



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VLIV DOBY SKLADOVÁNÍ POTRAVIN
ROSTLINNÉHO PŮVODU NA STANOVENÍ
JEJICH AUTENTICITY

THE INFLUENCE OF STORAGE TIME ON AUTHENTICATION OF PLANT-BASED FOODS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Martina Trödlerová

VEDOUcí PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Lenka Fialová, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1825/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Martina Trödlerová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a technologie
Vedoucí práce: **Ing. Lenka Fialová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Vliv doby skladování potravin rostlinného původu na stanovení jejich autenticity

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše (Izolace DNA, složení testovaných vzorků, principy metod využitých v experimentální části práce)
2. Příprava modelových potravin a jejich opakovaná charakterizace pomocí vybraných molekulárních a instrumentálních metod
3. Vyhodnocení a diskuse výsledků

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2023:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Martina Trödlerová
studentka

Ing. Lenka Fialová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Dětské příkrmy a pyré patří mezi falšované potraviny, kvůli cenám složek pro výrobu. Dražší složky se nahrazují těmi levnějšími, často málo kvalitními.

Tato bakalářská práce se zabývá vlivem doby skladování na stanovení autenticity vzorků. Teoretická část se zabývá chemickým složením ovoce (obzvláště jablek a broskví), technologii výroby a metodami stanovení autenticity.

V experimentální části byly připravené modelové vzorky a z nich izolovaná DNA. Ta byla pomocí dvou různých primerů amplifikována v real-time PCR. Specifické produkty byly detekovány pomocí analýzy křivek tání. Pomocí gelové elektroforézy bylo možné potvrdit přítomnost specifických produktů. Poslední metodou byla HPLC, díky které byly analyzovány fenolické látky.

KLÍČOVÁ SLOVA

Ovoce, dětské příkrmy, DNA, real-time PCR, gelová elektroforéza, HPLC

ABSTRACT

Fruit baby foods and purees belong among adulterated food, due to the prices of materials for their production. More expensive ingredients are replaced by cheaper, lower quality ones.

This bachelor thesis deals with influence of storage time on the determination of samples authenticity. The theoretical part of the thesis deals with the chemical composition of fruit (especially apples and peaches), production technology and methods of determining authenticity.

In the experimental part, model samples were prepared and DNA was isolated from them. Then, using two different primer pairs, this DNA was amplified by real-time PCR and a specific product was detected by analyzing melting curves. On gel electrophoresis, it was possible to confirm the presence of these specific products. The last method was HPLC, where phenolic substances were analyzed.

KEY WORDS

Fruit, baby foods, DNA, real-time PCR, gel electrophoresis, HPLC

TRÖDLEROVÁ, Martina. Vliv doby skladování potravin rostlinného původu na stanovení jejich autenticity [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/149055>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Lenka Fialová.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

Martina Trödlerová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala své vedoucí mé bakalářské práce, Ing. Lence Fialové Ph.D., za její ochotu, porozumění, trpělivost a cenné rady. Také bych chtěla poděkovat své rodině, která mě podporovala při studiu.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1. Ovoce	8
2.1.1. Obecná charakteristika	8
2.1.2. Superpotravin y	8
2.1.3. Význam ovoce a zeleniny ve výživě	8
2.1.4. Biologicky aktivní látky	9
2.2. Jablko	11
2.3. Broskev.....	11
2.4. Výroba ovocného pyré	12
2.5. Vybrané metody používané k analýze rostlinných složek v potravinách.....	12
2.5.1. Izolace rostlinné DNA.....	12
2.5.2. Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA.....	13
2.5.3. PCR	13
2.5.4. Gelová elektroforéza	14
2.5.5. Vysokoučinná kapalinová chromatografie	15
3. CÍL PRÁCE.....	17
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	18
4.1. Modelové vzorky.....	18
4.2. Vybavení laboratoře	18
4.2.1. Chemikálie.....	18
4.2.2. Komerční kit.....	18
4.2.3. Přístroje a pomůcky.....	18
4.3. Metody	19
4.3.1. Příprava modelových vzorků.....	19
4.3.2. Izolace rostlinné DNA pomocí kitu.....	20
4.3.3. Spektrofotometrické měření	21
4.3.4. Real-time PCR.....	21
4.3.5. Gelová elektroforéza	22
4.3.6. HPLC.....	23
5. Výsledky a diskuse.....	24
5.1. Stanovení koncentrace a čistoty	24
5.2. PCR a gelová elektroforéza	25
5.2.1. PCR a gelová elektroforéza DNA první série vzorků	25
5.2.2. PCR a gelová elektroforéza DNA druhé série vzorků.....	29
5.2.3. PCR a gelová elektroforéza DNA třetí série vzorků	33

5.2.4.	PCR a gelová elektroforéza DNA čtvrté série vzorků.....	37
5.3.	HPLC.....	41
6.	Závěr.....	44
7.	Použitá literatura.....	45
8.	Přílohy	48
8.1.	Příloha 1 - Křivky tání specifických produktů PCR první série.....	48
8.2.	Příloha 2 - Křivky tání specifických produktů PCR druhé série	49
8.3.	Příloha 3 - Křivky tání specifických produktů PCR třetí série.....	50
8.4.	Příloha 4 - Křivky tání specifických produktů PCR čtvrté série	51

1. ÚVOD

Pojem „falšovaná potravina“ či „falšování“ není přímo zakotveno v legislativě České republiky. Avšak zákon č. 110/1997 Sb. zakazuje uvádět do oběhu klamavě označené potraviny. V České republice falšování potravin není zas tak časté. Ovšem do falšovaných potravin spadají i ovocné výrobky. Důvodem k falšování ovocných výrobků je hlavně cena některých druhů ovoce. Dražší surovina bývá nahrazena tou levnější (často jablky nebo hruškami) [1].

V této práci jsou analyzovány modelové vzorky dětských příkrmů (ovocné pyré) molekulárně biologickými a instrumentálními metodami. Metoda real-time PCR je velmi citlivá na kvalitu a koncentraci izolované DNA a také na inhibitory. Výhodou této metody je rychlost a schopnost detekovat produkty i při nízkých koncentracích. Gelová elektroforéza už není tak průkazná, pro potvrzení přítomnosti produktu je zapotřebí vyšší koncentrace než pro PCR. Metoda HPLC je oproti real-time PCR časově náročnější a mobilní fáze se často skládá ze zdraví nebezpečných látek. Výhodou HPLC je širší spektrum analyzovaných látek (fenolické látky, karotenoidy, aminokyseliny a další).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Ovoce

2.1.1. Obecná charakteristika

Ovoce a zelenina patří mezi významné potravinářské komodity. Ovoce a zelenina, vedle toho že se využívají pro přímý konzum, představují současně i surovinu pro širokou škálu potravinářských výrobků [2].

Ovoce se definuje jako jedlý plod, plodenství nebo semena různých vytrvalých kulturních či planě rostoucích dřevin a bylin. Pro ovoce je charakteristické jeho sladká chuť a je často konzumováno v neupraveném stavu. Dříve se za ovoce považovaly plody rostlin, které měly alespoň část dřevnatého charakteru. Naopak za zeleninu lze považovat různé jedlé části rostlin, kromě ovoce. Některá členění nedokážou pokrýt celé spektrum druhů ovoce a zeleniny a lze nalézt druhy, které nelze jednoznačně zařadit do některé z uvedených skupin [2].

Níže uvedené členění vychází z botanické podstaty daného plodu a je jednou z mnoha možných základních klasifikací ovoce [2].

- jádrové ovoce (jablka, hrušky, kdoule)
- peckové ovoce (s neojíněnou/ojíněnou/plstnatou slupkou – třešně, švestky, broskve)
- drobné ovoce (jahody, bobuloviny, složené peckovice, lesní plody)
- skořápkové ovoce (ořechy, mandle)
- hrozny révy vinné
- tropické ovoce

2.1.2. Superpotraviny

Superpotraviny neboli funkční potraviny je název pro potraviny, které mají díky vysoké koncentraci živin a biologické aktivity vysokou výživovou a biologickou hodnotu. Podle literatury [3] jsou superpotraviny schopné zvýšit vitalitu lidského těla a můžou být dobrou volbou pro prevenci kardiovaskulárních onemocnění či diabetu. Nejdůležitější bioaktivní složky superpotravín, které byly prokázány jako prospěšné pro lidské tělo, jsou polynenasycené mastné kyseliny (ω -3, ω -6), vitamíny, minerály, probiotické organismy, antioxidanty, polysacharidy, esenciální aminokyseliny a různé enzymy [4].

Určité druhy ovoce jsou považovány za superpotraviny (př. borůvky, maliny, jahody a jiné). Největší výhoda superpotravín pochází z vysokého obsahu antioxidantů, jako jsou karotenoidy, vitamíny A, E a polyfenoly. Antioxidanty inhibují vznik volných radikálů v těle, které ve větší míře poškozují zdravé buňky a urychlují proces stárnutí. Vysoký podíl antioxidantů najdeme právě v malinách, aronii nebo borůvkách [4].

2.1.3. Význam ovoce a zeleniny ve výživě

Ovoce obsahuje velké množství vody (v průměru 76 až 89 %) a oproti jiným potravinářským surovinám má nižší obsah sacharidů, tuků a bílkovin. Některé druhy ovoce mají nízkou energetickou hodnotu. V ovoci se nachází celá řada látek se specifickými účinky na zdraví konzumenta. Mezi tyto specifické účinky patří například pozitivní vliv na správnou činnost trávicího ústrojí, podpora imunity a prevence závažných neinfekčních chorob a další. Mezi látky s pozitivními účinky se řadí například vitamíny, karotenoidy, flavonoidy apod. Mezi látky s negativními účinky se řadí šťavelany, dusičnany či různé alkaloidy. Různé druhy ovoce jsou bohatým zdrojem vitamínů (zejména kyseliny askorbové), thiaminu, riboflavinu a provitaminů skupiny A, minerálních solí, vlákniny, popřípadě silic [2; 5; 6].

Zelenina se často vyznačuje nízkou energetickou hodnotou, i když to nemusí platit pro všechny druhy. U ovoce je naopak často energetická hodnota vysoká, zejména díky sacharidům nebo tukům. Vyšší obsah sacharidů je například v hroznech, datlích či ficích, tuky jsou zejména v avokádu nebo skořápkovém ovoci [2].

Ovoce a zelenina mají nejvyšší biologickou hodnotu v čerstvém stavu. Opracováním nebo dlouhodobým skladováním se obsah výživových a senzory významných složek snižuje v závislosti na způsobu skladování či úpravy. Ovlivnit biologickou hodnotu ovoce a zeleniny mohou i kontaminanty, mezi které patří agrochemikálie, rezidua těžkých kovů apod [2].

2.1.4. Biologicky aktivní látky

Biologicky aktivní látky mohou mít fyziologické přínosy spojené s podporou zdraví a prevencí nemocí. V ovoci se vyskytuje velké množství bioaktivních látek, které pozitivně ovlivňují zdraví. Bioaktivní látky z ovoce mají antimikrobiální, proti-rakovinové, proti-zánětlivé, antioxidační a imunostimulační účinky [7]. Mezi biologicky aktivní látky patří například:

- sacharidy
- vitamíny
- minerální látky
- fenolové látky
- vláknina
- proteiny
- karotenoidy
- mastné kyseliny
- enzymy a koenzymy

2.1.4.1. Sacharidy

Z biologicky aktivních látek jsou v ovoci v největší míře zastoupeny sacharidy. V nezralém ovoci je nejvíce zásobního sacharidu škrobu, naopak ve zralém ovoci je více sacharózy, fruktózy a glukózy. Z polysacharidů je zastoupena nejvíce celulóza. Další z polysacharidů obsažených v plodech ovoce je pektin. Ten je ve větší míře zastoupen v nezralém ovoci, ve zralých plodech se nachází v černém rybízu, poté v jablkách a švestkách. Polysacharidy zpomalují vstřebávání cukrů z tenkého střeva do krve a tím pomáhají udržovat hladinu krevního cukru [5].

2.1.4.2. Vitamíny a minerály

V ovoci je široká škála fytochemikálií, z nichž mnohé mají antioxidační vlastnosti. Do této skupiny patří také vitamíny C a E. Žádné z těchto antioxidantů nejsou produkovány přímo v lidském těle, proto musí být neustále dodávány v potravě. Vitamín C a vitamín E jsou úzce spojeny se specifickými biochemickými procesy. Avšak obsah vitamínu může být u stejného druhu ovoce rozdílný, protože je závislý na několika faktorech – zejména na klimatických a půdních podmínkách, stupni zralosti, vystavení slunci, denní době sklizně (ráno či večer) a další [5; 7].

Vitamín C (kyselina askorbová) je sám o sobě bezbarvý a rozpustný ve vodě, ale vyskytuje se většinou s karotenoidy a flavonoidy, které zbarvují ovoce do oranžové, žluté, růžové, červené a fialové barvy. Kyselina askorbová je kofaktor při syntéze kolagenu a je také významným antioxidantem. Nejvíce je kyselina askorbová obsažena v liči, kiwi nebo sladké paprice. U nás pěstované ovoce, které obsahuje

nejvíce vitamínu C je například černý rybíz, lesní jahody nebo šípek. Naopak nízký obsah kyseliny askorbové je v jablku, hroznech nebo banánu [5; 7].

Významné jsou i vitamíny skupiny B. Ve větším množství jsou zastoupeny například v mirabelkách, švestkách či šípku. Thiamin, riboflavin nebo kyselina pantotenová se v ovoci vyskytují pouze ve stopových množstvích (do 1 mg/kg). Ve větším množství se vyskytuje v ovoci niacin. Nízká hladina tohoto vitamínu je spjata s únavou, dermatitidami nebo poruchami trávicího ústrojí [5; 7].

Vitamín E se vyskytuje v ovoci do 10 mg/kg, naopak vysoké zastoupení má v ořeších či semínech nebo listové zelenině. V lidském těle se nejvíce ukládá do lipoproteinů nebo cytoplazmatických membrán, kde chrání polynenasycené mastné kyseliny před oxidací. Z vitamínů patří k nejvýznamnějším antioxidantům. Nízká hladina vitamínu E má spojitost se zvýšením rizika kardiovaskulárních onemocnění nebo demence [5; 7].

Minerální látky zastoupené v ovoci jsou nejčastěji draslík, fosfor, vápník či hořčík. Jejich výskyt se v ovoci pohybuje 0,25 až 0,75 %. Mezi ovoce s vyšším obsahem vápníku patří především šípky, černý rybíz nebo maliny. Zdrojem draslíku mohou být například slívy a hořčiku mandle, kešu ořechy, bezinky či maliny [5].

2.1.4.3. Fenolické látky

V přírodě se vyskytuje více než 8000 fenolických sloučenin a ty jsou klasifikovány na základě počtu aromatických kruhů, různých stupňů glykosylace, hydroxylace a podobně. Rostlinné fenolické látky v plodech a ovocných šťávách dodávají důležité organoleptické vlastnosti, jako jsou chuť, vůně či barva. Na hořké chuti se z řady fenolických látek podílejí hlavně flavanony, katechiny a taniny. Anthokyaniny (modro-červené barvivo) a anthoxanthiny (žluté barvivo) dávají plodům a šťávám barvu, čím je jejich koncentrace vyšší, tím je barva sytější [8].

Fenolické látky mají v chemické struktuře alespoň jeden aromatický kruh (fenoly) nebo více (polyfenoly), na kterých je navázána hydroxylová skupina. Chemická struktura flavonoidů obsahuje dva aromatické kruhy spojené tříuhlíkatým alifatickým řetězcem. Flavonoidy, které jsou vazbou spojené k jedné nebo více molekulám cukru, se nazývají flavonoidové glykosidy. Pokud nemají vazbu s cukry, nazývají se aglykony. Je zde vazba mezi strukturou a antioxidantní aktivitou. Skupiny 2,3 dvojná vazba s 4-oxokarbonylovou skupinou a přítomnost hydroxylových skupin na 3 a 5 pozici pohlcují volné radikály a mají oxidační potenciál [7].

Fenolové látky jsou důležitou součástí antioxidantního systému, protože neutralizují peroxidové radikály lipidů. Ty mají podíl na rozvoji degenerativních onemocněních, jako je rakovina, záněty, kardiovaskulární a neurodegenerativní onemocnění a také urychlují stárnutí. Fenolické látky se také podílejí na likvidaci volných kyslíkových radikálů. Volné radikály jsou produkovány mnohými biochemickými reakcemi v těle a mohou poškodit velmi důležité biomolekuly [7].

Ovoce je velmi bohaté na různé druhy fenolických látek. Tyto látky poskytují ochranu proti škůdcům a také mají vliv na růst a reprodukci rostliny. Fenolické látky mají antialergenní, protizánětlivé, antimikrobiální, kardioprotektivní, antikarcinogenní a další účinky. Také jsou nedílnou součástí skupiny antioxidantů, které ovlivňují lidské zdraví. Reakcí mezi fenolickými látkami a glykoproteiny ve slinách dochází ke tvorbě hořké a trpké chuti ovoce a jejich šťáv. Mezi nejvíce zastoupené fenolické látky v ovoci se řadí fenolické kyseliny, stilbeny, lignany, flavonoidy a jiné. Fenolové kyseliny a flavonoidy představují 30 až 60 % z celkového obsahu fenolických látek v potravinách. Enzymatické hnědnutí ovoce je nechtěnou reakcí fenolických látek katalyzované polyfenoloxidázou, která způsobí ztrátu živin a změnu barvy a chuti [8].

2.1.4.4. Vláknina

Za vlákninu považujeme karbohydrátové polymery s 10 a více jednotkami, které nelze strávit nebo vstřebat v tenkém střevě. Vláknina zrychluje pohyb ve střevech, zvyšuje fermentaci pomocí symbiotických bakterií nebo snižuje hladinu LDL cholesterolu. Nízký příjem vlákniny je spojen s různými onemocněními, například zácpou, zánětem slepého střeva, cukrovkou, obezitou, srdečními onemocněními nebo rakovinou střev [7].

2.1.4.5. Karotenoidy

Karotenoidy jsou rozpustné v tucích a jsou příčinou žluté, oranžové, červené a fialové barvy různých druhů ovoce nebo zeleniny. Karotenoidy jsou klasifikovány jako karotenoidové hydrokarbony (karoteny) a karotenoidové alkoholy (xantofyly). Xantofyly mohou obsahovat různé funkční skupiny. Mezi ně spadají například hydroxylové, epoxidové, aldehydové nebo ketonové funkční skupiny. Některé struktury mohou mít na koncích zacyklení (př. β -karoten), některé mají jen jedno nebo žádné zacyklení (př. lykopen v rajčatech, melounu, růžových hroznech a jiné). Do karotenoidů patří i provitaminy A a jejich příjem pomáhá v prevenci například kardiovaskulárních onemocnění a rakoviny kůže [7].

2.2. Jablko

Jabloně patří mezi nejrozšířenější pěstované ovocné stromy u nás. V červenci dozrávají nejranější odrůdy, hlavní sklizeň probíhá na podzim. Jablka jsou většinou určena k přímé konzumaci, plody nižší kvality se zpracovávají do různých ovocných výrobků [9].

Chemické složení jablek závisí nejen na odrůdě, ale také na oblasti pěstování, počasí, věku stromu a dalších faktorech. Ovlivněn je nejen obsah organických kyselin a cukrů, ale také obsah vitamínu C, vitamínu B, kyseliny listové, fenolových sloučenin, pektinových látek, karotenoidů, polyfenolů a dalších [5; 9].

Z minerálních látek převládá draslík, poté je přítomen i bór, hořčík nebo železo. Jablka také obsahují více než 30 mikroprvků, například kobalt, měď, zinek a další [5; 9].

Z organických kyselin je v jablku zastoupena především kyselina jablečná, v malém množství i kyselina citronová. Mezi hlavní zastoupené cukry patří glukóza a fruktóza. Sacharóza je zastoupena v menším množství. V nezralých plodech jabloní je obsažen i škrob. Tyto plody jsou vhodné pro skladování, protože se postupně při dozrávání přítomný škrob štěpí na cukry. Jablka jsou rovněž zdrojem rozpustné a nerozpustné vlákniny, zejména pektinových látek, které jsou schopné vázat na sebe těžké kovy. Pektiny se také podílejí na inhibici růstu škodlivých mikroorganismů, normalizují proces trávení a další. Konzumace jablek je z důvodu obsahu pektinových látek a fytoncidů (rostlinných antibiotik) vhodná při prevenci zánětu tlustého střeva a dalších onemocnění střev. Fenolové látky v jablku pomáhají při zpevnění stěn cév a jsou prevencí jejich křehkosti. Mezi fenolické látky obsažené v jablkách patří například katechiny, chlorogenové kyseliny, antokyany a další. Do této skupiny patří také phloridzin, který byl donedávna považován za specifický pouze pro jablko. Nedávné výzkumy ale potvrdily přítomnost phloridzinu i v jiných rostlinách, ale oproti jablku jen v nízké koncentraci [5; 8; 9; 10].

2.3. Broskev

Broskve jsou rozšířené celosvětově. Ročně se vypěstuje zhruba 15 miliónů tun. V Evropě se vypěstuje zhruba 30 % celosvětové produkce. Tvar broskví je velmi různorodý, od plochého po kulatý, barvu mají žlutou, přes bílou až po červenou. Broskve se konzumují čerstvé, konzervované nebo sušené. Broskve nejsou dlouhodobě skladovatelné. Pro kratší dobu skladování se sklízí nezralé a nechávají se v chlazeném skladu při 0 °C. Jsou zdrojem vlákniny, vitamínů a různých antioxidantů, proto jsou také velmi lehce stravitelné (zejména oloupané) a jsou vhodné při dietě šetřící trávicí ústrojí. Také mají močopudné účinky, proto se doporučují při ledvinových onemocněních [5; 11].

Chemické složení plodu je závislé na odrůdě, stanovišti a také na stupni zralosti. Značný vliv má i počasí při zrání. V broskvích se nachází menší množství bílkovin, lipidů a sacharidů, z nichž je nejvíce zastoupena sacharóza. Dále obsahují rozpustnou a nerozpustnou vlákninu. Z vitamínů obsahují broskve především vitamín C, kyselinu listovou, kyselinu pantotenovou a další ze skupiny vitamínů B. Z minerálních látek je zastoupen bór, železo, draslík, hořčík a z biologicky aktivních látek zejména β -karoten. Z fenolických látek jsou v broskvi přítomny kyselina chlorogenová, rutin, dále také například kvercetin, tannin a další. Z organických kyselin převládá kyselina jablečná, méně je zastoupená kyselina citrónová [5; 12].

2.4. Výroba ovocného pyré

Pro lidský organismus je příjem ovoce a zeleniny nezbytný, protože tyto potraviny obsahují esenciální živiny a bioaktivní látky, které pomáhají snížit riziko různých chronických onemocnění. Avšak příjem ovoce a zeleniny je celosvětově nižší, než je doporučena denní dávka. Aby se příjem živin z ovoce a zeleniny zvýšil, začaly se vyrábět různé alternativy k čerstvým plodům [13].

Jednou z alternativ je výroba macerovaného ovoce. Výrobky obsahují vysoký podíl původního rostlinného pletiva. V současnosti se tyto produkty vyrábí ředěním koncentrátu. Při výrobě je kladen důraz na rychlost zpracování, proto by celková doba neměla přesáhnout 20 minut. Základní operací je rozvaření ovoce, které je provedeno hned po dělení (mechanickém poškození) plodu. Při rozvaření dojde k inaktivaci enzymů pomocí zvýšené teploty. Pro kvalitu výrobku je to důležitá fáze, společně s homogenizací produktu. Během těchto fází dojde k inaktivaci oxidáz, které by mohly znehodnotit výrobek [14].

Falšování potravin se zakládá na nahrazení drahé složky za levnou, často méně kvalitní surovinu. S falšovanými potravinami se můžeme setkat u masa, mléčných výrobků nebo rostlinných produktů (oleje nebo džusy). Použití potravin neuvedené na etiketě může způsobit alergickou reakci a ohrožení na zdraví spotřebitele. Pro odhalení falšovaných potravin se využívají různé analytické metody. Dlouhodobě používanou kapalinovou chromatografií nebo senzorkou analýzu nyní doplňují nastupující metody analýzy DNA. Mezi nejpoužívanější metody patří PCR [15].

2.5. Vybrané metody používané k analýze rostlinných složek v potravinách

2.5.1. Izolace rostlinné DNA

DNA je poměrně stabilní molekula a je přítomna v každé buňce živého organismu. Ve vhodném prostředí ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, voda nebo TE pufr) ji lze dlouhodobě uchovávat. DNA je nositelem jedinečné genetické informace zdrojového organismu, proto bývá využívána jako důkaz přítomnosti daného organismu ve vzorku. DNA je tvořena dvěma vzájemně komplementárními řetězci, složenými z nukleotidů, které svým pořadím kódují genetickou informaci. Vazby mezi vlákny jsou teplotně nestabilní, při zvýšené teplotě dochází k reverzibilní denaturaci. Této vlastnosti se využívá i při analýze DNA. Prvním krokem k analýze DNA je její izolace ze vzorku. Výběr metody závisí na vlastnostech matrice, ze které chceme izolovat DNA. Obecně lze izolaci rozdělit do několika kroků [16; 17; 18]:

- Rozrušení buněčných stěn (využívá se například třecí miska společně s tekutým dusíkem)
- Porušení buněčných membrán (využití detergentů, př. SDS, CTAB)
- Inaktivace endogenních nukleáz přidávkem detergentů nebo EDTA, která na sebe váže dvojmocné ionty (Mg^{2+} , Mn^{2+}), fungující jako kofaktory nukleáz
- Přídavek proteinázy k inaktivaci a degradaci proteinů
- Separace polysacharidů
- Separace hydrofobních buněčných zbytků od DNA (lipidy, polyfenoly)

- Izolace a purifikace DNA například opakovaným alkoholovým srážením či pomocí pevných nosičů

Po odstranění hrubých nečistot může být DNA izolována a purifikována buď alkoholovým srážením nebo zachycením a promytím na pevném nosiči. Pevné nosiče obvykle mívají formu silikátových kolonek či magnetických částic [16].

Kvalitu DNA izolované z potravin rostlinného původu může snížit hned několik faktorů. Prvním z nich je přítomnost inhibitorů PCR (například polysacharidy nebo polyfenolické látky), které nejen ztěžují průběh PCR, ale také ruší spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA. Dalšími faktory jsou stupeň degradace (př. depurinace) DNA, průměrná délka fragmentů a další. Kvalita izolované DNA je ovlivněna nejen použitým izolačním postupem, ale i typem a zpracováním potravin. Například zvýšená teplota způsobuje štěpení větších molekul DNA a fyzikální nebo chemické ošetření způsobí náhodné štěpení molekuly DNA. Důležité je i pH potravin, protože kyselé pH způsobí hydrolytickou degradaci DNA a zkrácení fragmentů [16; 19; 20].

2.5.2. Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA

Spektrofotometrie je založená na principu Lambert-Beerova zákona. Tento zákon definuje vztah mezi absorpcí záření a vlastnostmi určité látky, kterou záření prochází. Absorpce záření roztoku je při konstantní vlnové délce záření a konstantní délce vrstvy měřeného roztoku přímo úměrná molární koncentraci [21].

Koncentrace DNA ve vzorku lze změřit pomocí UV spektrofotometrie nebo fluorimetricky. Spektrofotometrie určuje množství DNA molekul ve vzorku na základě UV absorpce. Při spektrofotometrickém stanovení koncentrace DNA ve vzorku je měřena absorbance UV světla o vlnové délce 260 nm. Výsledkem spektrofotometrického měření je koncentrace všech molekul DNA (i RNA) ve vzorku. Distribuce molekul DNA i přítomnost kontaminujících látek ve vzorku ovlivňuje správnost a přesnost měření [22].

Poměry absorbancí A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230} jsou ukazatele čistoty izolované DNA. DNA má absorpční maximum při vlnové délce 260 nm, kontaminující proteiny při 280 nm a chemické kontaminanty při vlnové délce 230 nm. Optimální rozsah hodnot poměru absorbancí A_{260}/A_{280} je 1,8 až 2,0. U poměru absorbancí A_{260}/A_{230} je optimální rozsah hodnot 1,4 až 2,0. Důležitá pro měření je i hodnota pH vzorku. Výkyvy pH výrazně ovlivňují poměr absorbancí A_{260}/A_{280} , protože DNA se při vyšším pH denaturuje a jako jednořetězcová má v UV oblasti vyšší absorbanci [23; 24].

2.5.3. PCR

Polymerázová řetězcová reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) je enzymová metoda používaná pro rychlou syntézu určitého úseku DNA *in vitro*. PCR má široké uplatnění, nejen při kontrole potravin (identifikace geneticky modifikovaných organismů, jakost potravin, falšování a další), ale také při diagnostice dědičných chorob, v kriminalistice či určení paternity a jiné. PCR slouží pro detekci i malého množství DNA ve vzorku (měla by stačit jediná molekula). Základem úspěšné reakce je neporušený úsek DNA, který chceme amplifikovat a volba správných primerů [25; 26; 27; 28].

Princip PCR spočívá v cyklickém opakování teplotního profilu v průběhu reakce, která obsahuje denaturaci, nasednutí primerů na matrici a elongaci. Na začátku reakce je při 90 až 97 °C denaturována DNA, kdy vzniknou dva řetězce. Poté při ochlazení na 55 až 65 °C nasedají na řetězce primery. Následně po zvýšení teploty na 72 °C začne TAQ polymeráza amplifikovat DNA. Poté se cyklus opakuje. Takto je ve vzorku naamplifikována určitá část DNA, kterou chceme zkoumat. Specifita reakce závisí právě na volbě primerů [26; 29; 28].

Pomocí PCR může být studována také kinetika degradace DNA za použití různých primerů. Výsledkem měření jsou amplikony (produkty) různé délky v samostatných testech nebo v jednom testu

(multiplex PCR). Stupeň degradace DNA má vliv na délku produktů, které se podaří amplifikovat. Je proto velmi důležité si zvolit vhodné primery, jinak může dojít k falešným negativním výsledkům při volbě primerů amplifikujících dlouhé fragmenty na degradovanou DNA. Pokud je pravděpodobné, že se ve vzorku nachází degradovaná DNA, je vhodné použít primery na kratší amplicony (do 150 bp) [18; 22].

Citlivost real-time PCR lze ovlivnit volbou a koncentrací složek ve vzorku a použitými chemikáliemi. Účinnost metody závisí také množství a čistotě DNA. Výsledek PCR může být ovlivněn i tzv. inhibitory. Inhibitory PCR jsou látky, které mají negativní vliv na funkci DNA polymerázy a znemožňují amplifikaci DNA během PCR. Prokazatelnými inhibitory jsou například ionty Ca^{2+} (používané na vysrážení polysacharidů a polyfenolických látek), EDTA, ethanol, fenol a další látky [16; 22; 29].

2.5.3.1. Real-time PCR

Real-time PCR je metoda využitelná mimo jiné pro kvantifikaci geneticky modifikovaných organismů v jídle, krmivu pro zvířata a další. Při real-time PCR je reakční směs obohacena o interkalační barviva schopná fluorescence po navázání na dvouřetězcovou DNA nebo o fluorescenční sondy, které během PCR hybridizují ke vznikajícím ampliconům a fluoreskují pouze v případě, že byla amplifikována cílová sekvence DNA. Číslo cyklu, ve kterém fluorescenční signál ampliconů překročí signál na pozadí se nazývá cyklus prahové hodnoty (cycle threshold – Ct). Při sběru dat o fluorescenci v průběhu PCR lze pozorovat, že nárůst fluorescence má esovitý charakter. Díky fluorescenčním barvivům a sondám lze vznik specifických PCR produktů sledovat v reálném čase (*real time*). Mezi interkalační barviva schopná fluorescence se řadí ethidiumbromid, SYBR Green, SYBR Gold či SYTO9. Výhodou práce s interkalačními barvivy jsou jejich nízká cena a univerzálnost. Mezi jejich nevýhody patří nespecifičnost. Fluorescenci ovlivňují jakékoliv nespecifické produkty nebo i dimery primerů [22; 26; 29; 30].

Jednou z výhod real-time PCR je i možnost kvantifikace produktů. Pomocí kalibrační křivky vytvořené z roztoků o známé koncentraci DNA, je možné z intenzity fluorescence určit množství DNA ve vzorku. Výhodou této metody je vysoká citlivost a specifita, možnost určení počtu genových kopií nebo reprodukovatelnost [22; 26; 29; 30].

2.5.4. Gelová elektroforéza

Kvalita izolované DNA i její amplifikace po PCR jsou snadno ověřitelné pomocí gelové elektroforézy. Pro analýzu DNA se nejčastěji využívá horizontální agarózová gelová elektroforéza. Tato elektroforéza se provádí umístěním gelu mezi dvě elektrody, mezi kterými prochází stejnosměrný proud [25].

DNA se separuje v elektrickém poli na základě velikosti náboje a molekulové hmotnosti. Doba elektroforetické separace je závislá nejen na délce gelu, ale také na protékajícím elektrickém proudu, použitém pufru a v neposlední řadě i na koncentraci agarózy v gelu. Agarózové gely jsou vhodné pro separaci fragmentů DNA od 100 párů bází (bp) do 25 000 bp. Při tvorbě gelu polymery agarózy vytvoří síť, která má přesně definované póry. Koncentrace agarózy v gelu souvisí s velikostí pórů. Čím vyšší koncentrace, tím menší póry a větší rozlišovací schopnost gelu. Pro elektroforézu DNA vzorků se používají koncentrace agarózy od 0,5 až 2% [16; 31; 32].

Po skončení elektroforézy jsou fragmenty DNA detekovány nejčastěji pomocí interkalačních barviv, jako je například ethidium bromid. Ethidium bromid se váže na DNA molekulu a při excitaci UV zářením vyzařuje fluorescenční záření, které je zaznamenáno přístrojem pro další analýzu. Ethidium bromid není jediné barvivo pro zobrazení DNA po gelové elektroforéze. Používá se i fluorescein nebo rhodamin. Pro kontrolu délky fragmentů se obvykle doprostřed gelu zavádí délkový standard obsahující fragmenty definované délky [16; 31; 32; 33].

2.5.5. Vysokoučinná kapalinová chromatografie

High-performance liquid chromatography (HPLC) neboli vysokoučinná kapalinová chromatografie je jedna z chromatografických metod, používaných pro separaci a analýzu chemických směsí. HPLC má několik výhod [34; 35; 36]:

- takřka univerzální (využití při zkoumání potravin, výroba léčiv, v průmyslu a další)
- přesná ($\pm 0,5$ % nebo i menší v některých případech)
- komerčně dostupná široká škála příslušenství, kolon a dalších materiálů

S metodou HPLC se setkáváme už více než 50 let. V dnešní době se tato metoda používá nejen v analytických laboratořích, ale i pro klinické účely, forenzní analýzu, analýzu potravin a další. HPLC lze využít také na odhalení falšovaných potravin, například analýzou sacharidového profilu nebo profilu fenolických látek v analyzované potravine. V posledních dvaceti letech se HPLC metoda velmi zdokonaluje, ať už zmenšováním rozměrů kolon a částic stacionárních fází nebo novými detekčními systémy. Pro větší přesnost bývá HPLC metoda kombinovaná s hmotnostní spektrometrií [27; 34; 37].

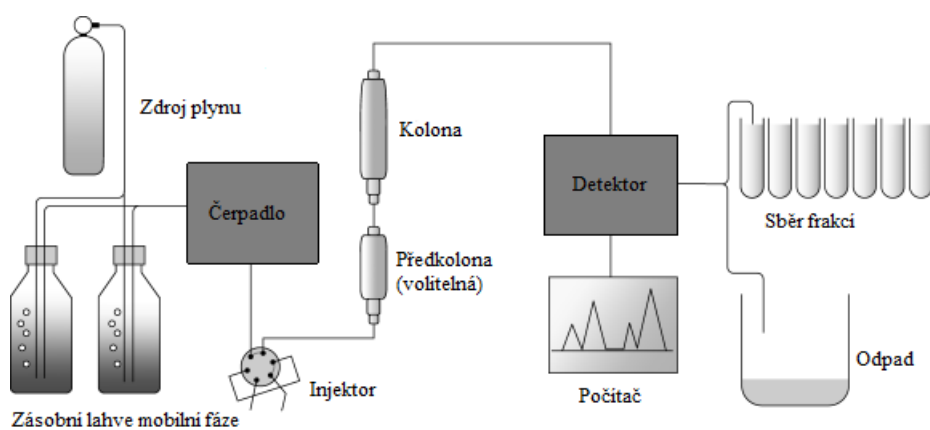
Chromatografie patří mezi separační analytické metody. Ty jsou založené na různé afinitě studovaných látek ke dvěma fázím, mobilní fázi a stacionární fázi. Stacionární fáze může být v případě kapalinové chromatografie buďto pevná nebo kapalná. V případě kapalné stacionární fáze je kapalina pevně vázána na sorbent. Stacionární fáze se nachází v koloně a mobilní fáze skrz ni protéká společně se vzorkem. Vzorek, jako směs látek, je vpraven do kolony spolu s mobilní fází a je rozdělen na frakce, podle toho, jak je daná složka zadržována stacionární fází. Takto jsou ze vzorku separovány jednotlivé složky, které jsou poté analyzovány detektorem v pořadí od nejméně zadržované složky až po nejsilněji zadržované složky [32; 37].

Při HPLC je mobilní fáze vháněna do systému pomocí čerpadla za vysokého tlaku. Důležitým krokem je také odplynění mobilní fáze, protože přítomné bubliny, které se vytvořily v průběhu čerpání, mohou způsobit horší separaci látek a slabou detekci [32; 37].

Metoda HPLC je v dnešní době plně automatizovaná. Uživatel vloží do stroje ampulky se vzorky, ze kterých si následně přístroj pomocí jehly sám nabere určité množství na analýzu. Rozpouštědlo je neustále pumpováno skrz kolonu a separované složky jsou analyzované na detektoru, který je umístěn hned za kolonou. Signál z detektoru je zaznamenáván do grafu jako funkce času, čímž vzniká chromatogram. Celý proces je ovládán pomocí počítače, který také následně analyzuje vzorek. Pro HPLC metodu je charakteristické použití vysokotlakého čerpadla pro rychlejší separaci, dále se využívá znovu použitelná a více efektivní kolona. Nad celým procesem je díky automatizaci lepší kontrola pro přesnější a reprodukovatelné výsledky. Důležité pro vyhodnocení jsou retenční časy látek neboli doba, než látka projde kolonou. Retenční časy a UV-VIS spektrum je velmi důležité pro určení druhu látky [34; 38].

Pro chromatografickou separaci fenolických látek jsou nejčastěji využívány kolony naplněné reverzní stacionární fází. Používané kolony pro tuto metodu jsou dlouhé 150 až 250 mm, s vnitřním průměrem 2,1; 3,0 či 4,6 mm. Stacionární fáze v kolonách je tvořena silikagelem, na kterém jsou navázané uhlovodíkové řetězce s délkou C8 a C18. Mobilní fázi většinou tvoří směs dvou kapalin – mírně kyselý vodný roztok (obsahující kyselinu mravenčí, octovou či trifluoroctovou) a organické rozpouštědlo. Slabě kyselé prostředí zajistí vyšší retenci polyfenolů (slabě kyselá látka) na koloně. Detekce probíhá nejčastěji kombinací DAD (spektrofotometrický s diodovým polem) a FLD (fluorescenční) či MS (hmotnostní spektrometr) detektorů. DAD detektor se využívá na rozpoznání látek s aromatickými kruhy. FLD detektor se používá na rozpoznání látek, které jsou schopny vlastní fluorescence. Kombinací těchto dvou detektorů je zajištěna vysoká selektivita pro stanovení látek ve vzorku. MS detektor je také

vhodný, avšak jeho používání v praxi je velmi nákladné. HPLC s vybraným typem detekce nám může poskytnout nejen kvalitativní ale i kvantitativní údaje [39].



Obr. 1 - Schéma HPLC (zdroj [35])

3. CÍL PRÁCE

- Vypracování literární rešerše
 - Izolace DNA
 - Složení testovaných výrobků
 - Principy metod využitých v experimentální části práce
- Příprava modelových vzorků potravin a jejich opakovaná charakterizace pomocí vybraných molekulárních a instrumentálních metod
- Vyhodnocení a diskuse výsledků

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Modelové vzorky

K izolaci DNA a přípravě modelových vzorků bylo použito ovoce (jablka a broskve) zakoupené v obchodním řetězci. Pro pozitivní kontroly byla DNA také izolována z listu příslušných stromů (jabloň a broskvoň).

4.2. Vybavení laboratoře

4.2.1. Chemikálie

- Agaróza pro gelovou elektroforézu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- FastGene 100 bp DNA standard (NIPPON Genetics EUROPE, Düren, Německo)
- FastGene 50 bp DNA standard (NIPPON Genetics EUROPE, Düren, Německo)
- Midori Green Advance DNA Stain (NIPPON Genetics EUROPE, Düren, Německo)
- PCR ultra H₂O (Top-Bio, ČR)
- PCR loading buffer Red load (Top-Bio, ČR)
- qPCR 2x SYTO-9 M.MIX (Top-Bio, ČR)
- Polyvinylpyrrolidon (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethanol (Lachner, ČR)
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina – EDTA (Penta, ČR)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan – Tris-báze (Serva, Německo)
- Kyselina boritá (Penta, ČR)
- Primery (Generi Biotech, ČR)

4.2.2. Komerční kit

- Invitrogen ChargeSwitch gDNA Plant Kit (Thermo Fisher Scientific corporation, USA)
- EliGene Plant DNA Isolation Kit (Elisabeth Pharmacon, Brno, ČR)

4.2.3. Přístroje a pomůcky

- Combi-spin FVL-2400 N Mini centrifuge (Biosan, Německo)
- Centrifuga Z216 MK (Hermle, Německo)
- DNA/RNA UV-cleaner box UVC/T-AR (Biosan, Švýcarsko)
- HPLC sestava: Dionex UltiMate 3000 series (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Laboratorní váhy KERN CM 60-2N (UNIPRO-ALPHA, ČR)
- Lyofilizátor FreeZone Triad (Labconco, USA)
- Mikrovlnná trouba (Sencor, ČR)
- Mini inkubátor LABNET 230 V (Thermo Fisher Scientific, USA)
- MS2 Minishaker Vortexer (IKA Works, Německo)
- NanoDrop Spectrophotometer 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA)

- Implen NanoPhotometer N60 (Westlake Village, USA)
- Pipety Acura Manual 825 (Socorex, Švýcarsko)
- Pipety Discovery Comfort (HTL, Polsko)
- Pipety BioPette (Labnet International, USA)
- Pipety Finnpiette (ThermoFisher Scientific, USA)
- Eppendorf mikrozkuhavky – různé velikosti (Hamburk, Německo)
- Termocykler Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Nizozemí)
- Termocykler LightCycler Nano (Roche, Švýcarsko)
- Transluminátor Azure Biosystems c200 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Ultrazvuková lázeň PS 02000 (POWERSONIC, Čína)
- Zařízení pro elektroforézu EasyCast (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300V (Labnet International, USA)
- Laboratorní pomůcky – špičky, buničina, laboratorní sklo, pinzeta a jiné

4.3. Metody

4.3.1. Příprava modelových vzorků

Modelové vzorky byly připraveny obdobným způsobem jako jiné dětské příkrmy nebo pyré. Jablka a broskve byly oloupany, odpeckovány a nakrájeny na malé kousky. Ovoce bylo podlito vodou a bylo vařeno odděleně na mírném plameni do změknutí. Rozvařené ovoce bylo rozmělněno mixérem.

Jablečné a broskvové pyré byly smíchány v objemovém poměru, který je uveden v Tabulka 1. Celkový objem každého vzorku byl 75 ml. Modelové vzorky byly zpracovány pouze jako čisté ovocné pyré bez přídavku cukru či jiných konzervantů.

Tabulka 1 - Složení modelových vzorků

číslo vzorku	jablko [%]	broskev [%]
1	100	0
2	0	100
3	50	50
4	70	30
5	80	20

Vzorky byly rozděleny do zásobních zkuhovek do 4 sérií. Doba uložení vzorků je uvedena v Tabulka 2. Všechny vzorky byly skladovány v chladničce při teplotě 3 až 5 °C. Bezprostředně před dalším zpracováním byla každá série vzorků lyofilizována.

Tabulka 2 - Doba uložení vzorků v chladničce

Série	Doba uložení
1.	1 týden
2.	10 týdnů
3.	18 týdnů
4.	22 týdnů

4.3.2. Izolace rostlinné DNA pomocí kitu

4.3.2.1. Izolace DNA z listu pomocí kitu *EliGene*

Do 1,5ml Eppendorfovy zkumavky bylo naváženo 0,2 g homogenizačního písku a 0,05 g listu. Do zkumavky bylo poté napipetováno 450 μ l homogenizačního pufru P1. Po homogenizaci tloučkem bylo přidáno 50 μ l lyzačního pufru P2, krátce zvortexováno a poté byla zkumavka ponechána 10 minut při teplotě 65 °C v inkubátoru. Následně byl vzorek centrifugován na 3 minuty při otáčkách 10 000 \times g a teplotě 22 °C. Do čisté zkumavky byl odpipetován supernatant, bylo přidáno k němu 175 μ l pufru P3 a směs byla krátce zvortexována. Následně byl vzorek ponechán v mrazáku po dobu 5 minut. Po inkubaci byl vzorek centrifugován 3 minuty při 10 000 \times g za laboratorní teploty.

Supernatant byl napipetován do čisté 2ml Eppendorfovy zkumavky, k němu bylo přidáno 500 μ l pufru P4 a směs byla zvortexována. Následně bylo přidáno 500 μ l pufru P5 a směs byla opět zvortexována. Poté bylo 750 μ l směsi převedeno do Eppendorfovy zkumavky se silikátovou kolonkou a centrifugováno při 10 000 \times g 1 minutu. Následně se tyto kroky opakovaly se zbytkem směsi. Kolonka byla přemístěna do nové 2ml sběrné zkumavky a byla promyta 500 μ l pufru P6 v centrifuze při 10 000 \times g na 1 minutu. Obsah sběrné zkumavky byl vylit a kolonka byla vložena zpátky do stejné sběrné zkumavky a promyta 500 μ l pufru P7 v centrifuze při 10 000 \times g na 1 minutu. Po vylití zbytku ze sběrné zkumavky byla kolonka opět vložena zpět do stejné sběrné zkumavky a byla sušena centrifugací při 12 000 \times g na 2 minuty.

Kolonka byla poté přemístěna do nové sběrné zkumavky a zachycená DNA byla eluována 100 μ l elučního pufru P8 a centrifugována při 10 000 g na 1 minutu. Koncentrace a čistota izolované DNA byly stanoveny spektrofotometricky pomocí přístroje NanoDrop2000 (kap. 4.3.3.) proti elučnímu pufru P8.

4.3.2.2. Izolace DNA ze vzorků pomocí kitu *Invitrogen s magnetickými částicemi*

Izolace DNA z ovocných pyré byla provedena pomocí izolačního protokolu kitu s magnetickými částicemi. Kvůli předpokládané přítomnosti polysacharidů a polyfenolů byla nutná příprava Reagentu A pro každou sérii vzorků. Reagent A byl připraven smícháním 44,1 mg chloridu vápenatého a 150 mg polyvinylpyrrolidonu společně s 1 ml lyzačního pufru L18. Následně bylo 600 μ l reagentu A smícháno s 5,4 ml pufru L18. Takto upravený pufr byl dále použit pro přípravu hrubých lyzátů. 60 mg lyofilizovaného vzorku bylo smícháno ve 2ml eppendorfově zkumavce s 1 ml lyzačního pufru s reagentem A a 2 μ l RNasy A (5 mg/ml). Vzorek byl následně důkladně zvortexován, dokud se veškerý obsah nerozmíchal. Následně bylo přidáno 100 μ l 10% SDS a vzorek byl 5 minut inkubován při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby bylo ke vzorku přidáno 400 μ l srážecího pufru N5. Vzorek byl následně krátce zvortexován, dokud se nevytvořil bílý zákal v celé zkumavce. Poté byl vzorek centrifugován při 12 000 \times g 5 minut. Supernatant byl poté opatrně přepipetován do čisté 1,5ml eppendorfovy zkumavky.

Po zvortexování roztoku magnetických částic, z něj bylo 40 µl napipetováno do zkumavky se vzorkem společně s 100 µl 10% detergentu D1. Vzorek byl promíchán pipetou opětovným nasáváním. Po 1 minutě inkubace při laboratorní teplotě byla zkumavka se vzorkem přemístěna do magnetického stojanu, aby došlo k separaci magnetických nosičů z roztoku. Aniž by byla zkumavka ze stojanu vytažena, byl odpipetován supernatant. Poté už mohla být zkumavka vytažena z držáku a k nosičům byl napipetován 1 ml promývacího pufru W12 a opětovným nasáváním pipetou byl vzorek promíchán, aniž by se vytvořily bubliny. Zkumavka byla vložena do magnetického držáku a po separaci magnetických nosičů byl odpipetován supernatant. Promývání bylo opakováno s 1 ml promývacího pufru W12.

K nosičům bylo přidáno 150 µl elučního pufru E6 a opětovným nasáváním pipetou byl obsah zkumavky důkladně promíchán. Vzorek byl inkubován při pokojové teplotě 1 minutu a po uplynutí této doby byla zkumavka vložena do magnetického stojanu. Supernatant s DNA byl převeden do 1,5ml eppendorfovy zkumavky pro uchování v lednici. Stejně jako v případě DNA z listu, byla i DNA ze vzorků proměřena nanospektrofotometrem pro zjištění její čistoty a koncentrace proti elučnímu pufru E6.

4.3.3. Spektrofotometrické měření

Izolovaná DNA byla proměřena spektrofotometrem, aby byla zjištěna čistota a koncentrace DNA. Měřeno bylo celé absorpční spektrum v rozsahu 220 až 340 nm, vždy proti čistému elučnímu pufru z kitu, kterým byla daná DNA izolována. Množství naneseného vzorku na spektrofotometr bylo 2 µl.

4.3.4. Real-time PCR

Zkumavky o objemu 0,2 ml určené pro měření v RotorGene byly nachystány do stojánku společně s Eppendorfovou zkumavkou na 1,5 ml v boxu a ten byl vysvícen UV světlem na 15 minut. Komponenty na PCR byly vytaženy z mrazáku a byly ponechány při pokojové teplotě, aby rozmrzly. Všechny vzorky byly připravovány v duplikátech, stejně jako negativní a pozitivní kontrola. Pro všechny vzorky v rámci jedné PCR analýzy byl míchán jeden mastermix, kdy na jeden vzorek připadalo množství komponent, které je vypsáno v Tabulka 3.

Tabulka 3 - Komponenty na PCR

Komponenta	Množství [µl]
H ₂ O	9,5
SYTO	12,5
Primer 1	1
Primer 2	1
DNA	1
celkem	25

Pro real-time PCR analýzy byly použity dva páry primerů – ITS2 a 26S. Po real-time PCR byla přítomnost specifických produktů ověřena analýzou křivek tání a agarózovou gelovou elektroforézou.

Tabulka 4 - Sekvence použitých primerů

Primer	Sekvence 5' → 3'	Zdroj
ITS2 – F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	[40]
ITS2 – R	ACGCTTCTCCAGACTACAAT	[40]
26S – F	GAATTCACCCAAGTGTGGGAT	[41]
26S – R	AGAGGCGTTCAGTCATAATC	[41]

Po namíchání mastermixu – voda, SYTO a primery, byly tyto komponenty vráceny do mrazáku, protože jsou foto a termolabilní. Po rozpipetování mastermixu do zkumavek, byly reakční směsi přeneseny do druhého vysvíceného boxu, kde k nim byla přidána DNA. Zkumavky byly stočeny, vloženy do rotoru přístroje RotorGene 6000 a zajištěny pojistkou. V software přístroje byl nastaven teplotní profil, který je uveden v Tabulka 5.

Tabulka 5 - Teplotní profil ITS2 i 26S primerů

fáze	teplota [°C]	čas [s]
hold	95	300
cycling opakování 35x	95	30
	52	30
	72	45
hold	72	600
melting	50-99	5 s/1 °C

Po dokončení amplifikace byla PCR vyhodnocena analýzou křivek tání. Výsledky analýzy byly poté ověřovány gelovou elektroforézou.

4.3.5. Gelová elektroforéza

Pro gelovou elektroforézu byl připraven gel z 1,2 % agarózy a 0,5x TBE pufr (EDTA + tris-báze + kyselina boritá). 1,2 g agaróza byla navážena do Erlenmayerovy baňky a zalita 100 ml 0,5x TBE pufrem. Tato směs byla několikrát přivedena k varu v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění agarózy. Do rozpuštěné agarózy bylo přidáno 5 µl interkalačního barviva MIDORI GREEN. Forma na gel byla oblepena izolační páskou a po mírném zchladnutí agarózy byla směs nalita do formy a vložen hřebínek na potřebný počet vzorků. Gel byl ponechán zatuhnout 20 minut při laboratorní teplotě. Poté, když byl gel tuhý, byly odlepeny pásky a vzorky s barvivem v poměru 5:1 (5 dílů vzorku na 1 díl barviva) byly nanášeny do jamek v množství 10 µl, Mezi kontroly a vzorky bylo nanášeno 5 µl délkového standardu. Gel se vzorky byl přenesen do elektroforetické vany a tam byl opatrně zalit čistým 0,5x TBE pufrem až po značku. Poté byla vana uzavřena víkem a zapojena do zdroje napětí a zdroj byl nastaven na 2 hodiny při 80 V. Po dokončení elektroforézy byl gel opatrně vytažen z vany a byl vyfocen na přístroji AZURE po osvětlení UV zářením o vlnové délce 302 nm.

4.3.6. HPLC

Vzorek o hmotnosti 5 g byl lyofilizován a byla zaznamenána jeho konečná hmotnost. K lyofilizovanému vzorku bylo přidáno 5 ml 70% ethanolu. Vzorek byl ultrazvukován při 40 kHz 60 minut při laboratorní teplotě. Poté byl vzorek centrifugován 10 minut při $10\,000 \times g$. Supernatant (extrakt) byl odpipetován do čisté zkumavky a skladován v mrazáku až do analýzy. Extrakty všech vzorků byly těsně před vložením do přístroje znovu zcentrifugovány na 10 minut při $10\,000 \times g$ a do vialek bylo napipetováno 400 μ l supernatantu. Vialky byly poté vloženy do přístroje.

Jako mobilní fáze v HPLC kvalitě byly použity 0,1% vodný roztok (miliQ) kyseliny trifluoroctové (fáze A) a 100% acetonitril (fáze B). Pro analýzu byla použita gradientová eluce pro dávkování mobilních fází. Harmonogram dávkování: 10 % B (0-5 minut); 12-25 % B (5-10 minut); 25-40 % B (10-15 minut); 40-55 % B (15-20 minut); 55-70 % B (20-22 minut) a nakonec 70-90 % B (22-30 minut).

Výsledný chromatogram byl vyhodnocován v programu Chromeleon. Z chromatogramů byly analyzovány fenolické látky. Látky byly identifikovány podle UV/VIS spektra při 260 nm a retenčního času v porovnání se standardy základních fenolických látek.

5. Výsledky a diskuse

5.1. Stanovení koncentrace a čistoty

Koncentrace a čistota byly stanoveny u všech izolovaných DNA. Výsledky spektrofotometrického měření jsou uvedeny v Tabulka 6 a Tabulka 7. Měření bylo vždy provedeno třikrát.

Tabulka 6 - Spektrofotometrické měření listů na pozitivní kontroly

vzorek	koncentrace [ng/μl]	A 260/280	A 260/230
list jabloně	75,1 ± 0,5	2,007 ± 0,015	1,72 ± 0,03

Tabulka 7 - Spektrofotometrické měření vzorků DNA

série	vzorek	koncentrace [ng/μl]	A 260/280	A 260/230
1	jablko	15,1 ± 0,5	0,527 ± 0,006	0,1 ± 0,0
	broskev	10,0 ± 2,9	0,79 ± 0,14	0,17 ± 0,05
	50/50	2,8 ± 0,7	0,54 ± 0,12	0,10 ± 0,03
	70/30	5,3 ± 0,9	0,75 ± 0,13	0,14 ± 0,01
	80/20	5,4 ± 0,6	0,533 ± 0,006	0,1 ± 0,0
2	jablko	3,3 ± 0,7	2,1 ± 0,7	0,18 ± 0,04
	broskev	6,9 ± 1,3	1,8 ± 0,3	0,26 ± 0,03
	50/50	6,3 ± 0,6	1,02 ± 0,11	0,161 ± 0,013
	70/30	5,8 ± 1,8	1,04 ± 0,12	0,14 ± 0,02
	80/20	3,5 ± 0,9	2,6 ± 1,3	0,22 ± 0,02
3	jablko	12 ± 3	0,66 ± 0,06	0,123 ± 0,008
	broskev	9,1 ± 0,4	1,32 ± 0,09	0,29 ± 0,03
	50/50	12,1 ± 0,7	1,07 ± 0,14	0,218 ± 0,011
	70/30	6,4 ± 0,9	1,4 ± 0,3	0,30 ± 0,02
	80/20	13 ± 0,4	0,432 ± 0,018	0,079 ± 0,002
4	jablko	6,0 ± 1,2	1,16 ± 0,13	0,43 ± 0,06
	broskev	18,8 ± 1,8	0,95 ± 0,17	0,29 ± 0,03
	50/50	10,6 ± 0,9	0,63 ± 0,04	0,14 ± 0,02
	70/30	1,8 ± 0,5	1,36 ± 0,12	0,504 ± 0,008
	80/20	10,3 ± 0,7	0,67 ± 0,07	0,14 ± 0,05

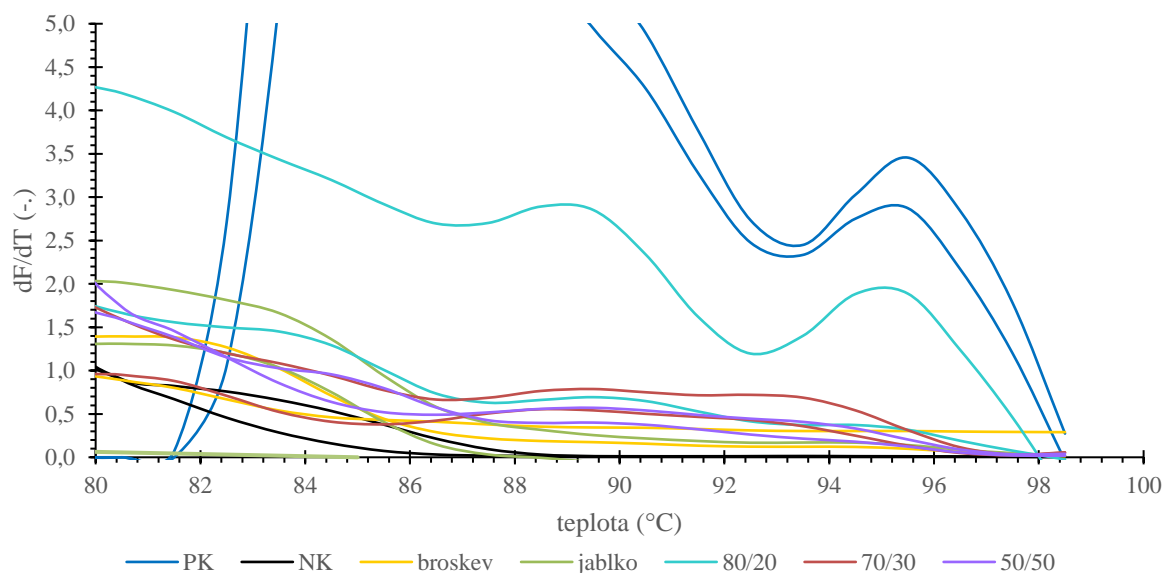
Koncentrace byla více než $75 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, proto musela být zředěna na $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. DNA listu jabloně byla používána jako pozitivní kontrola při PCR.

Koncentrace jednotlivých vzorků byla ve většině případů menší než $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Z poměrů A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230} lze vyčíst, že vzorky DNA nebyly čisté ani v jednom případě. Nízké hodnoty byly způsobeny kontaminanty jako proteiny, fenolické látky či magnetické částice z kytu. Svoji roli zde hrála i nízká hodnota pH vzorků, ze kterých byla DNA izolována. Nízké pH, mechanické a tepelné opracování vzorků poškodilo DNA, proto se hůře izolovala a byla takto znečištěná. Podle výsledků není možné vypořizovat závislost hodnoty koncentrace a čistoty na době skladování.

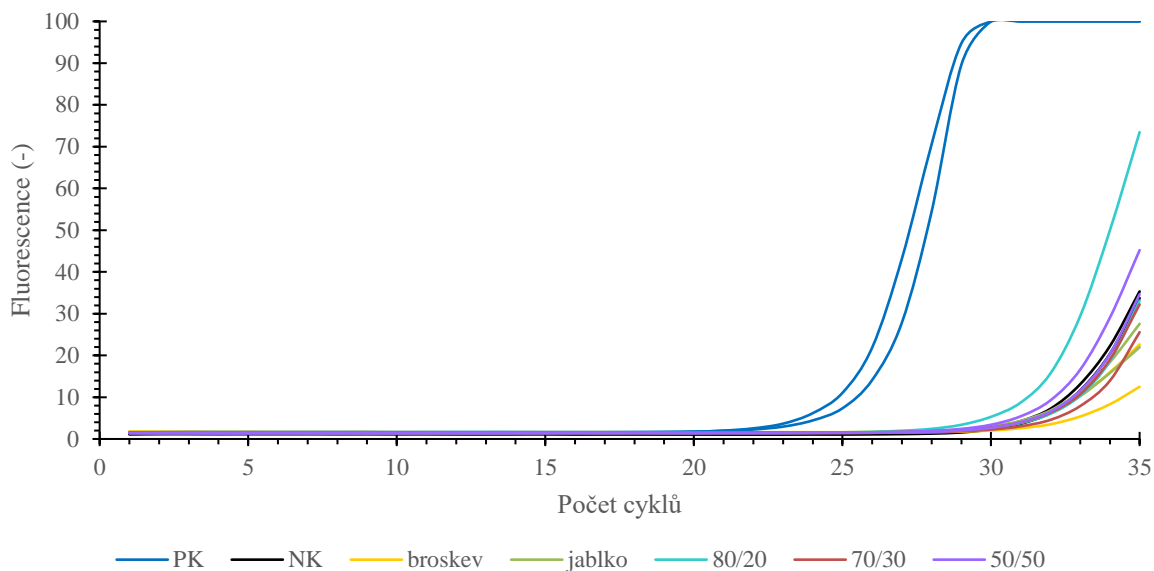
5.2. PCR a gelová elektroforéza

5.2.1. PCR a gelová elektroforéza DNA první série vzorků

První série vzorků byla lyofilizovaná po jednom týdnu skladování a DNA byla izolovaná kitem s magnetickými částicemi. Pozitivní kontroly se začaly amplifikovat při 23. cyklu, vzorky 80/20 se začaly amplifikovat při 29. cyklu, ostatní vzorky až při 30. a pozdějším cyklu.

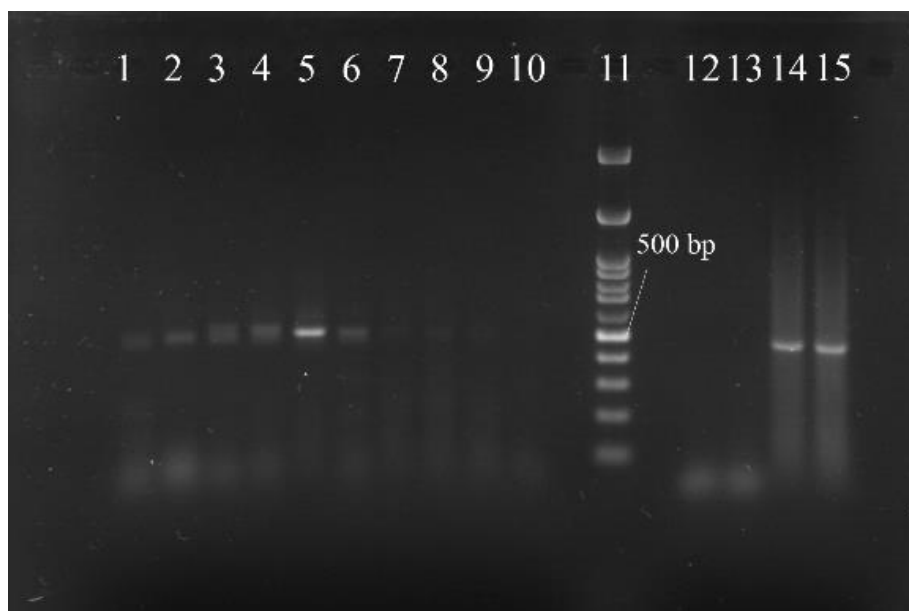


Graf 1 - Amplifikační křivka první série vzorků (primery ITS2) izolované kitem INVITROGEN



Graf 2 - Výřez křivek tání specifických produktů PCR první série (primery ITS2) izolované kitem INVITROGEN

Analýzou křivek tání bylo zjištěno, že specifické produkty vznikly u vzorků 80/20, 70/30 a 50/50. To se také prokázalo při gelové elektroforéze, jejíž výsledek je vyobrazen na Obr. 2. Specifické produkty byly na gelu detekovány u vzorků 80/20, 70/30 a 50/50.

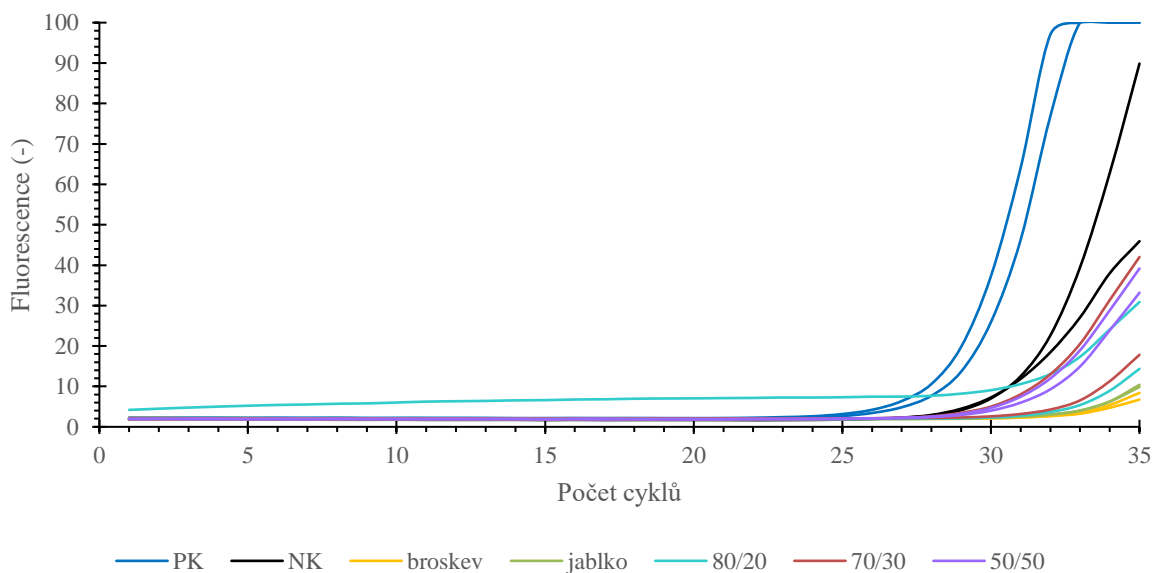


Obr. 2 - Agarózová gelová elektroforéza první série (primery ITS2) izolovaná kitem INVITROGEN

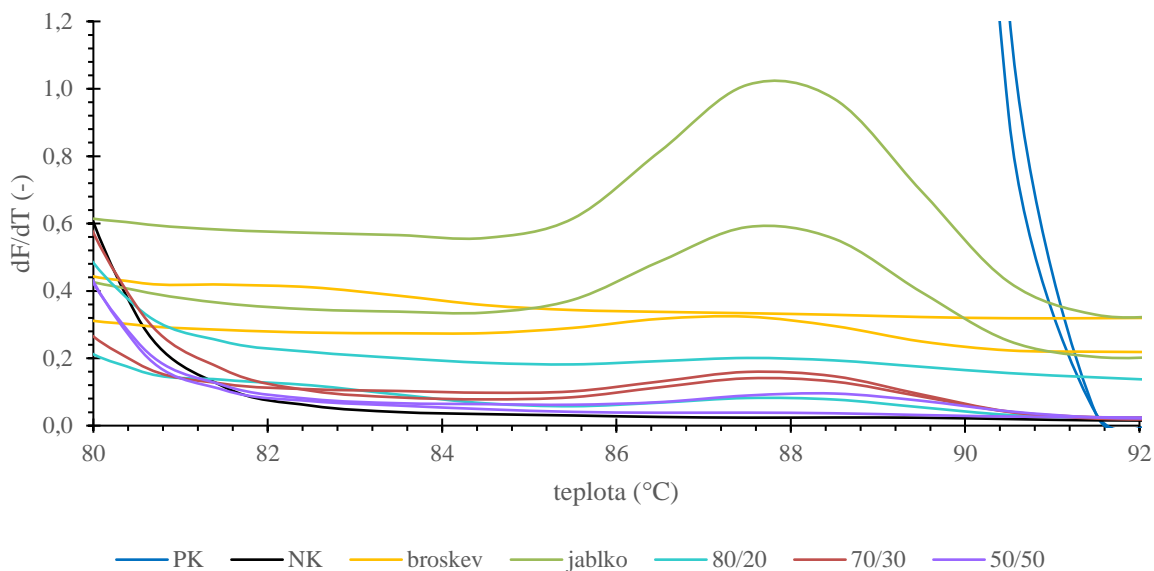
Tabulka 8 - Seznam nanesených vzorků na gelovou elektroforézu a jejich detekce (+ detekováno, - nedetekováno)

Běh	Vzorek	Detekce	Běh	Vzorek	Detekce
1	50/50	+	9	broskev	-
2		+	10		-
3	70/30	+	11	Délkový standard (po 100 bp)	
4		+	12		NK
5	80/20	+	13		-
6		+	14	PK	+
7	jablko	-	15		+
8		-	---	---	---

DNA izolovaná ze vzorků první série byla amplifikována ještě v real-time PCR s primery 26S, které amplifikují kratší fragmenty než ITS2. Ve vzorcích z ovocných pyré bylo očekáváno větší množství kratších fragmentů (degradovaná DNA) z důvodu pH prostředí a tepelné úpravy vzorků. Pozitivní kontroly se začaly amplifikovat ve 26. cyklu, ostatní vzorky až po 30. cyklu.

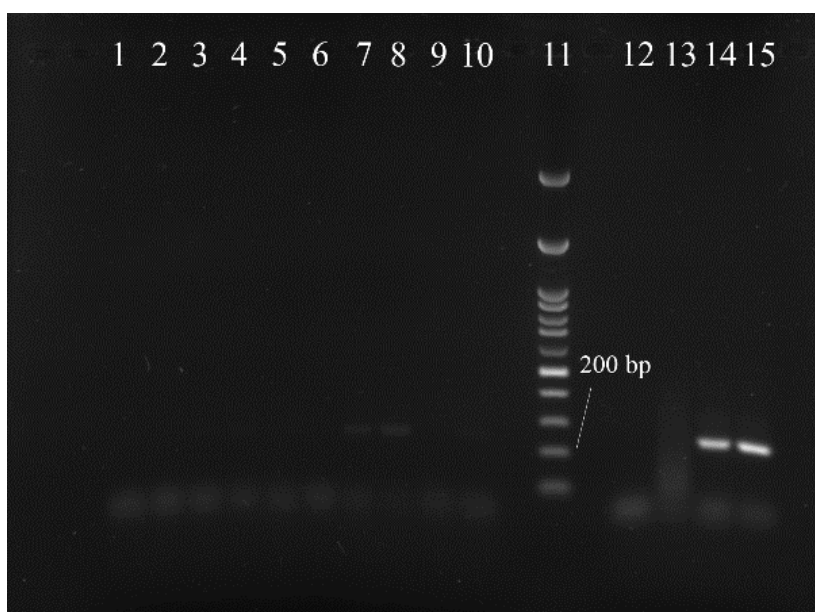


Graf 3 - Amplifikační křivka první série vzorků (primery 26S) izolované kitem INVITROGEN



Graf 4 - Výřez křivek tání specifických produktů PCR první série (primery 26S) izolované kitem INVITROGEN

Teplota tání specifických produktů u pozitivních kontrol byla 87 °C (Graf 18). V Graf 4 lze vidět, že se amplifikovala pouze DNA z čistého jablečného pyré. Ostatní vzorky splývají se šumem pozadí. Gelová elektroforéza (Obr. 3) se vzorky první série amplifikované primery 26S potvrdila výsledky analýzy křivek tání – bandy specifických produktů jsou viditelné pouze u pozitivních kontrol a vzorků z jablečného pyré.



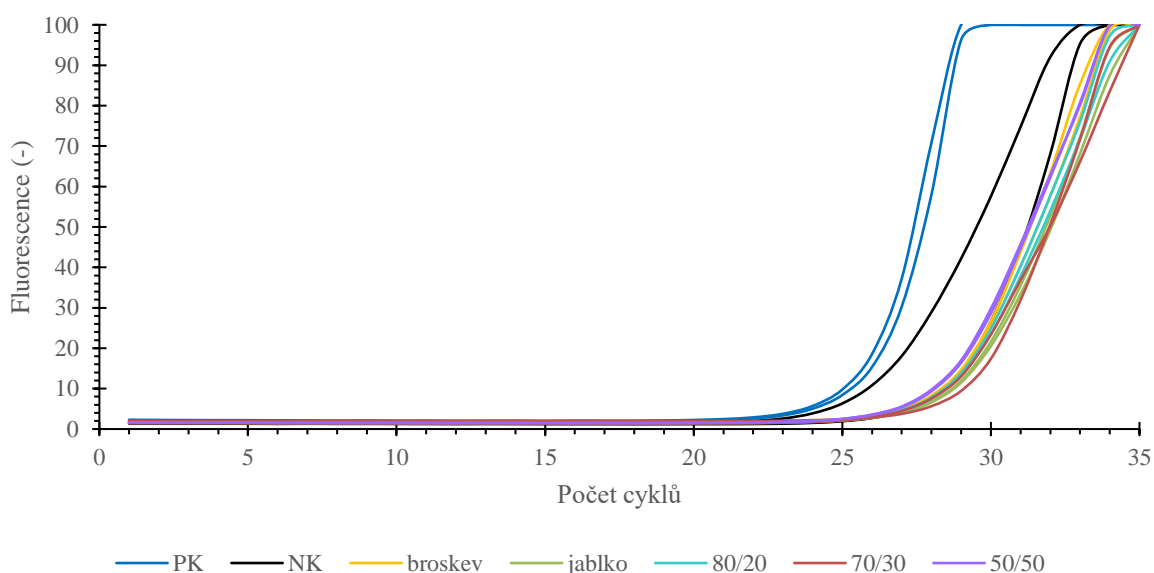
Obr. 3 - Agarózová gelová elektroforéza první série (primery 26S) izolovaná kitem INVITROGEN

Tabulka 9 - Seznam nanesených vzorků na gelovou elektroforézu a jejich detekce (+ detekováno, - nedetekováno)

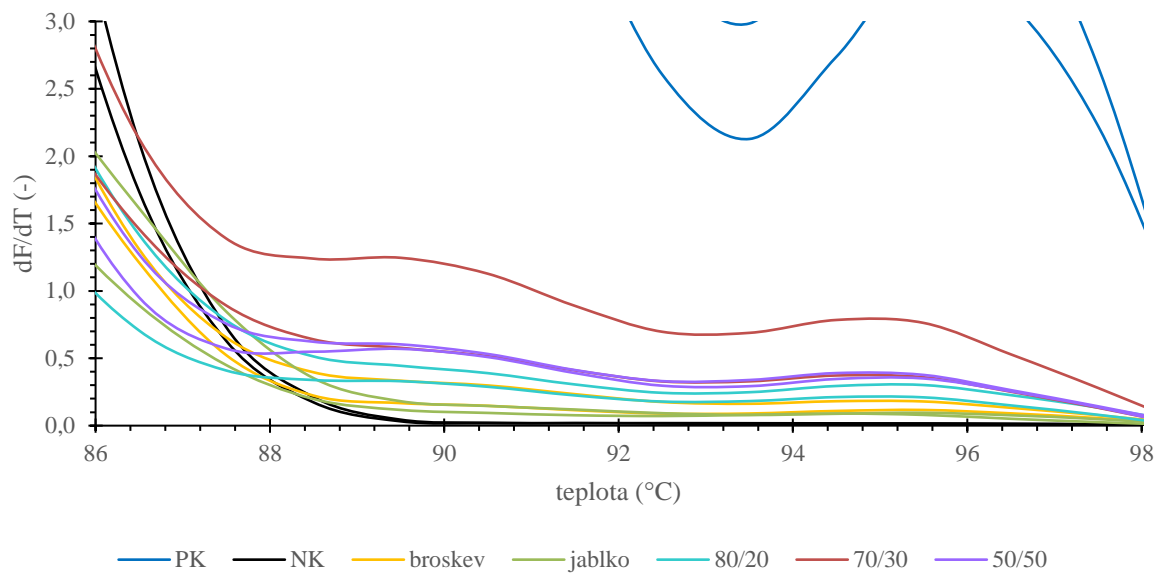
Běh	Vzorek	Detekce	Běh	Vzorek	Detekce
1	50/50	-	9	broskev	-
2		-	10		-
3	70/30	-	11	Délkový standard (po 100 bp)	
4		-	12	NK	-
5	80/20	-	13		-
6		-	14	PK	+
7	jablko	-	15		+
8		-	---	---	---

5.2.2. PCR a gelová elektroforéza DNA druhé série vzorků

Druhá série vzorků byla lyofilizovaná po deseti týdnech skladování a DNA byla izolovaná kitem s magnetickými částicemi. V Graf 5 se pozitivní kontroly začaly amplifikovat při 24. cyklu. Ostatní vzorky se začaly amplifikovat při 28. cyklu.

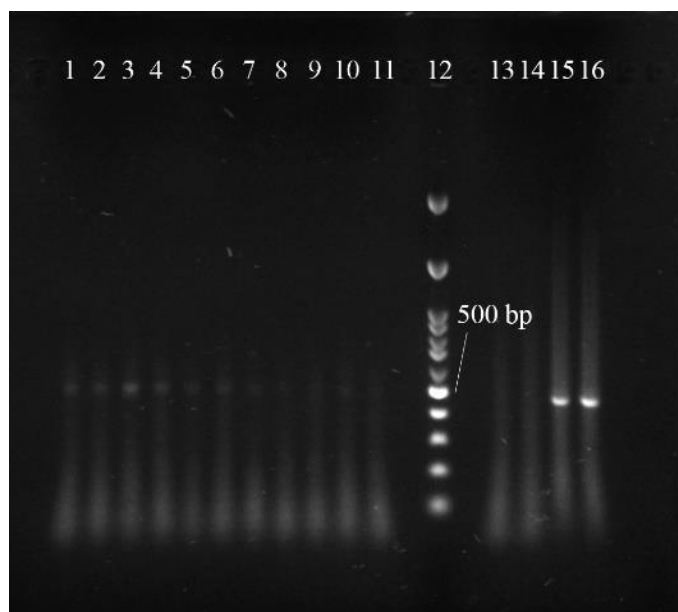


Graf 5 - Amplifikační křivka druhé série vzorků (primery ITS2) izolované kitem INVITROGEN



Graf 6 - Výřez křivek tání specifických produktů PCR druhé série (primery ITS2) izolované kitem INVITROGEN

V Graf 6 lze vidět, že se amplifikovala DNA všech modelových vzorků. Gelová elektroforéza (Obr. 4) potvrdila výsledky analýzy křivek tání.

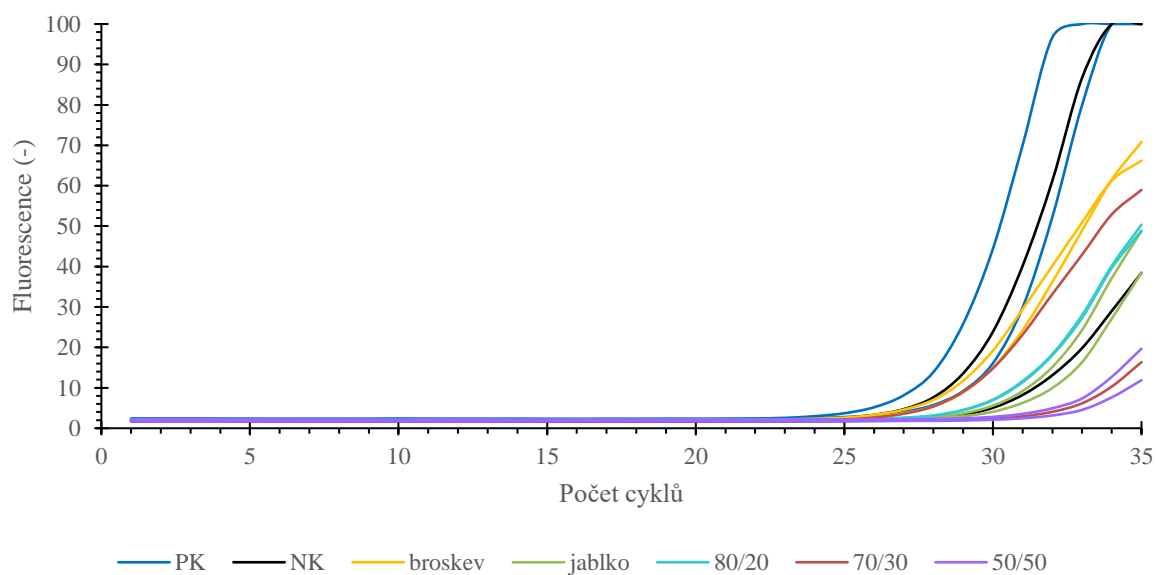


Obr. 4 - Agarózová gelová elektroforéza druhé série (primery ITS2) izolovaná kitem INVITROGEN

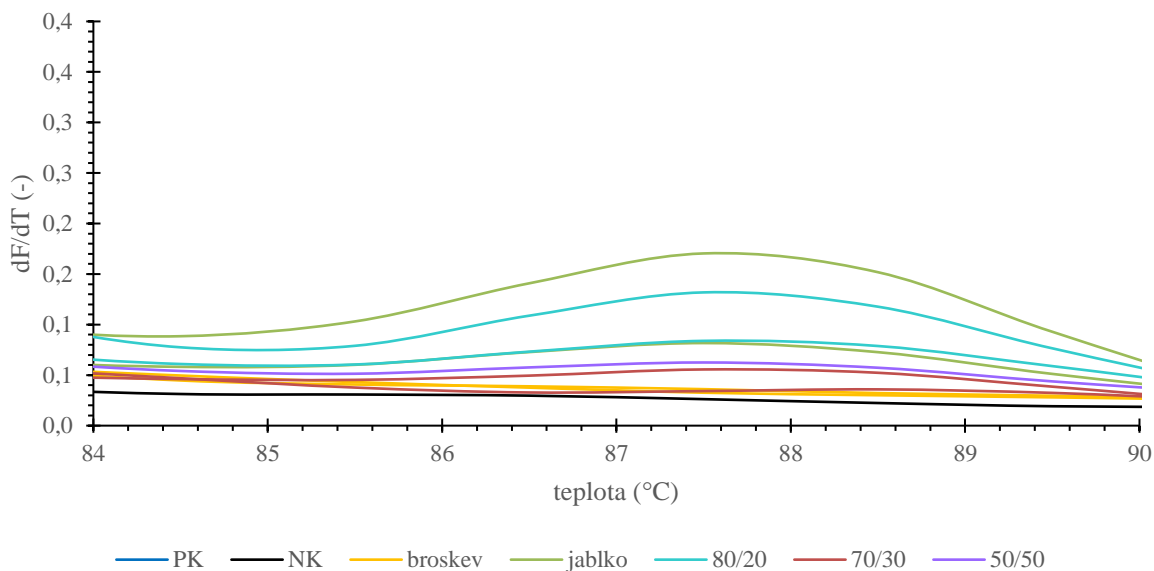
Tabulka 10 - Seznam nanesených vzorků na gelovou elektroforézu a jejich detekce (+ detekováno, - nedetekováno)

Běh	Vzorek	Detekce	Běh	Vzorek	Detekce
1	50/50	+	9	jablko	+
2		+	10	broskvev	+
3		+	11		+
4	70/30	+	12	Délkový standard (po 100 bp)	
5		+	13	NK	-
6	80/20	+	14		-
7		+	15	PK	+
8	jablko	+	16		+

PCR s DNA izolovanými z druhé série vzorků byla provedena ještě s primery 26S. Pozitivní kontroly se začaly amplifikovat ve 26. cyklu, ostatní vzorky až po 30. cyklu.

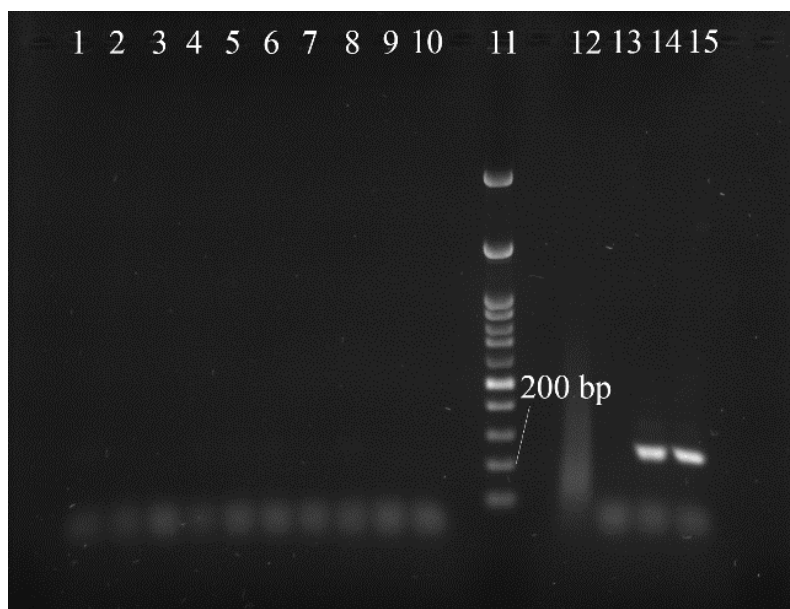


Graf 7 - Amplifikační křivka druhé série vzorků (primery 26S) izolované kitem INVITROGEN



Graf 8 - Výřez křivek tání specifických produktů PCR druhé série (primery 26S) izolované kitem INVITROGEN

Teplota tání specifických produktů pozitivních kontrol je 87,5 °C (Graf 20). Píky specifických produktů jsou viditelné u jednoho ze vzorků z jablečného pyré a poté i ze vzorku s poměrem jablečné a broskvové složky 80/20. Při gelové elektroforéze (Obr. 5) nebyl u žádného vzorku prokázán specifický produkt. Specifické produkty bylo možné detekovat pouze analýzou křivek tání.



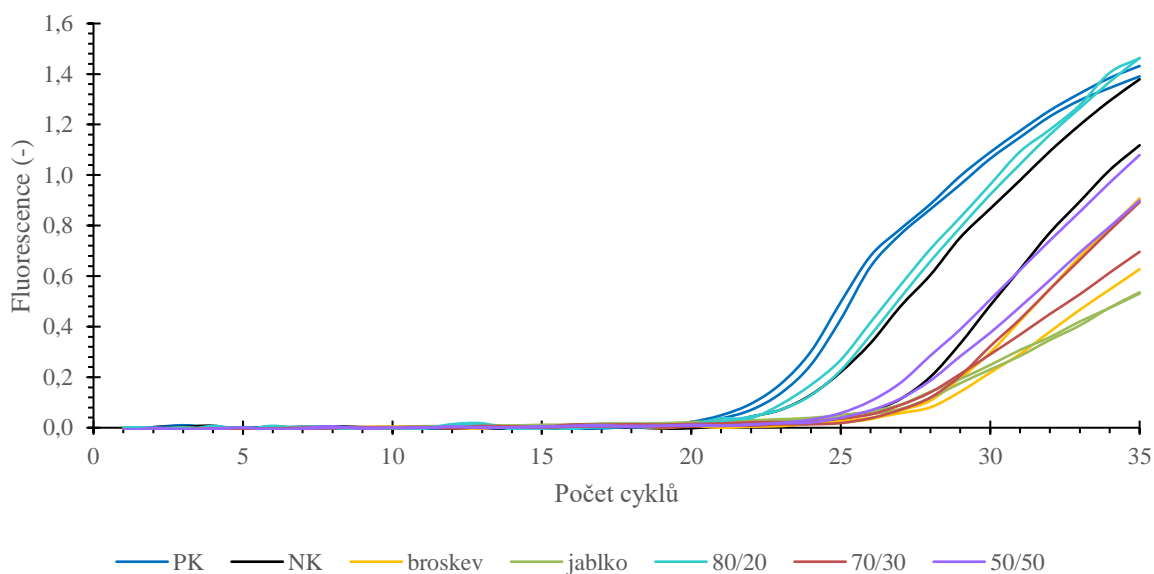
Obr. 5 - Agarózová gelová elektroforéza druhé série (primery 26S) izolovaná kitem INVITROGEN

Tabulka 11 - Seznam nanesených vzorků na gelovou elektroforézu a jejich detekce (+ detekováno, - nedetekováno)

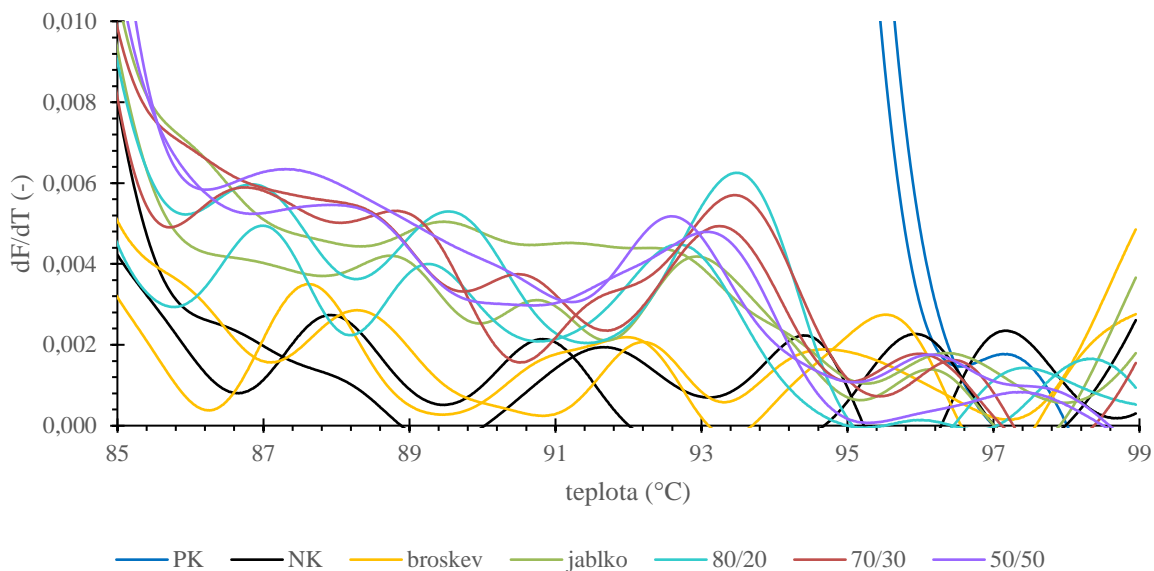
Běh	Vzorek	Detekce	Běh	Vzorek	Detekce
1	50/50	-	9	broskev	-
2		-	10		-
3	70/30	-	11	Délkový standard (po 100 bp)	-
4		-	12		NK
5	80/20	-	13	PK	-
6		-	14		+
7	jablko	-	15		+
8		-	---	---	---

5.2.3. PCR a gelová elektroforéza DNA třetí série vzorků

Třetí série vzorků byla lyofilizovaná po 18 týdnech skladování a DNA byla izolovaná kitem s magnetickými částicemi. Pozitivní kontroly se začaly amplifikovat při 22. cyklu, vzorky s poměrem jablečné a broskvové složky 80/20 se začaly amplifikovat při 23. cyklu, ostatní vzorky až při 26. a pozdějším cyklu.

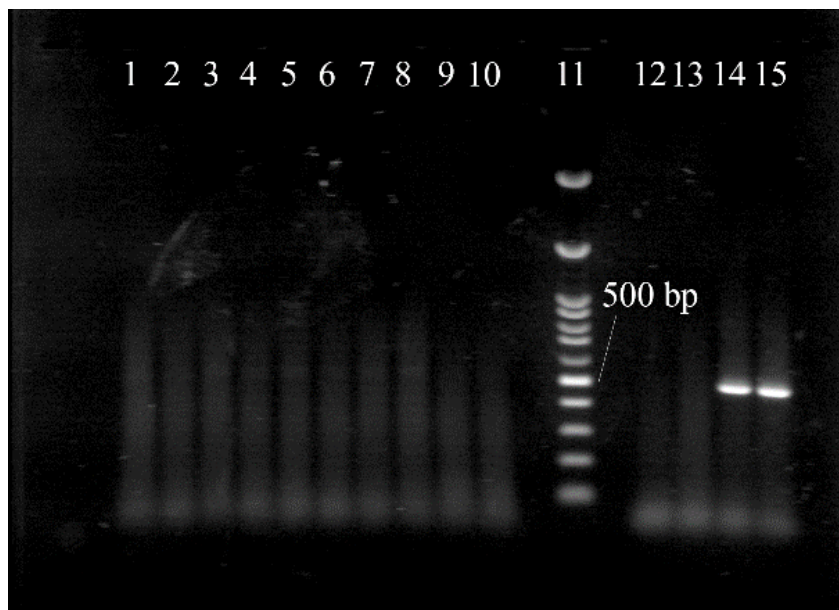


Graf 9 - Amplifikační křivka třetí série vzorků (primery ITS2) izolované kitem INVITROGEN



Graf 10 - Výřez křivek tání specifických produktů PCR třetí série (primery ITS2) izolované kitem INVITROGEN

Teplota tání specifických produktů pozitivních kontrol je 88 a 93 °C (Graf 21) Píky specifických produktů jsou viditelné ve všech vzorcích obsahujících DNA z modelových pyré (kromě čistě broskvového pyré). Na gelu (Obr. 6) nebyl u některých vzorků detekován žádný specifický produkt, protože jejich koncentrace je velmi nízká. Detekce bandů byla možná u vzorků s poměrem jablečné a broskvové složky 70/30, 80/20 a čistě jablečného pyré. Specifické produkty u ostatních vzorků obsahujících DNA z modelových vzorků (kromě broskvového pyré) bylo možné detekovat pouze analýzou křivek tání.

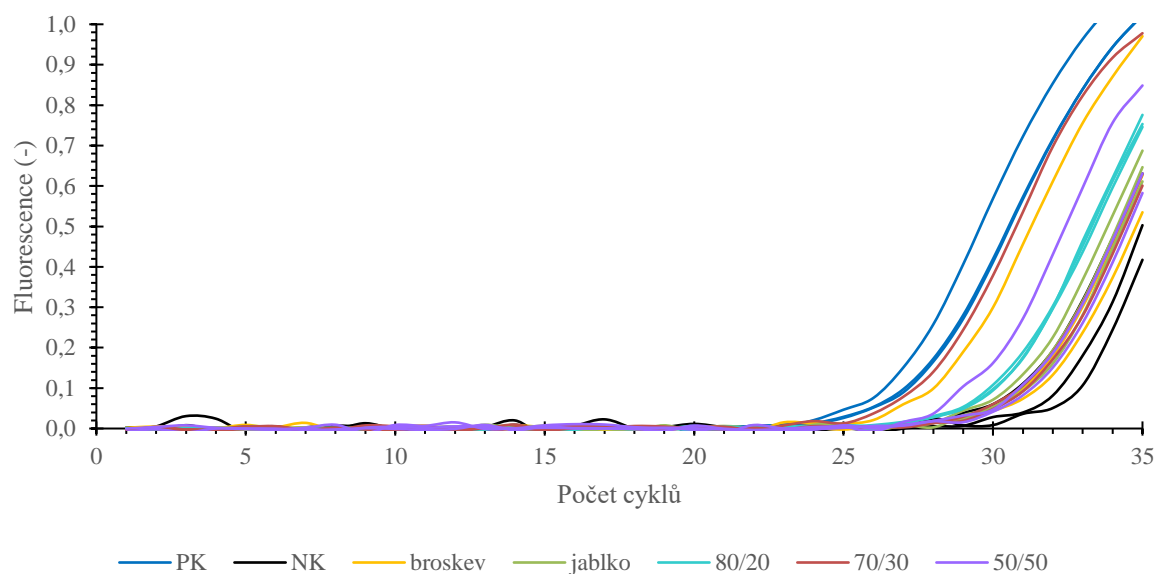


Obr. 6 - Agarózová gelová elektroforéza třetí série (primery ITS2) izolovaná kitem INVITROGEN

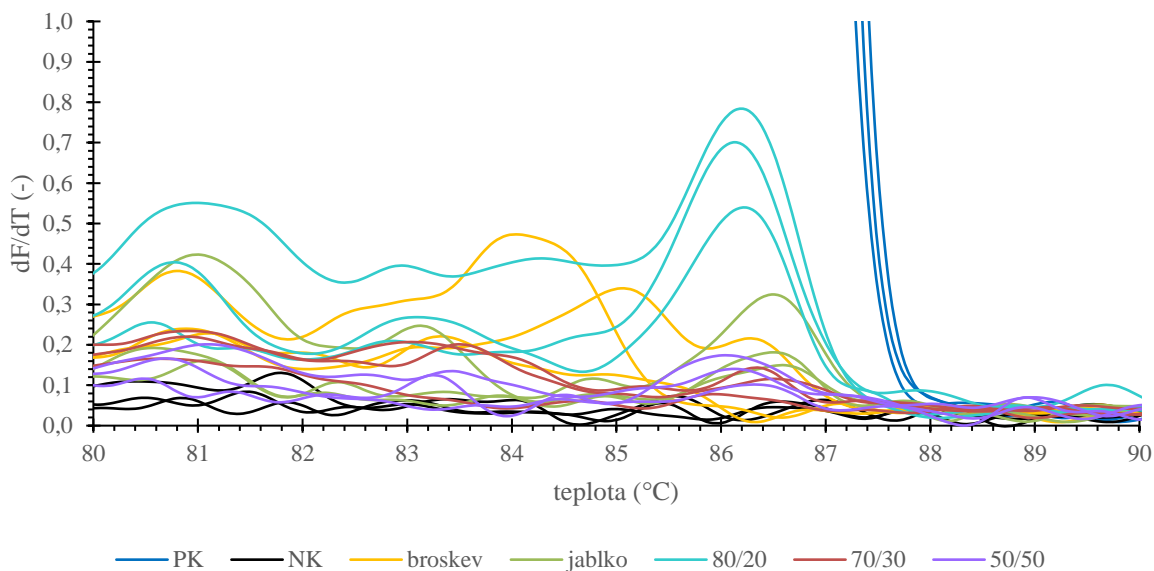
Tabulka 12 - Seznam nanesených vzorků na gelovou elektroforézu a jejich detekce (+ detekováno, - nedetekováno)

Běh	Vzorek	Detekce	Běh	Vzorek	Detekce
1	50/50	-	9	broskev	-
2		-	10		-
3	70/30	-	11	Délkový standard (po 100 bp)	-
4		+	12		NK
5	80/20	+	13	PK	-
6		-	14		+
7	jablko	+	15		+
8		+	---	---	---

PCR s DNA izolovanými ze třetí série modelových vzorků byla provedena také s primery 26S. Pozitivní kontroly se začaly amplifikovat ve 25. cyklu, ve 26. cyklu se amplifikovaly vzorky broskve. Ostatní vzorky až ve 30. cyklu.

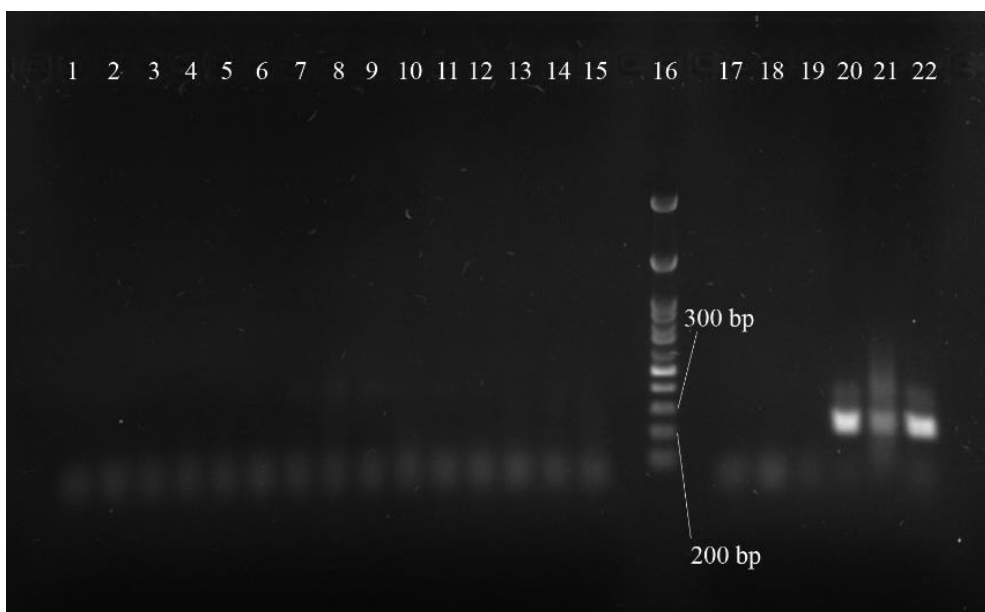


Graf 11 - Amplifikační křivka třetí série vzorků (primery 26S) izolované kitem INVITROGEN



Graf 12 - Výřez křivek tání specifických produktů PCR třetí série (primery 26S) izolované kitem INVITROGEN

Teplota tání specifických produktů pozitivních kontrol je 86,5 °C (Graf 22). Specifické produkty jsou viditelné u vzorků obsahující DNA z pyré s poměrem jablečné a broskvové složky 80/20. Na gelu (Obr. 7) nebyly detekovány žádné specifické produkty. Specifické produkty bylo možné detekovat pouze analýzou křivek tání.



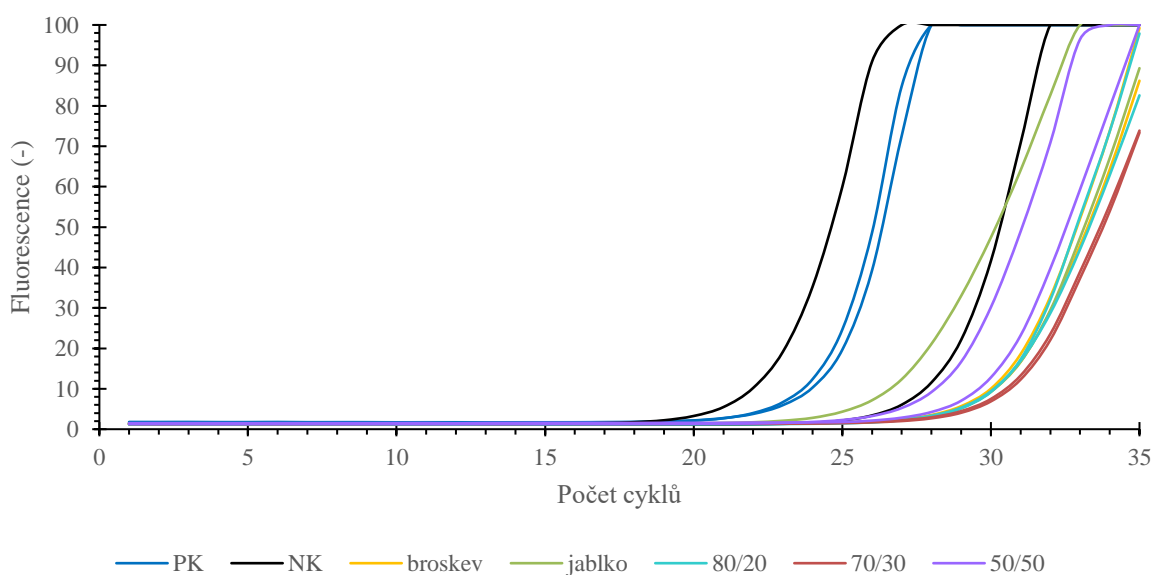
Obr. 7 - Agarózová gelová elektroforéza třetí série (primery 26S) izolovaná kitem INVITROGEN

Tabulka 13 - Seznam nanesených vzorků na gelovou elektroforézu a jejich detekce (+ detekováno, - nedetekováno)

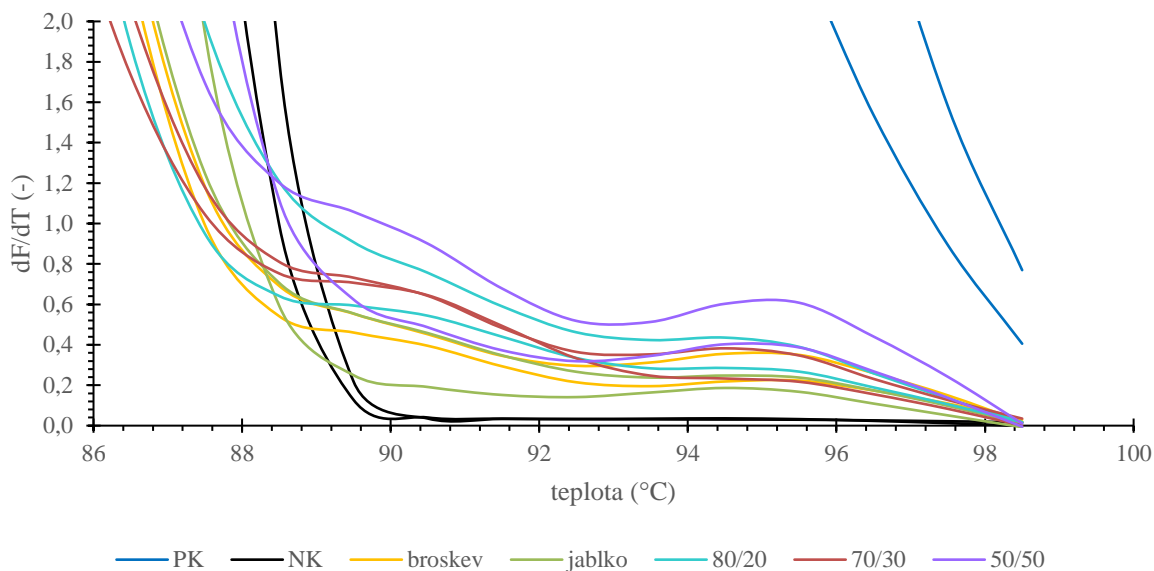
Běh	Vzorek	Detekce	Běh	Vzorek	Detekce
1		-	12	jablko	-
2	50/50	-	13		-
3		-	14	broskev	-
4		-	15		-
5	70/30	-	16	Délkový standard (po 100 bp)	
6		-	17		-
7		-	18	NK	-
8	80/20	-	19		-
9		-	20		+
10	jablko	-	21	PK	+
11		-	22		+

5.2.4. PCR a gelová elektroforéza DNA čtvrté série vzorků

Poslední série vzorků byla lyofilizovaná po 22 týdnech skladování a DNA byla izolovaná kitem s magnetickými částicemi. Pozitivní kontroly se začaly amplifikovat při 23. cyklu, vzorky s poměrem jablečné a broskvové složky 80/20 se začaly amplifikovat při 29. cyklu, ostatní vzorky až při 30. a pozdějším cyklu.

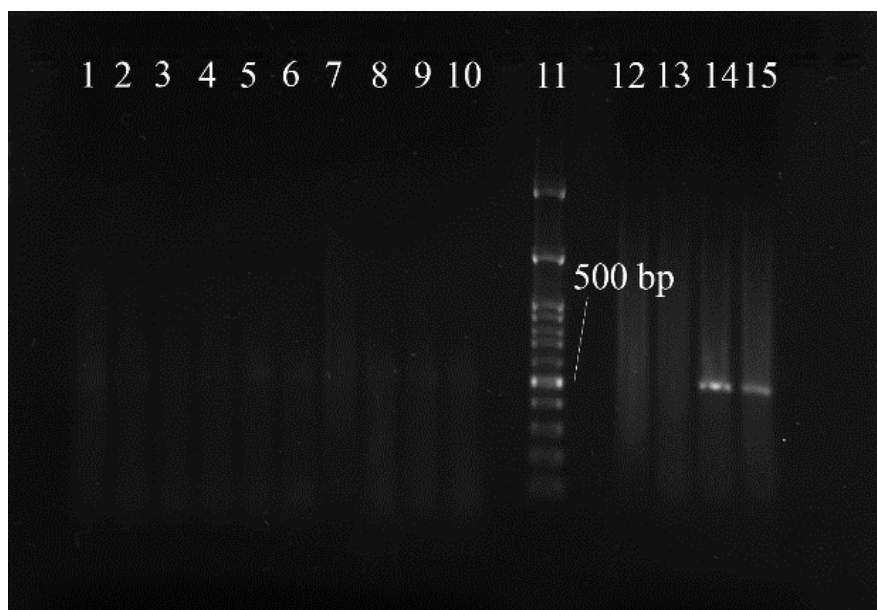


Graf 13 - Amplifikační křivka čtvrté série vzorků (primery ITS2) izolované kitem INVITROGEN



Graf 14 - Výřez křivek tání specifických produktů PCR čtvrté série (primery ITS2) izolované kitem INVITROGEN

Píky pozitivních kontrol jsou viditelné při teplotě 86,5 a 87,5 °C (Graf 23). Nejvíce specifického produktu bylo u vzorků obsahujících DNA z pyré s poměrem jablečné a broskvové složky 50/50. Nejméně specifického produktu je ve vzorku obsahujícím DNA z jablečného pyré. Na gelu (Obr. 8) nebyl detekován žádný specifický produkt. Specifické produkty bylo možné detekovat pouze analýzou křivek tání.

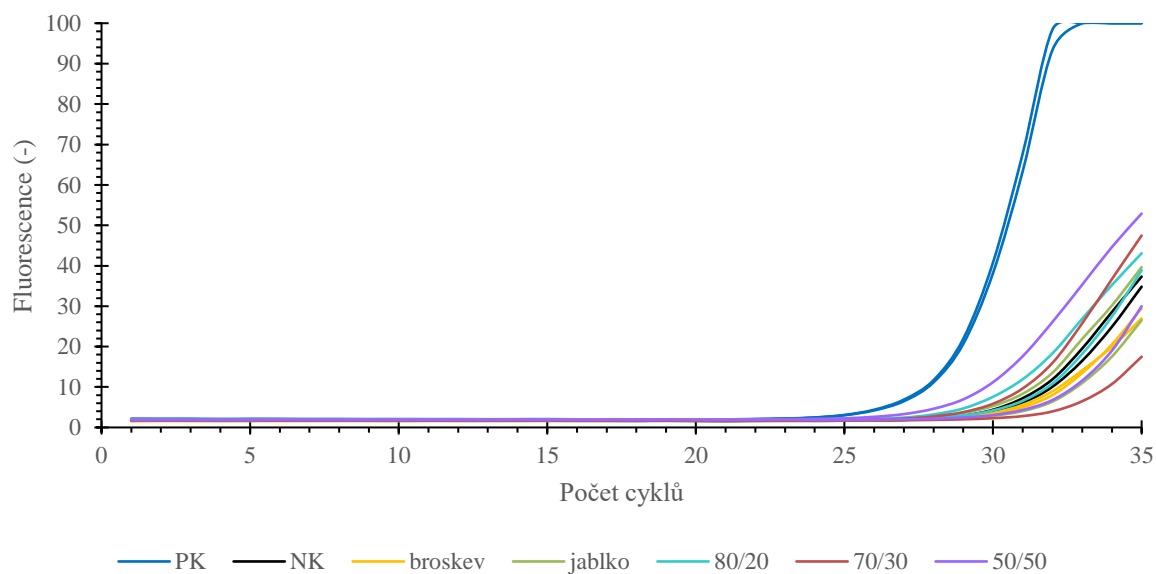


Obr. 8 - Agarózová gelová elektroforéza čtvrté série (primery ITS2) izolovaná kitem INVITROGEN

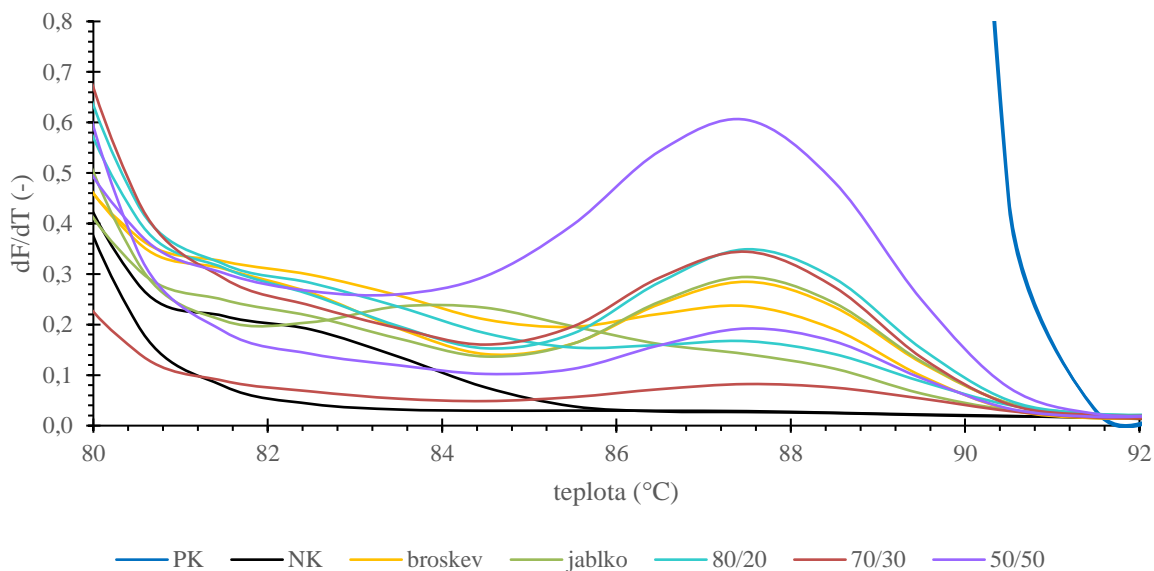
Tabulka 14 - Seznam nanesených vzorků na gelovou elektroforézu a jejich detekce (+ detekováno, - nedetekováno)

Běh	Vzorek	Detekce	Běh	Vzorek	Detekce
1	50/50	-	9	broskev	-
2		-	10		-
3		-	11		Délkový standard (po 100 bp)
4	70/30	-	12	NK	-
5	80/20	-	13	PK	-
6		-	14		+
7	jablko	-	15		+
8		-	---	---	---

PCR s DNA izolovanými ze čtvrté série vzorků byla provedena také s primery 26S. Pozitivní kontroly se začaly amplifikovat ve 26. cyklu, ostatní vzorky v rozmezí 28. až 32. cyklu.

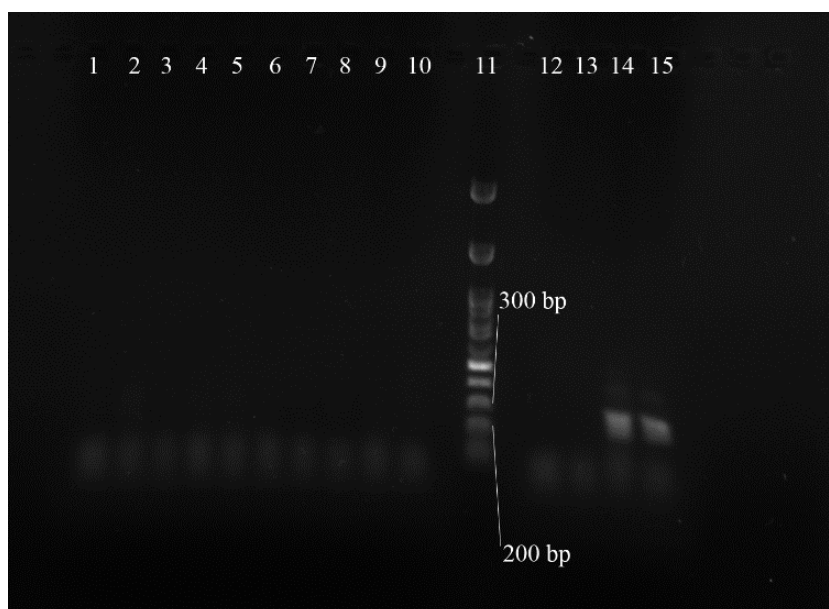


Graf 15 - Amplifikační křivka čtvrté série vzorků (primery 26S) izolované kitem INVITROGEN



Graf 16 - Výřez křivek tání specifických produktů PCR čtvrté série (primery 26S) izolované kitem INVITROGEN

Teplota tání specifického produktu pozitivních kontrol je 87,5 °C (Graf 24). Píky specifických produktů jsou viditelné u DNA ze všech modelových vzorků. Na gelu (Obr. 9) nebyl detekován žádný specifický produkt. Specifické produkty všech DNA z modelových vzorků možné detekovat pouze analýzou křivek tání.



Obr. 9 - Agarózová gelová elektroforéza čtvrté série (primery 26S) izolovaná kitem INVITROGEN

Tabulka 15 - Seznam nanesených vzorků na gelovou elektroforézu a jejich detekce (+ detekováno, - nedetekováno)

Běh	Vzorek	Detekce	Běh	Vzorek	Detekce
1	50/50	-	9	broskev	-
2		-	10		-
3	70/30	-	11	Délkový standard (po 100 bp)	
4		-	12		-
5	80/20	-	13	NK	-
6		-	14	PK	+
7	jablko	-	15		
8		-	---	---	---

5.3. HPLC

Podle postupu v kapitole 2.5.3. byly připraveny ethanolové extrakty ze všech modelových vzorků.

Identifikace fenolických látek probíhala porovnáním retenčních času a UV spekter vzorků se standardy.

Tabulka 16 - Počet fenolických látek ve vzorcích

vzorek	série			
	1	2	3	4
broskev	6	5	4	4
jablko	3	2	2	1
80/20	1	2	1	1
70/30	5	3	2	2
50/50	4	4	4	2

Ze všech fenolických látek, které byly detekovány pomocí HPLC se podařilo identifikovat pouze 4. Ostatní se nepodařilo identifikovat.

Phloridzin je fenolická látka, která je považována za indikátor přítomnosti jablka ve vzorku [10]. Při analýze byl identifikován phloridzin pouze ve vzorcích obsahující jablko. Množství phloridzinu je možné dopočítat z plochy pod píkem a dosazením do rovnice kalibrační křivky (1):

$$y = 3605,7 \cdot x, \quad (1)$$

kdy x je koncentrace v $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Množství phloridzinu ve vzorcích je uvedeno v Tabulka 17.

Tabulka 17 - Obsah phloridzinu ve vzorcích (mg na 100 g mokré váhy)

vzorek	série			
	1	2	3	4
broskev	-	-	-	-
jablko	5,238	3,123	3,340	1,402
80/20	2,287	2,470	2,433	1,173
70/30	3,228	2,718	2,954	2,366
50/50	1,368	1,226	1,977	1,289

V této tabulce lze vidět vliv doby skladování na obsah phloridzinu v modelových vzorcích. Delší doba skladování způsobila pokles obsahu phloridzinu ve vzorcích.

Tabulka 18 - Látky identifikované pomocí HPLC (+ detekováno, - nedetekováno)

série	vzorek	fenolická látka			
		rutin	phloridzin	katechin	hesperidin
1	broskev	+	-	-	-
	jablko	-	+	-	-
	80/20	-	+	-	-
	70/30	-	+	-	-
	50/50	-	+	-	-
2	broskev	+	-	+	-
	jablko	-	+	-	+
	80/20	-	+	-	-
	70/30	+	+	+	-
	50/50	-	+	-	-
3	broskev	-	-	-	-
	jablko	+	+	-	-
	80/20	-	+	-	-
	70/30	-	+	-	-
	50/50	-	+	-	-
4	broskev	-	-	-	-
	jablko	-	+	-	-
	80/20	-	+	-	-
	70/30	-	+	-	-
	50/50	-	+	-	-

6. Závěr

Předložená bakalářská práce se zabývala vlivem doby skladování na stanovení autenticity pomocí real-time PCR, gelové elektroforézy a HPLC.

Cílem této práce bylo zjistit, zda má doba skladování vliv na stanovení autenticity vzorků. Pro tuto práci byly využity modelové vzorky – ovocná pyré s různými poměry jablečné a broskvové složky. Do vzorků nebyly použity žádné stabilizátory, konzervanty či jiné přidané látky. Po provedených molekulárně biologických metodách bylo zjištěno, že doba skladování má vliv na PCR analýzu. DNA byla degradována již při přípravě vzorků, a to tepelnou úpravou a mechanickým rozmělněním vzorků. Protože ovoce má kyselé pH, DNA byla vystavena kyselému prostředí, což způsobuje její znehodnocení. Delší doba uskladnění způsobila větší degradaci DNA a ztížila její amplifikaci pomocí PCR. U první série vzorků (DNA izolované po 1 týdnu skladování) byly specifické PCR produkty detekované jak pomocí analýzy křivek tání, tak i elektroforeticky. U pozdějších sérií vzorků (DNA izolované po delší době skladování) byly specifické produkty ve většině případů detekované pouze pomocí analýzy křivek tání.

HPLC analýzou bylo stanoveno, že všechny vzorky s jablečnou složkou obsahovaly phloridzin. Obsah phloridzinu se s rostoucí dobou skladování snižoval. Vzhledem k výsledkům lze usoudit, že jablečnou složku bylo ve vzorcích možné identifikovat pomocí HPLC díky přítomnosti phloridzinu i po delší době skladování.

Doba skladování ovocných pyré negativně ovlivňovala výsledky analýzy DNA i výsledky HPLC, hlavně působením kyselého prostředí na molekuly DNA i na fenolické látky. Při výběru metody pro analýzu ovocných pyré, skladovaných dlouhou dobu je potřeba brát v úvahu degradaci analytů a vhodně zvolit způsob přípravy vzorků i parametry metody, která bude pro analýzu použita. V případě real-time PCR je vhodný výběr primerů amplifikujících kratší fragmenty DNA než 250 bp, zatímco v případě HPLC je důležitá například optimalizace extrakce.

7. Použitá literatura

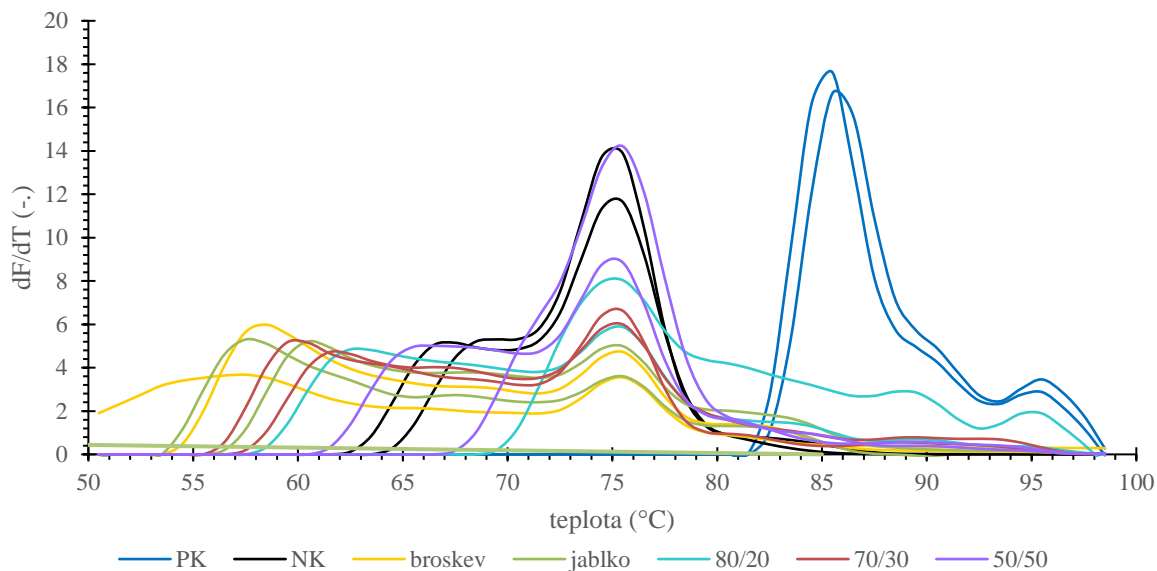
- [1] Kontrola správnosti označování potravin ("falšování" potravin). In: *Státní zemědělská a potravinářská inspekce* [online]. [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: <https://www.szpi.gov.cz/clanek/kontrola-spravnosti-oznacovani-potravin-falsovani-potravin.aspx>
- [2] DOSTÁLOVÁ, Jana a Pavel KADLEC. *Potravinářské zbožíznalství: technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2014. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-208-2.
- [3] VAN DEN DRIESSCHE, José J., Jogchum PLAT a Ronald P. MENSINK. Effects of superfoods on risk factors of metabolic syndrome: a systematic review of human intervention trials. *Food & Function* [online]. 2018, **9**(4), 1944-1966 [cit. 2023-05-12]. ISSN 2042-6496. Dostupné z: doi:10.1039/C7FO01792H
- [4] PROESTOS, CHARALAMPOS. Superfoods: Recent Data on their Role in the Prevention of Diseases. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal* [online]. 2018, **6**(3), 576-593 [cit. 2023-04-18]. ISSN 2347467X. Dostupné z: doi:10.12944/CRNFSJ.6.3.02
- [5] BULKOVÁ, Věra. *Rostlinné potraviny*. Vyd. 1. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2011. ISBN 978-80-7013-532-7.
- [6] BLAŽEK, Jan. *Ovocnictví*. Vydání první. Praha: Květ, 1998. ISBN 80-85362-33-3.
- [7] SKINNER, Margot a Denise HUNTER. *Bioactives in Fruit: Health Benefits and Functional Foods* [online]. 1. New Delhi: WILEY Blackwell, 2013 [cit. 2023-04-27]. ISBN 978-1-118-63556-8.
- [8] BÍLKOVÁ, Aneta. *Metodika stanovení hlavních fenolických sloučenin v genotypech jabloní s ohledem na různé podmínky skladování*. Holovousy: Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o., 2018. ISBN 978-80-87030-68-4.
- [9] ŠAPIRO, David Kopelevič. *Ovoce a zelenina ve výživě člověka*. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1988. Rostlinná výroba (Státní zemědělské nakladatelství).
- [10] GOSCH, Christian, Heidi HALBWIRTH, Jasmin KUHN, Silvija MIOSIC a Karl STICH. Biosynthesis of phloridzin in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Plant Science* [online]. 2009, **176**(2), 223-231 [cit. 2023-05-12]. ISSN 01689452. Dostupné z: doi:10.1016/j.plantsci.2008.10.011
- [11] HANCOCK, J.F., R. SCORZA a G.A. LOBOS. Peaches. In: HANCOCK, James F., ed. *Temperate Fruit Crop Breeding* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008, s. 265-298 [cit. 2023-05-03]. ISBN 978-1-4020-6906-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4020-6907-9_9
- [12] BLAHA, Josef, Jiří KALÁŠEK a Josef LUŽA. *Broskvoně, meruňky, mandloně*. 1. vyd. Praha: Academia, 1966. Ovocnická edice.
- [13] GONZÁLEZ-TEJEDOR, Gerardo A., Ginés Benito MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, Alberto GARRE, Jose A. EGEA, Pablo S. FERNÁNDEZ a Francisco ARTÉS-HERNÁNDEZ. Quality Changes and Shelf-Life Prediction of a Fresh Fruit and Vegetable Purple Smoothie. *Food and Bioprocess Technology* [online]. 2017, **10**(10), 1892-1904 [cit. 2023-04-18]. ISSN 1935-5130. Dostupné z: doi:10.1007/s11947-017-1965-5
- [14] TAUFEROVÁ, Alexandra. *Technologie a hygiena potravin rostlinného původu I., II*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-692-6.
- [15] BÖHME, Karola, Pilar CALO-MATA, Jorge BARROS-VELÁZQUEZ a Ignacio ORTEA. Review of Recent DNA-Based Methods for Main Food-Authentication Topics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2019, **67**(14), 3854-3864 [cit. 2023-05-16]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.8b07016
- [16] OVESNÁ, Jaroslava a Jan HODEK. *Metody extrakce DNA z čerstvého plodu papáji a z kandované papáji*. 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2010. ISBN 978-80-7427-063-5.
- [17] MURRAY, Robert K. *Harperova ilustrovaná biochemie*. 5. české vyd., 1. v nakl. Galén. Přeložil Bohuslav MATOUŠ. Praha: Galén, 2012. ISBN 978-80-7262-907-7.

- [18] DENNISTON, K. J. *General, organic, and biochemistry*. 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2014. ISBN 978-0-07-715767-8.
- [19] DIBERNARDO, G., S. DELGAUDIO, U. GALDERISI, A. CASCINO a M. CIPOLLARO. Comparative Evaluation of Different DNA Extraction Procedures from Food Samples. *Biotechnology Progress* [online]. 2007, **23**(2), 297-301 [cit. 2023-04-27]. ISSN 8756-7938. Dostupné z: doi:10.1021/bp060182m
- [20] KI, Jang-Seu, Ki Byum CHANG, Hee June ROH, Bong Youb LEE, Joon Yong YOON a Gi Young JANG. Direct DNA isolation from solid biological sources without pretreatments with proteinase-K and/or homogenization through automated DNA extraction. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2007, **103**(3), 242-246 [cit. 2023-05-16]. ISSN 13891723. Dostupné z: doi:10.1263/jbb.103.242
- [21] TKACHENKO, Nikolai V. *Optical spectroscopy: methods and instrumentations*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2006. ISBN 0-444-52126-7.
- [22] GRYSON, Nicolas. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2010, **396**(6), 2003-2022 [cit. 2023-04-18]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-009-3343-2
- [23] BOESENBERG-SMITH, Kelly A., Mohammad M. PESSARAKLI a Donna M. WOLK. Assessment of DNA Yield and Purity: an Overlooked Detail of PCR Troubleshooting. *Clinical Microbiology Newsletter* [online]. 2012, **34**(1), 1-6 [cit. 2023-05-05]. ISSN 01964399. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinmicnews.2011.12.002
- [24] WILFINGER, William W., Karol MACKEY a Piotr CHOMCZYNSKI. Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *BioTechniques* [online]. 1997, **22**(3), 474-481 [cit. 2023-05-12]. ISSN 0736-6205. Dostupné z: doi:10.2144/97223st01
- [25] KRÁLOVÁ, Blanka. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2018. ISBN 978-80-7080-449-0.
- [26] JOSHI, Mohini a J. D. DESHPANDE. POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION. *International Journal of Biomedical Research* [online]. 2011, **2**(1), 81-97 [cit. 2023-05-03]. ISSN 0976-9633. Dostupné z: doi:10.7439/ijbr.v2i1.83
- [27] ČÍŽKOVÁ, Helena a Rudolf ŠEVČÍK. Trendy v autenticitě potravin a v přístupech k detekci falšování. *Chemické listy* [online]. **2012**(106), 903-910 [cit. 2023-05-03]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/issue/view/58>
- [28] WAGES, J.M. POLYMERASE CHAIN REACTION. In: *Encyclopedia of Analytical Science* [online]. Elsevier, 2005, s. 243-250 [cit. 2023-05-05]. ISBN 9780123693976. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-369397-7/00475-1
- [29] GARIBYAN, Lilit a Nidhi AVASHIA. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 2013, **133**(3), 1-4 [cit. 2023-05-03]. ISSN 0022202X. Dostupné z: doi:10.1038/jid.2013.1
- [30] BERÁNEK, Martin. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3224-7.
- [31] LEE, Pei Yun, John COSTUMBRADO, Chih-Yuan HSU a Yong Hoon KIM. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2012, (62) [cit. 2023-05-03]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/3923
- [32] KENKEL, John. *Analytical chemistry for technicians*. 4th ed. Boca Raton: CRC Press, 2014. ISBN 978-1-4398-8105-7.
- [33] DOLNÍK, Vladislav. DNA sequencing by capillary electrophoresis (review). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* [online]. 1999, **41**(2-3), 103-119 [cit. 2023-05-16]. ISSN 0165022X. Dostupné z: doi:10.1016/S0165-022X(99)00041-X
- [34] SNYDER, Lloyd, Joseph KIRKLAND a John DOLAN. *Introduction to Modern Liquid Chromatography* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2009 [cit. 2023-04-18]. ISBN 9780470508183. Dostupné z: doi:10.1002/9780470508183

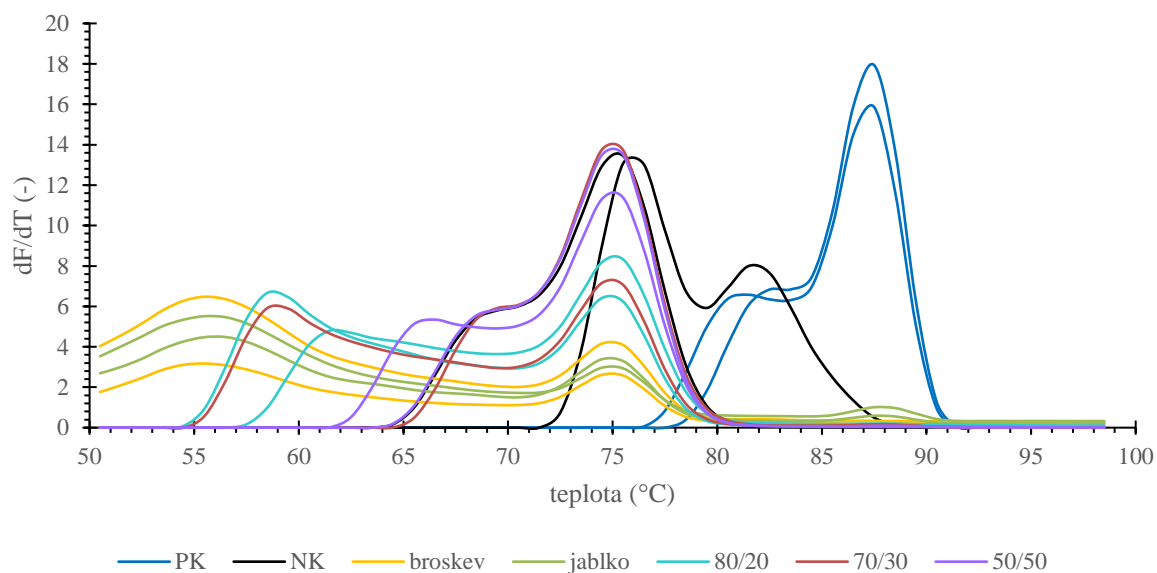
- [35] BENSAXHRIA, Ayoub. High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Analytical Toxicology* [online]. [cit. 2023-05-04]. Dostupné z: <https://www.analyticaltoxicology.com/en/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>
- [36] JANDERA, P. Pokroky v současné vysokoúčinné kapalinové chromatografii. *CHEMmagazín: časopis pro chemicko-technologickou a laboratorní praxi* [online]. Pardubice: Ing. Miloslav Rotrekl, 2016, **26**(2), 8-10 [cit. 2023-05-05]. ISSN 1210-7409. Dostupné z: <https://dk.upce.cz/handle/10195/67570?show=full&locale-attribute=en>
- [37] NOVÁKOVÁ, Lucie, Michal DOUŠA a Petr ČESLA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021. ISBN 978-80-270-8559-0.
- [38] LOUGH, W. J. a I. W. WAINER. *High Performance Liquid Chromatography: Fundamental Principles and Practice*. Dotisk. CRC Press, 1995, 288 s. ISBN 0751400769. 978-0751400762. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.1130100402
- [39] HOLLÁ, Marcela. *Metodika pro kvalitativní hodnocení ovoce a zpracovatelských produktů z hlediska obsahu látek prospěšných pro zdraví člověka*. Hradec Králové: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2019. ISBN 978-80-906644-4-9.
- [40] MOHAN KUMAR, A. B., M. VASUNDHARA, B. N. SATHYANARAYANA, S. SHYAMALAMMA a C. DORESWAMY. Authentication and DNA Bar-Coding of Curcuma caesia Roxb. Genotypes and other Zingiberaceae Species Using ITS-2 Gene. *THE MYSORE JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCES* [online]. University of Agricultural Sciences Bangalore, India, 2021, **55**(3), 171-179 [cit. 2023-05-05]. ISSN 0047-8539. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Surendra-K/publication/354945060_Agronomic_Investigations_on_Sida_Hemp_Sida_alnifolia_L_-_A_Medicinal_Plant_for_Future/links/6155451b2b34872782014070/Agronomic-Investigations-on-Sida-Hemp-Sida-alnifolia-L-A-Medicinal-Plant-for-Future.pdf#page=183
- [41] ZUZOMOVÁ-LIHOVÁ, Judita, Terezie MANDÁKOVÁ, Alena KOVAŘÍKOVÁ, Andreas MÜHLHAUSEN, Klaus MUMMENHOFF, Martin A. LYSAK a Aleš KOVAŘÍK. When fathers are instant losers: homogenization of rDNA loci in recently formed Cardamine × schulzii trigeneric allopolyploid. *New Phytologist* [online]. 2014, **203**(4), 1096-1108 [cit. 2023-05-05]. ISSN 0028-646X. Dostupné z: doi:10.1111/nph.12873

8. Přílohy

8.1. Příloha 1 - Křivky tání specifických produktů PCR první série

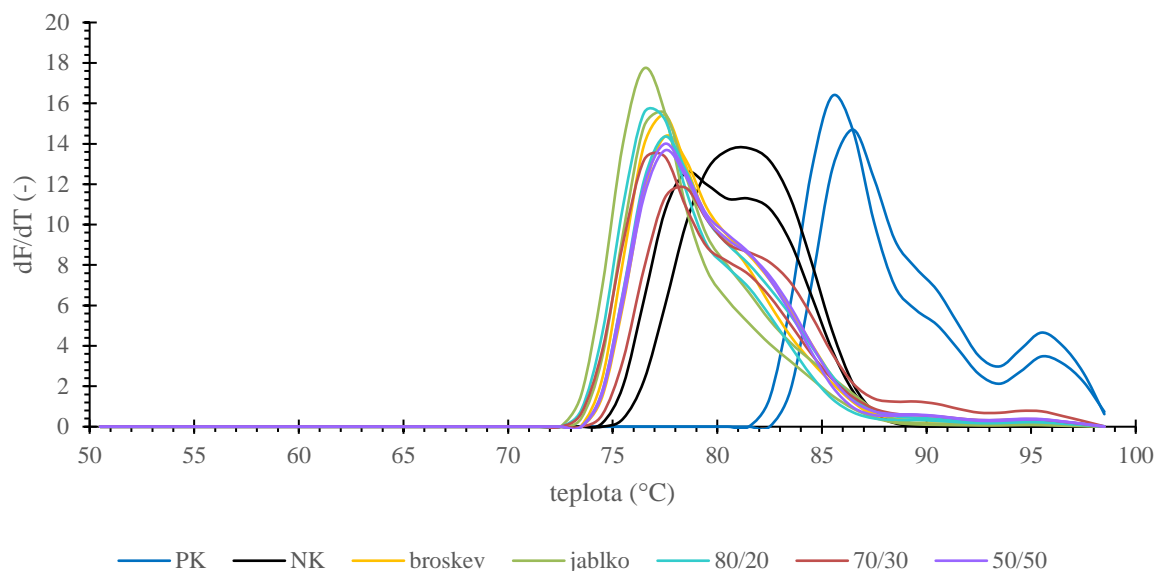


Graf 17 - Křivky tání specifických produktů PCR první série (primery ITS2) izolované kitem INVITROGEN

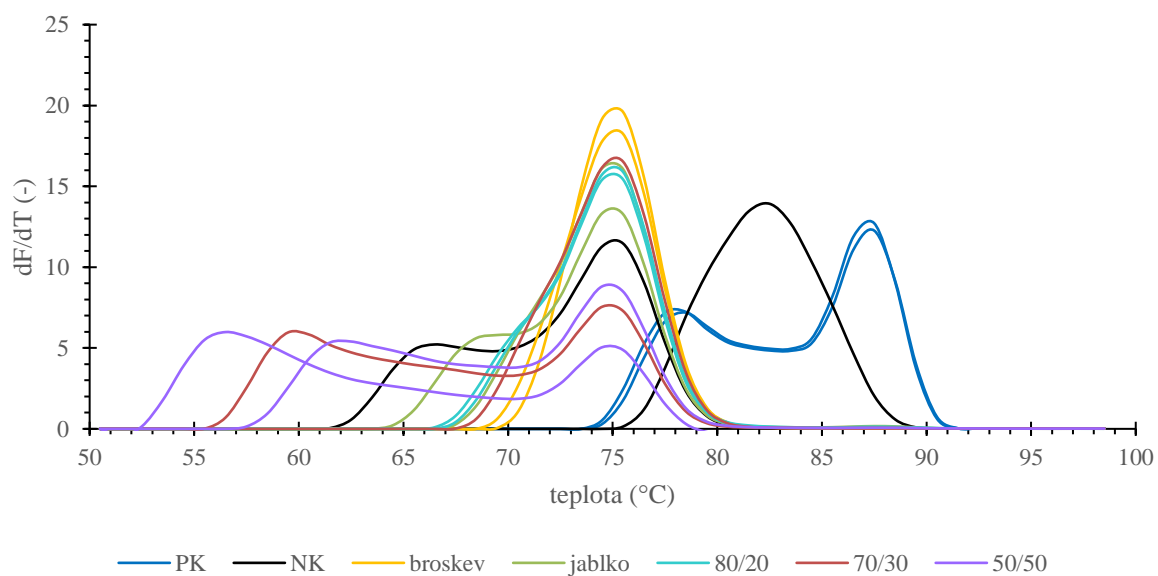


Graf 18 - Křivky tání specifických produktů PCR první série (primery 26S) izolované kitem INVITROGEN

8.2. Příloha 2 - Křivky tání specifických produktů PCR druhé série

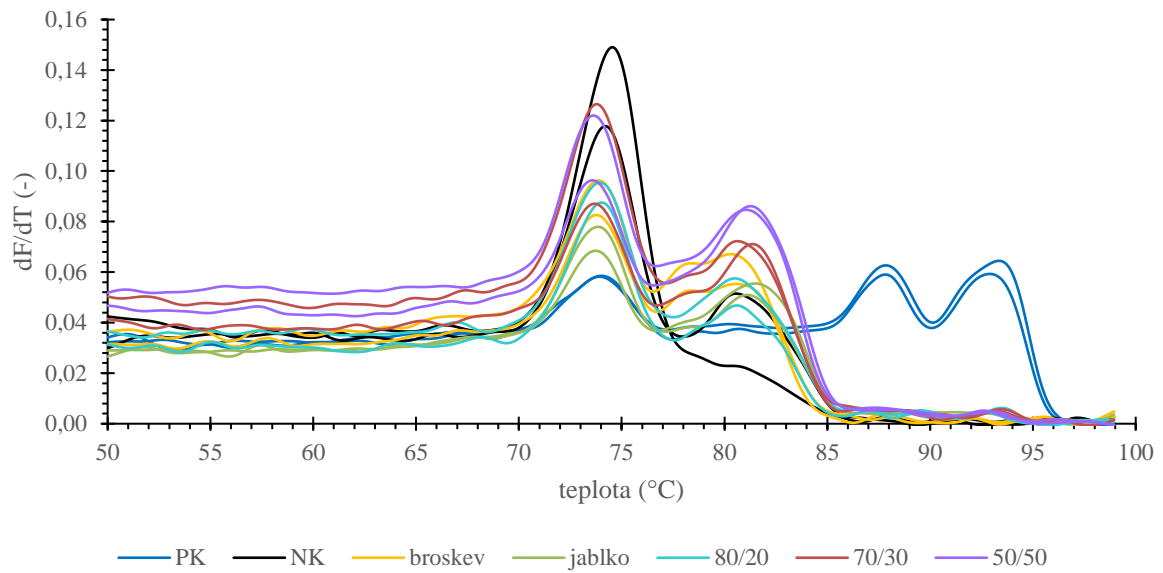


Graf 19 - Křivky tání specifických produktů PCR druhé série (primery ITS2) izolované kitem INVITROGEN

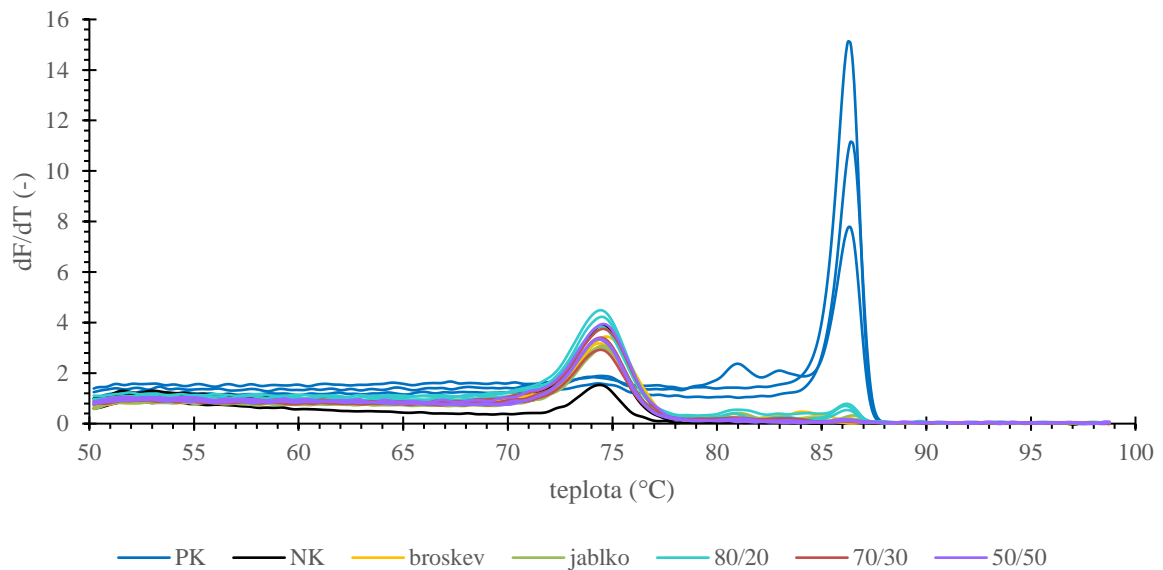


Graf 20 - Křivky tání specifických produktů PCR druhé série (primery 26S) izolované kitem INVITROGEN

8.3. Příloha 3 - Křivky tání specifických produktů PCR třetí série

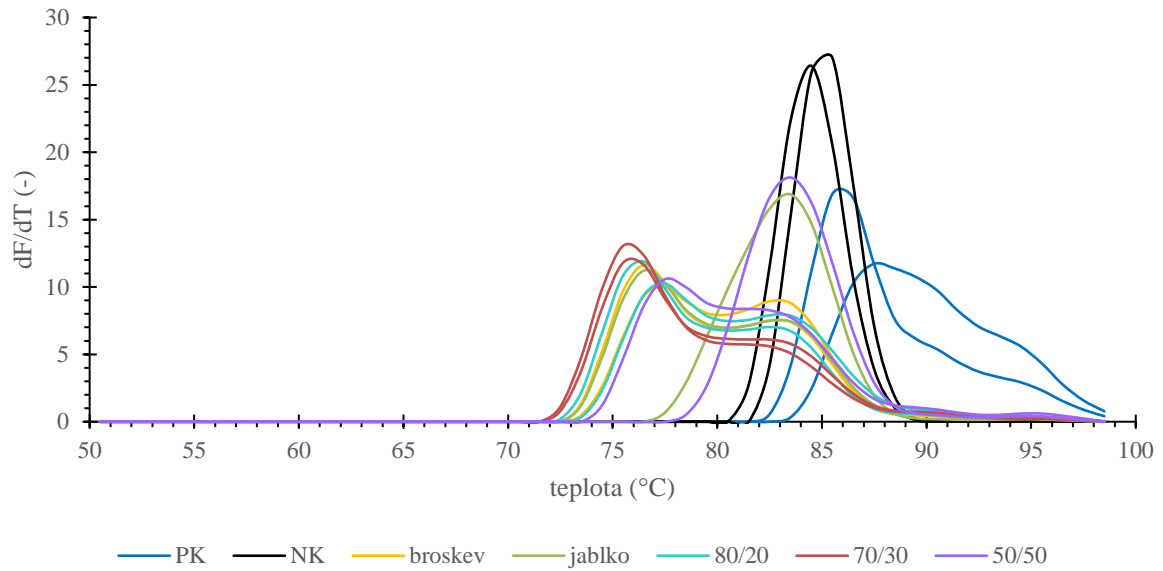


Graf 21 - Křivky tání specifických produktů PCR třetí série (primery ITS2) izolované kitem INVITROGEN

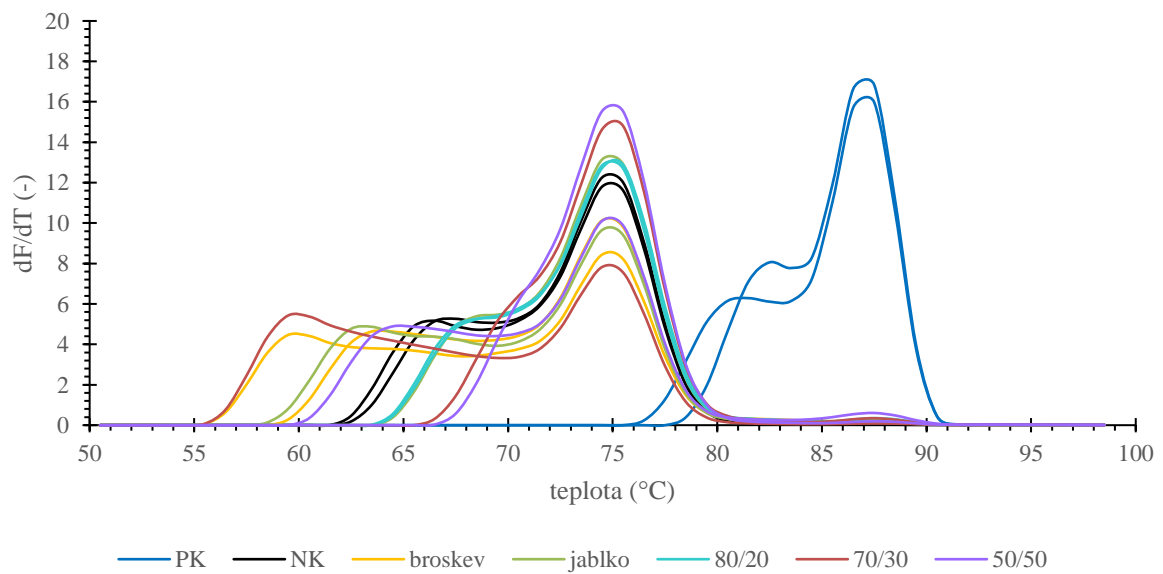


Graf 22 - Křivky tání specifických produktů PCR třetí série (primery 26S) izolované kitem INVITROGEN

8.4. Příloha 4 - Křivky tání specifických produktů PCR čtvrté série



Graf 23 - Křivky tání specifických produktů PCR čtvrté série (primery ITS2) izolované kitem INVITROGEN



Graf 24 - Křivky tání specifických produktů PCR čtvrté série (primery 26S) izolované kitem INVITROGEN