	Experimentální část	25
3.1	Použité chemikálie, přístroje a vzorky	25
3.2	Stanovení celkové antioxidační aktivity	26
3.3	Stanovení nízkomolekulárních antioxidantů.....	27
3.3.1	Obsah vitamínu C.....	27
3.3.2	Celkové polyfenoly	28
3.3.3	Celkové flavonoidy	28
3.4	Stanovení proteinů.....	29
3.4.1	Hartree-Lowryho metoda	29
3.4.2	Stanovení bílkovin pomocí mikročipové elektroforézy.....	30
3.5	Stanovení antioxidačních enzymů.....	30
3.5.1	Stanovení SOD.....	30
3.5.2	Katalasa	31
3.5.3	Stanovení PPO.....	32
3.5.4	Stanovení SOD, katalasy a PPO v čerstvé šťávě.....	33
3.6	Umělá infekce jablek plísněmi.....	33
4	Výsledky.....	34
4.1	Stanovení celkové antioxidační aktivity	34
4.2	Stanovení nízkomolekulárních antioxidantů.....	35
4.2.1	Obsah vitamínu C.....	35
4.2.2	Celkové polyfenoly	35
4.2.3	Celkové flavonoidy	36
4.3	Stanovení proteinů.....	39
4.3.1	Hartree-Lowryho metoda	39
4.3.2	Analýza jablečných proteinů mikrofluidní elektroforézou	40
4.4	Stanovení enzymů	42
4.4.1	SOD.....	42
4.4.2	Katalasa	43
4.4.3	PPO.....	44

4.4.4	Vzájemné porovnání stanovených enzymů v jednotlivých odrůdách.....	46
4.4.5	Stanovení SOD, katalasy a PPO v čerstvé šťávě.....	47
4.5	Umělé zaplísnění jablek	48
5	Diskuze.....	49
6	Závěry.....	52
7	Použité zdroje.....	54
8	Seznam použitých zkratk.....	57
9	Přílohy	58

1 ÚVOD

Aerobní organismy potřebují kyslík nezbytně ke svému přežití. Je zásadním oxidačním činidlem mnoha biochemických procesů, zvláště pak dýchacího řetězce. Paradoxem však je, že je kyslík pro aerobní organismus toxický. Důležitým faktem je generace volných radikálů, které mají vliv na velké množství procesů počínaje fyziologickým stárnutím a konče celou řadou onemocnění, zvláště pak rakovinou.

Organismus si proto musel logicky vyvinout účinnou obranu proti nežádoucím vlivům kyslíku. Tato obrana spočívá ve vytvoření komplexního antioxidačního systému, který zahrnuje celou řadu látek se schopnostmi vychytávat nežádoucí produkty oxidačních a jiných procesů. Část antioxidantů (zejména enzymových) je produkována přímo v organismu, část je třeba dodávat s potravou.

Běžná strava je zdrojem zejména nízkomolekulárních antioxidantů, které jsou zapojeny ve vzájemně propojených reakcích antioxidačního komplexu. Proto se v současné době klade tolik důrazu na správné návyky stravování a vhodnou životosprávu. Do běžné stravy by mělo být zahrnuto velké množství tak zvaných funkčních potravin, které obsahují dostatečné množství antioxidantů.

Jablka jsou významným zdrojem antioxidačních látek. Obsahují nejen nízkomolekulární antioxidanty ale i enzymy. Navíc jsou tuzemskou surovinou, která je dostupná pro širokou veřejnost a tudíž je zájem zjistit příznivé působení konzumace jablek na lidský organismus. Převážná většina produkce jablek (až 90 %) je skladována. Je obecně známo, že při dlouhodobějším skladování ztrácí plod pěkný vzhled, někdy i chuť a vůni. Cílem současného technologického vývoje je zajištění takových podmínek skladování, aby kvalita plodů a obsah aktivních látek byl uchován v plodech co nejdéle. Jedním z přístupů je i využití modifikované skladovací atmosféry.

Z poslední uvedené problematiky vyplývá v podstatě i část cíle této práce. Klade si za úkol přehledně shrnout a rozdělit antioxidační látky podle účinku působení a také podle fyzikálně-chemických vlastností (hlavně podle molekulové hmotnosti). Dále rozděluje rizika skladování podle původců znehodnocení a nastiňuje obranu proti nežádoucím vlivům (metody konzervace). V neposlední řadě si klade za cíl zhodnotit vliv ochranné atmosféry na obsah antioxidantů v plodech a také její vliv na vnímavost vůči plísňové infekci.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Nepříznivé vlivy radikálů na lidský organismus

Denně na lidský organismus působí spousta nepříznivých vlivů, ať už díky životního stylu (kouření, pití alkoholu,...) nebo 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 biologickém stárnutí. Proto se organismus chrání víceúrovňovým antioxidačním systémem. Řadu tzv. antioxidantů si člověk dokáže vyrobit, některé musí přijímat jako složky potravy [1].

2.1.1 Volné radikály

Jako volný radikál se označuje molekula, atom nebo jejich fragmenty, který má jeden nebo více nepárových elektronů a je schopen samostatné existence [2]. Jelikož má lichý počet elektronů, je vysoce reaktivní a může iniciovat řadu řetězových reakcí v organismu. Navíc má schopnost poškozovat důležité buňky (buňky DNA) a buněčné membrány [3].

- **Superoxidový radikál ($\cdot O_2^-$) [3]**

Superoxidový radikál vzniká redukcí O_2 při metabolických dějích a způsobuje peroxidaci lipoproteinů a lipidů. Obranu proti tomuto radikálu tvoří enzym superoxidodismutasa, který ho přemění chemickou reakcí na peroxid vodíku.

- **Hydroxylový radikál ($\cdot OH$) [3]**

Hydroxylový radikál vzniká redukcí peroxidu vodíku nebo účinkem superoxidu. Působí lipoperoxidaci, oxidaci proteinů a mutace při syntéze DNA i RNA, což pravděpodobně vede ke vzniku rakoviny.

- **Alkoxylový radikál ($\cdot OR$) [3]**

Alkoxylový radikál vzniká při štěpení molekul organických hydroperoxidů a poškozuje tkáň podobně jako výše popsané radikály.

- **Peroxylový radikál ($\cdot OOR$) [3]**

Peroxylový radikál vzniká odstraněním atomu vodíku z hydroperoxidů a vytváří se ve velkém množství při vzniku peroxidů z mastných kyselin, které obsahují dvojnou vazbu oddělenou methylovou skupinou. Tento radikál je jedním z hlavních činitelů způsobujících peroxidaci lipidů.

- **Oxid dusnatý ($\cdot NO$)**

Oxid dusnatý vzniká buď působením enzymů na L-arginin nebo neenzymaticky [4]. Tento volný radikál působí baktericidně, poskytuje ochranu organismu proti prvkům, zapojuje se do procesu nespecifické imunity, reguluje krevní tlak a inhibuje rozvoj nádorového bujení. Svými funkcemi se vymyká ostatním běžným volným radikálům.

2.1.2 Poškození buňky a biomolekul volnými radikály

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

- a) přímo: chemická látka (hydrofilní) se váže přímo na biomolekulu nebo organelu,
- b) nepřímo: chemická látka (lipofilní) 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 i 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 také s nukleovými kyselinami, změny v těchto molekulách působí chybné párování bází při syntéze DNA a RNA a tím mutace v genetické informaci, případně karcinogenezi [5].

2.2 Obrana organismu proti radikálům

Organismus se musí s eventuelním poškozením volnými radikály nějak vyrovnat a k tomu mu slouží systém antioxidační obrany. Za antioxidant se může považovat každá látka, která brání reakci reaktivního metabolitu s jinou látkou za vzniku relativně stabilních netoxických produktů [3].

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

2.2.1 Primární antioxidační systém

Úkolem primárních antioxidantů je bránění vzniku nových reaktivních metabolitů kyslíku eliminací iontů přechodných kovů, chelatací nebo inhibicí enzymů, které katalyzují tvorbu nových radikálů. Nejdůležitější primární antioxidanty se nacházejí v krevní plazmě (například transferin, laktoferin, ceruloplazmin, albumin, ferritin) [6].

2.2.2 Sekundární antioxidační systém

Funkcí sekundárních antioxidantů je odstraňovat již vzniklé volné radikály. Dle mechanismu se sekundární antioxidanty dělí na scavengery (přeměňují volné radikály na neradikálové molekuly), trappery (přeměňují radikály na relativně stabilnější reaktanty) a quenchery (přímo zhasí volné radikály). Z biologického hlediska je lze rozdělit na enzymy (struktura a funkce jednotlivých skupin je popsána v kapitole 2.4) 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 [7].

2.2.3 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 poškozený úsek DNA opravit, odstranit nebo pouze 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 [8, 9].

2.3 Některé 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 syntetizovat neumí, jsou pro něj esenciální. Mohou je však syntetizovat některé mikroorganismy, které osidlují vnitřní orgány člověka (například střevní bakterie). Vitaminy lze úspěšně dělit do dvou skupin, na hydrofilní a lipofilní (A, D, E, K).

Provitaminy jsou látky, které samy nevykazují fyziologické účinky, ale mohou sloužit jako prekursori syntézy vitaminů [10].

2.3.1 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 syntézách prostaglandinů, mukopolysacharidů, stimulaci transportu sodných a draselných iontů, metabolismu cholesterolu, atd. K antioxidantům se řadí především díky reakcím s aktivními formami kyslíku (s volnými radikály). Zabezpečuje ochranu vitamínu E či kyseliny listové před oxidací a chrání lipidy v membránách [11, 12, 13].

2.3.2 Tokoferoly

Tokoferoly jsou deriváty chromanu, jejichž společným základem jsou tokol a tokotrienol, a které tvoří vitamin E. Tento vitamin tvoří ochranu nenasycených mastných kyselin u eukaryotických buněk před poškozováním volnými radikály, hlídá integritu biomembrán (cytoplasmatických i organelových) a zabraňuje 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 [13, 7].

2.3.3 Karotenoidy

Karotenoidy jsou žluté, oranžové a výjimečně také žluto-zelené a červené rostlinné pigmenty hub, řas, mikroorganismů a živočichů, převážně lipofilní povahy. 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 vitaminu A.

Jelikož mají lipofilní povahu, měly by být přijímány v potravě společně s tuky. Působí podobně jako tokoferoly, zháší singletový kyslík i jiné volné radikály a mají také antikancerogenní vlastnosti [13].

2.3.4 Polyfenoly

V rostlinách se vyskytují strukturně velmi různé fenolové sloučeniny. Nejběžnějšími polyfenoly jsou flavonoidy, fenolové kyseliny a ligniny. Tyto látky chrání lipoproteiny s nízkou hustotou před oxidační modifikací (zásadní význam při rozvoji aterosklerózy), dále snižují riziko infarktu myokardu snížením tvorby krevních sraženin a také se uvažuje o antikancerogenním účinku [14, 15].

Na celkovém příjmu polyfenolů se podílí asi ze dvou třetin 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 antioxidačním systému. Zlepšují vstřebávání minerálů a vitaminů, jsou antikancerogenní, snižují tvorbu oxidovaných lipoproteinů a lipidů, ničí volné radikály, mohou vázat a inaktivovat některé prooxidační kovové ionty, atd [16, 17].

2.3.5 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, které ukazuje, že brukvovitá zelenina (hlávkové zelí, kapusta, brokolice) poskytuje mimořádně silnou ochranu proti rakovině plic a gastrointestinálního traktu [18, 19].

2.3.6 Porfyriny

Mezi deriváty porfyrinu se řadí chlorofyl, hemoglobin a některé enzymy. Jsou schopné vychytávat kyslíkové radikály, které jsou produkovány mutageny, proto jsou velmi účinným antimutagenem (v některých testech dokonce silně předčili kyselinu askorbovou, tokoferol, glutathion, atd.) [20].

2.4 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). Avšak ve srovnání s chemickými katalyzátory mají enzymy mnohem vyšší specifitu k substrátům a tvoří mnohem specifitější produkty (minimalizace vedlejších produktů) [21].

2.4.1 Aktivní centrum

Aktivní centrum, nebo-li aktivní místo, je oblast, která váže substrát a kofaktor, a zároveň obsahuje katalytické skupiny zodpovědné za tvorbu a štěpení vazeb. Je to trojrozměrná oblast tvořená postranními řetězci vybraných zbytků aminokyselin a zaujímá poměrně malou část na povrchu molekuly enzymu. V současné době se uvažuje o dvou modelech aktivního centra.

Model Emila Fischera z roku 1890 vysvětluje specifitu aktivního místa modelem „zámku a klíče“. Tzn., že centrum neobsazeného enzymu (enzymu bez navázaného substrátu) je tvarově plně komplementární s tvarem potencionálního substrátu. Substrát s menší odlišností ve tvaru se již do tohoto aktivního místa není schopen navázat. Tato úvaha však funguje pouze pro určitou skupinu enzymů.

Daniel E. Koshland v roce 1958 vymyslel model „indukovaného přizpůsobení“. Uvažoval, že v klidovém stavu enzym nemá pevně daný tvar, ale mění ho až po vazbě se substrátem. Proto jsou některé enzymy schopny vázat nejen jeden substrát, ale celou řady homologů (např. alkoholdehydrogenasa) [22].

2.4.2 Vazby enzymu se substrátem

Enzym se substrátem vytváří komplex vázaný nekovalentními vazbami. Jedná se o van der Waalsovy síly, elektrostatické síly, vodíkové můstky a hydrofóbní interakce. Pokud by se substrát k enzymu vázal kovalentně, byla by tím znemožněna regenerace enzymu při fyziologických podmínkách lidského těla. Při nedostatku jednoho z celé řady enzymů by se zastavila katalýza dané reakce a po delší či kratší době by zřejmě nastala smrt. Tímto mechanismem působí na lidský organismus například hadí a pavoučí jedy.

Van der Waalsovy síly se vytvářejí mezi všemi atomy, které nejsou spojeny kovalentní vazbou a nepřekračují navzájem mezi sebou limitní vzdálenost (součet van der Waalsových poloměrů), kdy se již začínají silně odpuzovat. I když jsou tyto síly velmi slabé, v molekule zastávají významnou roli. Povrch enzymu je totiž relativně velký a velké množství atomů je vázáno tímto způsobem. Proto ve výsledné bilanci mají tyto síly velký vliv na prostorovou strukturu komplexu enzymu se substrátem.

Elektrostatické síly, nebo-li coulombické síly, jsou přitažlivé a odpudivé interakce mezi nabitými nebo dipolárními částmi biomolekul. Přitažlivá síla mezi dvěma náboji se prudce zmenšuje se vzdáleností mezi nimi. V nepřítomnosti vody jsou tyto interakce velmi silné (například pevnost mramoru), ve vodě jsou velmi slabé, jelikož jsou nabitě skupiny chráněny interakcí s vodou.

Vodíkové můstky jsou intermolekulární nebo intramolekulární vazby mezi vodíkem a elektronegativnějším donorem elektronů (kyslíkem, dusíkem, fosforem...). Vazba se tvoří, když se vodík dostane mezi dva vhodné atomy. Nejpevnější je tehdy, když jsou všechny tři atomy v jedné linii.

Hydrofóbní interakce se tvoří ve vodných roztocích, kde dochází k seskupování nepolárních molekul s cílem minimalizovat kontakt s vodou. Tento slabě endotermní proces doprovázený vzrůstem entropie je hlavní hnací silou pro svinování molekul biopolymerů. Hydrofóbní část molekuly se stahuje dovnitř komplexu a hydrofilní část tvoří povrch [22].

2.4.3 Enzymová specifita

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

Reakční specifita enzymu znamená, že je schopen vázat substrát, který může podléhat několika enzymaticky katalyzovaným reakcím s různými produkty a katalyzuje pouze jednu z možných reakcí. Většina enzymů vykazuje jen jeden typ reakční specifity, jsou 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 [22].

2.4.4 Rozdělení enzymů

Enzymy jsou klasifikovány a pojmenovány podle povahy chemické reakce, kterou katalyzují. Podle typu katalyzovaných reakcí jsou rozděleny do šesti hlavních tříd, které se dále dělí na podtřídy a kategorie podle typu kofaktoru, struktury substrátů a průběhu katalyzované reakce [21].

- ***Oxidoreduktasy***

Oxidoreduktasy tvoří třídu enzymů katalyzujících intermolekulární oxidačně-redukční reakce. Jsou jednou z nejpočetnějších tříd enzymů. Oxidoredukční děje realizují buď přenosem atomů vodíku nebo elektronů, případně vestavěním atomu 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 [22].

- ***Transferasy***

Transferasy jsou enzymy přenášející skupiny atomů mezi molekulami. Účastní se řady biosyntetických dějů [23]. 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,...[22].

- ***Hydrolasy***

Hydrolasy katalyzují štěpení hydrolyzovatelných vazeb za účasti vody. Tyto enzymy pracují bez kofaktoru [22].

- ***Lyasy***

Lyasy katalyzují štěpení a vznik vazeb C-C, C-O, C-N bez účasti vody. Zajišťují eliminaci skupin za vzniku dvojných vazeb [23]. Jako kofaktor působí například acetyl-CoA [22].

- **Isomerasy**

Isomerasy působí stechiometrické změny uvnitř molekul, intramolekulární oxidačně-redukční reakce a přenosy skupin. Je to nejméně početná skupina enzymů [23].

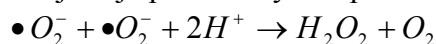
- **Ligasy**

Ligasy jsou enzymy katalyzující syntézu energeticky náročných vazeb C-C, C-O, C-N za součastného rozkladu látky uvolňující energii. Tvorba vazeb je spojena s hydrolyzou ATP [23].

2.4.5 Některé významné antioxidační enzymy

2.4.5.1 Superoxiddismutasa (SOD)

Superoxiddismutasa se řadí mezi oxidoreduktasy a má významnou funkci při detoxikaci produktů rozpadu molekulárního kyslíku. Při oxidačních reakcích vzniká vysoce reaktivní a toxický superoxidový radikál, který je přinejmenším jednou z příčin toxicity molekulárního kyslíku. Jeho rychlé odstranění zajišťuje právě enzym superoxiddismutasa dle reakce:



Tento enzym brání působení superoxidového radikálu a tím zabraňuje například peroxidaci lipidů, degradaci polysacharidů a inaktivaci jiných důležitých enzymů.

Superoxiddismutasa je přítomna ve všech aerobních organismech. V jablcích byla zjištěna přítomnost pouze ve slupce, v zrnech ani v dužnině nebyla prokázána [2].

Co se týče chemické struktury, patří enzym 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. Jejimi inhibitory jsou HCN, EDTA při $pH = 3,8$.

Metody na stanovení její aktivity využívají různé techniky, například polarografii, luminiscenci a spektrofotometrii [23].

2.4.5.2 Peroxidasa

Peroxidasa patří tak jako SOD do skupiny oxidoreduktas a metaloenzymů. Obsahuje v prosthetické skupině ferriprotoporfyrin (popřípadě jeho deriváty, například zelené heminy). Peroxidasa katalyzuje nespecifický rozklad peroxidu vodíku za přítomnosti vhodných donorů vodíku (kyseliny askorbové, polyfenolů atd.) [23].

Vyskytuje se hlavně v rostlinných materiálech, v jablcích převážně ve slupce a v nepatrném podílu i v dužnině [2]. Peroxidasová aktivita společně s katalasovou mohou být využívány jako indikátory metabolické aktivity [24] a ukazatele znečištění životního prostředí [25].

Konkurenční stanovení peroxidasové a katalasové aktivity v přírodních vzorcích jsou obvykle prováděna následovně: inhibuje se katalasa nebo se použije přebytek peroxidu vodíku a aktivita peroxidasy je stanovena oxidací pyrogallolem [23].

2.4.5.3 Katalasa

Katalasa je heminový protein (oxidoreduktasa) obsahující v prosthetické skupině čtyři ferriprotoporfyrinové zbytky pevně vázané na bílkovinu. Katalasa 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 [23].

V jablcích byla stanovena katalasa ve všech částech (semena, dužnina, slupka), nejvíce pak v semenech [2].

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

2.4.5.4 Polyfenoloxidas (PPO)

Polyfenoloxidas jsou oxidoreduktasy, jejichž 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 [23].

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 mikroorganismu 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 , polyvinylpyroliden a kationaktivní detergenty. V ovoci a zelenině se vyskytuje méně než fenoloxidasa [23].

2.4.5.5 Lipoxygenasa

Lipoxygenasa je široce zastoupena v rostlinné říši. Katalyzuje oxidaci nenasycených mastných kyselin s více dvojnými vazbami, obsahujícími cis-1,4-pentadienovou skupinu, molekulovým kyslíkem. Tím vznikají řetězovou reakcí přechodně 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 [23].

2.5 Skladování jablek

Během růstu a zrání jablka na stromě probíhá řada asimilačních procesů. Asimilační děje jsou takové, které vytváří z látek jednoduchých látky složitější povahy, přičemž je nutno dodat energii ve formě světla nebo chemickým dějem.

Trávení živin je z biochemického pohledu aerobní nebo anaerobní oxidace. Člověk se při skladování snaží účelně zamezit oxidaci živin způsobené mikroorganismy. Technologie a technika konzervace potravin vyhledává a využívá metody, kterými se upravují produkty prvovýroby tak, aby nepodlehly rozkladným procesům dříve, než při trávení v těle člověka. Konzervací se tedy rozumí každý proces, který se snaží o prodloužení skladovatelnosti suroviny déle, než dovoluje přirozená trvanlivost. Konzervace se ovšem nesnaží zachovat pouze nutriční hodnotu potravin, nýbrž i vzhled, vůni, chuť či obsah složek, které jsou důležité vzhledem ke svým katalytickým účinkům, což jsou například právě enzymy.

Jablka se řadí do potravin vodnatých, proto jsou tzv. neúdržné (dříve nebo později dojde k spontánním změnám). Změny potravin se dají rozdělit do dvou skupin:

- a) mechanické: dochází k nim vlivem narušení povrchu potravin, hlubším poškozením hmyzem, či špatným zacházením při sklizni, dopravě a skladování. Nejenže tyto změny zhoršují vzhled suroviny, ale navíc i urychlují změny druhé v pořadí, biochemické.
- b) biochemické: vlivem těchto procesů dochází ke změně organoleptických vlastností potravin [30, 31].

2.5.1 Spotřeba kyslíku během zrání

Nejintenzivněji dýchají mladé rostoucí organismy. Při vybarvování plodů se nápadně zvýší výdej CO_2 , ovšem spotřeba kyslíku nevzroste (tomuto jevu se říká klimakterický vzestup intenzity dýchání). Druhé maximum výdeje CO_2 je zpravidla u ovoce a zeleniny spjata s dobou konzumní zralosti. Spotřeba kyslíku po celou dobu klesá (ke zpomalení vstřebávání kyslíku napomáhá i tvorba tlustší slupky a voskovitého obalu u ovoce). Nápadně zvýšeně dýchá tkáň, která byla poraněna, nebo jejíž enzymová rovnováha byla narušena (dokud tkáň může reagovat na škodliviny dýcháním, je schopna tyto vlivy vyrovnat, za opačných podmínek odumírá).

Činitelé, které ovlivňují spolu se stupněm zralosti a mírou poškození intenzitu dýchání jsou především teplota a obsah O_2 a CO_2 v atmosféře a ve tkáních. Pokud se umělým zákrokem (atmosférou bohatou na O_2) zvýší pronikání kyslíku do tkání, uspíší se vznik klimakteria. V opačném případě se oddálí, tudíž tím lze dosáhnout delší skladovatelnosti. Stejně tak vyšší teplota klimakterium přibližuje, nižší oddaluje.

Pokud ovoce trpí nedostatkem kyslíku, nedochází k úplné oxidaci, nýbrž jen k tzv. intramolekulárnímu dýchání. Při tomto typu dýchání se vedle CO_2 tvoří i ethanol a malé množství acetaldehydu. Ethanol i acetaldehyd působí dráždivě, u jablek usmrcují buněčnou tkáň již koncentrace vyšší než 0,3% ethanolu nebo 0,04% acetaldehydu. Takto postižené ovoce má nepříjemnou vůni i chuť. Pokud obsah škodlivin převáží obsah ochranných faktorů, dochází k celkovému ochromení dýchání. V tomto okamžiku se ovoce nachází v bodě fyziologické zralosti, případně nastává počátek přezrávání, a ovoce se právě hodí ke konzumaci, ke skladování však nikoliv [30].

2.5.2 Znehodnocení jablek

Vedle přirozených biochemických procesů existují ještě další činitelé, kteří přispívají ke znehodnocení jablek. Mohou se dělit na nemikrobiální a mikrobiální [30].

2.5.2.1 Nemikrobiální změny

Tyto změny mohou být patrné pouhým okem nebo jiným senzorickým orgánem, nebo mohou zůstat utajeny.

Tzv. utajené změny nejsou subjektivně pozorovatelné, dají se sledovat laboratorním měřením. Mohou vážně poškozovat nutriční hodnotu potraviny především ztrátami sacharidů, změnami ve složení a obsahu dusíkatých látek, úbytkem vitaminů, atd.

Senzoricky postřehnutelné změny jsou změny barevnosti, chuti, vůně a konzistence [30].

2.5.2.2 Mikrobiální změny

Mikroorganismy organickou hmotu enzymaticky 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.

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 [30].

2.5.3 Skládkové poruchy a choroby jablek

Výskyt skládkových chorob stoupá s mírou dozrávání plodů během skladování a je nejvyšší těsně před ukončením fyziologické zralosti plodů, která se u jablek projevuje moučnatěním. Rozvoj skládkových chorob klesá s poklesem skladovacích teplot, kdy se zpomaluje proces dozrávání plodů a je nejnižší při doporučených skladovacích teplotách, případně v kombinaci s řízenou atmosférou.

Zvláštní skupinu tvoří ztráty způsobené některými fyziologickými poruchami, které jsou způsobeny vzájemnou interakcí faktorů odrůda, prostředí a sklizňový termín. Nebezpečí výskytu těchto poruch je možno v daných podmínkách snížit jen volbou vhodných sklizňových termínů. Výskyt skládkových chorob se kromě přesného dodržování skladovacích režimů omezuje v podstatě dvěma způsoby:

- u parazitních chorob a některých fyziologických poruch je to aktivní ochrana aplikací ochranných přípravků,
- v ostatních případech se spíše uplatňuje ochrana pasivní, kdy se na základě úrovně určitých faktorů předvídá výskyt fyziologických poruch, a proto se upravuje skladovací režim a počítá se s včasným vyskladněním těchto rizikových partií.

Rizikové partie ovoce během skladování vyžadují stálou kontrolu vzniku a průběhu poruch a měly by se vyskladňovat vždy dříve, než nastanou nadnormativní ztráty [31].

Tabulka 1: Průměrné ztráty hmotnosti některých odrůd jablek skladovaných v klimatizovaných skladech [31]

Odrůda	Délka skladování (počet dnů)	Ztráty (v %)		
		celkem	výparem a prodýcháním	mikrobiální činností
Bláhova oranžová	150	7,21	2,90	4,31
Boskoopské červené	150	8,57	3,74	4,83
Coxova reneta	120	6,25	2,19	4,06
Golden Delicious	210	6,80	4,29	2,51
Idared	210	7,79	5,70	2,09
James Grieve Red	30	1,69	0,29	1,40
Jonathan	180	6,34	3,16	3,18
Lord Lambourne	90	7,43	3,99	3,44
Spartan	150	6,34	3,17	3,17
Starking Delicious	210	6,31	3,96	3,35
Starkrimson Delicious	210	5,98	3,55	2,43
Zvonkové	210	11,5	6,91	4,63

Z hlediska původu lze rozdělit hlavní skládkové choroby jablek do tří skupin: poruchy vznikající ve výsadbě, fyziologické poruchy vznikající při skladování a skládkové choroby způsobené parazitickými houbami.

2.5.3.1 Fyziologické poruchy vznikající ve výsadbě

2.5.3.1.1 Hořká skvrnitost

Projevuje se buď již na plodu na stromě nebo až při uskladnění. Na plodech se objevují v dužnině pod slupkou rezavě hnědé skvrny, tvořené odumřelými buňkami. Při silnějším projevu poruchy jsou i na slupce zřetelné tmavě zelené, hnědavé nebo černé vkleslé skvrny. Dužnina v místě skvrn je poněkud nahořklá, plody mají horší konzumní jakost, dříve přezrávají a jsou citlivější na jiné skládkové poruchy.

Příčinou poruchy je nedostatek vápníku v plodech, způsobený buď jeho nedostatečným příjmem z půdy, či nedostatečným transportem do plodů, nebo jeho nadměrným odčerpáním z plodů listy a letorosty, které jsou v tomto směru vůči nim konkurujícím orgánem. Na poměru obsahu vápníku v listech a v plodech je založena také předpověď výskytu poruchy (je-li tento poměr malý, porucha se neobjeví).

Ochrana spočívá ve vyrovnané výživě stromku, především se nesmí přehnojovat dusíkem. Dále se z přímých ochranných prostředků osvědčil opakovaný postřik v době vegetace [31].

2.5.3.1.2 Sklovitost jablek

Porucha vzniká infiltrací vody do mezibuněčných prostor dužniny. Nejčastěji se projevuje kolem jádřince tak, že na příčném řezu plodem má v těchto místech dužnina sklovitý vzhled. Plody jsou těžké a chuťově nedobré. Porucha se vyvíjí pouze v době, kdy jsou plody na stromech, ve skladech se dále nerozvíjí. Při značné stupni poškození nastává v postižených místech často anaerobní dýchání, dužnina postupně odumírá, hnědne a následuje vnitřní rozpad.

Ochranou je umístění plodů po sklizni do skladů na 5-6 týdnů s vyšší teplotou a zajištění dostatečného větrání. Pokud sklovitost zmizí úplně, je plody možno dále normálně skladovat s tím, že je nutno počítat s jejich kratší uchovatelností. Pokud po uvedeném postupu sklovitost nezmizí, je nutno ovoce co nejdříve vyskladnit [31].

2.5.3.1.3 Rozpad plodů odrůdy Spartan

Porucha se projevuje v druhé polovině skladovacího období měknutí a hnědnutí dužniny těsně pod slupkou. Porucha je patrná zejména po vyskladnění, kdy se jablka záhy stávají neprodejná. Tento typ choroby se vyskytuje pouze u odrůdy Spartan.

Ochrana je stejná jako u hořké skvrnitosti, choroba vzniká ze stejných příčin [31].

2.5.3.2 Fyziologické poruchy vznikající ve skladu

2.5.3.2.1 Skládkové hnědnutí čili spála slupky

Projevuje se hnědnutím slupky, aniž by byla zasažena dužnina. Užité hodnota napadených plodů není výrazně ovlivněna, ale vzhledová kvalita je pro spotřebitele nepřijatelná. Tuto chorobu lze rozdělit na dva typy.

Hnědnutí slupky spojené s prořezáváním plodů se projevuje v důsledku příliš dlouhého skladování při nevhodných (vyšších) teplotách. Hnědnutí se může rozšiřovat i do dužniny. Skvrny se nejdříve projevují na slunečné straně plodů a to na žlutoplodých odrůdách jablek (Golden Delicious) světle hnědou barvou, na jiných odrůdách tmavě hnědou barvou. Ochranou je vhodné skladování odrůd náchylných k této chorobě.

Předčasné skládkové hnědnutí slupky se projevuje na dlouhodobě skladovaných plodech často ještě dříve, než dosáhnou konzumní zralosti. Nejsilněji se projeví za pár dní po přenesení plodů ze skladu do pokojové teploty. Slupka se zbarvuje světle hnědě, postižená místa jsou mírně vkleslá. První skvrny jsou malé, postupně se spojují až mohou pokrýt celou plochu povrchu jablka. Hnědnutí zasahuje jen slupku a několik podpovrchových vrstev buněk, jinak si dužnina zachovává svou tuhost a zdravotnost.

Příčinou je nahromadění některých aromatických látek pod kutikulou. U předčasně sklizených plodů se tato choroba vyskytuje nejčastěji.

Ochranou je především volba vhodných sklizňových termínů a okamžité uskladnění při nižší teplotě [31].

2.5.3.2.2 Chladové hnědnutí slupky a dužniny čili měkká spála slupky

Choroba se projevuje u plodů skladovaných v chlazených skladech (při teplotě pod 3°C). Na slupce se objeví světle hnědé široké pruhy v rovníkové části, které se ostře ohraničují od okolního zdravého pletiva. V místě napadení dužnina měkne. Postižená místa plodů jsou snadno napadávána parazitickými houbami, takže se plody rychle kazí [31].

2.5.3.2.3 Vnitřní rozpad plodů

Projevem poruchy je vodnatě šedá nebo hnědá barva slupky jablek, která současně v těchto místech začíná měknout. Porucha se projevuje pouze u citlivých odrůd, jsou-li plody ihned po sklizni uloženy v chladárně s teplotou 0°C. Kromě nižší teploty napomáhá vzniku této choroby i vysoká relativní vzdušná vlhkost [31].

2.5.3.2.4 *Jonathanová skvrnitost*

Tato choroba se převážně projevuje u odrůdy jablek Jonathan fialově hnědými až šedavě hnědými okrouhlými skvrnami (v pokročilém stupni černými), které se objevují na slupce zejména na sluněné straně plodů. Dužnina pod skvrnami zůstává zdravá.

Příčinou je odumření krycích pletiv způsobené organickými látkami vylučovanými samotnými plody. Rizikovým faktorem je opožděná sklizeň, pozdní uskladnění a skladování při vyšších teplotách [31].

2.5.3.2.5 *Jádrincové hnědnutí dužniny*

Symptomem poruchy je žlutohnědé až růžovohnědé zbarvení dužniny v prostoru kolem jádřince. V pokročilejším stupni se projevuje zhoršením chuti. Vznik poruchy umožňuje skladování jablek při teplotě okolo 0°C, účinnou prevencí je řízená atmosféra při skladování a včasná sklizeň [31].

2.5.3.2.6 *Hnědnutí dužniny způsobené vysokou koncentrací CO₂ nebo nedostatkem O₂*

Projevem jsou nepravidelně rozmístěné oranžově hnědé skvrny nebo souvislé pásy s gumovitou strukturou ve středních částech plodů. Poškozená dužnina časem tmavne, vysychá a někdy se v ní objeví i korkovité dutinky. Porucha signalizuje nevhodné složení atmosféry ve skladu, protože je způsobena nadměrnou koncentrací CO₂ [31].

2.5.3.3 *Skládkové poruchy způsobené parazitickými houbami*

Z parazitů vegetujících na jablkách lze vybrat čtyři nejvýznamnější.

2.5.3.3.1 *Moniliová hniloba*

Je způsobena parazitem (*Sclerotinia fructigena*, *Monilia fructigena*, *S. laxa*, *M. laxa*), který napadá jak plody dozrávající na stromě, tak plody během skladování či vyskladnění. Houba proniká do plodů různými poraněními slupky způsobenými mechanickým poškozením, ptactvem, hmyzem, atd. Na stromech se projevuje hnědou hnilobou, ve skladech černou.

Hnědá hniloba se projevuje v okolí místa vniku patogenu vytvořením okrouhlé skvrny, která se rychle zvětšuje při teplotách okolo 10°C. Napadená část hnědne a za vlhka a tepla se v zahnívajícím místě tvoří koncentricky uspořádané kruhy drobných polštářků s konidiami. Jejich barva postupně přechází od bílé až k hnědé. Dužnina má měkkou konzistenci, ale nekašovatí. Pokud plod zůstane viset na stromě, zaschne a je zdrojem nákazy v příštím roce.

Černá hniloba se projeví při pozdější nákaze ve skladě leskle černým povrchem a hnědou až černohnědou dužninou. Nákaza se jen zřídka přenáší dotykem z jednoho plodu na druhý [31].

2.5.3.3.2 *Hořká (gloeosporiová) hniloba*

Tato choroba (způsobená patogenem s řadou latinských názvů: *Phlyctaena vagabunda*, *Pezicula alba*, *Cryptosporiopsis curvispora*, *Colletotrichum gloeosporioides*, atd.) se rozvíjí i v chlazených skladech. Zdrojem nákazy jsou spory, které vznikají v napadených částech odumřelých větví a deštěm se přenáší na plody, kde vyklíčí a do plodů pronikají různými prasklinami. Až do sklizně zůstává parazit v latentní formě.

Projevem je tvorba hnědých okrouhlých skvrn, které jsou ostře ohraničené od okolního pletiva. Když skvrny dosáhnou určité velikosti, jejich středy vklesnou uprostřed se objeví bílé fruktifikační orgány, na kterých se tvoří konidie. Postižená dužnina se zbarvuje hnědě,

má moučnatou konzistenci a hořkou chuť. V konečném stádiu plody mumifikují. Nákaza se jen zřídka přenáší dotykem [31].

2.5.3.3.3 *Modrá penicilinová hniloba*

V sadech se vyskytuje na plodech jen výjimečně, a to na ovoci v pokročilejším stupni dozrávání. Jako původce je nejčastěji uváděna houba *Penicillium expansum*, jejíž spory jsou přítomny prakticky všude v půdě, na povrchu plodů, ve skladech, ve vzduchu, atd. Hlavním místem vstupu infekce jsou různá poškozená místa mechanicky, hmyzem, otlaky, napadením strupovitostí, apod.

Začátek napadení se projevuje světlými žlutými nebo hnědými skvrnami na povrchu plodu. Hniloba je nejdříve mělká, postupně proniká hlouběji. Později se za vlhka a tepla vytvoří na povrchu zprvu bělavý, potom modrozelený nebo i sivě zelený nálet houby, který silně práší. V chladném a suchém prostředí se nálet neobjeví, i když plody mohou být plísní úplně rozloženy. Postižená dužnina je zhnědlá, sklovitá, vodnatá, křehká, má nepříjemnou vůni i chuť [31].

2.5.3.3.4 *Skládková strupovitost*

S postupujícím dozráváním na stromech se plody stávají odolnějšími proti infekci původce strupovitosti (*Venturia inaequalis*, *Fusicladium dendriticum*). Může však dojít k latentní infekci, která se projeví až ve skladech. Na slupce vznikají sotva viditelné tečky, které se pomalu zvětšují. Jsou leskle černé, vkleslé a často navzájem splývají [31].

2.5.4 **Způsoby konzervace**

Postupem času vznikaly různé konzervační postupy a techniky na zachování původních organoleptických vlastností potravin. Rozdělují se do několika skupin [30, 32].

2.5.4.1 *Vylučování mikrobů z prostředí*

Mikroorganismy mohou být vylučovány z prostředí různými metodami, jejich přehled je uveden v dalším textu [30, 32].

2.5.4.1.1 *Omezování kontaminace potravin mikroby*

Pod tento způsob spadají veškerá opatření, která preventivně snižují počet mikroorganismů ohrožujících zpracovávané hmoty. Jedná se o péči o:

- čistotu nářadí a pracovních místností
- čistotu vzduchu (použití přetlaku v místnosti)
- čistotu vody
- čistotu pomocného materiálu a přísad
- čistotu pracovníků [30, 32].

2.5.4.1.2 *Ochuzování potravin o mikroby během zpracování*

Při zpracování potravin se narušuje přirozená obrana (například nastroháním jablka se poruší slupka a nežádoucí činitele mohou působit přímo na dužninu), proto se materiál musí zbavit nečistot (v případě šťáv i nerozpustných složek). Provádí se tedy:

- praní surovin a tuhých polotovarů (pomocí kartáčů)
- odstředování kalových látek ze šťáv

- filtrace šťávy [30, 32].

2.5.4.1.3 Úplné vylučování mikroorganismů z potravin

Tato metoda má uplatnění pouze u šťáv a vín, kdy se provádí tzv. mechanická sterilace, což je co nejdokonalejší zbavení produktu mikroorganismů. Provádí se buď mikrobiální filtrací nebo baktofugací [30, 32].

2.5.4.2 Přímá inaktivace mikrobů

Jedná se o usmrcení nebo přímou inaktivaci mikroorganismů v biologické matrici. Nedosahuje se absolutní sterility nýbrž pouze praktické, což znamená, že se trvale inaktivují pouze ty formy mikrobů, které mohou vegetovat za podmínek daných složením a uložením potravin. Zvláštní důraz musí být kladen na to, aby po inaktivačním zákroku nebyla matrice znovu infikována mikroorganismy, jelikož se tímto konzervářským postupem nemění složení matrice, tudíž na ní mohou mikroby opětovně vegetovat (potravinu se musí uložit do sterilního obalu). V praxi se rozlišují dva typy zákroků [30, 32].

2.5.4.2.1 Fyzikální zákroky

Fyzikální zákroky se mohou uskutečňovat:

- zvýšenou teplotou (jedná se buď o obvyklé zahřívání, odporový ohřev nebo o vysokofrekvenční nebo-li mikrovlnný ohřev)
- konzervací ionizujícím zářením
- sterilací střídavým tlakem (ultrazvukem)
- sterilací ultravysokým tlakem (při tomto postupu se inaktivují i enzymy) [30, 32].

2.5.4.2.2 Chemické zákroky

K chemosterilaci lze zařadit pouze ty zákroky, při kterých se mikroorganismy trvale inaktivují. Jedná se tedy o:

- sterilaci kyslíkem (ozónem, peroxidem vodíku, atd.)
- sterilaci stříbrem
- sterilaci chemikáliemi [30, 32].

2.5.4.3 Nepřímá inaktivace mikroorganismů

Těmito postupy je upravováno prostředí mikroorganismů tak, aby se v něm nemohly množit a působit svým enzymatickým aparátem. Dle povahy účinku se mohou tyto metody rozdělovat na tři kategorie [30, 32].

2.5.4.3.1 Konzervace fyzikální, příp. fyzikálně-chemickou, úpravou potravin

Je více způsobů, jak fyzikální konzervaci provádět:

- odnímáním vody (sušením, zahušťováním, vymrazováním, proslazováním, jedlou solí)
- snižováním teploty pod mez vegetace mikrobů
- odnímáním kyslíku neboli modifikací atmosféry (mechanická evakuace okolí potravin, konzervace v prostředí netečných plynů, konzervace prosycením tukem) [30, 32].

2.5.4.3.2 Konzervace chemickou úpravou potravin

- konzervace malými koncentracemi látek, které jsou ve větším množství nepoživatelné (mikroorganismy usmrcují i při této nízké koncentraci); jedná se o konzervaci chemikáliemi nebo uzením
- konzervace umělou alkoholizací a okyselením (pomocí vysokých koncentrací ethanolu a organických kyselin)
- konzervace antibiotiky (nesmí se používat antibiotika, které se používají v medicíně kvůli vzniku rezistence)
- konzervace fytoncidy (fytoncidy jsou biologicky účinné látky obsažené v některých potravinách jako je cibule nebo česnek) [30, 32].

2.5.4.3.3 Konzervace biologickou úpravou potravin

Při tomto typu konzervace vznikají konzervační činidla biologickou cestou. Používá se naočkování vhodnou kulturou mikroorganismů.

- konzervace kvašením cukrů (alkoholickým, mléčným)
- přeměna proteolýzou [30, 32].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie, přístroje a vzorky

Chemikálie, standardy a kity

Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, ČR)
Dusitan sodný (Lachema, ČR)
Folin-Ciocalteuovo činidlo
Hydroxid sodný (Onex, ČR)
Chlorid hlinitý
Kyselina chlorovodíková (Penta, ČR)
Monohydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Lach-Ner, ČR)
Peroxid vodíku (Lach-Ner, ČR)
Polyvinylpyrolidon (Sigma-Aldrich, ČR)
„Ransod kit“, Randox Laboratories (USA)
Síran měďnatý (Lachema, ČR)
„Total antioxidant status kit“, Randox Laboratories (USA)
Triton X-100 (Serva)
Uhličitan sodný (Lachema, ČR)
Vinan sodno-draselný tetrahydrát (Lachema, ČR)
2,6-dichlorindofenol
4-methylcatechol (Sigma-Aldrich, ČR)

Přístroje

Analytické váhy (AND HR-120)
Centrifuga (Janetzki T23, Polsko)
Lyofilizátor a koncentrátor LABCONCO (USA)
Mrazicí box (Samsung-Calex, ČR)
Spektrofometr Helios γ
Systém Experion (Bio-RAD, USA)
Temperovaná vodní lázeň (EL-20R)
UV/VIS spektrofotometr Helios α

Materiál

K dispozici byly tři odrůdy jablek, přičemž od každého druhu byly dodány dva typy plodů jablek: jedno skladované v normální atmosféře a druhé v modifikované atmosféře s sníženou koncentrací kyslíku (2%). Bylo pracováno s těmito odrůdami: Idared, Golden Delicious a Jonagored.

Úprava vzorku

Před stanovením jednotlivých charakteristik bylo vždy nutné upravit vzorky jablek do takové formy, která by vyhovovala požadovanému stanovení a současně by daný parametr byl stabilní.

Celé jablko každého typu bylo zváženo, poté rozpuřeno a vždy jedna polovina byla použita na stanovení nízkomolekulárních antioxidantů a druhá na stanovení antioxidantních enzymů. Z poloviny jablka na nízkomolekulární látky byl ještě oddělen malý díl na stanovení vitamínu C.

Nízkomolekulární antioxidanty byly stanovovány v čerstvé šťávě, proto bylo nutné danou část jablka vždy nastroumat na plastovém struhadle a následně byla hmota přefiltrována přes dvojitou gázu, čímž byla získána surová šťáva. Jelikož nebylo možné provést všechna měření ihned, musela být šťáva zamrazena při -18°C , aby se zamezilo ztrátám sledovaných látek. Malá část jablka na určení vitamínu C byla ručně natrhána na kousky a v třecí misce byla rozmělněna s 2% HCl. Pak byl roztok zfiltrován.

Zvláštní důraz na rychlé zpracování byl kladen na stanovení enzymů. Sledované antioxidantní enzymy rychle reagovaly se vzdušným kyslíkem a přecházely do oxidované formy. Bylo vyzkouřeno více postupů na zpracování biologického materiálu:

- jablko bylo nastrouháno na plastovém struhadle, ze získané hmoty byla co nejrychleji vymačkána šťáva přes dvojitou gázu a ihned vložena do mrazničky. Po zmrazení byla lyofilizována.
- jablko bylo zpracováno jako v předchozím postupu, jen ke hmotě před vymačkáním byly přidány 2 gramy polyvinylpyrolidonu a 1 ml Tritonu X-100 [2].
- po nastrouhání jablka byla hmota zamrazena přidáním tekutého dusíku a rozmělněna na prášek pomocí tloučku v třecí misce. Mrazení dusíkem muselo probíhat po částech. Dusík ihned zmrazil danou část jablka, která musela být následně od misky oddělena a rozmělněna na prášek tloučkem. Během mělnění docházelo k lokálnímu vzniku tepla, proto se muselo často přidávat po troškách mrazící médium. Na zmrazení poloviny průměrně velkého jablka bylo potřeba cca 0,5 litru dusíku. Také bylo nutné dbát na ochranu nádobí před nízkými teplotami, a proto byla miska i s tloučkem před používáním vložena vždy na cca 30 minut do mrazničky.
- jablko bylo zpracováno obdobným postupem jako byl předcházející, jen ke hmotě před mražením byly přidány 2 gramy polyvinylpyrolidonu a 1 ml Tritonu X-100.

Všechny výsledné preparáty byly uchovávány po celou dobu zkouření v mrazničce. Jako nejlepší byl vyhodnocen poslední uvedený postup, tedy mrazení pod tekutým dusíkem s přídkem polyvinylpyrolidonu a Tritonu X-100 s následním rozmělněním. Proto byly takto zpracovány i části odrůdových jablek na vlastní analýzu enzymů.

3.2 Stanovení celkové antioxidantní aktivity

Celková antioxidantní aktivita (ABTS) byla stanovena pomocí kitu TAS od firmy Randox. Kit obsahoval roztok pufru a chromogen, substrát a standard v práškové formě. Hodnota ABTS byla stanovena ihned po naskladnění a po 158 dnech skladování.

Princip:

Principem měření je sledování inhibice přeměny chromogenu substrátem. Čím vyšší je absorbance dané směsi, tím více chromogenu bylo přeměněno, tzn. že přidáný vzorek byl

menším antioxidantem, jelikož nebyl schopen dostatečně vychytat radikály působící na chromogen.

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 jablek
deionizovaná voda	10 μ l	8 μ l	8 μ l
standard	-	2 μ l	-
jablečná 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 přidavku byla změřena A_2 . Stejně bylo postupováno i v případě standardního vzorku a vzorku jablek. Na analýzu byla používána zamražená surová šťáva z jablek.

Výpočet:

Hodnota celkové antioxidační aktivity byla spočítána podle následujících vzorců:

$$faktor = \frac{c_{s\ tan\ dardu}}{(\Delta A_{blank} - \Delta A_{s\ tan\ dartního\ vzorku}) \cdot 5}$$

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

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 pomocí experimentálně zjištěné hustoty jablečné šťávy ($\rho_{jablečné\ šťávy} = 1,011024$ g/cm³).

3.3 Stanovení nízkomolekulárních antioxidantů

Z celé široké skupiny těchto látek byly stanovovány následující parametry: obsah vitamínu C titračně, celkové polyfenoly a celkové flavonoidy spektrofotometricky. Obsah nízkomolekulárních antioxidantů byl stanoven ihned po naskladnění a po 158 dnech skladování.

3.3.1 Obsah vitamínu C

Princip:

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

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-dichlorindifenolu do lososově růžového zbarvení.

Následně byl stanoven obsah vitamínu C ve vzorku. Na analýzu byl použit filtrát (připravený dle uvedeného postupu v kapitole 3.2), který byl kvantitativně převeden do odměrné baňky na 25 ml a doplněn po rysku 2% HCl. Roztok v odměrné baňce byl přelit do titrační baňky a titrován odměrným roztokem stejným postupem jako při titraci standardu..

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.

3.3.2 Celkové polyfenoly

Princip:

Vzorek jablečné šťávy reaguje s Folin–Ciocalteuovým činidlem. Změna zbarvení je sledována spektrofotometricky a následně se porovnává se změnou způsobenou standardním roztokem kyseliny gallové.

Postup:

Do zkumavky byl pipetován 1 ml Folin-Ciocalteuova činidla (desetkrát zředěného), 1 ml vody a 50 μ l vzorku jablek. 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 slepého vzorku byl totožný, pouze místo jablečné šťávy bylo přidáno 50 μ l vody). Jelikož byly připravené roztoky příliš koncentrované, musely být třikrát zředěny vodou. Na stanovení byla použita zamražená šťáva z jablek.

Výpočet:

Pro výpočet byla použita rovnice lineární regrese získaná z kalibrační křivky naměřené pro rozsah koncentrací kyseliny gallové 0,11-0,53 mg/ml:

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

Byla získána koncentrace celkových polyfenolů v mililitru šťávy, která musela být přepočtena pomocí experimentálně změřené hustoty šťávy ($\rho_{\text{jablečné šťávy}} = 1,011024 \text{ g/cm}^3$) a přímé úměry na obsah polyfenolů v gramu jedlého podílu.

3.3.3 Celkové flavonoidy

Princip:

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

Postup:

Do zkumavky bylo pipetováno 0,5 ml jablečné 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. Jelikož byly připravené roztoky příliš koncentrované, musely být třikrát zředěny vodou. Na stanovení byla použita zamražená vymačkaná šťáva z jablek.

Výpočet:

Pro výpočet byla použita rovnice lineární regrese získaná z kalibrační křivky naměřené pro rozsah koncentrací katecholu 0,5-3 mg/ml:

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

Byla získána koncentrace celkových flavonoidů v mililitru šťávy, která musela být přepočtena pomocí experimentálně změřené hustoty šťávy ($\rho_{\text{jablečné šťávy}} = 1,011024 \text{ g/cm}^3$) a přímé úměry na obsah flavonoidů v gramu jedlého podílu. Dále byla vypočtena směrodatná odchylka opakovaných měření.

3.4 Stanovení proteinů

3.4.1 Hartree-Lowryho metoda

Byly měřeny roztoky vzniklé rozpuštěním cca 0,1 g jablek mražených v tekutém dusíku v 10 ml fosfátového pufru. Dané roztoky obsahovaly tuhý podíl, který by rušil spektrofotometrické stanovení, proto byly vzorky centrifugovány 10 minut při 7500 ot./min. Ke stanovení byl použit supernatant, takže mohly být stanoveny pouze rozpustné proteiny. Koncentrace proteinů byly stanoveny v jablkách skladovaných 158 dní v různých typech atmosféry.

Princip:

Princip je založen na reakci aromatických aminokyselin s Folin –Ciocalauovým činidlem. Vzniká tmavě modrý roztok, intenzita zbarvení je měřena spektrofotometricky [39].

Postup:

Do zkumavek byl pipetován 1 ml fyziologického roztoku (v případě blanku) nebo vzorku. Pak bylo přidáno do každé zkumavky 0,9 ml činidla A (roztok vinanu sodno-draselného, uhličitanu sodného a hydroxidu sodného ve vodě) a směsi se nechaly inkubovat 10 min ve vodní lázni vyhřáté na 50°C. Poté byly zkumavky ochlazeny na laboratorní teplotu, po přidavku činidla B (roztok vinanu sodno-draselného, síranu měďnatého a hydroxidu sodného ve vodě) byly protřepány a nechaly se deset minut v klidu stát při laboratorní teplotě. Pak byly rychle přidány 3 ml činidla C (Folin-Ciocalauovo činidlo), po promíchání se zkumavky opět vložily do vodní lázně vyhřáté na 50°C a po deseti minutách inkubace a následném ochlazení na laboratorní teplotu byla měřena absorbance roztoku na spektrofotometru Helios γ při $\lambda = 650$ nm proti blanku.

Výpočet:

Celkový obsah proteinů ve vzorcích byl vypočítán pomocí rovnice lineární regrese z kalibrační křivky naměřené pro rozsah koncentrací albuminu $6 \cdot 10^{-5}$ -0,15 mg/ml:

$$A = 5,8501 \cdot c + 0,0347 .$$

Výsledná hodnota byla ještě přepočítána přes množství navážky mraženého vzorku na gram jedlého podílu jablka pomocí přímé úměry.

3.4.2 Stanovení bílkovin pomocí mikročipové elektroforézy

Byl používán mikročip, kity a celé zařízení Experion od firmy Bio-Rad.

Princip:

Gelem naneseným na mikročip pomocí speciálního zařízení prochází proteiny hnané proudem, které se zachytávají v závislosti na své molekulové hmotnosti různě daleko od startu. Jednotlivé bílkoviny jsou vizualizovány pomocí fluorescenčního barvení a je měřena intenzita jejich fluorescence, z čehož lze orientačně určit množství daného proteinu ve vzorku.

Postup:

Všechny roztoky dodávané v kitu Experion byly citlivé na světlo, proto byly uchovávány ve tmě a v chladu. Před použitím musely být roztoky ustáleny na laboratorní teplotu, jemně promíchány a mírně stočeny v centrifuze. Do čipu vloženého do nanášecí stanice bylo nejprve pipetováno 12 μ l gelu dle návodu přiloženém ke kitu. Stanice byla uzavřena a na gel působil předepsaný tlak po dobu 1 minuty. Pak bylo ještě do čtyř jamek pipetováno 12 μ l gelu a do zbývajících deseti 6 μ l předem povařeného vzorku. Čip byl vložen do automatické elektroforetické stanice, byla spuštěna analýza a výsledky byly vyhodnoceny speciálním programem Experion. Pokud se v čipu nacházelo příliš mnoho bublinek, nemohla být analýza provedena a bubliny musely být odstraněny.

Vyhodnocení:

Vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu Experion.

3.5 Stanovení antioxidantních enzymů

Ve výše uvedených odrůdách jablek byly stanovovány tři enzymy: superoxiddismutasa (SOD), katalasa a polyfenoloxidas (PPO). Nejprve bylo nutné zavést metody stanovení těchto enzymů pro daný biologický materiál. Enzymy byly stanoveny v jablkách skladovaných 158 dní různých atmosférách.

3.5.1 Stanovení SOD

Na stanovení SOD v jablkách 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 jablek. Navíc byla tato alternativa již testována na vzorcích ječného zrna [33].

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.

Postup:

Nejprve byly převedeny práškové chemikálie z kitu do roztoku dle návodu od výrobce. Pak byl připraven roztok rozpuštěním cca 0,1 g pod dusíkem zmraženého jablka v 10 ml fosfátového pufru. Jelikož vzorek obsahoval i nerozpustné části jablka, byl předem centrifugován 10 minut při 7500 ot./min. Z takto připraveného vzorku bylo pipetováno 50 μ l do kyvety s 1,7 ml substrátu [směs xanthinu a 2-(4-iodofenyl)-3-(4-nitrofenol)-5-fenyltetrazolium chloridu]. Obsah kyvety byl dobře promíchán a nakonec bylo přidáno 250 μ l 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 jablek bylo do kyvety pipetováno 50 μ l rozpouštědla Ransod.

Výpočet:

Nejprve byla vypočtena procenta inhibice příslušející danému roztoku:

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

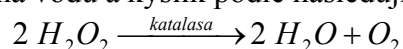
50% inhibice odpovídala jedné mezinárodní jednotce SOD. Přímou úměrou byla vypočítána aktivita SOD v mezinárodních jednotkách i v katalach v cca 0,1 g dusíkem mraženého jablka. Tato hodnota byla přepočítána na aktivitu v mezinárodních jednotkách i v katalach v gramu jedlého podílu jablka.

3.5.2 Katalasa

Na zjištění aktivity enzymu katalasy v jablkách bylo nalezeno několik možných postupů stanovení (manganometrické určení [36], práce s kitem od firmy Sigma [37], spektrofotometrické měření [2], atd) Jako nejvhodnější byl vybrán poslední zmiňovaný [2].

Princip:

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



Měří se úbytek peroxidu vodíku v roztoku v závislosti na čase.

Postup:

Nejprve byl připraven roztok rozpuštěním cca 1 g pod dusíkem zmraženého jablka v 10 ml fosfátového pufru. Jelikož obsahoval i nerozpustné části jablka, byl centrifugován 10 minut při 7500 ot./min. Z takto připraveného roztoku vzorku byl odebrán do kyvety 0,1 ml. Objem byl následně doplněn fosfátovým pufrem nebo roztokem peroxidu na 3 ml a byla měřena absorbance po 1 a půl minutě od přidavku enzymu na spektrofotometru Helios α při $\lambda = 240$ nm proti fosfátovému pufru.

Výpočet:

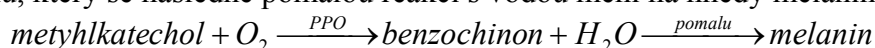
K výpočtu byl použit Lambert-Beerův zákon ($A = l \cdot c \cdot \varepsilon$), kde l byla tloušťka kyvety v centimetrech, c byla molární koncentrace v molech na litr a ε byl molární extinkční koeficient). Z absorbance byla vypočtena konečná koncentrace peroxidu po působení enzymu. Z rozdílu počáteční 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 jablka.

3.5.3 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-methylkatecholem [38].

Princip:

Roztok methylkatecholu 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 methylkatecholu.

Postup:

Prvně byl připraven roztok rozpuštěním cca 1 g pod dusíkem zmraženého jablka v 10 ml fosfátového pufru a centrifugován 10 minut při 7500 ot./min. 1 ml tohoto vzorku byl napipetován do kyvety s 2 ml methylkatecholu. 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.

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 extinkčního koeficientu koncentrace a následně látkové množství úbytku methylkatecholu. Z této hodnoty byla vyjádřena aktivita enzymu v mezinárodních jednotkách a v katelech v naředěném roztoku a po přepočtu i v jednom gramu jedlého podílu.

3.5.4 Stanovení SOD, katalasy a PPO v čerstvé šťávě

Výše zmiňované enzymy byly stanovovány i v čerstvě vymačkané šťávě z jablek.

Postup:

Před každou analýzou byla nastrohaná část jablka, ze které byla manuálně vylisovaná šťáva. Další operace se šťávou byly shodné jako v postupech stanovení jednotlivých enzymů z pod dusíkem mražených vzorků. V případě potřeby byla šťáva naředěna.

Výpočet:

Výpočty byly provedeny stejnými postupy, jaké byly uvedeny v kapitolách 3.5.1, 3.5.2 a 3.5.3.

3.6 Umělá infikace jablek plísněmi

Byl sledován rozvoj kolonií plísní na jablkách v závislosti na odrůdě a atmosféře skladování. Vždy z každé odrůdy a atmosféry bylo infikováno jedno jablko těmito plísněmi: *Gloeosporium album* izolovaná z napadeného jablka (viz Příloha 4), čistá kultura *Gloeosporium album* a plíseň rodu *Penicillium*.

Postup:

Nejprve byl vyzářen a vydezinfikován box, ve kterém se s výše uvedenými mikroorganismy pracovalo. Následně bylo očištěno jablko na třech místech ethanolem a byly do něj provedeny tři vpichy pomocí kuchyňského nože. Poranění bylo vedeno spíše do povrchové části pod slupkou. Do každého vpichu byla vpravena část kultivačního média s danou plísní. Jablka byla kultivována 4 týdny v chladu. Po inkubační době byla na jablkách zhodnocena úspěšnost umělého zaplísnění.

4 VÝSLEDKY

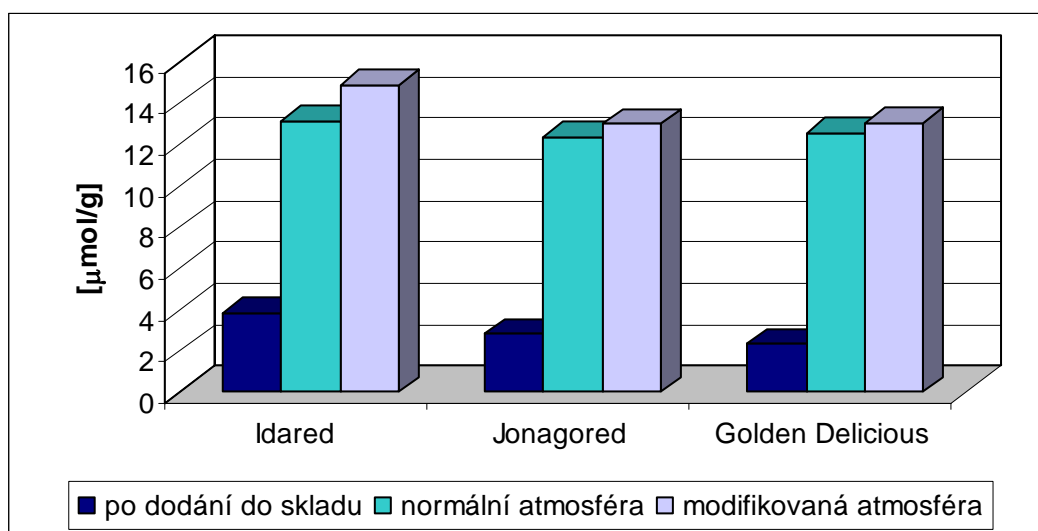
4.1 Stanovení celkové antioxidační aktivity

Postupem uvedeným v kapitole 3.2 byla provedena analýza celkové antioxidační aktivity ve vzorcích jablek pomocí kitu TAS od firmy Randox. Měření proběhlo v jablkách čerstvě dodaných do skladu a po 158 dnech uložení v modifikované nebo normální atmosféře.

Tabulka 2: Výsledky měření ABTS po dodání jablek do skladu a po 158 dnech skladování

	ABTS [$\mu\text{mol/g}$]		
	po dodání	po 158 dnech	
		normální atmosféra	modifikovaná atmosféra
Idared	3,836	13,151	14,894
Jonagored	2,815	12,365	12,983
Golden Delicious	2,321	12,533	13,039

Graf 1: Porovnání hodnot celkové antioxidační aktivity v jablkách po dodání do skladu a po 158 dnech v atmosféře



Z grafu je patrné, že na počátku skladování měly všechny vzorky nejnižší celkovou antioxidační aktivitu. Tento jev byl pravděpodobně způsoben tím, že jablka v době sklizně neměly ještě dostatečnou zralost a dozrávaly až ve skladu. Další příčinou může být rozrušování buněk vlivem disimilačních procesů a tím vyplavování v buňce vázaných látek.

Ve všech odrůdách byla nejvyšší aktivita naměřena ve vzorcích skladovaných v modifikované atmosféře, nejvíce ze všech pak v odrůdě Idared.

Ihned po dodání do skladu měly obě červené odrůdy (Idared, Jonagored) větší hodnotu ABTS než odrůda zelená (Golden Delicious). V průběhu skladování se poměry změnily. Odrůda Idared si zachovala nejvyšší hodnoty, ovšem ve vzorku jablka Jonagored docházelo k navyšování poměrově pomaleji než v odrůdě Golden Delicious.

4.2 Stanovení nízkomolekulárních antioxidantů

Nízkomolekulární antioxidanty (vyjma vitaminu C) byly měřeny ihned po naskladnění jablek a po 158 dnech uložení.

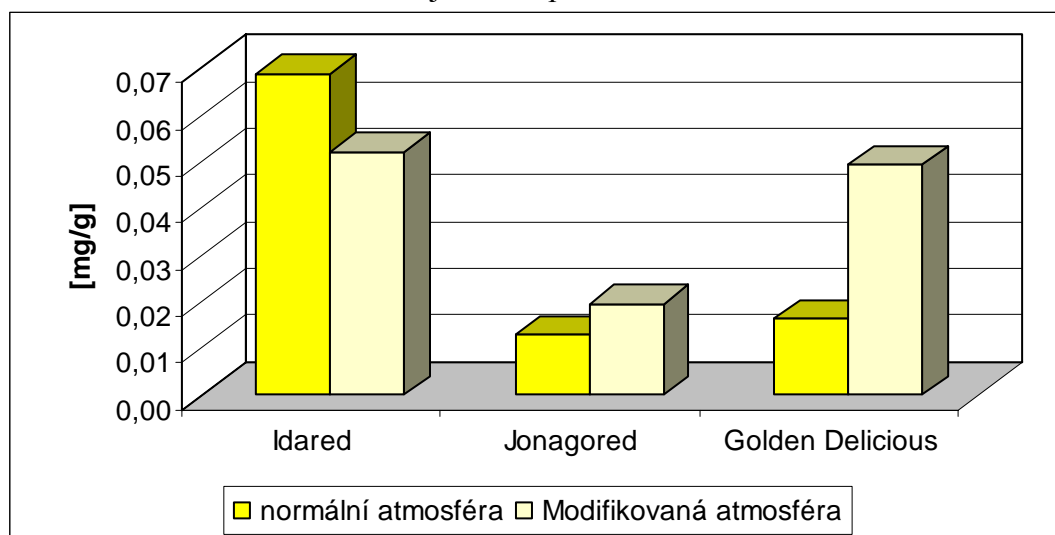
4.2.1 Obsah vitaminu C

Vitamin C byl měřen titračně dle postupu uvedeného v odstavci 3.3.1. Po přepočtech uvedených ve stejné části této bakalářské práce byly získány výsledky v mg vitaminu na gram jedlého podílu jablka, které jsou sumarizovány v následující tabulce.

Tabulka 3: Výsledky výpočtů obsahu vitaminu C v odrůdových jablkách po 158 dnech skladování

	obsah vitaminu C [mg/g]	
	normální atmosféra	modifikovaná atmosféra
Idared	0,0688	0,0521
Jonagored	0,0130	0,0194
Golden Delicious	0,0162	0,0495

Graf 2: Srovnání obsahu vitaminu C v jablkách po 158 dnech skladování



Ze srovnání je patrné, že největší obsah vitaminu C byl stanoven v odrůdě Idared skladované v normální atmosféře. Mezi obsahy vitaminu v normální atmosféře byl značný rozdíl při porovnání odrůdy Idared s ostatními zkoušenými odrůdami. Při tomto způsobu skladování obsahovala nejméně vitaminu C odrůda Jonagored. Pořadí dle množství vitaminu bylo zachováno i při skladování v modifikované atmosféře.

U plodů Idared působila modifikovaná atmosféra negativně, u odrůd Jonagored a Golden Delicious pozitivně (zvláště u poslední zmiňované, kdy byl zaznamenán prudký nárůst).

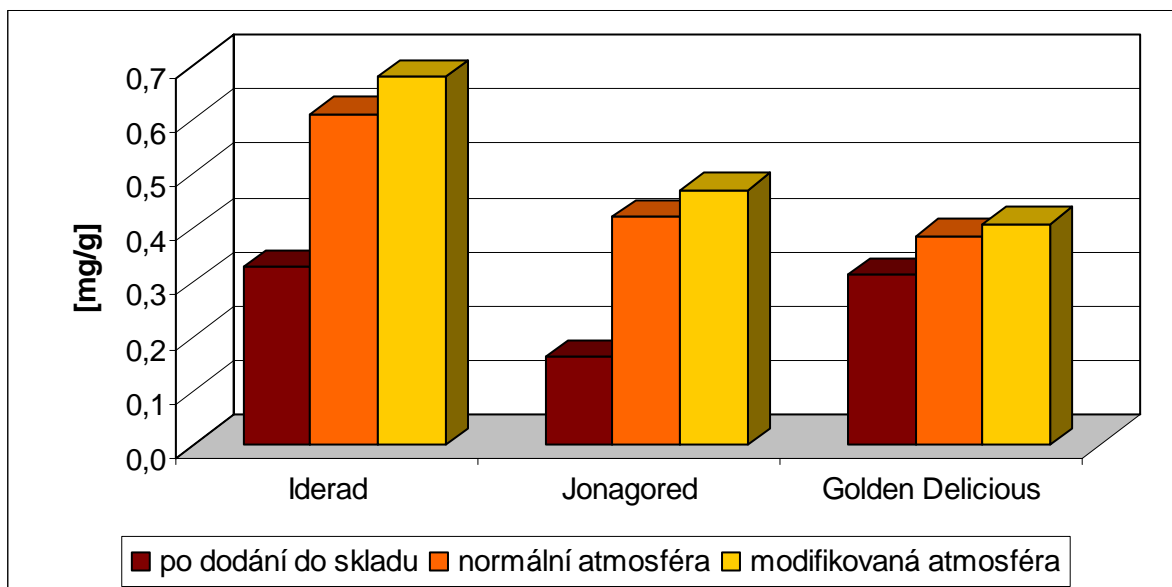
4.2.2 Celkové polyfenoly

Postupem, který byl popsán v odstavci 3.3.2 byla provedena analýza celkových polyfenolů v odrůdových jablkách. Měření poskytla výsledky (přepočtené na mg obsahu celkových polyfenolů v gramu jedlého podílu jablka) uvedené v tabulce.

Tabulka 4: Výsledky měření celkových polyfenolů po dodání jablek ze skladu a po 158 dnech

	celkové polyfenoly [mg/g]		
	po dodání	po 158 dnech	
		normální atmosféra	modifikovaná atmosféra
Idared	0,328	0,610	0,677
Jonagored	0,162	0,419	0,470
Golden Delicious	0,313	0,386	0,222

Graf 3: Porovnání obsahu polyfenolů v odrůdových jablkách po dodání do skladu a po 158 dnech skladování



Stejně jako u ABTS bylo zjištěno, že na začátku skladování obsahovaly vzorky mnohem méně celkových polyfenolů než po určené době uskladnění. Důvody jsou pravděpodobně stejné, totiž předčasná sklizeň plodů a dozrávání až ve skladu nebo disimilační procesy a tím navyšování hodnoty vlivem uvolňování polyfenolů z buněčných struktur.

Ve všech třech stanoveních byly nejvyšší hodnoty naměřeny u odrůdy Idared. Po dodání do skladu byly zjištěny vyšší hodnoty celkových polyfenolů u jablek Golden Delicious než u odrůdy Jonagored, naopak tomu bylo při skladování v obou typech atmosfér.

Jako výhodnější z daných typů uskladnění se jeví udržování v modifikované atmosféře.

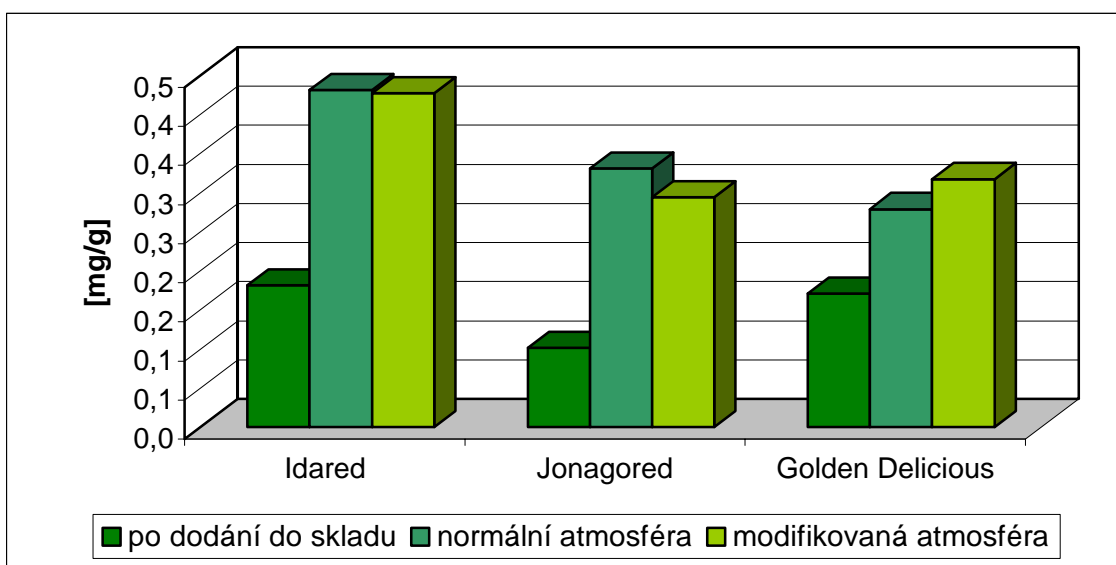
4.2.3 Celkové flavonoidy

Jako část z celkových polyfenolů byl měřen obsah celkových flavonoidů. V tabulce jsou uvedeny přehledně výsledky měření (převedeny na mg celkových flavonoidů vztažených na gram jedlého podílu jablka).

Tabulka 5: Obsah celkových flavonoidů v jablkách po dodání jablek do skladu a po 158 dnech skladování

	celkové flavonoidy [mg/g]				
	po dodání	normální atmosféra		modifikovaná atmosféra	
		po 158 dnech	směrodatná odchylka	po 158 dnech	směrodatná odchylka
Idared	0,181	0,431	0,029	0,427	0,007
Jonagored	0,101	0,331	0,015	0,294	0,010
Golden Delicious	0,171	0,279	0,022	0,317	0,055

Graf 4: Porovnání hodnot celkových flavonoidů v jablkách ihned po dodání jablek do skladu a po 158 dnech skladování

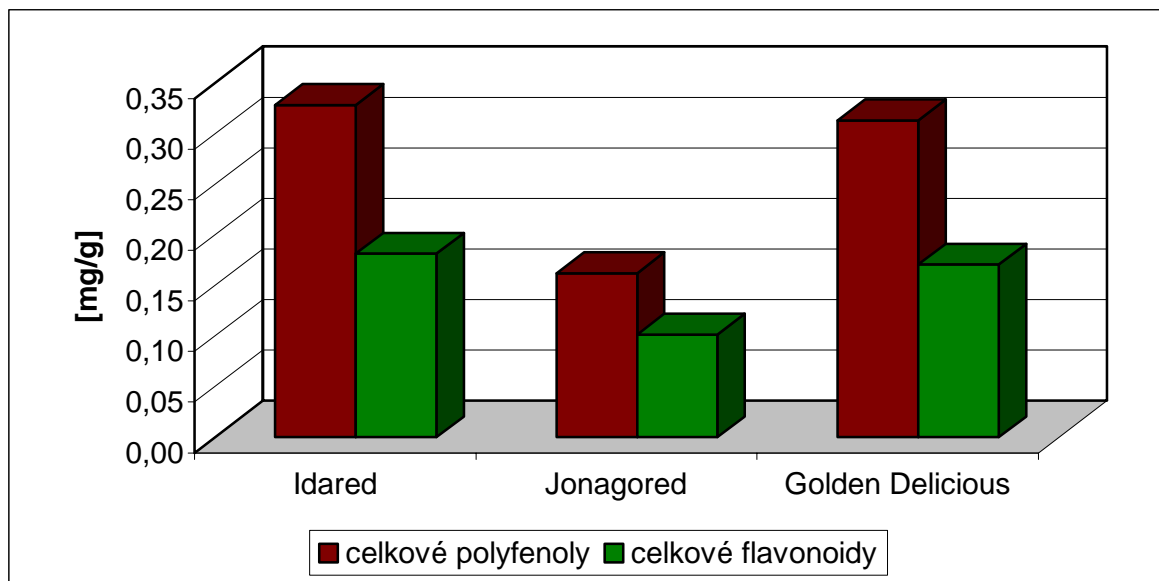


I u tohoto stanovení se ukázalo, že na počátku skladování byl obsah flavonoidů mnohem menší než po 158 dnech uložení.

Největší hodnoty byly opět naměřeny u odrůdy Idared a to u všech typů měření. Odrůda Jonagored vyniká nad Golden Delicious obsahem flavonoidů při uložení v normální atmosféře, opačně je to při uložení do modifikované atmosféry a při měření ihned po sklizni. Opět nelze říci, která odrůda obecně, zda červená či zelená, má vyšší obsah těchto látek.

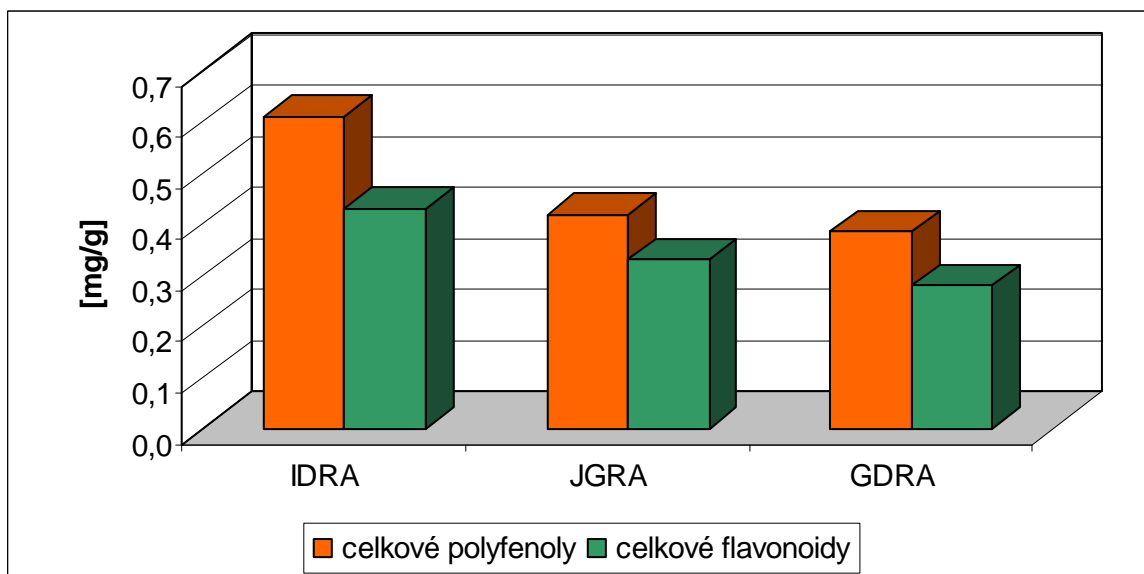
U plodů Idared se neprojevily téměř žádné rozdíly při skladování v normální a modifikované atmosféře, u obou dalších odrůd byly rozdíly pouze malé.

Graf 5: Srovnání obsahu celkových polyfenolů a flavonoidů v jablkách ihned po sklizni



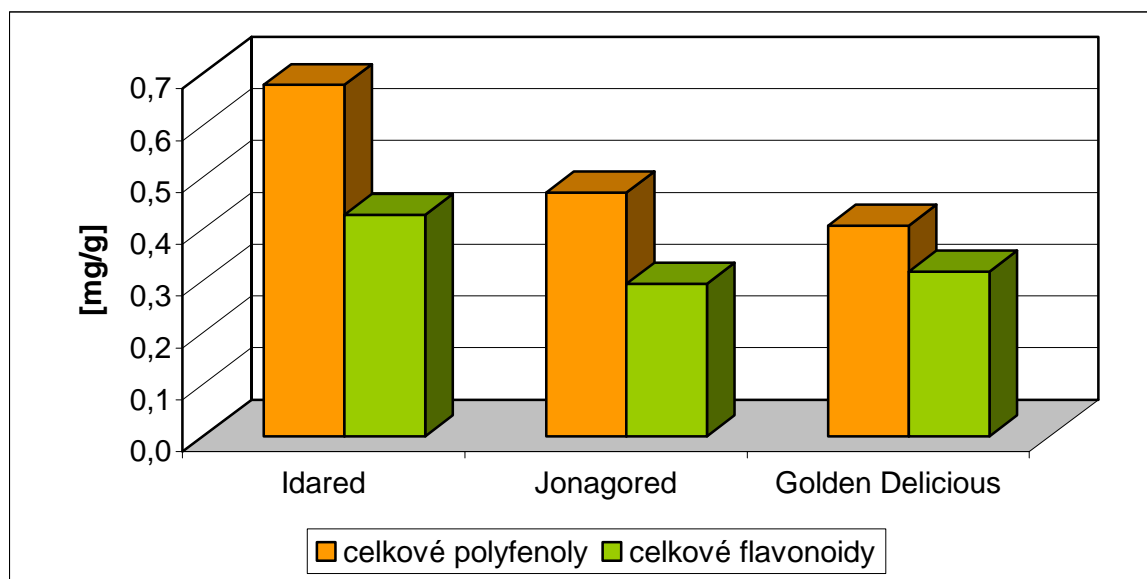
Výše uvedený graf monitoroval situaci v plodech ihned po sklizni. U odrůdy Idared a Golden Delicious tvořily flavonoidy přibližně polovinu z celkového obsahu polyfenolů, u odrůdy Jonagored to byly přibližně dvě třetiny.

Graf 6: Srovnání obsahu celkových polyfenolů a flavonoidů v jablkách po 158 dnech v normální atmosféře



Graf 6 srovnával poměrný obsah flavonoidů a polyfenolů v jablkách po 158 dnech uložení plodů v normální atmosféře. Bylo zjištěno, že u odrůd Idared a Golden Delicious tvořily flavonoidy asi tři čtvrtiny z celkového obsahu polyfenolů, u odrůdy Jonagored to byly přibližně čtyři pětiny.

Graf 7: Srovnání obsahu celkových polyfenolů a flavonoidů v jablkách po 158 dnech v modifikované atmosféře



Při stejném srovnání u jablek skladovaných v modifikované atmosféře (Graf 7) se došlo k závěru, že u odrůd Idared a Jonagored tvořily flavonoidy cca dvě třetiny z celkového počtu polyfenolů a u odrůdy Golden Delicious to byly čtyři pětiny.

4.3 Stanovení proteinů

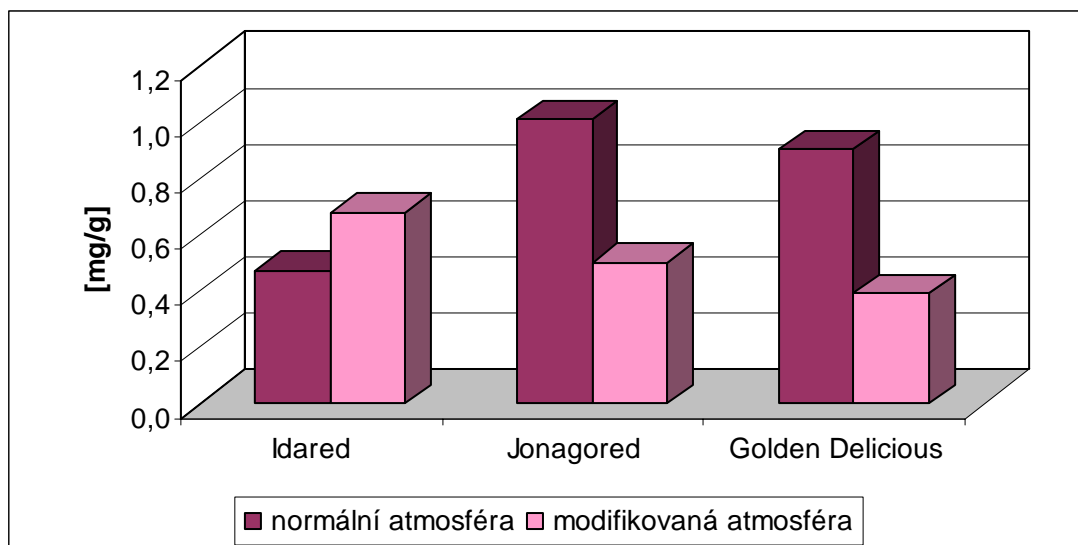
4.3.1 Hartree-Lowryho metoda

V jablkách bylo možno postupem uvedeným v kapitole 3.4.1 stanovit pouze rozpustné proteiny. Proto výsledky nevypovídají o hodnotách celkových proteinů a jsou celkově poměrně nízké, což je pro jablka typické

Tabulka 6: Výsledky měření rozpustných proteinů v jablkách vztažených na gram jedlého podílu jablka

	rozpustné proteiny [mg/g]	
	normální atmosféra	modifikovaná atmosféra
Idared	0,470	0,679
Jonagored	1,008	0,499
Golden Delicious	0,902	0,391

Graf 8: Srovnání obsahu rozpustných proteinů v jablkách v modifikované a v normální atmosféře



Z výše zobrazeného grafu je vidět, že nejvíce rozpustných proteinů je v odrůdě Jonagored skladované v normální atmosféře. U plodů Idared bylo skladování v modifikované atmosféře prospěšné, zatímco u dalších dvou odrůd působilo negativně.

Pokud bude uvažováno, že u posledních dvou typů simuluje skladování v normální atmosféře počáteční podmínky při sběru, je zřejmé, že během uchování těchto odrůd v modifikované atmosféře došlo ke snížení obsahu celkových rozpustných proteinů zhruba na polovinu.

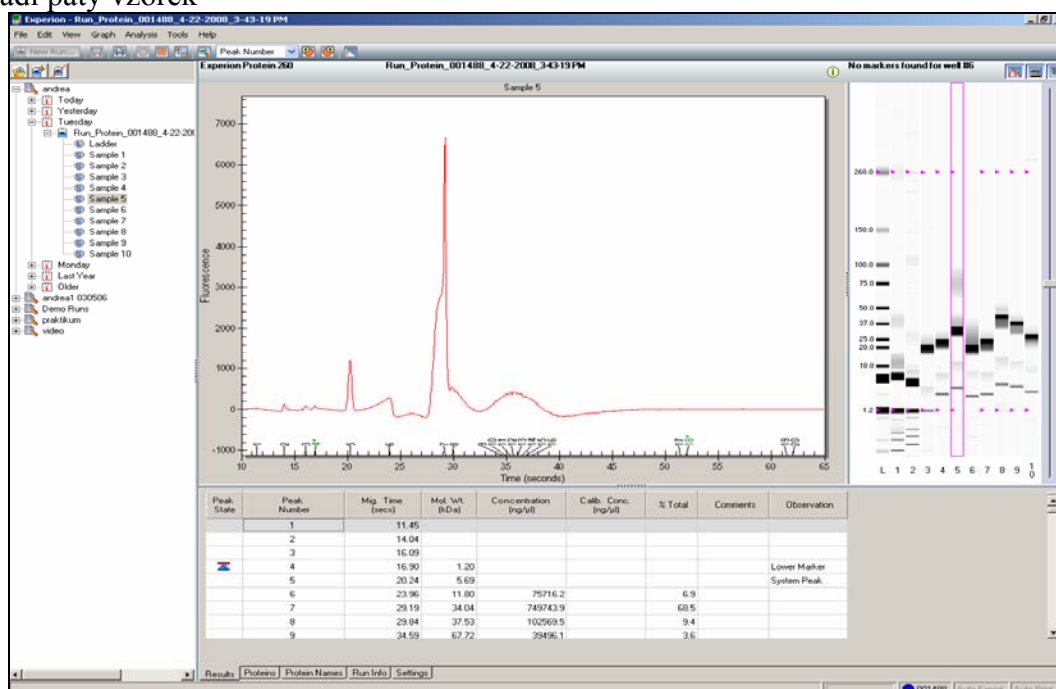
Z výsledků stanovení nelze říci, zda má více rozpustných proteinů odrůda červená či zelená.

Celkové proteiny byly stanovovány zejména jako pomocný parametr pro hodnocení enzymových aktivit a proteinového složení v plodech.

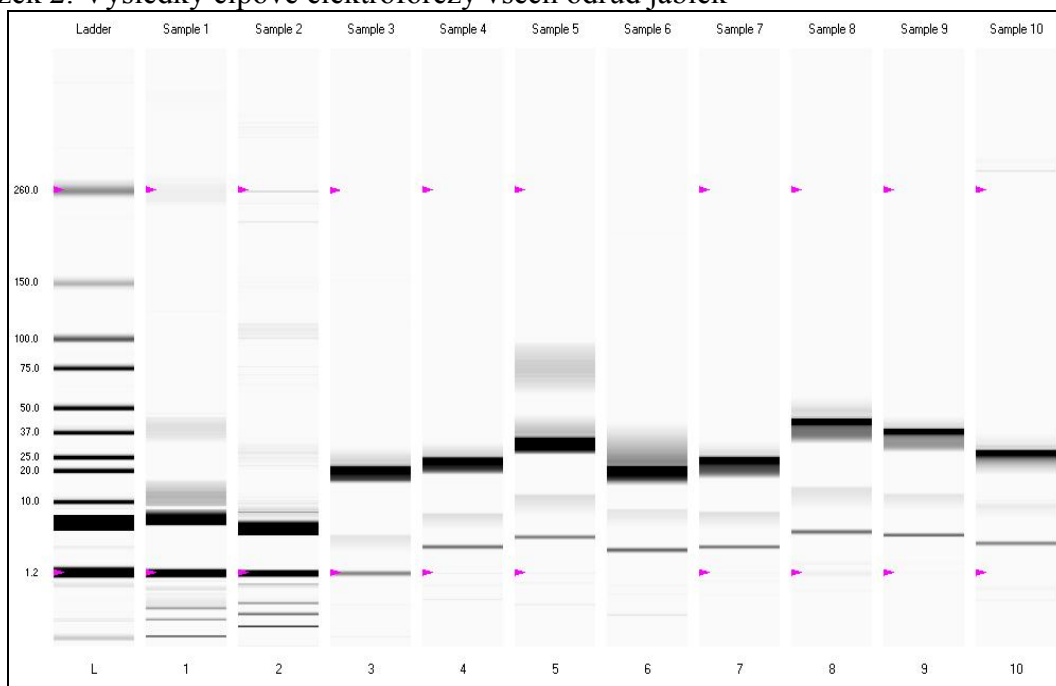
4.3.2 Analýza jablečných proteinů mikrofluidní elektroforézou

Pomocí čipu od firmy Bio-Rad byly kvalitativně určeny některé rozpustné proteiny ve vzorku jablek. Program Experion vyhodnotil analýzu a výsledkem byly grafy a tabulky s hodnotami pro každý analyzovaný vzorek.

Obrázek 1: Ukázka programu na kvalitativní vyhodnocení obsahu bílkovin ve vzorku pro v pořadí pátý vzorek



Obrázek 2: Výsledky čipové elektroforézy všech odrůd jablek



Fialové šipky určují vždy spodní a horní mez detekce. Na čip byly pipetovány vzorky jablek připravené rozpuštěním pod dusíkem mraženého preparátu ve fosfátovém pufru.

Do jamky čipu označené jako L (sloupec L) byl nanesen standard dodaný firmou Bio-Rad. Do 1. a 2. jamky byl aplikován vzorek extraktu jablka Idared skladovaného v normální atmosféře, do 3. a 4. vzorek jablka Golden Delicious skladovaného v normální atmosféře, do 5. a 6. vzorek jablka Jonagored skladovaného v normální atmosféře, do 7. a 8. vzorek jablka Idared skladovaného v modifikované atmosféře, do 9. vzorek jablka Golden Delicious

skladovaného v modifikované atmosféře a nakonec do 10. jamky byl nanesen vzorek jablka Jonagored skladovaného v modifikované atmosféře.

Jelikož se předpokládalo, že se kvalitativně nebude distribuce hlavních bílkovinných frakcí lišit v jednotlivých odrůdách, byl vybrána jedena reprezentativní linie (vzorek 5), která byla vyhodnocena. Prioritou v určení bílkovin bylo nalezení důkazu přítomnosti enzymů, jmenovitě SOD, katalasy a PPO.

Byly porovnány molekulové hmotnosti jednotlivých enzymů (molekulová hmotnost jablečné SOD leží v rozmezí mezi 22 a 32,5 kDa v závislosti na typu kovového prvku, který je její součástí [33]; molekulová hmotnost katalasy izolované ze savčích buněk náleží do intervalu mezi 230 a 250 kDa [34]) s naměřenými hodnotami (Příloha 1). Z tohoto srovnání vyplynulo, že první černou šipkou vyznačený pík (Příloha 2) náleží SOD a druhý (Příloha 3) náleží katalase. Ze srovnání vyplývá, že mikrofluidní elektroforézou byl zjištěn vyšší obsah SOD než katalasy ve vzorku. V kapitole 4.4 však bylo zjištěno, že jablka obsahovala nejvíce enzymu katalasy. Tento rozdíl se dá vysvětlit tím, že katalasa má molekulovou hmotnost blízko horní meze detekce, proto se nepodařilo zachytit všechny enzym a výsledky jsou tudíž zkreslené. Také je možné, že v průběhu provedení mikročipové elektroforézy došlo k částečné degradaci (denaturaci) katalasy.

Enzym PPO se vůbec nepodařilo gelovou elektroforézou zachytit, jelikož jeho molekulová hmotnost je značně vysoká (cca 750 kDa pro enzym izolovaný z jablek [35]) a tudíž tato hodnota leží nad horní mezí detekce.

4.4 Stanovení enzymů

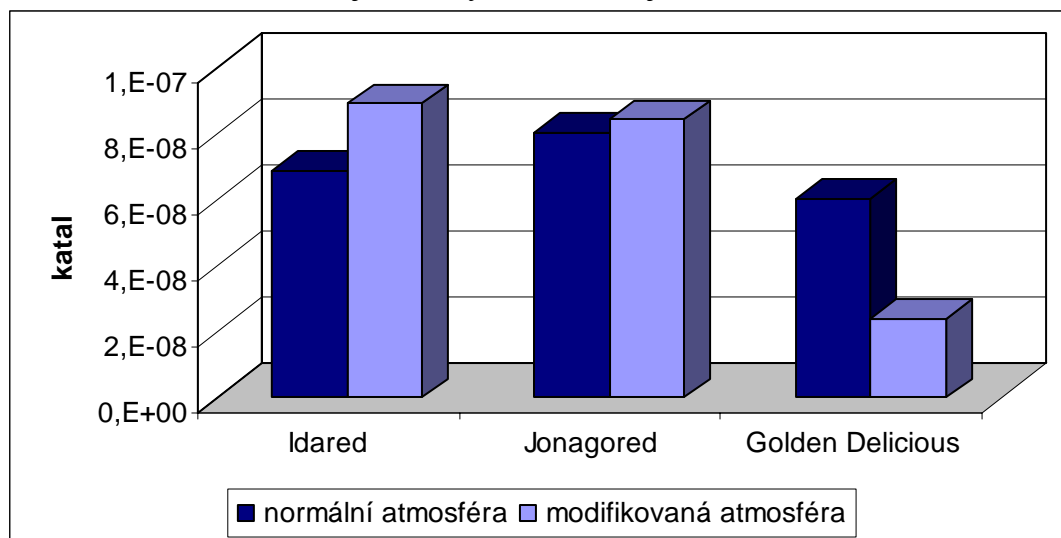
4.4.1 SOD

SOD byla stanovena pomocí kitu Ransod od firmy Randox. Jelikož byl zmiňovaný kit finančně nákladný, byla provedena pouze jedna analýza v každém vzorku. Proto nebylo možné vyhodnotit tyto výsledky statisticky. Všechny naměřené hodnoty byly zpracovány tak, jak je uvedeno v části 3.5.1 a přepočítány na aktivitu v mezinárodních jednotkách (množství přeměněného substrátu v μ molech za jednotku času v minutách) a v katalach (množství přeměněného substrátu v molech za jednotku času v sekundách) v gramu jedlého podílu jablka. Zjištěné hodnoty jsou uvedeny v Tabulka 7: Výsledky stanovení SOD v jednotlivých odrůdách jablek v gramu jedlého podílu.

Tabulka 7: Výsledky stanovení SOD v jednotlivých odrůdách jablek v gramu jedlého podílu

	normální atmosféra		modifikovaná atmosféra	
	U [μ mol/min]	katal [mol/s]	U [μ mol/min]	katal [mol/s]
Idared	4,130	$6,883 \cdot 10^{-8}$	5,346	$8,911 \cdot 10^{-8}$
Jonagored	4,817	$8,028 \cdot 10^{-8}$	5,054	$8,424 \cdot 10^{-8}$
Golden Delicious	3,629	$6,048 \cdot 10^{-8}$	1,437	$2,395 \cdot 10^{-8}$

Graf 9: Srovnání hodnot SOD v jednotlivých odrůdách jablek v katalach



Z grafu 9 vyplývá, že největší aktivita SOD byla zjištěna v odrůdě Idared skladované v modifikované atmosféře a nejmenší v jablku odrůdy Golden Delicious. Skladování v upravené atmosféře vychází obecně jako výhodnější pro uchování aktivity SOD, ovšem u odrůdy Golden Delicious se projevilo jako nepříznivé. Příčina tohoto odlišení se však může nacházet v nevhodném termínu sklizně tohoto konkrétního plodu.

Při porovnání aktivit v jablkách skladovaných v normální atmosféře vychází jako nejlepší odrůda Jonagored, následně Idared a nakonec Golden Delicious. Při porovnání v atmosféře modifikované se jeví nejlépe odrůda Idared, následně Jonagored a naposledy Golden Delicious. U prvních dvou odrůd nebyl při stanovení velký rozdíl mezi hodnotami aktivit při skladování v modifikované atmosféře, u odrůdy Golden Delicious nastal prudký pokles.

Pokud se bude vycházet z předpokladu, že skladování v modifikované atmosféře je pro zachování SOD výhodnější a že, při značném zjednodušení, aktivita enzymu klesá při dlouhodobém uchovávání ve všech odrůdách stejně rychle, lze sumarizovat, že v červených jablkách (v této práci representovány odrůdami Idared a Jonagored) je SOD více zastoupena než v jablkách zelených (v této práci representovány odrůdou Golden Delicious). Dále také lze uvažovat, že v normální atmosféře dochází k degradaci enzymu u jablek Idared rychleji než u jablek Jonagored. Otázkou zůstává, z jakých podmínek v plodu je SOD aktivována.

4.4.2 Katalasa

Druhým stanovovaným enzymem v jablkách byl enzym katalasa. Postup i výpočet korespondovaly s odstavci stejného názvu v kapitole 3.5.2. Měření bylo provedeno s daným vzorkem vždy třikrát. Průměrné výsledky jsou přehledně shrnuty v následujících tabulkách.

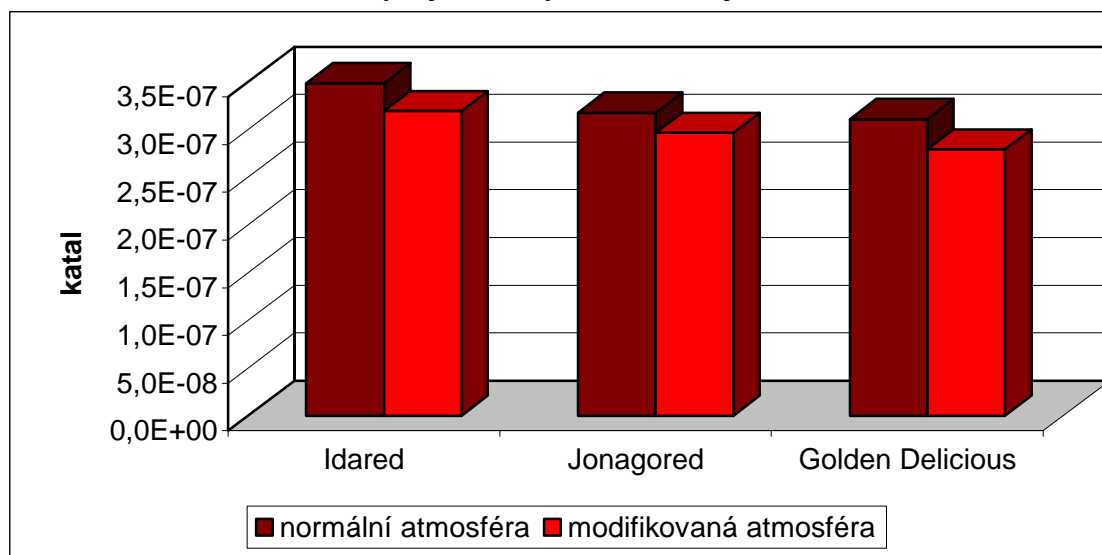
Tabulka 8: Průměrné výsledky stanovení katalasy v odrůdách skladovaných v normální atmosféře přepočtené na gram jedlého podílu

	průměr U [μmol/min]	průměr katal [mol/s]	směrodatná odchylka U	směrodatná odchylka katal
Idared	20,918	3,486.10 ⁻⁷	0,904	1,507.10 ⁻⁸
Jonagored	19,068	3,178.10 ⁻⁷	0,523	8,720.10 ⁻⁹
Golden Delicious	17,383	3,109.10 ⁻⁷	0,495	3,718.10 ⁻⁸

Tabulka 9: Průměrné výsledky stanovení katalasy v odrůdách skladovaných v modifikované atmosféře přepočtené na gram jedlého podílu

	průměr U [μmol/min]	průměr katal [mol/s]	směrodatná odchylka U	směrodatná odchylka katal
Idared	19,175	$3,196 \cdot 10^{-7}$	1,769	$2,948 \cdot 10^{-8}$
Jonagored	17,796	$2,966 \cdot 10^{-7}$	1,131	$1,885 \cdot 10^{-8}$
Golden Delicious	16,741	$2,790 \cdot 10^{-7}$	0,837	$1,395 \cdot 10^{-8}$

Graf 10: Srovnání hodnot katalasy v jednotlivých odrůdách jablek v katalach



Z výše uvedeného grafu je patrné, že aktivita katalasy v skladovaných jablkách je vyšší, pokud jsou skladovány v normální atmosféře. V modifikované je aktivita enzymu nižší. Z výsledku by bylo možné předpokládat, že jablka z normální atmosféry mají více aktivovány antioxidační obranné systémy.

Největší hodnoty byly naměřeny v odrůdě Idared, následně Jonagored a nejmenší v odrůdě Golden Delicious. Sestupná tendence aktivity enzymu v tomto pořadí byla naměřena jak v plodech z normální, tak v plodech z modifikované atmosféry. Mezi zmiňovanými odrůdami však nejsou tak znatelné rozdíly jako u enzymu SOD.

Pokud se bude předpokládat, že plody z normální atmosféry simulují situaci po utržení jablka, lze říci, že v červených odrůdách (v této práci zastoupeny odrůdami Idared a Jonagored) se nachází více enzymu katalasy než v odrůdách zelených (v této práci zastoupeny odrůdou Golden Delicious).

4.4.3 PPO

Dále byl také stanoven enzym PPO v odrůdových jablkách. Metoda nebyla z časových důvodů v daném typu biologického materiálu dostatečně ověřena, proto jsou naměřené výsledky považovány pouze za orientační.

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. Aktivita byla měřena třikrát, v následujících tabulkách jsou shrnuty průměrné hodnoty všech stanovení.

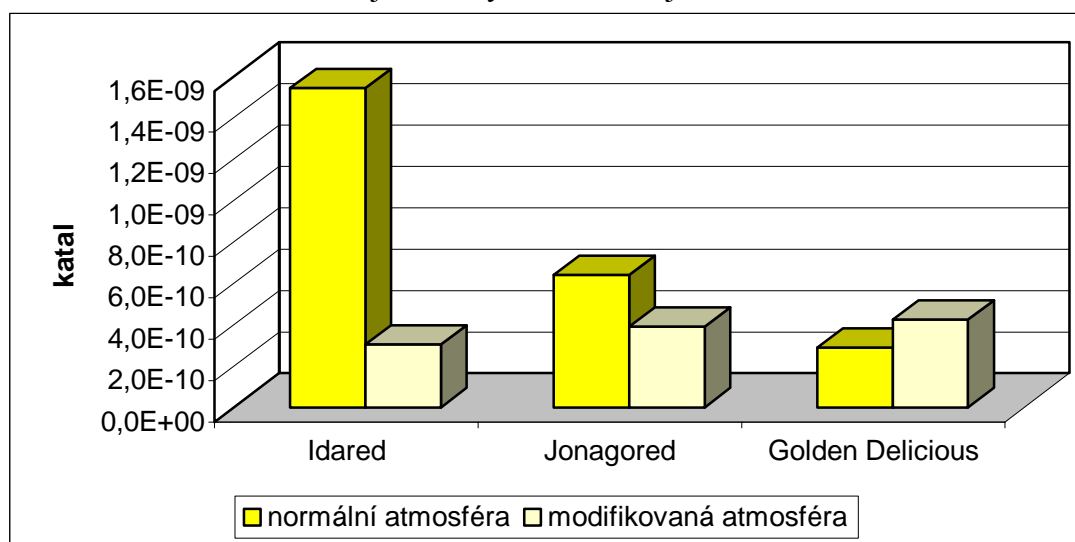
Tabulka 10: Průměrné výsledky stanovení PPO v odrůdách skladovaných v normální atmosféře přepočtené na gram jedlého podílu

	průměr U [μmol/min]	průměr katal [mol/s]	směrodatná odchylka U	směrodatná odchylka katal
Idared	0,093	$1,543 \cdot 10^{-9}$	$9,735 \cdot 10^{-3}$	$1,622 \cdot 10^{-10}$
Jonagored	0,038	$6,405 \cdot 10^{-10}$	$1,677 \cdot 10^{-3}$	$2,795 \cdot 10^{-11}$
Golden Delicious	0,017	$2,874 \cdot 10^{-10}$	$5,369 \cdot 10^{-3}$	$8,948 \cdot 10^{-11}$

Tabulka 11: Průměrné výsledky stanovení PPO v odrůdách skladovaných v modifikované atmosféře přepočtené na gram jedlého podílu

	průměr U [μmol/min]	průměr katal [mol/s]	směrodatná odchylka U	směrodatná odchylka katal
Idared	0,018	$3,031 \cdot 10^{-10}$	$7,412 \cdot 10^{-4}$	$1,235 \cdot 10^{-11}$
Jonagored	0,023	$3,898 \cdot 10^{-10}$	$4,198 \cdot 10^{-3}$	$6,997 \cdot 10^{-11}$
Golden Delicious	0,025	$4,234 \cdot 10^{-10}$	$7,055 \cdot 10^{-3}$	$1,176 \cdot 10^{-10}$

Graf 11: Srovnání hodnot PPO v jednotlivých odrůdách jablek v katalch



Ze srovnání je vidět výrazný obsah PPO v odrůdě Idared skladované v normální atmosféře proti ostatním odrůdám. Nejméně enzymu pak bylo stanoveno v odrůdě Golden Delicious skladované v normální atmosféře.

U odrůd Idared a Jonagored má regulovaná atmosféra spíše negativní vliv na množství PPO, u odrůdy Golden Delicious pozitivní. Důvodem může být zvýšená mobilizace některých obranných enzymových systémů v červených druzích jablek ve fázi postupné degradace plodů. Plody červených jablek analyzovaných v práci mají kratší dobu uchovatelnosti než jablka zelená.

Za předpokladu, že aktivita PPO naměřená v plodech z normální atmosféry simuluje podmínky při sklizni (vyjma plodů jablek Golden Delicious), lze uvažovat, že aktivita enzymu v modifikované atmosféře je nižší u odrůdy Idared než Jonagored. Dále také lze říci, že v červené odrůdě Idared je mnohem více enzymu PPO než v druhé červené odrůdě Jonagored, ovšem i tato odrůda má této složky poněkud více než zelená odrůda Golden Delicious. Tyto výsledky jsou dalším dokladem pro pravděpodobnou roli PPO jako

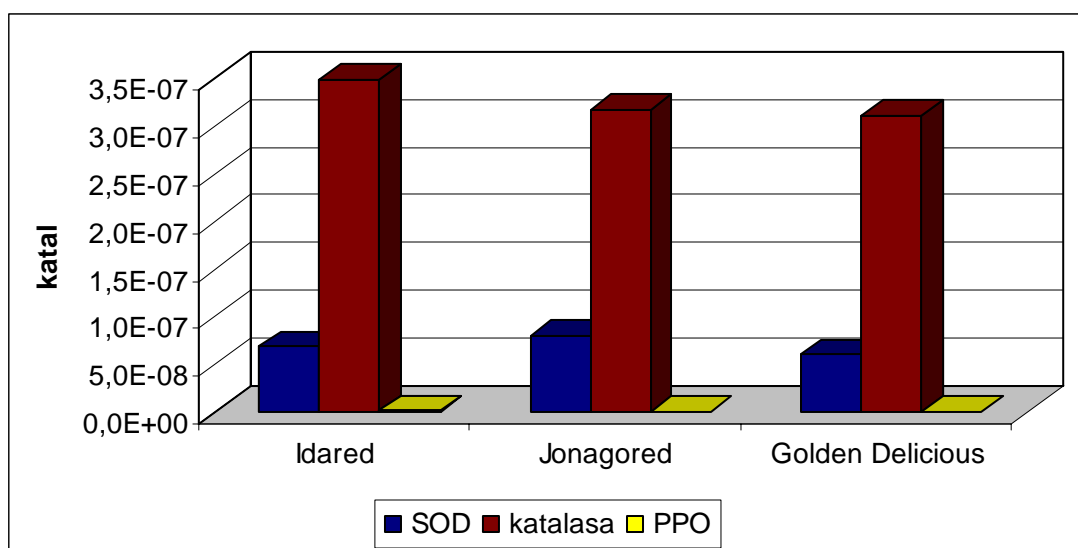
obrného systému chránícího dozrávající či lehce degradující plody před poškozením oxidací.

4.4.4 Vzájemné porovnání stanovených enzymů v jednotlivých odrůdách

V předložené práci byly všechny uvedené metody stanovení antioxidačních enzymů nově zavedeny a optimalizovány pro daný biologický materiál. V průběhu analýz byly získány hodnoty řádově srovnatelné s publikovanými údaji.

Z předchozích kapitol je zřejmé, že každá odrůda vykazuje vyšší aktivity u jiných enzymů. V následujících grafech jsou porovnány hodnoty aktivit všech jednotlivých stanovovaných enzymů v každé odrůdě.

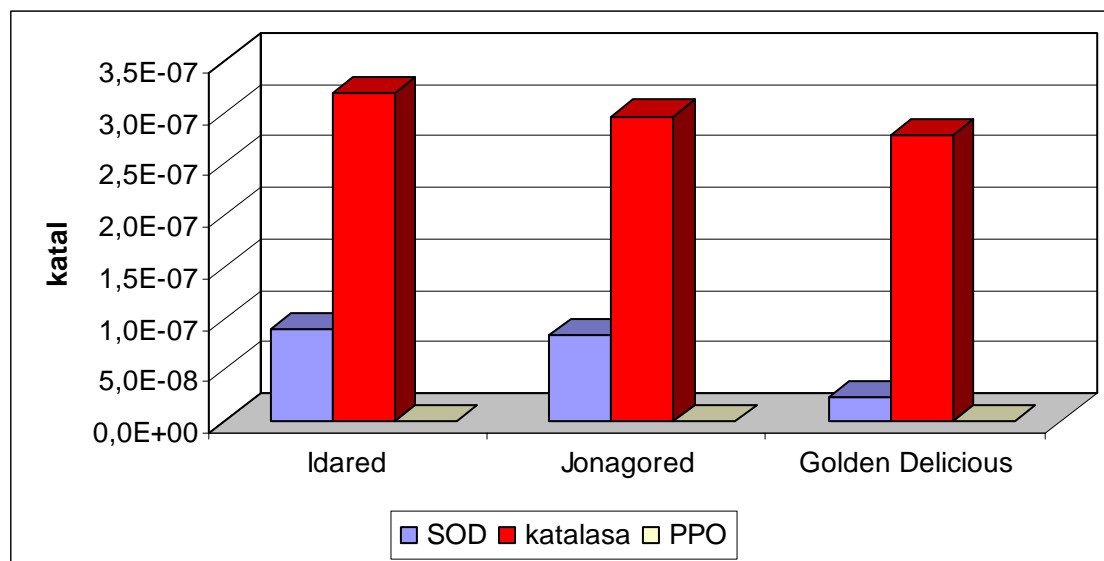
Graf 12: Srovnání aktivit enzymů v jednotlivých odrůdách skladovaných v normální atmosféře



Je patrné, že největší aktivitu má v jablkách ve všech odrůdách skladovaných v normální atmosféře enzym katalasa, jako druhý v pořadí je enzym SOD a nejmenší aktivitu má enzym PPO.

V odrůdě Idared z normální atmosféry je nejvíce katalasy a PPO ze všech odrůd. Plody Jonagored se vyznačují zase nejvyšší aktivitou enzymu SOD. Odrůda Golden Delicious skladovaná v normální atmosféře má nejmenší aktivitu všech enzymů ze všech stanovovaných odrůd. Tento výsledek může souviset s výše zmíněnou nižší dobou uchovatelnosti červených jablek a aktivací obranných systémů, zejména katalázy a PPO.

Graf 13: Srovnání aktivit enzymů v jednotlivých odrůdách skladovaných v modifikované atmosféře



Z grafu lze říci, že jablka Idared mají nejvyšší hodnotu aktivity katalasy i v modifikované atmosféře. Toto porovnání potvrzuje závěr, že v jablkách je nejvíce zastoupen enzym katalasa, pak SOD a nejméně enzym PPO.

Plody Idared skladované v upravené atmosféře vynikají největším obsahem katalasy a SOD ze všech stanovovaných odrůd z modifikované atmosféry, plody Golden Delicious mají zase největší obsah enzymu PPO ze stanovovaných odrůd skladovaných v regulované atmosféře.

Na hladiny antioxidačních enzymů v jablkách má kromě odrůdových vlastností a s tím spojené geneticky determinované délky udržitelnosti plodů zřejmě zásadní vliv i stupeň zralosti při sklizni. Významné jsou rovněž hladiny nízkomolekulárních antioxidantů, které pomáhají regenerovat enzymové antioxidanty. Srovnáním získaných výsledků se červená odrůda Idared jeví jako nejbohatší na všechny typy antioxidantů, což může znamenat nejvyšší stupeň zralosti a stejně tak nejvyšší tupeň mobilizace obranných systémů před postupující destrukcí plodů; tomuto by odpovídaly obecně nižší hodnoty převážné většiny antioxidantů naměřené u plodů skladovaných v ochranné atmosféře.

4.4.5 Stanovení SOD, katalasy a PPO v čerstvé šťávě

Bylo zkoušeno rovněž stanovení enzymů z čerstvě vymačkané šťávy. Bohužel byly enzymy velmi rychle oxidovány vzdušným kyslíkem, takže ani při rychlé práci nebylo možné věrohodně určit aktivity jednotlivých enzymů.

Dalším problémem při takovémto postupu byla synchronizace času měření. Nejenže každá z analýz jednotlivých enzymů má jiný postup a jiný časový interval měření, ale navíc nelze říci, že rychlost zpracování biologického materiálu byla stejná při všech stanoveních.

Zpracování tkání v tekutém dusíku je tedy nezbytné pro stanovení aktivity enzymů v jablečných vzorcích.

4.5 Umělé zaplísnění jablek

Uměle infikovaná jablka byla uchována po dobu čtyř týdnů v chladu při 4-10°C. Po stanovené době byla sledována a vizuálně zhodnocena úspěšnost zaplísnění.

Na všech odrůdách a obou typech atmosfér byla úspěšnost umělého zaplísnění stoprocentní. Mezi morfologií plísňe *Gleosporium album* izolované z jablka a morfologickými znaky čisté kultury nebyly zjištěny podstatné rozdíly ani po mikroskopické analýze, proto byly závěry sumarizovány pro oba pokusy.

Z Příloha 5, Příloha 6 a Příloha 7 je patrné, že největší kolonie plísňe *Gleosporium* narostla na odrůdě Jonagored skladované v normální atmosféře. Musí se však přihlídnout k faktu, že tento konkrétní plod byl napaden zmiňovanou plísní již mnohem dříve (dokonce z něj byla získána srovnávací kultura pro umělou infekci), a proto lze předpokládat, že masivní nárůst nebyl způsoben pouze umělým zaplísněním. Pokud se dále porovnají kolonie vždy na stejné odrůdě ale z jiné atmosféry, lze konstatovat, že se nijak výrazně neliší, i když jako poněkud méně poškozené se jeví vždy plody uchované v modifikované atmosféře.

Podobné výsledky byly získány i s plísní *Penicillium*, jak je patrné z příloh vyplývá i z Příloha 8, Příloha 9 a Příloha 10.

V souhrnu lze říci, že nárůst kolonií obou plísní byl velmi podobný a tudíž nelze určit, zda je některá z plísní dominující při zachování stejných podmínek, jako byly podmínky pokusu. Literární údaje však uvádějí jako hlavního původce skládkové choroby plíseň *Gleosporium*.

5 DISKUZE

V předložené práci byly sledovány hladiny vybraných enzymových a nízkomolekulárních antioxidantů u tří odrůd jablek dlouhodobě skladovaných při různě regulované atmosféře lišící se obsahem kyslíku. Současně byl u všech typů plodů sledován rozvoj vybraných skládkových infekcí po umělém infikování plísňemi rodu *Gleosporium* a *Penicillium*.

Ze získaných výsledků je patrné, že každá odrůda má poněkud odlišné hladiny antioxidačních parametrů a současně každý typ uchovávací atmosféry má jiný efekt na dlouhodobé změny jednotlivých sledovaných antioxidantů.

Při obecném shrnutí celkové antioxidační aktivity lze říci, že skladování (v jakékoliv atmosféře) mělo pozitivní vliv na nárůst této hodnoty. Ve všech odrůdách byla změřena nižší antioxidační aktivita ihned po sklizni než po 158 dnech skladování. Tento efekt byl pozorován rovněž u všech porovnávaných nízkomolekulárních antioxidantů a u většiny enzymových antioxidantů. Mohlo to být zapříčiněno buď předčasnou sklizní nebo postupným uvolňováním látek z buněčných struktur vlivem disimilačních procesů ve skladu. Na hladiny antioxidantů v jablkách má dále kromě odrůdových vlastností a s tím spojené geneticky determinované délky udržitelnosti plodů zřejmě zásadní vliv i stupeň zralosti při sklizni.

Odrůda Idared

Tato odrůda vyniká v řadě stanovení vysokými hladinami antioxidantů. Byla u ní zjištěna nejvyšší hodnota celkové antioxidační aktivity a všech nízkomolekulárních antioxidantů ihned po sklizni i po 158 dnech skladování v normální i modifikované atmosféře. Flavonoidy tvořily z celkových polyfenolů asi jednu polovinu při měření ihned po sklizni, tři čtvrtiny při měření plodů uskladněných v normální atmosféře a dvě třetiny při měření plodů z modifikované atmosféry. Z výsledků také vyplynulo, že pro nejvyšší obsah vitamínu C je vhodné skladovat tuto odrůdu v normální atmosféře, pro nejvyšší obsah celkových polyfenolů v modifikované atmosféře a pro nejvyšší obsah celkových flavonoidů v normální atmosféře.

Další část měření byla věnována proteinům. Bylo zjištěno, že u tohoto druhu bylo nalezeno nejvyšší množství rozpustných proteinů ze všech odrůd při uložení v modifikované atmosféře a naopak nejnižší množství při uložení v normální atmosféře. Tudíž pro zachování rozpustných bílkovin (hlavně enzymů) je výhodnější uložení plodů Idared v modifikované atmosféře. Rozdíl je způsoben pravděpodobně rychlou oxidací enzymů se vzdušným kyslíkem, na který je normální atmosféra dosti bohatá. Ostatní odrůdy si zachovaly vyšší obsah bílkovin v normální atmosféře, tudíž se lze domnívat, že odrůda Idared je méně odolná proti působení vzdušného kyslíku než ostatní dvě měřené. Tato odrůda se vyznačuje nejkratší dobou udržitelnosti plodů ze všech tří analyzovaných odrůd. Dále je třeba brát do úvahy faktor postupující proteolýzy u přezrálých a postupně degradujících plodů.

Byly také měřeny samostatné aktivity jednotlivých antioxidačních enzymů. V normální atmosféře byla u odrůdy Idared naměřena vyšší hodnota katalasy a PPO, v modifikované pak vyšší hodnota enzymu SOD. U této odrůdy byla naměřena nejvyšší hladina SOD v modifikované atmosféře, katalasy a PPO v normální atmosféře ze všech analyzovaných odrůd. Při srovnání hladin všech tří enzymů v obou atmosférách bylo zjištěno, že dominantní zastoupení vykazuje katalasa, dále jablka obsahovaly menší množství SOD a PPO byla zachycena v porovnání s oběma výše uvedenými pouze nepatrně. Tento závěr však nebyl potvrzen mikrofluidní elektroforézou. Nejvyšší hodnoty zde byly naměřeny u enzymu SOD.

Lze to vysvětlit tím, že se nepodařilo dostatečně zachytit katalasu, jelikož její molekulová hmotnost byla blízko horní meze detekce. PPO se nepodařilo stanovit vůbec ze stejného důvodu. Kvantitativní analýza mikročipovou elektroforézou je však spíše orientační, takže za směrodatné lze považovat spíše výsledky stanovení enzymové aktivity.

Odrůda Jonagored

Druhou v pořadí zkoumanou odrůdou byla odrůda Jonagored. V řadě měření se umístila při porovnání hladin antioxidantů na pomyslném druhém místě za odrůdou Idared. V této odrůdě byly zjištěny i podobné poměry aktivních látek při různém typu skladování.

To však určitě neplatilo při měření vitamínu C, jehož bylo zjištěno u jablek Jonagored nejnížší množství z analyzovaných odrůd, a to v normální i v modifikované atmosféře. Obsah polyfenolů v modifikované i normální atmosféře byl poněkud nižší než u odrůdy Idared, v plodech ihned po sklizni byly tyto hladiny dokonce nejnížší ze všech analyzovaných odrůd. Nejnížší hladiny byla zjištěna u této odrůdy i při stanovení obsahu celkových flavonoidů měřených ihned po sklizni a v modifikované atmosféře, při uložení v normální atmosféře byla na druhém místě. Poměr celkových flavonoidů k polyfenolům byl různý v závislosti na typu skladování. Ihned po sklizni tvořily flavonoidy dvě třetiny, v normální atmosféře čtyři pětiny a v modifikované dvě třetiny z celkových polyfenolů, ve všech případech tedy poměrně vysoké zastoupení.

Jak již bylo zmíněno, větší obsah rozpustných proteinů si tato odrůda zachovala v normální atmosféře, dokonce nejvyšší hladinu ze všech odrůd. V normální atmosféře byla naměřena vyšší hodnota katalasy a PPO, v modifikované zase vyšší hodnota SOD (prvenství mezi všemi zaujímal v obsahu SOD v normální atmosféře). Vzájemné poměrové zastoupení všech tří enzymů bylo zachováno stejně jako u odrůdy Idared.

Odrůda Golden Delicious

Odrůda Golden Delicious se vyznačovala celkově nejnížšími hladinami většiny analyzovaných antioxidantů, a to v obou typech atmosféry. Pouze obsahem vitamínu C se umístila na druhém místě v obou atmosférách, přičemž v modifikované byl zaznamenán prudký nárůst oproti normální. Při měření ihned po sklizni byl poměrně vysoký i obsah celkových polyfenolů, v průběhu skladování však došlo u červených odrůd k vyššímu stupni vzniku polyfenolických látek či uvolnění z rostlinných tkání. Ovšem stále platilo, že v průběhu skladování dochází k nárůstu obsahu vzhledem k původní hodnotě při sklizni (větší byl naměřen při uložení v modifikované atmosféře). Celkové flavonoidy byly zjištěny nejvyšší při skladování v modifikované atmosféře (druhá nejvyšší hodnota), dále pak v normální (nejnížší hodnota) a nejméně ihned po sklizni (druhá nejvyšší hodnota ze všech odrůd). Poměr flavonoidů k polyfenolům byl ihned po sklizni 1:2, v normální atmosféře 3:4 a v modifikované 4:5.

Obsah celkových proteinů byl u této odrůdy poměrně nízký, rovněž aktivita SOD a katalasy byla nejmenší ze všech odrůd v obou atmosférách, u PPO byl však naměřen v modifikované atmosféře obsah největší.

Zaplísňení jablek

Dalším pokusem bylo stanovení vlivu skladovací atmosféry na rozvoj kolonií určitých druhů plísní. Při porovnání narostlých kolonií za 4 týdny po infikování bylo zřejmé, že se od sebe

sice nijak výrazně neliší, ale přece jen vizuálně lepší charakteristiky vykazují plody uchované v modifikované atmosféře s redukovanou koncentrací kyslíku.

Celkově lze uzavřít, že pro komplexní popis vlivu typu skladovací atmosféry na kvalitu plodů má zřejmě zásadní vliv hodnota celkové antioxidační aktivity, která v sobě zahrnuje celkový efekt všech typů antioxidantů ve vzájemných interakcích. Podle hodnot TAS je pro zachování antioxidačních charakteristik a tedy i biologické kvality výhodnější uložení plodů všech odrůd do modifikované atmosféry. Tomu odpovídá i hodnota většiny nízkomolekulárních antioxidantů, které pomáhají regenerovat enzymové antioxidanty. Srovnáním získaných výsledků se červená odrůda Idared jeví jako nejbohatší na všechny typy antioxidantů, což může znamenat nejvyšší stupeň zralosti, nejvyšší kvalitu plodů a stejně tak nejvyšší stupeň mobilizace obranných systémů před postupující destrukcí plodů. K objektivnímu posouzení by bylo třeba sledovat hladiny antioxidačních parametrů ještě po delší dobu a porovnat je s vizuální, senzorickou, mikrobiologickou a tím s celkovou spotřebitelskou kvalitou plodů.

6 ZÁVĚRY

V předložené práci byly sledovány hladiny vybraných enzymových a nízkomolekulárních antioxidantů u tří odrůd jablek běžně celoročně dostupných v ČR – dvou červených (Idared, Jonagored) a jedné zelené (Golden Delicious). Jablka byla dlouhodobě skladovaná při různě regulované atmosféře lišící se obsahem kyslíku. Současně byl u všech typů plodů sledován rozvoj vybraných skládkových infekcí po umělém infikování plísňemi rodu *Gleosporium* a *Penicillium*. Biologický materiál byl získán ve spolupráci s Ústavem posklizňové technologie AF MZLU v Lednici.

Hlavní závěry práce:

- Hladina celkové antioxidační aktivity byla nejvyšší u červené odrůdy Idared. Vlivem skladování po dobu 158 dní došlo k nárůstu hodnot TAS u všech analyzovaných odrůd, a to více v modifikované atmosféře.
- Poměr nízkomolekulárních antioxidantů – polyfenolů a flavonoidů se lišil v závislosti na dané odrůdě i na způsobu uskladnění, pro některé bylo výhodnější uložení v normální, pro jiné v modifikované atmosféře. Vždy však byl zaznamenán nárůst hodnot u uchovávaných jablek proti hodnotám měřeným ihned po sklizni.
- Dále byly v práci zavedeny a optimalizovány metody stanovení enzymů SOD, katalasy a PPO ve tkáních plodů jablek. Bylo vyzkoušeno více postupů zpracování biologického materiálu i stanovení enzymové aktivity, jako nejlepší bylo ověřeno okamžité zpracování plodů v tekutém dusíku s přidavkem detergentu.. Úspěšně byly ověřeny metody pro stanovení SOD a katalasy. U PPO byl sice nalezen vhodný postup měření, z časových důvodů se nepodařilo metodu optimalizovat pro jablečné tkáně a uvedené výsledky PPO jsou proto považovány za orientační.
- Pomocí výše stanovených metod byla měřena aktivita jednotlivých enzymů v závislosti na typu skladování. Nelze sice jednoznačně říci, zda je některá z atmosfér pro zachování vysoké hodnoty aktivit lepší; celkově se jako výhodnější pro udržení aktivity ve všech odrůdách jeví spíše modifikovaná atmosféra.. Z porovnání bylo zjištěno, že největší zastoupení v jablkách má katalasa, následně SOD a nejmenší PPO. Dále je z výsledků patrné, že katalasa a PPO působí spíše synergisticky a jsou aktivovány jako obranné systémy u zralých a degradujících plodů.
- Byla provedena orientační analýza kvalitativního zastoupení proteinů v jablkách pomocí mikrofluidní elektroforézy se zvláštním zaměřením na zjištění výše uvedených enzymů. Touto metodou byly určeny proteinové frakce odpovídající katalase a SOD.
- Umělé zaplísnění odrůdových jablek bylo provedeno u všech odrůd i u obou typů skladovací atmosféry. Poněkud vnímavější k infekci byly jablka uchovávaná v normální atmosféře, takže zvýšené hladiny většiny antioxidantů by svědčily spíše pro mobilizaci obranných systémů

Z uvedených měření a výsledků je zřejmé, že nezávisle na podmínkách skladování si jablka dokážou dlouhodobě uchovat vysoký obsah aktivních látek a patří oprávněně k nejvýznamnějším celoročně dostupným zdrojům antioxidantů v naší populaci. Odrůdy se sice mohou v zastoupení jednotlivých skupin antioxidantů poněkud lišit, avšak rozdíly při

zachování stejných podmínek jsou poměrně nízké a při množství průměrně konzumovaných jablek (3-4 kg měsíčně) nemají zásadní vliv na celkový pozitivní efekt jablek na naše zdraví.

7 POUŽITÉ ZDROJE

- [1] ZEIGER, E. Illusions of safety: antimutagens can be mutagens, and anticarcinogens can be carcinogens. *Mut. Research* 543, 2003. s. 191-194.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] McCALL, T., VALLANCE, P. *Nitric oxide takes centre-stage with newly defined roles*. *Trends Pharmacol. Sci.*, 13 (1), 1992. s. 1-6.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] ĎURAČKOVÁ, Z. *Volné radikály a antioxidanty v medicíně (I)*. Bratislava: Slovak Academic Press, 1998.
- [8] ROSYPAL, S. *Úvod do molekulární biologie II*. 2. vyd. Brno, 1997
- [9] PEČ, P.: *Laboratorní cvičení z biochemie*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2000
- [10] HALLIWELL, B. *How to characterize a biological antioxidant*: *Free Rad. Res. Comm.* 9, 1990. s. 1-32.
- [11] KLAUNING, J. E., XU, Y., ISENBERG, J. S. *The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis*: *Environ. Hlth Perspect.* 106, 1998. s. 289-295.
- [12] FUJIKI, H., et al. *Cancer inhibition by green tea*: *Mut. Research* 402, 1998. s. 307-310.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] KURODA, Y. Bio-antimutagenic activity of green tea catechins in cultured Chinese hamster V79 cells: *Mut. Research* 361, 1996. s. 179-186.
- [16] 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.
- [17] BLOCK, G. *A role for antioxidants in reducing cancer risk*: *Nutr. Rev.* 50, 1992.
- [18] POKORNY, J., YANISHLIEVA, N., GORDON, M. *Antioxidants in Food-Practical Applications*: Woodhead Publishing 380, 2001.
- [19] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*. 1. vyd. Tábor : Osis, 1999.
- [20] ODIN, A. P. *Antimutagenicity of the porphyrins and non-enzyme porphyrin-containing proteins*: *Mut. Research* 387, 1997. s. 55-68.
- [21] VOET, D., VOETOVA, J. G. *Biochemie*. 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, a. s., 1995.

- [22] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. upr. vyd. Praha : Akademie věd České republiky, 2002. 3 sv. (180, 135, 191 s.). ISBN 80-200-0600-1.
- [23] HAVLOVÁ, Pavla. *Hydrolytické a oxidoredukční enzymy ječného sladu (Studijní zpráva)*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1999. ISBN 80-7271-040-0.
- [24] 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.
- [25] 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..
- [26] KRUL, C., LUITEN-SCHUITE, A., TENFELDE, A., VAN OMMEN, B., VERHAGEN, H., HAVENAAR, R. *Antimutagenic activity of green tea and black tea extracts studied in a dynamic in vivo gastrointestinal model*. Mut. Research 474, 2001. s. 71-85.
- [27] RAKOVÁ, M. *Studium vybraných přirozených antioxidantů v potravinách*, 2003. FCH VUT Brno. Dizertační práce.
- [28] KOUDELKA, J. *Funkční potraviny* [online]. Státní zemědělská a potravinářská inspekce, c2002 [cit. 2008-02-13]. Dostupný z WWW: <<http://www.szpi.gov.cz/cze/article.asp?id=54262&cat=2183&ts=9ec6>>.
- [29] HELWIG, B. *Antioxidants and Exercise : Vitamin C* [online]. 2006 , [cit. 2008-02-13]. Dostupný z WWW: <<http://www.exrx.net/Nutrition/Antioxidants/VitaminC.html>>.
- [30] KYZLINK, Vladimír. *Teoretické základy konzervace potravin*. Praha : Nakladatelství technické literatury, n. p., 1988. 510 s.
- [31] BLAŽEK, Jan, et al. *Ovocnictví*. 1. vyd. Praha : Květ, 1998. 383 s. ISBN 80-85362-33-3.
- [32] HUI, Y. H. *Handbook of food science, technology, and engineering*: Taylor & Francis group, LLC, 2006. 4 sv. ISBN 0-8493-9847-9.
- [33] BŘEZINOVÁ BELCREDI, N., EHRENBERGEROVÁ, J., PRÝMA, J., HAVLOVÁ, P. *Stanovení aktivity enzymu superoxidodismutasy pomocí soupravy Ransod v rostlinném materiálu*. Chemické listy, 101 (6), 2007. s. 504-508.
- [34] PETROVA, V. J., RASHEVA, T. V., KUJUMDZIEVA, A. V. *Catalase enzyme in mitochondria of Saccharomyces cerevisiae*. EJB Electronic Journal of Biotechnology [online]. 2002 [cit. 2008-05-16]. Dostupný z WWW: <<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol5/issue1/full/6/>>. ISSN 0717-3458.
- [35] WEEMAES, C. A., et al. *Activity, Electrophoretic Characteristics and Heat Inactivation of Polyphenoloxidases from Apples, Avocados, Grapes, Pears and Plums*. In *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 1998. s. 44-49.
- [36] KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2006. ISBN 80-7080-586-2.
- [37] SIGMA-ALDRICH. *Catalase assay kit* [online]. [cit. 2008-05-16]. Dostupný z WWW: <<http://www.sigmaldrich.com/sigma/bulletin/cat100bul.pdf>>

- [38] STEPHANE, M., et al. *Unfolding and refolding of active apple polyphenol oxidase*. In *Phytochemistry*, 1998. s. 1213-1217.
- [39] MÁROVÁ, I., VRÁNOVÁ, D. *Praktikum z biotechnologie*. Brno: Ústav chemie potravin a biotechnologií, 2002. 85 s.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

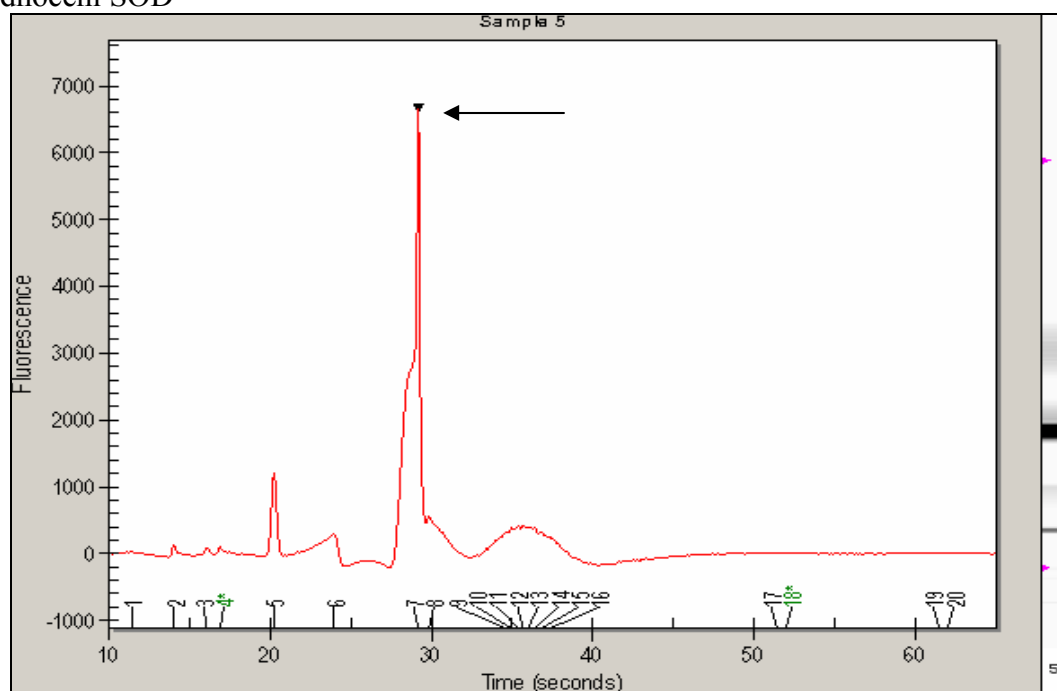
SOD	superoxiddismutasa
PPO	polyfenoloxidas
DOPA	dihydroxyfenylalanin
PVP	polyvinylpyroliden
ABTS	celková antioxidační aktivita
IDRA	odrůda Idared skladovaná v normální atmosféře
JGRA	odrůda Jonagored skladovaná v normální atmosféře
GDRA	odrůda Golden Delicious skladovaná v normální atmosféře
IDFAN	odrůda Idared skladovaná v modifikované atmosféře
JGFAN	odrůda Jonagored skladovaná v modifikované atmosféře
GDFAN	odrůda Golden Delicious skladovaná v modifikované atmosféře

9 PŘÍLOHY

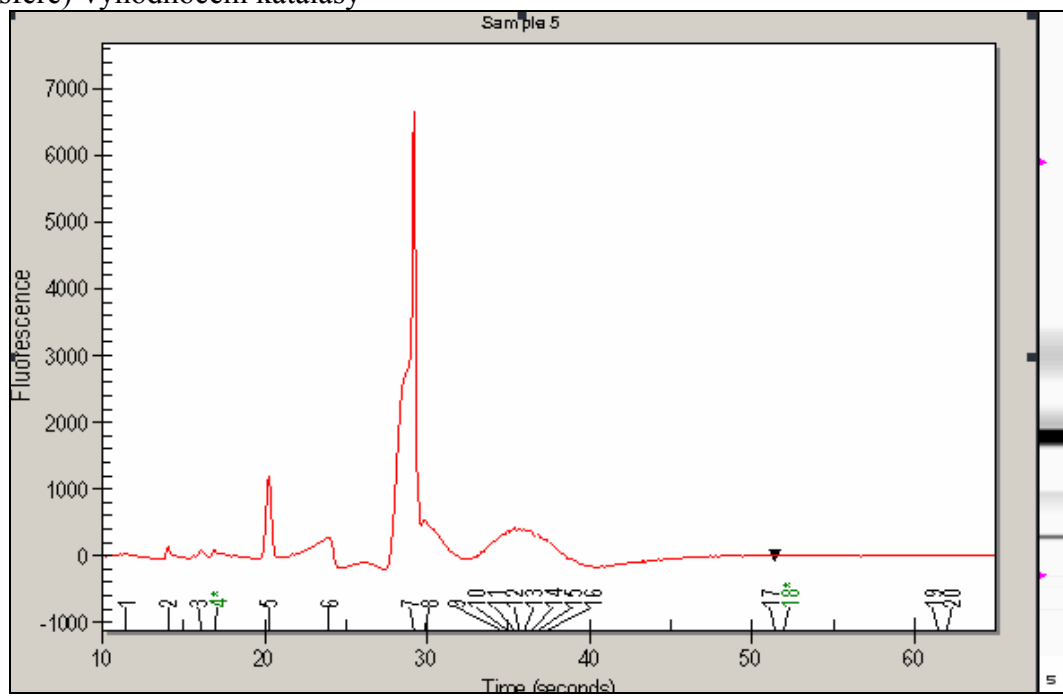
Příloha 1: Ukázka tabulky se zjištěnými molekulovými hmotnostmi jednotlivých proteinů ve vzorku číslo 5 (odrůda Jonagored skladovaná v normální atmosféře)

Peak State	Peak Number	Mig. Time (secs)	Mol. Wt. (kDa)	Concentration (ng/μl)	Calib. Conc. (ng/μl)	% Total	Comments	Observation
	1	11.45						
	2	14.04						
	3	16.09						
▲	4	16.90	1.20					Lower Marker
	5	20.24	5.69					System Peak
	6	23.96	11.80	75716.2		6.9		
	7	29.19	34.04	749743.9		68.5		
	8	29.84	37.53	102569.5		9.4		
	9	34.59	67.72	39496.1		3.6		
	10	34.96	70.30	17332.4		1.6		
	11	35.40	73.26	21838.6		2.0		
	12	35.67	75.14	18873.2		1.7		
	13	35.99	78.08	15132.7		1.4		
	14	36.42	82.00	18997.0		1.7		
	15	36.80	85.43	11687.4		1.1		
	16	37.34	90.33	22873.7		2.1		
	17	51.41	252.98	88.8		0.0		
▼	18	51.95	260.00					Upper Marker
	19	61.44						
	20	61.98						
	21	69.10						

Příloha 2: : Reprezentativní vzorek (odrůda Jonagored skladovaná v normální atmosféře)-vyhodnocení SOD



Příloha 3: Reprezentativní vzorek (odrůda Golden Delicious skladovaná v normální atmosféře)-vyhodnocení katalasy



Příloha 4: Přirozeně narostlá plíseň *Gloeosporium album*



Příloha 5: Plíseň *Gloeosporium album* na odrůdě Idared skladované v normální a modifikované atmosféře



Příloha 6: Plíseň *Gloeosporium album* na odrůdě Jonagored skladované v normální a v modifikované atmosféře



Příloha 7: Plíseň *Gloeosporium album* na odrůdě Golden Delicious z normální a modifikované atmosféry



Příloha 8: Plíseň rodu *Penicillium* na odrůdě Idared skladovaná v normální a modifikované atmosféře



Příloha 9: Plíseň rodu *Penicillium* na odrůdě Jonagored skladované v normální a modifikované atmosféře



Příloha 10: Plíseň rodu *Penicillium* na odrůdě Golden Delicious z normální a modifikované atmosféry

