



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**

**Enzymatická transformácia rastlinných extraktov ako  
potencionálny zdroj potravinových bioaditív**

**BAKALÁRSKA PRÁCA**

**Autor:** Zuzana Šmotková  
**Študijný program:** B1501 Experimentální biologie  
**Študijný odbor:** Experimentální biologie  
**Forma štúdia:** Prezenčné  
**Vedúci práce:** Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.  
**Termín odovzdania práce:** 2018

## **Bibliografická identifikácia**

Meno a priezvisko	Zuzana Šmotková
Názov práce	Enzymatická transformácia rastlinných extraktov ako potencionalny zdroj potravinových bioaditív
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Laboratoř rústových regulátorů
Vedúci práce	Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018
Abstrakt	Bakalárska práca bola zameraná na uskutočnenie 1-elektrónovej oxidácie rastlinných metabolitov pomocou chrenovej peroxidázy u vybraných druhov rastlín s cieľom zistiť, či by bolo možné použiť niektoré extrakty v potravinárskom priemysle ako bioaditívne látky. Potenciál enzymaticky transformovaných ale aj čistých extraktov bol overený prostredníctvom metódy ORAC slúžiacej na meranie antioxidačnej kapacity a metódy TPC, ktorou sa zisťoval celkový obsah fenolických látok. Bola zistená silná korelácia medzi týmito dvoma metódami. Zároveň bolo pri konzervačnom teste overované potencionalne využitie týchto extraktov ako konzervantov. Zistením zmeny absorbancie po prebehnutí 1-elektrónovej oxidácie bolo dokázané, že niektoré extrakty by mohli byť potencionalne použité ako prírodné potravinárske farbivá. Stanovením inhibície hnednutia jablka bolo zistené, že Drieň obyčajný by mohol byť pridávaný napríklad do čerstvých šalátov aby sa predišlo alebo aby sa zredukovalo ich enzymatické hnednutie.
Kľúčové slová	HRP, 1-elektrónová oxidácia, antioxidanty, konzervanty, farbivá
Počet strán	72
Počet príloh	0

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname	Zuzana Šmotková
Title of thesis	Enzymatic transformation of plant extracts as a potential source of food bioaditives
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
The year of presentation	2018
Abstract	The bachelor thesis was focused on performing single electron oxidation of plant metabolites by horseradish peroxidase in selected plant species in order to determine if some extracts could be used in the food industry as bioaditives. The potential of both enzymatically transformed and pure extracts was verified by the ORAC method, which is used for measuring antioxidant capacity and the TPC method, which determined the total content of phenolic substances. A strong correlation between these two methods was found. At the same time, the preservation test verified the potential use of these extracts as preservatives. By detecting a change in absorbance after single electron oxidation, it has been shown that some extracts could be potentially used as natural food dyes. By determining the inhibition of apple browning, it has been found that the Cornelian cherry ( <i>Cornus mas</i> ) could be for example added to fresh salads in order to prevent or reduce their enzymatic browning.
Keywords	HRP, single electron oxidation, antioxidants, preservatives, food colors
Number of pages	72
Number of appendices	0
Language	Slovak (English)

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne za použitia citovanej literatúry.

V Olomouci dňa : 23.4.2018

podpis :

Rada by som poďakovala Mgr. Jiřimu Grůzovi, Ph.D. za jeho vedenie, odborné rady, pripomienky a konzultácie, ktoré boli pre mňa pri spracovaní tejto bakalárskej práce veľkým prínosom. Ďalej by som chcela poďakovať Mgr. Lucii Slobodianovej a Ing. Michaele Šubrtovej za pomoc a čas, ktorý mi venovali v laboratóriu. Veľké poďakovanie patrí mojej rodine a môjmu priateľovi za psychickú podporu.

## Zoznam použitých skratiek a symbolov

*	označenie enzymaticky transformovaných extraktov (napr. Z23*)
A <sub>0</sub>	absorbancia čistých extraktov
AA	kyselina askorbová
AAPH	2,2'-Azobis (2-amidinopropan) dihydrochlorid
ABTS	2,2'-azino-di [3-ethylbenzthiazolin-6-sulfónová kyselina]
An•	radikál antioxidantu
A <sub>t</sub>	absorbancia enzymaticky transformovaných extraktov
AUC	plocha pod krivkou (Area Under the Curve)
BA	kyselina benzoová
BHA	butylhydroxyanizol
BHI	mozgovo- srdcová infúzia (Brain Heart Infusion)
BHT	butylhydroxytoluén
DHA	kyselina dehydroaskorbová
DW	hmotnosť suchej rastlinnej hmoty (Dry Weight)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EOs	esenciálne oleje
FRAP	železo redukujúca antioxidantná sila (Ferric Reducing Antioxidant Power)
GAE	ekvivalenty kyseliny gallovej (Gallic Acid Equivalents)
H•	vodíkový radikál
HAT	prenos atómu vodíku (Hydrogen Atom Transfer)
HRP	chrenová peroxidáza
In	iniciátor
K	kontrola (čistá inokulačná zmes pri konzervačnom teste)
MES	monohydrát 2-(N-morpholino)etánsulfónovej kyseliny
MS	Murashige and Skoog médium
NAUC	čistá plocha pod krivkou (Net Area Under the Curve)
NDEA	N-nitrózodietylamín
NDMA	N-nitrózodimetylamín
ORAC	kyslíková radikálová absorpčná kapacita

PG	propylgalát
PPO	polyfenoloxidáza
R•	radikál mastnej kyseliny
Rc	vznikajúci radikál
RH	molekula mastnej kyseliny
RH	vhodný substrát pre chrenovú peroxidázu
RO•	alkoxylový radikál
ROO•	peroxidový radikál
ROOH	hydroperoxid
ROS	voľné kyslíkové radikály (Reactive Oxygen Radicals)
SET	jedno-elektrónový prenos (Single Electron Transfer)
TAA	celková antioxidačná aktivita (Total Antioxidant activity)
TE	ekvivalenty Troloxu (Trolox Equivalents)
TMB	3,3', 5,5'-tetrametylbenzidín
TPC	celkový obsah fenolických látok (Total Phenolic Content)
UV	ultrafialové žiarenie
VIS	viditeľná oblasť spektra
X	označenie prázdnych jamiek pri konzervačnom teste

## Obsah

Zoznam použitých skratiek a symbolov .....	5
1 Úvod a ciele práce.....	9
2 Teoretická časť.....	10
2.1. Potravinové aditíva.....	10
2.1.1. Antioxidanty .....	10
2.1.2. Prírodné antioxidanty .....	11
2.1.3 Konzervanty .....	15
2.1.4 Prírodné konzervanty.....	15
2.1.5 Syntetické konzervanty .....	17
2.1.6 Farbivá.....	19
2.1.7 Prírodné farbivá.....	19
2.1.8 Syntetické farbivá.....	23
2.1.9 Význam prírodných aditív.....	24
2.2 Potravinové patogény.....	24
2.3 Biotransformácia .....	27
2.3.1 Chrenová peroxidáza (EC 1.11.1.7) .....	28
2.3.2 Jednoelektrónová oxidácia fenolov .....	30
2.4 Oxidácia potravín.....	32
2.5 Vybrané metódy merania antioxidačnej aktivity .....	34
2.5.1 TPC.....	35
2.5.2 ORAC .....	36
2.5.3 Hnednutie potravín a stanovenie inhibície enzymatického hnednutia jablka .....	37
3 Experimentálna časť .....	39
3.1 Materiál .....	39
3.1.1 Rastlinný materiál.....	39
3.1.2 Prístrojové vybavenie .....	40
3.1.3 Chemikálie.....	40
3.1.4 Zloženie roztokov .....	41
3.2. Metódy práce.....	41



3.2.1 Extrakcia rastlinného materiálu.....	41
3.2.2 Enzymatická transformácia pomocou chrenovej peroxidázy.....	42
3.2.3 Postup prípravy kultivačného média.....	42
3.2.4 Príprava inokulačnej zmesi.....	43
3.2.5 Aplikácia vzoriek na agar (Konzervačný test).....	43
3.2.6 Postup pri stanovení celkového obsahu fenolických látok (TPC).....	44
3.2.7 Postup pri meraní antioxidačnej kapacity (ORAC).....	45
3.2.8 Meranie absorbancie vzoriek vo viditeľnej oblasti svetla (VIS).....	46
3.2.9 Stanovenie inhibície enzymatického hnednutia jablka.....	46
3.3 Výsledky.....	47
3.3.1 Konzervačný test.....	47
3.3.2 Meranie absorbancie vzoriek vo viditeľnej oblasti svetla (VIS).....	49
3.3.3 Stanovenie celkového obsahu fenolických látok (TPC).....	51
3.3.4 Stanovenie celkovej antioxidačnej kapacity (ORAC).....	53
3.3.5 Korelácia metódy TPC a ORAC.....	56
3.3.6 Stanovenie inhibície enzymatického hnednutia jablka.....	57
3.4 Diskusia.....	59
3.5 Záver.....	62
Referencie.....	64
Zdroje obrázkov.....	70
Zoznam obrázkov.....	71
Zoznam tabuliek a grafov.....	72

# 1 Úvod a ciele práce

Ľudia už po stáročia používali rôzne prídavné (aditívne) látky prírodného pôvodu, ktoré pridávali do jedla primárne za účelom predĺženia trvanlivosti. Išlo napríklad o soľ (pri konzervácii mäsa), cukor (pri výrobe džemov) alebo oxid siričitý (pri výrobe vína). V súčasnosti sa rozšírilo použitie syntetických foriem konzervantov, farbív, antioxidantov, zvýrazňovačov chuti, alebo látok upravujúcich štruktúru potravín. Použitie farbív má za účel kompenzovať napríklad stratu farby spôsobenú tepelnou úpravou alebo nevhodným skladovaním potraviny. Antioxidanty zase zabraňujú pôsobeniu voľných kyslíkových radikálov, ktoré môžu v organizme spôsobovať poškodenie na bunkovej úrovni. V prípade použitia syntetických aditívnych látok vystupuje ako výhoda to, že sú viac stabilné ako prírodné. Syntetické aditívne látky zároveň nevnášajú do potraviny nežiadúcu chuť, farbu alebo vôňu ako tomu môže byť u prírodných látok. Na druhej strane prírodné aditívne látky môžu poskytovať naraz viac priaznivých vlastností ako napríklad mikrobiálnu aktivitu kombinovanú s antioxidačnou aktivitou. V potravinárskom priemysle zároveň vzrastá záujem o prírodné látky, ktoré by obmedzili hnednutie potravín spôsobené polyfenoloxidázou.

Cieľom mojej bakalárskej práce bolo najskôr extrahovať vybraný rastlinný materiál a následne ho použiť pri 1-elektrónovej oxidácii rastlinných metabolitov pomocou chrenovej peroxidázy. Potenciál enzymaticky transformovaných ale aj čistých extraktov bol následne overený prostredníctvom merania antioxidačnej aktivity pomocou metódy na zistenie celkového obsahu fenolických látok (TPC) a metódy kyslíkovej radikálovej absorpčnej kapacity (ORAC). Zároveň bol zisťovaný potencionálny konzervačný účinok týchto extraktov. Bola taktiež premeraná zmena absorbancie čistých a enzymaticky transformovaných extraktov vo viditeľnej oblasti svetla aby sa stanovilo, či došlo k zmene farby extraktu po prebehnutej enzymatickej transformácii. Na záver som použila čisté aj enzymaticky transformované extrakty pri stanovovaní inhibície enzymatického hnednutia jablka.

## 2 Teoretická časť

### 2.1. Potravinové aditíva

V širšom poňatí je aditívum látka, ktorá bola pridaná do potraviny. A to buď za účelom predĺženia skladovateľnosti alebo kvôli úprave chuti, farby, vône poprípade aby sa navýšila výživová hodnota daného produktu. Každé potravinové aditívum podlieha prísnyim podmienkam kontroly a teda musí byť dlhodobo testované aby sa zaručilo, že nepôsobí karcinogéne, toxicky alebo inak nepoškodzuje zdravie prípadne neohrozuje životné prostredie. Tieto kontroly zabezpečuje Európsky úrad pre bezpečnosť potravín a v Českej republike Ministerstvo zdravotníctví a Státní zdravotní ústav (SZÚ). Podľa pôvodu sú potravinové aditíva delené na prírodné, chemickým zložením zhodné s prírodnými a syntetické. Prídavné látky sú uvedené vo vyhláške Ministerstva zdravotníctví č. 52/2002 Sb., kde sú rozdelené do skupín ako: antioxidanty, baliace plyny, farbivá, emulgátory, konzervanty, modifikované škroby, regulátory kyslosti, nosiče, odpeňovače, sekvestrany a stabilizátory. Ďalej látky upravujúce povrch potravín, zlepšujúce múku, zvyrazňujúce chuť, vôňu, látky penotvorné, zvlhčujúce, želírujúce, kypriace a iné.

#### 2.1.1. Antioxidanty

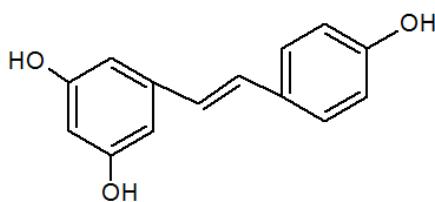
Ide o skupinu látok prírodného alebo syntetického pôvodu, ktorá zabraňuje pôsobeniu voľných kyslíkových radikálov známych ako ROS v organizme a zároveň predlžuje trvanlivosť potravín tým, že zabraňuje oxidácii komponentov potravín. ROS môžu v organizme spôsobovať poškodenie na úrovni buniek. Antioxidanty majú schopnosť reagovať s voľnými radikálmi, neutralizovať ich reaktívny potenciál a znížiť tak ich schopnosť poškodzovať DNA a ďalšie bunkové štruktúry (Minárik & Kimáková, 2016). Existujú endogénne a exogénne mechanizmy regulácie pôsobenia ROS na organizmus. Endogénne mechanizmy neutralizujú ROS a opravujú oxidatívne poškodenie. Exogénne mechanizmy obrany pochádzajú zo správnej stravy vo forme antioxidantov prevažne z ovocia a zeleniny. Použitie antioxidantov ako aditív je dnes v potravinárskom priemysle pomerne rozšírené. Antioxidanty môžeme rozdeliť do dvoch skupín. Prvá skupina je tvorená hlavne antioxidantmi pochádzajúcimi z prírodných zdrojov, ktoré zabraňujú zmene farby v mäsových výrobkoch a ovocí. Typickým príkladom je kyselina

L-askorbová. Medzi prírodné antioxidanty patria tiež napríklad vitamíny A, E a karotenoidy. Druhá skupina antioxidantov je tvorená látkami, ktoré zabraňujú oxidácii tukov a olejov a taktiež pôsobia pozitívne v prípade žltnutia potravín. Patria tu synteticky vyrábané látky ako butylhydroxytoluén (BHT, E 321) alebo butylhydroxyanizol (BHA, E 320).

### **2.1.2.Prírodné antioxidanty**

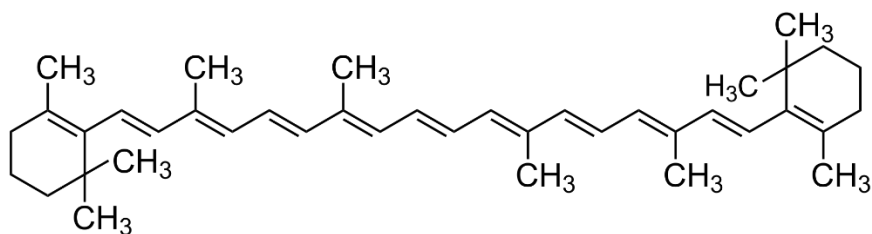
Prírodné antioxidanty sa nachádzajú v potravinách rastlinného i živočíšneho pôvodu. Antioxidanty rastlinného pôvodu však svojimi hodnotami vysoko prevyšujú tie živočíšne, ktoré sa v malých množstvách nachádzajú napríklad v mäsových výrobkoch alebo rybách. Medzi prírodné antioxidanty rastlinného pôvodu sa radia polyfenoly (fenolové kyseliny, flavonoidy, antokyany, lignany a stilbény), karotenoidy (xantofyly a karotény) a vitamíny (vitamín E a C). Karotenoidy a polyfenoly sú známe tým, že pôsobia protizápalovo, antibakteriálne, proti starnutiu ale zároveň boli popísané aj protirakovinové účinky (Zheng et al., 2016).

Polyfenoly sú sekundárne metabolity rastlín. Chránia rastliny proti ultrafialovému žiareniu (UV) a zároveň pomáhajú pri ochrane rastlín pred škodcami alebo patogénmi. V súčasnosti je známych viac ako 8000 polyfenolických zlúčenín vyskytujúcich sa u rôznych rastlinných druhov (Pandey & Rizvi, 2009). Polyfenoly predstavujú skupinu chemických látok, ktoré sú charakteristické prítomnosťou viac ako jednej fenolovej štruktúrnej jednotky. Polyfenoly sa delia na fenolové kyseliny (deriváty kyseliny benzoovej a škoricovej), flavonoidy (flavonoly, flavony, flavanony, katechíny (alebo flavanoly), antokyanidíny, dihydroflavonoly, chalkóny a izoflavonoidy), stilbény (resveratrol- Obrázok 1), lignany (matairesinol, sekoisolariciresinol). Vo veľkej miere sú zastúpené v ovocí ako hrozno, jablká, hrušky, čerešne a bobuľoviny a to až 200-300 mg polyfenolov na 100 g čerstvej hmoty. Pôsobia ako antioxidanty a hrajú významnú úlohu v liečbe kardiovaskulárnych a neurodegeneratívnych ochorení (Pandey & Rizvi, 2009). Ich prítomnosť v jedle môže byť sprevádzaná trpkosťou, špecifickou chuťou alebo farbou. Medzi polyfenolmi sa flavan-3-olom, flavanolom a tanínom dostalo väčšej pozornosti kvôli ich vysokej antimikrobiálnej aktivite. Zároveň sú tieto vybrané skupiny polyfenolov schopné potlačiť faktory mikrobiálnej virulencie ako napríklad inhibíciu tvorby biofilmu alebo neutralizáciu bakteriálnych toxínov a pôsobia synergicky s antibiotikami (Daglia, 2012).



**Obrázok 1** Štruktúra resveratrolu

Karotenoidy sú prírodné pigmenty, ktoré patria do skupiny tetraterpenoidov a z chemického hľadiska ide o oligoméry izoprénu. Delia sa do dvoch hlavných skupín a to na uhľovodíky nazývané karotény a na kyslíkaté zlúčeniny odvodené od karoténov, ktoré sa nazývajú xantofyly. Je známych viac ako 700 karotenoidov vyskytujúcich sa v prírode (Fernández-García et al., 2012). Najjednoduchším karoténom je acyklický polynasýtený uhľovodík lycopén, z ktorého sa prostredníctvom izomerácie a cyklizácie dá odvodiť postupne  $\gamma$ -karotén,  $\alpha$ -karotén a  $\beta$ -karotén (Obrázok 2).

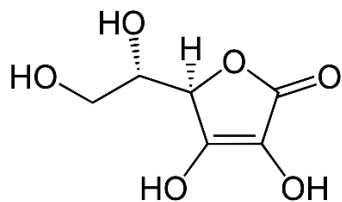


**Obrázok 2** Štruktúra  $\beta$ - karoténu

Karotenoidy zastávajú úlohu pri pochopení významu fotoprotekcie, zároveň sú súčasťou svetlozberných systémov pôsobiacich vo fotosyntéze. Deaktivujú ROS v organizme a teda sa radia medzi antioxidanty. Karotenoidy tvoria skupinu žltých, oranžových, červených a fialových pigmentov, ktoré sú prítomné v rastlinách. Tam sú viazané v chloroplastoch vo forme chromoproteínov. Okrem rastlín sa vyskytujú aj u mikroorganizmov a húb (Armstrong & Hearst, 1996). Pozitívne účinky na zdravie plynú z ich antioxidantnej kapacity, ktorá sa zvyšuje v dôsledku schopnosti konjugovaných dvojitéch väzieb premiestňovať nepárové elektróny. Táto vlastnosť je primárne zodpovedná za skvelú schopnosť karotenoidov fyzicky uhasiť singletový kyslík a obmedziť tak tvorbu ROS v tkanivách popríklad pletivách (Leatherman et al., 1999).

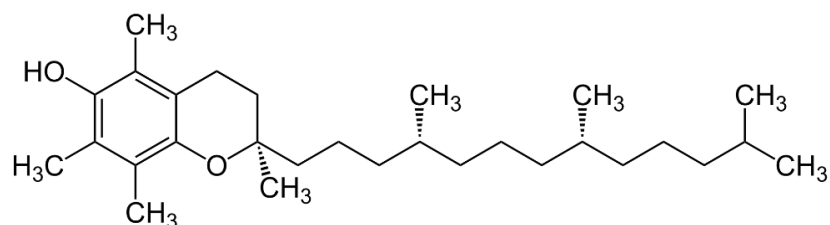
Vitamíny sú organické nebielkovinové zložky, ktoré neslúžia ako zdroj energie. Primárne ich organizmus potrebuje na správne fungovanie metabolizmu. Je dôležité, aby boli vitamíny prijímané z potravy, teda z vonkajších zdrojov, keďže si ich organizmus nedokáže vyrobiť. Výnimku čiastočne tvorí vitamín D, ktorého prekursor je produkovaný v koži a následne je prostredníctvom svetla premenený na aktívny vitamín D.

Vitamín C alebo inak kyselina L-askorbová (Obrázok 3) je vo vode rozpustný vitamín, ktorý v organizme nemôže byť skladovaný do zásoby. Primárne sa vyskytuje v ovocí a zelenine. Vitamín C je považovaný za antioxidant vďaka svojim redukujúcim schopnostiam (vysoký redoxný potenciál), ktoré dokážu eliminovať ROS, ktoré vznikajú v organizme v dôsledku premeny potravy na energiu (Lobo et al., 2010). Kyselina askorbová (AA) je prevedená pomocou jednoelektrónovej oxidácie na prvý chemicky stály oxidačný produkt kyselinu dehydroaskorbovú (DHA) (Jung & Wells, 1998). Ku oxidácii kyseliny askorbovej na DHA dochádza pôsobením oxidoreduktáz, ktoré sa zaraďujú do kategórie antivitaminov C. Kyselina askorbová je zároveň oxidovaná prostredníctvom peroxidu vodíka či vzdušného kyslíka. Oxidácia AA na DHA je vratná reakcia, ktorá prebieha rôznymi druhmi mechanizmov. Ak prenosom jedného elektrónu vzniká, ako medziprodukt, radikál AA tak sa takýto typ oxidácie nazýva jednoelektrónová oxidácia. V prípade, že dochádza priamo k vzniku DHA tak ide o oxidáciu dvojelektrónovú. V enzýmovo aktívnych, najčastejšie mechanicky poškodených rastlinných pletivách (lúpanie, krájanie a pod.) je oxidácia katalyzovaná prostredníctvom askorbát oxidázy. Reakcia AA s vzdušným kyslíkom sa nazýva autooxidácia a spôsobuje väčšinu strát AA v potravinách pri ich spracovaní. Kyselina askorbová brzdí reťazovú autooxidačnú reakciu a účinne tak pôsobí ako antioxidant. Degradácia vitamínu C v silno kyslom prostredí sa považuje za jednu z hlavných príčin strát vitamínu C v konzervárenských výrobkoch. Dochádza ku dekarboxylácii AA a k vzniku oxidu uhličitého a furan-2-karbaldehydu (Velíšek & Hajšlová, 2009a).



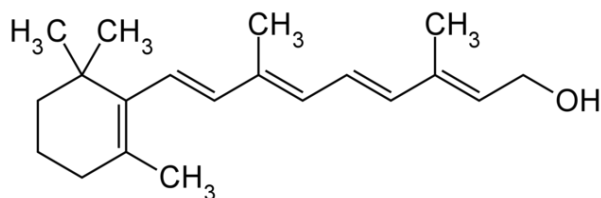
**Obrázok 3** Štruktúra kyseliny L-askorbovej

Je známych 8 základných štruktúrne príbuzných derivátov vitamínu E. Spoločným štruktúrnym základom týchto zlúčenín je tokol a tokotrienol, ktoré obsahujú chromanový cyklus s hydrofóbnym nasýteným alebo nenasýteným izoprenoidným reťazcom o 16 atómov uhlíka. Vitamín E je syntetizovaný výhradne rastlinami a niektorými cyanobaktériami (Seckbach, 2007). Najvýznamnejším je  $\alpha$ -tokoferol (Obrázok 4), ktorý sa nachádza v prírodnej ale aj v syntetickej forme a slúži ako prominentný antioxidant v lipidových zložkách organizmu ako napríklad v bunkových membránach alebo v prípade cholesterol-transportujúcich lipoproteínov. Redukuje a bráni oxidácii lipidov, ktorá by mohla viesť k ich degradácii prevažne v bunkových membránach (Traber & Atkinson, 2007).



**Obrázok 4** Štruktúra  $\alpha$ -tokoferolu

Vitamín A alebo retinol je v tuku rozpustný vitamín, ktorý sa vyskytuje v dvoch prírodných formách a to vitamín A<sub>1</sub> (retinol) a vitamín A<sub>2</sub> (3-dehydroretinol). Obe tieto formy a zároveň aj veľa provitamínov A vykazujú antioxidantnú aktivitu. Vitamín A pôsobí ako väzby narušujúci antioxidant tým, že sa kombinuje s peroxylovými radikálmi predtým, ako tieto radikály rozšíria peroxidáciu v lipidovej vrstve membrány a vytvoria hyperoxidy (Palace et al., 1999). Vitamín A sa ako retinol (Obrázok 5) vyskytuje v pečeni, ako vitamín A<sub>2</sub> v morských rybách a ako provitamín v zelenine a ovocí. Prírodné sa vyskytujúce izoméry provitamínov A a retinolu sú nestále no reagujú však s voľnými radikálmi a tým inhibujú nežiadúce radikálové reakcie (Velíšek & Hajšlová, 2009a).



**Obrázok 5** Štruktúra retinolu

### **2.1.3 Konzervanty**

Predlžovanie trvanlivosti potravín nie je záležitosťou súčasnosti. Prvé pokusy o konzervovanie potravín sú známe už spreď niekoľkých storočí. Využívali sa metódy ktorých podstatou boli čerstvé alebo sušené bylinky ako napríklad tymián, rozmarín, šalvia, kurkuma a iné. Pridávali sa do jedál prípadne nápojov na predĺženie ich trvanlivosti. Ďalším typom konzervovania využívaným už od minulosti je konzervovanie pomocou soli a cukru. V súčasnosti sa už konzervovanie potravín opiera o techniky, ktoré bránia mikrobiálnemu rastu ale aj znehodnoteniu potraviny po chemickej stránke (chuť, vôňa, vzhľad) prostredníctvom pridania prírodných alebo syntetických konzervantov. Konzervant je látka prírodného alebo syntetického pôvodu, ktorá je pridaná do jedla alebo liekov, na to, aby spomalila proces znehodnotenia od prírodného mikrobiálneho rastu až po nežiadúce chemické zmeny (Thakur & Nelson, 1998).

### **2.1.4 Prírodné konzervanty**

Do kategórie prírodných konzervantov sa zaraďujú látky ako cukor, soľ, alkohol, ocot a iné. Ide o tradičný druh potravinových konzervantov využívaných v priemysle ale aj v bežnej domácnosti. Cukor a soľ sú jedny z najdlhšie používaných konzervantov a zároveň veľmi efektívne znižujú rast baktérií v jedle. Postupy ako mrazenie, údenie, varenie alebo nasolovanie sú tiež považované za prírodné (Farkas, 2007).

Účinnosť soli ako dobrého konzervantu plynie z toho, že redukuje aktivitu vody v potravine. Aktivitou vody sa rozumie množstvo nespárovaných molekúl vody, ktoré sú dostupné pre potencionálny mikrobiálny rast a chemické reakcie. Schopnosť soli znížiť aktivitu vody je spôsobená sodnými a chloridovými iónmi, ktoré interagujú s molekulami vody (Fennema, 1996). Pridaním soli do potraviny sa vyvolá tzv. osmotický šok u mikroorganizmov a dochádza tak ku strate vody a následne ku ich smrti prípadne spomalenému rastu. U niektorých mikroorganizmov môže soľ dokonca ovplyvniť rozpustnosť kyslíka, reakcie s bunkovými enzýmami či donútiť bunku k tomu, aby použila svoju energiu na to, aby vylúčila sodné ióny z bunky. To všetko môže zredukovať stupeň mikrobiálneho rastu (Davidson, 2001).

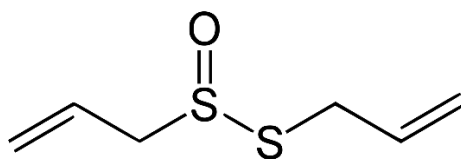
Potraviny v prípade kontaktu so vzduchom oxidujú a začínajú sa kaziť. Ale napríklad oleje vedia spomaliť proces oxidácie a tak zároveň zabraňujú prístupu nežiadúcich



mikroorganizmov. Počas procesu oxidácie sa v olejoch však stráca kyselina olejová a kyselina linolenová tak ako aj vitamín E (Velíšek & Hajšlová, 2009a). Teplota, vzduch, svetlo či organická katalýza ako vonkajšie faktory však urýchľujú proces oxidácie. Preto napríklad na konzerváciu potravín olejom je vhodný olivový olej, ktorý je bohatý na tokoferoly a polyfenoly pôsobiace ako prírodné antioxidanty.

Esenciálne oleje (EOs) sú extrahované z kvetov, vetiev, koreňov poprípade kôry rastlín. Je známych viac ako 3000 druhov EOs (Gong et al., 2005). Esenciálne oleje niektorých korení majú antimikrobiálne, antivírusové, antimykotické, antioxidačné a mnohé ďalšie vlastnosti. Hlavnými zložkami zodpovednými za antibakteriálne vlastnosti EOs napríklad u tymiánu sú fenolické látky ako timol, karvakrol, luteolin a kyselina kávová. Esenciálne oleje pôsobia v rastlinách ako chemická ochrana proti škodcom, hubám a iným mikroorganizmom. Ďalšie významné EOs sú prítomné v rozmaríne, škorici, oregáne a tiež vykazujú antimikrobiálnu aktivitu. Obzvlášť proti Gram-negatívnemu rodu *Salmonella*, proti druhu *Escherichia coli* a proti Gram-pozitívnemu druhu *Listeria monocytogenes* (Gong et al., 2005).

Prírodné antimikrobiálne látky sa syntetizujú a akumulujú v rastlinách pletivách ako reakcia na vonkajší podnet (napadnutie vírusom, baktériou, plesňou, UV žiarenie, chlad, ošetrovanie fungicídmi prípadne herbicídmi). Zlúčeniny, ktoré sú produkované zdravou rastlinou a majú slúžiť len ako pasívna obrana proti prípadným škodlivým činiteľom, sa nazývajú fytoanticipíny (Velíšek & Hajšlová, 2009b). Fytoalexíny (fytoncidy) v rastline slúžia ako rastlinné antibiotiká respektíve pesticídy, ktoré pôsobia toxicky na prípadné patogény či živočíšnych škodcov (hmyz). Medzi fytoncidy sa zaraďuje napríklad allicín (Obrázok 6), ktorý je prítomný v cesnaku a má výraznú antimikrobiálnu aktivitu.

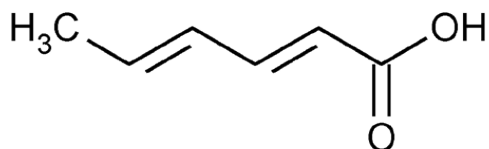


**Obrázok 6** Štruktúra allicínu

### 2.1.5 Syntetické konzervanty

V priebehu rokov sa pri použití syntetických konzervantov osvedčilo to, že sú najefektívnejšie pri použití u dlhodobo skladovaných potravín.

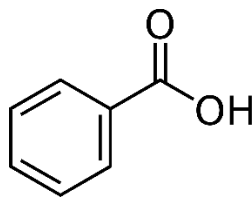
Kyselina sorbová (Obrázok 7) a jej soli (sorbáty) sú účinnými inhibítormi plesní (*Cephalosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Mucor* a iné), kvasiniek (*Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Candida* a iné) a niektorých druhov baktérií (*Acetobacter*, *Clostridium*, *Serratia*, *Salmonella* a iné) (Davidson et al., 2005). Záujem o antibakteriálne vlastnosti sorbátov v posledných rokoch stúpol z časti aj kvôli snahe nájsť alternatívy k dusitanom používaným pri spracovávaní mäsa. Široký záber pôsobenia sorbátu je zodpovedný za jeho efektívnosť v porovnaní s inými antimikrobiálnymi látkami. Inhibícia bakteriálneho rastu pôsobením sorbátu vedie k zmenám na bunkových membránach, k inhibícii transportných proteínov a enzýmov, k tvorbe protónového toku do bunky a k mnohým ďalším procesom (Sofos et al., 1986).



**Obrázok 7** Štruktúra kyseliny sorbovej

Dusitan sodný je používaný pri spracovávaní mäsa. Bráni bakteriálnemu rastu a pri reakcii s myoglobínom obsiahnutým v mäse daný produkt získava „ideálnu“ naružovelú farbu. Počas varenia reagujú dusitany v mäse s produktmi degradácie aminokyselín a tvoria nitrozamíny, ktoré patria medzi karcinogénne látky (Jakszyn & González, 2006). Konkrétne ide o N- nitrózodimetylamín (NDMA) a N- nitrózodietylamín (NDEA), ktoré sú klasifikované ako pravdepodobne karcinogénne pre ľudí podľa Medzinárodnej Agentúry pre Výskum Rakoviny (IARC).

Kyselina benzoová (BA) patrí k najstarším a najviac rozšíreným chemickým konzervantom používaných v kozmetickom, farmaceutickom a potravinárskom priemysle. V prírode sa vyskytuje v brusniciach či čiernych ríbezliach. Nedisociovaná molekula BA je primárne zodpovedná za antimikrobiálnu aktivitu (Davidson et al., 2005).



**Obrázok 8** Štruktúra kyseliny benzoovej

Kyselina benzoová (Obrázok 8) je efektívna voči baktériám, hubám a plesniam nachádzajúcim sa v kyslom, poprípade neutrálnom médiu, no v prípade zásaditého prostredia stráca účinok. Vzrastajúce pH kultivačného média znižuje efektivitu pôsobenia BA na inhibíciu nežiadúceho mikrobiálneho rastu. Po tom ako sa BA dostane do styku s vyšším pH v bunke, dôjde k jej disociácii čoho výsledkom je vypustenie nabitých aniónov a protónov, ktoré nemôžu prechádzať cez membránu (Davidson et al., 2005). Výsledkom vyššie popísaného procesu je to, že BA difúziou prechádza do bunky až do doby, kedy je ustálená rovnováha v súlade s pH gradientom.

Oxid siričitý je používaný ako konzervant pretože pôsobí antimikrobiálne a má zároveň antioxidačné vlastnosti zabraňujúce procesu žltnutia v prípade tukov. Oxid siričitý vzniká prírodne pri procese výroby vína a piva, často je do vín pridávaný aj za účelom zastavenia fermentačného procesu vo fľaši. Ďalej je používaný ako chemická látka, ktorá napadá enzýmy, ktoré spôsobujú zmenu farby, dozrievanie a hnilobu, zvyčajne v ovocí po zbere (Wedzicha, 1984). Antioxidačná aktivita  $\text{SO}_2$  závisí od schopnosti siričitanového iónu pôsobiť ako dobré redukčné činidlo. Na druhú stranu, antimikrobiálna aktivita závisí od rozsiahlych reakcií so zložkami biologických systémov, hlavne však od schopnosti  $\text{SO}_2$  prechádzať mikrobiálnou membránou.

Butylhydroxyanizol (BHA) patrí medzi najčastejšie používané syntetické antioxidanty. Zabraňuje žltnutiu tukov obsahujúcich masťné kyseliny s kratším reťazcom ako napríklad kokosový tuk či palmojadrový tuk. Rovnako ako butylhydroxytoluén (BHT) sa používa v obalových materiáloch odkiaľ môže ľahko preniknúť do potraviny. Butylhydroxytoluén vykazuje synergický účinok spolu s BHA a zároveň je účinnejší antioxidant ako BHA po konečnom tepelnom spracovaní potraviny (Velíšek & Hajšlová, 2009b). Tak ako aj u iných antioxidantov, u BHA dochádza k degradácii na diméry, bifenyly a ich étery, primárna antioxidačná aktivita býva však zachovaná.

V období vážnych obáv z rezistencie baktérií na antibiotiká je dôležité kontrolovať používanie týchto látok v potravinárskom priemysle. Prípadné reziduá antimikrobiálnych látok vyskytujúcich sa v potravinách môžu viesť k rezistencii populácie voči antibiotikám (Davies, 2010).

### **2.1.6 Farbivá**

Potravinové farbivá sa vyznačujú tým, že patria tiež do skupiny potravinových aditív. V potravinách sa používajú kvôli niekoľkým dôvodom. Hrajú rolu v kompenzácii straty farby potraviny v dôsledku vystavenia svetlu, vzduchu, teplotným extrémom, vlhkosti a podmienkam skladovania (Velíšek & Hajšlová, 2009b). Používajú sa pri úprave prirodzených odchýlok farby potravín, pri zlepšení pôvodnej farby potraviny alebo pri zafarbení nedostatočne zafarbených potravín.

### **2.1.7 Prírodné farbivá**

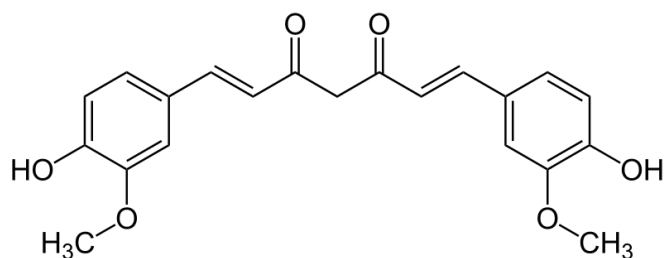
Prírodné farbivá sú farebné látky, ktoré syntetizujú a akumulujú či do prostredia vylučujú živé bunky. Ide napríklad o pigmenty húb, rias, lišajníkov, či iných mikroorganizmov, z ktorých sa získavajú v pôvodnom alebo štruktúrne pozmenenom stave. Karotenoidy, flavonoidy, porfyríny, betalaíny, chinolíny sú len jedny z mála pigmentov používaných v potravinárskom priemysle. Nadväzujúc na predchádzajúcu kapitolu, ktorá rozoberá antioxidačné vlastnosti karotenoidov, tak niektoré z nich sú zároveň používané ako potravinové farbivá. Semená stromu oreľánika farbiarskeho (*Bixa orellana*) (Obrázok 9) sú používané ako zdroj žltej až oranžovej farby.



**Obrázok 9** Strom orleánika farbiarskeho (*Bixa orellana*).

Prevzaté z : <https://www.nature-myview.com/blog/flora-bixa-orellana>.

Obsahujú diapokarotenoid bixín, ktorý je rozpustný v oleji a norbixín, ktorý je rozpustný vo vode. Stabilita farby je docielená voľnou väzbou medzi molekulami norbixínu a pridaného proteínu (Timberlake, 1989). Kurkumín je hlavným pigmentom získaným extrakciou z podzemkov kurkumy (*Curcuma longa*). V rozmedzí pH 1- 7 má žltú farbu, no vplyvom vyšších hodnôt pH stráca na stabilite a nadobúda oranžovejších odtieňov. Po chemickej stránke je kurkumín (Obrázok 10) diarylheptanoid patriaci do skupiny kurkuminoidov, čo sú prírodné fenoly zodpovedné za jeho farbu. Je rozpustný v alkohole, acetóne a kyseline octovej.



**Obrázok 10** Štruktúra kurkumínu (keto forma)

Limitáciou jeho použitia ako potravinového farbiva je pomerne slabá stabilita pri expozícii svetlu. Prítomnosť kovových iónov, najmä meďnatých, železných a cínových iónov spôsobuje zhnednutie kurkumy, zatiaľ čo v prítomnosti proteínu môže byť pigment stabilizovaný do istej miery tvorbou komplexu proteín- kurkumín (Timberlake, 1989). Krocín je vo vode rozpustný karotenoidný pigment, ktorý sa prirodzene nachádza v tyčinkách šafránu siateho (*Crocus*

*sativus*) a v semenách gardénie jazmínovitej (*Gardenia jasminoides*) (Obrázok 11). Chemicky je krocín diester vytvorený z disacharidovej gentiobiózy a dikarboxylovej kyseliny krocetínu.



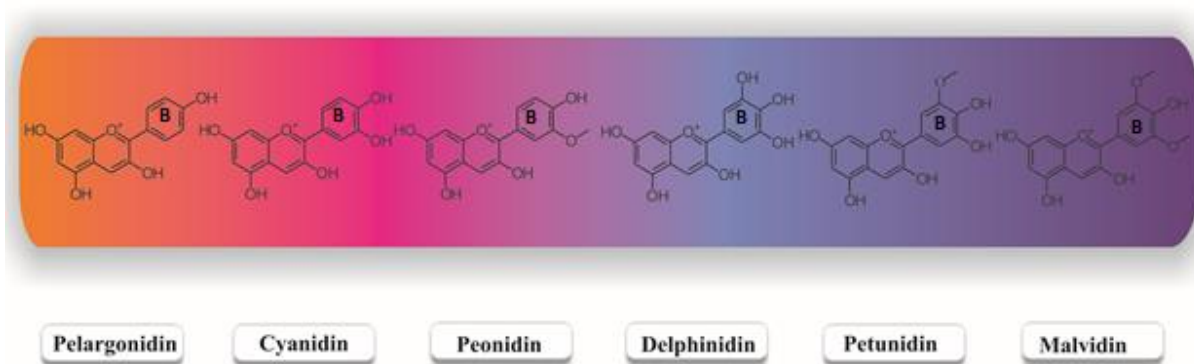
**Obrázok 11** Ker gardénie jazmínovitej (*Gardenia jasminoides*).

Prevzaté z <https://www.gardenia.net/plant/Gardenia-jasminoides-Buttons>.

Najdôležitejšie vlastnosti, ktoré ovplyvňujú výber krocínu ako farbiva v potravinárskych výrobkoch sa týkajú jeho konzervačných vlastností, kovových iónov a enzymovej aktivity (Timberlake, 1989). Nepriaznivý vplyv na stabilitu krocínu má prítomnosť ťažkých kovov ako meď či železo. Odtieň farby krocínu nie je ovplyvnený pH a je stály čo sa týka tepla a pôsobenia svetla. Tak ako aj u ostatných karotenoidov kyselina L-askorbová poskytuje ochranu pred ROS.

Antokyaníny reprezentujú jednu z najrozšírenejších skupín flavonoidov v rastlinách. Popri svojej schopnosti brániť oxidácii lipidov majú aj výrazné zafarbenie preto sú používané ako potravinárske farbivá (Timberlake, 1989). Z chemického hľadiska sú to diglykozidy antokyanidínov. Farebnosť všetkých antokyanínov je podmienená prítomnosťou systému konjugovaných dvojitých väzieb vo všetkých troch aromatických kruhoch. Jednotlivé antokyanidíny sa navzájom líšia tým, že majú rôzne substituenty v kruhu B (Kähkönen & Heinonen, 2003), čo je znázornené v Obrázku 12. Podľa tejto štruktúry disponujú buď červenou, oranžovou alebo modrou farbou. V rastlinách sa antokyanidíny vyskytujú v glykozylovanej forme ako antokyaníny. Antokyaníny v pokožke plodov červeného hrozna sú

hlavným zdrojom, z ktorého sa komerčne získavajú pigmenty používané ako potravinárske farbivá.



**Obrázok 12** Štruktúra antokyanidínov. Pelargonidín, cyanidín, peonidín, delphinidín, petunidín a malvidín. Na obrázku sú znázornené rôzne substituenty na kruhu B u jednotlivých antokyanidínov, ktoré sú zodpovedné za ich odlišné sfarbenie.

Prevzaté a upravené z: <https://www.intechopen.com/source/html/44143/media/image2.jpeg>

Chlorofyly sú jediné prírodné zelené farbivá vyskytujúce sa v prírode v neobmedzenom množstve (Velíšek & Hajšlová, 2009b). Základom štruktúry chlorofylu je 17,18- dihydroporfyrín. Z potravinárskeho hľadiska majú najväčší význam chlorofyl a, chlorofyl b a ich rozkladné produkty feofytíny, ktoré sa používajú ako potravinárske farbivá. Limitujúcim faktorom ich použitia je však to, že pri spracovávaní potravín dochádza k degradácii vplyvom tepla, svetla, poprípade prítomnosťou enzýmov (lipooxygenáza). K najväčším zmenám dochádza pri procese feofytinácie, kedy sa z chlorofylu pôsobením tepla v kyslom prostredí stáva feofytín. Pri skladovaní strukovín dochádza k degradácii chlorofylových farbív, v dôsledku pôsobenia lipooxygenázy, kedy následne vznikajú voľné radikály degradujúce chlorofyl (Velíšek & Hajšlová, 2009b).

Betalaíny sú rastlinné farbivá vyskytujúce sa u väčšiny čeľadí *Caryophyllales* a u niektorých vyšších húb ako napríklad *Amanita* a *Hygrocybe*. Všetky betalaíny majú rovnakú základnú štruktúru, ktorej chromofor s konjugovaným systémom dvojitéch väzieb je odvodený od dihydropyridínu (Velíšek & Hajšlová, 2009b). Rozoznávajú sa dve základné skupiny betalaínov: žlté betaxantíny a červeno-fialové betakyany. Ich farba je pripisovaná prítomnosti konjugovaných väzieb v štruktúre (Delgado-Vargas et al., 2000). Významné praktické použitie

majú hlavne pigmenty získané z červenej repy (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*), ktoré majú obchodný názov betaninová červeň poprípade betanín. Limitáciou týchto pigmentov je však fakt, že majú malú stabilitu na svetle a vplyvom teploty dochádza k ich degradácii. Betalaíny vykazujú antioxidačnú aktivitu a zároveň sa podieľajú na odstránení voľných radikálov z čoho plynú aj ich protirakovinové účinky (Gengatharan et al., 2015).

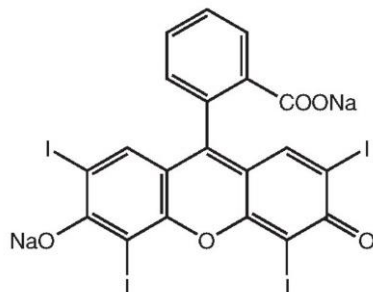
Kyselina karmínová sa získava zo sušených tiel samičiek hmyzu *Dactylopius coccus* Costa. Štruktúrne sa zaraďuje medzi antrachinóny a má schopnosť vytvárať cheláty s kovovými iónmi (hliníkom a vápnikom) nazývanými karmíny (Scotter, 2015). Kvalita karmínu je ovplyvňovaná teplotou a osvetlením počas jeho prípravy. Pri nízkom pH je kyselina karmínová oranžová, mení sa na červenú pri mierne kyslom a neutrálnom pH a nakoniec sa mení na fialovú v alkalickom roztoku.

### **2.1.8 Syntetické farbivá**

Syntetické farbivá sa vyznačujú intenzívnejšou farbou (napríklad erytrozín- Obrázok 13) v porovnaní s prírodnými farbivami. Majú stály odtieň farby a nevňášajú do farebnej potraviny chuť a vôňu. Preto sú vhodné pri použití v potravinárskom priemysle, kde aj nachádzajú široké uplatnenie. Podľa štruktúry sa delia na azofarbivá, pyrazolové farbivá, nitrofarbivá, xanthenové farbivá, antrachinónové farbivá, chinolínové farbivá a mnohé ďalšie (Velíšek & Hajšlová, 2009b). Väčšina farbív sa používa vo forme soli. Vykazujú dobrú stabilitu v suchých potravinách bez prístupu svetla.

Najviac zastúpenými farbivami používanými pri farbení potravín sú kyslé farbivá obsahujúce karboxylové skupiny, sulfonové skupiny a hydroxyskupiny. Ide napríklad o tartrazin, žltú SY, amarant, ponceau 4R alebo allura červenú. Zásadité farbivá naopak obsahujú jednu alebo viac voľných alebo substituovaných amino skupín ako napríklad v prípade farbiva hnedá FK. Špecifické vlastnosti farbív závisia na prítomných funkčných skupinách. Charakteristická je prítomnosť dvoch druhov funkčných skupín, auxochrómov a chromoforov. Auxochrómné skupiny sú zodpovedné za farbiace vlastnosti jednotlivých farbív zatiaľ čo na chromoforových skupinách závisí správanie sa farieb pri oxidačných a redukčných reakciách (Velíšek & Hajšlová, 2009b).





**Obrázok 13** Štruktúra syntetického potravinového farbiva erytrozínu

### 2.1.9 Význam prírodných aditív

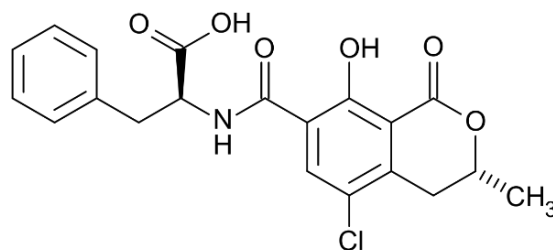
V súčasnej dobe sú prírodné potravinové aditíva v centre pozornosti potravinárskeho priemyslu ale dostávajú sa aj do povedomia zákazníkov. Aj keď použitie prírodných aditív nie je vždy tak výhodné ako použitie syntetických aditív čo sa týka stability (Timberlake, 1989) tak napriek tomu majú prírodné aditíva niekoľko výhod. Vo väčšine prípadov ide o zdravšiu alternatívu, ktorá sprostredkováva nové vlastnosti vnášané do potraviny. Navyše látka prírodného pôvodu môže poskytnúť naraz viac priaznivých vlastností ako napríklad antioxidačnú aktivitu spolu s mikrobiálnou aktivitou. Huby a riasy sú tiež zdroje prírodných potravinových aditív s veľkým potenciálom. Potravinársky priemysel vidí ich využitie v priamej aplikácii ako potravinové farbivo, konzervant alebo ako látka obohacujúca nutričné zloženie potraviny. Ďalej je tam veľký potenciál synergického účinku s prírodnými alebo syntetickými aditívami (Carocho et al., 2014).

Na druhej strane majú prírodné aditíva aj nežiadúce vlastnosti. V určitých prípadoch je napríklad množstvo prírodného aditíva potrebného na inhibíciu kontaminujúcich zložiek vyššie ako množstvo syntetického aditíva. Použitím prírodného aditíva sa môže do potraviny vnášať nežiadúca chuť, farba poprípade zápach čo v prípade syntetických aditív pozorované nie je (Velíšek & Hajšlová, 2009b).

## 2.2 Potravinové patogény

Potraviny či už nesprávnym uskladnením alebo nedostatočným použitím konzervantov napádajú mikroorganizmy a plesne.

Plesne môžu napadnúť ktorúkoľvek potravinu, ktorá obsahuje dostatok vody a živín (Strunecká & Patočka, 2012). Často dochádza k napadnutiu práve tých potravín, ktoré sú vystavené nadmernej teplote a vlhkosti. Predovšetkým ide o práve upečené pečivo a následne uskladnené v igelitových vreckách alebo syry a salámy. Nemožno opomenúť nápoje ako napríklad džúsy či ovocné šťavy, ktoré tiež ľahko podliehajú napadnutiu plesňami. Plesne rozkladajú organické molekuly z potraviny, ktorú napadli. Vylučujú tráviace enzýmy (lipázy, proteázy a iné), ktorými rozkladajú molekuly na jednoduchšie, pre nich vstrebateľné látky (Strunecká & Patočka, 2012). Plesne produkujú toxické sekundárne metabolity nazývané mykotoxíny. Sekundárny metabolizmus poskytuje dráhy pre odstránenie intermediátov, ktoré by sa inak akumulovali v primárnom metabolizme (Bu'Lock, 1961). Mykotoxíny môžu kontaminovať široké spektrum potravín tým, že svojimi hýfami prenikajú hlboko do potraviny a následne po zjedení môžu vyvolať toxické syndrómy alebo inak nazývané mykotoxikózy (Strunecká & Patočka, 2012). Po napadnutí potraviny plesňou je dôležité aby sa vyhodila vzhľadom k tomu, že odrezaním napadnutej časti, umytím, varom či mrazom nedochádza k odstráneniu mykotoxínov, ktoré sú už v potravine rozšírené. V súčasnej dobe je známych viac ako 400 druhov mykotoxínov, z ktorých niektoré sú karcinogénne alebo toxické pre ľudí a zvieratá (Bosco & Molle, 2012). K najvýznamnejším mykotoxínom patria aflatoxíny (predovšetkým aflatoxín B1), ochratoxíny (ochratoxín A- Obrázok 14)), fumonisíny (fumonisín B1), zeralenón a patulín. Aflatoxíny sú sekundárne metabolity produkované plesňami *Aspergillus parasiticus* a *Aspergillus flavus*. Štruktúrne ide o deriváty difurokumarínov, ktoré fluoreskujú pod ultrafialovým svetlom (Bosco & Molle, 2012). Sú vysoko toxické a karcinogénne. Aflatoxíny zároveň v prírode napadajú niektoré hospodárske plodiny ako kukuricu, arašidy, semená bavlníka alebo iné obilniny. Medzinárodná Agentúra pre Výskum Rakoviny (IARC) zaradila tento mykotoxín do kategórie I. teda je to preukázaný karcinogén pre človeka. Ochratoxíny sú produkované napríklad plesňami *Aspergillus ochraceus* a *Penicillium nordicum*. Boli u nich preukázané nefrotoxické, neurotoxické, embryotoxické, imunotoxické a mnohé ďalšie efekty (Bosco & Molle, 2012). Tento mykotoxín sa nachádza v plodinách ako kukurica, ryža, pšenica, ovos a iné, ktoré boli napadnuté plesňami.



**Obrázok 14** Štruktúra ochratoxínu A

Patulín je ďalším z mykotoxínov produkovaným plesňami. Konkrétne ide napríklad o *Aspergillus clavatus*, *Penicillium carneum*, *Penicillium expansum*, *Paecylomyces saturatus* a *Byssochlamys nivea*. Patulín spôsobuje neurotoxicitu, imunotoxicitu a zároveň pôsobí mutagénne ako dôsledok dlhodobej konzumácie kontaminovaného jedla alebo nápojov (Bosco & Molle, 2012). Patulín-produkujúce kmene plesní boli izolované z rôzneho ovocia a zeleniny, z pasterizovanej ale aj nepasterizovanej. Jablká a jablčné produkty sú však dominantné potraviny, u ktorých dochádza k tvorbe plesní produkujúcich patulín. Fumonisin je mykotoxín produkovaný hubami *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium nygamai* a *Aspergillus niger* (Bosco & Molle, 2012). Napadá prevažne kukuricu a produkty z nej vyrábané. Vplýva na bunkový rast, diferenciáciu, reguláciu apoptózy a zároveň pôsobí karcinogénne. Zearalenón je mykotoxín produkovaný niektorými druhmi rodu *Fusarium* a *Gibberella*. Bežne sa nachádza v kukurici. Na kontamináciu zearalenonómom je tiež náchylný jačmeň, ovos, pšenica, ryža, čakanka a sójové bôby. Nebezpečenstvo zearalenónu spočíva v jeho estrogénnej aktivite (Bosco & Molle, 2012). Väčšina mykotoxínov je pomerne stála pri konvenčne používanej teplote spracovania v potravinárskom priemysle (80–121 °C). Vo všeobecnosti počas varenia v domácich podmienkach dochádza k značnej redukcii mykotoxínov avšak nie k ich úplnému zničeniu. Pri teplote 150 °C dochádza už k výraznej redukcii koncentrácie mykotoxínov v potravine.

Ďalšími pôvodcami, ktoré spôsobujú intoxikácie jedlom sú baktérie. Pri primeranej teplote, pH, správnej koncentrácii kyslíka sa množia veľmi rýchlo. Pri bakteriálnych intoxikáciách existujú štyri hlavné činitele, ktoré sú zodpovedné za choroby: *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* a *Campylobacter jejuni*. Avšak existujú aj baktérie ako *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulium* a *Bacillus cereus*, ktoré sa spájajú s výskytom otráv jedlom. Baktérie rodu *Campylobacter* vyvolávajú akútne črevné infekcie u ľudí

tzv. kampylobakteriôzy a potraty u domácich zvierat. *Campylobacter jejuni* sa vyskytuje hlavne u hydiny a *Campylobacter coli* u ošípaných (Klement et al., 2011). Z týchto zdrojov sa nakazí najčastejšie človek. Infekcia nastáva požitím infikovanej potravy, kravským mliekom alebo vodou, ale aj kontaktom s nakazenými zvieratami. Baktérie *Escherchia coli* sa bežne vyskytujú v črevách človeka aj teplokrvných zvierat. Väčšina kmeňov *Escherchia coli* je nepatogénnych, niektoré sa pozitívne podieľa na tráviacom procese a na tvorbe vitamínov napr. B<sub>12</sub>, K<sub>1</sub>, a K<sub>2</sub> (Klement et al., 2011). Niektoré kmene sa dokonca používajú ako probiotiká, napríklad pri tráviacich ťažkostiach. Len malá časť kmeňov *Escherchia coli* vyvoláva hnačkové ochorenia. Prenikajú do čreva s potravinami alebo vodou, teda alimentárnou cestou. Rezervoárom baktérií *Escherchia coli* sú najmä prežúvavce chované ako hospodárske zvieratá a rovnako tak aj voľne žijúce jedince. K rizikovým potravinám teda patrí najmä surové hovädzie mäso a mlieko alebo pokrmy z nich vyrobené a mäso nedostatočne tepelne opracované. K menej často spomínaným zdrojom patrí aj surové ovocie a zelenina, ktoré sa dostávajú do kontaktu s *Escherchia coli* prostredníctvom hnojenia rastlín organickými hnojivami. *Bacillus cereus* sa bežne vyskytuje v pôde, v prachu a vo vzduchu. Ide o baktériu, ktorá tvorí spóry. Vlastné baktérie nie sú príliš patogénne. Produkujú však rad toxínov, z ktorých najvýznamnejšie sú dva enterotoxíny tzv. emetický a hnačkový toxín (Klement et al., 2011). Zdrojom šírenia býva často varená ryža, zelenina, mlieko, mäsové výrobky a tiež cukrárske výrobky.

### 2.3 Biotransformácia

Biotransformácia je organická reakcia využívajúca pri svojom priebehu biologické katalyzátory ako napríklad celé bunky (mikroorganizmy) alebo enzýmy. Biokatalyzátory môžu byť použité na regioselektívne alebo stereoselektívne reakcie alebo k zavedeniu chiralítym spôsobom, ktorý by bol pre klasické syntetické procesy nemožný alebo veľmi obtiažny. Mikrobiálna biotransformácia má mnoho výhod nad bežne dostupnými chemickými metódami. Vo všeobecnosti kvasinkami sprostredkovaná transformácia je prítomná pri príprave chleba, mliečnych výrobkov alebo alkoholických nápojov (Ray & Bera, 2014).

Biotransformácie majú niekoľko výhod v porovnaní s príslušnými chemickými metódami. Z ekonomického hľadiska sú biotransformácie menej nákladné procesy, sú priamejšie než ich chemické analógy a konverzia bežne prebieha za podmienok, ktoré sa

považujú za prijateľné pre životné prostredie. Enzýmy a mikroorganizmy poskytujú výrazné zvýšenie reakčnej rýchlosti a reakčnej špecificity reakcií. Mikrobiálna transformácia navyše poskytuje výhodu vysoko špecifických reakcií pri izbovej teplote a miernom pH a redukuje hladinu odpadných produktov (Waldemar et al., 1999). Biotransformácia s rekombinantnými mikrobiálnymi enzýmami je zároveň využívaná pri produkcii hormónov, antibiotík a vybraných chemických látok. Enzýmy a mikroorganizmy reprezentujú najefektívnejší katalytický systém používaný pri konvenčných reakciách. Baktéria alebo kvasinky produkujú veľké množstvo biomasy a zároveň aj širokú škálu enzýmov za krátky čas. Vzhľadom k ich veľkosti, majú baktérie najväčší pomer povrchu k ich objemu. To im dovoľuje maximalizovať ich metabolické procesy kvôli vysokej výmene molekúl a metabolitov cez ich povrch (Ray & Bera, 2014). Pri správnych kultivačných podmienkach mikroorganizmy rastú exponenciálne. Enzýmy sú nástrojmi biokatalýzy a katalyzujú nespočetné množstvo rôznych chemických reakcií. Delia sa do piatich tried na oxidoreduktázy, transferázy, hydrolázy, lyázy a izomerázy. Biokatalyzátory pracujú za miernych podmienok s teplotami od 20 až do 40° C, pri atmosférickom tlaku a pri neutrálnom pH alebo v rozmedzí od 5,0 do 8,0 (Waldemar et al., 1998). Biokatalyzátory môžu vykonávať reakcie, ktoré nie sú možné pomocou použitia konvenčnej chemickej syntézy alebo nie sú ekonomicky uskutočniteľné tradičnou chemickou syntézou. Biotransformácie navyše vytvárajú biologicky rozložiteľné zlúčeniny. Na druhej strane proces biotransformácie má aj niekoľko nevýhod. Pri biotransformácii vyžaduje biokatalyzátor úzke prevádzkové parametre. V prípade, že reakcia prebieha za daných parametrov pomaly, existuje iba úzky rozsah zmien, ktoré je možné urobiť, tak aby nedošlo k deaktivácii enzýmu. Biokatalytické reakcie sú navyše náchylné na koncentráciu substrátu alebo inhibíciu produktu (Ray & Bera, 2014). To spôsobuje, že enzýmy popripade použité mikroorganizmy prestávajú pracovať pri vyššej koncentrácii substrátu alebo produktu. Enzýmy sú prítomné v prírode v jednej enantiomérskej forme a sú citlivé na extrémne podmienky okolia ako napríklad teplota popripade pH.

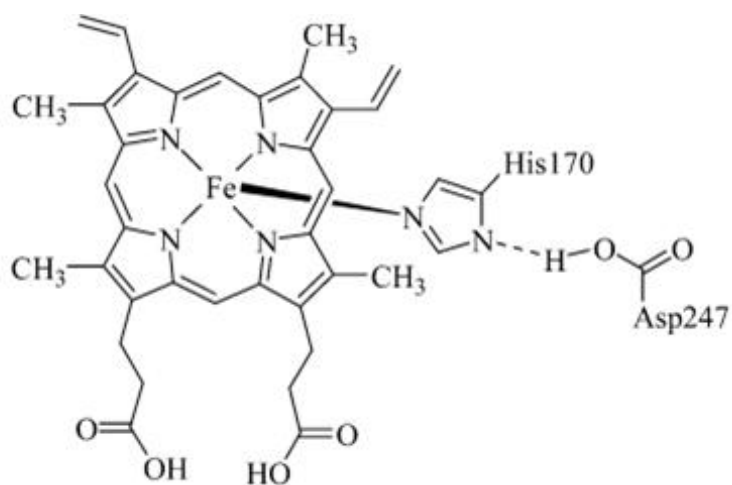
### **2.3.1 Chrenová peroxidáza (EC 1.11.1.7)**

Chren dedinský (*Armoracia rusticana*) je trvalá rastlina patriaca do čeľade kapustovité (*Brassicaceae*). Je pestovaná v miernom podnebnom pásme hlavne kvôli kulinárskemu využitiu valcovitých bielych koreňov. Korene sú zároveň zdrojom peroxidázy, hem-obsahujúceho

enzýmu, ktorý využíva reakcie s peroxidom vodíku na oxidáciu organických ale aj anorganických zložiek.

Chrenová peroxidáza sa zaraďuje medzi oxidoreduktázy a jej molekulová hmotnosť sa pohybuje medzi 40- 44 kDa. Produkcia peroxidázy z koreňov chrenu je rozšírená z dôvodu komerčného použitia enzýmu napríklad ako zložky klinických diagnostických súprav a pre imunologické testy. Hoci sa termín chrenová peroxidáza používa trochu všeobecne, koreň rastliny obsahuje niekoľko izoenzýmov peroxidázy. Poznatky o chrenovej peroxidáze pochádzajú však hlavne zo štúdií s izoenzýmom C, ktorý je v rastline zastúpený v najväčšej miere (Lopes et al., 2014). V dôsledku vysokej tepelnej odolnosti sa HRP často používa v potravinárskom priemysle na reguláciu tepelného spracovania a potravinovej stability.

Izoenzým C peroxidázy z chrenu dedinského obsahuje jeden polypeptid s 308 aminokyselinovými zvyškami. N-koncový zvyšok je blokovaný pyroglutamátom a C-koniec je heterogénny, pričom niektoré molekuly neobsahujú koncové zvyšky (Veitch, 2004). Izoenzým C peroxidázy (Obrázok 15) pozostáva z centrálného atómu železa (III) a protoporfyrínu IX, tento komplex je označovaný ako „hemová skupina“ alebo „hem“. Zároveň sú u neho prítomné ešte dva atómy vápnika. Centrálny atóm železa a protoporfyrín IX sú nevyhnutné pre štruktúrnu a funkčnú integritu enzýmu. Na druhej strane strata vápnika v štruktúre enzýmu má za následok zníženie enzýmovej aktivity a tepelnej stability a slabé zmeny v prostredí hemu, ktoré sa dajú detegovať spektroskopicky (Veitch, 2004).



**Obrázok 15** Štruktúra chrenovej peroxidázy izoenzýmu C

Reakcie katalyzované peroxidázami sa môžu vyjadriť nasledujúcou rovnicou (reakcia I), v ktorej RH predstavuje vhodný substrát pre HRP a Rc, ktorý reprezentuje vznikajúci radikál.



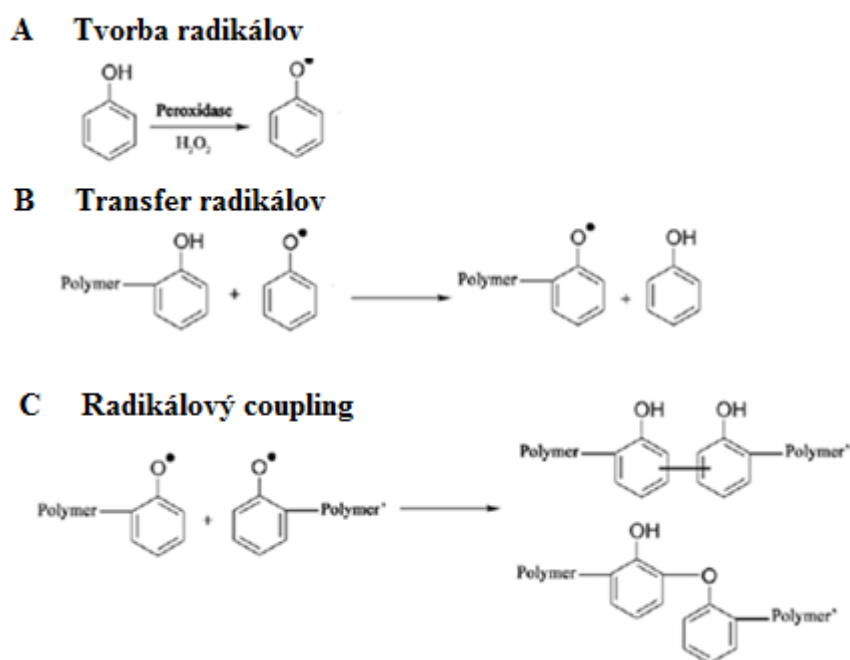
Tvorba radikálov v redukčných krokoch reakcií katalyzovaných HRP môže viesť k tvorbe dimérnych, trimérnych alebo oligomérnych štruktúr, ktoré môžu pôsobiť ako substráty v nasledujúcich krokoch. Typické substráty zahŕňajú aromatické fenoly, fenolové kyseliny, indoly, amíny a sulfonáty (Veitch, 2004). Chromogénne HRP substráty, ktoré zostávajú v roztoku a farbía po reakcii s HRP, sa často používajú na ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) a iné kolorimetrické testy. Bežne používané chromogénne HRP substráty zahŕňajú 3,3', 5,5'-tetrametylbenzidín (TMB) a 2,2'-azino-di [3-ethylbenzthiazolin-6-sulfónová kyselina] (ABTS). Výber rozpustného chromogénneho substrátu závisí od požiadaviek na citlivosť testu a schopnosti readeru. Po oxidácii pomocou HRP sa niektoré substráty vyzrážajú. Oxidovaný HRP substrát môže tvoriť zrazeninu, ktorá je sfarbená alebo vykazuje luminiscenciu (Lopes et al., 2014).

Stabilita štruktúry HRP závisí od molekulárnych interakcií ako napríklad vodíkových väzieb alebo elektrostatických síl. Tieto molekulové interakcie priamo zodpovedajú za účinky enzýmu. Účinok enzýmu je aj úzko spätý s pH reakčného média. Navyše enzýmy obsahujú veľké množstvo polárnych aminokyselín na vonkajšom povrchu, čo spôsobuje to, že povrch môže byť protonovaný a deprotonovaný v závislosti na pH prostredia (Lopes et al., 2014). Aktivita voľného enzýmu HRP vykazuje svoje maximum pri pH 8 a teplote 45 °C. Vystavenie HRP vysokej koncentrácii peroxidu vodíka môže viesť k jeho nevratnej samovražednej inaktivácii a k tvorbe vysoko reaktívneho radikálu, ktorý následne zničí prostetickú skupinu.

### 2.3.2 Jednoelektrónová oxidácia fenolov

Fenoly ako p- cresol, guaiacol, pyrogallol, katechol sú typickými substrátmi pre peroxidázy. Ich oxidáciou prostredníctvom peroxidu vodíku dochádza k tvorbe radikálov, ktoré po difúzii z aktívneho centra enzýmu reagujú s ďalšími aromatickými substrátmi a tvoria dimerické, oligomerické alebo polymerické produkty (Waldemar et al., 1999). Takto

enzymaticky katalyzovaná biotransformácia vedie k tvorbe pozmenených prírodných produktov s vysokou biologickou aktivitou. Proces polymerizácie fenolov (viď. Obrázok 16) sa využíva pri výrobe živíc a pri odstraňovaní fenolov z odpadovej vody. Polyméry produkované pri oxidácii fenolov môžu slúžiť ako potencionálne náhrady za fenol-formaldehydové živice (Waldemar et al., 1999). Fenoly a ich živice sú znečisťujúce látky v odpadových vodách pochádzajúcich z konverzie uhlia, z papierenského priemyslu a z výroby živíc a plastov. Ich transformácia peroxidázou a peroxidom vodíka predstavuje vhodný, mierny a environmentálne prijateľný čistiaci proces (Dordick et al., 1986).



**Obrázok 16** Mechanizmus peroxidázou katalyzovanej polymerizácie fenolov. V časti A dochádza k reakcii fenolu s chrenovou peroxidázou a peroxidom vodíka. Dochádza k vzniku radikálu na fenolickej skupine. V časti B reaguje štruktúra z časti A s ďalším fenolom. Vzniká radikál umiestnený na polyméri fenolu. V časti C reagujú spolu 2 radikálové polyméry fenolu za vzniku polyméru fenolu. Prevzaté a upravené z (Regil & Sandoval, 2013).

Z environmentálneho pohľadu polyméry (či už ide o polyfenoly, polysacharidy alebo polyestery) získané prostredníctvom enzýmom– sprostredkovanej katalýzy sú biologicky



odbúrateľné. Najbežnejším typom enzýmov, ktoré sú schopné katalyzovať polymerizačné reakcie sú transferázy, oxidoreduktázy a hydrolázy. Fenoly patria k látkam, ktoré predstavujú významnú zložku priemyselných aplikácií (Waldemar et al., 1999). Súčasnú polymérnu materiálu, ktoré sa komerčne vyrábajú z fenolických zlúčenín vykazujú dobré vlastnosti a zároveň poskytujú odolnosť voči vysokým teplotám. Ide napríklad o bakelit alebo poly-2,6-dimetyl-1,4-fenylénoxid. Avšak oxidatívnou polymerizáciou fenolov pomocou bežne dostupného katalyzátoru dochádza k tvorbe nerozpustných produktov s nekontrolovanou štruktúrou (Regil & Sandoval, 2013). Navyše v prípade bakelitu a poly-2,6-dimetyl-1,4-fenylénoxidu, ktoré predstavujú fenol-formaldehydové živice, je pre ich priemyselnú výrobu limitujúci fakt, že obsahujú toxický formaldehyd. Na druhej strane enzýmom katalyzovaná polymerizácia ponúka nielen typické výhody biokatalýzy, ale aj možnosť lepšej kontroly samotnej polymerizácie (Regil & Sandoval, 2013).

## 2.4 Oxidácia potravín

Pôsobením vzdušného kyslíka na zle uskladnené potraviny dochádza k nezvratnému procesu, ktorý sa nazýva oxidácia. Proces oxidácie znižuje kvalitu potravín tým, že dochádza k žltnutiu tukov, ktoré sú vo väčšine prípadov v danom produkte prítomné. Lipidy sú dôležitými štruktúrnymi a funkčnými zložkami potravín. Dodávajú potravinám chuť, farbu a vôňu a podieľajú sa na ich konzistencii. Rozlišujú sa dva druhy žltnutia a to oxidačné a hydrolytické žltnutie (Schmidt et al., 2002). Hydrolytické žltnutie je spôsobené buď reakciou lipidov a vody za prítomnosti katalyzátoru alebo pôsobením enzýmu lipázy. Oxidačné žltnutie je trojstupňový proces, ktorý zahŕňa samotnú oxidáciu lipidov. Oxidácia lipidov v potravinách navodzuje ďalšie zmeny, ktoré ovplyvňujú výživovú hodnotu, chuť, farbu poprípade konzistenciu. Látky, podieľajúce sa na spomaľovaní oxidácie lipidov sa nazývajú antioxidanty.

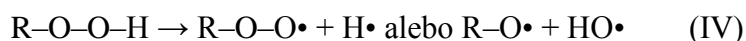
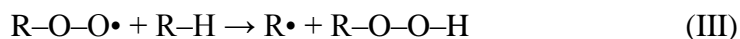
Autooxidačné reakcie lipidov prebiehajú radikálovým mechanizmom. Oxidáciu možno opísať z hľadiska iniciácie, propagácie a ukončenia reakcie ako trojstupňovú. Počas iniciačnej fázy (reakcia I) sa molekula mastnej kyseliny (RH) štiepi v prítomnosti iniciátora (In) na radikál mastnej kyseliny ( $R\bullet$ ) a radikál vodíka ( $H\bullet$ ). Ako iniciátor môže slúžiť svetelná poprípade tepelná energia, zároveň tiež iné voľné radikály (Schmidt et al., 2002) vznikajúce oxidáciou prostredníctvom singletového kyslíka alebo oxidáciou katalyzovanou enzýmami. Počas

propagačnej fázy sa voľný radikál mastnej kyseliny ( $R\bullet$ ) viaže so vzdušným tripletovým kyslíkom ( $^3O_2$ ). Vzniká reaktívny peroxidový radikál ( $ROO\bullet$ ) (reakcia II), ktorý je schopný z ďalšieho reťazca mastnej kyseliny odštiepiť vodík (reakcia III), čím vzniká hydroperoxid ( $ROOH$ ) a ďalší voľný radikál mastnej kyseliny ( $R\bullet$ ). Oba procesy sa opakujú a dochádza k reťazovej spotrebe kyslíka a mastných kyselín. Ako primárny produkt autooxidácie vznikajú hydroperoxidy, ktoré sa pri tomto procese hromadia. Lipidové hydroperoxidy sú nestále zlúčeniny a pôsobením izbovej teploty dochádza k ich rozkladu na voľné radikály, ktoré ďalej iniciujú oxidáciu (reakcie IV a V) (Schmidt et al., 2002).

Iniciačná fáza:

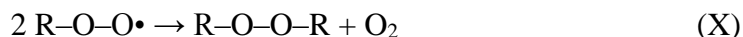


Propagačná fáza:



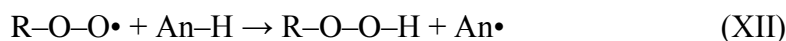
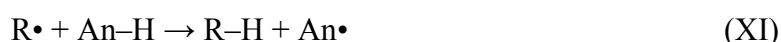
Počas terminačnej fázy autooxidácie dochádza k rekombinácii voľných radikálov. Následne vznikajú stabilné neradikálové produkty a reťazové reakcie sa prerušia (reakcie VI–X) (Schmidt et al., 2002).

Terminačná fáza:



Hyperoxidy polynenasýtených mastných kyselín sú bez chutia zápachu, no po rozštiepená väzby susediacej s násobnou väzbou dochádza k tvorbe prchavých nízkomolekulárnych látok ako

napríklad alkoholy, aldehydy, ketóny alebo kyseliny. Ide o tzv. sekundárne oxidačné produkty, ktoré dodávajú potravinám nežiadajú chuť, farbu a vôňu, zároveň znižujú aj výživovú hodnotu potraviny (Schmidt et al., 2002). Na oddialenie oxidácie lipidov sa využívajú látky s antioxidačnými vlastnosťami. Mechanizmus účinku antioxidantov (An-H) je založený na poskytnutí vodíka alkylovým (R•, reakcia XI) a peroxidovým radikálom (ROO•, reakcia XII) lipidov. V priebehu reakcií dochádza k tvorbe hydroperoxidov (ROOH) a voľných radikálov antioxidantov (An•). Voľné radikály antioxidantov už neiniciujú reťazovú oxidáciu. Antioxidanty reagujú podobným spôsobom s alkoxylovými voľnými radikálmi (RO•), ktoré sa tvoria počas rozkladu hydroperoxidov (reakcia XIII) (Schmidt et al., 2002). Voľné radikály antioxidantov sa deaktivujú reakciou s peroxidovými (reakcia XIV), alkoxylovými (reakcia XV), alebo inými radikálmi antioxidantov (reakcia XVI).



Butylhydroxytoluén (BHT), butylhydroxyanizol (BHA), propylgalát (PG) a mnohé ďalšie látky sa používajú ako bežne dostupné syntetické antioxidanty v potravinách. V súčasnosti sa dostávajú do popredia látky prírodného pôvodu ako bolo popísané v kapitole 2.1.2, ktorá je venovaná problematike prírodných antioxidantov (Schmidt et al., 2002).

## 2.5 Vybrané metódy merania antioxidačnej aktivity

Na porovnanie antioxidačných účinkov rôznych vzoriek bol zavedený pojem celková antioxidačná aktivita (TAA- Total Antioxidant Aktivita). Tento pojem určuje schopnosť vzorky eliminovať voľné radikály. To aký druh metódy merania antioxidačnej aktivity sa použije určuje aj to akým mechanizmom pôsobí daný antioxidant (Balla, 2012). Môže pôsobiť dvoma spôsobmi a to buď, že eliminuje radikály prostredníctvom dodania protónu, kedy ide o tzv.

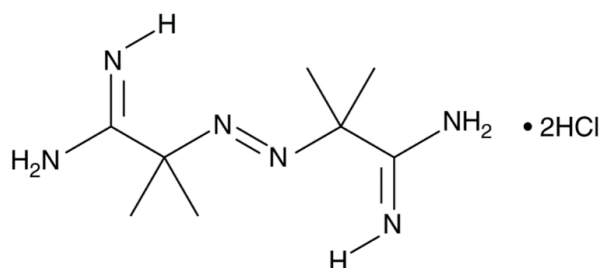
prenos atómu vodíka (HAT- Hydrogen Atom Transfer). Alebo k eliminácii radikálu dochádza jednoelektrónovou redukciovou tzv. jedno-elektrónovým prenosom (SET- Single Electron Transfer). Aj keď bola zistená pomerne dobrá korelácia medzi výsledkami oboch typov metód tak napriek tomu, je možné pozorovať nejaké rozdiely v reaktivite jednotlivých zlúčenín. Napríklad v prípade metódy FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), ktorá je založená na meraní redukčnej schopnosti železitých iónov alebo v prípade metódy celkového obsahu fenolických látok (TPC) neposkytujú odozvu karotenoidy (Balla, 2012). Na druhej strane v prípade metód sledujúcich inaktiváciu voľných radikálov je pomerne náročné jednoznačne určiť o aký druh mechanizmu eliminácie radikálu ide aj kvôli tomu, že oba mechanizmy môžu prebiehať súčasne pričom ich vzájomný pomer je daný štruktúrou testovaných antioxidantov, ich rozpustnosťou v konkrétnom systéme, pH a použitým rozpúšťadlom (Balla, 2012).

### **2.5.1 TPC**

Metóda stanovenia celkových fenolických látok (TPC- Total Phenolic Content) je založená na reakcii žltého zafarbeného Folin-Ciocalteu činidla s látkami fenolickej povahy. Folin-Ciocalteu činidlo má žltú farbu a je pripravené rozpustením wolfrámanu sodného a molybdénanu sodného vo vode (Singleton et al., 1999). Pri príprave činidla je ešte potrebné pridať kyselinu fosforečnú a kyselinu chlorovodíkovú. V reakcii dochádza k redukcii zmesi fosfomolybdenanu a fosfowolfrámanu fenolickými zlúčeninami za vzniku modro zafarbeného komplexu (oxidy wolfrámu a molybdénu) (Masagati, 2012). Pri tomto procese sa znižuje oxidačné číslo molybdénu. Modré zafarbenie vzniknutého polymérneho komplexu sa meria spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 750 nm a je úmerné celkovému množstvu pôvodne prítomných fenolických látok. Kvantifikácia celkového obsahu fenolických látok je založená na porovnaní vzorky so štandardom kyseliny gallovej (Singleton et al., 1999). Výsledná hodnota TPC sa následne uvádza v ekvivalentoch kyseliny gallovej (GAE- Gallic Acid Equivalents). Folin-Ciocalteu činidlo špecificky reaguje aj s väčšinou redukujúcich molekúl ako napríklad kyselinou L-askorbovou preto namerané údaje predstavujú skôr priamo antioxidačnú aktivitu samotnej vzorky. Metóda TPC je dobre korelovaná aj s ostatnými testami vhodnými na stanovenie antioxidačnej kapacity.

## 2.5.2 ORAC

Metóda kyslíkovej radikálovej absorpčnej kapacity (ORAC) je fluorescenčná metóda slúžiaca na meranie celkovej antioxidačnej kapacity. Je založená na meraní vychytávania peroxylového radikálu antioxidantmi obsiahnutými vo vzorke. Zdrojom peroxylových radikálov je 2,2'-Azobis (2-amidinopropan) dihydrochlorid (AAPH- vid'. Obrázok 17)).



**Obrázok 17** Štruktúra AAPH

Dochádza k terminálnej dekompozícii AAPH, ktorá pri teplote 37 °C produkuje stálu hladinu peroxylového radikálu. Nedochoďza však k vychytaniu všetkých peroxylových radikálov antioxidantmi prítomnými v štandarde Troloxu alebo vo vzorke. Zvyšné peroxylové radikály oxidujú fluorescenčnú prílohu ako napríklad fluoresceín, čo má za následok úbytok fluorescenčného signálu. Degenerácia fluorescenčnej prílohy závisí na množstve prítomných antioxidantov (Bicas et al., 2011). Čím menej antioxidantov je prítomných vo vzorke tým väčší úbytok fluorescencie bude zaznamenaný, pričom sa sleduje intenzita fluorescencie v závislosti na čase. Pri vyhodnocovaní sa používa porovnanie plochy pod krivkou fluorescenčného signálu tzv. AUC (area under the curve). Pričom plocha blanku je menšia ako plocha vzorky, ktorá obsahuje antioxidanty. Na vyhodnocovanie metódy ORAC sa používa syntetický analóg vitamínu E 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametylchróman-2-karboxylová kyselina (Trolox) ako antioxidačný štandardný roztok, kedy sa porovnáva krivka štandardu Troloxu s krivkou meranej vzorky (Masagati, 2012). Metóda ORAC je prevažne používaná na stanovenie antioxidačných aktivít. A to napríklad u ovocia, ovocných džúsov, zeleniny alebo v prípade čajov. Výhodou metódy ORAC je, že pracuje efektívne v prípade vzoriek, ktoré obsahujú ako pomalo pôsobiace tak aj rýchlo pôsobiace antioxidanty (Masagati, 2012).

### 2.5.3 Hnednutie potravín a stanovenie inhibície enzymatického hnednutia jablka

Hnednutie potravín je proces zmeny farby v dôsledku prebiehajúcich chemických reakcií. Rozoznávajú sa dva druhy hnednutia a to enzymatické hnednutie a neenzymatické hnednutie (Friedman, 1996). Proces hnednutia potravín je sprevádzaný zmenami, ktoré závisia na druhu potraviny.

Enzymatické hnednutie potravín je proces, ku ktorému dochádza u zeleniny a ovocia, ktoré sú bohaté na polyfenoly, ale aj v prípade niektorých morských plodov. Tento proces ovplyvňuje chuť, farbu ale aj nutričnú hodnotu jedla. Polyfenoly sú z časti zodpovedné za farbu, horkosť, chuť a nutričné vlastnosti v ovocí a zelenine. V plodoch sú najdôležitejšou skupinou sekundárnych metabolitov, ktoré sa medzi jednotlivými druhmi značne líšia v množstve a kvalite. V rastlinných bunkách sa fenolické zlúčeniny nachádzajú vo vakuolách, zatiaľ čo enzým polyfenoloxidáza (EC 1.10.3.1, PPO), ktorý sa priamo podieľa na enzymatickom hnednutí (Supapvanich et al., 2012), je prítomný v plastidoch. V prípade poškodenia buniek dochádza ku oxidácii fenolických zlúčenín prostredníctvom PPO. Vznikajú chinóny, ktoré sa ďalej polymerizujú s ďalšími chinónmi alebo fenolickými látkami za vzniku hnedých pigmentov (melanínov) na povrchu potravín (Holderbaum et al., 2010). Enzymatické hnednutie nie je vnímané iba ako nežiadúca zmena farby, v prípade procesu výroby kávy, čierneho čaju, čiernych olív alebo sušeného ovocia je táto zmena viac než žiadaná na dosiahnutie požadovaných vlastností týchto potravín (Friedman, 1996).

Neenzymatické hnednutie je proces, pri ktorom tiež dochádza k zmene pigmentu v jedle avšak bez účasti PPO a iných enzýmov. Neenzymatické hnednutie zahŕňa proces karamelizácie a Maillardových reakcií. Karamelizácia je proces pyrolýzy sacharidov pri teplotách vyšších ako 100 °C. Maillardova reakcia je súbor chemických reakcií medzi sacharidmi a aminokyselinami, ktorými vznikajú tmavo sfarbené produkty.

V potravinárskom priemysle existuje niekoľko spôsobov ktorými sa dá vyhnúť enzymatickému hnednutiu potravín. Môže byť použitá tepelná inaktivácia enzýmu PPO, sirovodík poprípade kyselina L-askorbová (Friedman, 1996). Sirovodík reaguje s chinónmi a tvorí bezfarebné komplexy. Kyselina L-askorbová redukuje chinóny a tvorí bezfarebné dihydroxyfenoly. Použitie sirovodíku je však spojené s negatívnymi následkami na ľudské zdravie, preto je nutné hľadať alternatívne prírodné inhibítory PPO.

Jedným z mnohých testov, ktoré sa používajú na stanovenie inhibície PPO je použitie jablka. Jablko sa nakrája na tenké plátky a umiestni sa suchý podklad. Pri krájaní dochádza k porušeniu vakuol a plastidov, a následne k procesu oxidácie fenolických zlúčenín prostredníctvom PPO (prítomné v plastidoch v jablku). Pri tomto teste sa hneď po prerezaní jablka na reznú plochu aplikuje látka, ktorá môže potencionálne pôsobiť ako inhibítor PPO. Hodnotenie stupňa inhibície PPO a teda aj hnednutia sa určuje prostredníctvom tzv. indexu hnednutia podľa Buta et al. (1999), kedy: 0- žiadne hnednutie, 1- stopy hnednutia, 2- slabé hnednutie, 3- mierne hnednutie, 4- ťažké hnednutie, 5- veľmi ťažké hnednutie.

## 3 Experimentálna časť

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Rastlinný materiál

V tejto práci boli použité vybrané druhy rastlín znázornené v Tabuľke 1. Zber jednotlivých druhov rastlín sa uskutočnil v závislosti na období. Listy cesnaku medvedieho (*Allium ursinum*), schizandry čínskej (*Schisandra chinensis*), púpavy lekárskej (*Taraxacum officinale*) a skorocelu kopijovitého (*Plantago lanceolata*) boli zberané v mesiaci apríl. Zber ostatných druhov rastlín sa uskutočnil v mesiaci september. Plody borievky obyčajnej boli zakúpené v obchode. Pri stanovení inhibície enzymatického hnednutia boli použité plody jablone domácej (*Malus domestica 'Jonagold'*) pôvodom z Poľska.

**Tabuľka 1** Použité rastlinné vzorky a ich konkrétna časť zahrnutá v experimente

Rastlinná vzorka	Použitá rastlinná časť
Z13- <i>Eriobotrya japonica</i>	list
Z14- <i>Alnus glutinosa</i>	list
Z15- <i>Cydonia oblonga</i>	list
Z16- <i>Cynara cardunculus var. scolymus</i>	list
Z17- <i>Robinia pseudoacacia</i>	list
Z18- <i>Pleioblastus vir. Auricoma</i>	list
Z19- <i>Cornus mas</i>	list
Z20- <i>Hippophae rhamnoides</i>	list
Z21- <i>Armoracia rusticana</i>	list
Z22- <i>Vicia hirsuta</i>	list
Z23- <i>Fragaria vesca</i>	list
Z24- <i>Plantago lanceolata</i>	list
Z25- <i>Taraxacum officinale</i>	list
N1- <i>Allium ursinum</i>	list
N3- <i>Actinidia arguta</i> Issai	list
N4- <i>Schisandra chinensis</i>	list
N5- <i>Persea americana</i>	list
N6- <i>Juniperus communis</i>	plod
N7- <i>Echinacea purpurea</i>	list



### 3.1.2 Prístrojové vybavenie

Analytická váha , OHAUS PIONEER (Česká republika)  
Automatické pipety labopette®, Hirschmann-Laborgeräte (Nemecko)  
Dusíková odparka TurboVap, Biotage (Švédsko)  
Kávoový mlynček KM1310S, Tarrington House (Nemecko)  
Lyofilizátor FreeZone 2,5 Liter, LABCONCO (USA)  
Mikrocentrifúga Micro Star 17, VWR International s.r.o. (Česká republika)  
Mikrovlnná rúra ZMC 19 M, ZANUSSI (Taliansko)  
Minitrepačka Vortex V-1 plus, bioSan (Lotyšsko)  
Multidetekčný reader infinite M200 PRO, TECAN (Švajčiarsko)  
Oscilačný guľový mlyn MM400, Retsch® & Co. KG (Nemecko)  
Sušiareň BINDER EED-53, WTC binder (Nemecko)  
Termoblok WiseTherm HB-R, Wisd (Írsko)  
Ultrazvuková kúpeľ Ultrasonic cleaner, VWR International s.r.o. (Česká republika)  
Viackanálová automatická pipeta Eppendorf Xplorer, Eppendorf (Nemecko)

### 3.1.3 Chemikálie

Benzoan sodný, Lachema (Brno, Česká republika)  
Bezvodý glycerín, Lach- Ner s.r.o (Neratovice, Česká republika)  
Dihydrogénfosforečnan draselný, Lach- Ner s.r.o (Neratovice, Česká republika)  
Dodekahydrát hydrogénfosforečnanu sodného, Lach- Ner s.r.o (Neratovice, Česká republika)  
Folin-Ciocalteauho činidlo, Sigma Aldrich (Steinheim, Nemecko)  
Hydroxid draselný, Lach- Ner s.r.o (Neratovice, Česká republika)  
Chrenová peroxidáza (HRP), Sigma Aldrich (Steinheim, Nemecko)  
Kyselina gallová, Lachema (Brno, Česká republika)  
Kyselina L-askorbová, Sigma Aldrich (Steinheim, Nemecko)  
Kyselina mravčia, Sigma Aldrich (Steinheim, Nemecko)  
Metanol (extrakčný), VWR International s.r.o. (Stříbrná Skalice, Česko)  
Monohydrát 2-(N-morpholino)etánsulfónovej kyseliny (MES), Duchefa (Haarlem, Holandsko)

Mozgovo-srdcová infúzia (Brain Heart Infusion, BHI), Sigma Aldrich (Steinheim, Nemecko)  
Murashige and Skoog médium (MS médium), Duchefa (Haarlem, Holandsko)  
Peroxid vodíka, Sigma Aldrich (Steinheim, Nemecko)  
Rastlinný agar, Duchefa (Haarlem, Holandsko)  
Sacharóza, Penta (Praha, Česká republika)  
Sodná soľ fluoresceínu, Sigma- Aldrich (Steinheim, Nemecko)  
Uhlíčan sodný, Lachema (Brno, Česká republika)  
6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametylchróman-2-karboxylová kyselina (Trolox), Sigma- Aldrich (Steinheim, Nemecko)  
2,2'-Azobis (2-amidinopropan) dihydrochlorid (AAPH), Sigma- Aldrich (Steinheim, Nemecko)

### **3.1.4 Zloženie roztokov**

PBS (fosfátový) pufr pre metódu ORAC: 10,39 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  a 1,15 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  na 0,5 litra destilovanej vody; pH 7,4

Zásobný roztok fluoresceínu (100  $\mu\text{M}$ ) pre metódu ORAC: 0,00376 g sodnej soli fluoresceínu bolo rozpustených v 100 ml 10% metanolu

Roztok 250nM fluoresceínu pre metódu ORAC: 37,5  $\mu\text{l}$  100 $\mu\text{M}$  zásobného roztoku fluoresceínu a 15 ml fosfátového pufru

Zásobný roztok Troloxu (500  $\mu\text{M}$ ) pre metódu ORAC: v 1 ml metanolu bolo rozpustených 0,0125g Troloxu a roztok bol doplnený do objemu 100 ml fosfátovým pufrom

Roztok 250 mM AAPH pre metódu ORAC: do 5 ml fosfátového pufru bolo pridaných 0,35 g AAPH

## **3.2. Metódy práce**

### **3.2.1 Extrakcia rastlinného materiálu**

Rastlinný materiál (listy) bol rozdelený do centrifugačných skúmaviek so skrutkovacím uzáverom a zmrazený v  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ . Centrifugačné skúmavky so skrutkovacím uzáverom s rastlinným materiálom boli následne umiestnené do lyofilizátoru. Samotná lyofilizácia prebiehala cez noc. Rastlinný materiál bol následne homogenizovaný pomocou kávového

mlynčeka. Z pripraveného zhomogenizovaného materiálu boli navážené triplikáty do 1,5 ml mikroskúmaviek, každý s hmotnosťou 50 mg. Do každej mikroskúmavky bola umiestnená kovová guľička a 1 ml extrakčného metanolu s 0,1% kyselinou mravčou. Vzorky boli umiestnené na oscilačný guľový mlyn na 5 minút pri 27 Hz. Následne boli prenesené do ultrazvukového kúpeľa na 10 minút a potom na dobu 10 minút do centrifúgy pri 20 000 g. Supernatant z mikroskúmaviek bol následne prenesený do nových mikroskúmaviek a bol odparený v dusíkovej odparke po dobu 3 hodín. Po odparení bolo do každej mikroskúmavky pridaných 300 µl destilovanej vody. Mikroskúmavky boli umiestnené na vortex a miešané po dobu 2 minút. Následne bola každá mikroskúmavka rozdelená na dve s objemom 150 µl každá a boli uchované v mrazničke pri -80 °C.

### **3.2.2 Enzymatická transformácia pomocou chrenovej peroxidázy**

Z každej mikroskúmavky pripravenej v predchádzajúcom postupe bolo odobratých 150 µl extraktu do nových mikroskúmaviek na následnú enzymatickú transformáciu. K 150 µl extraktu bolo pridaných 7 µl 0,01 % peroxidu vodíka a 10 µl chrenovej peroxidázy (1 mg/ml), ktorá spúšťala reakciu. Po uplynutí 20 minút boli vzorky prenesené do termobloku vyhriateho na 98 °C na zastavenie reakcie. Po 5 minútach boli následne vzorky prenesené do mrazničky a uchované pri -80 °C cez noc. Následne boli vzorky odparené na dusíkovej odparke a rozpustené v 150 µl destilovanej vody. Každá mikroskúmavka s enzymaticky transformovaným extraktom bola označená \* (napr. Z13\*).

### **3.2.3 Postup prípravy kultivačného média**

Na prípravu 1 l kultivačného média bolo navážených 11 g agaru. K tomuto množstvu bol pridaný 1 l destilovanej vody a následne bol roztok zahriaty v autokláve. Do roztoku bolo následne pridaných 2,15 g MS média; 0,5 g MES; 10 g sacharózy. pH roztoku bolo upravené prostredníctvom hydroxidu draselného na hodnotu 5,8.

### 3.2.4 Príprava inokulačnej zmesi

Z plesňou napadnutého ovocia (jablko a jahoda) a z agarových dosiek so semenami z paradajok napadnutých plesňou bola pomocou preparačnej ihly a škrabky odstránená pleseň a prenesená do centrifugačnej skúmavky so skrutkovacím uzáverom. Do centrifugačnej skúmavky bolo následne pridaných 15 ml 10% bezvodého glycerínu s BHI (Brain Heart Infusion). Inokulačná zmes bola umiestnená na vortex a miešaná po dobu 5 minút. Pri riedení inokulačnej zmesi bolo pripravených 6 mikroskúmaviek nato aby sa zistilo vhodné riedenie použité pri konzervačnom teste (Tabuľka 2).

**Tabuľka 2** Postup riedenia inokulačnej zmesi

Číslo riedenie	Objem roztoku [ $\mu$ l]	
1.	100 $\mu$ l zásobného roztoku	900 $\mu$ l destilovanej vody
2.	100 $\mu$ l roztoku z mikroskúmavky č.1	900 $\mu$ l destilovanej vody
3.	100 $\mu$ l roztoku z mikroskúmavky č.2	900 $\mu$ l destilovanej vody
4.	316 $\mu$ l roztoku z mikroskúmavky č.3	684 $\mu$ l destilovanej vody
5.	316 $\mu$ l roztoku z mikroskúmavky č.4	684 $\mu$ l destilovanej vody
6.	316 $\mu$ l roztoku z mikroskúmavky č.5	684 $\mu$ l destilovanej vody

### 3.2.5 Aplikácia vzoriek na agar (Konzervačný test)

Do 24- jamkovej dosky bolo nanosených 300  $\mu$ l média do každej jamky. Médium bolo nechané stuhnúť. Následne bolo do každej jamky aplikovaných 30  $\mu$ l čistého extraktu alebo enzymaticky transformovaného extraktu. Ako kontrola bol do niektorých jamiek aplikovaný benzoan sodný (0,1; 0,5; 1; 5 a 10 % ) namiesto extraktov. Následne bolo do každej jamky nanosených 30  $\mu$ l inokulačnej zmesi. 24- jamkové dosky boli uzavreté tesniacou fóliou a umiestnené do sušiarne pri teplote 30 °C. Každá vzorka (aj kontrola) bola do 24-jamkovej dosky vždy nanášaná v dvoch opakovaníach.

### 3.2.6 Postup pri stanovení celkového obsahu fenolických látok (TPC)

Vzorky extraktov boli nariadené podľa Tabuľky 3. Následne bolo do nových mikroskúmaviek prenesených 30  $\mu$ l nariadenej vzorky a 470  $\mu$ l destilovanej vody. Ďalej bolo pridaných 50  $\mu$ l Folin- Ciocalteu činidla. Vzorky boli umiestnené na Vortex a miešané po dobu 2 minút. Následne bolo do každej mikroskúmavky pridaných 950  $\mu$ l uhličitanu sodného a mikroskúmavky boli inkubované pri laboratórnej teplote po dobu 30 minút.

**Tabuľka 3** Spôsob riedenia jednotlivých extraktov pre metódu TPC

<b>čistý/enzymaticky transformovaný extrakt</b>	<b>riedenie extraktu</b>
Z13	10
Z15	10
Z18	1
Z19	10
Z23	10
Z25	10
N1	1
N3	10
Z13*	10
Z15*	10
Z18*	10
Z19*	10
Z23*	10
Z25*	10
N1*	1
N3*	10

Zároveň bola pripravená kalibračná rada štandardného roztoku kyseliny gallovej. Do 7 mikroskúmaviek bolo pridaných 0, 5, 10, 30, 100, 300 a 500  $\mu$ l 0,01 % kyseliny gallovej (10 mg do 100 ml H<sub>2</sub>O) a následne bol objem doplnený do 500  $\mu$ l destilovanou vodou. Následne bolo pridané Folin- Ciocalteu činidlo a uhličitan sodný ako pri vzorkách s extraktom. 150  $\mu$ l zo všetkých vzoriek bolo následne po 30 minútovej inkubácii prenesených pomocou viackanálovej pipety do mikrotitračnej dosky. Modré zafarbenie vzniknutého polymérneho komplexu bolo merané spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 750 nm. Z výsledkov štandardného roztoku

kyseliny gallovej bola urobená kalibračná krivka, ktorá slúžila na výpočet obsahu celkových fenolických látok. Výsledná hodnota TPC bola následne uvedená v ekvivalentoch kyseliny gallovej (GAE- Gallic Acid Equivalents).

### 3.2.7 Postup pri meraní antioxidačnej kapacity (ORAC)

Vzorky extraktov boli nariadené podľa Tabuľky 3. Do prvého a posledného stĺpca mikrotitračnej dosky bolo nanosených 25  $\mu$ l štandardného roztoku Troloxu (vid'. Tabuľka 4). Do prvého riadku bolo nanosených 25  $\mu$ l fosfátového pufru (blank). Do ostatných jamiek bolo nanosených 25  $\mu$ l nariadených extraktov v dvoch opakovaníach (vid'. Tabuľka 4). Následne bolo pomocou viackanálovej pipety do celej mikrotitračnej dosky nanosených 150  $\mu$ l roztoku fluorescenčnej próby- fluoresceínu. Následne bol pripravený roztok AAPH a bol nechaný na inkubáciu po dobu 30 minút na 37 °C. Do každej jamky bolo po inkubácii prenesených 25  $\mu$ l AAPH a na multidetekčnom readery bola meraná intenzita fluorescencie v závislosti na čase. Celé meranie trvalo 60 min a prebiehalo pri 30 cykloch pri rozmedzí teplôt 38 - 42 °C.

**Tabuľka 4** Spôsob prípravy koncentračnej rady Troloxu

Koncentrácia Trolox [ $\mu$ M]	Objem zásobného roztoku Trolox [ $\mu$ l]	Objem fosfátového pufru [ $\mu$ l]
250	500	500
100	200	800
50	100	900
25	50	950
12,5	25	975
5	10	990

**Tabuľka 5** Spôsob riedenia jednotlivých extraktov pre metódu ORAC

<b>čistý/enzymaticky transformovaný extrakt</b>	<b>riedenie extraktu</b>
Z13	3000
Z15	3000
Z18	500
Z19	2000
Z23	3000
Z25	2000
N1	500
N3	2000
Z13*	3000
Z15*	3000
Z18*	100
Z19*	2000
Z23*	3000
Z25*	1000
N1*	50
N3*	1000

### **3.2.8 Meranie absorbcie vzoriek vo viditeľnej oblasti svetla (VIS)**

Pri meraní absorpcie vzoriek vo viditeľnej oblasti svetla (400- 700 nm) boli premerané ako čisté rastlinné extrakty tak aj enzymaticky transformované rastlinné extrakty. Do 96-jamkovej dosky bolo nanosených 100 µl každej vzorky a následne bola odmeraná absorpcia na multidetekčnom readery infinite M200 PRO.

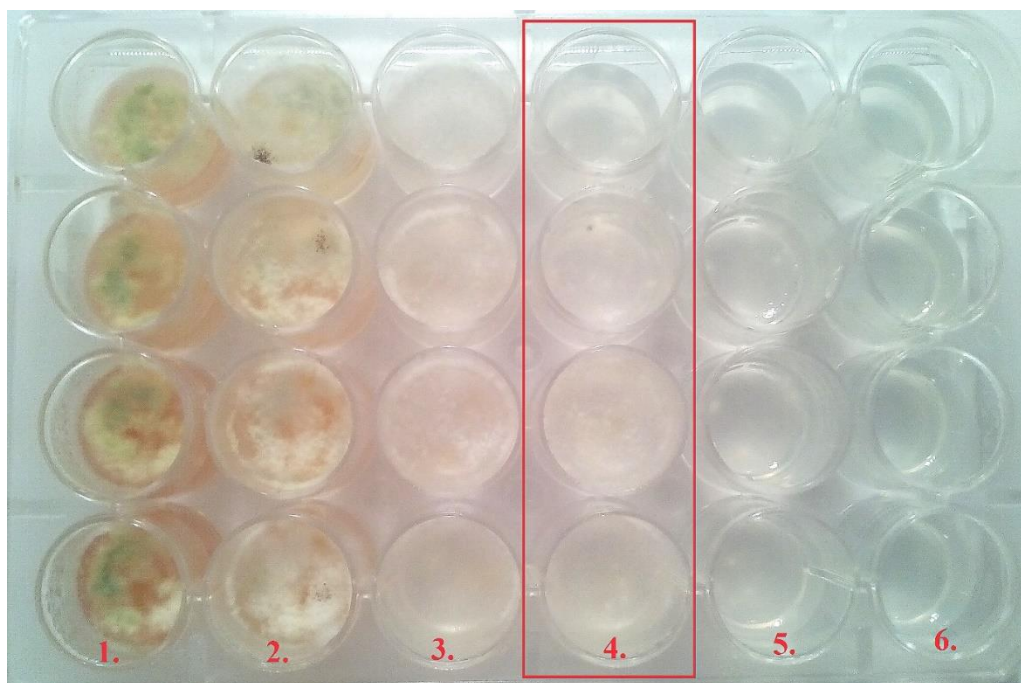
### **3.2.9 Stanovenie inhibície enzymatického hnednutia jablka**

Pri stanovovaní inhibície enzymatického hnednutia boli jablká nakrájané na tenké plátky. Následne bolo na každý plátok nanosených 15 µl čistého extraktu a 15 µl enzymaticky transformovaného extraktu. Ako kontrola bola na jeden plátok jablka nanosená kyselina L- askorbová (30, 20, 10 % ). Na vyhodnotenie stupňa PPO bol použitý tzv. index hnednutia podľa Buta et al. (1999), kedy: 0- žiadne hnednutie, 1- stopy hnednutia, 2- slabé hnednutie, 3- mierne hnednutie, 4- ťažké hnednutie, 5- veľmi ťažké hnednutie.

### 3.3 Výsledky

#### 3.3.1 Konzervačný test

Na správne nastavenie konzervačného testu bola najskôr otestovaná účinnosť inokulačnej zmesi. Ako vhodné riedenie bolo určené riedenie č.4 (Obrázok 18).



**Obrázok 18** Stanovenie vhodného riedenia inokulačnej zmesi. V prvom až treťom stĺpci bolo inokulum riedené desaťkrát. V štvrtom až šiestom stĺpci bolo inokulum riedené trikrát.

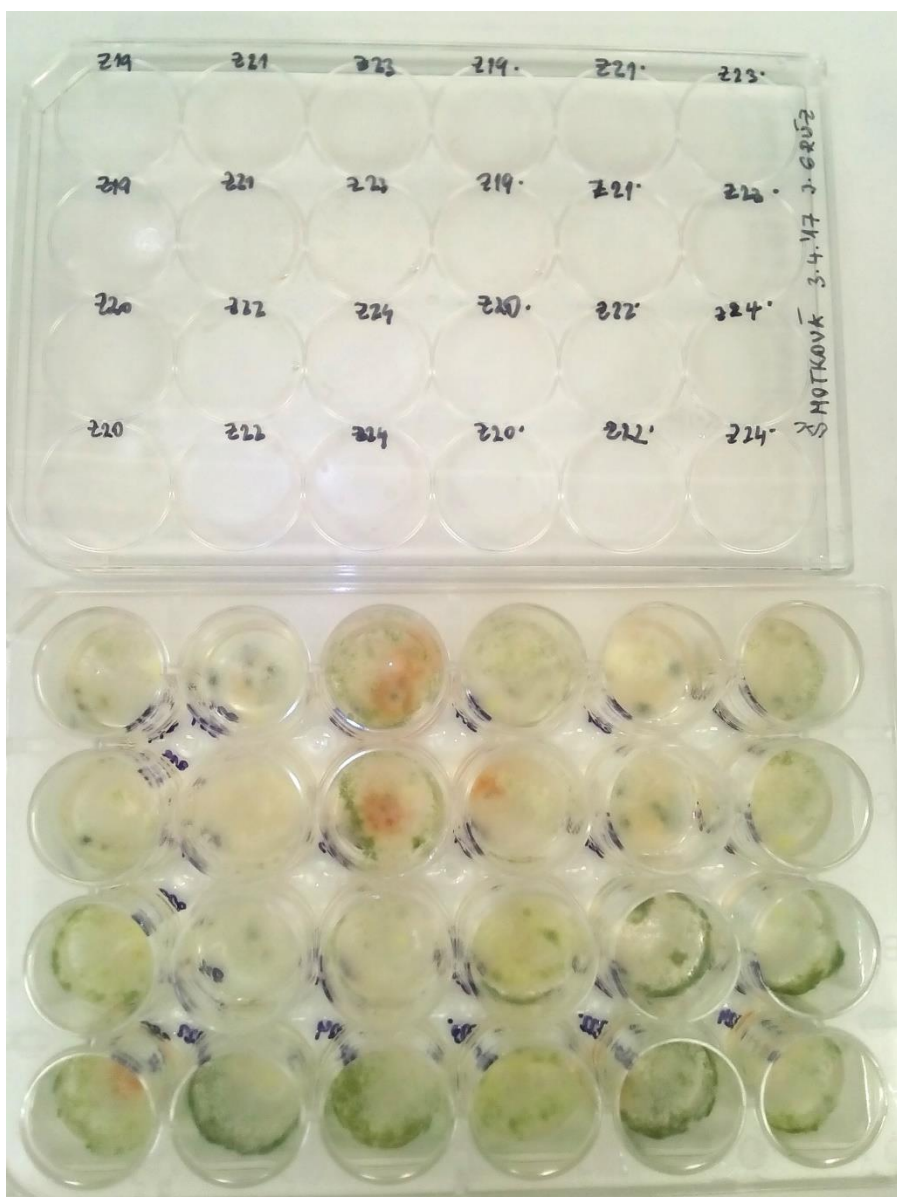
24- jamkové dosky boli inkubované po dobu 3 dní. Následne boli výsledky porovnané s účinnosťou benzoanu sodného. Pri konzervačnom teste bolo použitých päť koncentrácií benzoanu sodného (0,1; 0,5; 1; 5 a 10 %), ktorý bol do jamiek aplikovaný ako kontrola namiesto extraktov. Najväčšia účinnosť inhibície rastu plesní a baktérií bola preukázaná u 10% benzoanu sodného (Obrázok 20). Najnižšia účinnosť inhibície rastu plesní a baktérií bola viditeľná u 0,1% benzoanu sodného.

Už po druhom dni inkubácie bolo viditeľné zakalenie ako čistých tak aj enzymaticky transformovaných extraktov. V tretí deň bolo médium úplne zakalené, čo je známkou mikrobiálneho rastu. Na okrajoch jamiek sa bola prítomná väčšia vrstva plesne, ktorá mala biele

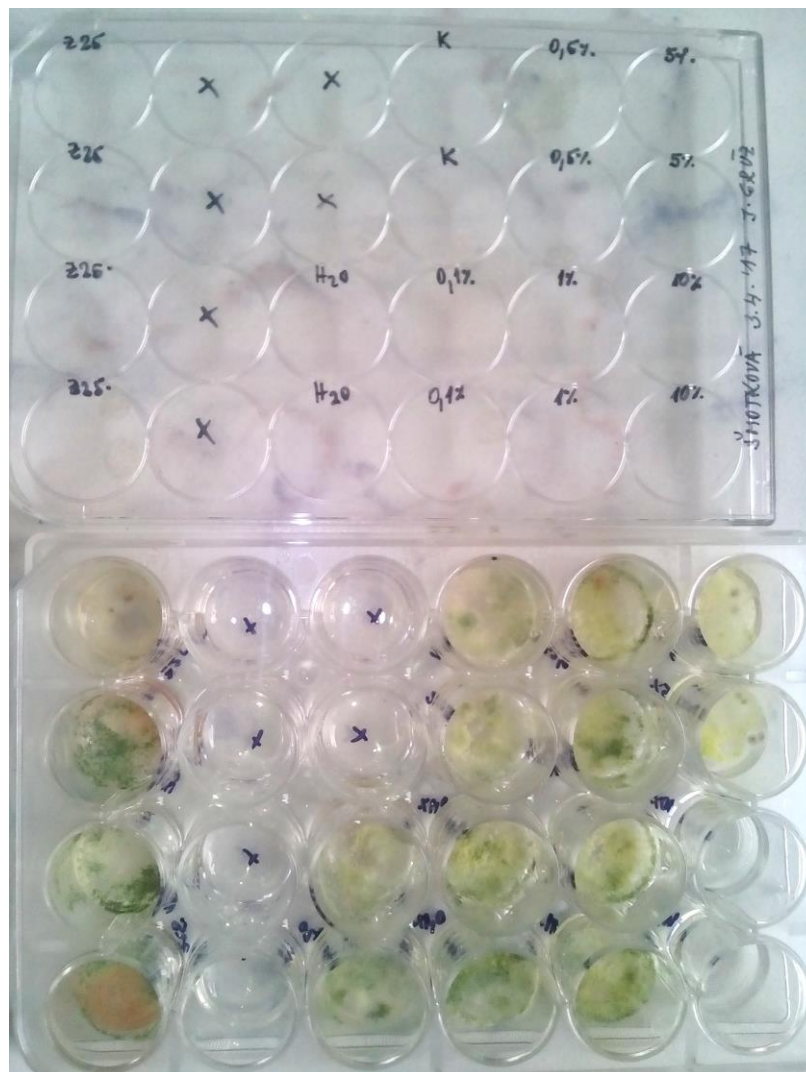


ale aj zelené zafarbenie. Na dne niektorých jamiek bolo prítomné jasne červené zafarbenie (Obrázok 19).

Žiaden z čistých ale ani enzymaticky transformovaných extraktov nevykazoval antibakteriálnu a ani anifungicídnu aktivitu. Extrakty neboli aktívnejšie ako 1% benzoan sodný.



**Obrázok 19** Konzervačný test. 24- jamková doska s jednotlivými extraktmi (2. deň inkubácie). Konzervačný test jednotlivých extraktov bol prevedený v dvoch opakovaníach.



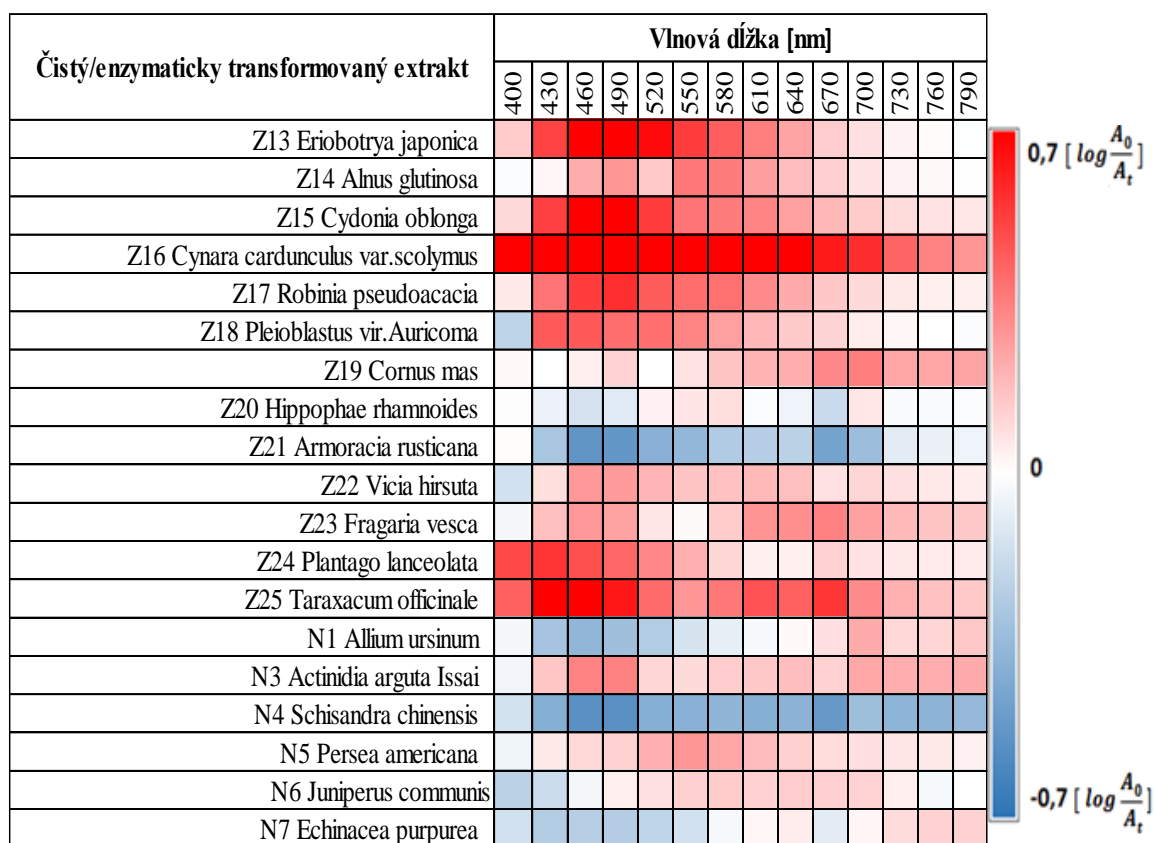
**Obrázok 20** Konzervačný test. 24- jamková doska s jednotlivými extraktmi a kontrolou (3. deň inkubácie). X = prázdne jamky, H<sub>2</sub>O= aplikovaná voda namiesto extraktu, K= čistá inokulačná zmes, 0,1%- 10%= koncentrácia použitého benzoanu sodného.

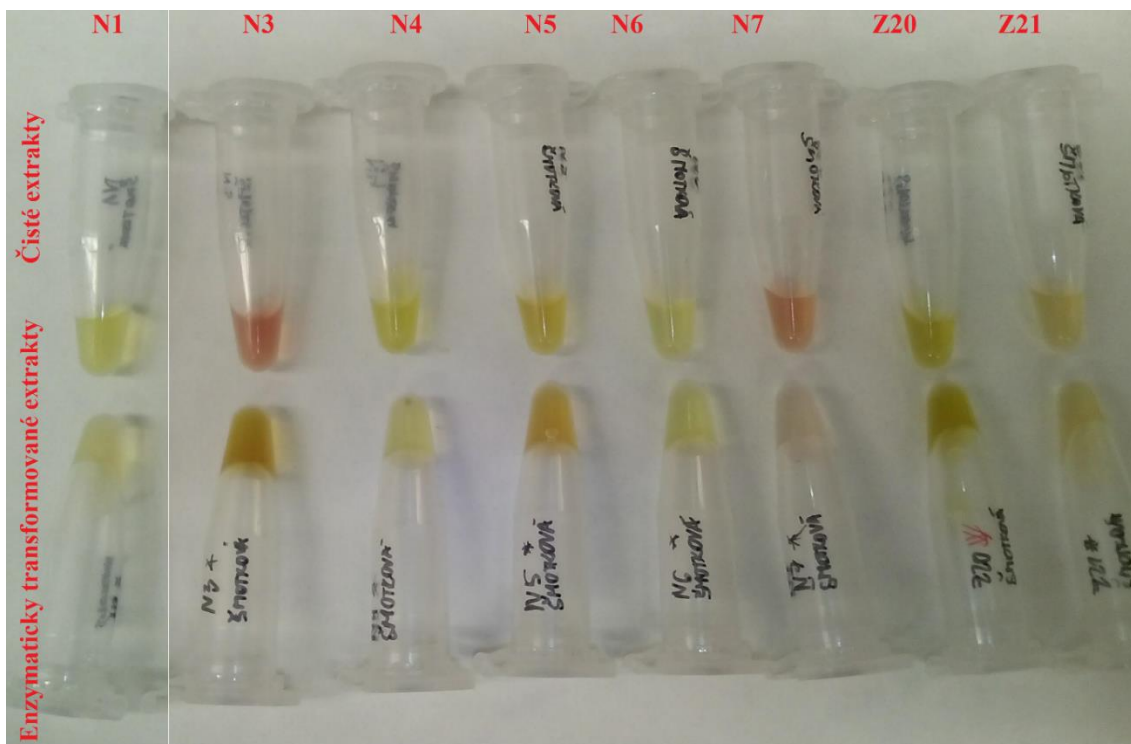
### 3.3.2 Meranie absorbancie vzoriek vo viditeľnej oblasti svetla (VIS)

Od hodnôt absorbancií jednotlivých extraktov bola odpočítaná hodnota pozadia. Následne boli hodnoty čistých extraktov dané do pomeru s enzymaticky transformovanými extraktmi. Hodnoty boli zlogaritmované a bola vytvorená heatmapa (vid'. Tabuľka 6).

U enzymaticky transformovaných extraktov došlo k nárastu absorbancie po 1- elektrónovej oxidácii. Pri enzymatickej transformácii dochádza k tvorbe dimérov a polymérov, ktoré majú konjugovaný systém väzieb a preto sa extrakty javili ako farbenejšie (Obrázok 21). Zmena farby extraktov po enzymatickej transformácii bola výrazná u Artičoku záhradného (Z16), u Duly podlhovastej (Z15), u Mišpule japonskej (Z13) a u Púpavy lekárskej (Z25). K najmenšej zmene farby došlo u Schizandry čínskej (N4) a u Chrenu dedinského (Z21).

**Tabuľka 6** Zmeny absorbancie extraktov po 1- elektrónovej oxidácii zobrazené prostredníctvom heatmapy.  $A_t$  = absorbancia enzymaticky transformovaných extraktov,  $A_0$  = absorbancia čistých extraktov





**Obrázok 21** Farebná zmena vybraných čistých extraktov v hornej rade a enzymaticky transformovaných extraktov v dolnej rade.

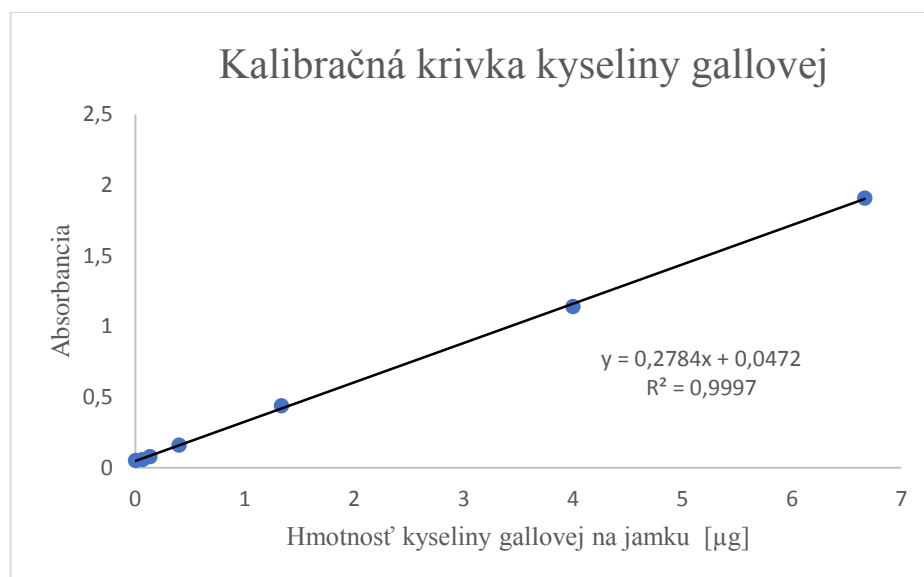
### 3.3.3 Stanovenie celkového obsahu fenolických látok (TPC)

Pomocou metódy stanovenia celkového obsahu fenolických látok (TPC) bolo premeraných 16 vybraných vzoriek. Meranie absorbancie bolo prevedené v troch opakovaníach a hodnoty boli následne spriemerované. Z rovnice kalibračnej krivky kyseliny gallovej boli vypočítané výsledné hodnoty vyjadrené v  $\mu\text{g}$  kyseliny gallovej na 0,050 g suchých zhomogenizovaných vzoriek (DW).

Výsledné hodnoty sú uvedené v Tabuľke 5 a porovnanie jednotlivých čistých extraktov a enzymaticky transformovaných extraktov je uvedené v Grafe 2. Z Grafu 2 je zjavné, že najvyššia hodnota celkového obsahu fenolických látok v prípade čistého extraktu je u Drienky obyčajnej (Z19). Naopak najnižší celkový obsah fenolických látok u čistých extraktov je v prípade Bambusu zakrslého Auricomus (Z18). Najvyšší celkový obsah fenolických látok u enzymaticky transformovaných extraktov je u Drienky obyčajnej (Z19\*). Najnižší celkový obsah fenolických látok u enzymaticky transformovaných extraktov je u Cesnaku medvedieho (N1\*).

U všetkých enzymaticky transformovaných extraktov došlo k poklesu celkového obsahu fenolických látok.

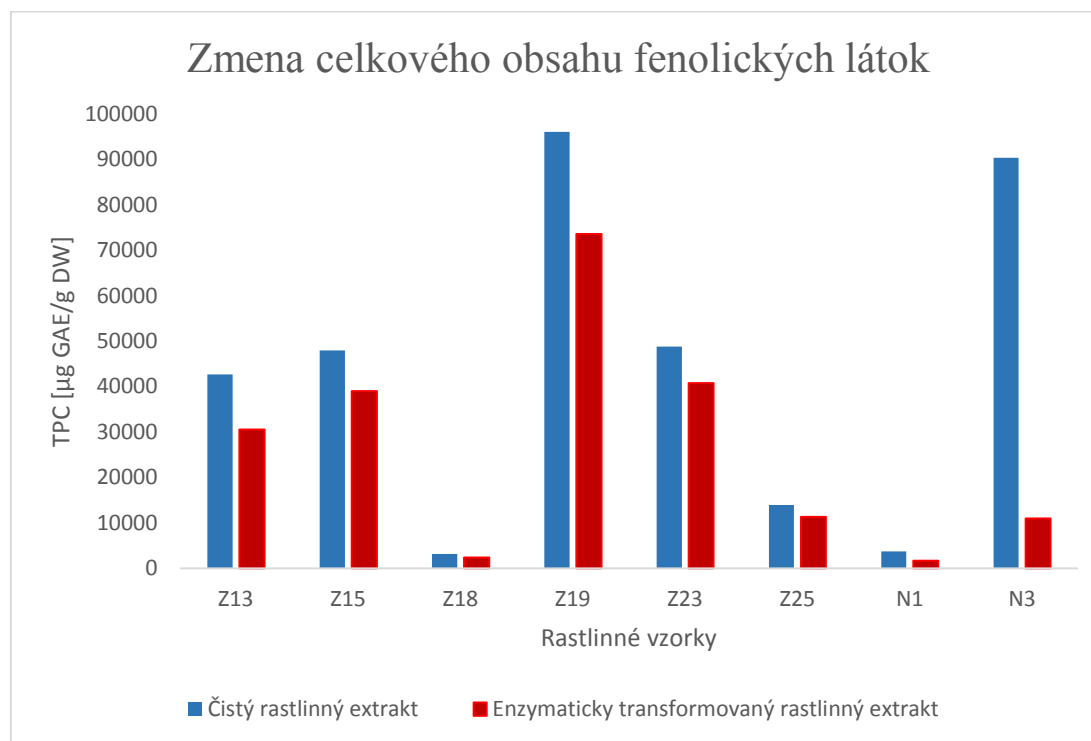
**Graf 1** Kalibračná krivka kyseliny gallovej. Závislosť absorbancie na hmotnosti kyseliny gallovej v jamke.



**Tabuľka 7** Hodnoty stanovenia celkového obsahu fenolických látok vo vybraných vzorkách

Rastlinná vzorka	Označenie rastlinnej vzorky	TPC [µg GAE/g DW]
<i>Eriobotrya japonica</i>	Z13	42643.7
	Z13*	30555.6
<i>Cydonia oblonga</i>	Z15	47957.4
	Z15*	38991.9
<i>Pleioblastus vir.Auricoma</i>	Z18	3155.9
	Z18*	2368.3
<i>Cornus mas</i>	Z19	96072.8
	Z19*	73575.2
<i>Fragaria vesca</i>	Z23	48778.7
	Z23*	40732.8
<i>Taraxacum officinale</i>	Z25	13891.3
	Z25*	11283.5
<i>Allium ursinum</i>	N1	3685.8
	N1*	1673.9
<i>Actinidia arguta Issai</i>	N3	90373.6
	N3*	10993.8

**Graf 2** Zmena celkového obsahu fenolických látok. Modrá farba znázorňuje celkový obsah fenolických látok v prípade čistých rastlinných extraktov a červená farba znázorňuje celkový obsah fenolických látok po enzymatickej transformácii extraktov.



### 3.3.4 Stanovenie celkovej antioxidačnej kapacity (ORAC)

Pomocou metódy stanovenia celkovej antioxidačnej kapacity bolo premeraných 16 vybraných vzoriek. Antioxidanty obsiahnuté v jednotlivých vzorkách vychytávali peroxylové radikály generované roztokom AAPH. Výsledky vyjadrené ako ekvivalenty µmol Troloxu na µmol vzorky sa zakladajú na oblasti pod krivkou fluorescenčného rozpadu v čase (AUC- Area Under the Curve) a na čistej oblasti (NAUC) vypočítanej v približných hodnotách podľa rovníc I a II (Bicas et al., 2011).

$$AUC \cong 1 + \sum_{i=1}^{30} \frac{f_i}{f_0} \quad (\text{I})$$

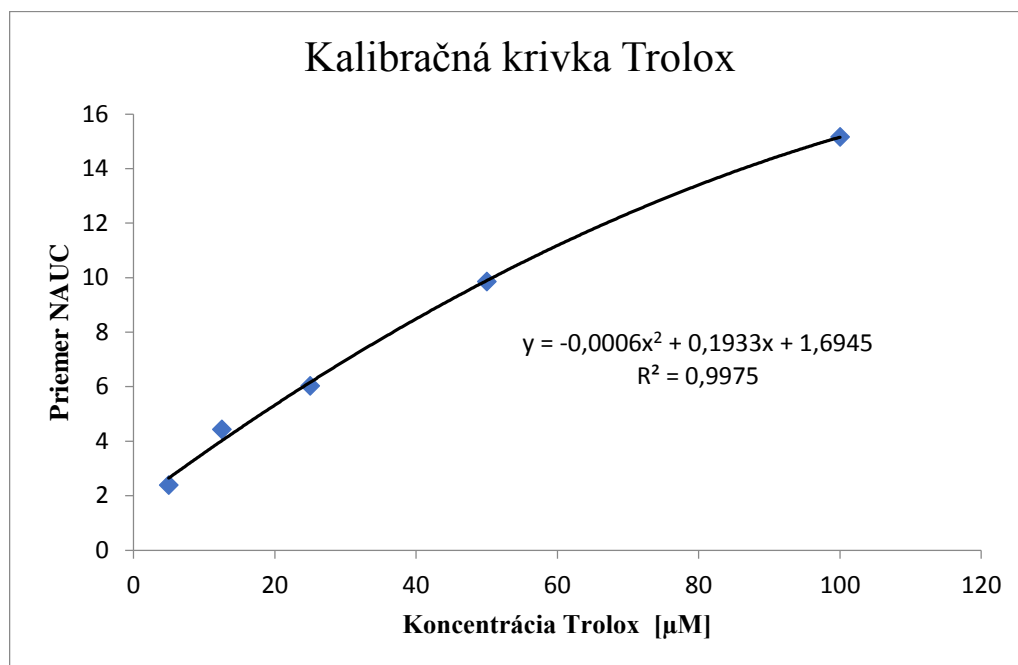
Kde  $f_0$  predstavuje hodnotu počiatočnej fluorescence v čase  $t = 0$  a  $f_i$  je hodnota fluorescence získaná pri čase  $t = i$  (min).

$$NAUC = AUC_{vzoraka} - AUC_{blank} \quad (\text{II})$$

NAUC bola vynesená proti koncentrácii vzorky a výsledky boli porovnané so krivkou štandardného roztoku Troloxu (NAUC ku koncentrácii Troloxu), ktorá je uvedená v Grafe 3. Rovnocennosť Troloxu bola daná uhlovým koeficientom koncentrácie krivky Trolox ( $\mu\text{M}$ ) v porovnaní s koncentráciou vzorky ( $\mu\text{M}$ ) (Bicas et al., 2011). Všetky testy sa uskutočnili v šiestich nezávislých opakovaníach. Výsledné hodnoty celkovej antioxidačnej kapacity sú uvedené v Tabuľke 6. Graf 4 popisuje antioxidačnú kapacitu u vzoriek čistých extraktov a u enzymaticky transformovaných extraktov. Najvyššiu hodnotu antioxidačnej kapacity u čistých extraktov má Dula podlhovastá (Z15). Naopak najnižšiu hodnotu antioxidačnej kapacity u čistých extraktov má Cesnak medvedí (N1). Najvyššiu hodnotu antioxidačnej kapacity u enzymaticky transformovaných extraktov má Jahoda obyčajná (Z23\*), najnižšiu hodnotu má Cesnak medvedí (N1\*).

U všetkých extraktov, okrem Jahody obyčajnej (Z23), došlo k poklesu antioxidačnej kapacity po prebehnutnej enzymatickej reakcii.

**Graf 3** Kalibračná krivka Trolox. Závislosť priemernej hodnoty čistej plochy pod krivkou (NAUC- Net Area Under Curve) na koncentrácii Trolox.

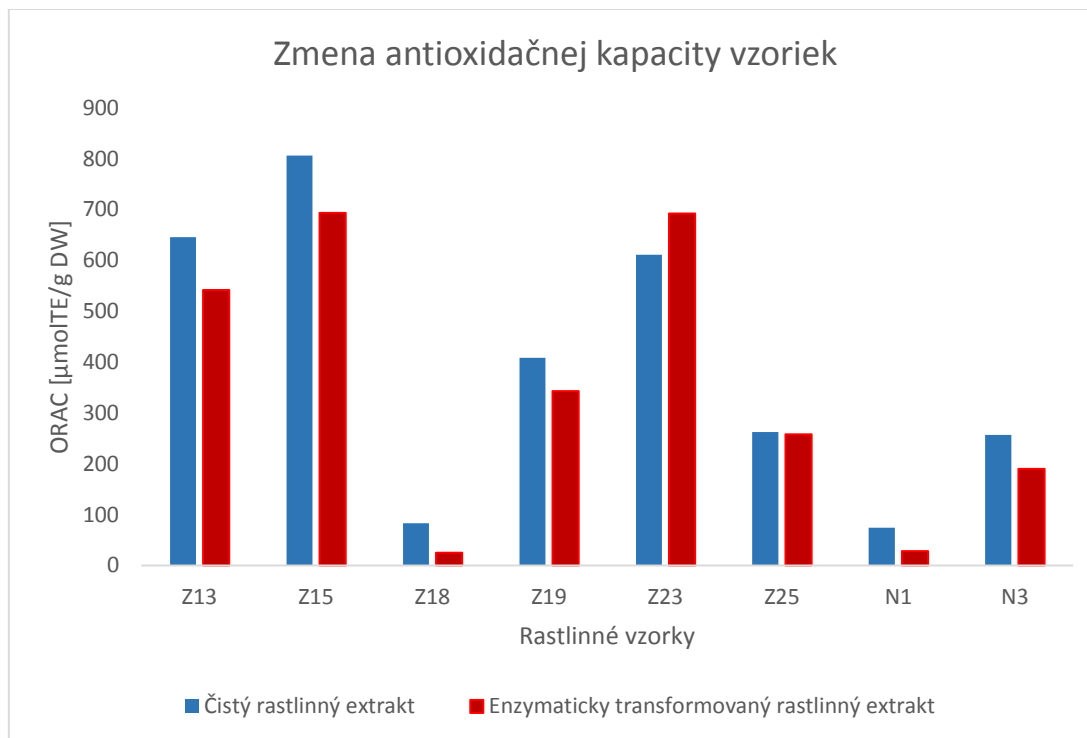


**Tabuľka 8** Hodnoty stanovenia antioxidačnej kapacity vo vybraných vzorkách

Rastlinná vzorka	Označenie rastlinnej vzorky	ORAC [µmolTE/g DW]
<i>Eriobotrya japonica</i>	Z13	645.9
	Z13*	541.9
<i>Cydonia oblonga</i>	Z15	806.3
	Z15*	693.9
<i>Pleioblastus vir.Auricom</i>	Z18	83.0
	Z18*	25.5
<i>Cornus mas</i>	Z19	408.8
	Z19*	342.9
<i>Fragaria vesca</i>	Z23	610.9
	Z23*	692.3
<i>Taraxacum officinale</i>	Z25	262.5
	Z25*	258.3
<i>Allium ursinum</i>	N1	74.7
	N1*	28.5
<i>Actinidia arguta Issai</i>	N3	257.2
	N3*	190.4



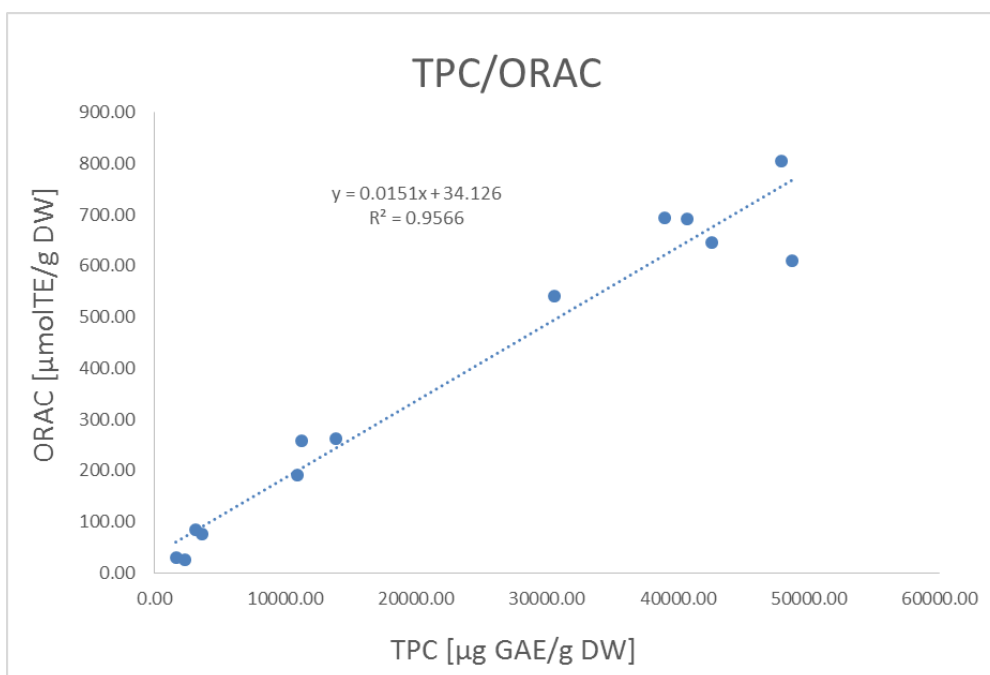
**Graf 4** Zmena antioxidačnej kapacity vzoriek. Modrá farba znázorňuje antioxidačnú kapacitu v prípade čistých rastlinných extraktov a červená farba znázorňuje antioxidačnú kapacitu po enzymatickej transformácii extraktov.



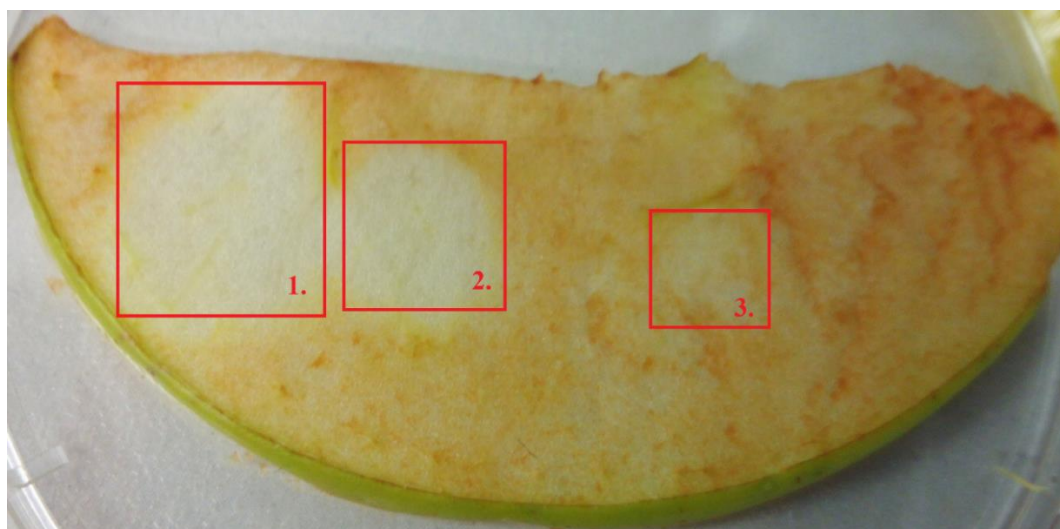
### 3.3.5 Korelácia metódy TPC a ORAC

Keďže metóda TPC je dobre korelovaná aj s ostatnými testami vhodnými na stanovenie antioxidačnej kapacity ako napríklad ORAC, tak bol zostavený Graf 5 znázorňujúcu koreláciu týchto dvoch metód. Pri zostavovaní grafu boli vylúčené 3 odľahlé body (Z19\*, N3, Z19), ktoré boli pravdepodobne spôsobené nepresným meraním. Z grafu je značné, že metóda ORAC a TPC sú medzi sebou dobre korelované.

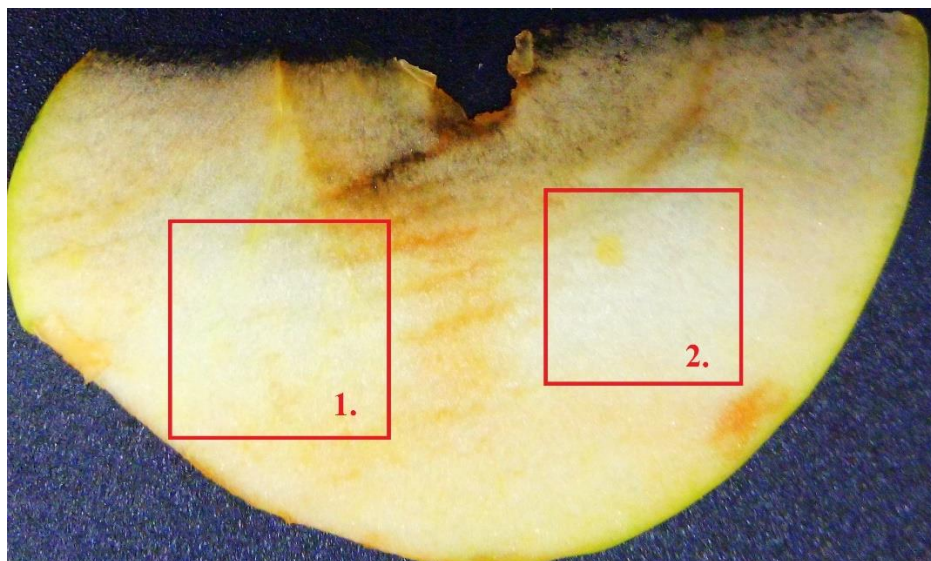
**Graf 5** Korelácia metód TPC a ORAC



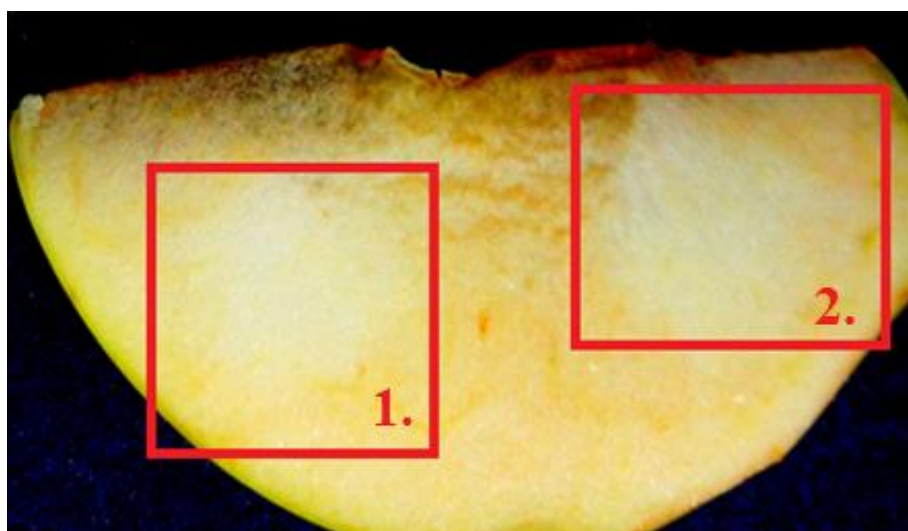
### 3.3.6 Stanovenie inhibície enzymatického hnednutia jablka



**Obrázok 22** Kontrola inhibície hnednutia - kyselina L-askorbová . Prvá zvýraznená oblasť zodpovedá aplikácii kyseliny L-askorbovej o koncentrácii 300 mg/ml. Druhá zvýraznená oblasť odpovedá koncentrácii 200 mg/ml a tretia zvýraznená oblasť odpovedá koncentrácii 100 mg/ml kyseliny L-askorbovej.



**Obrázok 23** Inhibícia hnednutia- Drieň obyčajný (Z19). Oblasť č. 1 odpovedá aplikácii čistého extraktu. Oblasť č. 2 odpovedá aplikácii enzymaticky transformovaného extraktu.



**Obrázok 24** Inhibícia hnednutia- Púpava lekárska (Z25). Oblasť č. 1 odpovedá aplikácii čistého extraktu. Oblasť č. 2 odpovedá aplikácii enzymaticky transformovaného extraktu.

Výsledky boli vzťahované k indexu hnednutia podľa Buta et al. (1999), kedy: 0- žiadne hnednutie, 1- stopy hnednutia, 2- slabé hnednutie, 3- mierne hnednutie, 4- ťažké hnednutie,

5- veľmi ťažké hnednutie. Výsledky hnednutia jablka po aplikácii vybraných extraktov sú znázornené v Tabuľke 7.

Čím nižší index hnednutia extrakt má, tým efektívnejšie bráni hnednutiu a aktivite PPO. Najnižší index hnednutia z vybraných čistých extraktov mal Drieň obyčajný (Z19) a najvyšší index hnednutia mala Mišpuľa japonská (Z13), Dula podlhovastá (Z15), Cesnak medvedí (N1) a Aktinídia význačná Issai (N3). Najnižší index hnednutia z vybraných enzymaticky transformovaných extraktov mal Drieň obyčajný (Z19\*), Púpava lekárska (Z25\*) a najvyšší index hnednutia mala Mišpuľa japonská (Z13\*), Dula podlhovastá (Z15\*), Cesnak medvedí (N1\*) a Aktinídia význačná Issai (N3\*).

**Tabuľka 9** Indexy hnednutia jablka po aplikácii vybraných extraktov.

Označenie rastlinnej vzorky	Index hnednutia					
	0	1	2	3	4	5
<b>Z13</b>	-	-	-	-	-	+
<b>Z13*</b>	-	-	-	-	-	+
<b>Z15</b>	-	-	-	-	-	+
<b>Z15*</b>	-	-	-	-	-	+
<b>Z18</b>	-	-	-	+	-	-
<b>Z18*</b>	-	-	-	-	+	-
<b>Z19</b>	-	+	-	-	-	-
<b>Z19*</b>	+	-	-	-	-	-
<b>Z23</b>	-	-	+	-	-	-
<b>Z23*</b>	-	+	-	-	-	-
<b>Z25</b>	-	+	-	-	-	-
<b>Z25*</b>	+	-	-	-	-	-
<b>N1</b>	-	-	-	-	-	+
<b>N1*</b>	-	-	-	-	+	-
<b>N3</b>	-	-	-	-	-	+
<b>N3*</b>	-	-	-	-	-	+

### 3.4 Diskusia

V prvej časti bakalárskej práce bola študovaná konzervačná aktivita čistých a enzymaticky transformovaných extraktov. Po 3 dňovej inkubácii 24- jamkových dosiek nebola

viditeľná u žiadneho z extraktov inhibícia rastu plesní a baktérií. V prípade komerčne používaného benzoanu sodného bolo očakávané, že bude možné pozorovať inhibíciu mikrobiálneho rastu v závislosti na použitej koncentrácii (Lennerz et al., 2015). Tento predpoklad bol aj potvrdený keďže bolo možné dobre rozoznať či išlo o 0,1% koncentráciu, pri ktorej nedošlo k výraznej inhibícii mikrobiálneho rastu alebo či išlo o 1% koncentráciu, ktorá inhibovala mikrobiálny rast pomerne dobre. V prípade 10% koncentrácie došlo k úplnej inhibícii mikrobiálneho rastu. Zo začiatku (2. deň inkubácie) bolo možné v jamkách pozorovať zákal, ktorý mohol byť spôsobený prítomnosťou baktérií v médiu. V 3.deň inkubácie na povrchu jamiek došlo k rastu bieleho, žltého a zeleného povlaku. Niekedy sa objavili všetky tri typy povlakov naraz, niekedy bol v jamke prítomný iba 1 druh. Pôvodcom tohto povlaku mohli byť plesne rodu *Aspergillus*, ktoré často napadajú zle uskladnené alebo nahnité potraviny (Bhosale et al., 1999). To, že bolo médium viditeľne napadnuté viacerými druhmi mikroorganizmov spôsobilo to, že test bol nedostatočne citlivý a teda ak by aj boli vzorky účinné voči niektorému konkrétnemu druhu mikroorganizmov tak by to nebolo možné rozlíšiť. Navyše extrakty neobsahovali len samotnú účinnú (antimikrobiálnu) látku ale aj zmes cukrov, aminokyselín a iných zložiek, ktoré tiež mohli podporovať rast mikroorganizmov. Zároveň prípadná antimikrobiálna látka, ktorá sa v extraktoch mohla nachádzať tam však nemusela byť v dostatočnom množstve (koncentrácii) na to, aby došlo k inhibícii mikrobiálneho rastu.

Pri meraní absorbancie vzoriek vo viditeľnej oblasti svetla v prípade niektorých vzoriek došlo po enzymatickej transformácii k nárastu absorbancie, to znamená, že intenzita zafarbenia extraktov sa zvýšila. Išlo konkrétne o extrakty Artičoku záhradného (Z16), Duly podlhovastej (Z15), Mišpule japonskej (Z13) a Púpavy lekárskej (Z25). Vplyvom prebehnutaj 1- elektrónovej oxidácie došlo k tvorbe dimérov a polymérov, ktoré majú konjugovaný systém väzieb, ktorý je zdrojom zmeny farby.

Najvyššia hodnota celkového obsahu fenolických látok, konkrétne 96073  $\mu\text{g}$  GAE/g DW, bola zistená v prípade čistého extraktu Drienky obyčajnej (Z19). Podobne vysoká hodnota bola nameraná aj v skôr publikovanej štúdií zaoberajúcej sa meraním celkového obsahu fenolických látok TPC (Cai et al., 2004). Najnižšia hodnota celkového obsahu fenolických látok bola u Bambusu zakrslého Auricomus (Z18). Takto nízka hodnota nemusela byť spôsobená len slabou antioxidačnou aktivitou, ale aj prítomnosťou antioxidantov inej ako fenolickej povahy. Pri porovnaní s metódou ORAC, pomocou ktorej sa merala aj antioxidačná kapacita

nefenolických antioxidantov, vyšla tiež nízka hodnota antioxidačnej kapacity, pretože tento extrakt neobsahoval antioxidanty fenolickej ale ani nefenolickej povahy. Pri porovnaní s výsledkami výskumov zisťujúcich celkový obsah fenolických látok TPC u bambusu (Nirmala at al., 2014) došlo v mojom prípade k získaniu dvojnásobne nižších hodnôt celkového obsahu fenolických látok. Mohlo to byť spôsobené tým, že pri spomínanom výskume boli použité priamo výhonky bambusu, zatiaľ čo v mojom prípade boli použité iba listy rastliny pestovanej pri miestnych podmienkach. V prípade vzoriek enzymaticky transformovaných extraktov bolo značné, že došlo k poklesu celkového obsahu fenolických látok a tým pádom k poklesu antioxidantov vo všetkých vzorkách. Došlo k tomu v dôsledku prebehnutaj 1-elektrónovej oxidácie.

Najvyššia hodnota antioxidačnej kapacity meranej metódou ORAC v prípade čistých extraktov bola zistená v extrakte Duly podlhovastej (Z15). Vysoká hodnota ORAC bola v súlade s vysokým podielom derivátov kyseliny škoricovej (p-kumarín, kyselina kávová), ktoré sú zodpovedné za jej dobrú antioxidačnú aktivitu (Silva et al., 2004). Najnižšia hodnota antioxidačnej kapacity ORAC v prípade čistých extraktov bola u Cesnaku medvedieho (N1) čo odpovedalo hodnotám získaným v práci (Mihaylova et al., 2014). V práci, ktorá sa venovala porovnaniu antioxidačnej kapacity u Cesnaku medvedieho v rôznych obdobiach zberu (Lachowicz et al., 2017) bolo zistené, že sa antioxidačná kapacita pri zbere v neskorších mesiacoch (jún) zvyšovala, zatiaľ čo v mesiaci marec mala porovnateľne nižšie výsledné hodnoty. Rozdielnou dobou zberu rastlín je teda možné vysvetliť prípadné odchýlky medzi publikovanými výsledkami. Po enzymatickej transformácii čistých extraktov došlo k poklesu antioxidačnej aktivity u 7 vzoriek. Výnimku tvoril enzymaticky transformovaný extrakt Jahody obyčajnej (Z23\*), u ktorého k poklesu antioxidačnej kapacity vplyvom prebehnutaj 1- elektrónovej oxidácie nedošlo. To, že v prípade extraktu Z23 k poklesu nedošlo mohlo byť spôsobené tým, že tento extrakt obsahoval antioxidanty inej ako fenolickej povahy, ktoré už neboli vhodnými substrátmi chrenovej peroxidázy použitej pri 1-elektrónovej oxidácii.

Pri metóde TPC bolo použité Folin-Ciocalteu činidlo, ktoré nereagovalo špecificky s fenolickými látkami ale hlavne s redukujúcimi molekulami (kyselina L-askorbová) nachádzajúcimi sa vo vzorkách. Preto výsledky tohto testu vyjadrovali skôr samotnú antioxidačnú kapacitu. Kvôli tomu bol tento test dobre korelovaný s metódou ORAC (Graf 5),

pri ktorej antioxidanty obsiahnuté v jednotlivých vzorkách vychytávali peroxylové radikály generované roztokom AAPH.

Stanovenie enzymatického hnednutia jablka bolo založené na určení indexu hnednutia podľa Buta et al (1999). Čím bol index hnednutia nižší, tým účinnejšie extrakt pôsobil proti hnednutiu jablka. Najnižší index hnednutia z vybraných čistých extraktov mal Drieň obyčajný (Z19). Extrakt Z19 zároveň vykazoval pomerne vysokú antioxidačnú kapacitu pri metódach TPC a ORAC, čo bolo podporené aj výsledkami autorov (Cai et al., 2004). Práve s tým by mohlo súvisieť aj to, že mal najnižší index hnednutia. Najnižší index hnednutia v prípade enzymaticky transformovaných extraktov mal opäť Drieň obyčajný (Z19). Porovnaním čistých a enzymaticky transformovaných extraktov bolo zistené, že sa ich účinnosť líšila iba o jeden index hnednutia alebo sa nelíšila vôbec. Preto nebola zistená priama súvislosť medzi inhibíciou hnednutia použitím čistých extraktov a použitím extraktov, u ktorých prebehla 1-elektrónová oxidácia.

### **3.5 Záver**

Predložená bakalárska práca bola predovšetkým zameraná na 1-elektrónovú oxidáciu rastlinných metabolitov s cieľom zistiť, či použitím tohto postupu dôjde k vylepšeniu vlastností jednotlivých extraktov, ktoré by mali byť následne využité v potravinárskom priemysle. Potenciál čistých extraktov a enzymaticky transformovaných extraktov bol premeraný prostredníctvom dvoch metód slúžiacich na meranie antioxidačnej aktivity a to metódy TPC a ORAC. Následne bol overovaný konzervačný účinok extraktov. Bola zároveň premeraná zmena absorbancie vo VIS po prebehnutej enzymatickej transformácii. V neposlednom rade bol overený účinok extraktov na inhibíciu enzymatického hnednutia jablka.

Pri konzervačnom teste sa nepreukázala účinnosť čistých ani enzymaticky transformovaných extraktov pri prevencii mikrobiálneho rastu. Viditeľný účinok bolo možné pozorovať iba v prípade benzoanu sodného, ktorý sa používa ako konzervačná (antimikrobiálna) látka v potravinárskom priemysle. V budúcnosti by bolo možné ešte optimalizovať tento konzervačný test prostredníctvom použitia napríklad konkrétnych kmeňov baktérií za účelom zvýšenia jeho citlivosti.

V prípade merania zmeny absorbancie vzoriek po enzymatickej transformácii bola u niektorých vzoriek zaznamenaná zmena farby po 1-elektrónovej oxidácii. Pri tomto procese

vznikali diméry a polyméry s konjugovaným systémom väzieb čo sa prejavilo zmenou farby extraktov. Najväčšie zmeny farby boli zaznamenané u enzymaticky transformovaných extraktov z listov Artičoku záhradného (Z16), Duly podlhovastej (Z15), Mišpule japonskej (Z13) a Púpavy lekárskej (Z25). Zistilo sa, že tieto 4 extrakty majú potenciál byť použité v potravinárskom priemysle ako náhrady za synteticky používané farbivá.

Použitím metód TPC a ORAC na zistenie antioxidačnej aktivity bolo zistené, že sú medzi sebou silno korelované. U enzymaticky transformovaných extraktov došlo k poklesu antioxidačnej aktivity v dôsledku prebehnutaj 1-elektrónovej oxidácie. Napriek tomu, dva čisté extrakty mali pomerne vysokú antioxidačnú aktivitu. Išlo o Drieň obyčajný (Z19) a Dulu podlhovastú (Z15), ktoré by mohli byť potencionálne pridávané do potravín ako prírodné antioxidanty.

Stanovenie enzymatického hnednutia jablka bolo založené na určení indexu hnednutia. So znižujúcim sa indexom hnednutia bola preukázaná lepšia účinnosť extraktu na enzymaticky spôsobené hnednutie. Najnižší index hnednutia mal Drieň obyčajný (Z19) ako u enzymaticky transformovaného tak aj u čistého extraktu. Nebola zistená priama súvislosť medzi 1- elektrónovou oxidáciou extraktov a zlepšením inhibície hnednutia prostredníctvom znižovania indexu hnednutia. Rastlinný extrakt Z19 by bolo možné použiť pri spracovávaní čerstvého ovocia a zeleniny. Mohol by byť napríklad pridávaný priamo do čerstvých šalátov aby sa predišlo alebo aby sa zredukovalo ich hnednutie.

V súčasnosti v potravinárskom priemysle rastie dopyt po prírodných látkach, ktoré by ponúkali vlastnosti výhodné pre komerčné využitie. V tejto práci bolo zistené, že vplyvom 1- elektrónovej oxidácie došlo k zmene farby extraktov a teda k vylepšeniu tejto vlastnosti oproti pôvodným čistým extraktom u Artičoku záhradného, Duly podlhovastej, Mišpule japonskej a Púpavy lekárskej. Preto by tieto látky mohli byť potencionálne pridávané do potravín za účelom zmeny farby ako prírodné farbivá. Ďalej bolo zistené, že Drieň obyčajný a Dula podlhovastá (čisté extrakty) mali vysokú antioxidačnú aktivitu a teda by mohli byť zdrojom prírodných antioxidantov pridávaných do potravín. V neposlednom rade bola ukázaná aj aktivita Drienky obyčajnej (enzymaticky transformovaný ale aj čistý extrakt), ktorá inhibovala enzymatické hnednutie jablka a teda by mohla byť pridávaná napríklad k čerstvo pripraveným šalátom za účelom inhibície ich hnednutia.



## Referencie

1. Armstrong G.A., Hearst J.E. (1996) Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB Journal* 10(2), 228-237.
2. Balla J. (2012) Flexible scope of accreditation in clinical biochemistry and immunochemistry. *Chemické listy* 106(1), 147-148.
3. Bicas J.L., Neri-Numa I.A., Ruiz A.L.T.G., De Carvalho J.E., Pastore G.M. (2011) Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. *Food and Chemical Toxicology* 49(7), 1610-1615.
4. Bosco F., Molle C. (2012) Mycotoxins in Food. In Food Industrial Processes - Methods and Equipment. Valdez B., 1<sup>st</sup> edition, pp. 170-189, InTech: Torino, Italy, ISBN: 978-953-307-905-9.
5. BU'LOCK JD. (1961) Intermediary metabolism and antibiotic synthesis. *Advances in Applied Microbiology* 3(1), 293–342.
6. Buta J. G., Moline H. E., Spaulding D. W. , Wang Ch. Y. (1999) Extending Storage Life of Fresh-Cut Apples Using Natural Products and Their Derivatives. *J. Agric. Food Chem.*47(1), 1–6.
7. Carocho M., Barreiro M. F., Morales P., Ferreira, I. (2014) Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13(4), 377–399.
8. Daglia M. (2012) Polyphenols as antimicrobial agents. *In Current Opinion in Biotechnology* 23(2), 174-181.

9. Davidson P., Taylor T., Schmidt S. (2013) *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 4rd edition, Washington, DC.: ASM Press, pp. 765-801, ISBN: 978-155-581-626-1.
10. Davidson P.M., Sofos J.N., Branen A. L. (2005) *Antimicrobials in Food*, 3rd edition, CRC Press, pp.11-26, 51-56, ISBN: 978-1-4200-2873-7.
11. Davies J., Davies D. (2010) Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 74(3), 417-433.
12. Delgado-Vargas F., Jiménez A.R., Paredes-López O. (2000) Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40(3), 173-289.
13. Dordick J. S., Marletta M. A., Klibanov A. M. (1987) Polymerization of phenols catalyzed by peroxidase in nonaqueous media. *Biotechnology and Bioengineering* 30(1), 31-36.
14. Farkas J. (2007) *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 3rd edition, Washington, DC.: American Society for Microbiology Press, pp. 685–705, ISBN: 9781555815912.
15. Fennema O.R. (1996) *Food chemistry*. 3rd edition, New York: Marcel Dekker, ISBN: 0-8247-9346-3.
16. Fernández-García E., Carvajal-Lérída I., Jarén-Galán M., Garrido-Fernández J., Pérez-Gálvez A., Hornero-Méndez A. (2012) Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *In Food Research International* 46(2), 438-450.

17. Gengatharan A., Dykes G. A., Choo W.S. (2015) Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. *LWT - Food Science and Technology* 64(2), 645-649.
18. Gong J., Si W., Tsao R., Zhou T., Yu H., Poppe C., Johnson R., Du Z. (2005) Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 100(2), 296-305.
19. Holderbaum D. F., Kon T., Kudo T., Guerra M. P. (2010) Enzymatic Browning, Polyphenol Oxidase Activity, and Polyphenols in Four Apple Cultivars: Dynamics during Fruit Development. *HORTSCIENCE* 45(8), 1150–1154.
20. Jakszyn, P., González, C. A. (2006) Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: A systematic review of the epidemiological evidence. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 12(27), 4296–4303.
21. Jung C. H., Wells W. W. (1998) Spontaneous conversion of L-dehydroascorbic acid to L-ascorbic acid and L-erythroascorbic acid. *Arch Biochem Biophys* 355(1), 9–14.
22. Kähkönen M., Heinonen M. (2003) Antioxidant Activity of Anthocyanins and Their Aglycons. *Journal of agricultural and food chemistry* 51(3), 628-33.
23. Klement C., Maďarová L., Sirágy P., Mezencev R., Kissová R., Strhářsky J., Kohútová D., Trnková K. (2011) *Mimoriadne udalosti vo verejnom zdravotníctve. Banská Bystrica : PRO*, pp. 301-330, ISBN 978-80-89057-29-0
24. Leatherman G., Durantini E.N., Gust N., Moore T.A., Moore A.L., Stone S., Zhou Z., Liu P., Liu Y.Z., Lindsay S.M. (1999) Carotene as a Molecular Wire: Conducting Atomic Force Microscopy. *The Journal of Physical Chemistry* 103(1), 4006-4010.

25. Lobo V., Patil A., Phatak A, Chandra N. (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* 4(8), 118-126.
26. Lopes G. R., Pinto D. and Silva M. S. (2014) Horseradish peroxidase (HRP) as a tool in green chemistry. *RSC Advances* 70(1), 37244–37265.
27. Masagati T. A. M. (2012) The Chemistry of Food Additives and Preservatives. 1st edition, Wiley-Blackwell, pp. 150-170, ISBN-13: 978-1118274149.
28. Mendel Friedman M. (1996) Food Browning and Its Prevention: An Overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (3), 631-653.
29. Minárik P., Kimáková T. (2016): *Antioxidanty a ich úloha pri prevencii a liečbe rakoviny. Praktické lekárnictvo* [online 12.11.2017].
30. Palace V. P., Khaper N., Qin Q., Singal P. K. (1999) Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *In Free Radical Biology and Medicine* 26(5), 746-761.
31. Pandey K.B., Rizvi S.I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2(5), 270-278.
32. Ray, L. and Bera, D. (2014) Biotransformation in Food Processing, in Conventional and Advanced Food Processing Technologies. Wiley J. & Sons, pp. 388- 391, Ltd: Chichester, United Kingdom, ISBN: 978-111-840-632-8.
33. Regil R. & Sandoval G. (2013) Biocatalysis for Biobased Chemicals. *Biomolecules* 3(4), 812-847.
34. Scotter M. J. (2015) Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing Oxford, pp. 3-34, ISBN : 978-1-7824-2011-8.

35. Seckbach J. (2007) *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*, Dordrecht: Springer, pp. 35, ISBN: 978-1-4020-6111-0.
36. Schmidt Š., Šardzíková I., Sekretár S. (2002) Výskyt, štruktúra a účinok prírodných antioxidantov. *Bulletin potravinárskeho výskumu* 41(4), 221–239.
37. Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299(1), 152-178.
38. Sofos J. N., Pierson M. D., Blocher J. C., Busta F. F. (1986) Mode of action of sorbic acid on bacterial cells and spores. *International Journal of Food Microbiology* 3(1), 1-17.
39. Strunecká A., Patočka J. (2012) *Doba jedová 2*. 1st edition, Praha : Stanislav Juhaňák-TRITON, pp. 135-139, ISBN: 978-80-7387-555-8.
40. Supapvanich S., Prathaan P., Tepsorn R. (2012) Browning inhibition in fresh-cut rose apple fruit cv. Taaptimjaan using konjac glucomannan coating incorporated with pineapple fruit extract. *Postharvest Biology and Technology* 73(1), 46-49.
41. Thakur B. R., Nelson P. E. (1998) High-pressure processing and preservation of food. *Food Reviews International* 14(4), 427-447.
42. Timberlake C. F. (1989) Plant pigments for colouring food. *Nutrition Bulletin* 14(2), 1467-3010.
43. Traber MG., Atkinson J. (2007) Vitamin E, Antioxidant and Nothing More. *Free radical biology & medicine* 43(1), 4-15.

44. Veitch N. C. (2004) Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* 3(65), 249-259.
45. Velíšek J., Hajšlová J. (2009) *Chemie potravin 1*, 3rd edition, Tábor : Václav Sedivý-OSSIS, pp. 435-439, ISBN: 978-80-86659-15-2.
46. Velíšek J., Hajšlová J. (2009) *Chemie potravin 2*, 3rd edition, Tábor : Václav Sedivý-OSSIS, pp. 175-389, ISBN: 978-80-86659-16-9.
47. Waldemar A., Lazarus M., Saha-Möller Ch. R., Weichold O., Hoch U., Häring D., Schreier P. (1999) Biotransformations with Peroxidases. In: Faber K. Biotransformations. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Springer, Berlin, pp. 74- 99, ISBN978-3-540-69791-6.
48. Wedzicha B. L. (1984) Sulphur dioxide in foods:– chemical interactions. *Nutrition Bulletin* 9(3), 155–164.
49. Zheng J., Zhou Y., Li Y., Xu D.P., Li S., & Li H.B. (2016) Spices for Prevention and Treatment of Cancers. *Nutrients* 8(8), 495.
50. Bhosale S. H., Jagtap T. G. & Naik C. G. (1999) Antifungal activity of some marine organisms from india, against food spoilage aspergillus strains. *Mycopathologia* 147(3), 133-8.
51. Lennerz B. S., Vafai S. B., Delaney N. F., Clish C. B., Deik A. A., Pierce K. A., Ludwig D. S., Mootha V. K. (2015) Effects of sodium benzoate, a widely used food preservative, on glucose homeostasis and metabolic profiles in humans. *Molecular Genetics and Metabolism* 114(1), 73-79.
52. Nirmala C., Bisht M. S. & Laishram M. (2014) Bioactive compounds in bamboo shoots: health benefits and prospects for developing functional foods. *Int J Food Sci Technol* 49(6), 1425-1431.

53. Silva B.M., Andrade P.B., Gonçalves A.C., Seabra R. M., Oliveira M. B., Ferreira M. A. (2004) Influence of jam processing upon the contents of phenolics, organic acids and free amino acids in quince fruit (*Cydonia oblonga* Miller). *Eur Food Res Technol* 218(4),385-389
54. Lachowicz S., Kolniak-Ostek J., Oszmiański J. & Wiśniewski R. (2017) Comparison of Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Bear Garlic (*Allium ursinum* L.) in Different Maturity Stages. *Journal of Food Processing and Preservation* 41(1), e12921.
55. Cai Y., Luo Q., Sun M. & Corke H. (2004) Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences* 74(17), 2157-2184.
56. Mihaylova D. S., Lante A., Tinello F., Krastanov A.I. (2014) Study on the antioxidant and antimicrobial activities of *Allium ursinum* L. pressurised-liquid extract. *Natural product research* 28(22), 2000-5.

### **Zdroje obrázkov**

1. <https://www.nature-myview.com/blog/flora-bixa-orellana>.
2. <https://www.gardenia.net/plant/Gardenia-jasminoides-Buttons>
3. <https://www.intechopen.com/source/html/44143/media/image2.jpeg>

## Zoznam obrázkov

Obrázok 1 Štruktúra resveratrolu.....	12
Obrázok 2 Štruktúra $\beta$ - karoténu .....	12
Obrázok 3 Štruktúra kyseliny L-askorbovej .....	13
Obrázok 4 Štruktúra $\alpha$ -tokoferolu.....	14
Obrázok 5 Štruktúra retinolu .....	14
Obrázok 6 Štruktúra allicínu.....	16
Obrázok 7 Štruktúra kyseliny sorbovej .....	17
Obrázok 8 Štruktúra kyseliny benzoovej.....	18
Obrázok 9 Strom orleánika farbiarskeho (Bixa orellana).....	20
Obrázok 10 Štruktúra kurkumínu .....	20
Obrázok 11 Ker gardénie jazmínovitej (Gardenia jasminoides) .....	21
Obrázok 12 Štruktúra antokyanidínov .....	22
Obrázok 13 Štruktúra syntetického potravinového farbiva erytrozínu.....	24
Obrázok 14 Štruktúra ochratoxínu A.....	26
Obrázok 15 Štruktúra chrenovej peroxidázy izoenzýmu C .....	29
Obrázok 16 Mechanizmus peroxidázou katalyzovanej polymeryzácie fenolov.....	31
Obrázok 17 Štruktúra AAPH.....	36
Obrázok 18 Stanovenie vhodného riedenia inokulačnej zmesi .....	47
Obrázok 19 Konzervačný test (2. deň inkubácie).....	48
Obrázok 20 Konzervačný test (3. deň inkubácie).....	49
Obrázok 21 Farebná zmena vybraných čistých extraktov .....	51
Obrázok 22 Kontrola inhibície hnednutia - kyselina L-askorbová .....	57
Obrázok 23 Inhibícia hnednutia - Drieň obyčajný (Z19) .....	58
Obrázok 24 Inhibícia hnednutia - Púpava lekárska (Z25).....	58



## Zoznam tabuliek a grafov

Tabuľka 1 Použité rastlinné vzorky a ich konkrétna časť zahrnutá v experimente .....	39
Tabuľka 2 Postup riedenia inokulačnej zmesi .....	43
Tabuľka 3 Spôsob riedenia jednotlivých extraktov pre metódu TPC.....	44
Tabuľka 4 Spôsob prípravy koncentračnej rady Troloxu .....	45
Tabuľka 5 Spôsob riedenia jednotlivých extraktov pre metódu ORAC.....	46
Tabuľka 6 Zmeny absorbancie extraktov po 1- elektrónovej oxidácii .....	50
Graf 1 Kalibračná krivka kyseliny gallovej .....	52
Tabuľka 7 Hodnoty stanovenia celkového obsahu fenolických látok .....	52
Graf 2 Zmena celkového obsahu fenolických látok. ....	53
Graf 3 Kalibračná krivka Trolox .....	55
Tabuľka 8 Hodnoty stanovenia antioxidačnej kapacity vo vybraných vzorkách .....	55
Graf 4 Zmena antioxidačnej kapacity vzoriek.....	56
Graf 5 Korelácia metód TPC a ORAC .....	57
Tabuľka 9 Indexy hnednutia jablka po aplikácii vybraných extraktov .....	59