

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Screening silic enkapsulovaných do jílových nanočástic
pro inhibici klíčení brambor**

Diplomová práce

**Helena Dolečková
Výživa a potraviny**

doc. Ing. Pavel Klouček, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Screening silic enkapsulovaných do jílových nanočástic pro inhibici klíčení" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 23.7. 2020 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Pavlovi Kloučkovi, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce. Dále Ing. Matěji Božikovi, MSc, Ph.D. za konzultace ohledně praktické části práce a Ing. Martině Šaškové za praktickou výpomoc v laboratoři.

Screening silic enkapsulovaných do jílových nanočástic pro inhibici klíčení brambor

Souhrn

V lidském jídelníčku představují brambory významný zdroj škrobu, vitamínu C a draslíku. Během skladování brambory procházejí určitými fázemi, ve kterých dochází k intenzivnímu buněčnému dýchání spouštějící tvorbu klíčků. Jednou z možností, jak klíčení omezit je aplikace silice a čistých látek z nich izolovaných. Silice jsou sekundární metabolity rostlin a v roli přírodních inhibitorů tedy nepoškozují životního prostředí, zdraví zvířat ani lidí. K jejich izolaci se nejčastěji používá destilace nebo extrakce v různých modifikacích. Pro testování inhibiční aktivity byla za nejvhodnější metodu popsána enkapsulace aktivní látky do jílových nanočástic.

V praktické části bylo testováno 21 čistých látek a 8 silic. Na základě předešlých studií byla pro tento pokus experimentálně zvolena koncentrace 300 μ l /l silice či čisté látky, enkapsulované do 3 g bentonitu, umístěného na dně každé skladovací nádoby o objemu 1 l. Enkapsulované látky byly překryty filtračním papírem, aby nedošlo k přímému kontaktu s hlízkami a zároveň se mohly postupně evaporizovat do prostředí nádoby během 3,5měsíčního skladovacího období. Každá varianta byla vyhodnocena ve třech opakováních. Během celkem deseti kontrolních bodů byly všechny zváženy, zkontrolovány na počet vyklíčených oček a přítomnost houbové infekce. Po každé kontrole byly nádoby uskladněny ve sklepech bez přístupu světla, s RV 60 % a teplotou 21 °C do dalšího kontrolního bodu.

Výsledky měření potvrdily silnou inhibiční aktivitu karvonu a kmínové silice. Srovnatelnou retardaci klíčení vykazoval mentol, 4-terpineol, kafr, linalol, citronelal a silice citronely. U karvakrolu byla detekována pouze slabší inhibice. Jako látky, které naopak stimuluje růst klíčků byly vyhodnoceny silice geranie, α -bisabolol, citronellyl propionát, vanilin, anisol, cedrol nebo limonen. Rozdíl hodnocených parametrů hlízk ošetřených účinnými retardanty od kontroly, byl patrný již v druhém kontrolním bodě. Klíčky ošetřených hlízk byly kompletně černé bez náznaku tvorby klíčků nových, zatímco klíčky kontroly rostly ve vrstvách přes sebe.

Nejefektivnější inhibitory potlačily vznik klíčků po celé 3,5měsíční skladovací období a na ošetřených hlízkách se houbová infekce nevyskytla na povrchu ani na klíčcích.

Silice a čisté látky z nich izolované, tedy představují účinnou a zároveň šetrnou náhradu syntetických inhibitorů, doposud používaných v komerčním zemědělství.

Klíčová slova: inhibice klíčení, silice, těkavé látky, terpeny

Screening of nanoclay encapsulated essential oils for inhibition of potato sprouting

Summary

In the human diet, potatoes (*Solanum tuberosum*) are an important source of starch, vitamin C, and potassium. During storage, potatoes go through certain phases, in which there is intense cellular respiration triggering the formation of sprouts. A suitable option to reduce germination might be an application of essential oils and pure substances isolated from them. Essential oils are secondary metabolites of plants, therefore as natural inhibitors, do not harm the environment, animal or human health. Distillation or extraction in various modifications is most often used to isolate them. For testing inhibitory activity, the encapsulation of the substance into clay nanoparticles was described as the most suitable method.

In the practical part, 21 pure substances and 8 essential oils were tested. Based on previous studies, a concentration of 300 μl /l of essential oil or pure substance encapsulated in 3 g of bentonite placed at the bottom of each 1 l storage vessel, was experimentally selected for this experiment. The encapsulated substances were covered with filter paper to avoid direct contact with tubers and at the same time could gradually evaporate into the container environment during 3.5month storage period. Each variant was evaluated in triplicate. During a total of ten checkpoints, each variant was weighed, check for the number of germinated stitches and the presence of fungal infection. Then the vessels were stored in the cellar without light access, with an RH 60 % and a temperature of 21 °C until the next control point.

The measurement results confirmed the strong inhibitory activity of carvone and cumin essential oil. Menthol, 4-terpineol, camphor, linalool, citronella and citronella essential oils showed comparable germination retardation. The expected retardation due to carvacrol was not confirmed and was very mild. Geranium essential oil, α -bisabolol, citronellyl propionate, vanillin, anisole, cedrol or limonene were evaluated as germ growth stimulants. The difference between the evaluated parameters of tubers treated with effective retardants compare to control was evident already at the second control point. The sprout of treated tubers was completely black with no sign of new sprouts, while the control sprouts grew in layers on top of each other.

The most effective inhibitors suppressed the development of germs throughout the 3.5month storage period, and the treated tubers did not show any significant signs of fungal infection not even on the germs by this time.

Essential oils and pure substances isolated from them, thus represent an effective, and at the same time gentle substitute for synthetic inhibitors used in commercial agriculture nowadays.

Keywords: sprout suppression, essential oils, volatiles, terpenes

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíle práce	9
3 Vědecká hypotéza	9
4 Literární rešerše	10
4.1 Charakteristika brambor	10
4.1.1 Chemické složení.....	10
4.1.1.1 Sacharidy	11
4.1.1.2 Dusíkaté látky	12
4.1.1.3 Minerální látky	12
4.1.1.4 Atioxidanty	12
4.1.1.5 Steroidní alkaloidy.....	13
4.1.2 Problematika skladování.....	13
4.1.2.1 Dýchání.....	13
4.1.2.2 Fáze skladování	14
4.1.2.3 Klíčení	14
4.1.3 Retardace klíčení.....	14
4.1.3.1 Syntetické inhibitory	15
4.2 Silice	15
Složení silic	16
4.2.1 Vliv silic na klíčení brambor	16
4.2.2 Metody získávání silic z rostlin	24
4.3 Jílové nanočástice	25
4.3.1 Bentonit.....	26
4.4 Enkapsulace	26
5 Materiál a metodika	28
5.1 Brambory a jejich skladování	28
5.2 Ošetření skladovaných brambor	28
5.3 Hodnocení	29
5.4 Průběh experimentu	30
6 Výsledky	31
6.1 Hodnocení sledovaných parametrů	31
6.1.1 Klíčení.....	31
6.1.2 Hmotnostní úbytek brambor během skladování	1
6.1.3 Výskyt houbové infekce h. i.	3
Diskuze	4

7 Závěr	8
8 Literatura	9
9 Seznam tabulek	14
10 Seznam obrázků	14
11 Seznam grafů	14
12 Seznam příloh	14
13 Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Bramborová hlíza má, jako rostlinný produkt s vysokými produkčními schopnostmi, význam především v lidské výživě a zpracovatelském průmyslu. V obou případech hraje stěžejní roli škrob, jako hlavní zásobní látka. Kromě sacharidů je brambor pro člověka významným zdrojem vitamínu C, draslíku, a v neposlední řadě i bílkovin (Hruška 1974).

Skladováním brambor vznikají problémy se ztrátami hmotnosti díky výparu, klíčení a výskytu skládkových chorob. Pro zamezení klíčení jsou komerčně využívány syntetické inhibitory na bázi chlóru, které však v hlízách zanechávají svá rezidua. Jejich výskyt v potravině představuje pro lidský organismus potenciální riziko, které je spotřebitelem vnímáno negativně. Proto je nezbytné, nahradit je účinnou, ale šetrnou alternativou.

V poslední době roste zájem o využití inhibičních látek přírodního původu. Pro tento účel mohou posloužit sekundární metabolity vyšších rostlin, totiž silice neboli esenciální, éterické oleje. Jejich využití sahá až do starého Egypta, kde používali např. tymián obsahující thymol, pro mumifikaci mrtvých těl. Do Evropy se rozšířily přes Benátky, Florencii a Janov původně k léčitelským účelům, později jako esence do parfémů. V Čínské medicíně je používání rostlinných olejů tradiční metodou využívanou do současnosti (Odyová 1995).

Využití silic a čistých látek z nich izolovaných v roli retardantů klíčení, se věnovalo již mnoho studií, nejčastěji byl na hlízy aplikován karvon obsažený v kmínové silici. Kromě inhibice klíčení, vyzdvihují autoři studií jeho antibakteriální vlastnosti potlačující výskyt infekce. Potenciálních inhibitorů z řad těkavých látek ale může být celá řada a je vhodné je podrobněji prozkoumat.

Tato diplomová práce se věnuje využití silic a čistých látek z nich izolovaných, jakožto přírodních inhibitorů klíčení hlíz *Solanum tuberosum*.

2 Cíle práce

Z předchozích studií a výsledků bude sestavena škála látek a silic podporujících, nebo naopak inhibujících klíčení u brambor během skladování. Inhibiční účinky jsou předpokládány především u karvonu, karvakrolu a kmínové silice. Cílem práce je zjistit, zda existují i další látky s podobným účinkem.

3 Vědecká hypotéza

Kromě známých přírodních inhibitorů klíčení brambor existují dosud nepopsané látky či jejich směsi s obdobným účinkem. Enkapsulace do jílových nanočástic je vhodnou metodou formulace těchto látek.

4 Literární rešerše

4.1 Charakteristika brambor

Brambor hlíznatý (*Solanum tuberosum*) náleží do rodu lilek (*Solanum* Tourn) čeledi lilkovitých (*Solanaceae* Pers). Pojmem brambor se běžně označují i příbuzné druhy rodu *Solanum*, kde se vyskytují jednoleté i vytrvalé rostliny. Brambor hlíznatý, dále jen brambor, je rostlinou jednoletou a v zemědělské výrobě se rozmnožuje vegetativně hlízami. Generativní rozmnožování semeny je nezbytné pro šlechtění nových odrůd (Rybáček et al. 1988).

Původně jihoamerická plodina byla do Evropy dovezena Španěly v 16. století. U nás se začala pěstovat až v druhé polovině 18. stol. v reakci na hladomor během Prusko-rakouské války. Spotřeba v roce 1850 dosáhla rekordních 170 kg na osobu.

V současné výživě člověka, zvířat i zpracovatelském průmyslu je význam brambor spojen především s obsahem škrobu jako hlavní zásobní látkou. Jeho sytící účinek vysloužil bramborům označení „druhý chléb“ a vysoký obsah vitamínu C pomohl ve své době i v boji proti kurdějím (Rybáček et al. 1988). Vzhledem ke konzumovanému množství a zastoupení této plodiny v lidském jídelníčku, představuje brambora důležitý zdroj antioxidantů a dusíkatých látek, včetně bílkovin i pro dnešní populaci (Bárta et al. 2004).

Spotřeba v ČR je k roku 2017 68,3 kg na osobu. (ČSÚ 2016). FAO k roku 2013 udává celosvětovou spotřebu na osobu 34,17 kg (FAO 2013).

Největším producentem je aktuálně Čína, následována Indií, Ruskem, Ukrajinou a Spojenými státy Americkými (NPC 2018).

4.1.1 Chemické složení

Bramborové hlízy jsou jediným využitelným orgánem bramborového trsu. Slouží k ukládání asimilátů, produktů vzniklých fotosyntézou a zastoupení jednotlivých složek určuje jejich hodnotu i další zpracování. Průměrné hodnoty chemického složení bramborových hlíz jsou uvedeny v Tabulce č.1.

Voda představuje 70-82 % hmotnosti hlízy v závislosti na zralosti, zvolené odrůdě, technologii pěstování a ročníkových poměrech. Kvalitu a charakteristiku samotného produktu však určuje sušina. Pro brambory určené k přímé konzumaci je volba obsahu sušiny závislá především na chuťových preferencích spotřebitele. Moučnaté brambory mají obsah sušiny nižší, vyšší obsah nacházíme u brambor lojovitých (Rybáček et al. 1988).

Tabulka 1 Základní chemické složení hlíz bramboru

Majoritní složky	Vyjádření v čerstvé hmotě (%)	Minoritní složky	Obsah v mg/ 100 g čerstvé hmoty
Voda	68–83	Vitamin C	8–54
Sušina	17–32	Karotenoidy	0,05–2
Škrob	11–26	Tokoferoly	až do 0,3
Celkový cukr	0,5	Polyfenoly	123–441
Vláknina	1–2	Dusičnany	<500
Dusíkaté látky	1–3	Steroidní	<20
Bílkoviny	0,5–2	glykoalkaloidy	
Volné aminokyseliny			
(Asp, Gln, Pro)	0,1–1		
Lipidy (tuk)	0,1		
Popeloviny	1,1		

(Bárta et al. 2008)

4.1.1.1 Sacharidy

Hlavní složkou sušiny je polysacharid škrob, uložený ve formě škrobových zrn. Jedná se o polymerní směs α -D-glukanů amylázy a amylopektinu v poměru 1:4 (Rybáček et al. 1988). Pro hlízy slouží jako zásobárna energie a zdroj pro tvorbu ostatních organických látek při klíčení. Odrůdy pro přímou konzumaci nebo výrobky z brambor obsahují 12-18 % škrobu (Vokál et al. 2013).

V bramborových hlízách se kromě škrobu vyskytují i další polysacharidy zajišťující výstavbu buněčných stěn a mezibuněčných prostor. Souhrnně jsou označovány jako vláknina, reprezentovány celulórou, hemicelulórou, pentózany a pektiny (Čížek et al. 2009).

Celkový cukr zahrnuje redukující cukry, monosacharid glukózu a fruktózu, neredukující zastupuje disacharid sacharóza. Přítomnost redukujících cukrů jako nositelů nasládlé chuti je spotřebiteli vnímána negativně. Jejich obsah je spjatý s fyziologickým stavem hlíz, odrůdou, stanovištěm a podmínkami skladování. Ve vyzrálých hlízách je za běžných teplot (10-20 °C) obsah cukrů minimální (do 0,5 %), zvyšuje se při poklesu teploty na 0 °C (Zrůst 2009). Při zpracování na smažené výrobky je navíc úzký vztah mezi jejich koncentrací a tvorbou pro člověka karcinogenního akrylamidu. Vzniká reakcí karbonylové skupiny cukrů a aminoskupin volných aminokyselin, zejména pak asparaginu. Tento jev je známý jako Maillardova reakce, kdy kromě vzniku akrylamidu dochází k neenzymatickému hnědnutí a hořknutí produktu (Zhu et al. 2010).

4.1.1.2 Dusíkaté látky

Dusíkaté látky zaujímají přibližně 2 % původní hmoty, spadají pod ně bílkoviny a nebílkovinné dusíkaté látky. Bílkoviny mají převážně vodorozpustný albuminový charakter. Dělí se na patatinové bílkoviny, skupinu inhibitorů proteáz a ostatní bílkoviny. Patatin jako hlavní zásobní bílkovina (20-40 % bílkovin) vykazuje především enzymatickou aktivitu a pravděpodobně se účastní i obraných reakcí v hlíze, podobně jako inhibitory proteáz (30-60 % bílkovin).

Mezi nebílkovinné dusíkaté látky ovlivňující kvalitu brambor patří volné aminokyseliny zastoupené především asparaginem a glutaminem (23 % N-látek). Tyto amidy jsou pro hlízu určitým rezervoárem dusíku a zároveň zvýrazňují chuť jiných sloučenin (Rybáček et al. 1988).

4.1.1.3 Minerální látky

Průměrné zastoupení minerálních látek v hlízách je 1,1 % čerstvé hmoty. Jejich množství je však silně ovlivňováno půdním prostředím, ve kterém je rostlina pěstována.

Nejvýznamnějším prvkem je draslík zaujímající 30-50 % popelovin. Podílí se na vytváření celkové chuti, zabraňuje enzymatickému hnědnutí a černání po uvaření nebo mechanickém poškození hlízy (Rybáček et al. 1988).

Nezanedbatelná je též přítomnost fosforu, důležitého pro rozvoj rostliny i metabolické pochody v hlíze. Hnojení P_2O_5 údajně podporuje zvýšení počtu hlíz, i když zdroje jsou v tomto nejednotné. Prokázán byl i pozitivní vliv na obsah vitamínu C (Zrůst 2009).

4.1.1.4 Antioxidanty

Brambory jsou vzhledem ke konzumovanému množství významným zdrojem látek s antioxidační aktivitou. V lidském organismu i v rostlinách mohou neutralizovat volné radikály a předcházet tak následnému oxidačnímu poškození. Tato skutečnost značně napomáhá ke snížení rizika vzniku kardiovaskulárních onemocnění a celkovému posílení imunity.

Antioxidanty lipofilního charakteru reprezentují karotenoidy, tokoferoly a α -lipoová kyselina, ve vodě rozpustné jsou kyselina askorbová a polyfenoly. V organismu působí obě skupiny synergicky a zvyšují svůj pozitivní účinek.

Kyselina askorbová se v bramborových hlízách vyskytuje ve vysokém množství (170-990 mg/kg). Dokonce i po tepelné úpravě v bramborách zůstává okolo 130 mg/kg. Jako přírodní antioxidant zabraňuje hnědnutí brambor, redukcí o-chinonů na o-difenoly.

Ze skupiny polyfenolů je nejhodněji zastoupen L-tyrosin (770-390 mg/kg), následován kyselinou kávovou (280 mg/kg), kyselinou chlorogenovou (22-71 mg/kg), kyselinou ferulovou (28 mg/kg) a kyselinou neochlorogenovou (11 mg/kg).

Největší podíl karotenoidů (4-4,5 mg/kg) zaujímá β -karoten a xantofyly lutein a zeaxantin. Nezanedbatelný je též obsah α -tokoferolu (0,5-2,8 mg/kg) a selenu (0,1 mg/kg) a kyseliny lipoové (Zrůst 2009).

4.1.1.5 Steroidní alkaloidy

V bramborových hlízách se nevyskytují jen živiny prospěšné lidskému organismu, ale rovněž tzv. antinutriční látky způsobující ve vysokých koncentracích zdravotní potíže. Do této skupiny patří kromě akrylamidu také glykoalkaloidy a kalysteginy. V kulturních odrůdách se nejvíce vyskytují glykoalkaloidy α -solanin a α -chakonin, zaujímají až 95 % TGA (total glykoalkaloid) (Velíšek, J., Hajšlová 2009). Z kalysteginů jsou nejvýznamnější A3, B2 a B4 vzhledem k jejich proměnlivosti napříč hlízou se koncentrace pohybuje v rozmezí od 0,01 % č.h. ve slupce až po 7,0 $\mu\text{g/g}$ č.h. v celé hlíze (Asano 1997; Nash 1993).

Obě skupiny glykoalkaloidů se vyskytují v klíčících hlízách ve vyšších koncentracích než v nadzemních částech rostliny. Rozdíl se objevuje při osvětlení hlíz, kdy se koncentrace kalysteginů ve slupce na rozdíl od glykoalkaloidů nezvyšuje a při klíčení jejich obsah dosahuje nižších hodnot než jejich ekvivalent klíčící ve tmě (Keiner et al. 2000). Působením světla dochází k zezelenání hlíz a zvýšení obsahu solaninu. Při množství nad 20 mg/100 g č.h. dochází k projevům toxicity zvracením, průjmům, žaludečními křečemi, bolestmi hlavy a závratěmi. Mechanismus účinku spočívá v inhibici cholinesterázy a porušení membrán zažívacího traktu i jiných orgánů. Zvýšení α -chakoninu má dokonce teratogenní účinky. U kalysteginu je toxicita též připisována schopnosti inhibice β -glukosidázy a α -galaktosidázy (Schulzová et al. 2017).

V ČR je dle vyhlášky č.305/2004 Sb. nejvyšší povolené množství glykoalkaloidů v bramborových hlízách stanoveno na 200 mg/kg (MZ 2004).

4.1.2 Problematika skladování

Cílem skladování je dosáhnout minimálních ztrát vznikajících dýcháním, výpary, klíčením nebo skládkovými chorobami brambor. Pro zajištění ideálních podmínek se používají sklady paletové nebo sklady volně ložených brambor. Prostory musí mít regulovatelnou teplotou, vlhkost a větrání. Brambory je též třeba skladovat ve tmě, aby se zamezilo zezelenání hlíz (Vokál et al. 2013).

4.1.2.1 Dýchání

Buněčné dýchání brambor probíhá v mitochondriích za přítomnosti kyslíku přeměnou organických látek (glukózy) za vzniku oxidu uhličitého, vody a uvolněného tepla jako vedlejšího produktu. Voda setrvává v buňce, zatímco oxid uhličitý je průduchy vypařován spolu s teplem, které ohřívá prostor mezi hlízami a přispívá k vypařování vody z pokožky. Vlivem kondenzace vznikne na povrchu brambor ve vyšších vrstvách vlhké, teplé prostředí, vhodné pro rozvoj skládkových chorob. Zvýšená respirace se vyskytuje u mladých brambor s aktivním buněčným dělením nebo u brambor poškozených. Důvodem je nedostatečně vyvinutá slupka neboli periderm (Rybáček et al. 1988). Pro minimalizaci těchto ztrát a zachování požadované kvality hlíz je tedy nezbytné dodržovat specifické skladovací podmínky (Vokál et al. 2013).

4.1.2.2 Fáze skladování

Po příjmu brambor do skladu jsou hlízy připravovány na dlouhodobé uložení, během kterého projdou několika fázemi:

Osušování brambor má za cíl omezit povrchovou vlhkost hlíz, pomocí intenzivního větrání při teplotách 10-22 °C. Tato fáze nastává 24 až 36 hod po naskladnění v závislosti na stavu brambor, které by neměly být mokré.

Suberizace neboli hojení hlíz trvá 10 až 21 dní a má za úkol vytvořit povrchovou korkovou vrstvu zabraňující výparu vody a vniknutí patogenů u poškozených míst. Optimální teplota je 12-18 °C a relativní vlhkost 85-95 %.

Proces zchlazování se provádí vháněním kombinace vnějšího a vnitřního vzduchu. Celková teplota vháněného vzduchu by měla být o 2-5 °C nižší než teplota hlíz. Ta je u sadbových brambor upravována na 2-4 °C, u konzumních 4-7 °C a pro zpracování na lupínky a hranolky 7-10 °C.

V období 3-4 týdnů před vyskladněním jsou hlízy vystaveny tzv. rekondicionaci, při které je teplota zvýšena až na 15-20 °C. U konzumních brambor se sníží obsah nahromaděných sacharidů, u brambor sadbových dojde k tzv. probuzení (Vokál et al. 2013).

4.1.2.3 Klíčení

Po sklizni brambory podléhají klidovému období dormance, kdy ani za příznivých podmínek nedojde k vyklíčení pupenů. K prodloužení této fáze jsou hlízy skladovány při nižších teplotách nebo ošetřeny inhibitory klíčení. Snížení teploty (2-4 °C) během skladování, může klíčení zpomalit. Zároveň však dochází k nežádoucímu fenoménu "chladového sládnutí", kdy je škrob degradován na redukující cukry - glukózu a fruktózu (Sonnewald 2001).

Proces klíčení pupenů v očkách hlíz je spuštěn intenzivním dýcháním v buňkách, které roste se zvyšující se teplotou a tmou. Klíčky tedy ve tmě rostou rychleji než na světle, expozice hlíz světlu je však v rozporu se skladovacími podmínkami prevence zelenání hlíz (Rybáček et al. 1988). V důsledku vyššího odpařování vody z povrchu vzniklého klíčku dochází k hmotnostním ztrátám, měknutí, smršťování, pozměněna je struktura i nutriční hodnota brambor (Owolabi et al. 2013).

4.1.3 Retardace klíčení

Pro uchování brambor v uspokojivé kvalitě se využívá retardace, jejímž cílem je zamezit klíčení. Využívá se u dlouhodobého uskladnění konzumních brambor s krátkou dobou dormance nebo u brambor zpracovávaných na výrobky, skladovaných při vyšších teplotách (7-10 °C) (Vokál et al. 2013). Omezení či dokonce zabránění klíčení lze dosáhnout následujícími způsoby:

- Výběr odrůd s dlouhým obdobím dormance.
- Úpravou skladovacích podmínek, včetně dodržování selektivity dle odrůdových vlastností.
- Ošetření hlíz syntetickými inhibitory.
- Využití inhibitorů na přírodní bázi (Rasocha et al. 2007).

4.1.3.1 Syntetické inhibitory

K nejrozšířenějším syntetickým inhibitorům používaných v zahraničí a donedávna i u nás patří chloropham (CIPC; isopropyl N-(3-chlor-fenylkarbamát)) a maleinohydrazid (MH).

MH je v ČR registrován pod obchodním názvem Fazor s ochranou lhůtou pro konzumaci hlíz 21 dní. Aplikuje se 2-3 kg/ha ve formě postřiku obvykle 4-5 týdnů před sklizní. Výhodou přípravku je možnost skladování ošetřených brambor společně se sadbou, jelikož neuvolňují účinné látky. Potíže mohou nastat se stanovením termínu aplikace, povětrnostními podmínkami a účinností na rozdílné odrůdy brambor (Vokál et al. 2013).

Chloroprofam (CIPC) patří k neúčinnějším inhibitorům používaným celosvětově již přes 40 let. CIPC potlačuje klíčení narušením buněčného dělení a následného hojivého procesu. Přípravek je tedy nezbytné aplikovat po suberizaci ale před ukončením dormance, nebo viditelného počátku klíčení, obvykle po 2-3 týdnech skladování. Ve skladu je rozprašováno 17-22 mg/kg na č.h. ve formě teplého aerosolu nebo mlhy. Po překročení skladovací období 8 měsíců je možnost CIPC dávkovat dvakrát. Celkové množství ovšem nesmí překročit 28 mg/kg č.h. Ochranná lhůta pro konzumaci je 60 dní po aplikaci. Nevýhodou CIPC je jeho těkavost během působení na hlízy a měřitelné stopy reziduí po ošetření kolísají mezi 33-50 %. Z tohoto důvodu nesmí být ošetřené brambory skladovány spolu se sadbou či osivem (Kleinkopf et al. 2003).

Některé země právě kvůli zpřísnění požadavků na snížení koncentrací reziduí pozměnila jejich přípustný limit nebo úplně zakázaly jejich používání a výskyt v bramborách (Baydar et Karadogan 2003).

EFSA vydala 17. června 2019 prováděcí nařízení o neschválení používání účinné látky CIPC na území členských států EU. Na odejmutí povolení přípravků obsahujících chloroprofam mají odkladnou lhůtu nejpozději do 8. října 2020 (EK 2019). Dle Nařízení Komise EU z 3.května 2018 je MRL (maximální reziduální limit) pro maleinohydrazid 60 mg/kg č.h (EK 2018).

Účinnost inhibitorů na syntetické bázi je nesporná, problém však nastává s jejich negativním dopadem na životní prostředí. Řešením problému mohou být alternativní metody využívající k retardaci klíčení přírodní sloučeniny s přirozenou biodegradací.

4.2 Silice

Silice jinak též éterické, esenciální nebo aromatické oleje jsou definovány jako těkavé, vonné směsi přírodních rostlinných látek. Mají olejovitou, lipofilní konzistenci a jsou ve vodě těžko rozpustné. V čerstvém stavu bývají obvykle bezbarvé, avšak rozkladnými procesy během zpracování a skladování tmavnou a pryskyřičnatí. Případné zbarvení od žluté, modré až po zelenou je způsobeno např. azulenem a jeho deriváty (Berger 2007). Označení „éterický olej“ (*Quinta esentia*) použil poprvé v 16. stol švýcarský lékař, alchymista a astrolog Paracelsus von Hohenheim k pojmenování účinné složky drogy (Guenther 2013).

V rostlinách se silice primárně vyskytují v mezibuněčném prostoru, kanálcích, speciálních trichomech, papilách a žlázkách. Morfologicky pak v různých částech jako jsou květy, listy, oplodí, kořeny, semena, kůra nebo jádro dřeva. Jedná se o sekundární metabolity

rostlin, které je využívají především k ochraně před škůdci ale i k nalákání opylovačů. (Odyová 1995).

Využití silic člověkem sahá do starého Egypta, kdy používali např. tymián s obsahem thymolu, který je nositelem antiseptické, antibakteriální i antifungální aktivity k mumifikaci mrtvých těl. O zdokonalování postupů získávajících silice se zasloužili lékaři a filosofové Perské říše Ibn Síná (Avicena) a al Kindí. Do Evropy se silice rozšířily přes Benátky, Florencii a Janov původně k léčitelským účelům později jako esence do parfémů. V čínské medicíně je používání rostlinných olejů tradiční metodou využívanou do současnosti (Odyová 1995).

Díky edukaci společnosti roste v poslední době popularita přírodních látek nejen v kosmetickém, ale také v potravinářském průmyslu. Jejich uplatnění lze aplikovat ve vývoji konzumovatelných obalových technik, díky antimikrobiálním vlastnostem při konzervaci masa, mořských plodů, zeleniny, ovoce, mléčných a obilných výrobků až po jejich užití jako pesticidů, čemuž je větší pozornost věnována v kapitole 4.2.1 (Ju et al. 2018; Perricone et al. 2015).

Složení silic

Složení silic je ovlivňováno několika vnějšími i vnitřními faktory. Jedním z nich je prostředí, ve kterém rostlina vyrůstá. Příkladem může být myrta (*Myrtus communis L.*) pěstovaná v různých zemích a oblastech (Írán, Turecko, Itálie), kdy procentuální zastoupení jednotlivých složek kolísalo až v desítkách procent. Konkrétně α -pinen (22,5-31,6 %), limonen (3,8-23,4 %), 1,8-cineol (5,9-36,1 %) a linalool (8,4-11,6%) (Červinka et al. 1991). Dalším faktorem ovlivňující zastoupení je chemotyp a ontogenetická fáze rostliny, kdy bylo pozorováno, že během růstu voňatky martinovy (*Cymbopogon martini*) se obsah eugenolu v silici zvyšuje z 65 % na 81 % (Sangwan et al. 2001). Zohlednit je třeba taky orgán, ve kterém se silice metabolizuje. Flach zjistil, že hlavní složkou silice izolované z kůry skořicovníku je cinamaldehyd, zatímco silice získaná z listů měla převahu eugenolu (de Guzman et al. 1999). Výtěžnost silic je nejvyšší před začátkem a během kvetení, ovlivněna je množstvím srážek, dobou slunečního svitu i hnojením (Hay et al. 1995).

Taxonomie silic je poměrně náročná, jelikož se jedná se o heterogenní směsi s majoritním zastoupením několika hlavních složek (z celkových 20-60 látek), určujících zároveň jejich biologické vlastnosti. Nejhojněji zastoupenou skupinou jsou terpeny a terpenoidní látky. Základní stavební jednotkou terpenů je isopren (2-methyl-1,3butadien). Podle stavby uhlíkového řetězce je můžeme dělit na cyklické a acyklické, dle počtu polymerovaných molekul isoprenu do šesti skupin (monoterpeny, seskviterpeny, diterpeny, triterpeny, tetraterpeny, polyterpeny) a dle navázaných funkčních skupin na alkoholy, aldehydy, ketony, fenoly apod. (Červený 1999). Další početnou skupinou jsou látky s benzenovým jádrem, kde je základ tvořen fenylpropanem. Nejmenší zastoupení ve směsi mají sloučeniny s alifatickým řetězcem obsahující síru či dusík (Bakkali et al. 2008).

4.2.1 Vliv silic na klíčení brambor

Syntetické inhibitory jsou k ochraně rostlin využívány po celé dekády. Kromě potlačení nežádoucích jevů v metabolismu zemědělských plodin, však poškozují i necílené organismy. Jejich rezidua zůstávají v půdě, odkud dál migrují do potravního řetězce až k cílovému

konzumentovi – člověku (De Carvalho et al. 2006). Pro zdraví lidského organismu mohou představovat potenciální riziko, což je spotřebitelem vnímáno negativně a je tak snaha hledat v dané problematice nové přístupy. Jednou z možností alternativních metod je použití silic jako přirozeně se vyskytujících látek v rostlinách, které jsou šetrnější k životnímu prostředí (Božik 2018).

Účinky silic proti patogenům napadajícím brambory byly předmětem mnoha studií a jsou již poměrně důkladně prostudovány (Mehrorosh et al. 2014; Hosseini et al. 2012). Jejich účinek proti klíčení brambor je blíže popisován v následujících řádcích.

Vzhledem k těkavosti aktivních látek byl způsob aplikace ve většině uvedených studiích rozprašováním silic/čistých látek v plynné fázi, pokud tomu bylo jinak, postup je odprezentován u dané studie.

- Karvon

Karvon je monoterpenický monocyklický keton, vyskytující se ve dvou enantiomerech D-karvon a L-karvon. D-karvon neboli (4S)-(+)-karvon voní po kmínu, ze kterého se také získává jako hlavní složka (50-70 %) silice kmínu kořeného (*Carum carvi*). L-karvon či 4(R)-(-)-karvon je v obsahu 60-70 % získáván z máty klasnaté (*Mentha spicata*), kde je i nositelem její vůně. Dalším zdrojem D-karvonu jsou semena kopru vonného (*Anethum graveolens*), ve kterých představuje 40-60 % silice (De Carvalho 2006).

Inhibiční účinnost D-karvonu je přímo závislá na jeho koncentraci (Sorace et al. 1997). Oosterhaven popsal vliv působení D-karvonu na pokles 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reduktázy, klíčového enzymu v mevalonátové cestě, díky čemuž dochází k inhibici klíčení (Oosterhaven et al. 1993). Nevýhodou aplikace je postupný pokles jeho koncentrace ve skladovacím zařízení. Nutná je tedy opakovaná aplikace, což oproti konvenčním inhibitorům zvyšuje náklady na retardaci (Čížková et al. 2000).

Dostatečná koncentrace se různí v rámci studií. Sorace et al. (1997) uvádí v šestiměsíčním pokusu při doplňování karvonu každé dva týdny za účinnou koncentraci 7,15 mmol/ mol⁻¹. Hartmans et al. aplikoval 50-100 ml čistého D-karvonu na 1000 kg brambor opakovaně každých šest týdnů a pozoroval srovnatelné a lepší výsledky oproti IPC/CIPC (Hartmans et al. 1995). Podobné výsledky uvádí De Carvalho vyzdvihující ještě antifungální působení karvonu proti výskytu houbové infekce brambor. Oosterhaven též uvádí že inhibice je reversibilní a po odstranění D-karvonu dochází k opětovnému růstu klíčků. Výše zmínění autoři se shodují, že aplikace karvonu neovlivnila chuť, barvu ani kvalitu hlíz.

Teper-Bammolker et al. 2010 testovali účinnost D i L-karvonu a potvrdili inhibici klíčení bramborových hlíz u obou isomerů. L-karvon je do hlíz absorbován mnohem pomaleji proto má oproti D-karvonu pomalejší nástup účinku (Teper-Bammolker et al. 2010).

- Karvakrol

Karvakrol je monoterpenický fenol, vyskytující se majoritně v bylinách čeledi *Lamiaceae* (dobromyslu-*Origanum vulgare* 38,3 %, *O. onites* 78,2 %; majoránky-*Origanum majorana* 48,7 %; tymiánu-*Thymus vulgare* 9-60 %, *T. capitatus* 12,7-74,4 %; saturejky-*Saturea montana* 30-40 %, *S. hortensis* 1,2-44 %; mateřídouškovci vonném *Coridothymus capitatus* 51,6 %) (De Vincenzi et al. 2004).

Baydar et al. shledali karvakrol v koncentraci 200 μl/l velmi účinným inhibitorem, navíc podporující antimikrobiální efekt v kombinaci s (S)-(+)-karvonem (Baydar et al. 2003).

Ve studii Vokou et al. naopak silice z *Origanum vulgare*, *O. onites* jediná při koncentraci 25, 125 a 250 mg/kg č.h. nepotlačila klíčení u hlíz skladovaných 5 týdnů za teploty od 14-23,8 °C (Vokou et al. 1993). Shukla et al. potvrzují jen mírnou inhibici silicí z *Thymus vulgaris* při koncentraci 200 µl, distribuovaného fumigací na hlízy umístěné v exsikatoru skladovaných 28 dní při pokojové teplotě (25±2 °C). Kontrola klíčila po 7. dni z 98±2,6 %, ošetřené hlízy z 93±1,7 % (Shukla et al. 2019).

▪ Kafr

Kafr je monoterpenický bicyklický keton, v přírodě se nejčastěji vyskytuje jako (R)-(+)-kafr ovšem existuje i jeho (S)-forma. Nachází se ve dřevě stromu kafrovníku (*Cinnamomum camphora*), jeho silice obsahuje až 68 %, v listech pelyňku ročního (*Artemisia anua*) se vyskytuje okolo 77,2 %, v listech bazalky posvátné (*Ocimum sanctum*) až 65,4 % (El-Awady et al. 2014). V rozmarýnu (*Rosmarinus officinalis*) se nachází 40,6 % a v šalvěji (*Salvia officinalis*) okolo 19 % (Baydar et al. 2003).

Vokou et al. uvedli účinnost inhibičního efektu silice *Salvia fruticosa* a *Rosmarinus officinalis* v koncentraci 1 ml/kg č.h. brambor. Jejich účinnost spočívala ve zčernání až vadnutí klíčků, nikoli v potlačení jejich vzniku. (Vokou et al. 1993) Vaughn potvrzuje slabší inhibici za headspace koncentrace $3,2 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$, způsobující zčernání a nekrózu pouze na koncích klíčků (Vaughn et al. 1991). Také El-Awady Aml ve své studii potvrzuje slabší, ale stále výraznou inhibici, konkrétně při koncentraci 4,6 a 8 mmol.l⁻¹ potlačil kafr 93 % klíčivosti (El-Awady Aml et al. 2014). Lil et al. uvádí po 50 dnech aplikace 0,2 g/l kafru zčernání konečků klíčků na skupině brambor skladovaných při teplotě 23±2 °C, zatímco na skupině skladované při teplotě 4 °C nepozoruje žádné klíčení. Po 110 dnech od aplikace se však klíčení obnovilo. Autor tento jev připisuje zvýšené hladině peroxidáz, ovlivňující právě růst klíčků, kterou však kafr nebyl schopen dostatečně potlačit. Naopak snížil hladinu enzymu fosfolitid fosfolipázy, zodpovědnou za ztráty vody a zvýšil hladinu proteinu způsobující nekrózu konečků klíčků (Lil et al. 2017).

▪ 4-Terpineol

4-terpineol dříve 4-karvomentenol, se vyskytuje ve dvou enantiomerech (4R)-(+)-α-terpineol a (4S)-(-)-α-terpineol. (+)-α-terpineol má těžkou liliovitou vůni, zatímco (-)-α-terpineol voní po dehtu. Vyskytuje se v koriandru (*Coryandrum capitatus*) 61,5 % (R), 38,5 % (S); majoránce (*Origanum majorana* L.) 57 % (R), 42 % (S); bazalce (*Ocimum basilicum*) 69 % (R), 31 % (S); v Rozmarýnu lékařském (*Rosmarinum officinalis*) 69 % (R), 31 % (S); levanduli (*L. angustifolia*) 62 % (R) 38 %, (S); v listech řebříčku (*Achilea ligustica*) 19,3 %; v mátě kadeřavé (*Mentha spicata*) 1,8-7 % nebo v ožance (*Teucrium montanum*) 3,9 % (Ravid, et al. 1995).

Vaughn et al. popisuje účinnost 4-terpinolu při headspace koncentraci $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ způsobující zčernání konečků klíčků (Vaughn et al. 1991). Vokou et al. testoval účinnost silice z *Lavandula angustifolia*, která při koncentraci 1 ml/ kg č.h. brambor inhibovala klíčení hlíz uskladněných 5 týdnů 99,8 % úspěšností. *Mentha spicata* inhibovala klíčení z 81,7 % při stejné koncentraci (Vokou et al. 1993). Chauhan et al. testovali též silici z *Mentha spicata* z různých lokalit za použití koncentrace 100, 200, 300 µl po 35 dní při 35 °C. K inhibici došlo u všech testovaných koncentrací (Chauhan et al. 2011). Meigh et al. potvrzuje úspěšnost inhibice α-terpineolu při headspace koncentraci 125 µg/l, kdy nedošlo ani ke klíčení ani ztrátě hmotnosti hlíz skladovaných 6 týdnů při teplotě 10 °C (Meigh et al. 1969).

- Kmínová silice

Kmín kořený (*Carum carvi*) se vyskytuje ve dvou formách lišících se obsahem účinných látek. Jedná se o kmín dvouletý s obsahem silic 3-7 %, zatímco jednoletý obsahuje pouze 2-3 %. Hlavní složkami silice je zmiňovaný D-karvon (50-70 %) a D-limonen (2-30 %) (De Carvalho et al. 2006). Inhibiční účinek vykazoval však pouze D-karvon. Čížková uvedla za dostatečnou koncentraci 0,1 ml/kg hlíz opakovaně aplikovanou v intervalech šesti týdnů (Čížková et al. 2000).

- Mentol

Mentol je monoterpenický monocyklický alkohol, vyskytující se v přírodě nejčastěji ve formě (1R,2S,5R), jako stereoizomer může mít až 8 forem: (±)-mentol, (±)-isomentol, (±)-neomentol, (±)-neoisomentol (Barry 1973). Ve směsi silic Máty peprné (*Mentha piperata*) se může vyskytnout monoterpenický keton menton (29,5 %) vyskytující se spolu s mentolem (44,1 %) (Baydar et al. 2003).

Coleman et al. testovali (1S, 2S, 5R)-(+)-neomentol a (1R, 2S, 5R)-(-)-mentol a L-menton (kontaminován isomerem isomenton). Těkavé látky působily na brambory 14 dní při teplotě 25 °C, poté byly uskladněny ve tmě na dalších 14 dní za teploty 20°C. Neomentol kompletně potlačil klíčení při koncentraci 2 µl/l a menton při 5 µl/l a pokud byly obě komponenty smíchány (0,5 µl/l) působily synergicky. Látky byly ve studii účinnější než S-karvon (Coleman et al. 2001). Naopak Vaughn uvádí jen slabou účinnost mentolu za headspace koncentrace $2,2 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ vedoucí ke zčernání konečků klíčků (Vaughn et al. 1991). Podobné výsledky uvádí Finger et al. kdy klíčivost za použití mentolu o koncentraci 100 mg/kg brambor vedla k 67,4 % klíčivosti oproti kontrole s hodnotou 92,9 % klíčivosti (Finger et al. 2018).

- Cedrol

Cedrol je seskviterpenický alkohol s dřevitou vůní. Vyskytuje se v silici jalovce viržinského (*Juniperus virginian L.*) obsahující 26 %, v cypřiši stálezeleném (*Cupressus sempervirens*) 8,3 %, v květu *Achillea ligustica* je 4,3 % nebo v ožance (*Teucrium orientale L* subsp. *Taylori*) 0,2 % (Klouček et al. 2012) (Hyun et al. 2015) (Amiri 2010).

- α-Felandren

Felandren je monoterpenický monocyklický alken, vyskytující se ve dvou izomerech α-felandren a β-felandren. Jeho vůně byla popsána jako směs pepřmintové vůně s citrusy. Izomer α-felandren se vyskytuje v silici eukalyptu (*Eucalyptus dives*) zastupující 20-80 %, v kopru vonném (*Anethum graveolens*) tvoří až 50 % silice, v *Echinophora tenuifolia* 49,5 % a ve vřesně bahenní (*Myrica gale*) 6,49-9,9 % silice. β-felandren se vyskytuje ve dřevě borovice pokroucené (*Pinus contorta*) z 34 % (< 0,6 % α-isomeru) (Baser et al. 2009).

Baydar et al. vyhodnotil užití 200 µl/l⁻¹ silice z *Echinophora tenuifolia* jako velmi efektivní v potlačení klíčení. Hlízy byly působení látky vystavené 16 h/ 22-24 °C a následně uskladněny 50 dní. Vaughn et al. uvádí lehký inhibiční efekt při headspace koncentraci $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ α-felandrenu. Hlízy byly skladované při teplotě 25 °C po dobu 7 dní a po ošetření došlo ke zčernání konečků klíčků (Baydar et al. 2003).

- α-Terpinen

α-Terpinen je monoterpenický monocyklický alken, jedná se o enantiomer, který může mít uspořádání α, β, σ, γ. Je nositelem typické vůně terpentýnové silice získávané z pryskyřic borovic (*Pinus nigra* Arn., *Pinus silvestris* L., *Pinus palustris* Mill., *Pinus pinaster* Sol. *Pinus halepensis* Mill.) (MZ 2014). Jako majoritní složka se vyskytuje v silici merlíku vonného (*Chemopodium abrosioides*) až z 63,3 % (Owolabi et al. 2010).

Ve studii Owolabi et al. byla použita koncentrace 0,3 ml silice *Chemopodium abrosioides* enkapsulované do bentonitu, kaolinu a oxidu hlinitého za přidání Trintonu X-100 proti vypařování. Použity byly 3 přístupy aplikace – práškové formy byly převrstveny hlízy či jimi poprášeny, nebo se silice distribuovaly fumigací. Hlízy se skladovaly 10 týdnů při teplotě 20-25 °C. Klíčivost ošetřených hlíz se pohybovala od 37,5-68,75 % oproti 93,97 % klíčivosti kontroly. Největší úspěšnost měla kombinace substrátu s Trintonu X-100 (Owolabi et al. 2010).

- p-Cymen

P-cymene je monoterpenický monocyklický alken, který je součástí silice merlíku vonného (*Chemopodium abrosioides*) kde představuje 26,4 % silice. Inhibiční účinky viz předchozí studie (Owolabi et al. 2010).

- Anisol/Anetol

Anetol patří do metoxy derivátů, jedná se o fenylmetyléter, anisol je synteticky připravená látka vonící po lékořici. Anetol se vyskytuje ve formě dvou izomerů cis a trans. Přírodním zdrojem anetolu je bedrník anýz (*Pimpinella anisum*; 93,9 %), fenykl obecný (*Foeniculum vulgare*; 76,4 %), anýzovec pravý (*Illicium verum*; 85-90 %), (*Clausena anisata*; 85-100 %), nebo aksamitník mexický (*Tagetes lucida*; 23,8 %) (Baser et al. 2009).

Baydar et al. popsali mírnou inhibiční účinnost anetolu za použití 200 µl/l při vystavení hlíz 16 h 22-24 °C a následně 50 dní uskladněných. Hodnotící škála měla maximum +++ z čehož anisol získal + (Baydar et al. 2003).

- Anýz

Silice bedrníku anýzu (*Pimpinella anisum*) obsahuje 76,9- 93,9 % *trans*-anetolu, 2,4 % estragolu a 0,06 % (E)-metyleugenol, α-cuparen, β-bisabolen, p-anisaldehyd a *cis*-anetol (Shojaii et al. 2012).

- Fenykl

V silici fenyklu setého (*Foeniculum sativum*) je zastoupen anetol (76,4 %), limonen (7,7 %), a fenchon (3,3 %) (Baydar et al. 2003).

Fenchon ve studii Vaughna způsobil kompletní zčernání a nekrózu klíčků při koncentraci 0,51±0,05 mg/l a hlízy měly pevnou strukturu (Vaughn et al. 1991).

- Limonen

Limonen je monoterpenický cyklický alken vyskytující se v enantiomerech (R)-(+)-limonen vonícím po citrónu, zatímco (S)-(-)-limonen voní po terpentýnu připomínající borovici. R-limonen je nejčastěji izolován z kůry citronu (*Citrusu limon*), pomeranče (*Citrus sinensis*) jejíž silice obsahují 86-100 % (Henner et al. 1990). Silice citronely a citronové trávy obsahují 0-4 % S-limonenu. V mátě kadeřavé (*Mentha spicata*) se vyskytuje v rozmezí 2,7-14 % (Chauhan et al. 2011). V kmínu (*Carum carvi*) je zastoupen z 40,3 %, ve fenyklu (*Foeniculum vulgare*) ze 7,7 % (Baydar et al. 2003).

Ve studii Vaughna měla headspace koncentrace 1,7± 2 mg/l limonenu velmi slabé inhibiční účinky (95 % klíčivosti) v porovnání s kontrolou (98 % klíčivosti). Navíc byly hlízy pokryty viditelnou vrstvou houbové infekce a měly měkkou strukturu (Vaughn et al. 1991).

- Citral

Citral je monoterpenický acyklický aldehyd vyskytující se ve dvou izomerech geranial čili *trans*-citral a neral, nebo *cis*-citral. Geranial má silnou citronovou vůni, neral méně intenzivní. Tvoří největší podíl (65-80 %) silice citrónové trávy (*Cymbopogon citratus*). Konkrétně 35,6-43,8 % *trans*-citralu a 29,4-36,2 % *cis*-citralu (Katsukawa et al. 2010). V citronele

(*Cymbopogon citratus*) se vyskytuje 22,7 % trans-citralu a 14,2 % cis-citralu (Nakahara et al. 2013).

El-Awady Aml et al. uvádí kompletní inhibici při koncentraci 6 a 8 mmol.l⁻¹ citralu na brambory uskladněné 4 měsíce za venkovních teplot (35/15 °C-den/noc). Brambory byly v jednotlivých roztocích izolovaných látek ve vodě, máčené 30 min a poté uskladněny. Nedošlo k redukci cukrů ani aminokyselin a aktivita peroxidázy, v reakci na zvyšující se koncentraci ROS (Reactive Oxygen Species), kvůli okolní teplotě vzrostla (El-Awady et al. 2014). Vaughn et al. za použití headspace koncentrace 1,6x10⁻³ mol.l⁻¹ citralu uvedl, že došlo pouze ke zčernání konců klíčků (Vaughn et al. 1991).

- Citronelal

Citronelal je monoterpenický acyklický aldehyd vyskytující se ve dvou enantiomerech (3)-(\pm)-citronelal a voní po citronu. V silici eukalyptu (*Eucalyptus citodora*) se vyskytuje ze 70-80 %. Většinou je však hlavní komponentou silice citronely (29,7-35,5 %), nebo meduňky lékařské (*Mellisa officinalis*) konkrétně 39 %. Synteticky může vznikat kyselou hydrolyzou citralu.

- β -Citronelol

Citronelol je monoterpenický acyklický alkohol vyskytující se ve dvou izomerech. (S)-(-)- β -citronelol voní po růžích a (R)-(+)- β -citronelol voní po citronech (Dvořáková et al. 2011).

Vyskytuje se v *Rosa damascena* ze 46,7 %, v geranii (*Pelargonium graveolens*) je 38 %, v citronelle (*Cymbopogon nardus L.*) je 4,6-10,7 % (Baser et al. 2009).

El-Awady Aml uvedl 100 % inhibici po 30 min máčení hlíz ve 4,6 a 8 mmol.l⁻¹ koncentraci L-citronelolu, 97 % u D-linalolu (El-Awady Aml et al. 2014). Vaughn za použití headspace koncentrace 1,6x10⁻³ mol.l⁻¹ citronelolu uvedl, že došlo pouze ke zčernání konců klíčků (Vaughn et al. 1991).

- Citronelyl propionát

Citronelyl propionát je citronelyl-ester kyseliny propionové, vyskytuje se ve dvou isomerech (3R)-(\pm)- β - citronelyl propionát. Voní směsnou vůní po růžích, květinách, vosku a ovoci. Nacházíme jej v minoritních koncentracích v rajčatech, v tymiánu (*Thymus vulgaris*) 0,06 %, v geranii 0-0,25 %, v Khelle (*Ammi visnaga*) 1,2-2,9 % (Tisserand et al. 2014).

- Lemongrass

Listy citronové trávy (*Cymbopogon citratus*) obsahují 65-80 % citralu a 9,73 % myrcenu (Chanthai et al. 2012).

Shukla et al. distribuovali koncentraci 200 μ l silice lemongrass pomocí fumigace v exsikátoru za pokojové teploty (25 \pm 2 °C) na celkovou dobu 28 dní. Autor uvádí podporující účinek lemongrass na klíčení i na samotnou délku klíčku, konkrétně 99 \pm 2,08% klíčivosti oproti kontrole s hodnotami 99 \pm 2,6% klíčivosti (Shukla et al. 2019).

- Citronela

Listy citronely či voňatky cejlonské (*Cymbopogon nardus L.*) obsahují 24,2-35,7 % geraniolu, 29,7-35,5 % citronelalu, 22,7 % trans -citralu, 14,2 % cis-citralu, 9,7 % geranyl acetátu, 5,8 % kotronelalu a 4,6-10,7 % citronelolu (Nakahara et al. 2013)(Koba et al. 2008).

Jia et al. aplikovali citronelovou silici (CEO-citronela essential oil) pomocí fumigace v koncentraci 30 μ l/l po dobu 10 dní při teplotě 25 \pm 2 °C a 90 % vlhkosti. Následně byly uskladněny na 90 dní za teploty 10 °C pro jednorázové dávkování, ve dvoufázovém byly

ošetřeny po 35 dnech. Klíčení po 90 dnech bylo u kontroly stanoveno na 95.40 %, u jednorázového ošetření na 62.09 % u dvoufázového na 47.75 %. Jia tedy konstatuje schopnost CEO zpomalit nástup klíčení bramborových hlíz (Jia et al. 2019).

- *Litsea cubeba*

Silice bobulí vavřínu kubébového (*Litsea cubeba*) obsahuje 60-92,6 % citralu (51,9 % geranialu, 40,7 % neralu) 2,8 % linalolu, 1,5 % metylheptanonu a 0,2 % limonenu (Gogoi et al. 1997).

Inhibiční účinky jsou zajištěny majoritním podílem citralu (viz 4.2.1.5).

- Vanilin

Vanilin je cyklický aromatický aldehyd vyskytující se v silici vanilky (*Vanilla plantifolia*) z 85-90%, nalezneme ho i v jasmínu velkokvětém (*Jasminum grandifolium*), 0,24-0,34 % v Cabreúvě (*Myrcarpus frondosus*) a orlářce drahocenné (*Aquilaria malaccensis*) (Baser et al. 2009).

Vaughn et al. popsal účinek vanilinu podporující klíčení, aplikován byl na filtrační papír v množství 1 ml, umístěný do baňky s hlízami skladovanými při 25 °C s 95 % vlhkostí, po dobu 14 dní. Již po 7 dnech klíčily hlízy z 87 % s výskytem infekce na povrchu. Překvapivě si však hlízy zachovaly svou pevnou strukturu (Vaughn et al. 1993). Beveridge et al. měřil délku klíčků na hlízách skladovaných 14 dní při teplotě 10 °C, ošetřených vanilinem o koncentraci 20, 100, 500 mg/kg. Kontrola měla klíčky dlouhé 154,4 mm, hlízy ošetřené vanilinem měli klíčky dlouhé 135,9;148,1;146,8 mm (resp. 20,100,500 mg/kg). Inhibiční účinek vanilinu byl tedy velmi slabý (Beveridge et al. 1981).

- Eugenol

Eugenol je odvozen od fenylypropanu, vyskytuje se ve formě 4 izomerů eugenol, o-eugenol, metoxyfenol a chavibetol. Obsažen je v silici získávané z listů, stonku nebo pupenů hřebíčkovce kořeného (*Syzygium aromaticum*) kde je 70-90 %, v listech skořicovníku cejlonského (*Cinnamomum zeylanicum*) je 74,9-88,7 %, v bazalce pravé (*Ocimum basilicum*) je 0,3-33 % a v bazalce posvátné (*Ocimum sanctum*) je 52,2-60,3 % (Baser et al. 2009).

Finger et al. uvádí slabší inhibiční efekt za použití eugenolu o koncentraci 100 mg/kg brambor vedoucí k 88,8 % klíčivosti oproti kontrole s hodnotou 92,9 % klíčivosti (Finger et al. 2018). Ve studii Afify et al. hodnotili kromě dalších parametrů aktivitu enzymu α -amylázy. Tento enzym se zvyšuje během klíčení, což následně vede k degradaci škrobu. Eugenol prokázal snížení aktivity α -amylázy při koncentraci 300 mg/kg č.h. na hodnotu $152,8 \pm 1,41$ U/100 mg hlíz, oproti kontrole s hodnotou $90,8 \pm 0,63$ U/100 mg hlíz. Jednotka U vyjadřuje množství přeměněného substrátu (škrobu) za daný čas ($\mu\text{mol}/\text{min}$) testované na 100 mg brambor. Paradoxně aplikace izolovaného eugenolu byla efektivnější než hřebíčkové silice (Afify et al. 2012). Shukla et al. naopak uvádí podporující účinek silice získané z *Syzygium aromaticum* o koncentraci 200 μl a hodnotami klíčení $99 \pm 2,6$ % oproti hodnotě klíčení kontroly $98 \pm 2,6$ % (Shukla et al. 2019).

- trans-Cinamaldehyd

Cinamaldehyd se přirozeně vyskytuje ve formě isomeru *trans*-cinamaldehyd neboli (E)-cinamaldehyd. Nejhojněji se vyskytuje v kůře skořicovníků např. s cejlonského (*Cinnamomum zeylanicum*), kde představuje 60-70 % silice a propůjčuje skořici svou typickou vůni (Ashakirin et al. 2018).

Vaughn et al. podrobili brambory 2 různým typům aplikace čistého cinamaldehydu (99 %). V 1. případě aplikace 1 ml substance na filtrační papír umístěný do baňky s hlízami,

skladovaných 7 dní při 25 °C, očka nezačaly klíčit ani po následném 14denním skladování, při zachování pevné struktury hlíz. V 2. případě byl cinamaldehyd aplikován sprejováním jednotlivých hlíz v množství 0,1-0,2 ml uskladněných 14 dní při 25 °C a 95 % relativní vlhkosti. Došlo též k 100 % inhibici klíčení s lehce měkčí strukturou hlíz (Vaughn et al. 1993).

- Geranyl acetát

Geranyl acetát je monoterpenický acyklický ester, ve voňatce martinově (*Palmarosa*; *Cymbopogon martinii*) představuje 4,3-14,8 % silice (Wolffenbittel et al. 2015). V koriandru (*Coriandrum sativum*) tvoří 1,9 % silice.

El-Awady Aml uvádí 95% potlačení klíčení geranyl acetátem po 30 min máčení hlíz v koncentraci 4, 6 a 8 mmol.l⁻¹ (El-Awady Aml et al. 2014). Kompletní inhibici klíčení popsali i Shukla et al. za použití silice z *Palmarosy* o koncentraci 200 µl (Shukla et al. 2019).

- Geranie

Silice geranie resp. pelargonie vonné (*Pelargonium graveolens*) obsahuje 38 % citronelolu, 16 % geraniolu, 10,4 % představuje citronelyl-formát, 6,5 % linalol, 5,6 % isomenton, 3,8 % geranyl-formát a 2,2 % isomenton (Gallardo et al. 2012). Silice voní po růžích. Geraniol je majoritně zastoupen v *Cymbopogon winteranus* Jowit (12-25 %) (Baser et al. 2009).

El-Awady Aml uvádí kompletní inhibici při koncentraci 6 a 8 mmol.l⁻¹ geraniolu, na brambory uskladněné 4 měsíce za venkovních teplot (35/15 °C-den/noc). V porovnání s kontrolou měl geraniol nižší hladiny redukcujících cukrů, aminokyselin a aktivita peroxidázy, v reakci na zvyšující se koncentraci ROS (Reactive Oxygen Species) kvůli okolní teplotě vzrostla (El-Awady Aml et al. 2014). Vaughn naopak za headspace koncentrace 1,2x10⁻³ mol.l⁻¹ geraniolu nepozoroval znatelný efekt, resp. žádný (Vaughn et al. 1991).

- Linalol

Linalol je monoterpenický acyklický alkohol vyskytující se jako dva enantiomery likareol neboli ®-(-)-linalol a koriandrol či (S)-(+)-linalol. S-linalol je hlavní složkou (60-80 %) silic v semenech koriandru setého (*Coriandrum sativum*) (Mandal et al. 2015). Vyskytuje se ve voňatce martinově (*Palmarosa* ; *Cymbopogon martinii*), kde představuje 0,8-2 % silice a je nositelem pomerančové vůně, kdy v pomerančovníku čínském (*Citrus sinensis Osbeck*) tvoří až 76-99 % silice (Wolffenbittel et al. 2015). Levandule (*Lavandula angustifolia*) obsahuje ve své silici 22,35 % R-linalolu, který voní právě po ní (Djamel et al. 2012).

Gómez-Castillo et al. ve své studii prezentovali inhibiční účinek koriandrové silice v koncentraci 230 µl/l, souběžně s kontrolou bez ošetření a CIPC jako standardu. Brambory ošetřené silicí začaly klíčit až na konci skladovacího období tedy po 55. a 70. dni pro obě odrůdy, podobně jako CIPC (Gómez-Castillo et al. 2013). Vokou et al. testovali účinnost levandulové silice na bramborách uskladněných 5 týdnů. Klíčení inhibovala koncentrace 0,1 ml/kg č.h., při koncentraci 1 ml/kg č.h. klíčky černaly až vadly (Vokou et al. 1993). Vaughn potvrzuje zčernání a nekrózu klíčků při koncentraci 0,23 mg/l linalolu, ale poukazuje na měkčí texturu hlíz (Vaughn et al. 1991). Opačné výsledky byly odprezentovány El-Awady Aml et al., zaznamenávající 96-100 % klíčivost a 2 % ztrátu hmotnosti hlíz při koncentraci 4, 6 a 8 mmol.l⁻¹ linalolu (El-Awady Aml et al. 2014).

- α-Bisabolol

α-bisabolol či levomenol je nejjednodušší cyklický seskviterpenický alkohol, v přírodě se může vyskytovat až ve 4 stereoisomerech ((±)-α-bisabolol, (±)-(epi)-α-bisabolol). Hojně je v silici keřovitého stromu *Myoporum crassifolium* (65,1 %, (-)-(epi)-α-bisabololu), vyskytuje se též v heřmánku pravém (*Matricaria recutita*) 68,8 %, v levanduli lékařské (*Lavandula*

angustifolia) 3-13,1 %, v rozmarýnu lékařském (*Rosmarinus officinalis*) 0,3 %, v listech bedrníku šedavého (*Pimpinella cumbrae*) 53 %, ve stonku a plodech 39 %, v šalvěži (*Salvia runcinata*) 50-90 %, ve dřevě Candeia (*Eremantus erythropappus*) 85 %, *Vavillosmopsis erythropappa* 27,33 % (Baser et al. 2009).

4.2.2 Metody získávání silic z rostlin

Silice jsou získávány z různých částí rostliny – květ, listy, stonek, plody apod. Nejčastěji využívanou metodou je destilace vodní parou, nebo hydrodestilace. K nejstarším metodám řadíme enfleuráž a lisování za studena. Z novodobějších technik je pak využívána extrakce v různých modifikacích např. superkritická fluidní extrakce (SFE), mikrovlně asistovaná (MAE), ultrazvukově asistovaná extrakce (UAE) nebo extrakce rozpouštědlem za zvýšeného tlaku a teploty (PSE).

Destilace rozděluje látky na základě rozdílných bodů varu. Silice jsou uvolňovány z olejových buněk rostlin do plynné fáze vlivem zvýšeného tlaku vznikajícího rostoucí teplotou. Rostlinný materiál může být ponořen do vroucí vody (hydrodestilace), nebo umístěn v proudu páry. Destilace vodní parou je nejčastěji využívána pro látky s vyšší těkavostí, ve vodě méně rozpustné. Nevýhodou destilace je případná degradace termolabilních vonných látek, tento způsob poskytuje však dostačující kvalitu produktu pro potravinářský průmysl (Baser et al. 2009).

Enfleuráž neboli extrakce tuky může naopak zajistit výtěžek silic těžko ze směsi izolovatelných, nebo termolabilních. Nejčastěji se jedná o květy rostlin (např. jasmínové silice). Princip spočívá v zachytu vonných látek v tuku za studena nebo macerací horkým tukem za tepla. Při prvním způsobu se zpravidla používá bezpachové vepřové sádlo, které pohlcuje aroma z květů. Po jeho nasycení a vzniku tzv. pomády následuje výluh etanolem, vymrazení a přefiltrování. Při maceraci za tepla může teplota dosahovat až 500 °C, avšak i přes toto urychlení je enfleuráž zdlouhavá a nákladná metoda, produkující kvalitní a čistou silici vhodnou pro parfumérský, nikoli však potravinářský průmysl (Voldřich 2009).

Lisováním za studena se získávají silice z citrusových plodů. Celý proces byl prováděn ručně a s velkými ztrátami oleje, což vedlo k mechanizaci. Pro tento účel je v dnešní době hojně využívaným zařízením FMC extraktor, produkující ovocnou šťávu i silice z kůry citrusů zároveň (Baser et al. 2009).

Extrakce rozpouštědlem je další konvenční metodou pro tepelně nestabilní látky. Organická rozpouštědla, jako hexan, petrolether nebo benzen, jsou silicí absorbována a následně odpařena v extraktoru. Vzniklý produkt se nazývá konkrét neboli konkrétní silice, obsahující kromě vonných látek také balastní látky ve formě vosků. Pro získání tzv. absolutní silice je konkrét rozpuštěn v etanolu, několikrát přefiltrován, zchlazen pro separaci vosků a nakonec odpařen. Během procesu jsou používány nižší teploty než u destilace zabraňující vzniku nežádoucích sloučenin a rozkladu termolabilních látek. Čistota silice není vzhledem k přítomnosti zbytkového rozpouštědla vysoká, ale díky rychlosti a nízké ceně je tato metoda využívána pro potravinářství i parfumerství (Preedy 2015).

Pro vyšší výtěžnost, menší ztráty a kratší dobu separace jsou využívány modifikované formy extrakce jako SFE, PSE, MAE a mnoho dalších. Upravován je nejčastěji tlak

(SFE-7,38 MPa, PSE- 10-15 MPa), teplota (SFE-31 °C, PSE-50-200 °C), resp. zdroj vlnění-mikrovlny (300 MHz), ultrazvuk či rozpouštědlo (SFE-CO₂).

Tyto metody jsou využívány pro získávání silic z pevných matric např. koření – kmín, anýz, fenykl skořice (Vrtílek 2011).

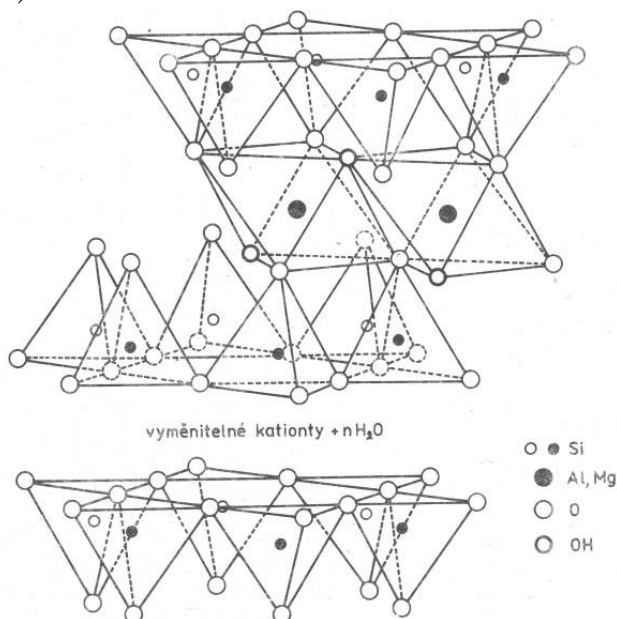
4.3 Jílové nanočástice

Jíl je přírodní materiál skládající se především z jemných zrnitých minerálů. Díky velikosti částic menších než 4 μm získává jíl unikátní charakteristické vlastnosti. Za přítomnosti vody je plastický a při vypalování či sušení mění svou strukturu a tvrdne.

Jílové minerály vznikají chemickým rozkladem primárních silikátů při hydrotermálních procesech. Vzniká zemina s majoritně zastoupenými fylosilikáty (silikáty s vrstvenou strukturou) a minoritním obsahem dalších minerálů (alofámů, křemene, živce, zeolitu) a organické hmoty (Weiss et al. 2008).

Vrstevnatá struktura fylosilikátů je tvořena dvěma typy koordinačních polyedrů a sice tetraedry (čtyřstěny) a oktaedry (osmistěny). Přerušované nenasycené vazby umožňují substituci a sorpci iontů i vody. Konkrétně je v centrální pozici u tetraedrů substituován Si⁴⁺ za Al³⁺, k tomu však nedochází více jak v 50 %, s výjimkou struktury slídy. U oktaedrů může rozsah substituce dosahovat až 100 %, vyměňovány jsou kationty Al³⁺ za Fe³⁺ a Mg²⁺. V mezivrstevném prostoru se nejčastěji vyskytují kationty Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺ společně s molekulami vody, které vytvářejí jejich hydratační obaly. Rozsah substituce a druh vyměnitelných iontů v mezivrstevném prostoru určuje vlastnosti smektitu (Weiss et al. 2008).

Skupina smektitů je tvořena dvěma tetraedrickými sítěmi a jednou sítí oktaedrickou. Patří sem montmorillonit a bentonit, použitý v praktické části této práce. Jednou z dalších často využívaných skupin jílových minerálů jsou serpentiny, zahrnující kaolinit, hectorit a halloysit (Merck 2020).



Obrázek 1 Hydratované vyměnitelné ionty ve vrstvě smektitu. (Kühn et al. 1984)

4.3.1 Bentonit

Hornina bentonit je směsná látka křemičitanu hlinitého s převahou jílového minerálu montmorillonitu. Obsah montmorillonitu kolísající mezi 40-90 % podle místa naleziště, propůjčuje bentonitu jeho specifické vlastnosti. Mezi ně patří především vysoká schopnost sorpce a iontové výměny, bobtnavost při kontaktu s vodou, plastičnost a vaznost (Weiss et al. 2008).

Stupeň hydratace montmorillonitu je závislý na přítomnosti vyměnitelných iontů v mezivrství. V přírodních bentonitech se vyskytují hlavně dvojmocné kationty vápníku a hořčíku. Jejich stabilita je zajištěna dvouvrstvou molekuly vody, která se zvyšujícím se stupněm vlhkosti zůstává prakticky bez rozšíření (max. 1,55 nm). Naopak je tomu u Na typu montmorillonitu, který postupným rozšiřováním mezivrstvy nad 4 nm dosáhne kompletní disociace (delaminace, exfoliace). Objem přijaté vody do daného stadia je tím prakticky neomezený. Po delaminaci jsou odhaleny vnitřní destičky původního mezivrství pokryté vyměnitelnými ionty, které jsou nyní zpřístupněné. Nově vzniklý povrch dosahuje velkých rozměrů (800 m²/g montmorillonitu) využitelných právě jako ideální plnivo v nanokompozitních materiálech (Weiss et al. 2008). Celkové složení iontů, jejich substituce a negativní náboj pak určuje výměnnou kapacitu minerálu (Konta 1983). Označuje se CEC (Cation Exchange Capacity) a pro montmorillonit má též vysokou hodnotu 80-129 mmol/100 g minerálu (Meunier 2005).

4.4 Enkapsulace

Enkapsulace je definována jako technologie balení pevných látek, kapalin, nebo plyných materiálů do uzavřených kapslí, které svůj obsah mohou uvolňovat za definovaných a kontrolovaných podmínek. Připravované částice mohou mít průměr od několika nm až po mm. V potravinářství se této technologii využívá již přes 60 let, usnadňuje manipulaci s enkapsulovaným materiálem, který je zároveň chráněn před nepříznivým vlivem okolního prostředí (teplota, vlhkost, vzduch, světlo) (Nedovic et al. 2011).

Nespornou výhodou této metody je možnost pozvolného nebo cíleného uvolňování, díky kterému je snížena potřeba aditiv a konzervačních látek. Řízené uvolňování lze definovat jako metodu, při které je jedna nebo více účinných látek k dispozici v požadovaném čase, místě a koncentraci, dávkovány požadovanou rychlostí. Pro uvolnění enkapsulovaných složek lze, v závislosti na účelu použití, měnit pH, mechanické napětí, teplotu, čas osmotické síly nebo enzymatickou aktivitu. Pro potravinářské účely lze enkapsulaci využít k maskování nepříjemné chuti, pozvolnému uvolňování těkavých látek, aroma nebo oddělení ve směsi reagujících složek. Mechanismus uvolňování účinných látek z kapslí ovlivňuje jejich velikost, forma a složení (Nedovic et al. 2011).

Enkapsulace se řadí do imobilizačních metod společně s adsorpcí, iontovou, kovalentní, afinitní vazbou, cross-linking (zesítnění) nebo entrapment (zachycení v pórovité matici). Při samotném procesu je enkapsulovaná složka obalena částečně propustnou membránou, nejčastěji ve formě kapsle. Membrána umožňuje vstup okolního prostředí do nitra částice, avšak únik aktivní látky do okolí je omezen. Determinujícím faktorem metody je tedy velikost pórů membrány (Gorecka et al. 2011).

K průmyslové aplikaci enkapsulace se nejčastěji využívá sprejové sušení, používané např. pro výrobu mikrokapslí probiotických kultur ve formě suchého prášku (Dong et al. 2013). Pro enkapsulaci ve vodě rozpustných látek obalovaných lipidovou vrstvou se používá sprejového chlazení (Desai et al. 2005). Další metody enkapsulace jsou extruze pro snadno oxidovatelné látky, tvorba polymerických kapslí, emulgace, koacervace, lyofilizace pro uchování mikrobiálních buněk (Park et al. 2000). Fluidní vrstva a kokrytalizace byly původně využívány pro farmaceutický průmysl, dnes však slouží i potravinářům k enkapsulaci potravinářských aditiv (Rathore et al. 2013). Významná je též enkapsulace do liposomů, vhodná jak pro hydrofobní, tak hydrofilní látky. Využívána je k enkapsulaci peptidů, vitamínů, antioxidantů, enzymů a antibakteriálních látek typu lysozym (Laouini et al. 2012).

Všechny látky používané k enkapsulacím v potravinářském průmyslu musí být certifikovány pro použití v potravinářství a v USA úřadem FDA (American food and Drug Administration) zařazeny do skupiny „všeobecně považované za bezpečné“ (GRAS-Generally Recognised As Safe). V EU musí celkový proces splňovat bezpečnostní požadavky EFSA - Evropského úřadu pro bezpečnost (Nedovic et al. 2011).

5 Materiál a metodika

5.1 Brambory a jejich skladování

Pro účely experimentu této diplomové práce byly použity brambory odrůdy Adéla. Jedná se o konzumní ranou odrůdu varného typu AB, vhodné do salátů, příloh nebo restování. Hlízy jsou oválné, se sytě žlutou dužninou a středním obsahem škrobu.

Brambory byly před pokusem skladovány v chladícím zařízení při teplotě 4 °C, s relativní vlhkostí (RV) 90 % po dobu několika měsíců. Po ošetření brambor účinnými látkami byly hlízy skladovány za tmy ve sklepě, při teplotě 21 °C a RV 60 % po dobu 14 týdnů. Podmínky skladování měly co nejvěrohodněji simulovat domácí prostředí, ve kterém jsou brambory běžně skladovány.

5.2 Ošetření skladovaných brambor

K ošetření skladovaných brambor bylo použito 21 čistých látek a 8 silic od společnosti Biomedica nebo Sigma-Aldrich, jejich přehled naleznete v Tabulce č. 2. Na základě experimentů ve studiích (Čížková et al. 2000; Owolabi et al. 2010), bylo stanoveno množství účinné látky na 300 µl/l. Pro účel experimentu posloužily jako skladovací nádoby zavařovací sklenice o objemu 1 l. Pro zajištění výměny vzduchu ve sklenici s okolním prostředím, byly do víček vyvrtány 3 otvory o průměru 3 mm.

Způsob distribuce do prostředí skladovaných brambor pak vychází z publikovaného patentu (Marek et al. 2001). Inhibitor klíčení je absorbován anorganickým nosičem umístěným uvnitř skladovací nádoby v polopropustném obalu, který umožňuje postupnou desorpci během celého skladovacího období. V našem případě, byly na dno každé sklenice naváženy 3 g bentonitu (Nanoclay hydrophilic bentonite) od společnosti Sigma-Aldrich. Následovala enkapsulace 300 µl aktivní látky do nosiče a směs byla překryta filtračním papírem KA4. Hlízy tedy nebyly v přímém kontaktu s inhibitorem. Umístěním inhibitoru do prostoru s uskladněnými hlízy/sklenice je zajištěna kontinuální retardace klíčení bez nutnosti opakované aplikace během skladování.

Brambory byly rozříděny podle velikosti (60-200 g) a umístěny do sklenic tak, aby v každé byly zastoupeny všechny velikosti hlíz. Do sklenice s čistými látkami bylo navrstveno 8 hlíz, do sklenic se silicemi 6 hlíz. Pro čisté látky byly vyhotoveny tři opakování, pro silice pouze dvě. Vyhotovení pro silice mělo zmíněná omezení z důvodu pozdějšího založení pokusu, kdy byl počet brambor již omezený.

Kontrolní sklenice byly naplněny hlízy s bentonitem bez aktivní látky, následně vystavené stejným skladovacím podmínkám jako ošetřené brambory.

Tabulka 2 Čisté látky a silice

Typ látky	Název látky	Výrobce
Čisté látky	(-)-Karvon	Sigma-Aldrich
	Karvakrol	Sigma-Aldrich
	(1R)-(+)-Kafr	Sigma-Aldrich
	4-Terpineol	Sigma-Aldrich
	(±)Mentol	Sigma-Aldrich
	Cedrol	Sigma-Aldrich
	α-Felandren	Sigma-Aldrich
	α-Terpinen	Sigma-Aldrich
	p-Cymen	Sigma-Aldrich
	Anisol	Sigma-Aldrich
	(R)-(+)-Limonen	Sigma-Aldrich
	Citral	Sigma-Aldrich
	(±)-Citronelal	Sigma-Aldrich
	β-Citronelol	Sigma-Aldrich
	Citronelyl propionát	Sigma-Aldrich
	Vanilin	Sigma-Aldrich
	Eugenol	Sigma-Aldrich
	<i>trans</i> -Cinamaldehyd	Sigma-Aldrich
	Geranyl acetát	Sigma-Aldrich
	(-)-Linalol	Sigma-Aldrich
(-)-α-Bisabolol	Sigma-Aldrich	
Silice	Kmín	Biomedica
	Anýz	Biomedica
	Fenykl	Biomedica
	Lemongrass	Sigma-Aldrich
	Lemongrass	Biomedica
	Citronela	Biomedica
	<i>Litsea cubeba</i>	Biomedica
	Geranie	Biomedica

5.3 Hodnocení

Parametry měřené v tomto pokusu určovaly počet vyklíčených oček (GR), váhový úbytek (WL) a přítomnost houbové infekce h. i. na bramborových hlízách v jednotlivých sklenicích.

- Relativní rychlost klíčivosti (GR-Germination rate)

Pro získání hodnot relativní rychlosti klíčivosti byl použit následující vztah:

$$GR = n_0/n \cdot 100$$

Kde n_0 vyjadřuje počet vyklíčených oček na hlízách v jedné sklenici a n je nejvyšší počet vyklíčených oček u dané látky/silice z průběhu celého experimentu.

- Hmotnostní úbytek (WL-Weight loss)

Pro získání hodnot hmotnostního úbytku byl použit následující vztah:

$$\text{Weightloss (\%)} = (W_0 - W_n) / W_0 * 100$$

Kde W_0 vyjadřuje váhu hlíz v jedné sklenici, naměřenou první den uskladnění, zatímco W_n je váha hlíz, naměřená během skladovacího období. Konkrétně hmotnost zbylých hlíz při vyřazení sklenice z důvodu kompletní houbové infekce h. i.

- Přítomnost mikrobiálních patogenů

Mikrobiální kontaminace způsobovala infekci částí nebo celých hlíz. Výskyt hub byl pozorován po celém povrchu hlízy nebo jen na konečcích klíčků. Patogeny nebyly dále identifikovány, jelikož se tato práce zaměřuje na problematiku klíčení.

5.4 Průběh experimentu

Během pokusu byla měřena hmotnost, klíčivost a přítomnost mikrobiální kontaminace v každé sklenici zvlášť. Pro přehlednost jsou v Tabulce č. 3 uvedeny kontrolní body (k. b.) během skladovacího období (99 dnů/14 týdnů/3,5 měsíce). Pokus byl založen 4.7. 2019 s hlízami ošetřenými 21 čistými látkami. O pět dní později 9.7. 2019, byly doplněny vzorky s 8 silicemi. První tři kontrolní body měly mezi sebou 3-7denní odstup, další kontroly byly prováděny po 14 dnech až měsíci. Ke konci měření, kdy docházelo k masivnímu výskytu patogenů byly intervaly opět týdenní. Během kontroly měřených parametrů, byly vyřazovány hlízy z části nebo kompletně infikované.

Tabulka 3 Průběh experimentu

Založení pokusu	1.	Čisté látky 4.7. 2019 / silice 9.7 2019
Kontrolní body	2.	15.7. 2019
	3.	18.7. 2019
	4.	25.7. 2019
	5.	6.8.2019
	6.	12.8.2019
	7.	19.8.2019
	8.	20.9.2019
	9.	26.9.2019
	Ukončení pokusu	10.

6 Výsledky

6.1 Hodnocení sledovaných parametrů

Z důvodu houbové infekce byly mezi prvními vyřazeny hlízy ošetřené α -terpinenem, *trans*-cinamaldehydem, citronelyl propionátem, β -citronelolem, α -felandrenem, vanilinem, eugenolem, genaryl acetátem z čistých látek. Ze silic pak lemongrass firmy Biomedica, anýz a geranie.

Klíčivost i hmotnostní úbytek byly díky vyřazení výše zmíněných látek vyjádřeny pouze pro skladovací období během kterého nebyly infikovány.

Přítomnost mikrobiální aktivity na povrchu hlíz byla klíčová pro jejich vyřazení, avšak pokud byla lokalizována pouze na klíčcích, byla zaznamenána do výsledků a hlízy byly opět uskladněny.

Jak již bylo řečeno, interval mezi prvními kontrolními body byl 3-7 dní, díky takto krátkému rozestupu byla zjištěna účinnost látek a silic především na změnu hmotnosti, která byla minimální. Proto byly další kontroly prováděny se 14denním až měsíčním odstupem, abychom pozorovali významnější změny.

6.1.1 Klíčení

Klíčení jednotlivých hlíz vyjádřené pomocí GR bylo hodnoceno z průměrných hodnot se směrodatnou odchylkou (SD), získaných ze tří opakování pro čisté látky a ze dvou opakování pro silice. Hodnoty klíčení v kontrolních bodech pro jednotlivé látky/silice jsou uvedeny v Tabulce č. 4.

Hodnota průměrné klíčovosti uvedená v předposledním sloupci Tabulky č. 4 naznačuje nejvýznamnější inhibici klíčení díky mentolu a silici kmínu (0 ± 0 %; $0,52 \pm 1,38$ %). Významnou inhibici zaznamenáváme též u karvonu s hodnotami klíčovosti $2,78 \pm 7,35$ %, 4-terpineolu s $2,85 \pm 7,54$ %, kafru $4,54 \pm 8,35$ % a silice citronely $4,46 \pm 11,81$ %. Hranici klíčovosti 10 % nepřesáhl ani linalol s hodnotou $5,7 \pm 10,20$ % a citronelal s $6,66 \pm 16,75$ %. Naopak nejslabší inhibiční účinek vykazovala silice geranie s klíčovostí $86,36 \pm 6,43$ %, podobně citronelyl propionát s $83,3 \pm 2,08$ %, kdy z důvodu infekce byla obě měření vyřazena již ve 5. k. b. Vysokou hodnotu klíčovosti měly také hlízy ošetřené α -bisabololem ($82,81 \pm 8,87$ %), nicméně vydržely až do 9. k. b. Hodnota klíčovosti Kontroly byla $71,81 \pm 4,88$ %.

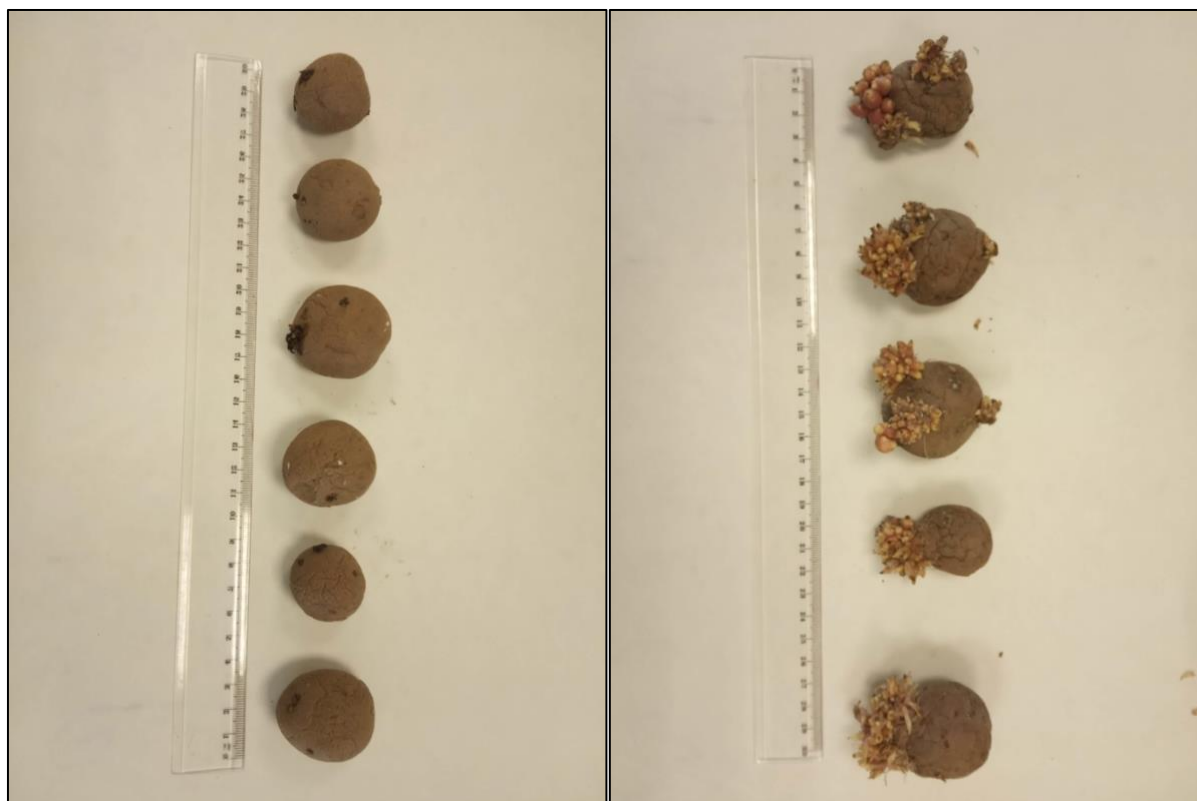
Tabulka 4 Přehled klíčivosti hlíz v průběhu experimentu vyjádřený pomocí Germination rate %

LÁTKA	15.čvc	25.čvc	06.srp	12.srp	19.srp	20.zář	26.zář	11.říj	průměr
(R)-(+)-Limonen	38,89	53,97	75,93	82,54	85,32	85,71	83,33		72,24 ± 17,08
(-)-Linalol	28,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	17,54	5,70 ± 10,22
Citral	29,37	26,32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	25,93	10,20 ± 13,20
(±)-Cintronelal	51,19	0,00	0,00	0,00	0,00	2,38	2,08	0,00	6,96 ± 1 6,75
α - Terpinen	36,08	87,71							61,90 ± 25,82
Karvakrol	44,55	20,20	0,00	18,18	56,08	16,67	11,11	0,00	20,85 ± 18,68
trans-Cinamaldehyd	36,11	39,44	70,00	28,33	70,83	32,50	35,00		44,60 ± 16,63
Anisol	87,92	73,49	79,58	59,21	59,21	77,24	100,00		76,66 ± 13,62
(-)-α-Bisabolol	95,56	68,85	90,00	73,29	79,21	83,90	88,89		82,81 ± 8,87
Citronellyl propionát	81,25	85,42							83,33 ± 2,08
Cedrol	79,89	69,48	80,56	69,48	77,41	74,24	79,17		75,75 ± 4,40
4-Terpineol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	22,81	2,85 ± 7,54
(-)-Karvon	0,00	0,00	22,22	0,00	0,00	0,00	0,00	0	2,78 ± 7,35
(1R)-(+)-Kafr	0,00	0,00	0,00	23,81	0,00	0,00	0,00	12,5	4,54 ± 8,35
Mentol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0,00 ± 0,00
β-Citronelol	93,75	42,26							68,01 ± 25,74
α- Felandren	33,33	66,57	100,00	73,68	73,68	68,42	78,95		70,66 ± 18,37
Vanilin	61,62	86,27	89,29	81,09	83,40	78,15	76,47		79,47 ± 8,37
Eugenol	67,58	61,10	73,21	48,81	78,21	59,05	66,67		64,95 ± 8,98
p-Cymen	24,06	65,79	96,28						62,05 ± 29,60
Genaryl acetát	45,32	71,90	66,67	73,33	66,67	64,71	76,47		66,44 ± 9,47
Kontrola	74,68	69,63	81,96	67,97	65,87	71,52	71,01		71,81 ± 4,88
SILICE									
Lemongrass-BioMed	39,74	0,00	76,92	0,00	38,46				31,03 ± 28,85
Citronela	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	35,71	4,46 ± 11,81
Lemongrass – Sigma-Al.	54,55	0,00	30,00	0,00	0,00	0,00	0,00	81,82	20,80 ± 29,81
Kmín	4,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,52 ± 1,38
<i>Litsea cubeba</i>	45,83	0,00	37,50	0,00	0,00	4,17	4,17	45,83	17,19 ± 20,25
Anýz	100,00	40,95	77,78	55,56	0,00	11,11	0,00	0	35,67 ± 36,67
Geranie	81,82	95,45	81,82						86,36 ± 6,43
Fenykl	46,88	21,25	0,00	34,38	0,00	0,00	0,00		14,64 ± 18,24

Klíčky hlíz ošetřených mentolem zčernaly prakticky hned po aplikaci a již v 2. k. b. byly kompletně černé. Během celého měření nedošlo k jejich regeneraci a množství vyklíčených oček bylo v 10. k. b. stejné, nebo nižší než na začátku. Houbová infekce se na klíčcích začala objevovat při 9. k. b. a v 10. k. b. byly postiženy 3 hlízy u I. opakování.

Působení kmínové silice se oproti mentolu projevilo postupně, jelikož při 2. k. b. bylo u I. opakování černých 11 z 12 oček. Jinak byl průběh měření obdobný jako u mentolu. Infekce klíčky postihla při 8. k. b. a vyřazeny byly celkem 2 hlízy u I. opakování.

Hlízy ošetřené karvonem měly klíčky černé taktéž v 2. k. b., kde se u III. opakování navíc vyskytla infekce. V dalších k. b. byla však eliminována a znovu se na klíčcích objevila až při 8. k. b. Počet vyklíčených oček během měření klesal u všech tří opakování. Na Obrázku č. 2 můžeme porovnat hlízy ošetřené karvonem s kontrolou v 9. k. b.



Obrázek 2: Hlízy ošetřené karvonem (vlevo) a kontrola bez ošetření v 9. k. b. (vpravo) (foto Ing. Matěj Božik, MSc, Ph.D.)

Podobně klesalo množství vyklíčených oček u hlíz ošetřených 4-terpinoelem, které byly infikovány až v posledním k. b. Ke zčernání klíčků došlo také ihned po aplikaci v 2. k. b. Inhibice kafrem způsobila zčernání též v 2. k. b., nicméně stejně jako u karvonu se vyskytla h. i., která byla v dalších k. b. eliminována a znovu se objevila až v 6. k. b. Počet vyklíčených oček kolísal, což pozorujeme i u silice citronely, která způsobila zčernání též v 2. k. b., a klíčky byly infikovány až v 8. k. b.

V případě I. opakování u geranie pozorujeme nejprve zčernání několika klíčků v 2. k. b. a v 3. k. b. již dochází k výskytu h. i. U druhého zplesnivěly hlízy hned u 2. k. b. a naopak u 3. k. b. klíčky zčernaly a bylo pozorováno zachování pevné struktury slupky a neseschnutí hlíz. Počet vyklíčených oček kolísal, spíše klesal kolem původní hodnoty a sklenice byly vyřazeny v 5. k. b. Podobně hlízy ošetřené citronelyl propionátem byly vyřazené též v 5. k.b., počet vyklíčených oček klesal a h. i. se na klíčcích objevila hned v 2. k. b. Do 9.k. b. vydržely hlízy ošetřené α -bisabololem, nicméně klíčky byly postiženy viditelnou h. i. již ve 2. k.b. a kompletně byly infokovány při 3. k. b. Počet vyklíčených oček výrazně narostl již ve 2. k. b. u I. a II. opakování, u třetího klesal po celou dobu měření.

6.1.2 Hmotnostní úbytek brambor během skladování

Hodnoty procentuálního úbytku hmotnosti pro skladovací období, lišící se konečnými daty pro každou čistou látku/silici zvlášť, jsou uvedeny v Tabulce č. 5 Jedná se o dobu od uskladnění, až po vyřazení vzorku z měření. U čistých látek byla pro tři opakování stanovena průměrná hodnota hmotnostního úbytku se směrodatnou odchylkou. Pro silice, pokud se doba ukončení lišila, byly uvedeny původní nezprůměrované hodnoty. Při 9. k. b. došlo k nárůstu hmotnosti, způsobeným pravděpodobně absorpcí zvýšené vnější vzdušné vlhkosti bentonitem. Zároveň byla vyřazena kontrola, jelikož byly všechny hlízy kompletně infikovány. Při 10. k. b. hmotnost opět poklesla. Díky této skutečnosti byl hmotnostní úbytek vypočten z hodnot naměřených v 1. a 8. kontrolním bodě jako W_0 a W_n .

Tabulka 5 Přehled hmotnostního úbytku hlíz WL % pro použité látky

Č.LÁTKA	Weight Loss %			
	6.srpen	12. srpen	20. září	
(R)-(+)-Limonen			5,72 ± 2,44	
(-)-Linalol			5,47 ± 0,15	
Citral			8,43 ± 3,63	
(±)-Cintronelal			5,85 ± 0,11	
α -Terpinen	1,96 ± 0,13			
Karvakrol			10,55 ± 3,44	
<i>trans</i> -Cinnamaldehyd			14,50 ± 13,64	
Anisol			4,51 ± 1,91	
(-)- α -Bisabolol			8,85 ± 2,43	
Citronelyl propionát	5,87 ± 5,26			
Cedrol			8,24 ± 0,18	
4-Terpineol			5,55 ± 0,19	
(-)-Karvon			8,34 ± 3,02	
(1R)-(+)-Kafr			17,92 ± 17,20	
Mentol			13,96 ± 11,26	
β -Citronelol	2,27 ± 0,39			
α -Felandren	3,97 ± 2,75			
Vanilin			11,06 ± 8,89	
Eugenol			14,61 ± 14,28	
p-Cymen		2,20 ± 0,12		
Genaryl acetát	4,20 ± 2,98			
Kontrola			8,12 ± 1,75	
SILICE	6.srpen	12.srpen	20.září	průměr
Lemongrass-BioMed	27,06		1,44	14,25 ± 12,81
Citronela			10,35	10,35 ± 1,30
Lemongrass-S.-A.		1,75	4,46	3,10 ± 1,36
Kmín		4,99	5,66	5,33 ± 0,33
<i>Litsea cubeba</i>			33,05	33,05 ± 27,51
Anýz	53,66		1,43	27,55 ± 26,12
Geranie	1,56	7,92		4,74 ± 3,18
Fenykl		1,84	55,44	28,64 ± 26,80

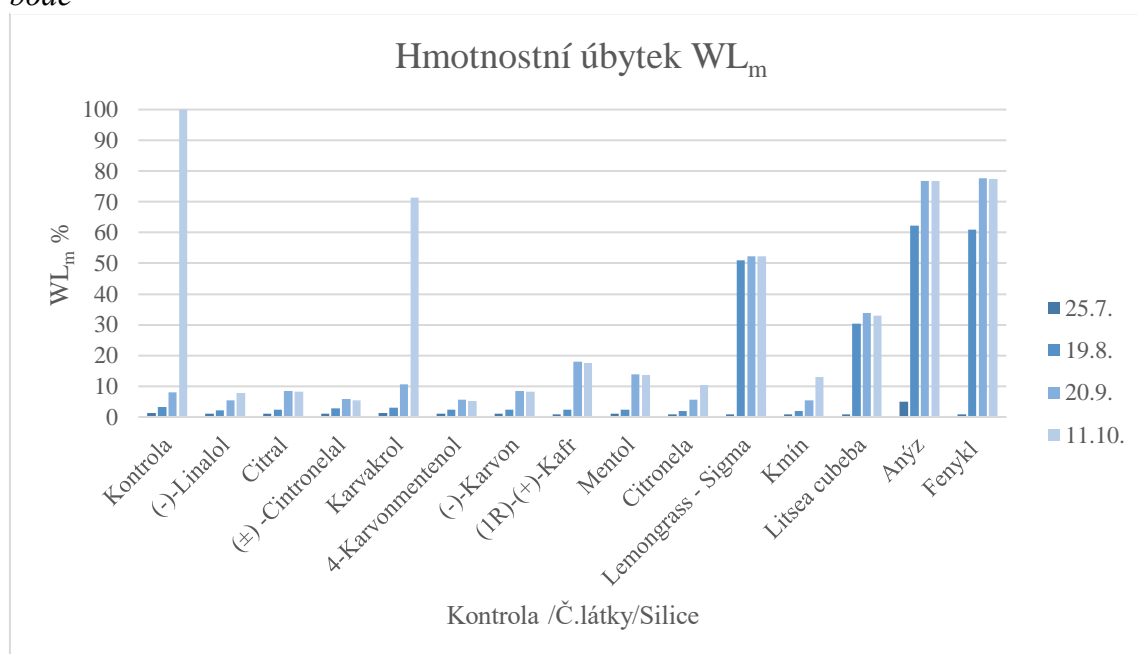
Postupný nárůst hmotnostních ztrát můžeme pozorovat u všech látek a silic. Kompletní přehled hmotnostních ztrát všech látek je možné shlédnout v Přílohách (Graf č. 1). Pro znázornění jsou v grafu č.1 uvedeny látky/silice, které hlízy udržely po celou dobu experimentu, tedy 3,5 měsíce bez viditelného výskytu infekce. Můžeme tak porovnat průměrný hmotnostní úbytek nejúčinnějších čistých látek a silic, jejichž nárůst byl výrazně větší. Hodnoty WL jsou zde ovšem poněkud zkresleny a slouží jen k porovnání hmotnostních ztrát u všech látek během celého experimentu. Hmotnostní ztráta po absenci jednoho či více opakování byla započtena jako 100 % WL, tím zajistila nárůst celkového hm. úbytku u konkrétní látky/silice. Pro přehlednost je označena WL_m. Podle zmíněného přepočtu byl výrazný úbytek z čistých

látek zaznamenán u karvakrolu (WL_m 71,34 %), z důvodů vyřazení I. a II. opakování v 9. k. b. U silic vykazoval významné ztráty často jen jeden ze vzorků. Konkrétně silice lemongrass firmy

BioMed s hodnotami 27,06 % WL pro I. a 1,44 % WL pro II. opakování, podobně anýzová silice s 53,66 % WL pro I. a 1,43 % WL pro II. opakování a silice fenyklu s 1,84 % WL u I. a 55,44 % WL u II. opakování. Vysoké průměrné hodnoty pozorujeme např. u silice *Litsea cubeba* konkrétně $33,05 \pm 27,51$ % WL. Nejmenší ztráty hmotnosti hlíz, které vydrželi do 8 k. b. pozorujeme u ošetření anisolem (WL $4,51 \pm 1,91$ %) a silicí lemongrass Sigma-Aldrich (WL $3,10 \pm 1,36$ %). Hmotnostní úbytek kontroly byl WL $8,12 \pm 1,75$ % .

6.1.3 Výskyt houbové infekce h. i.

Graf 1: Hmotnostní úbytek nejúčinnějších látek/silic WL_m v 4., 7., 8. a 10. kontrolním bodě



Výskyt h. i. u hlíz ošetřených nejsilnějšími a nejslabšími inhibitory v rámci našeho experimentu je uvedena spolu s ostatními hodnocenými parametry výše. V této sekci bych chtěla poukázat na inhibitory, jejichž aplikace způsobila výskyt hub v krátkém časovém horizontu, ve velkém množství. V 2. k. b. byly infikovány všechny klíčky hlíz ošetřených anisolem, citronelyl propionátem, α -terpinenem, α -bisabololem, α -felandrenem, silicí lemongrass Sigma-Aldrich a silicí geranie. Přetrvání h. i. na všech klíčcích po dobu celého měření pozorujeme na hlízách ošetřených anisolem, α -terpinenem, α -felandrenem. U ostatních došlo buď k částečné inhibici samotné h. i. až zčernání některých klíčků (citronelyl propionát, silice lemongrass Sigma-Aldrich a geranie), nebo postupnému úbytku výskytu na klíčcích vůči celkovému počtu vyklíčených oček na hlíze (α -bisabolol). Kontrola měla infikovány všechny klíčky od 3. k. b.

Diskuze

V problematice retardace klíčení si dané studie kladou za cíl omezit používání syntetických inhibitorů (CIPC) a nahradit je inhibitory přírodními.

V našem experimentu byly z hlediska retardace klíčení vyhodnoceny jako nejefektivnější inhibitory v koncentraci 300 $\mu\text{l/l}$ mentol a kmínová silice. Klíčky hlíz ošetřených těmito látkami odumřely hned při druhé kontrole a nevyklíčily po celou dobu měření (3,5 měsíce). Hodnota jejich klíčivosti GR je u mentolu $0 \pm 0 \%$, u kmínové silice $0,52 \pm 1,38 \%$. Hmotnostní úbytek byl u mentolu výraznější než u kmínové silice (WL $13,96 \pm 0,39 \%$; $5,33 \pm 27,51 \%$), povrchová struktura hlíz si však zachovala pevnost a pružnost. Infekce se u mentolu i u kmínové silice objevila v 9. k. b.

Podobné závěry uvedl i Coleman et al. (2001), kteří testovali (1S, 2S, 5R)-(+)-neomentol a (1R, 2S, 5R)-(-)-mentol a L-menton (kontaminován isomerem isomenton). Těkavé látky nanesené na filtrační papír působily na brambory 14 dní při teplotě 25 °C, poté byly uskladněny ve tmě na dalších 14 dní za teploty 20°C. Neomentol kompletně potlačil klíčení při koncentraci 2 $\mu\text{l/l}$ a menton při 5 $\mu\text{l/l}$, a pokud byly obě komponenty smíchány (0,5 $\mu\text{l/l}$) působily synergicky. Shodně s naším experimentem uvádí Coleman et al. vyšší účinnost inhibice neomentolu než S-karvonu. Navíc uvádí, že zmíněné látky neměly vliv na hladinu glukózy a sacharózy v hlízách.

Opačné výsledky ve svých studiích uvádí Vaughn et al. (1991) a Finger et al. (2018), kdy mentol způsobil pouze lehké zčernání konečků klíčků a 25,5 % inhibici klíčivosti. Finger et al. také studovali histologické řezy klíčků a možný mechanismus účinku inhibice jejich růstu. Popsali, že oproti kontrolním řezům mentol způsobuje rozrušení apikálního meristému a prokambia zodpovědného za tvorbu cévních svazků, které následně vede k nekróze klíčků.

Čížková et al. (2000) studovali nejen retardaci klíčení pomocí kmínové silice obohacené D-karvonem, ale též způsob její aplikace. Dospěli k závěru, že aplikací 0,1 ml až 0,4 ml surové kmínové silice na kilogram hlíz přímým výparem, opakovaným 1–3krát za 6 týdnů se zajistilo významné potlačení klíčení hlíz skladovaných při 10 °C. Hmotnostní ztráty způsobené klíčením se pohybovaly v rozmezí 0–0,4 % oproti kontrole 7,5–14,5 %. Za nevhodnou shledali aplikaci přímým jednorázovým postřikem komerčního přípravku Talent na bázi D-karvonu, způsobující nekrózu slupky, následovanou hmotnostními ztrátami a hnilobou. Podobně neúčinná byla evaplace z rozpadnutých semen kmínu. Naopak za velmi vhodnou metodu, mj. modifikovaně použitou v našem experimentu, byl vyhodnocen poprach kmínové silice adsorbované na bentonit v koncentraci 0,4 ml/2g bentonitu/kg hlíz, který také vykazoval nejlepší schopnost postupného a dlouhodobého uvolňování ze všech testovaných nosičů.

Hlavními složkami kmínové silice jsou D-karvon (50-70 %) a D-limonen (2-30 %). V našem experimentu potvrzujeme závěr ze studie DeCarvalho et al. (2006), s inhibičním účinkem pouze u D-karvonu, nikoli limonenu. Hodnota klíčivosti karvonu byla $2,78 \pm 7,35 \%$, limonenu $72,4 \pm 17,08 \%$. Hmotnostní ztráty karvonu se pohybovaly od 8,19–8,34 %, limonenu 5,72–38,29 %. Povrchová struktura hlíz ošetřených karvonem byla lehce svráštělejší než u mentolu, nicméně stále pevná a pružná. Infekce se na hlízách objevila poprvé v 8. k. b. a 9. k. b., byla však inhibována a na postižených hlízách se v dalších k. b. již nevyskytla. Opět se tedy shodujeme s výsledky studie DeCarvalho et al. (2006), který ve výběru alternativních

inhibitorů vyzdvihuje právě antifungální aktivitu karvonu. Hlízy ošetřené limonenem měly plesnivé klíčky již v 2. k. b.

Jak už bylo popsáno výše, důležitý je způsob aplikace inhibitoru na hlízy. I v případě izolovaného karvonu došlo k úspěšné inhibici ve formě aerosolu nebo pomocí bentonitového nosiče. Ve studii El-Awady Aml et al. (2014) byly hlízy máčeny po dobu 30 min v roztocích jednotlivých složek, rozpuštěných v destilované vodě a podobně jako postřik přípravku Talent ve studii Čížková et al. (2000), přímý kontakt karvonu s hlízami klíčení naopak podporoval. L-karvon potlačil klíčení pouze z 38 % (GR 62 %), D-karvon z 23,02 % (GR 76,98 %). Podobné výsledky byly v této studii prezentovány i u linalolu, který měl klíčivost 96 % (El-Awady, 2014).

Právě linalol vykazoval v našem pokusu poměrně výraznou inhibiční aktivitu. Hodnotou klíčivosti $5,7 \pm 10,22$ % se spolu s citronelalem (GR $6,96 \pm 16,75$ %) řadí k inhibitorům nepřekračující 10 % hranici klíčivosti. Úbytek hmotnosti se pohyboval $5,47-7,72$ % pro linalol a $5,85-5,41$ % pro citronelal. Infekce klíčků, přetrvávající až do konce měření, se začala objevovat v 8. a 9. k. b. u linalolu, v 10. k. b. u citronelalu. Povrchová struktura hlíz ošetřených linalolem odpovídá struktuře hlíz ošetřených mentolem, a u citronelalu můžeme úroveň sraštění přirovnat ke karvonu.

S-linalol je hlavní složkou (60-80 %) silice v semenech koriandru setého (*Coriandrum sativum*) (Mandal et al. 2015). Naše výsledky podporuje studie Gómez-Castillo et al. (2013) srovnávající inhibiční účinek koriandrové silice v koncentraci 230 ml/l, s komerčním CIPC, kdy hlízy ošetřené zmíněnými látkami začaly klíčit až na konci skladovacího období (50. a 70. den).

Listy citronely či voňatky cejlonské (*Cymbopogon nardus* L.) obsahují 29,7-35,5 % citronelalu (Nakahara et al. 2013). Jia et al. aplikovali citronelovou silici (CEO-citronela essential oil) pomocí fumigace v koncentraci 30 μ l/l po dobu 10 dní při teplotě 25 ± 2 °C a 90% vlhkosti. Následně byly uskladněny na 90 dní za teploty 10 °C pro jednorázové dávkování, ve dvoufázovém byly ošetřeny po 35 dnech. Klíčení po 90 dnech bylo u kontroly stanoveno na 95,40 %, u jednorázového ošetření na 62,09 % u dvoufázového na 47,75 %. Jia tedy konstatuje schopnost CEO zpomalit nástup klíčení bramborových hlíz (Jia et al. 2019). Shodně můžeme konstatovat, že samotný linalol dosahoval v našem experimentu slabší inhibice než silice citronely (GR linalolu $5,7 \pm 10,22$ %; citronely $4,46 \pm 11,81$ %).

Samotná silice citronely samozřejmě obsahuje i další složky. Z vybraných, které jsme též testovali jmenujme citral (36,9 % CEO silice), geranyl acetát (5,8 % CEO silice) a β -citronelol (4,6–10 %). Hodnoty klíčivosti citralu v našem měření byly GR $10,2 \pm 13,20$ %, geranyl acetátu $66,44 \pm 9,47$ %, β -citronelolu $62,05 \pm 25,74$ % a silice citronely $4,46 \pm 11,81$ %. Hmotnostní úbytek hlíz ošetřených citralem byl $8,43 \pm 0,11$ %, geranyl acetátem $4,20 \pm 1,75$ %, β -citronelolu $2,27 \pm 2,75$ % a silicí citronely byl $10,35 \pm 1,36$ %. Pevnou a pružnou povrchovou strukturu si zachovaly hlízy ošetřené silicí citronely. Hlízy ošetřené geranyl acetátem měly sraštělou strukturu a výskyt h. i. pavučinově přestupující z klíčků na hlízy již v 2. k. b. Hlízy ošetřené citralem nebyly sraštělé, ale klíčky i hlízy byly postihnuty h. i. vyskytující se nejdříve v 5.k. b., následně inhibovanou a znovu se objevující v 8.k. b. Hlízy ošetřené β -citronelolem byly kompletně plesnivé již v 5. k. b. a byly vyřazeny z měření. U silice citronely se h. i. na hlízách objevila až v 9. k. b.

Shodně s mírnější inhibicí citralu a téměř žádnou inhibicí β -citronelolu v našem pokusu uvádí Vaughn et al. (1991) za použití headspace koncentrace $1,6 \times 10^{-3}$ mol.l⁻¹ u obou látek pouze zčernání konců klíčků. Vidíme tedy, že izolované komponenty nezaručují vždy vyšší účinnost inhibice a lepších výsledků je dosahováno díky synergii, zajištěné přírodní kombinací látek

v silicích. Tuto hypotézu potvrzuje i studie Shukla et al. (2019) popisující kompletní inhibici klíčení za použití silice z *Palmarosy* (Voňatky martinovi; *Cymbopogon martinii*) o koncentraci 200 μ l, kde je geranyl acetát zastoupen z 4,3-14,8 % silice (Wolffenbuttel et al. 2015). Zajímavá myšlenka se také nabízí při srovnání výsledků našeho experimentu se studií El-Awady Aml et al. (2014). Máčení hlíz např. v karvonu /linalolu, jinak úspěšném inhibitoru v mnoha studiích (Oosterhaven et al., Čížková et al., Hartmans et al., De Carvalho et al., Teper-Balmnolker et al./Gómez-Castillo et al.), klíčení v této studii podpořilo. U geranyl acetátu, citralu i β -citronelolu je tomu naopak a studie uvádí 95–100 % potlačení klíčení po 30 min. máčení hlíz v koncentraci 4, 6 a 8 mmol.l⁻¹. Je tedy možné, že evaporizace izolátů, které (v našem pokusu) klíčení hlíz podporuje, může mít opačný efekt, pokud jsou v něm hlízy máčeny a naopak.

Tento efekt v našem experimentu pozorujeme i u dalších těkavých látek. Silice geranie s GR 86,36 \pm 6,43 %, WL 4,74 \pm 26,8 % a vyřazením v 5. a 6. k. b. díky kompletní infekci houbami, citronelyl propionát (obsažený v silici geranie) GR 83,3 \pm 2,08 %, WL 5,87 \pm 0,18 % a po postižení h. i. vyřazený v 5. k. b. *trans*-cinamaldehyd s GR 44,60 \pm 16,63 %, WL 14,50 \pm 1,91 % a h. i. objevující se hned v 2. k. b. Ve studiích Vaughn et al. (1993), El-Awady Aml et al. (2014), kde testovali přímý kontakt inhibitoru s hlízami, opět nacházíme výsledky rozlišné od našich (100 % inhibici klíčení s lehce měkčí strukturou hlíz *trans*-cinamaldehydem kompletní inhibici geranií).

Poněkud rozporuplná situace nastává s citralem, coby majoritní složky silice lemongrass/citrónové trávy (65-80 % silice), či silice *Litsea cubeba* (60-92,6 % silice).

I když byl citral v našem pokusu, coby izolát, obstojným inhibitorem (včetně silice citronely), silice *Litsea Cubeba*, lemongrass od firmy Biomedica i Sigma-Aldrich dosahovaly pouze slabšího inhibičního účinku. Konkrétně GR 17,9 \pm 20,25 %, WL 33,05 \pm 26,12 %, h. i. v 5. k. b. *Litsea Cubeba*; GR 31,03 \pm 28,85 %, WL 14,25 \pm 1,3 %, h. i. i vyřazení v 5. k. b. lemongrass Biomedica, GR 20,80 \pm 29,81 %, WL 3,10 \pm 0,33 %, h. i. v 2. k. b. a vyřazení v 6. k. b. I. opakování, až v 9. k. b. h. i. u II. opakování lemongrass Sigma-Aldrich.

Neúspěšnou inhibici lemongrass potvrzuje studie Shukla et al. (2019), kde distribuovali koncentraci 200 μ l silice lemongrass pomocí fumigace v exsikátoru za pokojové teploty (25 \pm 2 °C) na celkovou dobu 28 dní. Autor uvádí podporující účinek lemongrass na klíčení i na samotnou délku klíčku (99 \pm 2,08 % lemongrass, 99 \pm 2,6 % kontrola). Samotný citral, tedy pravděpodobně schopnost inhibice klíčení nese. V kombinaci s látkami podporujícími klíčení obsažené v dané silici (limonenu, myrcenu) se však chová též jako stimulát.

V silici kůry skořicovníku cejlonského (*Cinnamomum zeylanicum*) je majoritně zastoupen *trans*-cinamaldehyd (60-70 % silice) v listech však převažuje eugenol (74,9-88,7 %). Ten tvoří majoritní podíl i v silici hřebíčkovce kořenného (*Syzygium aromaticum*) kde představuje 70-90 % silice. Eugenol měl v našem pokusu hodnoty GR 64,95 \pm 8,98 %, WL 14,61 \pm 0,12 % a h. i. přítomnou hned v 2. k. b.

Vedle studií podporující naše výsledky se slabým inhibiční efektem eugenolu - Finger et al.(2018), Shukla et al. (2019), nacházíme nesoulad s teorií vyšší účinnosti silice versus čisté látky v ní obsažené ve studii Afify et al. (2012). Měřeným parametrem zde byla aktivita α -amylázy. Tento enzym se zvyšuje během klíčení, což následně vede k degradaci škrobu i ztráty sušiny. Eugenol prokázal snížení aktivity α -amylázy při koncentraci 300 mg/kg č.h. na hodnotu 152,8 \pm 1,41 U/ 100 mg hlíz, oproti kontrole s hodnotou 90,8 \pm 0,63 U/ 100 mg hlíz Aplikace izolovaného eugenolu zde byla efektivnější než hřebíčkové silice.

Enzymová aktivita byla také důležitá v testování účinnosti kafru ve studii Lil et al. (2017). Uvádí neschopnost potlačit hladinu peroxidáz, zodpovědných za růst klíčků a zároveň snížení hladiny fosfolitid fosfolipázy, zodpovědnou za ztráty vody. Dokázal ale zvýšit hladinu proteinu způsobující nekrózu konečků klíčků. V dalších studiích popisují též slabší inhibici Vokou et al.

(1993), Vaughn et al. (1991), El-Awady Aml et al. (2014) a shrnují kafr jako inhibitor způsobující pouze zčernání a vadnutí klíčků, nikoli zabraňující jejich růstu.

V našem experimentu byl kafr naopak velmi silným inhibitorem odpovídající inhibici citronely (GR $4,46 \pm 11,81$ %), s hodnotou GR $4,54 \pm 8,35$ %, WL $17,92 \pm 11,26$ %, s h. i. objevující se až v 9. k. b.

Ještě lepší výsledky vykazoval 4-terpineol s hodnotou GR $2,85 \pm 7,54$ %, WL $5,55 \pm 3,02$, s klíčky plesnivějícími až v 10. k. b. V účinnosti tohoto inhibitoru se však naše výsledky shodují se všemi prezentovanými studiemi (Vaughn et al. (1991); Vokou et al. (1993); Chauhan et al. (2011); Meigh et al. (1969)).

Podobnou shodu studií, s mírnou nebo velmi slabou inhibicí, nacházíme též u našich výsledků karvakrolu (GR $20,85 \pm 18,68$ %) obsaženého z 9-78,2 % v bylinách čeledi *Lammiacea*. anisolu (GR $76,6 \pm 13,62$ %), obsaženého až do 93,9 % v silici bedrníku anýzu (*Pimpinella anisum*) (GR $35,67 \pm 36,67$ %) a ze 76,4 % v silici fenyklu obecného (*Foeniculum vulgare*) (GR $14,64 \pm 18,24$ %). p-cymenu (GR $62,05 \pm 29,60$ %) obsaženého spolu s α -terpinenem (GR $61,9 \pm 25,82$ %) v silici merlíku vonného (*Chemopodium abrosioides*), kde představuje 26,4 %. vanilinu (GR $79,47 \pm 8,37$ %) obsaženém ve vanilce (*Vanilla plantifolia*), či felandrenu (GR $70,66 \pm 18,37$ %) obsaženém z 50 % v silici kopru vonném (*Anethum graveolens*).

Závěrem tedy můžeme potvrdit původní hypotézu o účinnosti inhibice klíčení karvonem, kmínovou silicí, méně pak karvakrolu. Srovnatelný efekt inhibice měl v našem experimentu mentol, karvonmentenol, kafr, linalol, citronelal a silice citronely. Všechny uvedené látky retardovaly klíčení při koncentraci 300 μ l/l.

7 Závěr

Experiment této diplomové práce potvrdil inhibiční účinek monoterpenu karvonu a kmínové silice, kde představuje majoritní podíl. Předpokládaná retardace klíčení u hlíz ošetřených karvakrolem, s efektivitou odpovídající předešlým dvěma látkám, se nepotvrdila. Další látky prokazující velmi účinnou inhibici byly mentol, karvonmentenol, kafr, linalol, citronelal a silice citronely. Všechny uvedené látky retardovali klíčení při koncentraci 300 µl/l.

- Vědecké hypotézy, stanovené na začátku testování byly potvrzeny.
- Účinnost retardace klíčení použitých látek seřazených sestupně je mentol > kmínová silice > karvonmentenol > karvon > kafr > linalol > citronelal.
- Aplikace těkavé látky na nosič bentonit a jeho pozvolné uvolňování v efektivním množství se jeví jako velmi účinná, je třeba však podotknout že tříměsíční testovací období bylo limitní a bentonit poté adsorboval okolní vlhkost, čímž zkresloval výsledky hmotnostního úbytku.
- Koncentrace 300 µl/l použitá pro tuto aplikaci se osvědčila jak u látek s předpokládanou retardací klíčení, tak u látek, které za tak významné retardanty považovány nebyly.
- Ve srovnání našich výsledků se zveřejněnými studii daných látek, se naskytly nové hypotézy. Jednak porovnání vyšší účinnosti retardace klíčení silicemi versus čistými látkami v nich obsažených a pokud jako izoláty retardovaly klíčení, proč se v jiných silicích, kde jsou stále majoritní složkou, chovají jako látky klíčení stimuluující (viz Diskuse-citral). Dále látky klíčení jednoznačně podporující by měly být podrobeny testování přímého kontaktu s hlízami, zda bude jejich působení opačné či nikoli.

Silice a jejich účinné látky nabízejí slibnou alternativu v náhradě syntetických inhibitorů klíčení hlíz *Solanum tuberosum*. Pro komerční použití je však další výzkum nezbytný a je třeba stanovit optimální dávku, způsob aplikace i studium samotného mechanismu účinku inhibice.

8 Literatura

- Afify, A.E.-M.M.R., El-Beltagi, H.S., Aly, A.A., El-Ansary AE. 2012. The impact of irradiation, essential oils and iodine on biochemical components and metabolism of potato tubers during storage. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* **40**:129.
- Amiri H. 2010. Antioxidant activity of the essential oil and methanolic extract of *teucrium orientale* (L.) subsp. *taylori* (Boiss.) Rech. f. Iran Journal Pharmaceutical Research **9**:417–423.
- Asano, N., Kato, A., Matsui, K., Watson, A. A., Nash, R. J., Molyneux, R. J., Hackett, L., Topping, J., Winchester B. 1997. The effect of calystegines isolated from edible fruits and vegetables on mammalian liver glycosidases. *Glycobiology* **7**:1085–10088.
- Ashakirin, S.N., Tripathy, M., Patil, U.K., Majeed ABA. 2018. Chemistry and bioactivity of cinnamaldehyde: a natural molecule of medicinal importance. *International Journal of Pharmaceutical sciences and research*:2333–2340.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils- a review. *Food Chemical Toxicology* **46**:446–475.
- Barry J. 1973. Determination of relative and absolute configurations of (-)-menthol and (+)-neomenthol. *Journal of Chemical Education* **50**:292.
- Bárta, J., Čurn V. 2004. Potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber proteins - classification, characterization, importance. *Chemické Listy* **98**.
- Bárta et al. J. 2008. *Okopaniny*.
- Baser, K.H.C., Buchbauer G. 2009. *Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications*.
- Baydar, H., Karadogan T. 2003. The effects of volatile oils on in vitro potato sprout growth. *Potato Research* **46**:1–8.
- Berger RG. 2007. *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*.
- Beveridge, J.L., Dalziel, J., Duncan HJ. 1981. The assessment of some volatile organic compounds as sprout suppressants for ware and seed potatoes. *Potato Research* **24**:61–76.
- Božík IM. 2018. *Využití přírodních látek při skladování zemědělských produktů*. Česká zemědělská univerzita v Praze.
- Červený L. 1999. Syntetické vonné a chuťové látky. *Chemické Listy* **93**:412–420.
- Červinka, O., Dědek, V., Ferles M. 1991. *Organická chemie*. 4. Praha: Informatorium.
- Chanthai, S., Prachakoll, S., Ruangviriyachai, CH., Luthria D. 2012. Influence of extraction methodologies on the analysis of five major volatile aromatic compounds of citronella grass (*Cymbopogon nardus*) and lemongrass (*Cymbopogon citratus*) grown in thailand. *Journal of AOAC International* **95**:763–772.
- Chauhan, S. S., Prakash, O., Padalia, R. C., Vivekanand, Pant, A. K., Mathela, C. S. 2011. Chemical diversity in *Mentha spicata*: Antioxidant and potato sprout inhibition activity of its essential oils. *Natural Product Communications* **6**:1373–1378.
- Čížek, M., Hamouz, K., Lachman, J. (VÚVBHB). 2009. Složení hlíz bramboru z hlediska výživy In: *Konzumní brambory na poli, zahradě a v kuchyni*. Strany 83–106.
- Čížková, H., Vacek, J., Voldřich, M., Ševčík, R., Krátká J. 2000. Kmínová silice jako potenciální inhibitor klíčení brambor. *Rostlinna Vyroba* **46**:501–507.
- Coleman, W.K., Lonergan, G., Silk P. 2001. Potato sprout growth suppression by menthone and neomenthol, volatile oil components of *Minthostachys*, *Satureja*, *Bystropogon*, and *Mentha* Species. *American Journal of Potato Research* **78**:345–354.
- ČSÚ. 2016. Spotřeba potravin 2016. Dostupné z <https://www.czso.cz/documents/10180/45565376/2701391703g.pdf/8f3a9c3f-e4e5-4b11-ab08-d7629ece4112?version=1.2>.

- De Carvalho, C., Dafonseca M. 2006. Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. *Food Chemistry* **95**:413–422.
- de Guzman, CC., Siemonsma, J.S., Tsauri HS. 1999. PROSEA: Plant resources of south-east Asia Volume 13: Spices. Blackhuys.
- De Vincenzi, M., Stamatii, A., De Vincenzi, A., Silano M. 2004. Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia* **75**:801–804.
- Desai, K., Jin Park GH. 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology* **23**:1361–1394.
- Djamel, D., Aider, M., Yanguela, J., Idir, L., Gómez, D., Roncalés P. 2012. Antioxidant and antibacterial effects of Lavandula and Mentha essential oils in minced beef inoculated with E.coli O157:H7 and S.aureus during storage at abuse refrigeration temperature. *Meat Science* **92**:667–674.
- Dong, Q-Y., Chen, M-Y., Xin, Y., Qin, X-Y., Cheng Z., Shi, L-E., Tang Z-X. 2013. Alginate-based and protein-based materials for probiotics encapsulation: a review. *International Journal of Food Science* **48**:1339–1351.
- Dvořáková, M., Valterová, I., Vaňek T. 2011. Monoterpeny v rostlinách. *Chemické Listy* **105**:839–845.
- El-Awady Aml, A., Moghazy, A.M., Gouda, A.E.A, Elshatoury SA. 2014. Inhibition of Sprout Growth and Increase Storability of Processing Potato by Antisprouting Agent. *Trends in Horticultural Research* **4**:31–40.
- FAO. 2013. Food Balance Sheets. Dostupné z <http://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS>.
- Finger, F.L., Santos, M.M.de S., Araujo, F.F., Lima, P.C.C., Costa, L.C.da , Franca, C.de F.M, Queiroz M d. C. 2018. Action of essential oils on sprouting of non-dormant potato tubers. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **61**.
- Gallardo, A., Picollo, M., Gonzalez-Audino, P., Mougabure Cueto G. 2012. Insecticidal activity of individual and mixed monoterpenoids of geranium essential oil against pediculus humanus capitis (Phthiraptera: Pediculidae). *Journal of medical entomology* **49**.
- Gogoi, P., Baruah, P., Nath SC. 1997. Antifungal activity of essential oil of Litsea cubeba Pers. *Journal of Essential Oil Research* **9**:213–215.
- Gómez-Castillo, D., Cruz, E., Iguaz, A., Arroqui, C., Vírseda P. 2013. Effects of essential oils in sprout suppression and quality of potato cultivars. *Postharvest Biology and Technology* **82**:15–21.
- Gorecka, E., Jastrzebska M. 2011. Immobilization techniques and biopolymer carriers. *Biotechnology and Food Science* **75**:65–68.
- Guenther E. 2013. Essential oils - vol 1 : history - origin in plants - production - analysis. Read Books Ltd.
- Hartmans, K.J., Diepenhors, P., Bakker, W., Gorris LGM. 1995. The use of carvone in agriculture: sprout suppression of potatoes and antifungal activity against potato tuber and other plant diseases. *Industrial Crops and Products* **4**:3–13.
- Hay, R., Waterman PG. 1995. Their Biology, Biochemistry and Production. Longman Scientific & Technical. Wiley-Blackwell.
- Henner, U., Kreis, P., Mosandl A. 1990. Chiral compounds of essential oils IV. Enantiomerdistribution of pinen, pinene, and limonen in essential oils and extracts; Part 2: Perfumes and cosmetics. *Flavour and Fragrance Journal* **5**:201–204.
- Hosseini Nezhad, M., Alamshahi, L., Panjehkeh N. 2012. Biocontrol efficiency of medicinal plants against Pectobacterium carotovorum, Ralstonia solanacearum and Escherichia coli. *The Open Conference Proceedings Journal* **3**:46–51.
- Hruška L. 1974. BramboryRostlinná. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.
- Hyun, J.-E., Bae, Y.-M., Yoon, J.-H., Lee S-H. 2015. Preservative effectiveness of essential oils in vapor phase combined with modified atmosphere packaging against spoilage

- bacteria on fresh cabbage. *Food Control* **51**:307–313.
- Jia, B., Xu, L., Guan, W., Lin, Q., Brennan, C., Yan, R., Zhao H. 2019. Effect of citronella essential oil fumigation on sprout suppression and quality of potato tubers during storage. *Food Chemistry* **284**:254–258.
- Ju, J., Xie, Y., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., Yao W. 2018. Application of edible coating with essential oil in food preservation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **59**:2467–2480.
- Katsukawa, M., Nakata, R., Takizawa, Y., Hori, K., Takahashi, S., Inoue H. 2010. Citral, a component of lemongrass oil, activates PPAR α and γ and suppresses COX-2 expression. *Molecular and Cell Biology of Lipids* **1801**:1214–1220.
- Keiner, R., Nakajima, K., Hashimoto, T., Drager B. 2000. Accumulation and biosynthesis of calystegines in potato. Secondary plant compounds. Proceedings of a symposium held at the Biological-Pharmaceutical Faculty. *Appl. Botany* **74**:122–125.
- Kleinkopf, G. E., Oberg, N. A., Olsen NL. 2003. Sprout inhibition in Storage: Current Status, New Chemistry and Natural Compounds. *American Journal of Potato Research* **80**:317–327.
- Klouček, P., Šmíd, J., Fraňková, A., Kokoška, L., Valterová, I., Pavela R. 2012. Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase. *Food Research International* **47**:161–165.
- Koba, K., Sanda, K., Guyon, C., Raynaud, C., Chamont, J-P., Nicod L. 2008. In vitro cytotoxic activity of *Cymbopogon citratus* L. and *Cymbopogon nardus* L. essential oils from Togo. *Bangladesh Journal of Pharmacology* **4**.
- Komise E. 2018. Nařízení Komise EU 2018/685 kterým se mění přílohy II, III a IV nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 396/2005, pokud jde o maximální limity reziduí pro abamektin, fluopyram, fluxapyroxad, maleinohydrazid, pivo, prášek z hořčičných semen a teflut. Strana 121/6.
- Komise E. 2019. Prováděcí Nařízení Komise EU 2019/989, kterým se v souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh neobnovuje schválení účinné látky chlorprofam a kterým se mění příloha prováděcího nařízení. Strany 160/11–13.
- Konta J. 1983. Keramické a sklářské suroviny. Univerzita Karlova.
- Kühn, P., Zamarský V (VŠBO). 1984. Mineralogie systematická II.díl, Silikáty.
- Laouini, A., Jaafar-Maalej, C., Limayem-Blouza, I., Sfar, S., Charcosset, C., Fessi H. 2012. Characterization and application of liposomes: state of the art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology* **1**:147–168.
- Lil, L-Q., Zou, X., Deng, M-S., Peng, J., Huang, X-L., Lu, X., Wang X-Y. 2017. Comparative morphology, transcription, and proteomics study revealing the key molecular mechanism of camphor on the potato tuber sprouting effect. *International journal of Molecular Sciences* **18**:2280.
- Mandal, S., Mandal M. 2015. Coriander (*Coriandrum sativum*L.) essential oil: Chemistry and biological activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **5**:421–428.
- Marek, M., Vacek, J., Voldřich, M., Čížková, H., Krátká, J., Ševčík R. 2001. Způsob přípravy prostředku inhibujícího klíčení brambor. Úřad průmyslového vlastnictví. Dostupné z https://isdv.upv.cz/doc/FullFiles/Applications/2001/PPVCZ2001_0212A3.pdf.
- Mehrorosh, H., Gavanji, S., Larki B. 2014. Essential oil composition and antimicrobial screening of some Iranian herbal plants on *Pectobacterium carotovorum*. *Global Nest Journal* **16**:240–250.
- Meigh DF. 1969. Suppression of sprouting in stored potatoes by volatile organic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **20**:159–164.

- Merck KGaA. 2020. Nano mineral: Nanoclay. Dostupné z <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/nanomaterials/nano-minerals-nanoclays.html>.
- Meunier A. 2005. Clays. New York: Springer Berlin Heidelberg.
- Nakahara, K., Alzoreky, N.S., Yoshihashi, T., Nguyen, H.T.T., Trakoontivakorn G. 2013. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (Cintronella Grass). *Japan Agricultural Research Quarterly* **37**:249–252.
- Nash, R., Rothschild, M., Porter, E., Watson A. A., Waigh, R. D., Waterman PG. 1993. Calystegines in *Solanum* and *Datura* species and the death's-head hawk-moth (*Acherontia atropus*). *Phytochemistry* **34**:1281–1283.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., Bugarski B. 2011. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* **104**:467–483.
- NPC. 2018. Potato Statistical Yearbook. Dostupné z <https://www.flipsnack.com/nationalpotatocouncil/2018-npc-statistical-yearbook.html>.
- Odyová P. 1995. Velký atlas léčivých rostlin. Martin: Osveta.
- Oosterhaven, K., Hartmans, K. J., Huizing HJ. 1993. Inhibition of potato (*Solanum tuberosum*) sprout growth by the monoterpene *s*-carvone: reduction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity without effect on its mRNA level. *Journal of Plant Physiology* **141**:463–369.
- Owolabi, M. S., Olowu, R. A., Lajide, L., Oladimeji, M. O., Padilla-Camberos, E., Flores-Fernández JM. 2013. Inhibition of potato tuber sprouting during storage by the controlled release of essential oil using a wick application method. *Industrial Crops and Products* **45**:83–87.
- Owolabi, M.S., Lajide, L., Oladimeji, M.O., Setzer W. 2010. The Effect of essential oil formulations for potato sprout suppression. *Natural Product Communications* **5**:645–648.
- Park, J.K, Chang, H.N, Liew, C. V., , Chan, L. W., Heng PWS. 2000. Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnology Advances* **18**:303–319.
- Perricone, M., Arace, E., Corbo, M.R., Sinigaglia, M., Becilacqua A. 2015. Bioactivity of essential oils; a review on their interaction with food components. *Frontiers in microbiology* **6**.
- Preedy VR. 2015. Essential oils in food preservation, flavor and safety. Academic Press.
- Rasocha, V., Hausvater, E., Doležal P (VÚBHB. 2007. Možnosti omezení klíčení hlíz bramboru 2. vyd. aktualiz.
- Rathore, S., Desai, P.M., Liew, C.V., Chan, L.W., Heng WS. 2013. Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering* **116**:369–381.
- Ravid, U., Putievsky, E., Katzir I. 1995. Determination of the enantiomeric composition of α -terpineol in essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* **10**:281–284.
- Rybáček et al. 1988. Brambory.
- Sangwan, N. S., Farooqi, A. H. A., Shabih, F., Sangwan RS. 2001. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation* **34**:3–21.
- Schulzová, V., Hajšlová J (VŠCHT). 2017. Toxické alkaloidy v potravinách řetězci člověka.
- Shojaii, A., Fard MA. 2012. Review of Pharmacological Properties and Chemical Constituents of *Pimpinella anisum*. *ISRN Pharmaceutics* **510795**.
- Shukla S, Pandey SS, Chandra M, Pandey A, Bharti N, Barnawal D, Chanotiya CS, Tandon S, Darokar MP, Kalra A. 2019. Application of essential oils as a natural and alternate method for inhibiting and inducing the sprouting of potato tubers. *Food Chemistry*.
- Sonnewald U. 2001. Control of potato tuber sprouting.
- Sorce, C., Lorenzi, R., Ranalli P. 1997. The effects of (S)-(+)-carvone treatments on seed potato tuber dormancy and sprouting. *Potato Research* **40**:155–161.
- Teper-Balmnolker, P., Dudai, N., Fischer, R., Belausov, E., Zemach, H., Shoseyov, O., Eshel

- D. 2010. Mint essential oil can induce or inhibit potato sprouting by differential alternation of apical meristem. *Planta* **232**:179–86.
- Tisserand, R., Young R. 2014. *Essential oil safety-E-Book: a guide for health care professionals*.
- Vaughn, S.F., Spencer GF. 1991. Volatile monoterpenes inhibit potato tubersprouting. *American Potato Journal* **68**:821–831.
- Vaughn, S.F., Spencer GF. 1993. Naturally-occurring aromatic compounds inhibit potato tuber sprouting. *American Potato Journal* **70**:527–533.
- Velíšek, J., Hajšlová J. 2009. *Chemie potravin II*.
- Vokál et al. 2013. *Brambory*. Profi Press s.r.o.
- Vokou, D., Varelzidou, S., Katinakis P. 1993. Effects of aromatic plants on potato storage:sprout suppression and antimicrobial activity. *Agriculture,Ecosystem & Environment* **47**:223–235.
- Voldřich M. 2009. *Výroba aromat a trestí: Co byste měli vědět o výrobě potravin?* Key Publishing.
- Vrtílek P. 2011. *Identifikace silic u vybraných druhů léčivých, aromatických a kořeninových rostlin*. Mendelova univerzita v Brně.
- Weiss, Z., Kužvart M. 2008. *Jílové minerály, jejich nanostruktura a využití*. Strana (Karolinum P, editor).
- Wolffenbuttel, N. A., zamboni, A., dos Santos, M., K., Borille, B.T., Augustin, A., de Cassia Mariotti, K., Leal, M.B., Limberger RP. 2015. Chemical components of citrus essential oils from Brazil. *the Natural products journal* **5**:14–27.
- Zdravotnictví M. 2004. Vyhláška č. 305/2004 Sb., kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách.
- Zdravotnictví M. 2014. *Český lékopis 2009, Doplněk 2014*.
- Zhu, F., Cai, Y-Z., Ke, J., Corke H. 2010. Compositions of phenolic compounds, amino acids and reducing sugars in commercial potato varieties and their effect on acrylamide formation. *Journal of Science of Food and Agriculture* **90**:2254–2262.
- Zrůst J (VÚBHB). 2009. *Faktory ovlivňující obsah nutričně významných a škodlivých látek v hlízách a výrobcích z brambor*.

9 Seznam tabulek

Tabulka 1 Základní chemické složení hlíz bramboru	11
Tabulka 2 Čisté látky a silice	29
Tabulka 3 Průběh experimentu	30
Tabulka 4 Přehled klíčivosti hlíz v průběhu experimentu vyjádřený pomocí Germination rate %	32
Tabulka 5 Přehled hmotnostního úbytku hlíz WL % pro použité látky	2

10 Seznam obrázků

Obrázek 1 Hydratované vyměnitelné ionty ve vrstvě smektitu. (Kühn et al. 1984).....	25
Obrázek 2: Hlízy ošetřené karvonem (vlevo) a kontrola bez ošetření v 9. k. b. (vpravo) (foto Ing. Matěj Božik, MSc, Ph.D.)	0

11 Seznam grafů

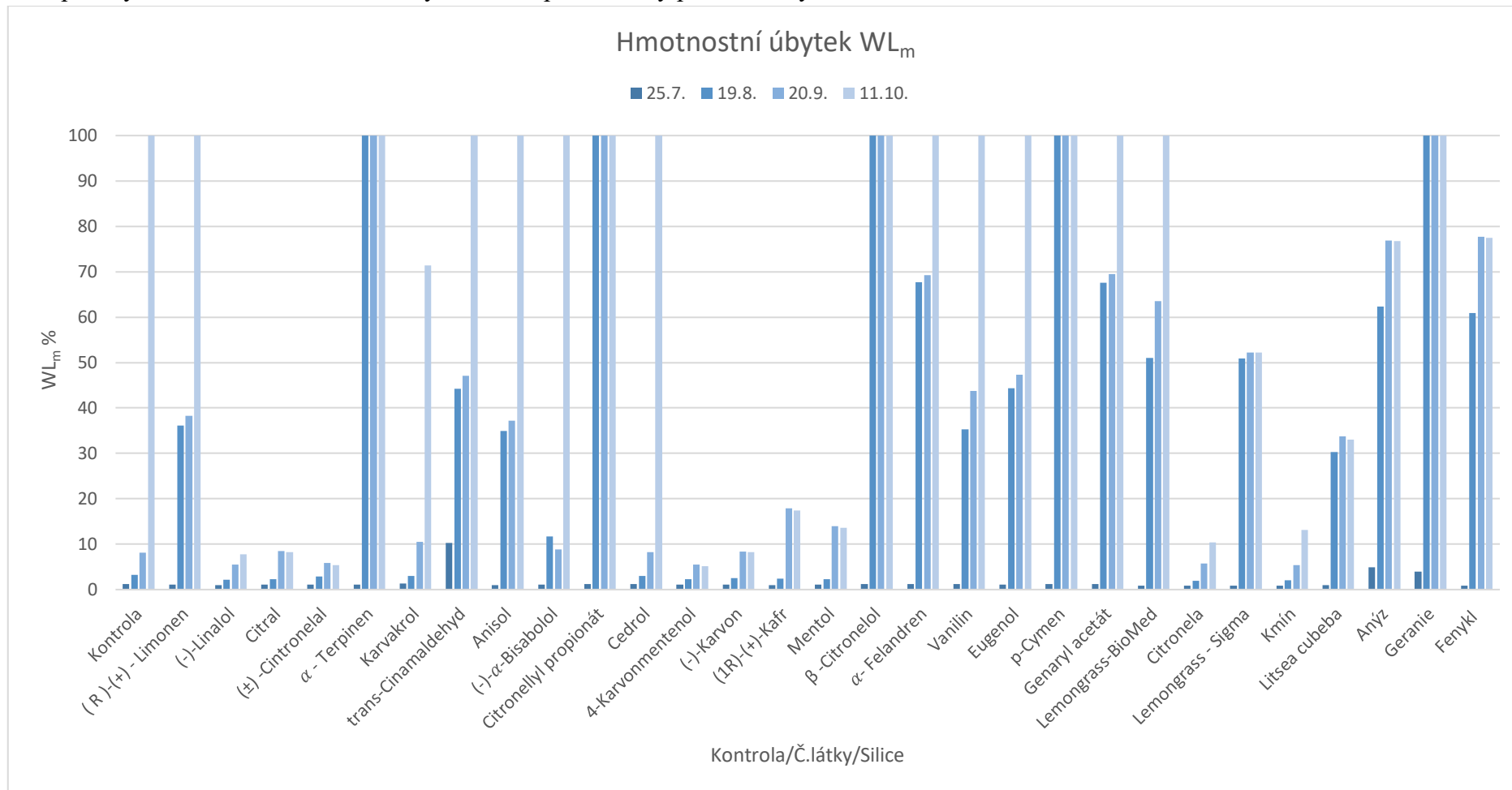
Graf 1: Hmotnostní úbytek nejúčinnějších látek/silic WLm v 4., 7., 8. a 10. kontrolním bodě.	3
----------------------------------------------------------------------------------------------	---

12 Seznam příloh

Graf přílohy 1:Přehled hmotnostního úbytku WLm pro všechny použité látky v 4., 7., 8. a 10. kontrolním bodě.....	I
Obrázek přílohy 1: Hlízy ošetřené kmínovou silicí po 14 týdnech skladování	II
Obrázek přílohy 2: Hlízy ošetřené karvonem po 14 týdnech skladování	II
Obrázek přílohy 3: Hlízy ošetřené mentolem po 14 týdnech skladování	III
Obrázek přílohy 4: Hlízy ošetřené 4-terpineolem po 14 týdnech skladování.....	III
Obrázek přílohy 5: Hlízy ošetřené kafrem po 14 týdnech skladování.....	IV
Obrázek přílohy 6: Hlízy ošetřené karvakrolem po 14 týdnech skladování.....	IV
Obrázek přílohy 8: Hlízy ošetřené silicí citronely	
Obrázek přílohy 9: Hlízy ošetřené linalolem	
Obrázek přílohy 7: Hlízy ošetřené citronelalem	

13 Samostatné přílohy

Graf přílohy 1: Přehled hmotnostního úbytku WL_m pro všechny použité látky v 4., 7., 8. a 10. kontrolním bodě





Obrázek přílohy 1: Hlízý ošetřené kminovou silicí po 14 týdnech skladování



Obrázek přílohy 2: Hlízý ošetřené karvonem po 14 týdnech skladování



Obrázek přílohy 4: Hlízy ošetřené 4-terpineolem po 14 týdnech skladování



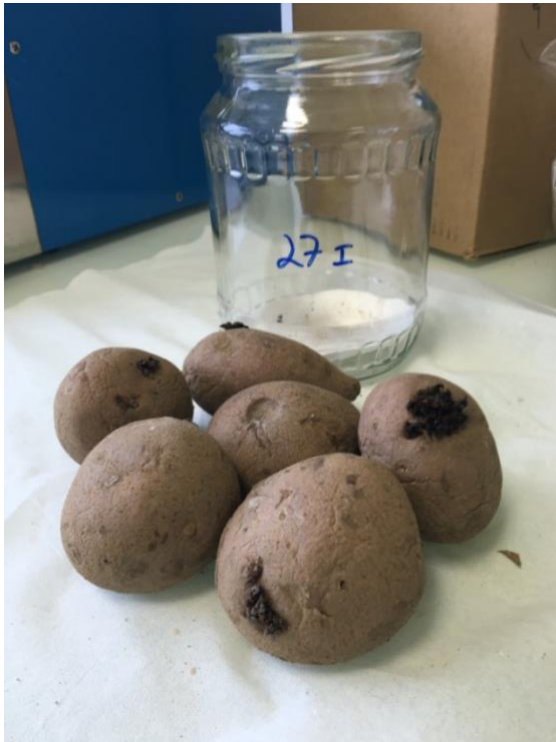
Obrázek přílohy 3: Hlízy ošetřené mentolem po 14 týdnech skladování



Obrázek přílohy 5: Hlízy ošetřené kafrem po 14 týdnech skladování



Obrázek přílohy 6: Hlízy ošetřené karvakrolem po 14 týdnech skladování



Obrázek přílohy 7: Hlízy ošetřené silicí citronely



Obrázek přílohy 9: Hlízy ošetřené citronelalem



Obrázek přílohy 8: Hlízy ošetřené linalolem