



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

**NEGATIVNÍ VLIV TZV. "RAW" POTRAVIN Z HLEDISKA
MOŽNÉ MIKROBIÁLNÍ KONTAMINACE**

THE NEGATIVE EFFECT OF RAW FOODS DUE TO POSSIBLE MICROBIAL CONTAMINATION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Martina Štastná

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1119/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Martina Šťastná**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Negativní vliv tzv. "raw" potravin z hlediska možné mikrobiální kontaminace

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) literární rešerše týkající se charakterizace "raw" potravin
- 2) analýza vybraných aktivních složek obsažených ve vybraných "raw" potravinách
- 3) možnosti potenciální mikrobiální kontaminace v daných typech "raw" potravin

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

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

Martina Šťastná
student(ka)

Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Raw strava je aktuálnym trendom v oblasti výživy, najmä kvôli konzumácii vyváženej stravy s vysokým podielom zdraviu prospešných látok. Základom je konzumácia čerstvých potravín, ktoré neprešli tepelnou úpravou presahujúcou 42 – 45 °C.

Témou bakalárskej práce je všeobecná charakterizácia raw stravy, jej bezpečnosť z hľadiska možnej mikrobiálnej kontaminácie a stanovenie významných živín a aktívnych látok obsiahnutých v raw produktoch. V teoretickej časti sú popísané najrozšírenejšie typy stravovania, priblíženie raw stravy z hľadiska jej výhod a nevýhod. Ďalej sú popísané najvýznamnejšie baktérie, kvasinky a plesne vyskytujúce sa na ovocí a zelenine. Vybranými metódami popísanými v teoretickej časti boli stanovené niektoré živiny a aktívne zložky vo vzorkách raw tyčiniek. Experimentálna časť popisuje postupy a princípy stanovenia spomínaných látok a v neposlednom rade postupy metódy PCR v reálnom čase, elektroforézu na agarózovom géle a metódu očkovania vzoriek na selektívne pevné médiá, ktoré priblížili možnosť výskytu nežiaducich mikroorganizmov v raw tyčinkách a zákusku.

Napriek veľkému množstvu výhod konzumácie raw potravín a produktov z nich vyrobených, je potrebné dbať na svoje zdravie aj z hľadiska možnej kontaminácie mikroorganizmami. Rizikom sa stáva fakt, že potrava pri príprave nie je zbavená nežiaducich mikroorganizmov. To je dôvodom pre to, aby boli raw produkty po otvorení skonzumované v čo najkratšej dobe, pretože sa vzhľadom na svoje zloženie ľahko stávajú nutričným zdrojom pre rôzne typy mikroorganizmov.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Raw strava, mikrobiálna kontaminácia, aktívne látky, PCR v reálnom čase

ABSTRACT

Raw diet is the current trend in nutrition, mainly because of the consumption of a balanced diet with a high proportion of health benefits. The basis is the consumption of fresh foods that have not undergone a heat treatment exceeding 42 - 45 ° C.

The topic of the bachelor thesis is the general characterization of raw diet, safety of possible microbial contamination and determination of important nutrients and active substances contained in raw products. There are described the most widespread types of meals, approximation of raw diet in terms of its advantages and disadvantages. Also, there are described the most important bacteria, yeasts and molds occurring on fruits and vegetables. By selected methods described in the theoretical part, some nutrients and active ingredients in raw stick samples were determined. The experimental part describes the procedures and principles for the determination of these substances, and last but not least, the real-time PCR methods, agarose gel electrophoresis and the method of sample inoculation for selective solid media that have brought closer the possibility of occurrence of undesirable microorganisms in raw bars and cake.

Despite the large number of benefits of raw food consumption and products made from it, it is necessary to take care of its health also in terms of possible contamination by microorganisms. The risk is that the food is not free from unwanted microorganisms during preparation. This is the reason why the raw products are consumed in the shortest possible time after opening, because they become easily a nutrition source for different types of microorganisms due to their composition.

KEYWORDS

Raw diet, microbial contamination, active substances, real-time PCR

ŠŤASTNÁ, M. *Negatívni vliv tzv. "raw" potravín z hľadiska možnej mikrobiálnej kontaminácie*. Brno: Vysoké učenie technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 61 s. Vedoucí bakalárskej práce Ing. Andrea Hároniková, Ph.D..

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne, a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Na tomto mieste by som sa chcela srdečne poďakovať vedúcej mojej bakalárskej práce Ing. Andrei Háronikovej Ph.D. za odborné rady, ochotu a ústretovosť pri jej riešení. Ďalej by som sa chcela poďakovať Simone Jančíkovej a Bc. Denise Romanovskej za pomoc pri riešení experimentálnej časti. V neposlednom rade ďakujem mojej rodine a priateľom za podporu a trpezlivosť.

OBSAH

1. ÚVOD.....	9
2. TEORETICKÁ ČASŤ.....	10
2.1. Rôznorodosť stravovania.....	10
2.1.1. Hypokalorické diéty	10
2.1.2. Hyperlipidové diéty	10
2.1.2.1. Paleostrava	10
2.1.3. Hyperprotidické diéty	11
2.1.4. Hyperproteínové diéty	11
2.1.5. Hyperglycidové diéty	11
2.1.5.1. Vegetariánska strava	11
2.1.5.2. Vegánska strava	11
2.1.5.3. Fruktariánska strava	11
2.1.6. Raw strava	12
2.1.6.1. História.....	12
2.1.6.2. Charakteristika	12
2.1.6.3. Výhody.....	12
2.1.6.4. Riziká	12
2.1.6.5. Rozdiely v názoroch	13
2.2. Vlastnosti jednotlivých živín v potravinách	13
2.2.1. Základné živiny	13
2.2.1.1. Bielkoviny.....	13
2.2.1.2. Lipidy	14
2.2.1.3. Sacharidy.....	15
2.2.2. Biologicky aktívne látky	16
2.2.2.1. Antioxidanty	16
2.2.2.2. Polyfenoly	18
2.2.2.3. Antokyány.....	18
2.2.3. Kontaminujúce látky	18
2.3. Mikroorganizmy	19
2.3.1. Vlastnosti.....	19
2.3.2. Pramene mikrobiálnej kontaminácie potravín.....	19
2.3.3. Mikrobiálny výskyt na ovocí a zelenine	19
2.3.4. Prehľad najvýznamnejších baktérií vyskytujúcich sa v ovocí a zelenine	20

2.3.5.	Prehľad najvýznamnejších kvasiniek vyskytujúcich sa v ovocí a zelenine	21
2.3.6.	Prehľad najvýznamnejších plesní vyskytujúcich sa v ovocí a zelenine	22
2.4.	Superpotraviny.....	24
2.4.1.	Najčastejšie sa vyskytujúce typy superpotravín v raw výrobkoch.....	24
2.5.	Metódy využívané pre charakterizáciu molekulárnych a mikrobiálnych vlastností potravín.....	26
2.5.1.	Rozdelenie a príprava živných pôd	26
2.5.2.	Polymerázová reťazová reakcia	27
2.5.2.1.	PCR v reálnom čase	27
2.5.2.2.	Analýza krivky topenia (Melt analýza).....	27
2.5.2.3.	Gélová elektroforéza pre detekciu produktov PCR	28
3.	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	29
3.1.	Chemikálie, prístroje a materiál.....	29
3.1.1.	Chemikálie použité pre stanovenie vybraných látok.....	29
3.1.2.	Chemikálie použité pre metódu PCR	29
3.1.3.	Kultivačné médiá a zložky použité pre očkovanie vzoriek	29
3.1.4.	Ďalšie zložky použité pre metódu PCR.....	30
3.1.5.	Prístroje	30
3.1.6.	Materiál	30
3.2.	Príprava vzoriek.....	33
3.3.	Stanovenie antioxidačnej aktivity	33
3.4.	Stanovenie celkových polyfenolov	34
3.5.	Stanovenie celkových flavonoidov.....	34
3.6.	Stanovenie antokyánov	34
3.7.	Stanovenie celkových sacharidov podľa Duboise	35
3.8.	Extrakcia lipidov podľa Folcha	35
3.9.	Stanovenie celkovej sušiny sušením.....	36
3.10.	Stanovenie mikrobiálnej kontaminácie potravín.....	36
3.10.1.	Príprava pevného média	36
3.10.2.	Riedenie a očkovanie vzoriek.....	37
3.11.	Molekulárna analýza potravín metódou PCR	37
3.11.1.	Lýza buniek a izolácia DNA	37
3.11.2.	Izolácia DNA z hrubých lyzátov	37
3.11.3.	PCR v reálnom čase a analýza krivky topenia (Melt analýza).....	38
3.11.4.	Detekcia DNA agarózovou gélovou elektroforézou	39

4.	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	41
4.1.	Antioxidačná aktivita.....	41
4.2.	Obsah celkových polyfenolov a flavonoidov	41
4.3.	Obsah antokyánov	43
4.4.	Obsah celkových sacharidov	44
4.5.	Izolácia lipidov	45
4.6.	Obsah celkovej sušiny	45
4.7.	Stanovenie mikrobiálnej kontaminácie potravín	46
4.7.1.	Očkovanie na pevné médium	46
4.8.	Určenie mikroorganizmov metódou PCR	48
4.8.1.	PCR špecifická pre doménu <i>Bacteria</i>	48
4.8.2.	PCR špecifická pre kvasinky.....	51
5.	ZÁVER.....	54
6.	ZDROJE.....	56
7.	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	61

1. ÚVOD

Moderná doba sa vyznačuje pestrou škálou stravovania, čo je zabezpečené súčasnými technologickými postupmi. Tie zabezpečujú, že sa do väčšiny krajín dopraví akákoľvek prísada či druh potraviny. Pre ľudí je to podnetom pre rozširovanie svojho jedálneho o novú druhu potravín s veľkým množstvom vitamínov, minerálov či aktívnych látok.

Do popredia sa dostáva raw strava, známa aj ako „živá strava“. Tento životný štýl sa vyznačuje konzumáciou tzv. superpotravín, ktoré obsahujú látky prospešné pre ľudské telo. Konzumenti sa zameriavajú na čo najvyšší príjem živín a aktívnych látok. Keďže raw potraviny neprechádzajú tepelnou úpravou vyššou ako 42 – 45 °C, vznikajú rôzne dohady o pozitívach tohto typu stravovania. Dôležitým faktorom je stráviteľnosť veľkého množstva surových potravín. Ďalšou otázkou je, či je naozaj potrebná horná hranica tepelnej úpravy z hľadiska uvoľňovania určitých látok z potravín. Zvýšená teplota taktiež zabezpečuje antimikrobiálnu ochranu potravín počas procesu prípravy a uskladnenia.

Práca je zameraná na popis jednotlivých typov stravovania, približuje charakterizáciu, históriu, výhody a riziká životného štýlu raw. V práci budú ďalej stanovované vybrané živiny potrebné pre ľudský organizmus a aktívne látky, ktoré sú súčasne predmetom mnohých štúdií. Patria medzi ne antioxidanty, ktoré zabráňujú hromadeniu voľných radikálov v ľudskom organizme. Ďalšími stanovovanými aktívnymi látkami budú polyfenolické látky a antokyány, ktoré sú významné z hľadiska v boji proti rakovine. Tieto látky sa vyznačujú svojou prítomnosťou najmä v ovocí a zelenine, ktorá je preferovaná u raw konzumentov.

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1. Rôznorodosť stravovania

V dnešnej dobe existuje veľké množstvo diét a dôvodov je hneď niekoľko. Patrí medzi ne snaha o zníženie telesnej hmotnosti, možnosť rizika ochorení, nátlak modernej doby alebo dosiahnutie pocitu psychického a fyzického zdravia. Na trhu sa vyskytuje množstvo výživových doplnkov a kníh sľubujúcich dosiahnutie vysnívanej postavy, ktoré však môžu byť nebezpečné. Dôležité je identifikovať, ktoré potraviny a zložky sú v súčasnej dobe účinné a ktoré nebezpečné [1].

2.1.1. Hypokalorické diéty

Hypokalorické diéty sú založené na zníženom príjme kalórií, čo znamená, že ľudia ktorí dodržia tento typ diéty znižujú príjem potravy a ich celkový energetický príjem je veľmi nízky. Človek tak smeruje k hladovaniu, pričom telo začne využívať vlastné energetické rezervy. Hypokalorické diéty nie sú zdravé pre ľudské telo z dôvodu nízkej pestrosti jedálničku, kedy človek neprijíma potrebné živiny. Najčastejším nedostatkom je vitamín B, železo, vápnik a bielkoviny. Po ukončení diéty a dosiahnutí stanovenej hmotnosti trpia títo ľudia únavou, slabosťou a vyzerajú nezdravo. Výsledkom je opätovný nárast hmotnosti, čomu sa dá vyhnúť len celoživotným stravovaním na báze hypokalorickej diéty. Príkladom je napríklad Delená strava (kombinácia jedného typu potravín v priebehu niekoľkých dní), Diéta s kalorickým prahom (príjem presného množstva kalórií) alebo Diéta kliniky Mayo (denný príjem je 800 – 1000 kcal) [2].

2.1.2. Hyperlipidové diéty

Princípom je príjem stravy s vyšším podielom tukov a zníženým príjmom sacharidov. Nie je dôležitý denný príjem kalórií. Dôvodom je presvedčenie, že pri zníženom príjme cukrov organizmus tuky neukladá a len ich spaľuje. Rizikom je vznik kardiovaskulárnych chorôb, zvýšenie cholesterolu a lipidov v krvi, čomu sa však dá predísť príjmom mastných kyselín napr. z rybieho tuku. Ďalším rizikom je nadmerná záťaž pečene a obličiek, a znížený príjem vlákniny, minerálov a vitamínov [2].

2.1.2.1. Paleostrava

Označuje sa ako praveký alebo paleolitický typ stravovania. Základom sú princípy podmienené prírodou. Ľudia konzumujúci paleostravu vychádzajú zo stravovacích návykov našich predkov, ktoré prispôsobujú dnešnej dobe. Vychádzajú z teórie, že naši evoluční predkovia boli zdraví a neboli ohrození civilizačnými chorobami, pretože boli najmä lovcami stravujúci sa potravou bohatou na mäso či vajíčka. V paleo strave sú z celkového energetického príjmu uprednostňované tuky (takmer 50 – 60 %), sacharidy (20 – 30 %) a bielkoviny (20 – 25 %). Do jedálničku zaraďujú hlavne mäso zo zvierat spásajúcich trávu, ryby žijúce v ich prirodzenom prostredí, vnútornosti, vajcia, listovú zeleninu, ovocie s nízkym obsahom cukrov, mliečne výrobky s vysokým obsahom tuku. Paleo konzumenti sa zásadne vyhýbajú väčšiemu množstvu cukrov, strukovinám, olejom a semenám rastlín, potravinám z obilia a mliečnym výrobkom obsahujúcim väčšie množstvo kazeínu a laktózy [3, 4].

2.1.3. Hyperprotidické diéty

Cieľom hyperprotidických diét je zvýšený príjem potravín bohatých na proteíny a príjem určitého množstva sacharidov. Príjem tukov je obmedzený na ich obsah v daných výrobkoch. Tento typ diéty je založený na tom, že organizmus musí vynaložiť viac energie na rozštiepenie proteínov než na lipidy a sacharidy, pričom je prebytok proteínov vylučovaný v moči. V priebehu diéty je postupne znižovaný denný energetický príjem a percentuálne zastúpenie jednotlivých zložiek. U ľudí stravujúcich sa hyperprotidickými diétami je zaznamenaný nedostatok vitamínov, minerálov a vlákniny [2].

2.1.4. Hyperproteínové diéty

Základom je dostatočný príjem proteínov a mikroprvkov kombinovaný s čo najnižším príjmom kalórií. Od hyperprotidickej diéty sa líši množstvom a obmedzeným typom potravín. Pri dlhšom stravovaní sa zvyšuje riziko značného narušenia metabolizmu z dôvodu výhradnej konzumácie proteínov a veľmi malého až žiadneho príjmu sacharidov a lipidov. Proteíny sú konzumované vo forme práškov, polievok alebo dezertov. Tento typ diéty je doporučený len v urgentných prípadoch, ako sú ľudia s nadmernou obezitou alebo pacienti pred operáciou. Povolenými potravinami sú napríklad ovocie, zelenina, ryby a mliečne výrobky. Zo zakázaných potravín sú napríklad chlieb, cestoviny, ryža či červené mäso. Príkladom je diéta od Dr. Stillmana alebo Cambridge diet [2].

2.1.5. Hyperglycidové diéty

Základom je príjem prevažne sacharidových potravín z rastlinnej ríše a prvotným cieľom nie je chudnutie. Správnym prístupom sa môže dosiahnuť dokonalá kombinácia príjmu sacharidov, lipidov a bielkovín [2].

2.1.5.1. Vegetariánska strava

Vegetariánska strava zahŕňa rastlinné potraviny, mliečne výrobky vajcia a ďalšie potraviny živočíšneho pôvodu. V mnohých častiach sveta sa tento typ stravovania líši, ale všeobecne sa vylučuje mäso, ryby, morské plody a výrobky obsahujúce tieto potraviny [5, 6].

2.1.5.2. Vegánska strava

Termín vegánstvo sa vzťahuje na konzumáciu výrobkov, ktoré neobsahujú zložky živočíšneho pôvodu. Vegáni nekonzumujú akýkoľvek produkt zo zvierat, či už ide o produkt z usmrteného zvierat'a (napr. mäso, želatína), produkty živých zvierat (napr. mlieko, vajcia) a ďalšie ingrediencie založené na živočíšnej báze. Potrava vegánov je rozmanitá a najčastejšie zahŕňa ovocie, zeleninu, strukoviny, orechy a celozrnné výrobky [7, 8].

2.1.5.3. Fruktariánska strava

Za fruktariánov sa považujú ľudia, ktorí sa stravujú hlavne čerstvým ovocím. Strava tiež zahŕňa v nízkom množstve orechy, semená, sušené ovocie a olejnaté plody. Fruktariáni často trpia rôznymi zdravotnými problémami kvôli nedostatku bielkovín, vitamínu B₁ a B₂, vápniku, železa a zinku. V minimálnom množstve je povolená konzumácia zeleniny [9].

2.1.6. Raw strava

2.1.6.1. História

Konzumácia surovej stravy má svoj pôvod už v praveku. Naši predkovia konzumovali surovú stravu ešte predtým, ako objavili oheň. Po tomto významnom objave si ľudia začali variť a tepelne upravovať jedlo. Moderná doba začala propagovať surovú stravu už začiatkom 19. storočia. Lekár Maximilian Bircher-Benner, vynálezca müsli, je považovaný za prvého propagátora raw stravy a objaviteľa značného vplyvu raw stravy na vitalitu človeka. Bol zakladateľom sanatória a niekoľkých kliník, čo mu dalo podnet experimentovať a podávať pacientom najmä ovocie a zeleninu v priebehu ich pobytu v sanatóriu. V roku 1905 boli publikované jeho prvé teórie zamerané na diétu. Za spopularizovaním raw stravy v priebehu 19. storočia však stojí autorka kníh o zdravej výžive Leslie Kenton [10, 11].

2.1.6.2. Charakteristika

Raw strava je definovaná ako konzumácia surových potravín, ktoré neprešli tepelnou úpravou nad 113 ° F, čiže 45 °C. Ľudia patriaci do tejto skupiny konzumujú viac ako 75 % jedla, ktoré nie je tepelne upravené. Veria, že čím viac sa priblížia ku konzumácii 100 % surovej stravy, tým budú zdravší. Raw konzumenti sa delia do niekoľkých skupín. Môžu to byť vegáni, ktorí odmietajú jesť tiež živočíšne produkty, vegetariáni, ktorí odmietajú jesť mäso, no patrí sem aj skupina, ktorá konzumuje potraviny rastlinného aj živočíšneho pôvodu, avšak podmienkou je spracovanie pri teplote nižšej ako 42 – 45 °C. Hlavnými potravinami sú čerstvé a sušené ovocie a zelenina, orechy, semená, strukoviny, nepasterizované ovocné a zeleninové šťavy, nepasterizované mlieko a mliečne výrobky, surové vajcia. Je nevyhnutné získať rovnováhu v príjme vitamínov a minerálnych látok. Mnoho surových potravín je potrebné namočiť do vody, sušiť, nasekať či spracovať iným spôsobom, počas ktorého teplota nepresiahne 42 – 45 °C.

Hlavnou myšlienkou konzumentov raw stravy je, že enzýmy vyskytujúce sa v surových potravinách napomáhajú správne tráveniu. Tieto enzýmy sa inaktivujú teplom počas prípravy a jedlo sa tak stáva ťažšie stráviteľným. Extrémne skupiny konzumentov zastáva názor, že surové potraviny obsahujú baktérie a mikroorganizmy prospešné pre trávenie [10, 12, 13].

2.1.6.3. Výhody

Raw konzumenti tvrdia, že po prechode na raw stravu na sebe zaznamenali výrazné fyzické a duševné zlepšenie. Ďalej tvrdia, že konzumácia raw stravy so sebou prináša množstvo výhod, medzi ktoré patrí kontrola hmotnosti, zvýšenie energie, lepšie trávenie, odolnejší imunitný systém, zlepšený stav pokožky, lepší duševný stav a zníženie rizika srdcových a chronických chorôb [12].

2.1.6.4. Riziká

Ak človek prechádza na raw stravu, mal by sa dostatočne informovať aké potraviny sú v surovom stave nebezpečné. Príkladom sú listy rebarbory, ktoré sú v surovom stave jedovaté. Ak sú ich stonky zozbierané v nesprávnom období, po konzumácii môžu byť pre človeka toxické. Toxíny v zelených častiach na povrchu zemiakov sa varením pri vysokej teplote neutralizujú, no ich konzumácia bez varenia môže byť nebezpečná. Surové mäso a morské plody môžu byť napadnuté baktériami či parazitmi. Tie sú varením pri vyšších teplotách

usmrtené. Rizikom v oblasti zdravotného stavu môže byť tiež náhly prechod z varenej na surovú stravu. Telo po zaznamenaní veľkej zmeny reaguje opačným efektom, ako je bolesť hlavy, nevoľnosť a depresia. Dôležité je hlavne množstvo informácií pri zostavovaní jedálničku. Konzumenti surovej stravy často trpia na nedostatok príjmu bielkovín, vitamínov D a B₁₂, selénu, zinku, železa a dvoch typov omega-3 mastných kyselín (DHA a EPA) [12].

2.1.6.5. Rozdiely v názoroch

Niektoré názory vedcov a raw konzumentov sa líšia. Vedci uznávajú, že teplo ničí enzýmy. Dôležitým faktom je, že mnoho rastlinných enzýmov je zničených v kyslom prostredí tráviaceho traktu človeka bez ohľadu na to, či bolo alebo nebolo jedlo tepelne upravené. V priebehu varenia nastáva rozpad vláken a bunkových stien potraviny, vďaka čomu sa uvoľňujú živiny, ktoré by sa neuvolnili počas konzumácie v surovom stave. Ide napríklad o obsah karotenoidov v mrkve. Telo dokáže ľahšie absorbovať beta-karotén po tepelnej úprave. Väčšie množstvo železa a vápniku telo dokáže prijať z vareného špenátu. Ďalším príkladom je lykopén v paradajkách. Pravdou však je, že varením sa určité živiny strácajú. Ide najmä o vitamín C a niektoré vitamíny skupiny B. Ďalším pozitívom tepelnej úpravy je, že vysoká teplota ničí určité chemické látky v rastlinách, ktoré po konzumácii za surového stavu zabraňujú vstrebávaniu minerálov ako je napríklad zinok, horčík a vápnik [12, 14].

2.2. Vlastnosti jednotlivých živín v potravinách

2.2.1. Základné živiny

Medzi najdôležitejšie prirodzené zložky potravín patria živiny, ktoré určujú nutričnú a energetickú hodnotu potravín. Hlavné živiny sú bielkoviny, tuky (hlavne triacylglyceroly, fosfolipidy) a cukry (niektoré poly-, oligo- a monosacharidy). Ďalšie postavenie v strave zaujímajú voľné aminokyseliny či peptidy. Ich význam je však väčšinou zanedbateľný. Medzi živiny sa ďalej zaraďujú vitamíny a minerálne látky, ktoré sa súhrnne označujú ako prídavné živiny. Z výživového hľadiska sa tiež označujú ako esenciálne výživové faktory, pretože s výnimkou niektorých vitamínov ich ľudské telo nedokáže syntetizovať a musí ich preto získavať ako zložky potravy. Ďalšou dôležitou živinou je voda, ktorá je v malom množstve získavaná oxidáciou hlavných živín. Človek ju získava z potravín, hlavne z nápojov. Rada potravín prirodzene obsahuje tiež rôzne toxické látky, ktoré môžu byť pre človeka čiastočne nebezpečné a teda sa jedná o látky vyvolávajúce potravinovú neznášanlivosť. Tá sa môže prejaviť napríklad alergiou [15].

2.2.1.1. Bielkoviny

Bielkoviny (proteíny) sú polyméry aminokyselín, ktoré vznikli procesom proteosyntézy. V molekule bežne obsahujú viac než 100 aminokyselín viazaných peptidovou väzbou do nerozvetvených reťazcov. Okrem peptidových väzieb sa na vytváraní štruktúry proteínov podieľajú aj ďalšie väzby, ako napríklad disulfidové, esterové a amidové. Proteíny tvoria (vedľa vody) väčšinu hmoty živých organizmov. Proteíny sa na základe funkcie, ktorú vykonávajú, rozlišujú na:

- štruktúrne – vyskytujú sa prevažne ako stavebné zložky buniek, tkanív živočíchov a rastlinných pletív,
- katalytické – enzýmy, hormóny,

- transportné – umožňujú prenos rôznych zlúčenín, napr. hemoglobín,
- pohybové – napr. svalové proteíny aktín, myozín, aktomyozín,
- obranné – protilátky, imunoglobulíny,
- zásobné – ferritín,
- senzorické – rhodopsín,
- regulačné – históny, hormóny,
- výživové – sú zdrojom esenciálnych aminokyselín pre živočíchov, hlavným zdrojom dusíku v potrave a hmoty potrebnej k výstavbe a obnove živočíšnych tkanív.

Potravinárske suroviny sú často tepelne upravované, pričom v mnohých prípadoch dochádza k súboru fyzikálnych a chemických zmien proteínov označovaných termínom denaturácia. Z tohto dôvodu sa preto niekedy podľa stavu v akom sa nachádzajú v potravinách rozlišujú na natívne (prírodné), ktoré majú zachované svoje biologické funkcie, denaturované, ktoré tieto funkcie už nemajú a upravené (chemicky modifikované), ktoré sa väčšinou používajú ako aditíva pre zvláštne účely.

Pre ľudskú výživu sa proteíny získavajú z rôznych zdrojov. Ide najmä o bielkoviny potravín živočíšneho pôvodu, z ktorých významné sú mäso (jahňacie hovädzie, morčacie), ryby (napr. losos, makrela, tuniak), mlieko a mliečne výrobky (tvaroh, tvrdé syry) a vajcia. Medzi významné bielkoviny rastlinného pôvodu patria obilniny, strukoviny (hrach, fazuľa, šošovica), olejniny (sója, orechy, mak), ale tiež ovocie a zelenina. Kvôli dosiahnutiu optimálneho príjmu aminokyselín je dôležitá správna kombinácia jednotlivých druhov strukovín medzi sebou [15, 16].

2.2.1.2. Lipidy

Lipidy patria k významným zložkám potravín a vo výžive človeka tvoria jednu z hlavných živín nevyhnutnú pre zdravie a vývoj organizmu. Slúžia ako zásobný a dlhodobý zdroj energie, chránia tkanivá a orgány pred mechanickým poškodením a podieľajú sa na tvorbe niektorých hormónov. Sú tiež súčasťou mozgového tkaniva a bunkových membrán. V lipidoch sa rozpúšťajú vitamíny A, D, E a K, ktoré nie sú schopné rozpustiť sa vo vode. Práve preto sú lipidy ich hlavným zdrojom pre živočíšny organizmus. Podľa charakteristického zloženia sa lipidy rozdeľujú do troch hlavných skupín:

- Homolipidy sú zlúčeniny mastných kyselín a alkoholov.
- Heterolipidy obsahujú okrem mastných kyselín a alkoholu ešte ďalšie kovalentne viazané zlúčeniny, napr. kyselina fosforečná je viazaná vo fosfolipidoch.
- Komplexné lipidy, ktoré obsahujú homolipidy aj heterolipidy. Okrem väzieb sú niektoré zložky viazané rôznymi fyzikálnymi väzbami, napr. vodíkovými alebo hydrofóbnymi reakciami.

K významným tukom patria tuky rastlinného pôvodu, rybí tuk a tuk vaječného žĺtka, z dôvodu vysokého obsahu esenciálnych mastných kyselín, ktoré majú na ľudské telo pozitívny účinok. Dôležitý je pomer medzi omega-3 a omega-6 mastnými kyselinami, ktorých zdrojom sú napríklad ľanový olej a orechy. Z tukov živočíšneho pôvodu sú významným zdrojom najmä mliečne výrobky, ktoré majú vplyv na činnosť svaloviny. Potrebne je dodržiavať správny pomer jednotlivých druhov mastných kyselín. Potraviny obsahujúce tuky

prospešné pre ľudské telo sú avokádo, orechy (mandle, vlašské orechy, para orechy), rybí tuk a oleje (olivový, konopný) [15, 16].

Mastné kyseliny

Mastné kyseliny sa triedia podľa polohy prvej dvojitej väzby od koncovkej metylovej skupiny. Ak sa prvá dvojité väzba nachádza na šiestom uhlíku od konca reťazca, tak hovoríme o rade ω -6 polyénových kyselín. Obdobne sa nazývajú mastné kyseliny rady ω -3, ktoré obsahujú prvú dvojitú väzbu na treťom uhlíku od konca reťazca.

Z hľadiska výživy sú mastné kyseliny najvýznamnejšou zložkou lipidov. Formou stravy človek prijíma len málo voľných mastných kyselín. Človek je schopný syntetizovať nasýtené a niektoré nenasýtené mastné kyseliny, ale nedokáže syntetizovať k životu potrebné polyénové mastné kyseliny rady ω -6 (linolové) a ω -3 (α -linolenové). Preto musí tieto tzv. esenciálne mastné kyseliny prijímať potravou v dostatočnom množstve.

Linolová a α -linolenová kyselina sa v ľudskom organizme predĺži o 2, resp. 6 atómov uhlíku a vytvárajú sa dvojité väzby, pričom vznikajú mastné kyseliny s 20 – 24 atómami uhlíku a s 3 – 6 dvojitými väzbami v molekule. Tieto vyššie esenciálne mastné kyseliny majú v živočíšnom organizme nezastupiteľnú úlohu ako prekursor biologicky aktívnych látok a ako modulačné zložky biologických membrán.

Nasýtené mastné kyseliny (SAFA) vo svojej molekule obsahujú len jednoduché väzby. Nasýtené mastné kyseliny sa syntetizujú z acetyl-CoA. Reťazec mastnej kyseliny sa pri každom cykle predĺži vždy o dva atómy uhlíku, preto sa v lipidoch častejšie nachádzajú mastné kyseliny s párnym počtom uhlíkov. Väčšinou je syntéza zastavená po dosiahnutí 16 – 18 atómov uhlíkov. Vďaka vyššej teplote topenia sú odolnejšie voči tepelnej úprave. Pri nadmernej konzumácii môžu spôsobovať zhoršené okysličovanie krvi a tkanív, zvýšiť hladinu cholesterolu v krvi, čo môže mať za následok vyššie riziko vzniku srdcovocievnych ochorení. Vyskytujú sa hlavne v živočíšnych produktoch ako je červené mäso či maslo. Z rastlinných zdrojov je to napríklad palmový a kokosový olej.

Nenasýtené mastné kyseliny obsahujú vo svojom reťazci aspoň jednu dvojitú väzbu. Podľa počtu dvojitých väzieb sa delia na mononenasýtené (MUFA), ktoré obsahujú len jednu dvojitú väzbu a polynenasýtené (PUFA), ktoré majú vo svojom reťazci dve a viac dvojitých väzieb. Vyskytujú sa najmä v rastlinných olejoch a rybom tuku [15, 16].

2.2.1.3. Sacharidy

Sacharidy sú dôležitým zdrojom energie a tvoria takmer polovicu z celkového energetického príjmu. Vďaka ich vlastnostiam a funkciám sú často využívané pri chudnutí alebo pri naberaní svalovej hmoty. Sú hnacím motorom pre mozog a svaly. Pri ich nedostatku sa u človeka môže prejaviť narušenie psychiky či agresivita. Naopak, pri ich nadbytku, nesprávnej a nepremyslenej konzumácii ovplyvňujú hladinu glukózy v krvi, čo vedie k priberaniu a nadváhe. Sacharidy sa často vyznačujú sladkou chuťou. Medzi sacharidy škodlivé pre ľudské telo sa zaraďujú potraviny obsahujúce umelé sladidlá, ďalej sú to napríklad zákusky, limonády či pečivo z pšeničnej múky. Sacharidy sú prítomné v každej rastlinnej a živočíšnej bunke a majú rôzne funkcie:

- Využívajú sa predovšetkým ako zdroj energie a preto sa radia medzi hlavné živiny.
- Majú zásobnú funkciu.

- Sú základnými stavebnými jednotkami mnohých buniek, chránia bunky pred pôsobením rôznych vonkajších vplyvov.
- Sú biologicky aktívnymi látkami alebo zložkami mnohých biologicky aktívnych látok, ako sú enzýmy, glykoproteíny, niektoré vitamíny či hormóny [15].

Delia sa na 3 základné skupiny podľa dĺžky reťazca:

- Monosacharidy

Sú to jednoduché cukry, ktoré sa často vyskytujú vo forme monomérov alebo ako zložky oligo- a polysacharidov. Sú definované ako polyhydroxyaldehydy (aldózy) alebo polyhydroxyketóny (ketózy). Podľa počtu uhlíkových atómov sa delia na triózy, tetrózy, pentózy a hexózy. K najvýznamnejším monosacharidom patrí glukóza (hroznový cukor), fruktóza (ovocný cukor), galaktóza (mliečny cukor) a kyselina askorbová (vitamín C).

- Oligosacharidy

Sú to sacharidy zložené z 2 až 10 monosacharidových jednotiek, ktoré sú spojené α - alebo β - glykozidovou väzbou. Podľa počtu monosacharidov sa delia na di-, tri-, tetrasacharidy atď, na ktoré sa môžu rozložiť kyslou alebo enzýmovou hydrolýzou. Sú častou súčasťou polypeptidov v glykoproteínoch a glykolipidoch. Medzi najvýznamnejšie oligosacharidy patrí sacharóza (trstinový cukor), maltóza (sladový cukor) a laktóza (mliečny cukor).

- Polysacharidy

Skupina skladajúca sa z 10 a viac monosacharidových podjednotiek, avšak ich počet môže dosahovať stovky až tisíce. Reťazce polysacharidov môžu byť rozvetvené a nerozvetvené, navzájom pospájané α - alebo β -glykozidickými väzbami. Ak sú polysacharidy zložené len z jedného typu monosacharidu, ide o homoglykány. Ak sú zložené z rôznych monosacharidových podjednotiek, hovoríme o heteroglykánoch. Medzi najvýznamnejšie homoglykány patrí škrob (zásobný polysacharid v rastlinách), celulóza (vláknina, primárna štruktúrna zložka rastlinných buniek) a glykogén (zásobný polysacharid živočíchov). Z heteroglykánov je to napríklad kyselina hyalurónová (zložka spojivových tkanív) alebo heparín (inhibuje zrážanie krvi) [17].

Pozitívny vplyv majú polysacharidy so zvýšeným podielom vlákniny, ktorú ľudské telo trávi pomaly. Prísun energie je vďaka tomu pomalší a postupný, čím sa udržiava stabilná mentálna a fyzická výkonnosť. Po ich konzumácii telo pociťuje dlhodobý pocit zasýtenia. Medzi významné zdroje patrí celozrnné pečivo, cereálie, strukoviny a hnedá ryža [17, 19].

2.2.2. Biologicky aktívne látky

2.2.2.1. Antioxidanty

Živočíšny organizmus závislý na kyslíku je vystavený negatívnym účinkom tzv. reaktívnych foriem kyslíku – voľným radikálom. Voľný radikál je častica (napr. atóm) s jedným nespárovaným elektrónom vo valenčnom orbitále. Je extrémne reaktívny a v podstate nestabilný. Keď vytvorené reaktívne kyslíkové formy (ROS) alebo dusíkové metabolity (RNS) prevýšia antioxidačnú kapacitu v biologickom systéme, nastáva nerovnováha, ktorú odzrkadľuje oxidačný stres. Voľné radikály môžu poškodiť všetky zložky bunky (proteíny, nukleové kyseliny, lipidy), čo má za následok vznik rôznych ochorení

vrátane rakoviny a kardiovaskulárnych chorôb. Redukciou kyslíku vznikajú reaktívne formy kyslíku:

- superoxidový radikál – reaktívny anión s nespárovaným e^- ,
- peroxid – nebezpečný oxidant, ktorý poškodzuje bunkové štruktúry,
- hydroxylový radikál – najnebezpečnejší a najreaktívnejší radikál [20, 21].

Medzi reaktívne formy dusíku (RNS) patrí oxid dusnatý a peroxydusitan. Sú to dusíkové deriváty podieľajúce sa na oxidačnom poškodení biologických štruktúr. Významnosť poškodení reaktívnymi formami dusíku sa dosť zanedbávala. V poslednej dobe sa zisťuje, že nebezpečnosť RNS je minimálne rovnako dôležitá ako u ROS. Zdroje nežiaducich radikálov môžu byť vnútorné aj vonkajšie. Ak hovoríme o vnútornom zdroji radikálov, ide o proces v dýchacom reťazci, v ktorom dochádza k úniku elektrónu počas jeho prechodu z jedného komplexu na druhý. Uniknutý elektrón zreaguje s kyslíkom rozpusteným v mitochondriách, čím vzniká superoxid. Superoxid, peroxid či oxid dusnatý môže tiež vzniknúť v priebehu oxidatívneho vzplanutia bielych krviniek ako prirodzený proces imunitného systému. Vonkajších zdrojov vzniku voľných radikálov je mnoho. Medzi vonkajšie zdroje patrí ionizujúce žiarenie, UV žiarenie, pri ktorom vzniká superoxid a prejavuje sa starnutím kože. Tento proces najčastejšie nastáva pri častom a dlhodobom vystavení sa na priamom slnečnom žiarení. Voľné radikály môžu vznikať aj v pľúcach, čo je dôsledkom znečisteného životného prostredia. Pre zmiernenie týchto oxidačných poškodení udržiavajú živé organizmy komplexné systémy antioxidantov.

Antioxidanty sú bioaktívne látky, ktoré majú pozitívny účinok pri znižovaní rizika rôznych druhov rakoviny, infekčných chorôb, chronických ochorení vrátane obezity a kardiovaskulárnych ochorení. Antioxidačný účinok môžu mať antioxidačné enzýmy alebo antioxidačné molekuly. Enzýmy, ktoré sa nachádzajú v organizme, sú napríklad soperoxidázmutáza, kataláza, či peroxidáza. Antioxidačné molekuly sú predovšetkým vitamíny alebo látky prevažne lipidovej povahy označované bežne ako antioxidanty. Antioxidanty priamo reagujú s voľným radikálom tak, že sa sami stanú voľným radikálom, ktorý je už relatívne stabilný a nereaktívny vďaka množstvu konjugovaných dvojných väzieb vo svojej štruktúre.

Najvýznamnejšie antioxidačné molekuly:

- CoQ10 (ubichinón, ubichinol) – jeho funkciou je prenášať elektróny medzi komplexami 1,2, a 3 v dýchacom reťazci. Vyskytuje sa v mitochondriálnej membráne.
- Vitamín E (tokoferol) – antioxidant vyskytujúci sa vo všetkých membránach (okrem mitochondriálnej).
- Karotenoidy a lipofilné farbivá – skupina žltých, oranžových, červených a fialových pigmentov. Významné sú najmä chlorofyl *a*, *b*, ďalej napríklad beta-karotén (prekurzor vitamínu A).
- Vitamín C (kyselina askorbová) – funguje ako antioxidant v hydrofilných častiach bunky alebo ako regenerátor vitamínu E [20, 22].

2.2.2.2. Polyfenoly

Polyfenoly sú organické zlúčeniny obsahujúce aspoň dve hydroxylové skupiny pripojené k aromatickému kruhu. Ich antioxidačná aktivita je zapríčinená práve prítomnosťou –OH skupiny. Majú celý rad fyziologických vlastností, medzi ktoré patrí protizápalová, antimikrobiálna a antioxidačná aktivita. Vďaka svojej antioxidačnej aktivite sú považované za jedny z najvýznamnejších zložiek potravín rastlinného pôvodu. Boli detekované v mnohých rastlinách, kde pracujú ako sekundárne rastlinné metabolity, zvyčajne zapojené do obrany proti ultrafialovému žiareniu a patogénnemu napadnutiu. Polyfenoly obsahujú veľkú škálu zlúčenín, ktoré majú rozmanitú štruktúru a vlastnosti [23, 24].

Delia sa do troch základných skupín, medzi ktoré patria flavonoidy, fenolové kyseliny, stilbény a lignány.

○ Flavonoidy

Flavonoidy sú prirodzene sa vyskytujúce sa polyfenoly, ktoré sa vyskytujú v potravinách rastlinného pôvodu, ako je ovocie (hrozno, čerešne, jablká), zelenina (paprika, paradajky, špenát) či liečivé rastliny. Flavonoidy prispievajú k funkčnosti ovocia a zeleniny a svojou antioxidačnou aktivitou sú prevenciou rôznych ochorení. Patria do skupiny farmakologických zástupcov s antioxidačnou, antilipidemickou, antihyperglykemickou a protirakovinovou aktivitou. V priebehu posledných desaťročí bolo charakterizovaných viac ako 10 000 flavonoidov. Skladajú sa z niekoľkých podtried, medzi ktoré patria napríklad flavonoly, antokyány, flavóny [25, 26, 27].

2.2.2.3. Antokyány

Spolu s antokyanidínmi patria do širokej skupiny flavonoidov fenolových zlúčenín, ktoré sú zodpovedné za červenú, modrú a fialovú farbu mnohých rastlín, ovocia a zeleniny. Sú klasifikované ako biologicky aktívne látky s radom potenciálnych prínosov pre ľudské zdravie. Sú známe pre svoje antioxidačné, protirakovinové a protizápalové vlastnosti. Sú to vo vode rozpustné pigmenty s antioxidačnými a biologickými vlastnosťami, ktoré pôsobia v boji proti neurodegeneratívnym ochoreniam či cukrovke. Snaha o využívaní prírodných ingrediencií viedla k využívaniu antokyánov ako prírodných farbív v potravinách.

Majú mnoho farmakologických využití a zdravotných výhod. Antokyány získavané z rastlín sa vyznačujú rozpustnosťou vo vode, jasnými farbami a absenciou nepriaznivých účinkov na zdravie. Najväčšie zastúpenie majú v bobuľovom ovocí. Použitie antokyánov je obmedzené kvôli ich nestabilite a nízkej biologickej dostupnosti. Sú citlivé na podmienky prostredia ako je pH, teplota, obsah kyslíku a prítomnosť enzýmov [28, 29, 30].

2.2.3. Kontaminujúce látky

Kontaminanty patria k ďalším nežiaducim zložkám potravy. Vo vzťahu k požívateľinám sa často rozlišujú na:

- exogénne (primárne) kontaminanty – môžu vzniknúť v dôsledku ľudských aktivít, napríklad reziduá pesticídov,
- endogénne (sekundárne) kontaminanty – môžu vzniknúť z prirodzených zložiek v potravinách počas spracovania či skladovania [15].

2.3. Mikroorganizmy

Ako mikroorganizmy sú označované jednobunkové alebo viacbunkové organizmy, ktoré nemajú schopnosť tvoriť funkčne diferencované tkanivá alebo pletivá. Mikroorganizmy boli nazvané podľa gréckeho slova mikros – malý, pretože ich veľkosť sa pohybuje od niekoľkých desiatín μm do niekoľkých desiatín mm. V systematike organizmov sú mikroorganizmy označované ako Protista, ktoré sa rozdeľujú na:

- Prokaryota – nemajú diferencované jadro, rozdeľujú sa na cyanobaktérie a baktérie.
- Eukaryota – organizmy s pravým jadrom, oddeleným od cytoplazmy jadrovým obalom. Do skupiny sú zahrnuté všetky rastliny a živočíchy. Patria sem riasy, huby (kvasinky, plesne) a protozoa.

K mikroorganizmom sa pričleňujú aj vírusy. Sú to nebunkové organizmy, ktoré ako zdroj energie a stavebných materiálov pre syntézu svojej bunkovej hmoty vyžadujú organické zlúčeniny [31].

2.3.1. Vlastnosti

Mikroorganizmy sú schopné zachovať si v potravine svoju životaschopnosť a virulenciu (schopnosť spôsobiť ochorenie). Ďalej sú schopné v potravine množiť sa a vlastniť špecifické faktory patogenity. Špecifické faktory patogenity zahŕňajú tvorbu toxínov, množenie a šírenie sa v tkanivách vnímavého jedinca. Rozhodujúcim faktorom je infekčná dávka mikroorganizmu, odolnosť človeka, ktorá je ovplyvnená aktuálnym zdravotným stavom, vek a obranné mechanizmy človeka [32].

2.3.2. Pramene mikrobiálnej kontaminácie potravín

Kontaminácia potravín mikroorganizmami môže byť primárna alebo sekundárna. Primárnu kontamináciu potravín spôsobujú saprofytické a choroboplodné mikroorganizmy skôr, ako sú potraviny dodané do potravinárskeho alebo kulinárneho závodu. Ku kontaminácii mlieka môže dôjsť k primárnej kontaminácii prítomnosťou choroboplodných baktérií vo vemene, počas dojenia, ďalej pri styku s nádobami, potrubím a plochami počas prvého ošetrenia mlieka. Mäso môže byť kontaminované intravitálne pred porážkou chorých hospodárskych zvierat alebo po porážke zdravých zvierat. K primárnej kontaminácii rastlín dochádza pred a počas zberu úrody mikroorganizmami nachádzajúcich sa v pôde, v prachu či v kontaminovanej vode použitej na polievanie.

Sekundárnu kontamináciu potravín spôsobujú najmä saprofytické mikroorganizmy. Väčšinou k nej dochádza počas opracovania, spracovania a finalizácie stykom s náradím a zariadením, ktoré je nedostatočne očistené a dekontaminované. Dôležitú úlohu majú aj chorí ľudia a bacilonosiči, ktorí sú zamestnaní v potravinárskych a kulinárskych závodoch aj napriek zdravotným predpisom. V tomto prípade je možnosť primárnej a sekundárnej kontaminácie potravín mikroorganizmami napríklad z vlasov, hnisavých rán, fekálií a iných. Saprofytické alebo choroboplodné mikroorganizmy sa môžu množiť aj v zle uskladnených polotovarochoch či hotových produktoch [32].

2.3.3. Mikrobiálny výskyt na ovocí a zelenine

Vhodným živným médiom pre rozvoj mikroorganizmov je dužina ovocia, ktorá je poškodená a ovocie nie je chránené súvislou šupkou. Typická mikroflóra ovocia pozostáva

hlavne z kvasiniek. Znehodnotenie ovocia je spôsobené najmä plesňami, predovšetkým plesňami rodu *Penicillium*. Len v malých množstvách bývajú v ovocí prítomné koliformné mikróby. Zloženie a množstvo mikroflóry sa líši podľa druhu ovocia a je ovplyvňované aj podmienkami, za akých bolo ovocie pestované a zbierané. Ďalším faktorom je počasie pred a počas zberu. K značnému zvýšeniu mikrobiologickej kontaminácie môže prispievať nevhodná manipulácia, transport a obal.

Ak je zelenina celistvá a neporušená, tak je svojou biologickou štruktúrou chránená proti napadnutiu mikroorganizmami. Napriek sterilným tkanivám môžu mikroorganizmy prenikať cestou cievných zväzkov stoniek, listov a plodov. Veľké množstvo baktérií, kvasiniek, spór a plesní sa však nachádza na povrchu zeleniny či v pôde, ktorá sa zachytáva na hľuzách a koreňoch. Medzi dominantnú mikroflóru na zdravej zelenine patria baktérie, kvasinky, menej časté sú plesne a koliformné baktérie. Výskyt mikroorganizmov tiež závisí na spôsobe a dobe zberu, na doprave a skladovaní [31, 32].

2.3.4. Prehľad najvýznamnejších baktérií vyskytujúcich sa v ovocí a zelenine

○ Rod *Acetobacter*

Tento rod patrí do čeľade *Acetobacteraceae*, čo sú aeróbne baktérie, ktoré sa vyskytujú v kaziacom sa ovocí a zelenine, nevyvolávajú však ochorenia. Sú to gramnegatívne aeróbne tyčinky a koky. Používajú sa pri výrobe octu. Nežiaduce sú pre kontamináciu pri výrobe droždia [31].

○ Rod *Bacillus*

Rod, ktorý tvorí väčšinou grampozitívne peritrichné tyčinky, ktoré majú bohaté enzýmové vybavenie. Niektoré druhy sú aeróbne, iné anaeróbne. Majú lipolytické, proteolytické a sacharolytické vlastnosti. Na povrch ovocia a zeleniny sa dostávajú z pôdy. Druh *Bacillus cereus* produkuje pri raste na polysacharidových substrátoch toxíny, ktoré môžu byť pri vyšších množstvách príčinou otravy. Najčastejšou príčinou môže byť vysoká koncentrácia tohto druhu v potravinách obsahujúcich škrob.

○ Rod *Enterobacte*

Patrí do čeľade *Enterobacteriaceae* a sú to gramnegatívne fakultatívne anaeróbne tyčinkovité mikroorganizmy. Mikroorganizmy tohto rodu sa označujú ako koliformné a patria medzi črevné mikroorganizmy, pretože sa vyskytujú v tráviacom trakte zvierat a ľudí [31, 32].

○ Rod *Erwinia*

Patrí do čeľade *Enterobacteriaceae* a sú to gramnegatívne fakultatívne anaeróbne tyčinkovité mikroorganizmy. Rod *Erwinia* sa vyskytuje na rastlinách a môže vyvolávať nekrózy či iné poškodenia rastlín. Môže spôsobovať kazenie plodov a zeleniny v priebehu skladovania. Je možné tieto mikroorganizmy izolovať tiež z vody a pôdy [31].

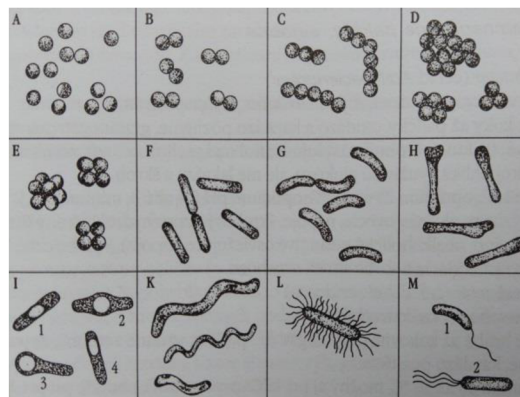
○ Rod *Escherichia*

So svojim najdôležitejším druhom je *E. coli* zástupcom čeľade *Enterobacteriaceae*. Jeho druhy sú charakteristické kvôli svojmu výskytu v spodnej časti črevného traktu človeka a teplokrvných zvierat. Jeho prítomnosť vo vode alebo v potravinách najčastejšie poukazuje na to, že došlo k znečisteniu fekáliami. Pravidelne sa vyskytuje v surovinách, ktoré boli v kontakte s hnojenu pôdou. Zástupcovia sa však môžu vyskytovať aj tam, kde sa nepredpokladá priame fekálne znečistenie ako napríklad v pasterizovanom mlieku

či v syroch. Niektoré kmene spôsobujú hnačkové ochorenia a ochorenia močových ciest [31, 32].

○ *Rod Lactobacillus*

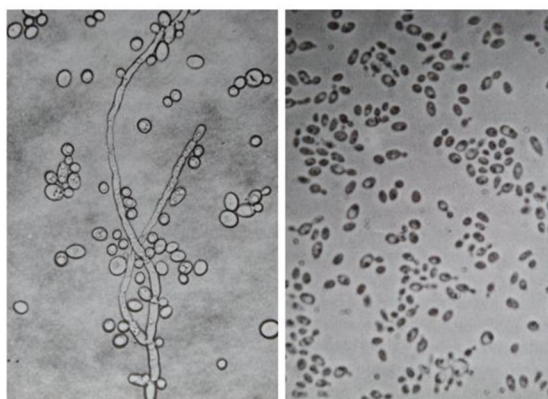
Sú to dlhé, grampozitívne, nesporulujúce tyčinkovité mikroorganizmy rozšírené v prírode. Tento rod je dôležitý z biotechnologického a potravinárskeho hľadiska. Jeho druhy sa vyskytujú v mlieku, kde vyvolávajú prirodzené kysnutie. Niektoré druhy sa môžu využívať na výrobu jogurtov, prípravu kvaseného mlieka či na konzervovanie zeleniny a niektorých krmív (kysnutie kapusty a uhoriek). Nevyvolávajú ochorenia z potravín, práve naopak. Výsledné potraviny pri riadenej fermentácii sú ľahšie stráviteľné [31].



Obr. 1: Základné tvary baktérií (A = koky, B = diplokoky, C = streptokoky, D = stafylokoky, E = sarcíny, F = paličky, G = vibriá, H = koryneformné paličky, I = sporujúce paličky, spóry centrálné (1,2), terminálne (3), subterminálne (4), klostridie (2,3), K = spirily, L = peritrichné bičiky, M₁ = monopolárne monotrichný bičík, M₂ = monopolárne polytrichné bičiky [32]

2.3.5. Prehľad najvýznamnejších kvasiniek vyskytujúcich sa v ovocí a zelenine

Kvasinkovité organizmy sa vyskytujú predovšetkým na ovocí, hlavne bobuľovom a kôstkovitom a na cukornatých potravinách, pretože majú zväčša sacharolytické schopnosti. Na povrchu mäkkého ovocia prevládajú hlavne kvasné typy (*Saccharomyces*, *Saccharomyces*, *Kloeckera*). Negatívny vplyv majú tiež patogénne kvasinky, hlavne *Cryptococcus neoformans*, ďalej rody *Filobasidiella* a *Malassezia* a niektoré druhy *Trichosporon*. Bunky niektorých druhov napádajú tkanivá ľudí a zvierat, predovšetkým mozgové tkanivo a poranené kosti. Vážne ochorenia spôsobujú väčšinou u oslabených jedincov alebo u jedincov s poškodeným imunitným systémom. V týchto prípadoch môže ochorenie končiť aj smrťou. Rod *Candida* zahŕňa mnoho patogénnych zástupcov. Jedným z nich je *Candida albicans*, ktorý je pôvodcom ochorenia kože a nechtov najmä u ľudí, ktorí pracujú s pôdou alebo s ovocím a cukrovými nálevmi. Ďalej môže tiež napádať vnútorné orgány či sliznicu. Rod *Malassezia* je patogénny len za určitých podmienok, kedy je nebezpečný pre zvieratá aj pre človeka. Napáda napr. pokožku nôh a hlavy [31, 32].



Obr. 2: Mikrofotografie buniek kvasiniek (zľava: *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*)[31]

2.3.6. Prehľad najvýznamnejších plesní vyskytujúcich sa v ovocí a zelenine

Keďže sú plesne schopné napádať aj neporušené rastlinné pletivá (napr. zelenina, mäkké ovocie), vytvárajú tak cestu bakteriálnemu rozkladu. Sú schopné rozmnožovať sa aj za nízkeho pH, vďaka čomu sú schopné vyskytovať sa na kyslom ovocí, džemoch a marmeládach. Plesne majú negatívny význam z hľadiska schopnosti tvoriť mykotoxíny.

Mykotoxíny sú toxické sekundárne metabolity produkované veľkým množstvom mikroskopických vláknitých húb a predstavujú zdravotné riziko rovnako ako pre ľudí, tak aj pre hospodárske zvieratá. Ochorenia vznikajúce v dôsledku konzumácie kontaminovaných potravín alebo krmív toxickými mykotoxínmi sa označujú pojmom „mykotoxikózy“ [31, 32].

Trieda Zygomycetes

○ Rod *Mucor*

Najrozsiahljším rodom triedy *Zygomycetes* je rod *Mucor*, ktorý zahŕňa približne 100 druhov. Na ovocí a zelenine vytvára voľne vláknitý, väčšinou belavý porast s guľovitými sporangiami. Kolumela má rôzny tvar. Niektoré druhy produkujú mykotoxíny, ktoré sú patogénne.

○ Rod *Rhizopus*

Rod veľmi rozšírený v prírode, ktorý spôsobuje kazenie ovocia a iných potravín. Niektoré jeho druhy produkujú patogénne mykotoxíny [31, 32].

Trieda Deuteromycotina a k nej prislúchajúca Ascomycotina

○ Rod *Alternaria*

Mykotoxíny produkujú len niektoré kmene. Často sa vyskytuje vo vzduchu v prírode a v rôznych potravinárskych prevádzkach, vďaka tmavej farbe spór a mycélia, ktoré ju chránia pred nepriaznivými účinkami slnečného žiarenia. V skladiskách zeleniny spôsobuje čiernu hnilobu mrkvy. Niektoré kmene sú producenti mykotoxínov [32].

○ Rod *Aspergillus*

Rod, ktorý je vybavený amylolytickými, pektolytickými a proteolytickými enzýmami. Vďaka tomu sa niektoré druhy využívajú na priemyslovú prípravu týchto enzýmov, ktoré sú ďalej využívané v potravinárskom priemysle (pivovarstvo, príprava ovocných štiav). Pre priemyslovú a kvasnú výrobu organických kyselín sa používa napríklad druh *Aspergillus*

niger (výroba kys. citrónovej) alebo *Aspergillus terreus* (výroba kys. itakonovej). Plesnivenie džemov či chlebu spôsobuje druh *Aspergillus glaucus*. *Aspergillus versicolor* je druh vyskytujúci sa na potravinách s pomerne nízkou vlhkosťou ako napríklad obilie, sušené mäso, sušené ovocie a zelenina. Rôzne druhy produkujú ochratoxín A. Mutagénne aflatoxíny spôsobujúce rakovinu čriev sú toxíny produkované druhmi *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* [32].

Aflatoxíny a ich toxicita: Sú to heterocyklické zlúčeniny, ktoré sa delia na šesť hlavných typov B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ a M₂. Aflatoxíny sa napriek svojej termorezistencii čiastočne inaktivujú dlhšie trvajúcim pôsobením vyšších teplôt (100 až 120 °C). Pre človeka je významná ich chronická toxicita, ktorá sa po konzumácii prejavuje poškodením pečene. Nebezpečné je aj vdychovanie prachu zo splesniveného obilia. Okrem toxicity je nebezpečná aj teratogenita (znetvorenie alebo odumretie plodu) a kancerogenita, ktorá sa prejavuje hlavne u zvierat, ako sú vtáky či ryby. Prítomnosť a obsah aflatoxínov sa odporúča vyšetrovať na nasledovných produktoch a potravinách vyrobených z týchto produktov: podzemnica olejná (tzv. búrske oriešky), lieskovce, orechy, paraorechy, pistácie, mandle, marhuľové a broskyňové jadrá, kokosová múčka, mak, sezam a obilniny [32, 33, 34].

- *Rod Botrytis*

Tento psychrofilný rod plesní spôsobuje hnilobu ovocia skladovaného pri nízkych teplotách. Pri vlhkom počasi tiež spôsobuje hnitie jahôd a cibule. Druh *Botrytis cinerea* tvorí tzv. ušľachtilú pleseň na vínnej réve, čo je žiaduce pre prípravu tokajského typu vín [32].

- *Rod Fusarium*

V prírode veľmi rozšírený a rozsiahly rod. Niektoré jeho druhy spôsobujú choroby rastlín, iné produkujú toxíny, ktoré môžu človeku spôsobiť vážne zdravotné problémy. Patria medzi najvýznamnejších producentov mykotoxínov typu zearalenon, moniliformin a skupiny trichothecény. Najčastejšie sú to *Fusarium poae*, *F. graminearum* a *F. sporotrichioides*. Najčastejšia kontaminácia bola sledovaná u cereálií, pšenice, kukurice, sójových bôbov a banánov [32].

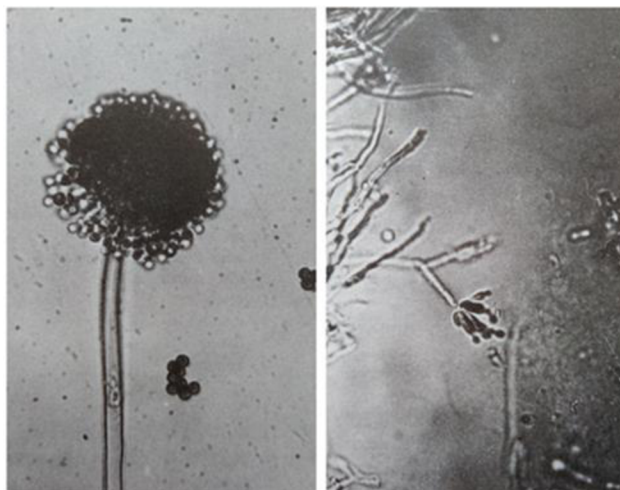
Trichothecény a ich toxicita: Podľa charakteristických vlastností a počtu funkčných a substitučných skupín sa rozlišujú na základné skupiny *typu A*, medzi ktoré patrí T-2, HT-2 toxín, neosolaniol (NEO), diacetoxyscirpenol (DAS), *typu B*, kam patrí nivalenol (NIV), deoxynivalenol (DON), 3-acetyldeoxynivalenol (3-ADON), 15-acetyldeoxynivalenol (15-ADON) a fusarenon-X (FUS-X) a skupiny *typu C* a *D*. Celkovo sa jedná o skupinu obsahujúcu viac než 180 typov toxínov. V silne alkalickom prostredí sú menej stabilné a sú známe ako inhibítory proteosyntézy a imunosupresívne látky. Po požití sa trichothecény v črevách metabolizujú na epoxidy, ktoré negatívne ovplyvňujú základné funkcie, ako je syntéza bielkovín a DNA, čím je negatívne ovplyvnená replikácia buniek. Fusariovým toxínom sa pripisuje rad doteraz neobjasnených epidemicky vyskytujúcich sa ochorení. T-2 toxín je spájaný s ochorením ATA – alimentárna toxická aleukia, ktorá spôsobuje oslabenie krvotvorného systému [32, 33, 34].

- *Rod Penicillium*

Zahrňa asi 150 druhov, čo z neho robí najrozšírenejší a najrozsiahlejší druh. Jeho druhy tvoria kolónie s veľkým množstvom žltozelených až modrozelených konidií, ktoré sa na potravinách javia ako zelené až zamatové povlaky. Zástupcovia tohto rodu spôsobujú kazenie ovocia a zeleniny, niektorí z nich produkujú mykotoxíny, iné u človeka vyvolávajú alergické

reakcie. Rôzne druhy rodu *Penicillium* tvoria ochratoxín A, patrí medzi ne napr. *P. viridicatum* [32].

Ochratoxín A a jeho toxicita: Tvorený niektorými druhmi rodov *Aspergillus* a *Penicillium*, ktoré rastú na podzemnici olejnej, strukovínach a obilovinách ako sú pšenica, kukurica, jačmeň, ovos, ryža, proso a iné. Ochratoxín A sa môže dostať do hydínového a bravčového mäsa cez splsnivené krmivá. Patrí medzi významné nefrotické mykotoxíny s karcinogénnym účinkom. Často sa spája s nádormi na obličkách. Práve jeho nefrotický účinok môže vo väčších dávkach vyvolať u zvierat nekrózu alebo teratogénny účinok [32, 34].



Obr. 3: Mikrofotografie plesní (zlava: *Aspergillus niger*, *Penicillium*) [31]

2.4. Superpotraviny

Medzi superpotraviny sa radia potraviny bohaté na vysoký obsah živín, ktoré môžu výrazne zlepšiť zdravie a vitalitu. Zvýšenie konzumácie takýchto potravín môže mať význam v boji proti rôznym chorobám, kvôli čomu by mali byť potraviny zahrnuté do vyváženej stravy [35].

2.4.1. Najčastejšie sa vyskytujúce typy superpotravín v raw výrobkoch

Marhule

Je to ovocie bohaté na významné látky ako je vitamín C či vitamíny skupiny B, ďalej sú zdrojom antioxidantu beta-karoténu, ktorý zbavuje organizmus voľných radikálov a chráni pokožku počas jej vystavenia na slnku. Marhule sú bohaté na vlákninu, napomáhajú v boji proti únave a preventívne pôsobia proti vzniku Alzheimerovej choroby.

Tab. 1: Nutričné hodnoty marhúľ (v 100 g)

Bielkoviny	0,9 g	Beta-karotén	1,5 mg
Tuky	0,2 g	Vápnik	20,0 mg
Sacharidy	12,4 g	Železo	0,7 mg
Vláknina	2,3 g	Draslík	274,0 mg
Vitamín C	10,5 mg	Horčík	9,0 mg
Vitamín E	1,8 mg	Fosfor	23,0 mg
Vitamín B₁	0,4 mg		

Čučoriedky

Čučoriedky sú bobuľové ovocie, ktoré sa vyznačuje svojim pozitívnym vplyvom na psychiku, znižujú hladinu cholesterolu v krvi, podporujú trávenie a rovnako ako brusnice pomáhajú pri liečbe zápalu močových ciest. Liečebné účinky majú aj mladé lístky čučoriedok, ktoré majú priaznivý vplyv pri žalúdočných ťažkostiach.

Tab. 2: Nutričné hodnoty čučoriedok (v 100 g)

Bielkoviny	0,7 g	Vitamín B₃	0,4 mg
Tuky	0,6 g	Vápnik	13,0 mg
Sacharidy	12,3 g	Železo	0,7 mg
Vláknina	3,4 g	Draslík	66,0 mg
Vitamín C	15,7 mg	Horčík	3,0 mg
Vitamín E	0,6 mg	Fosfor	14,0 mg
Beta-karotén	34,0 µg		

 [36].

Mandle

Mandle sú bohatý zdroj bielkovín, tukov, vitamínov a minerálov kvôli čomu sú ideálnou potravinou v dobe rýchleho rastu v detstve a v dospievaní. Obsah nenasýtených mastných kyselín môže pomôcť k zníženiu vysokej hladiny cholesterolu v krvi. Mandle sú tiež charakterizované obsahom vitamínu E, ktorý pôsobí ako antioxidant, ďalej obsahom vitamínu B, vysokým obsahom vápniku, draslíku a horčíku. Vysoký obsah železa podporuje krvotvorbu, preto je konzumácia mandlí vhodná pre ľudí trpiacich chudokrvnosťou.

Tab. 3: Nutričné hodnoty mandlí (v 100 g)

Bielkoviny	20,2 g	Železo	3,4 mg
Tuky	52,7 g	Draslík	785,0 mg
Sacharidy	19,5 g	Horčík	258,0 mg
Vláknina	12,2 g	Fosfor	467,0 mg
Vitamín C	5,0 mg	Selén	4,2 µg
Vitamín E	25,0 mg	Zinok	1,48 mg
Vápnik	246,0 mg		

Čerešne

Sú významným zdrojom vitamínu C, kyseliny listovej (vitamínu B₄), beta-karoténu (provitamínu A), vápniku, železa, horčíku, fosforu a draslíku. Čím sú plody tmavšie, tým je obsah minerálov vyšší. Chránia telo pred pôsobením voľných radikálov a majú protizápalové účinky. Čerešne obsahujú prekvapivo vysoké množstvo organicky viazaného jódu. Podľa posledných prieskumov obsahujú čerešne antokyány, látky na báze farbív, ktoré prispievajú k liečbe diabetu, pomáhajú chrániť cievy a srdce pred poškodením a pôsobia proti rakovine.

Tab. 4: Nutričné hodnoty čerešni (v 100 g)

Bielkoviny	0,9 g		Vápnik	15,0 mg
Tuky	0,4 g		Železo	0,5 mg
Sacharidy	15,4 g		Draslík	215,0 mg
Vláknina	2,0 g		Horčík	11,0 mg
Vitamín C	10,1 mg		Fosfor	23,0 mg
Beta-karotén	69,0 µg			

[36].

Kokos

Najviac zastúpenou živinou kokosu sú tuky, liečebné využitie je dané obsahom minerálov, hlavne horčíku, ktorého nedostatok spôsobuje kŕče a zhoršuje psychický stav.

Tab. 5: Nutričné hodnoty kokosu (v 100 g)

Bielkoviny	6,4 g		Železo	3,6 mg
Tuky	65,7 g		Draslík	356,0 mg
Sacharidy	23,8 g		Horčík	32,0 mg
Vláknina	12,0 g		Fosfor	187,0 mg
Vitamín C	3,3 mg		Sodík	28,0 mg
Vápnik	11,0 mg		Selén	10,0 µg

Ďatle

Vďaka vysokému obsahu cukrov sa ďatle zaraďujú medzi najbohatšie plody na energiu, čo je dôvodom ich účinku proti únave alebo slabosti. Jedným z najvýznamnejších minerálov, ktorý sa vyskytuje v ďatliach je draslík, ktorý okrem iného pomáha lepšie zvládať stres. Ďatle majú ukludňujúci účinok pri dráždivom kašli či zápale priedušiek, najčastejšie v kombinácii s mliekom. Obsahujú značné množstvo tryptofánu, ktorý podporuje tvorbu spánkového hormónu melatonínu.

Tab. 6: Nutričné hodnoty ďatli (v 100 g)

Bielkoviny	2,0 g		Vápnik	51,0 mg
Tuky	0,5 g		Železo	1,0 mg
Sacharidy	81,0 g		Draslík	643,0 mg
Vláknina	6,4 g		Horčík	54,0 mg
Vitamín C	3,0 mg		Fosfor	56,0 mg

[36].

2.5. Metódy využívané pre charakterizáciu molekulárnych a mikrobiálnych vlastností potravín

2.5.1. Rozdelenie a príprava živných pôd

V mikrobiologickej praxi sa využíva široký sortiment živných pôd a kultivačných médií, ktoré rozdeľujeme podľa konzistencie na tekuté (bujón, senný nálev) a pevné (agar, želatína) a podľa použitia na kolektívne a selektívne. Selektívne živné pôdy vytvárajú svojim zložením

selektívne podmienky len pre rast určitej skupiny mikroorganizmov alebo len pre určitý rod mikróbov. Kultivačné médiá sa ďalej rozdeľujú podľa pôvodu na prirodzené živné pôdy rastlinného pôvodu (zelenina, senný nálev) a živočíšneho pôvodu (bujón). Opakom sú chemicky definované živné pôdy, ktoré sú synteticky pripravované [37].

2.5.2. Polymerázová reťazová reakcia

Polymerázová reťazová reakcia (PCR) je jednou z často používaných molekulárne diagnostických metód. Princípom tejto metódy je cyklicky sa opakujúca syntéza špecifického úseku DNA. K vybraným úsekom komplementárnych vlákien denaturovanej DNA sa hybridizujú krátke syntetické oligonukleotidy – primery, od ktorých prebieha syntéza nového reťazca DNA. Tá je katalyzovaná DNA dependentnou DNA-polymerázou. PCR je proces, pri ktorom dochádza k pravidelnému striedaniu troch teplotných krokov, v priebehu ktorých prebiehajú tri odlišné deje:

- 94 °C – denaturácia dvojreťazcových molekúl DNA,
- 50 – 65 °C – pripojenie primerov k oddeleným reťazcom DNA,
- 65 – 75 °C – syntéza nových reťazcov DNA katalyzovaná DNA-polymerázou.

Postupným opakovaním tohto procesu je exponenciálne nasyntetizovaných až 10^9 kópií špecifického úseku DNA. Optimálny počet cyklov sa spravidla pohybuje v rozmedzí od 25 – 35 cyklov a je závislý na viacerých faktoroch, medzi ktoré patrí napríklad koncentrácia templátovej DNA alebo kvalita izolovanej DNA. Pri príliš vysokom počte cyklov môže dochádzať k zníženiu účinnosti DNA-polymerázy. Reakcie prebiehajú v termocykli, v ktorom je po naprogramovaní časových intervalov automaticky menená teplota.

Výsledným produktom PCR sú úseky DNA s definovanou dĺžkou. Veľkosť PCR produktov (amplikónov) sa pohybuje v rádoch desiatok až tisíc párov báz (bp z anglického „base pair“). Koncentrácia DNA sa zisťuje spektrofotometricky. Produkty PCR sú detekované metódou agarózovej gélovej elektroforézy za použitia interkalačných farbív [38, 39].

2.5.2.1. PCR v reálnom čase

PCR v reálnom čase vychádza z konvenčnej PCR, je však nutná prítomnosť fluorescenčného farbiva v PCR zmesi. Fluorescenčné farbivo po začlenení do dvojšróbovice DNA emituje žiarenie, fluorescenčný signál je meraný priamo v priebehu reakcie na konci každého jednotlivého cyklu. Intenzita fluorescencie je priamo úmerná koncentrácii produktu prítomného v reakčnej zmesi. Nameraná intenzita fluorescencie sa vynáša do grafu proti príslušnému počtu cyklov. Amplifikačná krivka sa skladá z fázy pozadia, exponenciálnej fázy a plató fázy. Hodnoty C_T (threshold cycle) odpovedá cyklu, pri ktorom došlo k prekročeniu prahu merateľnej fluorescencie [40].

2.5.2.2. Analýza krivky topenia (Melt analýza)

Melt analýza je metóda založená na snímaní poklesu fluorescenčného signálu pri tepelnej denaturácii produktov PCR. Po ukončení reakcie je produkt PCR ochladený, potom je postupne zahrievaný na teplotu vyššiu, než je predpokladaná teplota topenia (T_m) amplikónu. Pôsobením zvýšenej teploty dochádza k denaturácii vlákien DNA, pričom sa z molekúl uvoľňuje fluorescenčné farbivo a k poklesu fluorescenčného signálu. Krivka topenia vzniká vynesением intenzity fluorescencie proti príslušnej teplote. Analýzou derivácie krivky topenia

sa z inflexného bodu stanoví teplota topenia špecifická pre prítomné amplikóny. Metóda je nedeštruktívna, to umožňuje ďalšiu analýzu PCR produktov aj po melt analýze napr. agarózovou gélovou elektroforézou [41].

2.5.2.3. Gélová elektroforéza pre detekciu produktov PCR

Princíp elektroforézy spočíva v migrácii elektricky nabitých častíc v jednosmernom elektrickom poli. Jednosmerné elektrické pole sa vytvára vkladáním konštantného jednosmerného napätia medzi elektródy. Po nanosení vzorky do určitého miesta začnú častice migrovať k opačne nabitému pólu. Katióny migrujú k zápornému, anióny ku kladnému pólu a neutrálne molekuly sa nepohybujú. V jednosmernom elektrickom poli putujú nukleové kyseliny k anóde, pretože obsahujú vo svojej molekule fosfátové skupiny, ktoré nesú záporný náboj. Pri delení na nosiči sa môžu rozdeľovať aj látky s rovnakým efektívnym nábojom, ale s rôznou veľkosťou molekuly vďaka sieťovému efektu, ktorý sa tu uplatňuje. V gélovej elektroforéze na agarózovom géle dochádza k deleniu častíc na základe ich veľkosti, kde sa menšie častice po vložení jednosmerného napätia pohybujú gélom rýchlejšie.

Separáciu je potrebné ukončiť skôr než prvé zóny dorazia ku koncu alebo než dôjde k ich prílišnému rozšíreniu. Po ukončení elektroforézy sa gél vyťahne z elektroforetickej vane a farbí sa interkalačným činidlom (nepr. ethidium bromidom), ktoré sa viaže medzi vlákna DNA a po ožiarení UV svetlom s vlnovou dĺžkou $\lambda = 260 - 360$ nm fluoreskuje. Komplex DNA a interkalačného činidla je vizualizovaný v UV svetle na transiluminátore. Pre vyhodnotenie veľkosti produktov sa využívajú komerčne dostupné zmesi DNA štandardov s definovateľnou veľkosťou úsekov DNA. Odhadovaná veľkosť produktov PCR je vyhodnotená na základe porovnania polohy získaných produktov PCR s DNA štandardom [38, 39, 42].

3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1. Chemikálie, prístroje a materiál

3.1.1. Chemikálie použité pre stanovenie vybraných látok

- Dusitan sodný, p.a., Lach-Ner (ČR)
- Hexakvanoželeznatan draselný trihydrát, Lachner (ČR)
- Hydroxid sodný, p.a., Lach-Ner (ČR)
- Chlorid hlinitý anhydrid, p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
- Peroxodisíran draselný, p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
- Síran zinočnatý heptahydrát, p.a., Lach-Ner (ČR)
- Uhličitan sodný bezvodý, p.a., Lach-Ner (ČR)
- Metanol, p.a., Lach-Ner (ČR)
- Metanol pre HPLC (96 %), VWR Chemicals BDH PROLABO (USA)
- Chloroform, Lach-Ner (ČR)
- Fenol, p.a., Lach-Ner (ČR)
- Etanol pre UV VIS, Lach-Ner (ČR)
- Kyselina chlorovodíková (35 %), Lach-Ner (ČR)
- Kyselina sírová (96 %), Lach-Ner (ČR)
- ABTS, Sigma-Aldrich (SRN)
- Folin-Ciocalteu činidlo, Penta (ČR)
- Glukóza anhydrid, p.a., Lach-Ner (ČR)
- Katechín, Sigma-Aldrich (SRN)
- Kyanidinchlorid, Sigma-Aldrich (SRN)
- Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (SRN)
- Trolox, Sigma-Aldrich (SRN)

3.1.2. Chemikálie použité pre metódu PCR

- Agaróza pre elektroforézu, Serva, Heidelberg (SRN)
- Nanášací tlmivý roztok Yeallow load, Top-Bio (Praha, ČR)
- DNA štandard, Malamité (Moravské Prusy, ČR)
- Dodecylsulfát sodný (SDS), Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
- Etanol p.a., Penta (Chrudim, ČR)
- Ethidium bromid (5 mg/ml), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), Serva, (Heidelberg, SRN)
- Fluorescenčné farbivo GoldView, Ecoli (Bratislava, ČR)
- Chlorid sodný, Lachema (Brno, ČR)
- Lyzozým, Serva (Heidelberg, SRN)
- Polyetylen glykol (PEG 6000), FLUKA BioChemika, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- Proteináza K, Serva (Heidelberg, SRN)

3.1.3. Kultivačné médiá a zložky použité pre očkovanie vzoriek

- Trypton sójový agar, Himedia
- MRS agar, Carl Roth
- Agar Type I, Himedia
- D-glukóza monohydrát, Penta

- Kazeínový peptón, Sigma-Aldrich
- Práškový kvasničný extrakt, Himedia
- Destilovaná voda, FCH VUT v Brne

3.1.4. Ďalšie zložky použité pre metódu PCR

Roztoky na PCR

- Zmes B (1M Tris-HCl, pH 7,8; 0,5M EDTA, pH 8,0; lyzozým 3 mg/ml)
- TE tlmivý roztok (1M Tris-HCl, pH 7,8; 0,5M EDTA, pH 8,0; destilovaná voda)

Komponenty pre PCR

- PPP Master mix (zmes DNA-polymerázy, zmes dNTP, PCR tlmivý roztok s Mg^{2+} iónmi), Top-Bio (Praha, ČR)
- PCR voda, Top-Bio (Praha, ČR)
- qPCR 2x SYTO-9 Master Mix (2krát koncentrovaný 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25 °C), 40 mM $(NH_4)_2SO_4$, 5 mM $MgCl_2$, 400 μ M dATP, 400 μ M dCTP, 400 μ M dGTP, 400 μ M dTTP, Taq DNA polymeráza (50 U/ml), monoklonálna protilátka anti-Taq, SYTO-9, stabilizátory a aditíva), Top-Bio (Praha, ČR)
- Primer špecifický pre doménu *Bacteria* (F_eub, R_eub)
- Primer špecifický pre kvasinky *Candida glabrata* (Oli-F, Oli-R)

Magnetické nosiče

- F-kol B 77 ox (2 mg/ml) pripravené Ing. Danielom Horákom CSc. na Ústave makromolekulárnej chémie Akadémie vied ČR v Prahe.

3.1.5. Prístroje

- Spektrofotometer VIS, Helios δ , Unicam (GB)
- Trepáčka IKA Yellow Line (SRN)
- Centrifúga Sigma Laborzentrifugen (SRN)
- Analytické váhy Boeco (SRN)
- Vákuová odparka RV 06, IKA (SRN)
- Vortex, TK35, Kartell spa (USA)
- Ultrazvuková lázeň PS 02000 (ČR)
- Termostat IP60, Biotech (ČR)

3.1.6. Materiál

- LIFE BAR PLUS raw čučoriedková tyčinka s quinoou (47 g): organic bio vegan superfood



Obr. 4: Čučoriedková raw tyčinka

Zloženie: ovocie* (67 %) (d'atle*, mrazom sušený čučoriedkový prášok* (6 %), moruša biela*, mrazom sušený malinový prášok*), aktivovaná pohánka* (12 %), aktivované slnečnicové semienko* (10 %), aktivovaná quinoa* (6%), chia semienka* (5 %) (*Salvia hispanica*);

* = produkt ekologického poľnohospodárstva. Môže obsahovať stopy škrupinových plodov a sezamu. Môže obsahovať kúsky kôstok. Uchovajte v suchu a tme, chráňte pred teplom. Po otvorení spotrebujte do 5 dní.

Výrobca a predávajúci: Lifefood Czech Republic s.r.o.,

Tab. 7: Výživové údaje čučoriedkovej raw tyčinky

	Na 100 g	Na 1 tyčinku (47 g)
Energetická hodnota	1433 kJ/344 kcal	688 kJ/165 kcal
Tuky	8 g	4 g
- z toho nasýtené mastné kyseliny	1 g	0 g
Sacharidy	56 g	27 g
- z toho cukry	39 g	19 g
Vláknina	11 g	5 g
Bielkoviny	7 g	3 g
Sol'	0,02 g	<0,01 g

- LIFE BAR raw kokosová tyčinka (47 g): organic bio vegan energy



Obr. 5: Kokosová raw tyčinka

Zloženie: d'atle* (58 %), orechy* 25 % (raw kešu orechy*, mandle*, mandľová pasta*), kokos* (17 %), vanilka mletá*;

* = produkt ekologického poľnohospodárstva. Môže obsahovať stopy škrupinových plodov a sezamu. Môže obsahovať kúsky kôstok. Uchovajte v suchu a tme, chráňte pred teplom. Po otvorení spotrebujte do 5 dní.

Výrobca a predávajúci: Lifefood Czech Republic s.r.o.,

Tab. 8: Výživové údaje kokosovej raw tyčinky

	Na 100 g	Na 1 tyčinku (47 g)
Energetická hodnota	1749 kJ/419 kcal	839 kJ/201 kcal
Tuky	23 g	11 g
- z toho nasýtené mastné kyseliny	11 g	5 g
Sacharidy	45 g	22 g
- z toho cukry	39 g	19 g
Vláknina	9 g	4 g
Bielkoviny	7 g	4 g
Sol'	0,03 g	<0,01 g

- o NATURALLY SPORTYFEEL raw korenená d'atlovo-citrónová tyčinka (40 g): raw



Obr. 6: Citrónová raw tyčinka

Zloženie: d'atle (59 %), jadra mandlí, sušená citrónová šťava (3 %), agávodý nektár, citrónový olej (0,6 %), chilli, zázvor, rozmarínový extrakt. Môže obsahovať stopy arašidov, iných škrupinových plodov a sezamu. Skladujte v suchu, chráňte pred teplom a priamym slnečným žiarením.

Výrobca a predávajúci: Lidl Česká republika v.o.s.

Tab. 9: Výživové údaje citrónovej raw tyčinky

	Na 100 g	Na 1 tyčinku (40 g)	% RI
Energetická hodnota	1689 kJ/403kcal	676 kJ/161 kcal	8 %
Tuky	17,4 g	7,0 g	10 %
- z toho nasýtené mastné kyseliny	1,4 g	0,6 g	3 %
Sacharidy	46,9 g	18,8 g	7 %
- z toho cukry	40,9 g	16,4 g	18 %
Vláknina	8,9 g	3,6 g	-
Bielkoviny	10,4 g	4,2 g	8 %
Sol'	0,0 g	0,0 g	0 %

RI (reference intake) = Referenčná hodnota príjmu u priemernej osoby (8400 kJ/2000 kcal)

- Raw zákusok



Obr. 7: Marhuľový raw zákusok

Zloženie:

Vrstva 1: para orechy, lieskovce, d'atle

Vrstva 2: kešu orechy, sušené a mrazené marhule, kokosový olej, lecitín, agáve

Vrstva 3: kakao, agáve, kokosový olej

Zakúpené v SECRET OF RAW v Brne

3.2. Príprava vzoriek

Do skúmavky bol navážený 1 g vzorky a 5 ml destilovanej vody. Účinné látky boli extrahované na trepačke po dobu 1 hodiny. Následne bol extrakt vhodne nariadený a pripravený k stanoveniu celkových polyfenolov, flavonoidov a antokyánov.

Účinné látky lipidickej povahy boli extrahované podobným spôsobom, avšak miesto destilovanej vody bol použitý metanol okyslený kyselinou chlorovodíkovou.

3.3. Stanovenie antioxidačnej aktivity

Pre stanovenie antioxidačnej aktivity sa využíva metóda TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), ktorá je založená na hodnotení schopnosti vzorky eliminovať kationradikál $ABTS^{+}$. Výsledná antiradikálová aktivita vzorky sa porovnáva s antiradikálovou aktivitou syntetickej štandardnej látky – Troloxu. Trolox je derivát vitamínu E. Na základe zmien absorpčného spektra $ABTS^{+}$ sa sleduje ako antioxidanty, ktoré sa správajú ako donory vodíku eliminujú radikál $ABTS^{+}$ [43].

Bol pripravený radikálový kation $ABTS^{+}$ v 10 ml odmernej banke s koncentráciou $c = 7 \text{ mM}$ (0,0036 g ABTS), bol pridaný 2,45 mM peroxidisíran draselný (0,0066 g v 10 ml H_2O) a banka bola doplnená destilovanou vodou po rysku. Banka bola zabalená do alobalu a ponechaná v tme na 12 hodín pri laboratórnej teplote. Pred analýzou bol $ABTS^{+}$ zriedený etanolom pre UV-VIS na absorbanciu $A = 0,700$ pri $\lambda = 734 \text{ nm}$ proti etanolu. Do zúženej kyvety bol napipetovaný 1 ml pripraveného roztoku $ABTS^{+}$ a bolo pridaných 10 μl extraktu vzorky. Po premiešaní bola zmeraná absorbancia $\rightarrow A_0$ a po uplynutí 10 minút bol zmeraný pokles absorbancie $\rightarrow A_1$. Obe absorbancie boli merané pri vlnovej dĺžke $\lambda = 734 \text{ nm}$ proti etanolu.

Výsledná absorbanca bola vypočítaná pomocou vzťahu:

$$A = A_0 - A \quad (1)$$

Každá vzorka bola zmeraná 2 krát. Pre kalibračnú radu bol pripravený zásobný roztok Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-carboxylic acid) v koncentračnom rozmedzí 0 – 400 µg/ml (40 mg Troloxu v 100 ml banke so 60 % etanolom), ktorý bol použitý ako štandard. Miesto destilovanej vody bol použitý 60 % roztok etanolu pre UV-VIS. Postup stanovenia je zhodný s postupom stanovenia jednotlivých vzoriek. Kalibračná rada bola prevzatá zo súbežne spracovávanej bakalárskej práce Aronie – zdroj biologicky aktívnych látok.

3.4. Stanovenie celkových polyfenolov

Na stanovenie celkových polyfenolov sa používa spektrofotometrická metóda s použitím Folin-Ciocalteuovo činidla. Metóda je založená na redukcii činidla za vzniku modrého zafarbenia, kedy je možné reakciu pozorovať spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke $\lambda = 750$ nm. Pri tejto vlnovej dĺžke závisí intenzita zafarbenia na koncentrácii polyfenolov prítomných vo vzorke. Výsledná hodnota sa uvádza v ekvivalentoch kyseliny gallovej [23].

Do skúmavky bol napipetovaný 1 ml Folin-Ciocalteuovho činidla (riedenie vodou 1:9) a 1 ml destilovanej vody. Ďalej bolo pridaných 50 µl extraktu vzorky a zmes bola premiešaná. Po 5 minútach bol pridaný 1 ml nasýteného roztoku Na_2CO_3 (7,5 g Na_2CO_3 v 95 ml H_2O). Zmes bola opäť premiešaná a ponechaná 15 minút stáť. Pri vlnovej dĺžke $\lambda = 750$ nm bola spektrofotometricky zaznamenaná absorbanca, čím bol zmeraný obsah polyfenolov vo vzorke. Každé meranie bolo prevedené trikrát. Slepá vzorka bola pripravená rovnakým postupom, pričom bola na miesto vzorky použitá destilovaná voda. Pre kalibračnú radu bola použitá kyselina gallová ako štandard v koncentračnom rozmedzí 0 – 0,5 mg/ml.

3.5. Stanovenie celkových flavonoidov

Táto spektrofotometrická metóda je založená na detekcii farebných komplexov chloridu hlinitého s karbonylovou a hydroxylovou skupinou flavonoidov. Absorbanca je zmeraná pri vlnovej dĺžke $\lambda = 510$ nm a oranžovočervené zafarbenie roztoku zodpovedá množstvu prítomných flavonoidov. Ako štandard pre kalibračnú radu sa používa katechín [44, 45].

Do skúmavky bolo napipetovaných 0,5 ml extraktu vzorky, 1,5 ml destilovanej vody a 0,2 ml 5 % NaNO_2 (5 g NaNO_2 v 100 ml H_2O), roztok v skúmavke bol premiešaný. Po 5 minútach bolo pridaných 0,2 ml 10 % AlCl_3 (10 g AlCl_3 v 100 ml H_2O), roztok v skúmavke bol opäť premiešaný a ponechaný 5 minút stáť. Ďalej bolo pridaných 1,5 ml 1 M NaOH (4 g NaOH v 100 ml H_2O), roztok bol premiešaný a po 15 min. bola zmeraná absorbanca pri vlnovej dĺžke $\lambda = 510$ nm proti slepej vzorke. Slepá vzorka bola pripravená rovnakým postupom, kde bolo miesto vzorky napipetovaných 0,5 ml destilovanej vody. Každá vzorka bola pripravená trikrát. Kalibračná rada bola pripravená rovnakým postupom, kde bol ako štandard použitý katechín s koncentráciou v rozmedzí 0,05 – 0,30 mg/ml).

3.6. Stanovenie antokyánov

Množstvo celkových antokyánov sa meria spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke $\lambda = 528$ nm, kde sa využíva prirodzené zafarbenie týchto látok po dosiahnutí kyslého pH. Ako štandard sa používa kyanidinchlorid [43].

Pre stanovenie antokyánov boli vzorky extrahované v metanole. Roztok bol desaťkrát zriedený (1 ml extrahovaného roztoku + 9 ml metanolu). Zriedený roztok bol okyslený 35 % HCl do získania pH = 3. Spektrofotometrickou metódou bola zmeraná absorbanca vzoriek pri vlnovej dĺžke $\lambda = 528$ nm proti slepej vzorke (okyslená destilovaná voda). Kalibračná rada bola pripravená zmeraním absorbanca roztoku kyanidinchloridu v koncentračnom rozmedzí 1 – 20 $\mu\text{g/ml}$, ktorá bola prevzatá zo súbežne spracovávanej bakalárskej práce Aronie – zdroj biologicky aktívnych látok.

3.7. Stanovenie celkových sacharidov podľa Duboise

Sacharidy sa často stanovujú pomocou spektrálnych metód vo viditeľnej oblasti svetla. Stanovenie celkových sacharidov podľa Duboise je fyzikálno-chemická metóda založená na rozklade cukrov kyselinou sírovou a následnou kondenzáciou furfuralu s fenolom. To sa prejaví zafarbením reakčného roztoku, ktorý absorbuje v oblasti UV-VIS. Absorbanciu roztokov je možné zmerať pri vlnovej dĺžke $\lambda = 490$ nm [43, 46].

Do skúmavky bol navážený 1 g vzorky a napipetovaných 5 ml metanolu. Ďalej bolo pridaných 14,2 μl 35 % HCl a skúmavka bola ponechaná na trepačke 1 hodinu. Po vyextrahovaní bol roztok v skúmavke vložený do centrifúgy a následne zriedený tisíckrát (10 μl extraktu + 9,99 ml metanolu). Do zriedeného roztoku bolo pridaných 0,5 ml Carrezového roztoku I a 0,5 ml Carrezového roztoku II. Celý roztok vzorky bol pre lepšie vyčistenie opäť vložený do centrifúgy.

Do skúmavky bol odobratý 1 ml pripraveného roztoku a 1 ml 5 % roztoku fenolu (5 g v 100 ml H_2O). Ďalej bolo opatrne pridávaných 5 ml koncentrovanej H_2SO_4 . Zmes bola premiešaná a po 30 minútach bola zmeraná absorbanca pri vlnovej dĺžke $\lambda = 490$ nm proti slepej vzorke, v ktorej bola vzorka nahradená 1 ml destilovanej vody. Každá vzorka bola stanovená trikrát. Pre prípravu kalibračnej rady bol vykonaný rovnaký postup, kde bol miesto vzorky použitý roztok glukózy s koncentráciou $c = 100$ $\mu\text{l/ml}$. Z tohto roztoku bolo pipetovaných 0; 0,25; 0,5; 0,75 a 1 ml.

3.8. Extrakcia lipidov podľa Folcha

Metóda bola navrhnutá v roku 1957 Folchom a využíva sa na extrakciu lipidov z rôznych druhov materiálov. Pôvodná metóda zahŕňala dvojitú extrakciu zmesou chloroformu a metanolu v pomere 2 : 1 s veľkým množstvom soľného roztoku pre vymytie nelipidických zložiek. Prídavok soli bol navrhnutý z dôvodu vzniku emulzie, čo značne znevýhodňovalo postup tejto metódy. V dnešnej dobe existuje mnoho modifikácií extrakcie podľa Folcha, ktoré sa líšia množstvom a pomerom použitých rozpúšťadiel [47, 48].

Do 10 ml Folchovho roztoku (chloroform : metanol = 2:1) bol pridaný 1 g vzorky a 1,5 lyžičky sklenených guľôčok. Roztok v skúmavke bol ponechaný na vortexe za intenzívneho miešania. Po 30 minútach bola odobratá kvapalná fáza do čistej skúmavky. Zmes bola premytá 2 ml Folchovho roztoku a opäť bola odobratá kvapalná fáza. Do odobratého roztoku v čistej skúmavke boli pridané 2 ml destilovanej vody a roztok bol na 2 minúty vložený do centrifúgy, kde sa rozdelila vodná fáza od chloroformovej. Zo skúmavky bola spodná chloroformová fáza vzorky obsahujúca extrakt odobratá do suchej, vopred zvaženej odparovacej banky. Banka bola ponechaná na vákuovej odparke až do úplného odparenia roztoku tak, že v banke zostala len neodparená lipidová fáza. Po vychladnutí bola banka s lipidovou fázou zvážená.

3.9. Stanovenie celkovej sušiny sušením

Pod pojmom sušina sa rozumie súhrn všetkých organických a anorganických zložiek v potravine, okrem vody. Rozpustnú sušinu tvoria organické a anorganické látky rozpustné vo vode. Príkladom môžu byť napríklad niektoré vitamíny a minerálne látky. Nerozpustná sušina zahŕňa vo vode nerozpustné organické a anorganické látky, ako sú bielkoviny či tuky. Súčtom rozpustnej a nerozpustnej sušiny je celková sušina, ktorá sa najčastejšie stanovuje sušením do konštantnej hmotnosti. Sušenie prebieha najčastejšie pri teplote 105 °C približne niekoľko hodín. To však závisí na type analyzovanej vzorky [49].

3.10. Stanovenie mikrobiálnej kontaminácie potravín

Výrobca udáva na obaloch produktu dobu spotreby po otvorení, počas ktorej je možná konzumácia produktu. V priebehu uvedenej doby spotreby by mala byť konzumácia produktu pre konzumenta bezpečná. Na obaloch vybraných raw tyčínok je uvedené, aby bol produkt spotrebovaný do 5 dní od otvorenia. Nakoľko úprava surovín do konečného produktu neprechádza teplotami vyššími než 42 – 45 °C, bola zvolená metóda, ktorá by potvrdila alebo vylúčila výskyt možných mikroorganizmov, ktorými by mohla byť vzorka kontaminovaná už v priebehu výroby produktu. Nesplňovala by tak bezpečnosť konzumácie po dobu uvedeného počtu dní po otvorení. Bola zvolená metóda očkovania vzoriek na selektívne pevné médiá, ktorá bola vykonávaná v priebehu prvých 5 dní od otvorenia vzorky. Kontrola misiek bola vykonaná vždy po 2 dňoch od naočkovania vzorky na selektívne médium. Vzorky boli po otvorení uchovávané v sterilnom prostredí po dobu 5 dní, aby sa zabránilo prípadnej kontaminácii z okolia. Celý proces prípravy kultivačných médií, riedenia a očkovania vzoriek na pevné médium bolo prevádzané v sterilnom boxe za použitia sterilných nástrojov a destilovanej vody.

3.10.1. Príprava pevného média

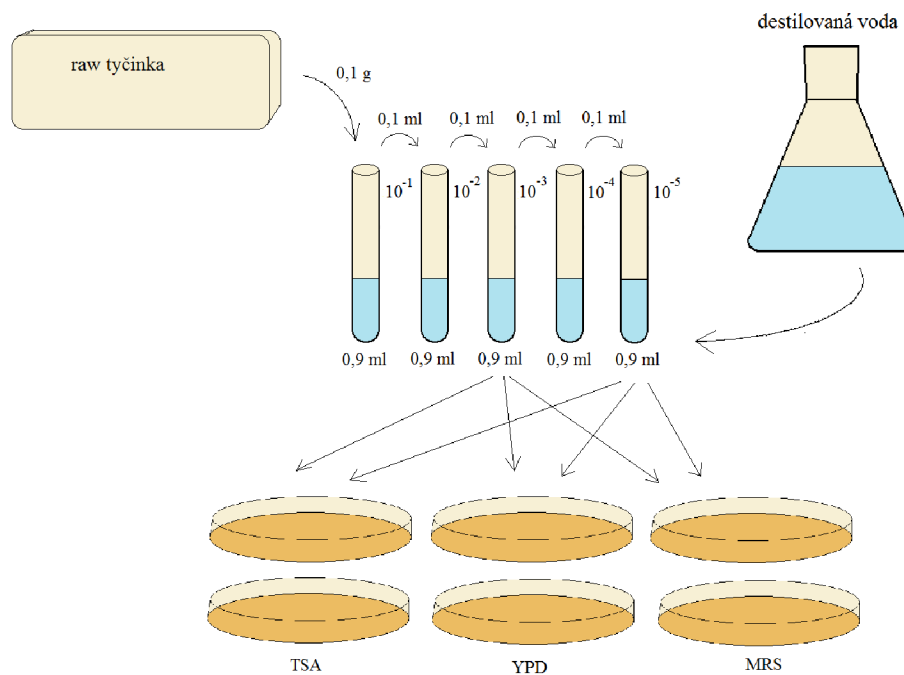
Boli pripravené tri selektívne médiá TSA, YPD a MRS z dôvodu zvýhodnenia rastu mikroorganizmov vyskytujúcich sa vo vzorkách. Bolo potrebné použiť pevné živné médium, ktoré by potlačilo rast mikroorganizmov vyskytujúcich sa v okolí prostredia, v ktorom sa pracovalo. Do Erlenmeyerových baniek boli namiešané živné médiá TSA, MRS a YPD podľa zloženia v Tab. 10. Erlenmeyerove banky boli premiešané, uzavreté zátkou prekrytou alobalom a na 3 minúty vložené do ultrazvukovej lázne. Po vytiahnutí boli na 1 hodinu sterilizované v tlakovom hrnci s vodou. Po sterilizácii boli jednotlivé agarové médiá rozliate do Petriho misiek a ponechané vychladnutiu a vysvieteniu pod UV svetlom. Pripravené misky boli uskladňované v chladničke najdlhšie na dobu 1 týždňa.

Tab. 10: Zloženie kultivačných médií

Kultivačné médium	Zložka	m [g/l H ₂ O]
TSA	Tryptofánový sójový agar	41,5
MRS	Mikrobiologický agar	62,0
YPD	Peptón	20,0
	Kvasničný extrakt	10,0
	Agar	20,0
	Anhydrid glukózy	20,0

3.10.2. Riedenie a očkovanie vzoriek

Do skúmavky bol naváženy 0,1 g zhomogenizovanej vzorky a pridaných 0,9 ml sterilnej destilovanej vody. Bolo prevedené desiatkové riedenie až po hodnotu 10^{-5} . Kultivácia na Petriho miskách bola prevedená pre vybrané riedenia 10^{-3} a 10^{-5} , vzorky boli očkované do dvoch Petriho misiek z každého kultivačného média. Na každú miskú bolo nanesené vždy 0,1 ml roztoku vzorky z príslušného riedenia. Jednorazovými hokejkami bola zmes rozotretá, Petriho miska uzavretá a opatrená parafilmom ponechaná na kultiváciu po dobu 2 dní pri teplote 30 °C. Po ukončení kultivácie boli zaznamenaný počet kolónií vyrastených na pevných médiách. Postup bol prevedený pre všetky vzorky.



Obr. 8: Zobrazenie desiatkového riedenia a očkovania na selektívne pevné médiá

3.11. Molekulárna analýza potravín metódou PCR

3.11.1. Lýza buniek a izolácia DNA

Boli analyzované 4 vzorky, z toho 3 raw tyčinky a 1 raw zákusok. V sterilnom prostredí bolo odobratých 0,5 g vzorky do mikroskúmaviek typu Eppendorf (1,5 ml), do ktorej bol pridaný 1 ml roztoku B (1 M tris-HCl pH = 7,8; 0,1 M EDTA pH = 8,0; 3 mg/ml lyzozým). Vzorky boli inkubované pri laboratórnej teplote po dobu 1 hodiny. Následne bolo pridaných 25 μ l 10 % SDS a 5 μ l proteinázy K. Vzorky boli inkubované do druhého dňa pri teplote 55 °C. Z pripravených hrubých lyzátov bola izolovaná DNA magnetickými časticami.

3.11.2. Izolácia DNA z hrubých lyzátov

Bola namiešaná separačná zmes za použitia magnetických mikročastíc F-kol 77 ox v presnom poradí podľa Tab. 11.

Tab. 11: Zloženie zmesi pre izoláciu DNA

Poradie	Zložka	V [μl]
1.	NaCl (5 M)	400
2.	DNA (lyzát)	100
3.	PEG 6000 (40 %)	400
4.	Magnetický nosič (2 mg/ml)	100
Celkový objem		1000



Obr. 9: Zľava: 0,5 g vzorky v 1 ml roztoku B; vzorky v magnetickom separátore

Po zmiešaní všetkých zložiek bola zmes 10 minút inkubovaná pri laboratórnej teplote. Následne bola zmes umiestnená na 5 minút do magnetického separátora pri laboratórnej teplote, kde boli častice separované. Zo skúmavky bol odobratý supernatant a následne bol do skúmavky pridaný 1 ml 70 % etanolu a vzorka bola premiešaná. Vzorky boli opäť vložené do magnetického separátora. Po separovaní častíc bol zo skúmavky odobratý etanol a magnetické nosiče boli následne znovu premyté 0,5 ml etanolu. Skúmavky boli vložené do exikátoru aby sa odparil zbytkový etanol.

Po odparení zbytkového etanolu bolo do skúmaviek pridaných 50 μl TE tlmivého roztoku. DNA bola eluovaná 2,5 hodiny pri laboratórnej teplote. Následne boli magnetické nosiče odseparované a do čistých mikroskúmaviek typu Eppendorf (1,5 ml) bol odpipetovaný eluát obsahujúci DNA.

3.11.3. PCR v reálnom čase a analýza krivky topenia (Melt analýza)

Bola pripravená zmes pre PCR v reálnom čase, podľa zloženia uvedeného v Tab. 12. Ako pozitívna kontrola pre doménu *Bacteria* bola použitá DNA *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7088^T a pre kvasinky DNA *Candida glabrata* CCM 8270. V prípade negatívnej kontroly bol 1 μl matrice DNA nahradený 1 μl vody pre PCR.

Tab. 12: Zloženie zmesi pre PCR v reálnom čase

Krok	Komponent	V [μl]
1	Voda pre PCR	9,5
2	qPCR 2x SYTO-9 Master Mix (Top-Bio)	12,5
3	Primer 1	1,0
4	Primer 2	1,0
5	Matrice DNA	1,0
Celkový objem		25,0

Pre PCR špecifickú pre doménu *Bacteria* boli použité primery F_eub a R_eub. Pre PCR špecifickú pre kvasinky boli použité primery Oli-F a Oli-R uvedené v Tab. 13.

Tab. 13: Zoznam špecifických primerov pre PCR

Špecifická PCR	Primer	Sekvencia 5' - 3'	Veľkosť produktu PCR [bp]	Referencia
Doména <i>Bacteria</i>	F_eub	TCC TAC GGG AGG GAG CAG CAG T	466	[22]
	R_eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT		
Kvasinky	Oli-F	CGT CAT AGA GGG TGA GAA TCC	152	[23]
	Oli-R	ACT TGT TCG CTA TCG GTC TC		

Teplotné programy pre PCR sú uvedené v Tab. 14. Teplotný program bol zvolený podľa príslušných primerov použitých pre PCR.

Tab. 14: Použité amplifikačné programy

Krok cyklu		Špecifita PCR	
		Doména <i>Bacteria</i>	Kvasinky
1	Denaturácia DNA pred 1. Cyklom	95 °C/5 min	94 °C/5 min
2	Denaturácia	95 °C/30 s	94 °C/60 s
3	Pripojenie primerov	55 °C/30 s	51 °C/30 s
4	Syntéza DNA	72 °C/60 s	72 °C/60 s
5	Dosyntetizovanie reťazca v poslednom cykle	72 °C/5 min	72 °C/5 min
	Počet cyklov	35	35

Na cykleri Rotor-Gene 6000 bola vykonaná analýza real-time PCR s použitím primerov špecifických pre doménu *Bacteria* a primerov špecifických pre kvasinky podľa programov uvedených v Tab. 14. Po ukončení amplifikácie boli produkty PCR analyzované melt analýzou (od 50 do 95 °C, 1 °C/s).

Výsledky boli vyhodnotené pomocou programu Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7. Produkty PCR boli potom detekované agarózovou gélovou elektroforézou.

3.11.4. Detekcia DNA agarózovou gélovou elektroforézou

Bol pripravený 1,6 % agarózový gél (1,92 g agarózy v 120 ml 0,5 x TBE tlmivom roztoku). Do gélu bol pridaný 1 µl interkalačného činidla Gold view. Zmes bola premiešaná a rozvarená v mikrovlnnej rúre. Po miernom vychladnutí bol gél naliaty do vaničky s hrebienkom a ponechaný na stuhnutie.

Po stuhnutí gélu bol hrebienok vytiahnutý a do vzniknutých komôrok boli nanesené produkty PCR zmiešané v pomere 5:1 s nanášacím tlmivým roztokom (6x koncentrovaný), do každej z komôrok bolo pipetovaných 30 µl vzorky. Do jednej z komôrok bolo napipetovaných 5 µl DNA štandardu (100 pb štandard), ktorý obsahuje fragmenty DNA s veľkosťou 100, 200,

300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 a 1500 bp. Vanička so vzorkami nanesenými v jamkách gélu bola vložená do elektroforetickej vane a prevrstvená 0,5 x TBE tlmivým roztokom. Elektroforéza prebiehala 2,5 hodiny pri napätí 80 V. Po jej ukončení bol gél vytiahnutý z vane a bolo vykonané vyhodnotenie na transiluminátore v UV svetle. V prípade potreby bol gél dofarbený v ethidium bromide. Výsledky boli fotograficky zdokumentované.

4. VÝSLEDKY A DISKUSIA

4.1. Antioxidačná aktivita

Spektrofotometrickou metódou bola stanovená antioxidačná aktivita v 3 raw tyčinkách, podľa postupu v kapitole 3.3. Bola vykonaná extrakcia tyčínok vo vode a v okyslenom metanole. Každé meranie bolo vykonané trikrát a výsledná absorbancia bola vypočítaná ako priemer troch nameraných absorbancií pre každú vzorku. Koncentrácia bola vypočítaná z rovnice kalibračnej závislosti $A = 0,00137x$ [$\mu\text{g/ml}$], do ktorej bola dosadená priemerná hodnota absorbancie. Výsledná antioxidačná aktivita je vyjadrená v ekvivalentoch Troloxu, ktorý bol použitý ako štandard. Antioxidačná aktivita bola vzťahovaná na 1 g vzorky raw tyčinky a pomocou Excelu bola vypočítaná smerodajná odchýlka.

Tab. 15: Antioxidačná aktivita raw tyčínok – vodná extrakcia

Druh tyčinky	Koncentrácia [mg/g]
Kokosová	$0,68 \pm 0,39$
Čučoriedková	$2,08 \pm 0,28$
Citrónová	$1,13 \pm 0,15$

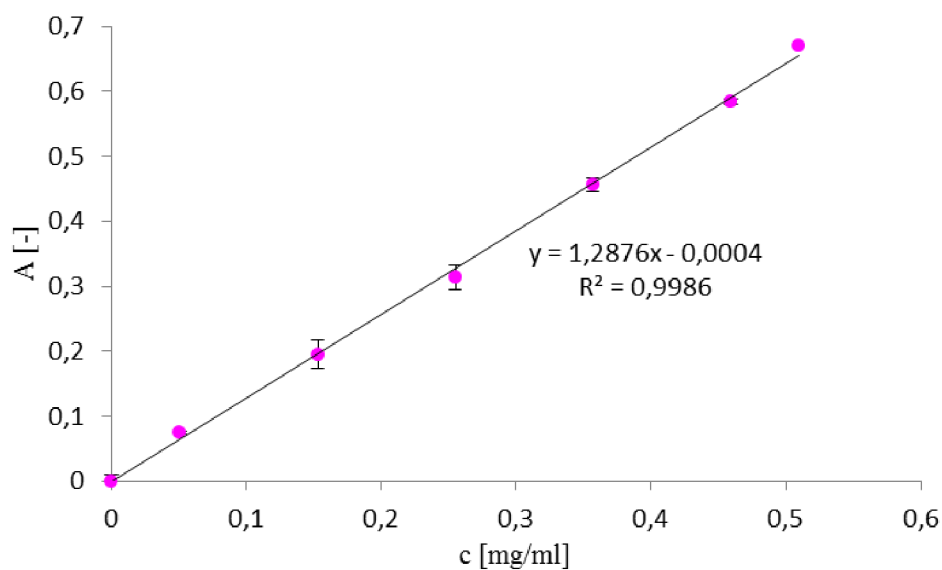
Tab. 16: Antioxidačná aktivita raw tyčínok – metanolová extrakcia

Druh tyčinky	Koncentrácia [mg/g]
Kokosová	$3,33 \pm 0,13$
Čučoriedková	$8,64 \pm 0,09$
Citrónová	$1,65 \pm 0,12$

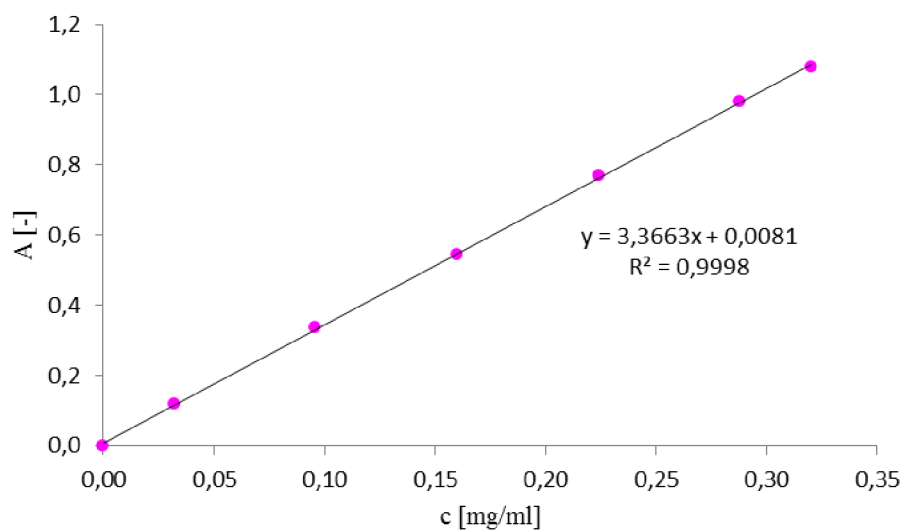
Najvyššiu antioxidačnú aktivitu vykazuje čučoriedková tyčinka. Výsledná antioxidačná aktivita konkrétnej vzorky odpovedá antioxidačnej aktivite antioxidantu Troloxu pri rovnakej koncentrácii. Z výsledkov vyplýva, že pre metódu stanovenia antioxidačnej aktivity je metanolová extrakcia vhodnejšia než vodná, pretože raw tyčinky obsahujú pravdepodobne viac účinných látok s antioxidačnou aktivitou lipidovej povahy.

4.2. Obsah celkových polyfenolov a flavonoidov

V 6 raw tyčinkách, z toho v 3 druhoch bol spektrofotometrickou metódou stanovený celkový obsah polyfenolov a flavonoidov podľa postupu popísaného v kapitole 3.4 a 3.5. Extrakcia bola vykonaná vo vode a v okyslenom metanole. Každé meranie bolo vykonané trikrát a výsledná absorbancia bola získaná ako priemer troch nameraných absorbancií pre každú vzorku. Koncentrácia celkových polyfenolov bola získaná výpočtom z rovnice lineárnej regresie kalibračnej krivky viz. Obr. 10 a koncentrácia celkových flavonoidov výpočtom z rovnice lineárnej regresie kalibračnej krivky viz. Obr. 11, do ktorej bola dosadená priemerná hodnota absorbancie. Koncentrácia bola prepočítaná na 1 g vzorky raw tyčinky a pomocou Excelu bola vypočítaná smerodajná odchýlka.



Obr. 10: Kalibračná krivka pre stanovenie celkových polyfenolov



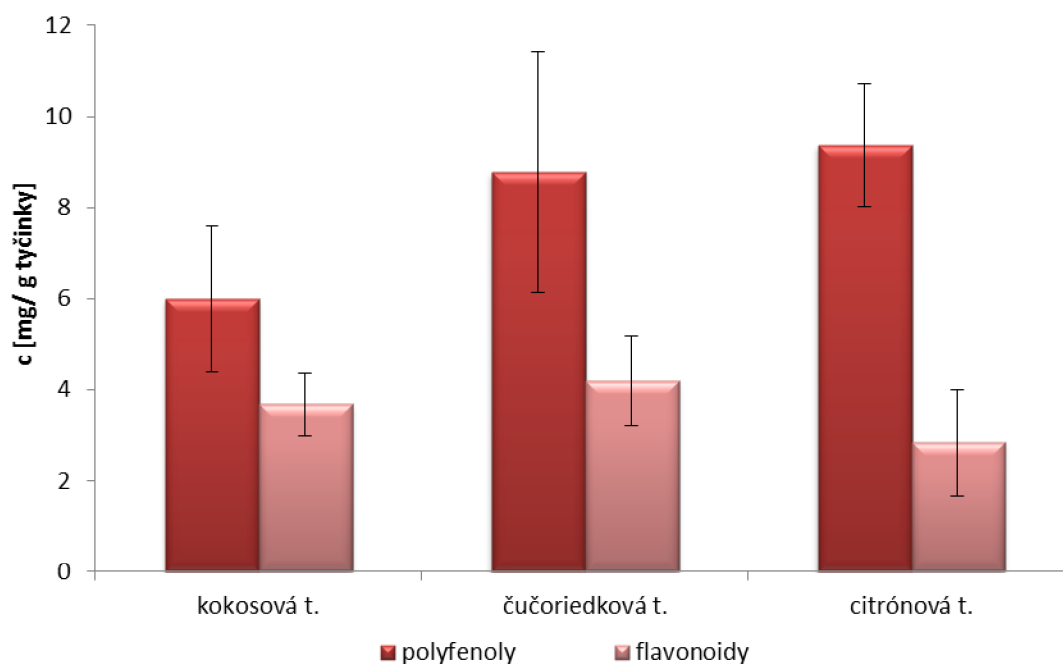
Obr. 11: Kalibračná krivka pre stanovenie celkových flavonoidov

Tab. 17: Obsah celkových polyfenolov a flavonoidov – vodná extrakcia

Druh tyčinky	Koncentrácia [mg/g]	
	Polyfenoly	Flavonoidy
Kokosová	4,29 ± 0,51	2,17 ± 0,21
Čučoriedková	6,25 ± 2,54	2,65 ± 1,10
Citrónová	5,39 ± 1,50	1,04 ± 0,61

Tab. 18: Obsah celkových polyfenolov a flavonoidov – metanolová extrakcia

Druh tyčinky	Koncentrácia [mg/g]	Koncentrácia [mg/g]
	Polyfenoly	Flavonoidy
Kokosová	1,71 ± 1,27	1,51 ± 0,82
Čučoriedková	2,53 ± 0,83	1,55 ± 0,31
Citrónová	3,98 ± 0,61	1,81 ± 1,43



Obr. 12: Porovnanie obsahu celkových polyfenolov a flavonoidov z oboch typov extrakcií

Koncentrácia celkových polyfenolov a flavonoidov bola získaná pomocou extrakcie vzoriek vo vode a v metanole. Na Obr. 12 je porovnaný obsah celkových polyfenolov a flavonoidov z oboch typov extrakcií. Z výsledkov vyplýva, že celkový obsah polyfenolov a flavonoidov je najvyšší v citrónovej a čučoriedkovej tyčinke, čo je potvrdené tým, že tieto látky sa v prírode najčastejšie vyskytujú v plodoch ovocia, najmä v bobuliach a rovnako aj z nich vyrobených produktoch. Kokosová tyčinka neobsahuje také množstvo fenolických látok pravdepodobne z dôvodu, že jej zloženie pozostáva z rôznych druhov orechov a neobsahuje žiadne bobuľové či dužinaté ovocie [50].

4.3. Obsah antokyánov

Spektrofotometricky bol stanovený obsah antokyánov v 6 vzorkách raw tyčínok podľa postupu v kapitole 3.6. Vzorky boli extrahované v metanole s prídavkom 35 % kyseliny chlorovodíkovej. Každé meranie bolo vykonané trikrát a výsledná absorbancia bola získaná ako priemer troch nameraných absorbancií pre každú vzorku. Koncentrácia celkových antokyánov bola získaná výpočtom z rovnice lineárnej regresie kalibračnej závislosti $A = 59,61 \times [\mu\text{g/ml}]$, do ktorej bola dosadená priemerná hodnota absorbancie. Koncentrácia bola prepočítaná na 1 g vzorky raw tyčinky a pomocou Excelu bola vypočítaná smerodajná odchýlka.

Tab. 19: Obsah antokyánov – metanolová extrakcia

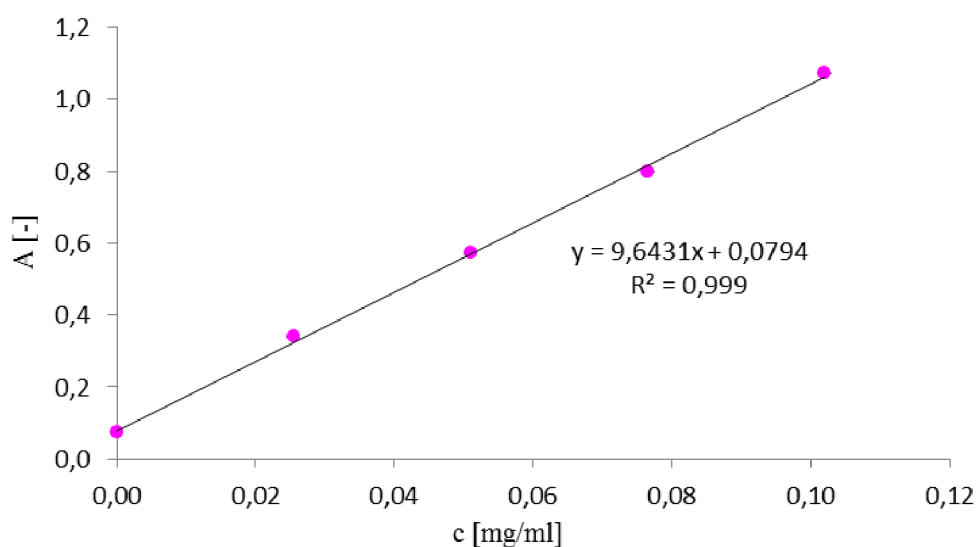
Druh tyčinky	Koncentrácia [$\mu\text{g/g}$]
Kokosová	$0,017 \pm 0,010$
Čučoriedková	$0,545 \pm 0,008$
Citrónová	$0,039 \pm 0,028$

Metóda využíva najmä prirodzené zafarbenie antokyánov. Sú to prírodné látky s veľmi intenzívnym zafarbením a ich obsah sa dá často odhadnúť len z pozorovania zloženia potravy. Už pri pohľade na čučoriedkovú raw tyčinku vyplýva, že musí obsahovať veľké množstvo biologicky aktívnych látok. Antioxidačná aktivita skupiny antokyánov je v súčasnosti predmetom záujmu mnohých odborníkov. Zo všetkých fenolických frakcií nachádzajúcich sa vo vzorkách potravín, práve antokyány majú najvyššiu antioxidačnú aktivitu, 7-25-krát vyššiu, než frakcie obsahujúce len flavonoly a fenolické kyseliny [51].

Tento fakt potvrdzujú výsledky obsahu antokyánov a zároveň antioxidačnej aktivity, ktorá je u čučoriedkovej tyčinky najvyššia v porovnaní s ostatnými testovanými druhmi.

4.4. Obsah celkových sacharidov

V 6 vzorkách bol stanovený celkový obsah sacharidov spektrofotometricky podľa postupu v kapitole 3.7. Každé meranie bolo vykonané trikrát a výsledná absorbancia bola získaná ako priemer troch nameraných absorbancií pre každú vzorku. Koncentrácia celkových sacharidov bola získaná výpočtom z rovnice lineárnej regresie kalibračnej krivky viz. Obr. 13, do ktorej bola dosadená priemerná hodnota absorbancie. Koncentrácia bola prepočítaná na 100 g vzorky raw tyčinky a pomocou Excelu bola vypočítaná smerodajná odchýlka.



Obr. 13: Kalibračná krivka pre stanovenie celkových sacharidov

Tab. 20: Obsah celkových sacharidov

Druh tyčinky	Koncentrácia [g/100 g]
Kokosová	6,88 ± 1,72
Čučoriedková	13,56 ± 5,83
Citrónová	8,30 ± 8,54

Vo vzorkách bol stanovený obsah sacharidov metódou podľa Duboise. Výsledky celkového obsahu sú takmer o tretinu nižšie ako hodnoty uvedené spotrebiteľom. Výsledné hodnoty sú nízke pravdepodobne z dôvodu rôzneho zloženia ovocia a orechov, ktoré sú nehomogénne rozložené na malom kuse tyčinky. Vzhľadom na to, že celý produkt má hmotnosť asi 40 g (záleží od typu tyčinky), dôvodom je aj rozdielna veľkosť kusov ovocia v tyčinke. Ďalej bolo zistené, že zastúpenie jednotlivých nutričných látok v ovocí či v orechoch sa líši v závislosti na konkrétnom kultivare. Často to býva ovplyvnené rozdielnou odrodou, ekologickým štandardmi poľnohospodárskej techniky a čiastočne tiež teplotou a množstvom slnečného žiarenia počas dozrievania plodov.

4.5. Izolácia lipidov

Metódou podľa Folcha bol vyizolovaný obsah lipidov v 3 vzorkách raw tyčíniek podľa postupu v kapitole 3.8. Obsah lipidov bol prepočítaný na 100 g vzorky.

Tab. 21: Obsah lipidov

Druh tyčinky	Koncentrácia [g/100 g]
Kokosová	19,64
Čučoriedková	6,51
Citrónová	18,40

Stanovený obsah lipidov vo vzorkách sa od hodnôt udávaných na obale čiastočne líši. Najväčší rozdiel medzi deklarovaným a stanoveným obsahom lipidov je v prípade kokosovej tyčinky. S najväčšou pravdepodobnosťou je dôvodom rôznych druhov orechov, ktoré sa v tyčinke vyskytujú v rôznych veľkostiach a v nerovnomernom rozptýlení. Experimentálne zistený obsah lipidov v citrónovej tyčinke vyšiel vyšší, čo je pravdepodobne z dôvodu vysokého obsahu d'atlí a mandlí v tyčinke, ktoré obsahujú pomerne vysoký podiel lipidov.

4.6. Obsah celkovej sušiny

Vzorka bola sušená v sušiarňi do konštantnej hmotnosti a následne bola sušina zvážená.

Tab. 22: Obsah celkovej sušiny

Druh tyčinky	Obsah sušiny [% hm.]
Kokosová	91,34
Čučoriedková	91,67
Citrónová	91,19

Celková sušina je súčtom rozpustnej a nerozpustnej sušiny. Celková sušina teda obsahuje organické aj anorganické látky rozpustné vo vode, ako sú napr. cukry, farbivá, vitamíny a rovnako aj látky nerozpustné vo vode, medzi ktoré patria tuky či minerálne látky. Zo stanovených hodnôt sušiny vyplýva, že vybrané vzorky obsahujú menej ako 10 % hm. vody.

4.7. Stanovenie mikrobiálnej kontaminácie potravín

4.7.1. Očkovanie na pevné médium

Podľa postupu v kapitole 3.10.2 bolo prevedené 5 dňové mikrobiologické očkovanie nariadených vzoriek na selektívne pevné médiá. Výsledky sú uvedené v Tab. 23 až Tab. 26.

Tab. 23: Zhrnutie rastu buniek nariadenej vzorky kokosovej tyčinky na selektívnych pevných médiách (TSA, MRS a YPD agar)

Deň	Riedenie	Kultivačné médium					
		TSA		MRS		YPD	
1.	10^{-3}	–	–	–	–	–	–
	10^{-5}	–	–	–	–	–	–
2.	10^{-3}	–	–	–	–	–	–
	10^{-5}	–	–	–	–	–	–
3.	10^{-3}	–	–	+++	+++	+++	+++
	10^{-5}	–	–	–	–	+	+
4.	10^{-3}	+++	+++	+++	++++	++++	++++
	10^{-5}	–	+	+	–	+++	+++
5.	10^{-3}	C	C	++++	++++	C	C
	10^{-5}	+++	+++	+++	+++	++++	++++

(Pozn. Symbol – odpovedá < 100 KTJ/ml (bez rastu mikroorganizmov), + odpovedá 10^2 KTJ/ml (nepatrný rast mikroorganizmov), ++ odpovedá 10^3 KTJ/ml (mierny rast mikroorganizmov), +++ odpovedá 10^4 KTJ/ml (silný rast mikroorganizmov), ++++ odpovedá 10^5 (masívny rast mikroorganizmov), symbol C odpovedá 10^6 (povrch pokrytý mikroorganizmami).

Tab. 24: Zhrnutie rastu buniek nariadenej vzorky čučoriedkovej tyčinky na selektívnych pevných médiách (TSA, MRS a YPD agar)

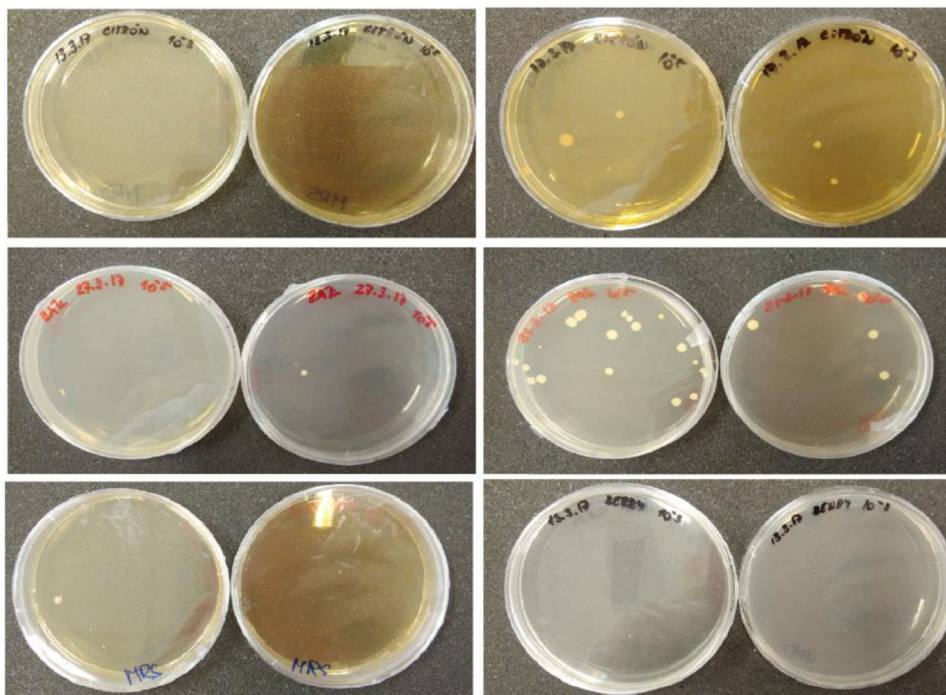
Deň	Riedenie	Kultivačné médium					
		TSA		MRS		YPD	
1.	10^{-3}	–	–	–	–	–	–
	10^{-5}	–	–	–	–	–	–
2.	10^{-3}	–	–	–	–	+++	+++
	10^{-5}	–	–	–	–	–	–
3.	10^{-3}	+++	+++	–	–	++++	++++
	10^{-5}	–	–	–	–	+++	+++
4.	10^{-3}	+++	++++	+++	+++	++++	++++
	10^{-5}	+++	+++	+++	+++	++++	++++
5.	10^{-3}	++++	C	++++	++++	C	C
	10^{-5}	C	C	+++	+++	C	C

Tab. 25: Zhrnutie rastu buniek nariedenej vzorky citrónovej tyčinky na selektívnych pevných médiách (TSA, MRS a YPD agar)

Deň	Riedenie	Kultivačné médium		
		TSA	MRS	YPD
1.	10^{-3}	–	–	–
	10^{-5}	–	–	–
2.	10^{-3}	–	–	–
	10^{-5}	–	–	–
3.	10^{-3}	–	–	+++
	10^{-5}	–	–	+
4.	10^{-3}	+++	+++	++++
	10^{-5}	+++	–	+++
5.	10^{-3}	++++	++++	C
	10^{-5}	+++	+++	+++

Tab. 26: Zhrnutie rastu buniek nariedenej vzorky raw zákusku na selektívnych pevných médiách (TSA, MRS a YPD agar)

Deň	Riedenie	Kultivačné médium					
		TSA		MRS		YPD	
1.	10^{-3}	–	–	–	–	–	–
	10^{-5}	–	–	–	–	–	–
2.	10^{-3}	–	–	+++	+++	+++	+++
	10^{-5}	–	–	–	–	–	–
3.	10^{-3}	+++	+++	+++	+++	+++	++++
	10^{-5}	–	–	+	+	+++	+++
4.	10^{-3}	+++	+++	++++	++++	++++	++++
	10^{-5}	+++	+++	+++	+++	+++	+++
5.	10^{-3}	++++	++++	++++	++++	C	C
	10^{-5}	+++	+++	+++	+++	++++	++++



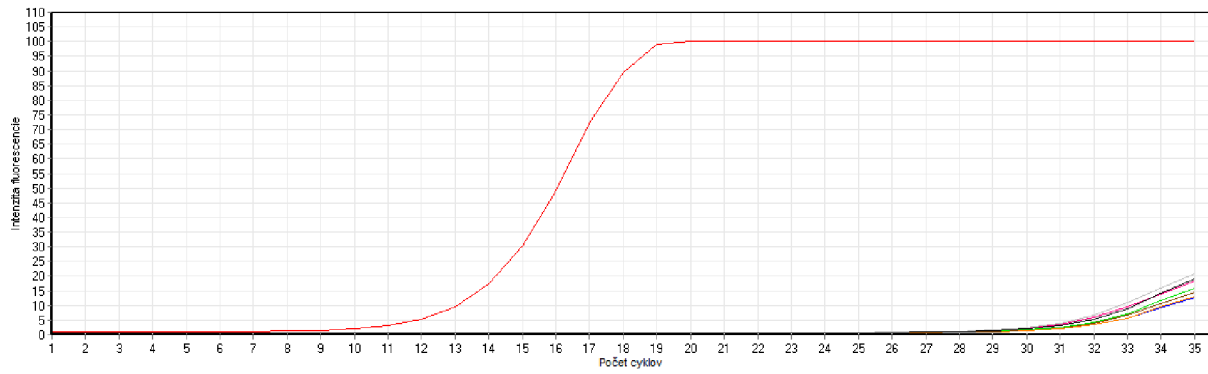
Obr. 14: Vybrané selektívne média zaznamenané v priebehu kultivácie

Pri stanovení možnej mikrobiálnej kontaminácie v sledovaných výrobkoch mikrobiologickým očkovaním na selektívne pevné médiá vyplýva, že najvyššie riziko mikrobiálnej kontaminácie nastáva v raw zákusku. Už v druhý deň bol zaznamenaný nárast kolónií na agare MRS a YPD. Predpoklad pre pomerne rýchly nárast mikroorganizmov pramení pravdepodobne vo vysokom obsahu sacharidov, ktoré sú vhodným substrátom pre rast kvasiniek. Zároveň zákusok nebol balený v ochrannom obale, ktorý by zamedzil kontaminácii z okolia. Na YPD agare sa rovnako preukázala prítomnosť kvasiniek v čučoriedkovej raw tyčinke na druhý deň po jej otvorení. Kokosová a citrónová tyčinka sa dajú považovať za pomerne bezpečné, vzhľadom na to, že mikrobiálny nárast bol potvrdený až v tretí deň po ich otvorení. Spomalený rast mikrobiálnej kontaminácie môže byť pravdepodobne následok vyššieho obsahu tuku v tyčinkách v porovnaní s čučoriedkovou tyčinkou.

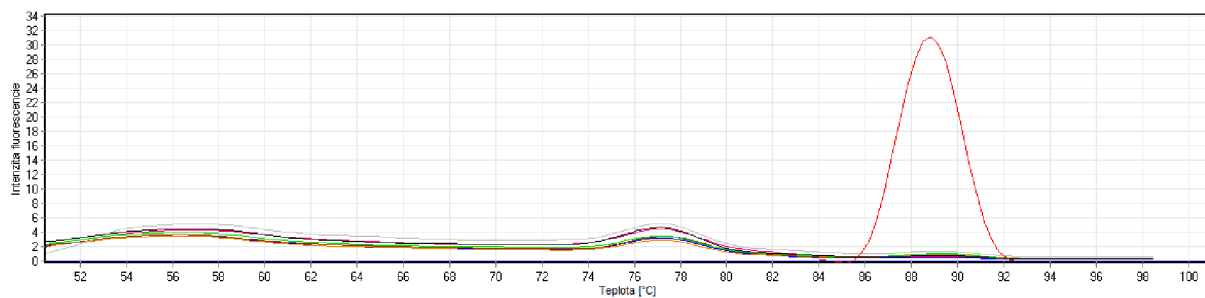
4.8. Určenie mikroorganizmov metódou PCR

4.8.1. PCR špecifická pre doménu *Bacteria*

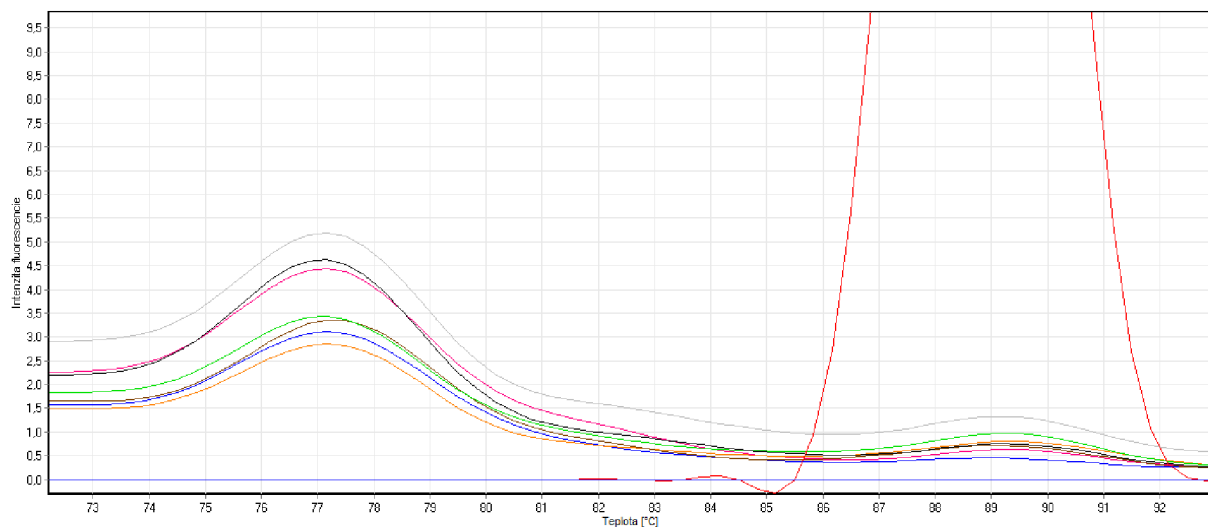
S primermi špecifickými pre doménu *Bacteria* bola vykonaná PCR podľa postupu uvedeného v kapitole 3.11.3. Boli amplifikované špecifické produkty PCR s dĺžkou 466 bp. Príslušné amplifikačné krivky sú uvedené na Obr. 15 a príslušné krivky topenia na Obr. 16. Hodnoty teplôt topenia sú uvedené v Tab. 27. Snímka agarózového gélu s nanesenými produktmi PCR je uvedená na Obr. 18.



Obr. 15: Amplifikačné krivky – závislosť množstva fluorescence na cykle reakcie



Obr. 16: Záznam z Melt analýzy PCR produktov špecifických pre doménu Bacteria – závislosť intenzity fluorescence produktov PCR na teplote



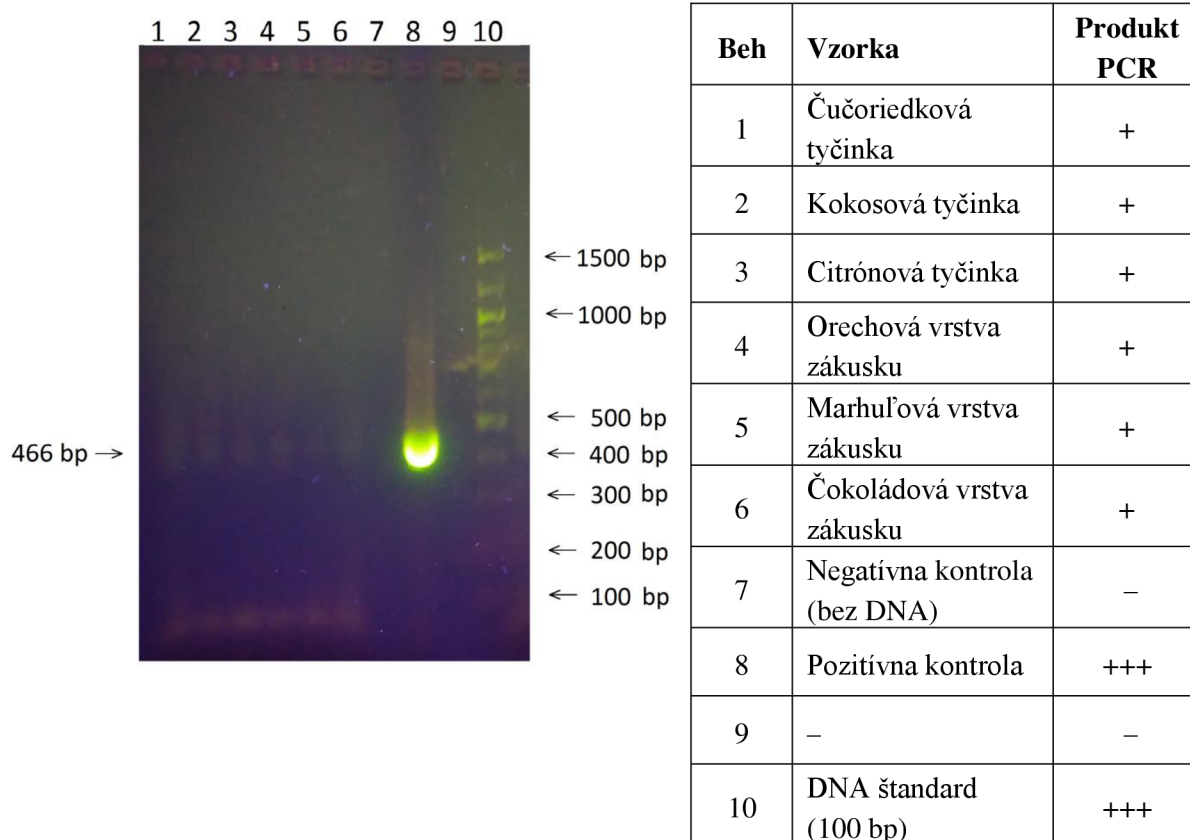
Obr. 17: Približený záznam z Melt analýzy pre doménu Bacteria

Tab. 27: Výsledky Melt analýzy pre doménu *Bacteria*

Farba krivky	Vzorka	T_m [°C]
●	Pozitívna kontrola	88,8
●	Negatívna kontrola	N
●	Kokosová tyčinka	89,3
●	Čučoriedková tyčinka	89,2
●	Citronová tyčinka	89,0
●	Orechová vrstva zákusku	89,3
●	Marhuľová vrstva zákusku	89,0
●	Čokoládová vrstva zákusku	89,3

(Vysvetlivky: T_m – teplota topenia, N – nedetekované)

Výsledné hodnoty teploty topenia pre doménu *Bacteria* boli takmer zhodné s teplotou topenia pozitívnej kontroly, z čoho vyplýva, že vo vzorkách sa s najväčšou pravdepodobnosťou nachádzala bakteriálna DNA.



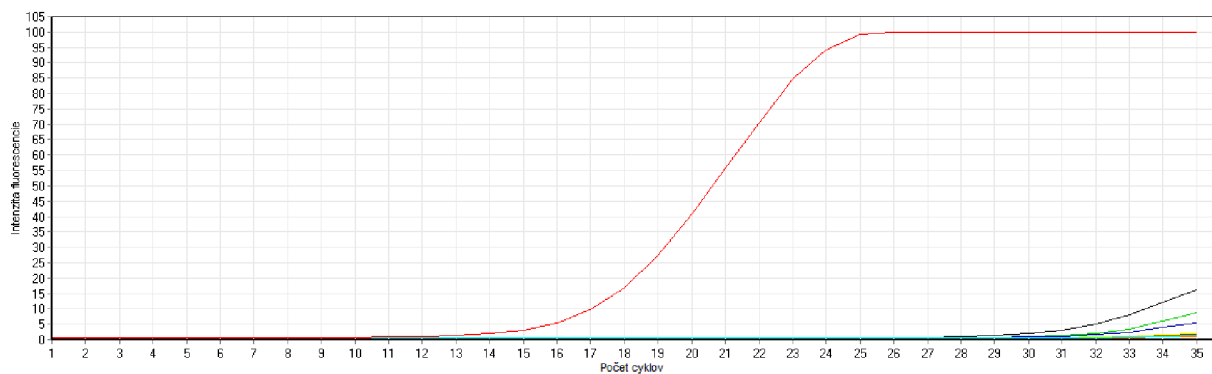
Obr. 18: Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre doménu *Bacteria*. Schéma nanesenia vzoriek a intenzity produktov PCR (+++ silná, ++ stredná, + slabá, – nedetekovaná)

DNA získaná zo vzoriek 3 raw tyčínok a raw zákusku pomocou magnetických nosičov bola amplifikovaná v PCR za použitia primerov špecifických pre doménu *Bacteria*. Získaný produkt bol vyhodnotený melt analýzou a elektroforeticky.

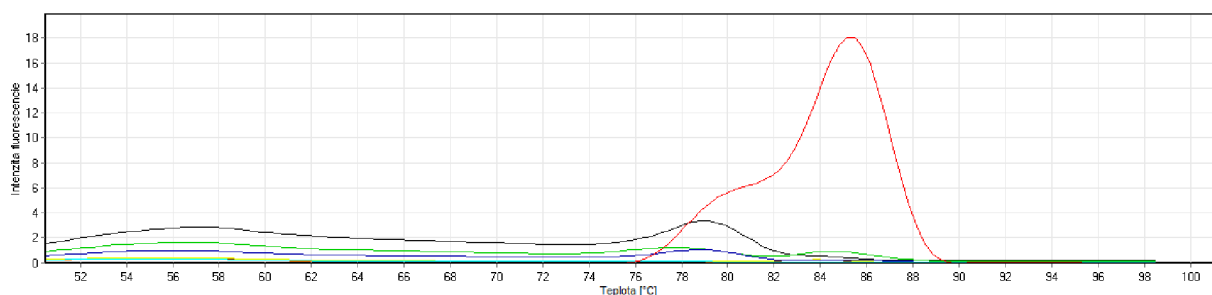
Výsledky metódy melt analýzy a agarózovej gélovej elektroforézy sa zhodujú, pretože u oboch metód boli detekované bakteriálne DNA ale v malom množstve. Prítomnosť bakteriálnej DNA bola potvrdená agarózovou gélovou elektroforézou. Boli detekované špecifické produkty PCR slabej intenzity, čím bola preukázaná prítomnosť bakteriálnej DNA.

4.8.2. PCR špecifická pre kvasinky

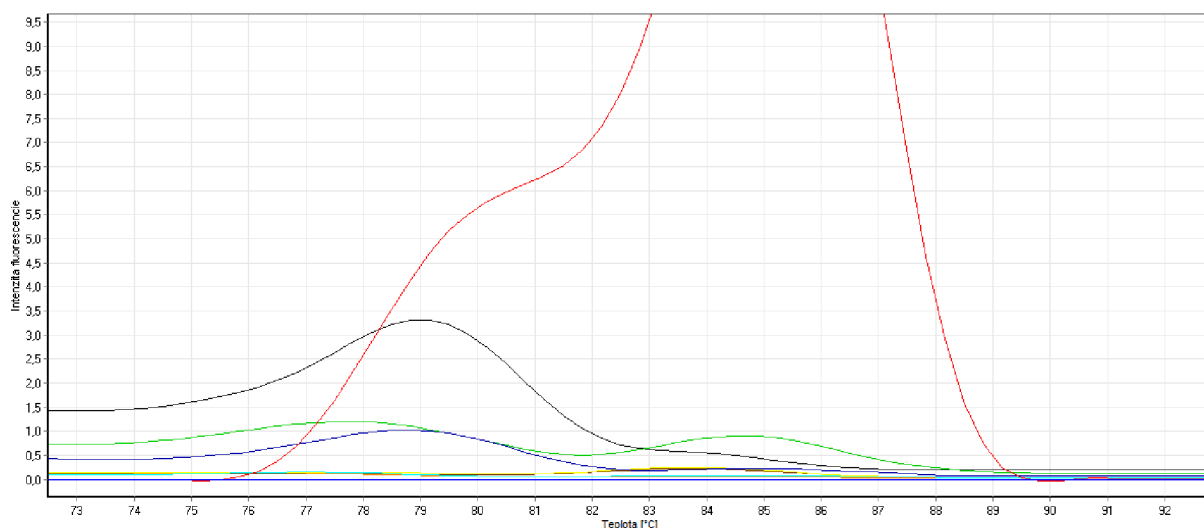
S primermi špecifickými pre kvasinky bola vykonaná PCR podľa postupu uvedeného v kapitole 3.11.3. Boli amplifikované špecifické produkty PCR s dĺžkou 152 bp. Príslušné amplifikačné krivky sú uvedené na obrázku Obr. 19, príslušné krivky topenia na Obr. 20. Hodnoty teplôt topenia produktov PCR sú uvedené v Tab. 28 snímka agarózového gélu s nanesenými produktmi PCR je uvedená na Obr. 22.



Obr. 19: Amplifikačné krivky – závislosť množstva fluorescence na cykle reakcie



Obr. 20: Záznam z Melt analýzy pre kvasinky – závislosť intenzity fluorescence produktov PCR na teplote

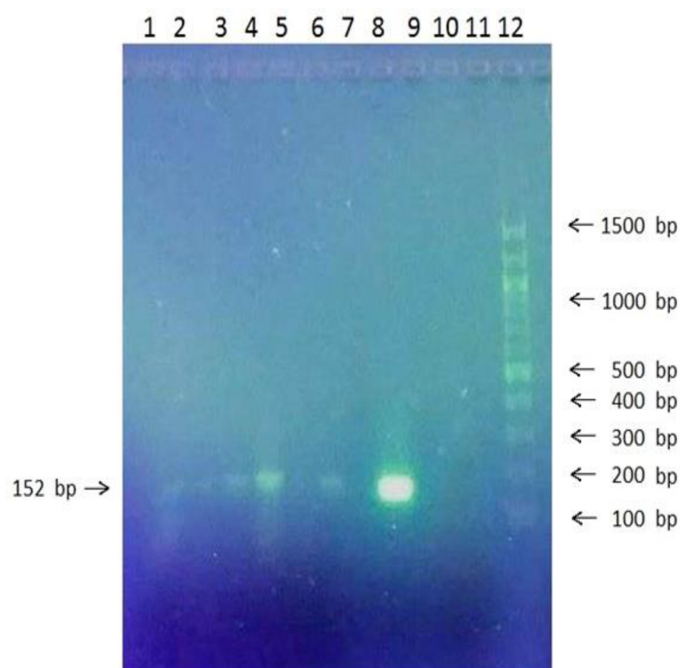


Obr. 21: Približený záznam z Melt analýzy pre kvasinky

Tab. 28: Výsledky Melt analýzy pre kvasinky

Farba krivky	Vzorka	T_m [°C]
●	Pozitívna kontrola	85,3
●	Negatívna kontrola	N
●	Kokosová tyčinka	84,3
●	Čučoriedková tyčinka	85,0
●	Citrónová tyčinka	83,8
●	Orechová vrstva zákusku	84,5
●	Marhuľová vrstva zákusku	84,5
●	Čokoládová vrstva zákusku	83,7

Výsledné hodnoty teploty topenia pre kvasinky sa blížili k hodnote teploty topenia pozitívnej kontroly, z čoho vyplýva, že o vzorkách sa pravdepodobne vyskytovala kvasinková DNA. Odchýlky hodnôt môžu byť spôsobené nízkym množstvom DNA matrice v PCR zmesi, prítomnosťou inhibítorov PCR alebo nedostatočnou optimalizáciou PCR programu.



Beh	Vzorka	Produkt PCR
1	Čučoriedková tyčinka	+
2	Kokosová tyčinka	+
3	Citrónová tyčinka	+
4	Orechová vrstva zákusku	++
5	Marhuľová vrstva zákusku	-
6	Čokoládová vrstva zákusku	+
7	-	-
8	Pozitívna kontrola	+++
9	-	-
10	Negatívna kontrola (bez DNA)	-
11	-	-
12	DNA štandard (100 bp)	+++

Obr. 22: Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre kvasinky. Schéma nanesenia vzoriek a intenzity produktov PCR (+++ silná, ++ stredná, + slabá, - nedetegovaná

Prítomnosť kvasinkovej DNA bola potvrdená agarózovou gélovou elektroforézou. Boli detekované produkty PCR slabej až strednej intenzity. Na základe intenzity produktov PCR bola preukázaná prítomnosť kvasinkovej DNA vo všetkých vzorkách. V prípade marhuľovej vrstvy zákusku sa výsledky melt analýzy a agarózovej gélovej elektroforézy líšia. Melt analýzou bol detekovaný produkt PCR, na géle však produkt PCR detekovaný nebol. To je zrejme spôsobené malým množstvom PCR produktov v PCR zmesi, ktoré je pod detekčným limitom tejto metódy.

V porovnaní metód očkovania vzoriek na selektívne pevné médiá a agarózovej gélovej elektroforézy bol potvrdený výskyt DNA kvasiniek. Na selektívnom médiu YPD bol zaznamenaný rast kolónií pre očkovanie v druhý deň od kúpy vzorky. Na géle bola pre orechovú vrstvu detekovaná stredná intenzita produktu PCR.

5. ZÁVER

Cieľom práce bola analýza vybraných živín a aktívnych zložiek obsiahnutých v raw potravinách a sledovanie vybraných raw potravín z hľadiska potenciálneho mikrobiálneho ohrozenia. K štúdiu boli použité ovocno-orechové balené tyčinky, ktoré je bežne možné zakúpiť v potravinových reťazcoch a ovocno-orechový zákusok, ktorý sa ponúka v rôznych kaviarňach či cukráňach. Vybranými živinami boli sacharidy, ktoré boli stanovené spektrofotometrickou metódou a lipidy, ktorých obsah bol stanovený metódou extrakcie s následným gravimetrickým stanovením. Spektrofotometricky boli stanovené aktívne zložky antioxidanty, polyfenoly, flavonoidy a antokyány. Potenciálna mikrobiálna kontaminácia bola zisťovaná metódou PCR, elektroforézou a 5 dňovým očkovaním vybraných typov raw potravín na selektívne pevné médiá.

Z výsledkov stanovenia antioxidačnej aktivity vyplýva, že vybrané vzorky boli bohaté na antioxidanty, najvyššia hodnota bola zaznamenaná v čučoriedkovej raw tyčinke. Na základe dvoch typoch extrakčných činidiel môžeme usudzovať, že väčšie množstvo antioxidačných látok u všetkých vzoriek malo lipidickú povahu.

Obsah polyfenolov a flavonoidov bol stanovený v tyčinkách obsahujúcich rôzne typy ovocia. Najvyšší obsah polyfenolov a flavonoidov bol stanovený v čučoriedkovej raw tyčinke, ktorá obsahuje dužinaté bobuľovité plody, v ktorých sa všeobecne vyskytuje najväčší podiel týchto látok. Najnižší obsah bol stanovený v kokosovej raw tyčinke, ktorá obsahuje suché ovocie ako je kokos a d'atle. Z výsledkov vyplýva, že suché plody nie sú v porovnaní s dužinatým ovocím také bohaté na aktívne látky. Tento fakt vyplýva aj zo stanovenia obsahu antokyánov, ktorých najvyšší obsah bol stanovený opäť v čučoriedkovej raw tyčinke a najnižší v kokosovej. Citrónová tyčinka sa obsahom antokyánov takmer rovnala čučoriedkovej.

Ďalej bol v raw tyčinkách stanovený obsah celkových sacharidov. Stanovené výsledky sa od hodnôt udávaných na obale značne líšia. Predpokladom je, že obsah sacharidov je ľahko ovplyvniteľný z hľadiska rôzneho dozrievania a odrody plodov a ich vystavenia vonkajším podmienkam.

Izoláciou lipidov podľa Folcha bol stanovený obsah lipidov. Ich najvyšší obsah bol stanovený v kokosovej raw tyčinke, čo je pochopiteľné z dôvodu vysokého podielu orechov. Experimentálne zistené hodnoty sa od udávaných hodnôt líšia. Dá sa však argumentovať tým, že tyčinky nemajú homogénnu konzistenciu a tak odobratie z rôznych častí tyčinky čiastočne skresľuje výsledky, rovnako tak ovocie a orechy nepochádzajú vždy z rovnakého miesta zberu, nie je to vždy rovnaká odroda.

Obsah sušiny bol experimentálne stanovený v každej raw tyčinke na hodnotu vyššiu ako 91 % hm. Z toho vyplýva, že tyčinky obsahujú vo veľkom množstve organické a anorganické látky nerozpustné vo vode.

Riziko možného výskytu nežiaducich mikroorganizmov a teda bezpečnosť konzumácie výrobku po uvedení do spotreby, bolo vyhodnotené z nárastov kolónií na selektívnych médiách. Výsledky pre jednotlivé raw tyčinky a zákusok sú uvedené v Tab. 23 – Tab. 26. Už v druhý deň po otvorení čučoriedkovej tyčinky bol zaznamenaný nárast kolónií na selektívnom médiu YPD. V prípade zákusku bol v druhý deň očkovania zaznamenaný nárast aj na MRS agare. Melt analýzou a detekciou na agarózovom géle bola potvrdená prítomnosť

kvasinkovej DNA vo väčšom množstve v zákusku než v ostatných vzorkách. To môže byť spôsobené tým, že raw zákusok pozostáva z prísad tepelne upravených max. do 45 °C, ďalej bol po príprave uložený v chladiacom boxe v predajni, nebol vákuovo balený. Týmto spôsobom mohlo dôjsť ku kontaminácii z okolného prostredia už počas prepravy do predajne. Suroviny na výrobu raw zákuskov sú viacmenej dokonalým nutričným zdrojom živín nielen pre človeka, ale i pre mikroorganizmy. Prítomnosť kvasinkovej aj bakteriálnej DNA bola potvrdená melt analýzou vo všetkých raw tyčinkách a agarózovou gélovou elektroforézou boli detekované slabé intenzity PCR produktov.

Z výsledkov vyplýva, že najvyššie riziko kontaminácie hrozí v prípade raw zákuskov. Konzumácia je pravdepodobne najvhodnejšia v priebehu prvého dňa od prípravy zákusku, prípadne v druhý deň. Tretí deň od prípravy zákusku je vysoká pravdepodobnosť napadnutia výrobku kvasinkami, vďaka vysokému podielu cukrov. Znížiť riziko konzumácie mikrobiologicky kontaminovaného produktu môžeme výberom overenej prevádzky kaviarne či cukrárne.

Raw tyčinky sú chránené vákuovým obalom, z čoho vyplýva, že riziko kontaminácie nastáva až po otvorení obalu. Bezpečnosť raw tyčínok sa preukázala až do tretieho dňa od otvorenia s výnimkou čučoriedkovej raw tyčinky. Je teda vhodné po zakúpení baleného raw produktu spotrebovať ho ihneď po otvorení.

Hoci sa u vzoriek preukázalo riziko výskytu bakteriálnych a kvasinkových mikroorganizmov, ich veľkým pozitívom je, že raw produkty sú bohatým zdrojom aktívnych látok prospešných pre ľudský organizmus.

6. ZDROJE

- [1] MARTÍNEZ-AUGUSTIN, Olga, Concepción M. AGUILERA, Mercedes GIL-CAMPOS, Fermín SÁNCHEZ DE MEDINA a Angel GIL. Bioactive Anti-Obesity Food Components. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* [online]. 2012, **82**(3), 148-156 [cit. 2017-04-29]. DOI: 10.1024/0300-9831/a000105. ISSN 0300-9831. Dostupné z: <http://econtent.hogrefe.com/doi/abs/10.1024/0300-9831/a000105>
- [2] SABATIER, Patrick Pierre. Kniha o všech dietách: ty, které fungují, ty, které jsou nebezpečné, ta, kterou potřebujete. Praha: Motto, 2013. ISBN 978-80-7246-573-6.
- [3] Čo je paleo stravovanie. *Varimepaleo* [online]. [cit. 2017-03-02]. Dostupné z: <http://varimepaleo.sk/paleo-2/paleo/>
- [4] Čo je paleo stravovanie. *Varimepaleo* [online]. [cit. 2017-03-02]. Dostupné z: <http://varimepaleo.sk/paleo-2/paleo-v-obrazoch/>
- [5] GARBETT, Tanya M., Donald L. GARBETT a Annmarie WENDORF. Vegetarian Diet: A Prescription for High Blood Pressure? A Systematic Review of the Literature. *The Journal for Nurse Practitioners* [online]. Elsevier, 2016, **12**(7), 452-458.e6 [cit. 2017-01-19]. DOI: 10.1016/j.nurpra.2016.04.013. ISSN 1555-4155. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S1555415516300745>
- [6] MIHRSHAH, Seema, Ding DING, Joanne GALE, Margaret ALLMAN-FARINELLI, Emily BANKS a Adrian E. BAUMAN. Vegetarian diet and all-cause mortality: Evidence from a large population-based Australian cohort - the 45 and Up Study. *Preventive Medicine* [online]. Elsevier, 1704, **97**, 1-7 [cit. 2017-01-19]. DOI: 10.1016/j.ypmed.2016.12.044. ISSN 0091-7435. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0091743516304479>
- [7] JANSSEN, Meike, Claudia BUSCH, Manika RÖDIGER a Ulrich HAMM. Motives of consumers following a vegan diet and their attitudes towards animal agriculture. *Appetite* [online]. Elsevier, 2016, **105**, 643-651 [cit. 2017-01-19]. DOI: 10.1016/j.appet.2016.06.039. ISSN 0195-6663. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0195666316302677>
- [8] RADNITZ, Cynthia, Bonnie BEEZHOLD a Julie DIMATTEO. Investigation of lifestyle choices of individuals following a vegan diet for health and ethical reasons. *Appetite* [online]. Elsevier, 2015, **90**, 31-36 [cit. 2017-01-23]. DOI: 10.1016/j.appet.2015.02.026. ISSN 0195-6663. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0195666315000732>
- [9] Fruitarian diet. *Diet* [online]. [cit. 2017-02-02]. Dostupné z: <https://diet.com/info/facts/fruitarian-diet>
- [10] Raw jídelníček. *Pestryjidelnicek* [online]. [cit. 2017-04-29]. Dostupné z: <https://www.pestryjidelnicek.cz/magazin/jidelnicky/raw-jidelnicek/>

- [11] Maximilian Bircher-Benner, 1867-1939. *Benner* [online]. [cit. 2017-04-29]. Dostupné z: <http://www.benner.org.nz/index.php/stories/benner-europe/208-maximilian-bircher-benner>
- [12] Raw food (syrová strava): módní trend nebo zdravé stravování?. *Skaba* [online]. [cit. 2017-02-02]. Dostupné z: <http://skaba.cz/raw-foodsyrova-strava-modni-trend-nebo-zdrave-stravovani/>
- [13] PERŠINOVÁ, Eva. Raw food jako zážitek: užívej si pestrost živé stravy každý den!. Praha: Grada, 2016. ISBN 978-80-247-5799-5.
- [14] Raw foods diet. *Diet* [online]. [cit. 2017-02-02]. Dostupné z: <https://diet.com/info/facts/raw-foods-diet>
- [15] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 1*. 2. upr. vyd. Tábor: OSSIS, 2002, 331 s. ISBN 80-86659-03-8.
- [16] EDITORS, Navam S. Hettiarachchy a Kenji Sato ASSOCIATE EDITORS. *Food Proteins and Peptides Chemistry, Functionality, Interactions, and Commercialization*. Hoboken: CRC Press, 2012. ISBN 9781420093421.
- [17] MA, Xiaofei, Miaomiao LV, Debbie P. ANDERSON a Peter R. CHANG. Natural polysaccharide composites based on modified cellulose spheres and plasticized chitosan matrix. *Food Hydrocolloids* [online]. Elsevier, 1705, **66**, 276-285 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2016.11.038. ISSN 0268-005X. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0268005X16308864>
- [18] TÁBORSKÁ, Eva a Jiří DOSTÁL. *Overview of chemistry*. Brno: Masaryk University, 2010. ISBN 978-80-210-5193-5.
- [19] TOMASIK, Piotr. *Chemical and functional properties of food saccharides*. Boca Raton: CRC Press, c2004. ISBN 0849314860.
- [20] HUANG, Wei, Yuequan DENG a Yi HE. Visual colorimetric sensor array for discrimination of antioxidants in serum using MnO₂ nanosheets triggered multicolor chromogenic system. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. Elsevier B.V., 2017, **91**, 89-94 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1016/j.bios.2016.12.028. ISSN 0956-5663. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0956566316312568>
- [21] TOREN FINKEL a NIKKI J. HOLBROOK. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* [online]. Nature Publishing Group, 2000, **408**(6809), 239 [cit. 2017-05-14]. DOI: 10.1038/35041687. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://web.a.ebscohost.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=a3263fde-ece2-4533-8ce7-9096b9322dda%40sessionmgr4009&hid=4104>
- [22] SHI, Mengxuan, Jie BAI, Liyun ZHAO, Xinrui YU, Jingjing LIANG, Ying LIU, Willem NORD a Yuan LI. Co-loading and intestine-specific delivery of multiple antioxidants in pH-responsive microspheres based on TEMPO-oxidized polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* [online]. Elsevier, 2017, **157**, 858-865 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.10.057. ISSN 0144-8617. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0144861716312255>
- [23] CHEN, Liang-Yu, Chien-Wei CHENG a Ji-Yuan LIANG. Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *Food Chemistry* [online]. Elsevier, 2015, **170**, 10-15 [cit. 2017-04-08]. DOI:

- 10.1016/j.foodchem.2014.08.038. ISSN 0308-8146. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0308814614012539>
- [24] OSOWSKI, Adam, Adam KASPAREK, Zbigniew WIECZOREK, Ryszard AMAROWICZ a Mariusz SZABELSKI. Evaluation of the characteristics of some plant polyphenols as molecules intercepting mitoxantrone. *Food Chemistry* [online]. Elsevier, 2017, 227, 142-148 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.01.083. ISSN 0308-8146. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0308814617300948>
- [25] GEORGE, Vazhappilly Cijo, Graham DELLAIRE a H.P. Vasantha RUPASINGHE. Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. *The Journal of Nutritional Biochemistry* [online]. Elsevier, 1707, **45**, 1-14 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2016.11.007. ISSN 0955-2863. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0955286316302236>
- [26] AUCELIO, Ricardo Q., Juliana M. CARVALHO, Juliana T. REAL, Luis MAQUEIRA-ESPINOSA, Aurora PÉREZ-GRAMATGES a Andrea R. DA SILVA. Study of the interaction of flavonoids with 3-mercaptopropionic acid modified CdTe quantum dots mediated by cetyltrimethyl ammonium bromide in aqueous medium. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [online]. Elsevier B.V, 2017, **172**, 147-155 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1016/j.saa.2016.04.021. ISSN 1386-1425. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S1386142516301962>
- [27] ZHANG, Huijie, Meng WANG, Lina CHEN, et al. Structure-solubility relationships and thermodynamic aspects of solubility of some flavonoids in the solvents modeling biological media. *Journal of Molecular Liquids* [online]. Elsevier B.V, 1701, **225**, 439-445 [cit. 2017-03-11]. DOI: 10.1016/j.molliq.2016.11.036. ISSN 0167-7322. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0167732216328628>
- [28] ŠMÍDOVÁ, Barbora, Dalibor ŠATÍNSKÝ, Kateřina DOSTÁLOVÁ a Petr SOLICH. The pentafluorophenyl stationary phase shows a unique separation efficiency for performing fast chromatography determination of highbush blueberry anthocyanins. *Talanta* [online]. Elsevier B.V, 2017, **166**, 249-254 [cit. 2017-03-17]. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.01.061. ISSN 0039-9140. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0039914017301704>
- [29] SANG, Jun, Jie SANG, Qun MA, Xiao-Fang HOU a Cui-Qin LI. Extraction optimization and identification of anthocyanins from *Nitraria tangutorun* Bobr. seed meal and establishment of a green analytical method of anthocyanins. *Food Chemistry* [online]. Elsevier, 2017, **218**, 386-395 [cit. 2017-03-17]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.09.093. ISSN 0308-8146. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0308814616314856>

- [30] HE, Bo, Jiao GE, Pengxiang YUE, Xueyang YUE, Ruiyan FU, Jin LIANG a Xueling GAO. Loading of anthocyanins on chitosan nanoparticles influences anthocyanin degradation in gastrointestinal fluids and stability in a beverage. *Food Chemistry* [online]. Elsevier, 2017, **221**, 1671-1677 [cit. 2017-03-17]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.10.120. ISSN 0308-8146. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S030881461631799X>
- [31] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [32] GÖRNER, Fridrich a Ľubomír VALÍK. Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho pôvodu, ktorých zárodoky sú prenášané požívatinami. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [33] Feriancová, J.: Zborník prednášok z konferencie *Mykotoxíny 2014, Praha 23. – 24. 10. 2014*. Ed. Jana Feriancová: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2014, 104 s. ISBN: 978-80-7080-895-5
- [34] Feriancová, J.: Zborník prednášok z konferencie *Mykotoxíny 2016, Bratislava 22. – 23. 9. 2016*. Ed. Jana Feriancová: Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU v Bratislave, 2016, 78 s. ISBN: 978-80-89597-43-7
- [35] Superfoods. *Dental Abstracts* [online]. Mosby, 2007, **52**(2), 86-87 [cit. 2017-01-22]. DOI: 10.1016/j.denabs.2006.12.009. ISSN 0011-8486. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011848606000598>
- [36] MANDŽUKOVÁ, Jarmila. *Superpotraviny*. vyd. Bratislava: Príroda, 2013, 248 s. ISBN 978-80-07-02100-6
- [37] JAVOREKOVÁ, Soňa. *Laboratórny manuál k predmetu mikrobiológia*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2015, 123 s. ISBN 978-80-552-1392-7
- [38] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010, 86 s. : il. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [39] KRÁLOVÁ, Blanka. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 254 s. ISBN 80-7080-449-1.
- [40] DUDOVÁ, S. a R. HÁJEK. *Využití metody real-time PCR (kvantitativní PCR, PCR v reálném čase) v hematologii a studiu mnohočetného myelomu*. Klinická onkologie, Aps Brno: Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, 2008, roč. 21, S1, s. 220-222. ISSN 0862-495X.
- [41] SIBLEY, Christopher D., Gisele PEIRANO a Deirdre L. CHURCH. Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: Current and potential application in diagnostic microbiology. *Infection, Genetics and Evolution* [online]. Elsevier B.V, 1204, **12**(3), 505-521 [cit. 2017-05-02]. DOI: 10.1016/j.meegid.2012.01.011. ISSN 1567-1348. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S1567134812000123>
- [42] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko, 2016, 176 stran : ilustrace ; 24 cm. ISBN 978-80-86369-22-8

- [43] MÁROVÁ, Ivana a Stanislav OBRUČA. *Vybrané instrumentální úlohy z aplikované biochemie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. ISBN 978-80-214-4788-2.
- [44] GRUBEŠIĆ, Renata, Dario KREMER, Marijana KONČIĆ, Jadranka RODRÍGUEZ a Marko RANDIĆ. Quantitative analysis of polyphenols and antioxidant activity in four *Daphne L.* species. *Central European Journal of Biology* [online]. Heidelberg: SP Versita, 1212, 7(6), 1092-1100 [cit. 2017-05-14]. DOI: 10.2478/s11535-012-0102-8. ISSN 1895-104X. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.2478%2Fs11535-012-0102-8>
- [45] MAMMEN, Denni a Mammen DANIEL. A critical evaluation on the reliability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids. *Food Chemistry* [online]. Elsevier, 2012, 135(3), 1365-1368 [cit. 2017-05-01]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.05.109. ISSN 0308-8146. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0308814612009582>
- [46] ČOPIKOVÁ, Jana. *Chemie a analytika sacharidů*. Praha: VŠCHT, 1997, 104 s. ISBN 80-7080-306-1.
- [47] CARRASCO-PANCORBO, Alegría, Natalia NAVAS-IGLESIAS a Luis CUADROS-RODRÍGUEZ. From lipid analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part I: Modern lipid analysis. *Trends in Analytical Chemistry* [online]. Elsevier B.V, 2009, 28(3), 263-278 [cit. 2017-04-28]. DOI: 10.1016/j.trac.2008.12.005. ISSN 0165-9936. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0165993608002811>
- [48] FOLCH, J, M LEES a G H SLOANE STANLEY. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry* [online]. 5705, 226(1), 497 [cit. 2017-04-28]. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/content/226/1/497.long>
- [49] HRSTKA, M., SOMROVÁ, L. *Praktikum z analytickéj chemie potravin*. Brno: 2013. Dostupné z: <https://moodle.vutbr.cz/course/view.php?id=171810>
- [50] HU, Shuting, Xinchun ZHANG, Feng CHEN a Mingfu WANG. Dietary polyphenols as photoprotective agents against UV radiation. *Journal of Functional Foods* [online]. Elsevier, 1703, 30, 108-118 [cit. 2017-05-07]. DOI: 10.1016/j.jff.2017.01.009. ISSN 1756-4646. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464617300099>
- [51] JAKOBEK, Lidija a Marijan SERUGA. Influence of Anthocyanins, Flavonols and Phenolic Acids on the Antiradical Activity of Berries and Small Fruits. *International Journal of Food Properties* [online]. Taylor, 2012, 15(1), 122-133 [cit. 2017-05-14]. DOI: 10.1080/10942911003754684. ISSN 1094-2912. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10942911003754684>

7. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ABTS	2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonovej kyseliny)
TEAC	„Trolox equivalent antioxidant capacity “
UV	žiarenie v ultrafialovej oblasti spektra
VIS	žiarenie vo viditeľnej oblasti spektra
bp	pár báz
KTJ	kolónia tvoriaca jednotka
PCR	polymerázová reťazcová reakcia
kcal	kilokalórie
DHA	kyselina dokozahehexaénová
EPA	kyselina eikozapentaénová
SAFA	nasýtené mastné kyseliny
MUFA	mononenasýtené mastné kyseliny
PUFA	polynenasýtené mastné kyseliny
acetyl-CoA	acetylkoenzým A
ROS	reaktívne formy kyslíku
RNS	reaktívne formy dusíku
CoQ10	koenzým Q10
NEO	neosolaniol
DAS	diacetoxyscirpenol
NIV	nivalenol
DON	deoxynivalenol
3-ADON	3-acetyldeoxynivalenol
15-ADON	acetyldeoxynivalenol
FUS-X	fusarenon-X
ATA	alimentárna toxická aleukia
C _T	threshold cycle
T _m	teplota topenia
RI	„reference intake“
TSA	tryptofánový sójový agar
YPD	kvasničný práškový extrakt
MRS	mikrobiologický agar