

Mendelova univerzita v Brně

**Zahradnická fakulta v Lednici
Ústav posklizňové technologie zahradnických produktů**

**VÝVOJ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITY V PRŮBĚHU
MLÉČNÉHO KVAŠENÍ ZELENINY**

Diplomová práce

**Vedoucí diplomové práce
Ing. Pavel Híc, Ph.D.**

**Vypracovala
Bc. Eva Pavloušková**

Lednice 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma *Vývoj antioxidantní kapacity v průběhu mléčného kvašení zeleniny* vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury.

Souhlasím, aby byla moje práce zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998Sb. o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle §60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla a to až do jejich skutečné výše.

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce Ing. Pavlu Hícovi, Ph.D. za jeho cenné rady, připomínky, čas a vedení diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala všem, kteří mne svými názory nutili k zamyšlení a také své rodině, blízkým a přátelům za jejich podporu.

Obsah

1	Úvod	6
2	Cíl práce	8
3	Literární přehled	9
3.1	Zelenina – přehled obsahových látek.....	9
3.1.1	Voda	9
3.1.2	Bílkoviny	9
3.1.3	Tuky.....	9
3.1.4	Sacharidy	10
3.1.5	Kyseliny	10
3.1.6	Vitamíny	10
3.1.7	Minerální látky	12
3.1.8	Vláknina.....	13
3.1.9	Barviva	13
3.1.10	Alkoholy.....	14
3.1.11	Aromatické látky	14
3.1.12	Plyny.....	14
3.2	Zelí a jeho charakteristika	16
3.3	Zdraví prospěšné látky.....	17
3.3.1	Prebiotika a probiotika	17
3.3.2	Zelenina jako prebiotikum.....	17
3.3.3	Zelenina a probiotika	17
3.3.4	Možnosti dalšího využití probiotických kmenů	19
3.3.5	Kyselina mléčná	19
3.4	Antioxidanty	21
3.4.1	Dělení antioxidantů.....	21
3.4.2	Vliv antioxidantů na lidský organismus	25
3.4.3	Antioxidační kapacita.....	26
3.4.4	Metody stanovení antioxidační kapacity	27
3.5	Konzervace mléčným kvašením	35
3.5.1	Bakterie mléčného kvašení	35
3.5.2	Použití čistých kultur	36
3.5.3	Produkty mléčného kvašení	37

3.5.4	Průběh mléčného kvašení	38
3.5.5	Mléčné kvašení jako konzervační metoda	40
3.5.6	Kvasné nádoby	40
3.5.7	Skladování kvašených produktů	41
3.5.8	Kazy a znehodnocení kvašených produktů	41
3.5.9	Přínosy a rizika kvašené zeleniny	45
3.5.10	Stanovení mléčného kvašení	48
4	Materiál a metodika	49
4.1	Materiál	49
4.1.1	Rostlinný materiál	49
4.1.2	Přístroje a pomůcky	50
4.1.3	Chemikálie a roztoky	50
4.2	Metodika	51
4.2.1	Příprava rostlinného materiálu	51
4.2.2	Odběr vzorků	51
4.2.3	Postup stanovení titračních kyselin a antioxidační kapacity	52
4.3	Stanovení titračních kyselin a antioxidační kapacity	54
4.3.1	Stanovení titračních kyselin vzorků	54
4.3.2	Stanovení antioxidační kapacity vzorků metodou FRAP	54
4.3.3	Stanovení antioxidační kapacity vzorků metodou DPPH	55
4.4	Metody vyhodnocení výsledků měření	55
5	Výsledky a diskuse	56
5.1	Vývoj titračních kyselin	56
5.2	Vývoj hodnot antioxidační kapacity stanovených metodou FRAP	60
5.3	Vývoj hodnot antioxidační kapacity stanovených metodou DPPH	63
5.4	Vývoj antioxidační kapacity v průběhu mléčného kvašení suroviny	66
7	Závěr	68
8	Souhrn – Resume	70
9	Použitá literatura	72
10	Přílohy	81

1 Úvod

V dnešní době se pozornost upírá k možnostem, jak předcházet civilizačním chorobám. Mezi sledovaná témata patří i ta, která souvisí s výživou a s životním stylem. Je kladen velký důraz na současné stravovací návyky spojené hlavně s pracovním procesem každého člověka. Ve společnosti je rozšířeno mnoho různých výživových směrů a diet a skrze ně je zaměřena pozornost nejen na nové či netradiční potravinové skupiny a jejich zástupce, ale i na možnosti využití starších, tradičních druhů potravin. Sleduje se výživová hodnota potravin, podíly vitamínů, minerálů a dalších látek potřebných pro lidské tělo, ale i mnoho faktorů, které mohou mít na lidský organismus další pozitivní či negativní účinky.

Mezi zmíněné tradiční druhy potravin lze řadit i mléčně kvašenou zeleninu. U nás je časté použití této metody hlavně u kvašených okurek a zelí, k ostatním takto upraveným zeleninovým druhům se obyvatelstvo staví spíše skepticky a jen malá část ji zařazuje pravidelně do svého jídelníčku.

V případě mléčně kvašených zeleninových výrobků je charakteristický obsah kyseliny mléčné vzniklé během procesu fermentace a obsah živých bakterií mléčného kvašení. Pro tento způsob zpracování vybraných zeleninových druhů je důležitá přítomnost přirozené mikroflóry na povrchu zeleniny, která obsahuje velkou škálu žádoucích mikroorganismů, mající přímý vliv na mléčné kvašení.

Příznivé účinky fermentovaných výrobků se projevují u konzumenta nejen díky tomu, že si výsledný produkt uchovává vysoký podíl původních cenných látek suroviny, z níž jsou vyrobeny, ale i díky hodnotným látkám, které jsou při fermentačních procesech produkovány bakteriemi mléčného kvašení jako vedlejší metabolity. Důležitou vlastností těchto bakterií je jejich schopnost kolonizace trávicího traktu konzumenta a eliminace nežádoucí mikroflóry. Některé z vedlejších produktů fermentačních procesů společně s vybranými látkami chuťovými a aromatickými mají schopnost snižovat rizika civilizačních chorob a tím také přispívají k velkému zdravotnímu významu této skupiny potravin. Cenným dietetickým kritériem je zde také snížený obsah sacharidů.

Často diskutovanými původci civilizačních chorob jsou i zástupci skupiny volných radikálů. Proti působení volných radikálů si většina živých organismů samovolně vytvořila obranný systém, jehož hlavním článkem je tvorba antioxidantů. Ty zajišťují inaktivaci a zneškodnění těchto nežádoucích látek a výsledkem je ochrana organismu před nekontrolovatelnou oxidací.

Ve tkáních organismů tedy antioxidanty napomáhají ochraně před jeho poškozením, ale ani tato ochrana není úplná a dokonalá a dochází k jistému procentu poškození. Z komplexního hlediska se ale inaktivační účinek antioxidantů na volné radikály v lidském organismu projevuje pozitivně. Také jejich schopnost úpravy redoxního potenciálu, se projevuje mimo jiné snížením výskytu některých onemocnění.

Hlavní myšlenkou této práce bylo sledování změn v antioxidační kapacitě vzorků, které procházely spontánní mléčnou fermentací. Pro tato měření bylo zvoleno zelí jako zástupce zeleniny a to proto, že se jedná o tradiční surovinu pro mléčné kvašení. Při kvašení zelí se stále používá metoda, kdy se surovina nechá spontánně nakvasit pomocí mikroflóry, přirozeně se vyskytující na povrchu zelných hlávek. Při procesu mléčného kvašení zelí jsou sledovány tendence vzrůstu či poklesu antioxidační kapacity a tím i potenciál mléčného kvašení jako dalšího možného zdroje antioxidantů.

2 Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo zhodnotit vývoj antioxidační kapacity v průběhu mléčného kvašení vybraného zástupce zeleniny.

3 Literární přehled

3.1 Zelenina – přehled obsahových látek

Mezi základní sledované látky v zelenině můžeme řadit ty, které jsou nejdůležitější pro lidský organismus. Patří sem voda, dále pak bílkoviny, tuky, sacharidy, vitamíny a minerální látky. V zelenině je největším podílem zastoupena právě voda a její dostatečné množství umožňuje spontánní reakce ostatních obsahových látek, které tvoří sušinu a jejich obsah se pohybuje mezi 5 – 30 %. (Kyzlink, 1988)

3.1.1 Voda

Celkový obsah vody v zelenině je 70 – 95 % podle charakteru odrůdy zeleniny, vegetačních podmínek, stáří rostliny a její vyspělosti či vyspělosti plodu. Mladší organismy obsahují v průměru více vody než ty starší a také rostliny sklizené v oblastech s dostatkem závlahy bývají na vodu bohatší, než plodiny ze suchých oblastí. (Kyzlink, 1988)

3.1.2 Bílkoviny

Bílkoviny představují u zeleniny obvykle pouze 0,5 – 3,0 % hmotnosti, v některých případech až 6 %, nejsou tedy v zelenině nijak významně zastoupeny. Ve výživě člověka proto zelenina bývá ceněna pro jiné obsahové látky, než jsou bílkoviny, nepovažuje se za dobrý zdroj bílkovin. (Hostašová, Němec, Vlachová, 1987, Kopec, 1998)

3.1.3 Tuky

S obsahem do 1 % zelenina není významným zdrojem tuků, ovšem ve vazbě na aromatické struktury mohou některé tuky spoluvytvářet specifické aroma zeleninového druhu. Díky této nízké hodnotě tuků je ale zelenina vyhledávaná při redukci a udržování tělesné hmotnosti, kdy se z pohledu energetické hodnoty zeleniny nemusí množství konzumované zeleniny nijak omezovat. Spíše naopak se doporučuje. (Hostašová, Němec, Vlachová, 1987, Kopec, 1998)

Lipidy (tuky), které se v zelenině nacházejí v dužině, jsou spíše tuky v širším měřítku. Jedná se o steroly, fosfolipidy, slizové látky a některá barviva.

V semenech plodů je obsah tuků mnohonásobně vyšší, než u ostatních částí rostlin, protože se jedná o energetické zásoby budoucí rostliny. (Kyzlink, 1988)

3.1.4 Sacharidy

Sacharidy jsou hlavní energetickou složkou výživy nejen člověka, ale i bakterií a mikroorganismů. V zelenině jsou obsaženy kolem 5 % celkové hmotnosti (některé zdroje uvádějí až výjimečných 18 %), převážně ve formě jednoduchých cukrů (glukóza a fruktóza) a polysacharidů ve formě celulózy a škrobu. Obsah celulosy v rostlině kolísá podle druhu zeleniny, její anatomické části, stáří rostliny, vegetačních podmínek a dalších faktorů. Škrob se v zelenině také objevuje často, může například indikovat přezrálost suroviny. (Kyzlink, 1988)

Zmíněné sacharidy mohou být dále využity pro fermentaci zeleninových produktů mikroorganismy. (Hostašová, Němec, Vlachová, 1987, Kopec, 2010)

3.1.5 Kyseliny

Obsah kyselin v čerstvé zelenině je nízký, její pH se pohybuje většinou v rozmezí 5,0 – 6,6 a tím se řadí mezi suroviny nekyselé nebo málo kyselé. Kyselost u zeleniny způsobují netěkavé kyseliny a kyselé soli. U většiny zeleniny je nejpodstatnější kyselina L-askorbová. (Kyzlink, 1988)

3.1.6 Vitamíny

I přes to, že vitamíny nejsou zdrojem energie pro organismus, je jejich zastoupení ve stravě nezbytné a zvyšují nutriční hodnotu zeleniny. Patří mezi esenciální látky, které si lidský organismus nedokáže sám syntetizovat (kromě částečné tvorby vitamínu D) a proto musí být přijímány ve stravě. (Hostašová, Němec, Vlachová, 1987)

V zelenině jsou zastoupeny pouze vybrané vitamíny, některé, jako například B12, se v zelenině prakticky nevyskytují. Mnoho vitamínů spadá i mezi antioxidanty, například vit. A, C a E.

Účinným prekurzorem vitamínu A je β -karoten (až z 50 %). Ten je přítomen hlavně v mrkvi, paprice, chřestu, kapustě, hrášku a špenátu. Sám β -karoten je antioxidantem a je i odolný vůči působení vnějších vlivů. Následky

nedostatku β -karoten a vitamínu A ve stravě jsou větší náchylnost k infekcím, poruchy zraku a poruchy růstu. (Žamboch, 1996)

V mnoha druzích zeleniny je bohatě zastoupen vitamín C. Je citlivý na vyšší teploty a je náchylný k oxidaci, proto jsou nutné šetrné postupy při zpracování potravin. Vitamín C má antioxidační účinky, stimuluje organismus a má podstatný vliv na činnost imunitního systému.

Vitamín E je zastoupen jen v některých druzích zeleniny. Podporuje správnou činnost nervů, ledvin, jater, svalů a je důležitý pro vývoj gonád (jeho nedostatek může vést až k neplodnosti). Také patří mezi významné antioxidanty.

V petrželové a celerové nati najdeme menší množství vitamínu D, který se uplatňuje v metabolismu cholesterolu a stavbě kostí. Tento vitamín si lidský organismus dokáže z části syntetizovat sám, ale stále je třeba jej doplňovat z potravy.

Ze skupiny vitamínů B je vitamín B1 zastoupen nejvíce v hrášku a kapustě. Jeho ztráty vařením jsou malé, ale není odolný vůči zásaditému prostředí. Jeho nedostatek se může projevovat atrofií svalů, nemocí beri-beri a poruchami v nervové soustavě.

Oproti vitamínu B1 se vitamín B2 vyskytuje i ve špenátu a fazolkách. Tento vitamín je velmi citlivý na světlo a jeho nedostatek se projevuje záněty sliznic a kůže (například popraskané koutky rtů).

Proti oxidačním vlivům je dobře odolný vitamín B6. Ten je obsažen v zelených zeleninových druzích a je všestranně potřebný pro správnou činnost nervů, svalů a kůže.

V brokolici a kořenové zelenině se nachází vitamín B7, který je odolný vůči oxidaci i působení tepla. Avitaminóza může vést k pelagře a onemocnění nervů a kůže. (Hostašová, Němec, Vlachová, 1987, Kopec, 2010)

Kyselina listová známá také jako vitamín B9 je především obsažená v listové zelenině. Je důležitá pro prevenci prenatálních poruch ve vývoji plodu, pro metabolismus bílkovin a krvetvorbu.

Jak bylo zmíněno výše, vitamín B12 se v zelenině prakticky nevyskytuje. (Herbert, 1988, Hermann *et al.*, 2008)

Tab. 1: Obsah vitamínů u vybraných zástupců zeleniny (na 100g jedlého podílu):

Zelenina	Vitamin B1 (thiamin) [mg]	Vitamin B2 (riboflavin) [mg]	Vitamin C [mg]	Vitamin A (beta-karoten) [µg]	Vitamin E (alfa – tokoferol) [mg]
Salát hlávkový	0.06	0.08	12.5	1153	0.55
Zelí bílé	0.06	0.06	44	52	0.02
Zelí červené	0.08	0.07	52	15	0.07
Červená řepa	0.03	0.04	10	60	0.04
Cibule	0.03	0.03	8.2	12	0.07

(Databáze složení potravin ČR, 2016)

3.1.7 Minerální látky

Z dalších složek zeleniny je třeba zmínit i minerální látky. Jsou to mikronutrienty nezbytné k životu. Účastní se totiž metabolických pochodů v organismu, mohou být strukturní součástí tkání a pomáhají udržovat acidobazickou rovnováhu v těle. Ve výčtech složení jsou převážně uváděny jako popeloviny. (Kvasničková, 1998)

Čerstvá zelenina má v sobě zastoupeno 0,5 – 2 % minerálních látek, to by v přepočtu na sušinu odpovídalo přibližně 50 – 200 g*kg⁻¹.

V nejvyšším množství je v zelenině zastoupen draslík, dále pak fosfor, síra, vápník, sodík, železo a hořčík. Další minerály jsou zastoupeny ve velmi malém množství. Jelikož zelenina obsahuje podstatné množství kyseliny šťavelové, vápník v ní obsažený může být zastoupen i jako šťavelan vápenatý, který je ale pro lidský organismus ve větším množství nežádoucí, protože má vliv na tvorbu ledvinových kamenů. To se může týkat například hlávkového salátu, reveně, špenátu a červené řepy a proto by se tyto zástupci zeleniny neměli požívat v nadměrném množství. (Kyzlink, 1988) Zastoupení minerálních látek v požitelných částech některých rostlin je zaznamenáno níže v tabulce č. 2, kde jsou údaje vyjádřeny na 100g jedlého podílu.

Tab. 2: Obsah minerálních látek u vybraných zástupců zeleniny (v mg na 100g jedlého podílu):

Zelenina	Sodík	Hořčík	Fosfor	Draslík	Vápník	Železo	Měď	Zinek
Salát hlávkový	9	10	46	280	43	0.8	-	-
Zelí bílé	13	18	34	238	53	0.5	-	-
Zelí červené	13	15	31	266	40	0.6	-	-
Červená řepa	45	15	39	273	35	0.7	-	-
Cibule	8	10	27	146	31	0.5	-	-

(Databáze složení potravin ČR, 2016)

3.1.8 Vlákna

Podstatnou a velmi ceněnou složkou zeleniny je vlákna. Ta může být zastoupena celulózu, hemicelulózu, pektiny, gumou, slizy, ligninem, nestravitelnými oligosacharidy nebo i dalšími doprovodnými látkami jako jsou třísloviny. Zastoupení vlákniny v celkovém obsahu zeleniny bývá v rozsahu 3 - 50 g*kg⁻¹, pro což bývá zelenina ceněna, jelikož doporučená denní dávka vlákniny je 30 – 40 g na osobu. Hlavními přínosy vlákniny pro funkci organismu je její schopnost regulace průchodu tráveniny střevem, podpora vstřebávání a metabolismus živin z tráveniny, společně s příznivým vlivem na střevní mikroflóru a v neposlední řadě i spoluúčast vlákniny na detoxikaci organismu. (Kyzlink, 1988)

3.1.9 Barviva

Každý zeleninový druh obsahuje barviva, která jsou pro něj typická a dodávají mu jeho charakteristické zbarvení.

Karotenoidy zbarvují v odstínech hnědé, oranžové, žluté a případně i červené a jsou zastoupeny především v mrkvi, špenátu, petrželi a celeru. Karotenoidy jsou citlivé ke změnám teplot, proto jejich obsah v zelenině klesá podle příslušných skladovacích teplot například v listové zelenině. U zásobních orgánů a plodů naopak obsah karotenoidů v těchto situacích přibývá. Nejznámějším zástupcem je β-karoten (zmíněný již dříve jako prekurzor vitamínu A), který převládá například mezi barvivy u mrkve. (Kyzlink, 1988)

Červená až modrofialová zbarvení jsou způsobena anthokyany.

Betanin je zástupce dusíkatých barviv a společně se žlutými betaxanthiny tvoří soubor barviv například u červené řepy. (Kyzlink, 1988)

3.1.10 Alkoholy

Alkoholy se v zelenině vyskytují ve dvou formách. Bud se jedná o alkoholy volné nebo o alkoholy vázané, které se váží jako estery s rozličnými organickými kyselinami. Kromě této esterifikace je u alkoholů důležitá také jejich oxidace na aldehydy, ketony a případně až na organické kyseliny. (Kyzlink, 1988)

3.1.11 Aromatické látky

Nejnámější aromatické látky u zeleniny patří mezi organické sloučeniny obsahující síru. Vyskytují se především u několika zeleninových druhů, jako jsou například cibule, česnek, pór, křen, ředkev, hořčice a některých druhů košťálovin. Příčinou typického zápachu u vařené košťálové zeleniny jsou dimethylsulfid, dimethyltrisulfid a allylisothiokyanát. Celkově obsah pachových látek u zeleniny kolísá v rozmezí $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ až do $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$. (Kyzlink, 1988)

3.1.12 Plyny

I přes to, že podíl plynů na hmotnosti zeleniny nebývá nijak podstatný, jejich objem může být značný. Plyny bývají volně v dutinách tkání nebo jsou zastoupeny rozpuštěné jako součást rostlinných šťáv. V tabulce 3 jsou znázorněny vybrané zeleninové druhy a zastoupení plynů v nich v množství mg na 100 g. (Kyzlink, 1988)

Tab. 3: Obsah plynů [$\text{mg} \cdot 100^{-1} \text{ g}$] ve vybraných zeleninových druzích:

Zelenina	Obsah plynů
Zelí – nitro listů	35,4
Zelí – celé hlávky	40,8
Červená řepa	21,8
cibule	30,2
celer	50,0

(Kyzlink, 1988)

I když se v některých zdrojích uvádí jinak, při správném průběhu mléčného kvašení v produktu většina vitamínu C zůstává. Jednotlivé složky a jejich zastoupení kolísají podle odrůdy, ročníku i místa původu suroviny. (Bartoš, Kopec, 1989)

Jen v zelí je zastoupeno více než padesát zdraví prospěšných bioaktivních látek. Jsou mezi nimi například glykosidy, estery kyseliny sinapové

a malonové. Zastoupené sirné sloučeniny mají zase protirevmatické účinky. Obsah vápníku v zelí je $530 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a jeho využitelnost je srovnatelná s využitelností vápníku u mléka. (Kopec, 1998)

3.2 Zelí a jeho charakteristika

Hlávkové zelí patří mezi zeleninu, která je ceněna pro své výživové vlastnosti a obsah vlákniny. Průměrné zastoupení základních živin v zelí znázorňuje tabulka 4. Zelí se dá konzumovat celoročně, jeho využití je jak v čerstvém stavu (přibližně od konce května do listopadu), tak jako fermentovanou či zpracovanou surovinu během zimních měsíců. Konzumace zelí během zimních měsíců je možná hlavně díky jeho vhodnosti ke konzervaci mléčným kvašením. Jedná se o velice jednoduchý, tradiční a biologicky cenný způsob uchování a skladování.

Tab. 4: Průměrný obsah základních živin v bílém zelí [$g \cdot kg^{-1}$]:

Složka	Obsah
Voda	920
Sušina	80
Bílkoviny	15
Tuky	2
Sacharidy	45
Popeloviny	6
Vláknina	27
Vit. C	Kolísá mezi 30 – 70 $mg \cdot 100^{-1}g$ zelí

(Kopec, 1998)

Zelí lze rozlišit i podle velikosti, které se dorůstají jednotlivé hlávky. Rané a letní odrůdy se vyznačují malými až středně velkými hlávkami, mají nižší obsah sušiny a vyšší obsah cukrů. Jsou určeny hlavně k přímému konzumu. U odrůd polopozdních a pozdních nacházíme velké hlávky o hmotnosti přes tři kilogramy, které jsou špatně skladovatelné. Tyto odrůdy jsou vhodné k výrobě kvašeného zelí, mají nízký obsah sušiny ale vysoký obsah cukrů. Kvašením se tak prodlužuje i možnost jejich skladování. (Pekárková, 2001)

Z hlediska vhodnosti ke konzervárenskému využití je zelí vhodné pro konzervaci mléčným kvašením a sterilací. Obsah vitamínu C je v zelí červeném vyšší, než v zelí bílém, přesto oba typy obsahují takové množství vitamínu C, že je zelí ceněno již historicky jako cenný zdroj vitamínu C pro výživu člověka během zimy a na jaře. (Půhoný, 1988)

3.3 Zdraví prospěšné látky

3.3.1 Prebiotika a probiotika

Pokud hovoříme o probiotikách, jedná se o živý organismus v potravě, který má příznivý vliv na střevní mikroflóru konzumenta. Zlepšuje rovnováhu mikroflóry a tím i zlepšuje zdraví konzumenta. Mezi tato probiotika patří například i bakterie mléčného kvašení.

Prebiotika jsou oproti tomu nestravitelné složky stravy, které podporují aktivitu a růst střevní mikroflóry jako jejich substráty a tím se tedy také podílejí na zlepšování zdravotního stavu konzumenta. Převážně se jedná o těžko stravitelné a nestravitelné oligosacharidy obsažené například jako vláknina v zelenině. (Kopec, 2010)

V zelenině se mohou vyskytovat obě tyto složky. Abiotická jako součást složení zeleniny a probiotická jako součást povrchové mikroflóry.

3.3.2 Zelenina jako prebiotikum

Jak je již zmíněno výše, prebiotika lze definovat jako nestravitelné složky potravy, jako je vláknina a další. Ty mají pozitivní vliv na metabolismus lidského organismu tím, že stimulují aktivitu a růst střevních bakterií a mikroflóry. Do prebiotik tak řadíme fruktooligosacharidy, polyfenoly, rezistentní škroby a některé další druhy již zmíněné vlákniny. Z fruktooligosacharidů můžeme zmínit například inulin obsažený v cibuli. Polyfenoly jsou hodnoceny jako látky ochranné a jsou zastoupeny ve všech druzích zeleniny obsahem až 3000 mg*kg⁻¹. Všechny tyto zmíněné látky se v zelenině vyskytují. (Davis, Milner, 2009, Kopec, 2010, Roberfroid, 2000)

V souhrnu lze tedy z hlavních vlastností prebiotik zmínit, že plní funkci selektivního substrátu pro střevní mikroflóru, zvyšují odolnost vůči hydrolýze a vstřebávání v horní části trávicího traktu, mají vliv na udržování zdravé střevní mikrobiální rovnováhy a podporují příznivé procesy systémové i lokální uvnitř střev. (Kailasapathy, Chin, 2000)

3.3.3 Zelenina a probiotika

Hlavními zástupci probiotik u zeleniny mohou být mléčné bakterie, u kterých mezi hlavní přínosy patří ochrana konzumenta před střevními

infekcemi a zvýšení nutriční hodnoty potraviny. Nejsou to ale zdaleka jediné podstatné vlastnosti těchto bakterií. Usnadňují totiž také trávení laktózy a mají vliv na hladinu cholesterolu v krvi. Dále je uváděn i vliv na některé druhy rakoviny, převážně na procesy a faktory s rakovinou spojené.

Zmíněný vliv na ochranu před střevními infekcemi lze vysvětlit produkcí organických kyselin a snížením pH prostředí. Dalšími faktory jsou produkce oxidu uhličitého a také specifických inhibičních látek podobných antibiotikům, jako jsou acidolin, acidophilin, laktocidin, reuterocyclin, nebo také látek s bakteriocidním účinkem, kam patří lakticin. (Gilliland, 1990, Kailasapathy, Chin, 2000, Ross, Morgan, Hill, 2002)

Zvýšení nutriční hodnoty produktů je dáno činností mikroorganismů. Jde o nárůst obsahu vitamínů, štěpení bílkovin a štěpení látek, které byly v původní surovině pro člověka nestravitelné, jako například obsažené polysacharidy. (Battcock, Azam-Ali, 1998, Gilliland, 1990)

Trávení laktózy usnadňují probatické bakterie mléčného kvašení proto, že je tento proces ovlivněn bakteriálním enzymem laktázou (β -galaktosidázy). Vliv na hladinu cholesterolu v krvi je pravděpodobně důsledkem bakteriální přeměny žlučových kyselin tak, že ve výsledku je zamezeno jejich zpětné vstřebávání do organismu. (Gilliland, 1990, Kailasapathy, Chin, 2000)

U snížení rizika rakoviny se jedná o důkaz nepřímý, kterým je pokles aktivity enzymů β -glukuronidázy, azoreduktázy a nitroreduktáz. Výsledky byly získány za pomoci analýzy stolice laboratorních zvířat, u kterých byla střevní mikroflóra cíleně obohacena o bakterie mléčného kvašení z potravy. Pokles aktivity zmíněných enzymů je významný z toho důvodu, že tyto enzymy se účastní přeměny některých prokarcinogenů v karcinogeny. Pokles jejich aktivity proto může znamenat menší riziko vzniku rakoviny. (Gilliland, 1990, Kailasapathy, Chin, 2000)

Většina prací na téma mléčných bakterií a jejich činnosti se týká fermentovaných mléčných výrobků, nikoli mléčně kvašené zeleniny. Nejen z tohoto důvodu by výsledky u zeleniny nemusely být shodné například vlivem jiných substrátů a následných metabolitů mikroflóry a dalších podmínek. Vyjma

vlivu na trávení laktózy také nejsou tyto jevy ale ještě zcela zmapovány a představují problematiku vyžadující další výzkum. (Gilliland, 1990)

3.3.4 Možnosti dalšího využití probiotických kmenů

Podle obecné definice WHO jsou probiotika živé mikroorganismy vyskytující se v potravinách či potravinových doplňcích, které při dostatečném dávkování přinášejí prokazatelné zdravotní výhody pro konzumenta. (Sanders, 2008)

Jak uvádí ve svém díle Parvez *et al.* (2006), mezi příznivé účinky probiotik patří zmírnění intolerance k laktóze, posílení imunitního systému, zlepšení zažívání konzumenta a možné snížení rizika některých druhů rakoviny.

V pozdějších definicích jsou probiotika definována jako jasně identifikovatelná s prokázanými účinky a podávaná v dávce, která je účinná. (Sanders, 2008) K dalším atributům pak patří, že jde o bakterie odolné vůči žlučovým a žaludečním kyselinám, enzymům a kyslíku, které jsou schopné adheze na střevní sliznici a kolonizace trávicího traktu a zároveň produkují antimikrobiální substance, které jsou ale pro konzumenta nezávadné. (Kailasapathy, Chin, 2000)

Z výše uvedených definic vyplývá, že mléčně kvašenou zeleninu bychom mezi probiotika řadili chybně. Nejedná se o probiotickou potravinu, ale jde o potravinu obohacenou o probiotika. Machala (2008) označuje mléčně kvašenou zeleninu, která ovšem nebyla druhotně konzervována, termínem probiotický salát. Kvašená zelenina obohacená fermentací o probiotika je do budoucna podle Roberfroida (2000) výhodná výživová alternativa.

3.3.5 Kyselina mléčná

V mléčně kvašených produktech se krom zmíněných probiotických a prebiotických složek nachází kyselina mléčná, která má také významný pozitivní vliv například na správnou činnost střev. Její obsah v mléčně kvašených zeleninových produktech není nijak zanedbatelná, pohybuje se kolem 2 %.

Důležité postavení kyseliny mléčné spočívá nejen v její schopnosti přirozeně regulovat prostředí ve střevech, ale i v její schopnosti inhibice

patogenních organismů v trávicím systému. Také obsažené složky laktátu a boryátu navíc stimulují regeneraci enterocytů tenkého střeva a tím přímo zvětšují plochu pro vstřebávání živin do těla. (Scholz-Ahrens *et al.*, 2007, Kailasapathy, Chin, 2000)

3.4 Antioxidanty

Samotná existence volných radikálů přiměla živé organismy k tomu, aby si vytvořily obranný systém. Ten zabezpečuje inaktivaci nebezpečných volných radikálů a tím organismus chrání před nekontrolovanou oxidací. (Lonrot *et al.*, 1996) Tímto obranným systémem je tvorba antioxidantů.

Definice antioxidantů se často liší, především podle toho, na co konkrétně jsou využívány nebo proč je vlastně zjišťujeme. Jedna z definic je, že se jedná o látky, které jsou v nízkých koncentracích obsaženy v potravinách a tyto potraviny chrání před poškozením radikály. Tím zvyšují jejich uchovatelnost. (Velíšek, 2002) V tomto případě jde o definici z hlediska potravin a jejich údržnosti. Jiná definice může antioxidanty nazývat aditiva přidávaná do umělých hmot, kde slouží k tomu, aby se prodloužila jejich životnost a ohebnost materiálu. Z chemického hlediska se jedná o látky schopné inaktivovat volný elektron bez toho, aby se samy staly radikály. Z pohledu lidské výživy a vlivu na lidský organismus je možné definovat antioxidanty jako látky, které v relativně malých koncentracích zabraňují oxidačnímu poškození organismu.

V živých tkáních antioxidanty chrání organismus před poškozením. Tato ochrana samozřejmě není absolutní, a proto dochází k jistému poškození organismu. (Ames *et al.*, 1993) Mezi jednotlivými druhy antioxidantů mohou probíhat vzájemné reakce, jejichž následkem může být antagonistické nebo synergické působení.

Na celkovém zdraví živých organismů se pozitivně projevuje inaktivační účinek antioxidantů na volné radikály i jejich schopnost upravovat redoxní potenciál a to se projevuje například i sníženým výskytem některých onemocnění. Způsobů, kterými antioxidanty zabraňují poškození je více a na základě toho, jak pracují, bylo utvořeno jejich základní rozdělení.

3.4.1 Dělení antioxidantů

Rozdělení antioxidantů mnozí autoři uvádějí podle svého sledovaného úhlu pohledu, a proto se známé druhy antioxidantů dělí podle většího množství kritérií.

Podle způsobu vzniku se antioxidanty dělí na:

1. **Přírodní antioxidanty**, které vznikly v rostlinách nebo živočiších při jejich metabolických pochodech.
2. **Syntetické antioxidanty**, které byly uměle syntetizovány člověkem.

Mezi významné syntetické antioxidanty patří:

- **BHA** (3-terc-butyl-4-hydroxyanisol + 2-terc-butyl-4-hydroxyanisol) používaný do obalových materiálů. Rizikem je, že má schopnost migrovat do potravin.
- **BHT** (3,5-di-terc-butyl-4-hydroxytoluen) používaný také na obalové materiály, který ale vykazuje účinnější antioxidační vlastnosti při oxidaci živočišných tuků.
- **TBHQ** (2-terc-butylhydrochinon), který je dobrým antioxidantem tuků na smažení a antioxidační aktivitu vykazují všechny jeho degradační produkty.
- **Galáty** jsou estery kyseliny galové a používají se převážně ke stabilizaci živočišných tuků.
- **Santokin** (6-ethoxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydrochinolin), jehož využití je hlavně v krmivářství. (Velíšek, 2002)

Podle molekulové hmotnosti se antioxidanty dělí na:

1. Vysokomolekulární
2. Nízkomolekulární

Podle enzymatické povahy na:

1. **Enzymatické antioxidační systémy** jsou skupiny látek, jejichž společnou vlastností je rozpustnost ve vodě. Jedná se o velké molekuly, které se při svém působení nespotřebovávají. Mezi tyto enzymatické antioxidanty řadíme například katalázu, peroxidázu, transferázu a superoxiddismutázu, tedy enzymatické antioxidanty, které v těle mají intracelulární povahu. (Eremin, 2001)
2. **Neenzymatické antioxidanty** jsou skupinou látek, které mají malé molekuly a jsou rozpustné ve vodě (hydrofilní) nebo v tucích (lipofilní), ale při jejich působení dochází k jejich spotřebování. (Ames *et al.*, 1993)

Podle původu se mohou dělit na:

1. **Endogenní** vznikající lidským metabolismem, jako například kyselina močová, melatonin a glutation.
2. **Exogenní** jsou přijímány potravou a mezi ně patří například karotenoidy, vitamín A, polyfenoly, fenoly a kyselina L-askorbová.

Podle místa účinku lze antioxidanty dělit na:

1. Antioxidanty, které působí mimo organismus a které chrání potraviny před nežádoucí oxidací a tím prodlužují její životnost.
2. Antioxidanty, které působí uvnitř organismu a chrání jej před škodlivými účinky volných radikálů.

Podle toho, kde se nejčastěji vyskytují je lze dělit na:

1. Cytoplasmatické (hydrofilní), kam patří feritin, bilirubin, transferin, albumin, kyselina močová, ceruloplasmin, cystein, tioly, glutation a kyselina L-askorbová.
2. Membránové (lipofilní), mezi které patří karotenoidy a tokoferoly. (Ďuračková, 1998)

Na základě chemických reakcí, kterými působí na volné radikály, je můžeme dělit na:

1. Látky zabraňující tvorbě volných radikálů, jako jsou kataláza a xantinoxidáza.
2. Látky zneškodňující a chytající volné radikály, které již vznikly. Tyto antioxidanty lze dále dělit na:
 - a. Vychytávače („scavengers“), jako je například superoxiddismutáza
 - b. Lapače („travers“), kam řadíme vitamín E
 - c. Zhášedče („quenchers“), jako je β -karoten
3. Systémy odstraňující poškozené molekuly z organismu. Jsou to lipofilní enzymy fosfolipáza, reparační endonukleázy a proteolytické enzymy. (Ďuračková, 1998)

Další dělení založené na principech chemických reakcí člení antioxidanty na:

1. Primární antioxidantů redukující vzniklé hydroperoxydy.
2. Sekundární antioxidantů.
3. Vazbu katalyticky aktivních kovů do komplexů.
4. Eliminaci přítomného kyslíku. (Velíšek, 2002)

Jiným způsobem je klasifikace dělící antioxidantů do tří tříd:

1. Primární antioxidantů rušící řetězové reakce.
2. Synergicky působící antioxidantů.
3. Sekundární antioxidantů.

Primární antioxidantů pracují tak, že dodávají vodík nebo elektrony volným radikálům a tím ruší či ukončují řetězovou oxidační reakci. Antioxidantů této skupiny jsou účinné i v malých množstvích. (Kvasničková, 2000)

Podle struktury aktivní části antioxidantů primární skupiny můžeme členit na:

- Endioly, kam patří kyselina L-askorbová, erytrobová a jejich soli.
- Sloučeniny s konjugovaným systémem dvojných vazeb, které umožňují delokalizaci přijatého elektronu (karotenoidy).
- Fenolové substituované sloučeniny umožňující delokalizaci přijatého elektronu na aromatickém jádře, kam patří například fenolové antioxidantů, tokoferoly a galáty.
- Kombinované struktury konjugovaných dvojných vazeb a substituovaných fenolů (resveratol a kurkumin).
- Další antioxidačně působící látky.

Celkový antioxidační potenciál je u primárních antioxidantů určován nejen rychlostí inhibičních reakcí, ale také tím, co se stane se vzniknuvším radikálem původního antioxidantu. Nermalou roli také hraje koncentrace a pohyblivost antioxidantu v daném prostředí a místem vzniku a aktivity reagujícího volného radikálu. (Enrique, 2002)

Sloučeniny, které působí synergicky, dělíme na lapače kyslíku a chelátory. Jejich hlavní funkce spočívá v tom, že regenerují primární antioxidantů tím, že předávají elektrony nebo vodík radikálům primárních antioxidantů. Další významnou roli hrají při vytváření kyselého prostředí, díky kterému se zvyšuje

i stabilita primárních antioxidantů. Sloušeniny patřící mezi lapače kyslíku reagují s volným kyslíkem a tím eliminují jeho vliv. Do této skupiny řadíme například kyselinu L- askorbovou či siřičitany. Na druhou stranu zástupci spadající mezi chelátory, nebo také chelatační činidla, odstraňují peroxidované kovy a tím také zabraňují oxidacím katalyzovaným kovy. Do této skupiny patří třeba kyselina vinná, kyselina citronová a kyselina fosforečná. (Kvasničková, 2000)

Skupinu sekundárních antioxidantů lze nazývat také jako antioxidanty preventivní. Jejich způsobem reakce je rozkládání peroxidů lipidů na stabilní látky. Řadíme sem například flavonoidy a jejich příbuzné sloučeniny a aminokyseliny působící jako primární antioxidanty i synergicky. Dále sem patří dusičnany a dusitany, β - karoten a jemu příbuzné karotenoidy, které zabraňují vzniku hydroperoxidů a likvidují singeltoový kyslík. Také sem můžeme řadit i selen a zinek. (Kvasničková, 2000)

3.4.2 Vliv antioxidantů na lidský organismus

V lidském organismu hrají antioxidanty nezastupitelnou roli při procesech zpomalujících stárnutí, snižují riziko arteriosklerózy, pomáhají chránit proti infarktu a mozkové příhodě. Také mají podíl na snižování hladiny cholesterolu a zpomalují průběh Alzheimerovy choroby. Dále snižují riziko vzniku nádorů, potlačují růst zhoubných nádorů a pomáhají při detoxikaci protirakovinných léků. V neposlední řadě je třeba zmínit i jejich úloha při ochraně zraku před degenerativními pochody, ochraně proti astmatu a tlumení následků kouření a dále ochranu proti bronchitidě nebo rozedmě plic. (Mindell, 2000)

Nejrozšířenějším antioxidačním činidlem můžeme nazvat kyslík. Za normálních podmínek působí na anorganické i organické látky, a tím dochází k jejich samovolnému a pomalému, ale trvalému procesu, který nazýváme autooxidace. Jde o oxidační přeměnu, která spadá do potravinářsky nežádoucích procesů vedoucích k hospodářským ztrátám.

Pokud jsou přítomny určité katalyzátory a záření je autooxidace účinnější a totéž platí i pro vliv vyšších teplot. Výsledný proces je znám jako stárnutí a jde o nevratné změny vlastností u organických látek i organismů. V souvislosti s obranou proti tomuto jevu se mluví o látkách, které lze použít proti oxidaci kyslíkem. Tyto látky nazýváme antioxidanty. (Pospíšil, 1968)

Na naše tělní buňky denně útočí volné radikály, proti kterým jsou dobrou obranou právě bioaktivní látky, které mohou být obsaženy například v konzumovaném ovoci, zelenině, luštěninách či obilovinách. Volné radikály vznikají i v našem těle, a tak nejsme schopni se kontaktu s nimi naprosto vyhnout. Proto jsou pro nás důležité antioxidanty jako obranné látky, které omezí působení volných radikálů.

Volné radikály jsou takto nazývány proto, že tyto látky mají ve svých vazbách jeden volný elektron. To znamená, že tato vazba je volná a snaží se zaplnit elektronem jiné molekuly. Když pak dojde k navázání jiného elektronu, vytvoří se volný radikál z molekuly, kde elektron ubyl. Tento celý proces se nazývá oxidace a mohou tak vznikat dlouhé řetězce volných radikálů. Částice, které jsou zoxidované, ztrácí svoje schopnosti a funkce a obranyschopnost celého organismu je tedy narušena. Zmíněné oxidaci mohou zabránit některé enzymy (jako jsou kataláza, dismutáza a další), které se nacházejí v našem těle, nebo antioxidanty získané stravou. Tyto dvě možnosti vedou k zneškodnění volných radikálů a tím jim zabrání páchat takové škody. (Dittrich, Leitzmann, 1999)

Jakkoli lákavě to ale zní, antioxidanty nelze brát jako nějaký elixír života. Jde spíše o součást našeho organismu, protože funkce jednoho antioxidantu je velice často podmíněna účinkem jiné látky ochranného systému našeho organismu. Jedná se stále o látky, které jsou probádané pouze z části, a můžeme očekávat, že budou i nadále objevovány či syntetizovány stále nové antioxidanty, které bude třeba dále podrobně zkoumat. (Štípek, 2000)

3.4.3 Antioxidační kapacita

Snaha o objektivní stanovení antioxidantů a jejich množství následovala po zjištění, že jejich přítomnost snižuje pravděpodobnost vzniku mnohých onemocnění a poškození buněk organismu. Více než stanovení jejich kvantitativního množství je snaha o zjištění velikosti jejich antioxidační aktivity, kterou má vlastně velká skupina látek. Z rozdělení antioxidantů také vyplývá jejich rozdílnost ve způsobu inaktivace volných radikálů, a to znesnadňuje nalezení optimální metody stanovení antioxidační kapacity.

Celková antioxidační kapacita je veličina, která nám pomáhá stanovit některé bioaktivní látky. Představuje souhrn všech látek obsažených v tekutině a stanovuje se biochemickými metodami, mezi které můžeme řadit metody zahrnující přepočty na Trolox či kyselinu askorbovou. U antioxidační kapacity jde tedy o schopnost látek odolávat či zabraňovat oxidační degradaci dalších sloučenin. (Kopřiva, 2011)

Parametrem antioxidační kapacity je antioxidační aktivita. Ta může být ovlivněna mnoha faktory, jako například koncentrací antioxidantů, přítomností dalších antioxidantů, pH roztoku, nebo přítomností dalších látek, oxidačních činidel, iontů kovů s proměnlivou valencí. Také fyzikální faktory, jako jsou teplo, světlo a další, mohou mít na antioxidační aktivitu podstatný vliv. (Rěblová, 2011)

V dalších dílech můžeme narazit na rozdílné definice, jak například upozorňuje Stratil (2007). Ten udává, že antioxidační aktivita ukazuje za daných podmínek v reakční metodě chemickou reaktivitu, a je proto nepřesné označovat tuto hodnotu jako celkovou antioxidační aktivitu. Antioxidační kapacita je pak podle něj vyjádřením výsledku získaného rozdílnými metodami. Pak je celková antioxidační kapacita volně definovaným výrazem.

V další definici je antioxidační aktivita charakteristikou počáteční dynamiky průběhu antioxidačního procesu za určité koncentrace antioxidantů. A antioxidační kapacita poskytuje informace o tom, jak dlouho trvá antioxidační účinek. (Šulc, 2007)

Podobně je definována antioxidační kapacita jako celková síla všech antioxidačních látek nacházejících se v živém organismu, které společně působí proti negativním vlivům přítomných volných radikálů. Průběh a rychlost těchto reakcí je pak označován jako antioxidační aktivita. (Hřebíčková, 2009)

3.4.4 Metody stanovení antioxidační kapacity

Lze použít různých metod ke stanovení antioxidační kapacity. Mohou to být metody založené na hodnocení eliminace kyslíkových radikálů (jako je metoda ORAC), metody založené na vychytávání OH radikálů, metody založené na eliminaci volných radikálů DPPH a ABTS (metody TEAC) nebo

metody založené na hodnocení redoxních látek, kam patří například metoda FRAP. Z dalších metod ještě zmíníme elektrochemické metody, kde je například cyklická volumetrie nebo HPLC metoda s elektrochemickou detekcí. (Paulová, Bochořáková, Táborská, 2003)

Podle parametrů, které jsme zvolili pro sledování, můžeme dělit i metody pro stanovení antioxidační kapacity, kdy rozdělení a definice konkrétní metody je na základě použitého reagentu. Tím je zpravidla vybraný druh radikálu inaktivovaný antioxidanty, které jsou přítomny ve sledovaném vzorku. Výsledné množství inaktivovaného radikálu ve zkoumaném vzorku je změřeno a porovnáno s množstvím inaktivovaného radikálu ve variantě, kde byl použit standard, na nějž se antioxidační kapacita vyjadřuje.

Jak bylo zmíněno výše, při měření se používá k porovnání určitý druh standardu, není ale přesně určeno, který by se měl standardně používat. Jde ale vždy o chemickou látku s antioxidačními vlastnostmi, kterou lze vyrobit či získat v chemicky čistém stavu.

Nezákladnější dělení metod stanovování antioxidační kapacity je na **základě typu chemické reakce**. Zde můžeme rozlišit:

1. **HAT** (Hydrogen Atom Transfer), kde při reakci dochází k přenosu atomu vodíku
2. **SET** (Single Elektron Transfer), kde dochází při reakci k přenosu elektronu. (Huang *et al.*, 2005)

Oba dva tyto typy chemických reakcí se mohou objevit současně, ale při rozdílném mechanismu reakcí je potenciál i kinetika vedlejších reakcí rozdílná. Reakce, která převládá, je potom dána převážně druhem antioxidantu, rozpustností, druhem použitého média, ionizačním potenciálem, rozdělovacím koeficientem a disociační energií vazby vodíku na antioxidant. (Wright *et al.*, 2001)

Metody pro měření antioxidační kapacity na základě **polarity reagentu** dělíme na ty:

1. S **lipofilním reagentem**, kam můžeme řadit ve vodě nerozpustné a málo rozpustné látky při měření oxidace lipidů.
2. S **hydrofilním reagentem**, kam spadají látky ve vodě rozpustné.

1) HAT metody

Jak bylo zmíněno, metody v této skupině měří schopnost inaktivace volných radikálů dodáním atomu vodíku. Hlavním principem zde je kompetitivní kinetika. Generátorem je stále dodávaný volný radikál, o který soupeří standardní antioxidant a měřený vzorek. O co je větší antioxidační kapacita zkoumaného vzorku, o to více standardního antioxidantu zůstane nepoškozeno. Měří se tedy množství standardu, které nezreaguje a je přepočítáváno na antioxidační kapacitu sledovaného vzorku. (Prior *et al.*, 2005)

Měřenými hodnotami ale v tomto případě mohou být také produkty vzniklé při oxidaci standardu nebo spotřeba kyslíku nutného k tvorbě peroxylových radikálů. Nevýhodou u těchto metod je používání syntetických antioxidantů jako standardů. Tyto nerepresentují fyziologické podmínky, ale zato je jejich složení přesně definované a dá se zopakovat. Také u těchto metod může chybné údaje vydávat přítomnost redukčních látek, které působí synergicky.

Mezi metody HAT řadíme:

- ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) – měří schopnosti inhibovat oxidaci indukovanou peroxylovým radikálem β -pycoerrytrinu jeho oxidačním činidlem ABAP-2,2-azobis-2-metyl-propionamidinem.
- TRAP – obdoba metody ORAC, založená na principu zpomalení oxidace cílového reagentu přidaným (měřeným) antioxidantem, kde jako radikál slouží peroxylový radikál vytvářený tepelným rozkladem ze sloučeniny AAPH/ABAP.
- CB – jde o metodu podobnou předchozím, kde dochází k odbourávání krocínu nebo karotenu peroxylovým radikálem ROO•/LOO• generovaným AAPH nebo excitovaným lipidy.
- ILO – tato metoda je založena na principu umělé autooxidace kyseliny linolenové nebo LDL působením AAPH nebo Cu^{2+} . (Prior *et al.*, 1999), kdy se oxidace zpomalí po přidání antioxidantů.

- IUO – metoda se používá k měření rychlosti spotřeby kyslíku, kdy je substrátem styren, indikátorem azoisobutyronitril a standardem tokoferol.

Každá z výše zmíněných metod má své uplatnění, ale i nevýhody, kvůli kterým se jí v některých případech vyhnout. Některé výhody mohou být například ty, že metoda ORAC byla kvůli možnostem rozšíření jejího uplatnění modifikována s použitím směsi acetonu a vody. (Wu *et al.* 2004, Huang *et al.*, 2002) Metoda TRAP má dobrou detekční schopnost pro všechny známé druhy antioxidantů přerušujících řetězovou reakci lipidů, ale je relativně náročná na čas. (Frankel, *et al.*, 2000) Podobné nevýhody jako metody ORAC a TRAP má i metoda CB. Tato metoda je ale navíc ještě velmi citlivá na udržení konstantní teploty. Použití Cu^{2+} u ILLO metody je problematické kvůli jeho reakci s peroxidanty lipidů a další nevýhodou této metody je i problematické získávání LDL, protože se jednotlivé získané šarže mohou lišit a to snižuje možnost reprodukovatelnosti metody. IUO metoda má mnoho nevýhod a proto se moc nepoužívá. Hlavní nevýhody zde jsou nereálný tlak kyslíku a také relativně nízká citlivost metody.

2) SET metody

Do této skupiny metod řadíme ty, při kterých dochází k přenosu elektronu.

Spadají sem metody:

- FC (Folin – Ciocalteu) – jde o metodu vytvořenou pro analýzu proteinů, ale brzy byla rozšířena i pro analýzu celkových antioxidantů ve vínech. (Singleton *et al.*, 1999) Při metodě dochází k oxidaci fenolu molybden-wolframovým reagentem. Nevýhodou této metody je velké množství látek nepatřících mezi zdraví prospěšné antioxidanty, které zvyšují naměřené hodnoty a také to, že reakce probíhá pouze v silně zásaditém prostředí a je tedy velmi náchylná změnám pH směsi.
- FRAP – metoda byla vyvinuta pro měření redukční schopnosti plasmy, ale následně byla několikrát upravena a přizpůsobena k použití při měření antioxidantů v rostlinných extraktech. (Proteggente *et al.*, 2002, Gil, 1999, Pellegrini *et al.*, 2003) Hlavním principem metody je přenos elektronu antioxidantu na železitou sloučeninu 2,4,6-tripiridil-s-triazin, kdy

při tomto procesu je trojmocný ion železa redukován na dvojmocný. Tento je pak barevný a jeho koncentraci lze změřit na spektrofotometru při vlnové délce 593 nm. (Benzie, Strain, 1996) U metody jde hlavně o redukční schopnost sledovaného vzorku a mnohé antioxidanty tak nejsou metodou detekovatelné. Vysoké hodnoty naměřené FRAP metodou mohou poukazovat na schopnost látek stát se prooxidanty, a tím být v určitých podmínkách propagátory radikálových reakcí. (Cao *et al.*, 1997)

- DPPH – u této metody je využíváno schopnosti 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu existovat jako radikál a reagovat s vodíkovými donory. Tento dusíkový radikál je stabilní, a proto je i komerčně dostupný a není nutné jej generovat jen před analýzou. Radikál je fialově zabarvený a při metodě DPPH dochází k měření poklesu zabarvení vzorku, který je úměrný množství inaktivovaného radikálu antioxidanty. Pokles absorbance je měřen spektrofotometricky při vlnové délce 515nm. (Bondet *et al.*, 1997) U látek se silnými vodíkovými vazbami, jako jsou například metanol a etanol, je ale průběh reakce velmi pomalý a je též problém nepřístupnosti velkých molekul antioxidantu k reakčním místům DPPH. (Cadenas *et al.*, 2002) Celkově je ale metoda často používána, je rychlá a jednoduchá.
- TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) zvaná též ABTS – je další často používaná jednoduchá metoda. Jejím principem je vytváření radikálů pomocí oxidantu a ABTS, kde je vzniklý radikál barevný a sledované antioxidanty tento radikál inaktivují, čímž snižují zabarvení. K vyhodnocení se používají vlnové délky 415 nm a 734 nm. (Cano *et al.*, 2000)
- CUPRAC, AOP-490 – obě tyto metody jsou velmi podobné FRAP, ale železné ionty v reakci jsou nahrazeny ionty mědi. U CUPRAC metody jde o neocuproin (2,9-dimetyl-1,10-fenantrolin), který má absorpční maximum v 450 nm a v metodě AOP-490 se užívá batocuproin (2,9-dimetyl-4,7-difenyl-1,10-fenantrolin) s absorpčním maximem ve 490 nm. (Apak *et al.*, 2004)

- PB – u této metody je redukován hexakynoželezitan fenolovými sloučeninami na hexakynoželeznan zbarvený modře. (Price *et al.*, 1977)
- 4AAP – je metoda vhodná pro stanovení fenolu, glukózy a peroxidu. Užívaná je málo a případně pouze u vína. 4-AAP (4-aminoantipyrin) tvoří v alkalickém prostředí s fenoly červené barvivo a je možné stanovení spektrofotometrem při vlnové délce 510 nm. (Stratil *et al.*, 2006)
- DMPD – metoda užívaná u hydrofilních sloučenin je založená na oxidaci N,N-dimetylfenylendiaminu chloridem sodným za vzniku barevného roztoku, který lze měřit při 505 nm. Přítomnost antioxidantu inhibuje celou reakci. (Schleisier *et al.*, 2002)
- Sonoluminiscenční stanovení antioxidační kapacity – při této metodě se využívá ultrazvuku ke generování reaktivních forem kyslíku akustickou kavitací. Takto vzniklé radikály reagují s látkami v okolí a tím tvoří další formy radikálů. (Mcmurray *et al.*, 1999) Přidá se menší množství luminolu a vzniklé radikály jej napadají. Přidáním antioxidantu, který bude inaktivovat volné radikály, se sníží světelná odezva luminolu a pokles této hodnoty lze vyjádřit jako antioxidační kapacitu, která je porovnávána s libovolným antioxidantem. Pokles antioxidační kapacity se ovšem neprojevuje úměrně, ale zato velice přesně. (Yingchun *et al.*, 2010)

3) Metody určující inaktivační schopnost kyslíkových radikálů

- TOSC – metoda, kde se vytváří etylen a ten je následně měřen pomocí plynové chromatografie. Jedná se o složitou a zdlouhavou metodu, kde je nutné časté opakování a nakonec složité matematické vyhodnocení. (Lichtenthaler *et al.*, 2005)
- SOS – při této metodě je generován superoxidový radikál a kyselina močová, kdy obě tyto složky lze detekovat spektrofotometricky při vlnových délkách 290 nm a 550 nm. Výsledky metody SOS je třeba velice složitě vyhodnocovat. (Arts *et al.*, 2003)
- Inaktivace peroxidu vodíku – jde o oxidaci peroxidu vodíku peroxidázou a přítomnost antioxidantu tuto reakci inhibuje. Výsledky jsou ale těžko interpretovatelné, protože povaha reakcí je nejednoznačná a mohou

probíhat naráz různé reakce s rozdílnou kinetikou. (Martínez-Tomé *et al.*, 2001)

- Inaktivace hydroxylového radikálu – jde o měření schopnosti inhibice hydroxylového radikálu antioxidanty, kdy je měřen úbytek fluorescence s a bez antioxidantu v roztoku. Metodu lze dobře vyhodnocovat a je použitelná i pro stanovení chelatační schopnosti antioxidantů ke kovům. (Ou *et al.*, 2002)

4) Chemiluminiscenční metody

- CL – principem metody je měření antioxidační kapacity na základě reakcí radikálového oxidantu se sloučeninou markeru, kdy je generováno světlo v excitovaném stavu. Při přítomnosti antioxidantu je intenzita generovaného světla omezována. (Whitehead *et al.*, 1992) K vyhodnocení slouží čas potřebný ke snížení generování světla. Metoda je velmi citlivá a je třeba použití citlivých přístrojů, také ale reakce probíhající během doby měření mohou ovlivňovat naměřené hodnoty. (Cadenas *et al.*, 2002)
- PCL – u této metody je hlavním principem generování superoxidového radikálu z fotosenzitizéru působením světla. Fotosenzitizér a zároveň i reagent je v reakci luminal. U reakce jde o zaznamenání intenzity světla vzniklého v průběhu reakce. Při přítomnosti antioxidantu je opět intenzita světla v průběhu reakce snížena. Je třeba speciální přístroj Photochem Bux určený pro měření antioxidantů touto metodou. (Prior *et al.*, 2005)

Existují i další metody pro stanovení antioxidační kapacity, které používají různé principy a mnohé jsou ve stádiu výzkumu. Z výše zmíněných metod pro stanovení antioxidační kapacity se zaměříme na dvě hlavní, které byly použity dále v praktické části. Zde si znovu stručně přiblížíme jejich charakteristiky a principy.

3.4.4.1 Metoda DPPH

Jedná se o jednu ze základních metod pro stanovení antioxidační aktivity. Je založena na principu reakce testované látky se stabilním radikálem difenylpikrylhydrazylem – DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl). Při této reakci se redukuje radikál za vzniku -H (dyfenylpikrylhydrazin) a nejčastěji

se toto stanovení provádí spektrofotometricky. (Paulová, Bochořáková, Táborská, 2003)

3.4.4.2 Metoda FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Potential*)

Metoda FRAP je založena na redoxní reakci, kdy reagují antioxidanty vzorku s komplexem Fe^{3+} 2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin) (Fe^{3+} -TPTZ). Sleduje se nárůst absorpance při vlnové délce 593 nm, který odpovídá množství komplexu Fe^{3+} -TPTZ a který je pak mírou antioxidační kapacity vzorku. Tato metoda má ale nevýhodu pro stanovení polyfenolických látek a thiolů ve vzorku. Probíhá v nefyziologicky nízkém pH (3,6) a polyfenolické látky a thioly pak nejsou zachyceny, protože s komplexem reagují velmi pomalu. Metoda FRAP tak jen zobrazuje schopnost látek vzorku redukovat ionty Fe^{3+} . (Paulová, Bochořáková, Táborská, 2003)

3.5 Konzervace mléčným kvašením

Většina potravinových druhů se svými vlastnostmi řadí mezi potraviny, které snadno podléhají zkáze. Z tohoto důvodu se pro prodloužení jejich trvanlivosti používá celá řada konzervačních metod. Řada moderních konzervačních metod je založena na snaze respektovat a zachovávat nutričně významné složky surovin a produktů a také jejich smyslové vlastnosti. (Ingr, 1999, Cagno *et al.*, 2013)

Mléčné kvašení zeleniny je jeden z nejstarších způsobů konzervace pro delší uchování vybraných zeleninových druhů. Mléčné kvašení neboli fermentaci provádí morfologicky heterogenní skupina mikroorganismů – bakterií mléčného kvašení (*Lactobacteriaceae*), které mají specifické nároky na prostředí a výživu. Protože neobsahují cytochromy, nemají ani dýchací řetězec a chybí jim i běžné anabolické dráhy. Jedná se ale o fermentující organismy. (Balaščík, 2001)

Mléčným kvašením se rozumí komplexní mikrobiologický pochod ovlivnitelný mnoha činiteli. Mezi ty hlavní a nejvíce patrné lze zařadit teplota, koncentrace soli a přístup vzduchu k surovině či jeho zamezení. (Horčín, 2004)

3.5.1 Bakterie mléčného kvašení

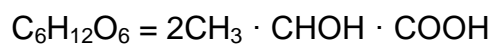
V procesech mléčného kvašení převládají bakterie rodu *Lactobacillus*. K hlavním zástupcům patří skupiny *Lactobacillus plantarum* a jim příbuzné bakterie z *Lactobacillus arabinosus*, *Lactobacterium cucumeris fermentaci*, *Lactobacillus casei* a další. Jedná se hlavně o streptobakterie, tedy o nevětvené tyčinky, pospojované řetízky, které jsou samostatně nepohyblivé. Zmíněné bakterie zkvašují cukry na převládající kyselinu mléčnou a druhotné produkty, za které můžeme zmínit acetylcholin a některé žádoucí aromatické látky.

Kromě výše zmíněných hlavních zástupců jsou při mléčném kvašení přítomny i další důležité druhy mikroorganismů. Z nich lze zmínit heterofermentativní koky *Leuconostoc mezenteroides*. Je to fylogeneticky méně příbuzná betaforma, které je přisuzována schopnost způsobit rychlý vzrůst kyselosti prostředí v době, kdy dochází k přechodu mezi první a druhou fází mléčného kvašení. Tyto koky tvoří směs kyselin, a to kyseliny mléčné a octové,

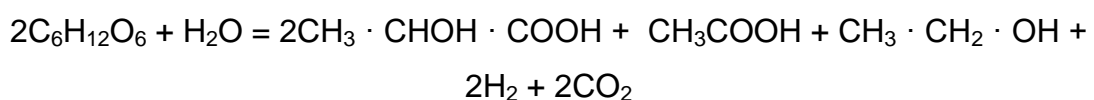
kteře jsou zastoupeny přibližně v poměru 1:1. Těto směsi se může vytvořit až 1 %, ale po počátečním rychlém rozvoji koky ustupují tyčinkovitým streptobakteriím, které způsobují pozvolné prokvašení celé hmoty, a to i do hloubky. Hlavní důvod, proč heterofermentativní koky ustoupí tyčinkovitým streptobakteriím, je citlivost koků na zvýšenou kyselost prostředí.

Za mléčné kvašení je považován proces, kdy ze sacharidů metabolickou činností mikroorganismů vždy vznikne kyselina mléčná a podle kvantitativního a kvalitativního zastoupení této kyseliny jsme schopni rozlišit heterofermentativní a homofermentativní variantu procesu mléčného kvašení.

Homofermentativní varianta se vyznačuje tím, že jediným produktem je kyselina mléčná a lze ho také nazývat mléčným kysáním. Je způsobeno přítomností pravých bakterií mléčného kvašení *Lactobacillus plantarum* a probíhá podle rovnice:



V případě heterofermentativní varianty se jedná o kvašení, kdy kromě kyseliny mléčné vznikají vedlejší produkty, plyny a lze je označovat i jako kvašení. Probíhá za přítomnosti nepravých bakterií mléčného kvašení, které jsou směsí více druhů. Vedlejším produktem bývá v první řadě kyselina octová, dále pak etanol a CO₂. Průběh vyjadřuje rovnice:



Výtěžnost kyseliny mléčné se v obou variantách výrazně liší. U homofermentativního kysání je teoretická výtěžnost přibližně 46%, kdežto u heterofermentativního může tato výtěžnost díky vedlejším produktům a procesům vzrůst až k 60%. Na průběhu mléčného kvašení se ale celkově angažuje až 230 různých druhů bakterií. (Kyzlink, 1958)

3.5.2 Použití čistých kultur

Při kvašení je prioritní získat vysokou jakost konečného výrobku, proto se k tomuto účelu často používají čisté kultury. Záleží ovšem na surovině, zda je použití čisté kultury vhodné, či je lepší použití spontánního kvašení.

Čisté kultury se používají ve formě zákvasu. Tímto zákvasem se prolévají vrstvy stlačované zeleniny ve kvasných nádobách. Pro čisté kultury je nutné použití mléčných bakterií a kvasinek, které při své činnosti netvoří produkty metabolismu ve formě plynů. Dva hlavní zástupci používaných druhů pro čisté kultury jsou *Lactobacillus plantarum* a *Sacharomyces brassicae fermentaci*. Při používání čistých kultur je velmi důležité nejen dodržení technologického postupu, ale i správné hygieny a provádění správné sanitace, protože je vysoké riziko zavlečení nežádoucích mikroorganismů, kvůli kterým by použití čistých kultur naprosto ztratilo svůj smysl.

Dodržení správného fermentačního postupu s použitím kvasných kultur, okyselováním a dodržováním správných teplot a podmínek v průběhu celého kvasného procesu, jsou základními podmínkami procesu. Pokud jsou důsledně dodrženy, získáme produkty s požadovanými výživovými i sensorickými vlastnostmi. (Drdák, 1989)

Pokud chceme kvasit běžné zelí, není potřeba přidávat zákvas čisté kultury bakterií mléčného kvašení. Na zelných listech se nacházejí v přirozené mikroflóře všechny druhy mikroorganismů potřebných ke kvašení. Z tohoto důvodu není žádoucí, aby před krouháním docházelo k praní zelných hlávek, doporučuje se pouze odstranit košťály a nahnilé, plesnivé a silně znečištěné povrchové listy. (Cagno *et al.*, 2013, Kyzlink, 1958)

3.5.3 Produkty mléčného kvašení

Mléčným kvašením vznikají dva hlavní produkty, kterými jsou kyselina mléčná a kyselina octová, které redukuje pH prostředí na hodnotu inhibující bakterie hnilobných, patogenních a toxikogenních procesů. Jedny z nejzávažnějších, velice nežádoucích a často diskutovaných zástupců toxikogenních bakterií jsou *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* nebo *Clostridium botulinu*. Z hnilobných bakterií jsou to například bakterie rodů *Clostridium* a *Pseudomonas*, z patogenních bakterií například rod *Salmonella* a zástupce druhu *Listeria*. (Horčín, 2004)

Z hlediska konzervace je nejvýznamnější vedlejší produkt mléčného kvašení kyselina octová, které bývá ve fermentovaném produktu přibližně 0,3 - 0,4 % z celkové hmotnosti. Optimální poměr kyseliny mléčné a kyseliny

octové v produktu by měl být 3:1. Z vedlejších produktů se dále tvoří menší množství látek, které přispívají k zaoblení a ucelení výsledné chuti produktu. Patří k nim kyselina jantarová, propionová, mravenčí, kapronová a valerová. (Balašík, 1992)

3.5.4 Průběh mléčného kvašení

Hlavním principem je, že k nakrouhané či nadrcené surovině je přidána sůl či její roztok, a tím se uvolní zbývající buněčné šťávy v surovině. Přítomné bakterie mléčného kvašení přeměňují cukry obsažené v tekutině na kyselinu mléčnou. Záleží ovšem na vhodných podmínkách jako jsou v první řadě teplota a anaerobní prostředí. Kromě žádoucích kmenů bakterií jsou ve směsi přítomny i zástupci dalších mikroorganismů, které mohou vytvářet alkohol, kyselinu octovou, máselnou a jiné nežádoucí látky. Tyto vedlejší mikroorganismy jsou ve směsi ale ovlivňovány během kvasného procesu například změnou kyselosti prostředí (pH). (Kyzlink, 1988, Cagno *et al.*, 2013)

3.5.4.1 Fáze 1

Pro začátek je třeba surovinu nařezat či nadrtit a tuto krouhanku nebo drť pak s průběžným přidáváním soli udusat do kvasných nádob. Pak nastupuje první fáze mikrobiologických a chemických aktivit. Rostlinné pletivo suroviny odumírá a rozvíjejí se v celé hmotě anaerobní organismy. Ty spotřebovávají kyslík, který je v hmotě ze vzduchu nebo uvolněný z odumírajících pletiv. Mezi tyto anaerobní mikroorganismy patří bakterie ze skupiny *Coliaerogenes*.

V této první fázi mléčného kvašení jsou tvořeny především aromatické a chuťové látky kvašeného produktu. Vedle hlavní kyseliny mléčné zde probíhá i tvorba kyseliny octové, mravenčí, jantarové a alkoholů. Protože během této fáze probíhá i tvorba plynů, je časté silné pění. (Kyzlink, 1958)

3.5.4.2 Fáze 2

Ve druhé fázi mléčného kvašení převládají procesy způsobené heterofermentačními mléčnými bakteriemi. Ty v této fázi produkují až 1% výše zmíněných produktů a zároveň u toho dochází i k další produkci kyseliny mléčné. Významnými zástupci jsou v této fázi bakterie ze skupiny *Leuconostoc mesenteroides*.

První a druhá fáze společně trvají přibližně 10 dní. Tato doba je ovšem závislá na podmínkách a prostředí, kde ke kvašení dochází. (Kyzlink, 1958)

3.5.4.3 Fáze 3

Třetí fáze mléčného kvašení je nejdůležitější z celého procesu. Převládá zde činnost homofermentativních mléčných bakterií, které při své činnosti neprodukují plyny ani jiné zplodiny a produkty metabolismu. Celý proces je přísně anaerobní za ideálních teplot kolem 20 °C. Hlavní zástupce je v této fázi *Lactobacillus plantarum*. V 1 ml kysané šťávy suroviny se může vyskytovat až několik milionů jedinců tohoto druhu.

To však platí pouze za dodržení příznivých podmínek. Pokud jsou podmínky nepříznivé, může na počátku této fáze nastoupit nesprávná varianta kvašení a může dojít k vývoji nežádoucích bakterií, které produkují kyselinu máselnou. Vliv teploty pro vznik kyseliny mléčné můžeme pozorovat na zpomalení mikrobiologické aktivity a tím i nižší tvorbě kyselin, pokud se teploty sníží. Tím také právě může docházet ke vzniku nežádoucích látek v produktu. Podobně, jako nízké teploty, působí i teploty vyšší než 30 °C. (Kyzlink, 1958)

Ve třetí fázi se v příznivých podmínkách začíná hromadit kyselina mléčná, která potlačuje činnost samotných mléčných bakterií. Zároveň se mohou v kyselějším prostředí začít dobře množit plísně a povrchové kvasinkové mikroorganismy, což může vést k odkyselení produktu a s tím spojený rozpad kyseliny mléčné. Tyto mikroorganismy se řadí mezi aerobní a mohou snášet i vysoké teploty, proto je doporučováno snížení teploty produktu na 0 – 2 °C. Tímto postupem je možné zachovat vysokou jakost produktu po delší čas. (Drdák, 1989)

3.5.4.4 Fáze 4

Poslední fází mléčného kvašení je fáze čtvrtá. Převládá v ní činnost *Lactobacillus brevis*, kvasinek a dalších heterofermentativních bakterií. Poslední zbytky cukrů ve hmotě jsou přeměňovány na kyselinu mléčnou, alkohol a další látky.

Celkově trvá celý proces mléčného kvašení za optimálních podmínek 3 - 6 týdnů. Pokud jsou teploty pod 15 °C, zpomalí se celý proces fermentace až na

několik měsíců. Teploty pod 15 °C totiž způsobí, že jsou částečně vyřazeny konkurenční bakterie octového a máselného kvašení, kdy pro octové kvašení jsou ideální teploty 27 - 35 °C a pro kvašení máselné teploty v rozmezí 35 - 41 °C. Proto je doporučováno počáteční rozkvašené zeleninové hmoty při teplotách kolem 21 °C a následně ji pro kvasný proces uložit do nižších teplot. V chladnějším prostředí je sice prodloužen čas celého procesu kvašení hmoty, ale hloubka jejího prokvašení je při nižších teplotách lepší. (Kyzlink, 1958)

3.5.5 Mléčné kvašení jako konzervační metoda

Kvasné metody a nakládání do soli jsou jedny z nejstarších metod konzervace, které předcházely tepelným způsobům konzervace, mezi které patří pasterace a sterilace, i konzervačním způsobům používajícím nízké teploty, jako je mražení. Po zavedení konzervace teplem a nízkými teplotami do praxe společně se zavedením vhodných obalových materiálů, uzávěrů a také chladících a mrazících zařízení, jsou tyto varianty úchovy potravin dostupné i pro běžnou domácnost. Tím bylo ale v průmyslově vyspělých oblastech mléčné kvašení postaveno až na druhé místo v metodách úchovy potravin. V dnešní době ale mléčné kvašení získává opět svůj význam, protože se do popředí dostává snaha o výrobu co nejkvalitnějších produktů. (Drdák, 1989)

U produktů mléčného kvašení má vzniklá kyselina mléčná a některé přidružené produkty velké konzervační účinky, které se projevují především proti hnilobným mikrobům. Kyselina mléčná sama o sobě v koncentraci vyprodukované mléčným kvašením by nestačila k zakonzervování produktu, proto je důležitá i fáze, kdy se v produktu vytvoří jisté množství kyseliny octové, antibiotik a etanolu. Tohoto jevu je využíváno při klasické metodě biokonzervace používané například při výrobě kvašeného zelí, okurek a také u dalších kvašených zeleninových produktů. (Kyzlink, 1988)

3.5.6 Kvasné nádoby

U nádob určených pro kvašení je hlavním parametrem materiál, ze kterého jsou vyrobeny. Mezi hlavní vlastnosti takového materiálu patří, že jejich vnitřní povrch nesmí ohrožovat průběh kvašení a musí být také odolný vůči kyselinám. Dalším důležitým požadavkem je snadná uzavíratelnost nádoby, aby bylo možné zajistit surovině a kvasnému procesu anaerobní prostředí.

Nejčastěji jsou tedy kvasné nádoby zhotoveny ze dřeva, kameniny, skla a dalších materiálů splňujících požadavky. (Kyzlink, 1958)

Vhodná je také možnost zatížení suroviny v nádobě, protože během kvašení je surovina nadzvedávána plyny, které během kvašení vznikají a mohlo by tak dojít k nadzvednutí uzávěru a porušení anaerobního prostředí v nádobě. (Drdák, 1989)

3.5.7 Skladování kvašených produktů

Mléčně kvašená zelenina je i po skončení procesu kvašení živou potravinou a tím je ovšem také podmíněna její údržnost. Při následném skladování produktu je hlavním skladovacím faktorem teplota a její udržení v optimálním rozmezí 0 - 10 °C. Skladovací teploty nižší nebo vyšší jsou nevhodné, v daných případech může dojít k rozvinutí mikrobiologických procesů, a to i těch nežádoucích. (Kyzlink, 1958)

Procesem sterilace, při kterém se produkt zahřeje na 70 - 75 °C a následně plní do obalových materiálů a chladí, lze zvýšit trvanlivost výsledného produktu. (Balašík, 2001)

3.5.8 Kazy a znehodnocení kvašených produktů

V případě, že dojde k nečistému mléčnému kvašení, dochází v produktu ke vzniku nejen kyseliny mléčné, ale i kyseliny octové, oxidu uhličitého, vodíku a dalších, velice často nepříjemně páchnoucích látek, mezi kterými mohou být kyselina máselná a sirovodík. Původci vzniku těchto nežádoucích látek jsou *Esterichia coli*, *Lactobacillus brevis* a *Leuconostoc mezenteroides*. Pro tyto nežádoucí procesy nečistého a smíšeného kvašení není na překážku anaerobní prostředí hmoty ani její vysoká kyselost. Mohou probíhat v těchto nepříznivých podmínkách stejně, jako za přístupu vzduchu. (Kyzlink, 1988)

Mezi hlavní z nežádoucích procesů můžeme zařadit mikrobiologické procesy a jejich následné látkové změny produktu. V hlavních složkách zeleniny jsou v této skupině přítomny bakterie, kvasinky a plísňe a pro prodloužení úchovnosti surovin a produktů ze zeleniny je proto tedy důležité, do jaké míry se podaří z hmoty odstranit tyto původce nežádoucích mikrobiálních změn. V počátečních fázích se tyto nežádoucí změny projevují změnou barvy

a konzistence suroviny či produktu a také změnou jejich chuťových a aromatických vlastností. V další fázi pak dochází k rozsáhlejšímu rozkladu suroviny spojenému se ztrátou cenných živin. Nakonec dochází k výrazným změnám ve vlastnostech celé suroviny a výsledného produktu a k jeho celkové degradaci. (Němec, 1987)

Na zeleninu se mnoho mikroorganismů dostává již během vegetace. Vliv má na to působení hmyzu, prachu i případný styk se zemí, ovšem na zdravých plodinách a plodech se tyto saprofyty nemnoží a k jejich případnému rozvoji dochází až tehdy, nastanou-li pro ně příhodné podmínky. Příkladem těchto podmínek mohou být různá onemocnění pletiva plodiny, její přezrání i sklizeň. Pro bakterie jsou ideálními hostiteli zástupci zeleninových druhů, protože zelenina má nižší obsah kyselin. Pro zástupce plísní a kvasinek jsou to naopak druhy ovocné, které má pro ně díky vyššímu obsahu kyselin i příznivější prostředí. (Ingr, 1999)

3.5.8.1 Bakteriální napadení

Nejpočetnější skupinu zástupců mikroorganismů tvoří bakterie, jednobuněčné organismy, které bývají ve tvarech tyčinek, spirál nebo kulovité a které se za normálních příznivých podmínek množí dělením. Organismy to mohou být jak aerobních druhů, tak i druhů anaerobních.

Závažné problémy v surovině mohou způsobit také sporotvorná klostridia a bacily. Tyto skupiny mikroorganismů jsou velmi odolné k teplotě a dalším omezujícím vlivům díky tomu, že jejich spory obsahují konstitučně vázanou vodu, a tak jsou fyziologicky suché. (Horčín, 2004)

Pro každý jednotlivý druh i rod bakterií je specifický jiný vztah k potravinám a surovinám rostlinného původu, a tak i jejich reakce na zásahy v prostředí a jeho změny jsou každému rodu a druhu specifické. (Ingr, 1999)

3.5.8.2 Vliv kvasinek

Kvasinkami nazýváme převážně jednobuněčné organismy, které se řadí do tříd *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* a *Deuteromycetes*. Na rozdíl od výše zmíněných bakterií mají spory kvasinek mnohem menší odolnost vůči vnějším vlivům za nepříznivých podmínek prostředí. Kvasinky se množí pučením a jen

ve velmi ojedinělých případech může dojít k rozmnožování jedinců dělením. (Kyzlink, 1958)

Pro kvasinky je ideální kyselé prostředí, které musí obsahovat alespoň minimální množství kyslíku, které je pro ně nezbytné. Kvasinky jsou také velice náročné na zdroje energie. Jejich primárním zdrojem je cukr, a to v mnoha svých formách. Přesný typ cukru si kvasinky často vybírají. Dalšími významnými látkami pro kvasinky jsou některé vitamíny, minerály a význam má i amoniakální dusík. (Drdák, 1989)

3.5.8.3 *Napadení plísněmi*

Z botanického hlediska řadíme plísně do kategorie pravých hub. Jsou to jedno či více buněčné houby, které vytvářejí rourkovitá a nálevkovitá vlákna, která nazýváme hyfy, a následně vytvářejí makroskopicky viditelné porosty. Plísně preferují prostředí s vyšším obsahem cukrů a nejlépe s pH 3-6. Z hlediska teplot jsou plísně citlivé k zahřevu, ale dobře se mohou přizpůsobit nižším teplotám, a pokud jde o přístup kyslíku, jedná se o striktně aerobní organismy citlivé k rychlému pohybu vzduchu. Mnohé druhy plísní tvoří nebezpečné mykotoxiny a mnohdy i specifický zápach. (Ingr, 1999)

3.5.8.4 *Biochemické změny*

Chemickými a fyzikálně-chemickými pochody v živých organismech a strukturách jsou iniciovány biochemické pochody, které mají důležitý vliv i na fyziologické děje organismu a jejich projevy, jakými mohou být například růst či stárnutí. (Kyzlink, 1958)

V konzervářenském a zpracovatelském průmyslu mají hlavní význam biochemické pochody probíhající v plodu, který byl oddělen od matečné rostliny, protože tento zásah má velký vliv na porušení rovnováhy látkové výměny plodu před oddělením. To má za následek porušení stávajícího sledu enzymatických reakcí a počátek změn jakosti daných potravin. Typickými činiteli těchto biochemických změn jsou hlavně kyslík, voda, světelné záření a teplota, ale i různá chemická činidla. (Němec, 1987)

Podle skladovacích podmínek biochemické změny postupují různou rychlostí. Dochází ke změně vnějších vlastností suroviny i zhoršení její výživové

kvality. Kromě vzhledu, chuti a konzistence suroviny se mění i obsah vitamínů a cukrů. Přizpůsobením optimálních skladovacích podmínek lze většinu těchto nežádoucích biochemických změn podstatně ovlivnit. (Ingr, 1999)

3.5.8.5 Chemické látky

Přímý i nepřímý vliv na vlastnosti suroviny a produktu může mít i působení chemických činidel, která působí většinou při skladování plodiny. Mnohá chemická činidla jsou totiž významnými katalyzátory reakcí.

Mezi přísadami, které příznivě okyselují prostředí a tím mění jeho pH, na kterém je závislá stabilita výrobků, jsou organické kyseliny. Dvě hlavní převládající kyseliny jsou kyselina citronová a octová, dalšími pak jsou kyselina benzoová, sorbová a v některých případech se využívá konzervačních vlastností jejich solí.

Nepříznivé vlivy chemických látek jsou patrné například u kovů, které i v nepatrném zastoupení katalyzují nezvratné oxidační pochody, podílejí se na odbourávání vitamínu C přítomného v surovině a jsou i příčinou nežádoucích sensorických změn. Těmi mohou být změny chuti a vůně produktu i jeho barvy. Mezi tyto kovy patří železo, zinek, cín, hliník, měď a olovo a i když některé z nich jsou ve stopovém množství pro lidský organismus nezbytné pro správnou funkci metabolismu, ve vyšších množstvích jsou naopak škodlivé. Zvláště olovo, zinek a měď mohou způsobovat i otravy a z tohoto důvodu jsou jejich množství v potravinách přísně kontrolována normou. (Drdák, 1989)

3.5.8.6 Teplota

Mezi podstatné faktory ovlivňující většinu chemických, biochemických i fyzikálně-chemických pochodů patří teplota. Působení nízkých teplot nebo teplot pod bodem mrazu, dochází k narušení rostlinných pletiv a buněk, což jsou nepříznivé projevy, které mohou nastat i při krátkodobém působení těchto teplot. Po opětovném zvýšení teploty dochází u postižené suroviny většinou k rychlé zkáze. Podobné projevy mohou nastat i při delším působení vyšších teplot či jen náhlému zvýšení teplot. To se projevuje zrychlením chemických, biochemických a fyzikálně-chemických pochodů v surovině a tím dochází k nežádoucím změnám v chuti, barvě, konzistenci a vůni surovin i výsledných produktů. (Kyzlink, 1958)

3.5.8.7 Světlo

Působením světla na hmotu suroviny či produktu může docházet také k vnějším změnám hmoty a ke ztrátám její nutriční hodnoty, jelikož světelné záření patří mezi základní činitele mnohých oxidačních procesů.

Proti těmto nepříznivým projevům světelného záření je účinnou obranou použití neprůhledných či neprůsvitných obalů pro uchování potravin, nebo obalů, které pohlcují ze světla alespoň některé vybrané vlnové délky. K těmto možnostem je dobrým příkladem používání různých variant zbarveného skla.

Hlavní účinnou možností ochrany suroviny, polotovarů a finálních výrobků před světelným zářením je i její ukládání v temných skladech, do nichž je přístup záření zamezen úplně. (Němec, 1987)

3.5.8.8 Mechanické kazy

Jak zmiňuje Drdák (1989), z komplexního úhlu pohledu dochází mechanickým poškozením a následným vývojem v těchto místech ke zhoršení sensorické a tržní hodnoty suroviny i produktu. Dochází k urychlení biochemických změn a tato zraněná místa jsou příznivým vstupem pro nežádoucí mikroorganismy, kdy všechny tyto pochody vedou k nezvratné zkáze produktu.

Dle Kyzlinka (1958) patří k mechanickým poškozením produktů i některé fyzikálně-chemické procesy, kdy vlivem mechanického poškození je narušena biochemická rovnováha plodu a v závislosti na tom je urychleno kažení suroviny. K mnohým poškozením různého charakteru a závažnosti dochází u zeleniny i ovoce již během sklizně nebo vlivem požití hmyzem.

3.5.9 Přínosy a rizika kvašené zeleniny

3.5.9.1 Přínosy spojené s konzumací mléčně kvašené zeleniny

Na prvním místě v této oblasti je snaha o zvýšení podílu zeleniny v běžném jídelníčku. Hlavními přínosy by u kvašené zeleniny byla prevence nádorových a kardiovaskulárních onemocnění. Pro dnešní sedavou dobu je důležité také snížení denního příjmu energie společně se zvýšením podílu vlákniny ve stravě. Podle údajů české Společnosti pro výživu by denní příjem

ovoce a zeleniny měl dosahovat 600 g, a to v poměru ovoce k zelenině 1:2. (Dostálová *et al.*, 2004)

Mléčné kvašení zeleniny může přinášet výhody lepší stravitelnosti a také obsahem živých bakterií mléčného kvašení, které podporují celkové trávení stravy. Nezanedbatelný je také obsah vitamínů, který se u vybraných druhů zeleniny v průběhu kvašení může zvýšit. Velice důležitou roli hraje i konzervační stránka mléčného kvašení, kdy dochází k eliminaci nežádoucích patogenních mikroorganismů, a tím se zvýší údržnost a trvanlivost celého výrobku. To může být velmi důležitým kritériem pro oblasti s nedostatečnou úrovní kvality a dostupnosti potravin nebo pro jedince ve špatném sociálním postavení. (Battcock, Azam-Ali, 1998)

3.5.9.2 Možná rizika spojená s konzumací kvašené zeleniny

Kontraindikace s dietami

Při konzumaci mléčně kvašených produktů může docházet ke kontraindikaci s některými dietami. V některých případech může být nevhodný příliš vysoký obsah soli, který se u běžného kvašeného zelí z hlediska procesu kvašení a následné údržnosti pohybuje kolem 2 %. To může být problémem například pro osoby, které dodržují dietní režim omezující příjem soli. (Machala, 2008, Svačina *et al.*, 2008)

V případě diet šetřících je pro pacienty problémem vysoký obsah vlákniny, který se ve kvašené zelenině a hlavně kvašeném zelí nachází. Na druhou stranu je třeba zmínit, že u některých diet diabetických a redukčních jsou naopak tyto potraviny doporučovány. (Svačina *et al.*, 2008)

Biogenní aminy

Bakteriální činností v průběhu mléčného kvašení vznikají v produktu biogenní aminy. Ty mohou představovat určité riziko i přes to, že jejich obsah v produktech kolísá. Vznikají v produktech nejčastěji dekarboxylací aminokyselin na aromatické (fenyletylamin, tyramin), alifatické (kadaverin, spermidin, spermin, putrescin) a heterocyklické (tryptamin, histamin). (Karovičová, Kohajdová, 2005)

Přítomnost biogenních aminů v produktu může také značit stupeň kažení produktu, proto je nejdůležitějším preventivním opatřením hygienické zacházení se surovinami a také správné skladování konečných hotových produktů. (Komprda, 2004)

U biogenních aminů je znám antioxidační účinek, ale mají také pozitivní vliv na funkci nervového, cévního a imunitního systému. Dále je jejich vliv patrný také na regulaci buněčného metabolismu a růstu. (Karovičová, Kohajdová, 2005)

Opatrní by v tomto případě měli být jedinci alergičtí, pacienti léčení přípravky inhibujícími monoaminoxidázu (MAO - za běžných okolností zajišťuje jejich detoxikaci) a také osoby se zvýšeným celkovým příjmem biogenních aminů v potravě. (Komprda, 2004)

Závadné produkty

Mezi nejčastější rizika spojená s mléčně kvašenými produkty patří možnost, že u výrobku došlo k nějakému pochybení v průběhu výroby a ve výsledku je tento produkt z některého hlediska závadný. Tato závada může vzniknout u produktu ve třech možných úrovních procesu výroby. Může se v první řadě jednat o použití nekvalitních či jinak znehodnocených surovin v počátku výroby produktu, druhou možností pochybení může být špatný výrobní postup a třetí úroveň, kdy může dojít k pochybení, je při jeho skladování, kdy při nesprávných podmínkách (teplota, nádoby, doba, atd.) může taktéž dojít k nezvratným degradačním změnám již konečného produktu. (Kopec, 2000)

Každá z těchto tří úrovní procesu obsahuje faktory, které lze pozitivně i negativně ovlivnit. V první úrovni je třeba používat nepoškozená a čistá zelenina (u zelí se mají pouze odstranit první vnější znečištěné listy). Surovina, která je znečištěná prachem či půdou, poškozená nebo napadená nežádoucími mikroorganismy má urychlené procesy kažení a sníženou trvanlivost. Pokud se jedná o déle uchovávaný rostlinný materiál pro výrobu, během doby skladování postupně klesá jeho hodnota tím, že klesá podíl dobře fermentovatelných sacharidů a také obsah žádoucích bakterií mléčného kvašení. (Görner, Valík, 2004)

Nejčastějším faktorem při pochybení ve výrobním procesu je výsledné snížení obsahu kyseliny mléčné, protože nedošlo k dostatečnému rozvoji bakterií mléčného kvašení, nebo může dojít k převládající tvorbě kyseliny máselné, pokud se *Clostridium butyricum* při zvýšení teploty procesu zpracování přemnoží. Výsledný výrobek je pak sensoricky nepřijatelný stejně, jako projevy činnosti hnilobných bakterií.

Skladování výsledného produktu je závislé na faktu, že u druhotně neošetřených kvašených produktů se jedná o nižší údržnost. Je proto třeba dbát na správné skladovací balení výrobků, kdy je zamezeno přístupu vzduchu a také o správné skladovací podmínky, podmíněné 0 - 3 °C při maximální době skladování 15 dní. (Bartoš, Kopec, 1989)

3.5.10 Stanovení mléčného kvašení

Během procesu mléčného kvašení dochází k přeměnám cukrů obsažených v surovině na kyselinu mléčnou a další produkty. To je zapříčiněno činnostmi bakterií mléčného kvašení. Na rozdíl od kvašení etanolového, většina druhů mléčných bakterií zpracovává při své metabolické činnosti všechny běžné cukry. (Ingr, 1999)

Průběh mléčného kvašení lze sledovat pomocí charakteristického poklesu rozpustné sušiny zastoupené cukry ve hmotě a vzestupu titračních kyselin, kdy úbytek rozpustné sušiny je přímo závislý na vzestupu titračních kyselin. Surovina, která má v počátku kvašení větší podíl rozpustné sušiny a tedy vyšší počáteční množství cukrů, má i ve výsledku vyšší podíl titračních kyselin. (Sharma, Mishra, 2014)

4 Materiál a metodika

4.1 Materiál

4.1.1 Rostlinný materiál

Jako materiál pokusu v letech 2014 a 2015 bylo použito bílé a červené hlávkové zelí (*Brassica oleracea L. convar. Capitata*). V roce 2014 bylo bílé zelí ze školních pozemků v Lednici odrůdy Oklahoma, u červeného zelí šlo o odrůdu červeného Dobrovodského zelí poskytnutou Ing. Pavlouškem, která byla vypěstována ve Vranovicích. V roce 2015 se jednalo u bílého o odrůdu Portoza F1 a u červeného o odrůdu Pourovo červené, obě tyto odrůdy byly vypěstované opět ve Vranovicích a dodané Ing. Pavlouškem. U bílé Portozy F1 a Oklahomy se jednalo o typ zelí spíše vhodný ke skladování, u červeného Pourova a Dobrovodského šlo o červenou obdobu kruhárenského zelí.

Zelí bylo jako surovina k pokusu použito proto, že se jedná o jeden z tradičních kvašených zeleninových druhů. U kvašení zelí se stále používá starých klasických metod, kdy se nakrouhané zelí nechá spontánně kvasit pomocí přirozené mikroflóry, která se nalézá na povrchových listech zelných hlávek. I při komerčním zpracování často nebývá používána čistá kultura, ale spontánní kvašení, kterého bylo využito i v tomto případě.

Zelenina, která byla k pokusu použita, byla minimálně skladována před založením pokusů z důvodu zamezení většího mikrobiologického poškození suroviny, které by bylo nežádoucí.

4.1.2 Přístroje a pomůcky

- Spektrofotometr Specord ® 50 plus - od firmy Analytik jena
- Analytické váhy – KERN ABJ 320-4 – od firmy Kern
- Elektromagnetická míchačka – IKA MS 3 digital – od firmy IKA
- pH metr inoLab® Oxi 7310 – od firmy WTW
- Běžné laboratorní sklo
- Skleničky – vialky uzavíratelné s těsněním
- Mikropipety Eppendorf Research plus
- Manuální krouhač

4.1.3 Chemikálie a roztoky

- DPPH (2,2-difenyyl-1-pikrylhydrazil) – od firmy Sigma Aldrich
- FeCl₃ - od firmy Sigma Aldrich
- TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazin) – od firmy Sigma Aldrich
- HCl – od firmy Sigma Aldrich
- Kyselina octová – od firmy Merck
- Octan sodný - od firmy Merck
- Trolox – od firmy Merck
- Methanol – od firmy Sigma Aldrich
- Deionizovaná voda - zařízení Aqua osmotic
- NaOH – od firmy Sigma Aldrich
- Kamenná sůl (NaCl) – od firmy Solné mlýny

4.2 Metodika

4.2.1 Příprava rostlinného materiálu

Zelí bylo po odstranění povrchových znečištěných listů a košťálů nakrouháno na jemné proužky manuálním kruhadlem a s průběžným přidáváním porce soli namačkáno manuálně do sklenic. Podíl soli v každém vzorku byl 2 %, tedy bylo použito 20 g kuchyňské soli na 1 kg zelné krouhanky. Do každé sklenice se vzorkem bylo napěchováno 3,5 kg zelné krouhanky. Tvorba krouhanky je zachycena na obr. 4 v příloze, plnění sklenic na obrázku 5 umístěném také v příloze.

Při pěchování vzorků byl vyvinut takový tlak, že došlo k odstranění nežádoucích vzduchových kapes ve hmotě a krouhanka sama pustila vlastní šťávu, která vyplnila sklenice po okraj. Nebyla tedy přidávána vůbec žádná voda.

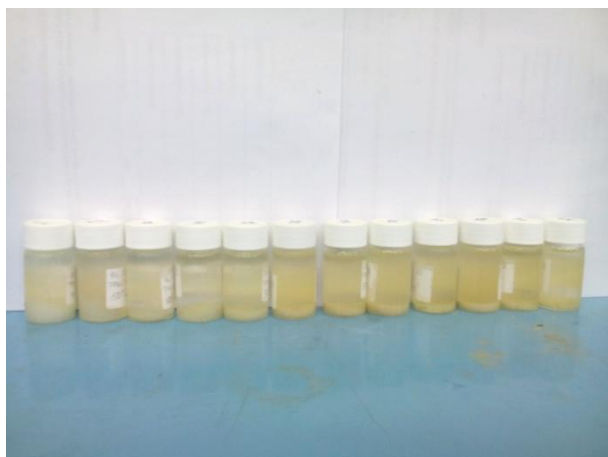
Následně byly dány dvě vrstvy igelitového krytí, jedna na hladinu a druhá přes hrdlo nádoby, jak je vidět na obr. 6 v příloze. Krytí na hrdle láhve bylo staženo gumou, aby byl zneprístupněn obsah pro vzduch.

Všechny nádoby byly uskladněny v místnosti s průměrnou teplotou 15 – 16 °C a v pravidelných intervalech byly odebírány vzorky k analýze.

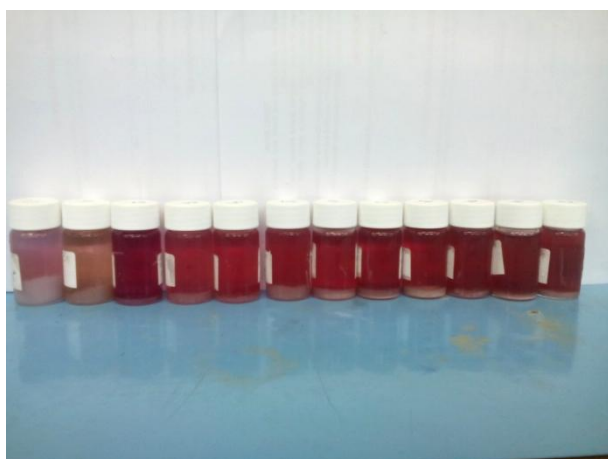
4.2.2 Odběr vzorků

Vzorky k analýze byly mikropipetou odebírány ihned po založení pokusu (0. den kvašení), dále pak 1., 3., 6., 8., 10., 13., 15., 17., 20., 22. a 24. den průběhu kvašení suroviny.

Pro analýzu byl použit nálev z kvasící zelné hmoty, u kterého se předpokládá obdobné složení jako v zelí. Z každé sklenice se surovinou bylo odebíráno 10 ml vzorku šťávy z kvasící suroviny do uzavíratelných skleněných vialek, které jsou vidět na obrázku 1 a 2. Vzorky byly doplněny 10 ml metanolu a byly zamrazeny, aby mohla být veškerá stanovení provedena v jeden den.



Obr. 1: Vialky s odebranými vzorky Oklahoma 2014 při temperaci před analýzou titračních kyselin a antioxidační kapacity



Obr. 2: Vialky s odebranými vzorky Pourovo červené 2015 při temperaci před analýzou titračních kyselin a antioxidační kapacity

4.2.3 Postup stanovení titračních kyselin a antioxidační kapacity

4.2.3.1 Postup stanovení obsahu titračních kyselin

Obsah kyselin se měří potenciometrickou titrací, kdy je použita kombinovaná elektroda pH metru. U této analýzy je měřena změna elektrického potenciálu skleněné elektrody vnořené do zkoumaného roztoku. Elektrický potenciál se mění vlivem působení iontů zkoumaného roztoku a iontů skleněného povrchu elektrody.

Při vlastní titraci je k vzorku umístěnému na magnetické míchačce přidáván $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok NaOH o známém faktoru až do pH 8,1 (bodu ekvivalence). Množství spotřebovaného roztoku NaOH je následně podkladem

pro výpočet veškerých titračních kyselin, které lze přepočíst na konkrétní vybranou převládající kyselinu, kterou je v tomto případě kyselina mléčná.

Vzorec je následující: $(a \cdot f \cdot 0,009 \cdot 10 \cdot 100) / n = x \text{ [g} \cdot \text{l}^{-1}\text{]}$

- a = spotřeba 0,1 M NaOH v ml
- f = faktor roztoku NaOH
- 0,009 = (přepočítávací faktor) množství [g] kyseliny mléčné, odpovídající 1 ml 0,1 M NaOH
- n = množství vzorku napipetovaného k titraci (s ohledem na ředění)
- x = výsledná hodnota je vyjádřena v gramech kyseliny mléčné na 1 l vzorku

4.2.3.2 Postup stanovení antioxidační kapacity metodou FRAP

Stanovení probíhá v prostředí octanového pufru s pH 3,6 (4 ml koncentrované kyseliny octové s 0,775 g octanu sodného v 250 ml vody) a komplexu TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazin) v HCl (0,078 g TPTZ rozpustit v 25 ml baňce s vodou okyselenou 0,08825 ml 35% HCl).

Reakční směs vznikne smícháním roztoku $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, TPTZ a pufru v poměru 1:1:10. Při měření se do kyvety pipetují 2 ml reakční směsi a 25 μl naředěného vzorku. Poté se obsah kyvety míchá 10 sekund na třepačce. Absorbance se měří po 10 minutách od začátku reakce na spektrofotometru v 10 mm kyvetě při vlnové délce 593 nm. Jako standard je používán Trolox o koncentraci základního roztoku 0,5 mmol. (Híc, 2009)

4.2.3.3 Postup stanovení antioxidační kapacity metodou DPPH

Do kyvety je napipetováno 1900 μl směsi radikálového roztoku DPPH v metanolu s koncentrací 0,1 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ a 100 μl naředěného vzorku. Poté je obsah kyvety míchán na třepačce po dobu 10 sekund.

Po 30 minutách od počátku reakce se měří absorbance na spektrofotometru v 10 mm kyvetě při vlnové délce 515 nm. Původně tmavofialové zbarvení roztoku se odbarvuje a dochází k poklesu absorbance. Jako standard je použit Trolox s koncentrací základního roztoku 0,5 mmol. (Híc, 2009)

4.3 Stanovení titračních kyselin a antioxidační kapacity

4.3.1 Stanovení titračních kyselin vzorků

Pro stanovení veškerých kyselin ve vzorku bylo 5 ml vzorku z vialky (směs 2,5 ml šťávy s 2,5 ml metanolu) v kádince zředěno destilovanou vodou, aby došlo k lepšímu promíchání a následně i k lepší detekci při měření na pH-metru. Do takto zředěného vzorku, který byl postaven na magnetickou míchačku, byla vnořena elektroda pH-metru. Vzorek byl titrován $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztokem NaOH o faktoru 0,9671 až do bodu ekvivalence ($\text{pH}=8,1$). Průběh změn zbarvení patrný u vzorků červeného zelí během titrace roztokem NaOH k bodu ekvivalence zobrazuje obr. 3. Výsledná spotřeba roztoku NaOH byla použita do vzorce pro přepočet na kyselinu mléčnou, v němž byl brán i ohled na zředění vzorku metanolem a nepočítalo se tedy s 5 ml vzorku ale pouze s 2,5 ml. Kyselina mléčná byla vybrána pro přepočet jako převládající kyselina ve vzorku. Výsledné hodnoty byly zaznamenány v tabulce 5 zařazené v příloze.



Obr. 3: Změny zbarvení vzorku zelí odrůdy Pourova červeného 2015 během titrace roztokem $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH (růžová – pH 4,3; fialová – pH 7,0; zelenomodrá – pH 8,1)

4.3.2 Stanovení antioxidační kapacity vzorků metodou FRAP

První byla připravena kalibrační řada z 0,5 mMol roztoku Troloxu, a to o koncentracích po desetínách v řadě od 0,1 až do 0,5 mMol o objemu 1 ml. Toto bylo připraveno do zkumavek typu Eppendorf.

Pro vlastní měření vzorků bylo napipetováno 2 ml reakční směsi (FeCl₃, 2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine (TPTZ) a pufr) a 25 µl vzorku z daného odběru. Tato směs byla míchána po dobu 10 s na třepačce a po 10 min změřena. Měření probíhalo na spektrofotometru při vlnové délce 593 nm za použití destilované vody jako slepého vzorku. Výsledky měření jsou uváděny v příložené tabulce 6 jako mmol Troloxu na litr kvašené zelné šťávy.

4.3.3 Stanovení antioxidační kapacity vzorků metodou DPPH

Pro měření metodou DPPH byla připravena kalibrační řada, kdy bylo použito roztoku radikálu difenylpicrylhydrazylu (DPPH), 0,5 mMol roztoku Troloxu a metanol. Tyto látky byly napipetovány do 5. kyvet v objemech 2 ml roztoku DPPH do každé z nich spolu s 20, 40, 60, 80 a 100 µl Troloxu a 80, 60, 40, 20 a 0 µl metanolu (v postupném pořadí objemů Troloxu a metanolu jednotlivých kyvet). Kyvety byly míchány po dobu 10 s na třepačce a uloženy na 30 min v temnu. Po uplynutí tohoto reakčního času byly kalibrační vzorky změřeny na spektrofotometru při vlnové délce 515 nm.

Byla provedena vlastní analýza odebraných vzorků (připravené vzorky zobrazuje obr. 7 v příloze), kdy bylo dávkováno 100 µl vzorku a 2 ml roztoku DPPH. Kyvety se vzorky byly promíchány na třepačce a následně odloženy na 30 min do temna, aby mohla proběhnout reakce. Vlastní měření probíhalo na spektrofotometru při shodné vlnové délce 515 nm a jako slepý vzorek byl použit metanol. Výsledky uvedené v tabulce 7 v příloze jsou zapsány jako mmol Troloxu na litr vzorku.

4.4 Metody vyhodnocení výsledků měření

Měření byla provedena ve třech opakováních a pro vyhodnocení výsledků měření byly použity programy Microsoft Office Excel 2007 a Statistica 12 od společnosti StatSoft. Pro základní přehled a vytvoření grafů byly použity výpočty základních charakteristik, průměry a směrodatné odchylky. Pro prokázání a potvrzení vlivu sledovaných parametrů byly použity základní statistiky, analýza rozptylu ANOVA a následně i analýza korelace.

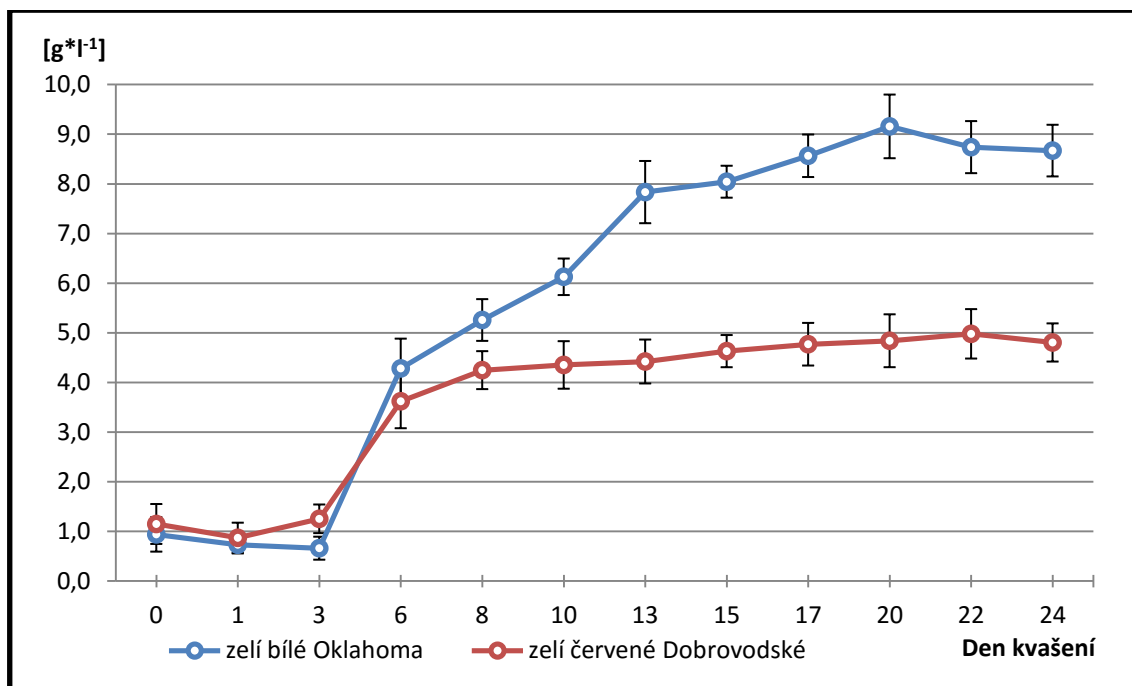
5 Výsledky a diskuse

Během kvašení zelných materiálů byly odebírány vzorky kvasné šťávy, u kterých bylo předpokládáno podobné složení jako u zelí samotného, a které byly podrobeny analýze. Při měření byly následně hodnoty počítány na objem zelné šťávy, protože nedošlo k extrakci z rostlinného materiálu, ale pouze k odebrání přirozeně vzniklé zelné šťávy z kvasící suroviny.

Měření byla provedena ve třech opakováních a výsledky měření titračních kyselin i antioxidační kapacity (metodou FRAP a DPPH) byly zapsány do tabulek (jako průměr opakovaných měření \pm směrodatná odchylka) a zpracovány v programu Statistica 12. Hlavní popisné statistiky znázorňuje tabulka 8 v příloze, v níž jsou pro hodnoty kyselin a antioxidační kapacity (metod FRAP a DPPH) vypočteny základní parametry. V tabulce 9 v příloze jsou vypočteny vzájemné korelační závislosti sledovaných faktorů u naměřených vzorků.

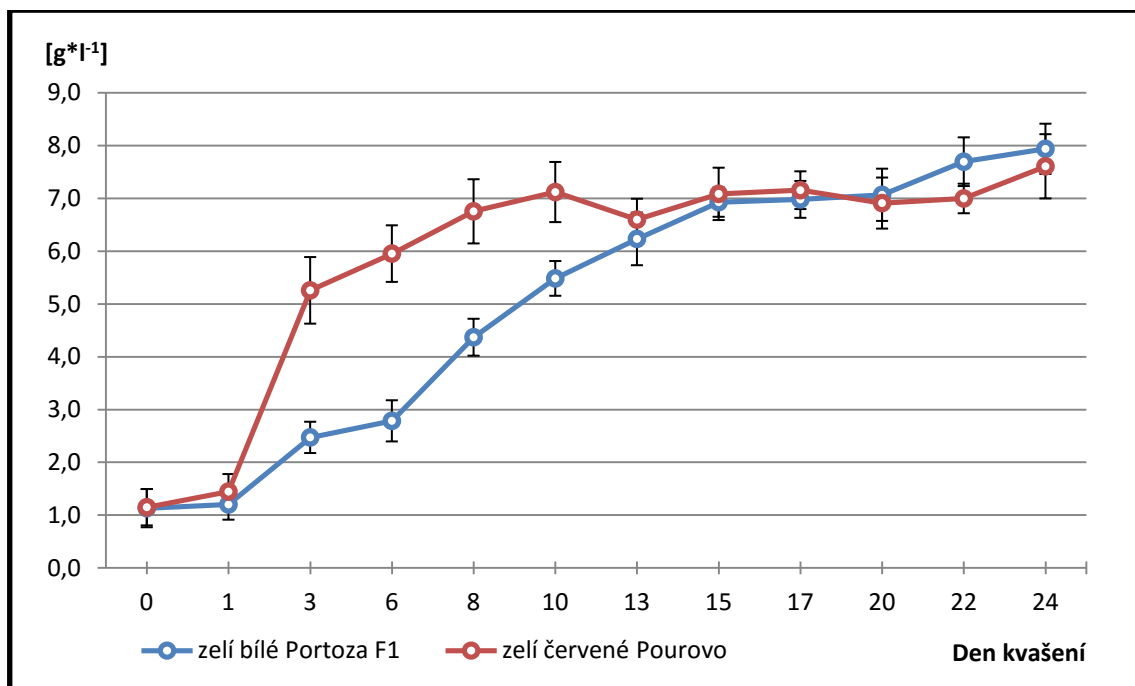
5.1 Vývoj titračních kyselin

Při měření veškerých titračních kyselin byly naměřené a vypočtené hodnoty zaznamenány v tabulce (Tab. 5 v příloze) a následně byly zhotoveny grafy průběhu výsledných hodnot kyselin vyjádřených jako převládající kyselina mléčná. V grafech 1 a 2, je patrný vývoj kyselin během kvašení jednotlivých vzorků zelných hmot.



Graf 1: Vývoj hodnot naměřených titračních kyselin vyjádřených jako kyselina mléčná [g·l⁻¹] v průběhu procesu kvašení vzorků bílého (Oklahoma) a červeného (Dobrovodské) zelí v roce 2014

Pro vzorky kvašení zelného materiálu v roce 2014 zaznamenané v grafu 1 je patrný zřetelný vzestup titračních kyselin v průběhu kvašení zelného materiálu. Z počátečních hodnot blízkých 1 g·l⁻¹ obou vzorků zelí (bílé Oklahoma 0,94 ± 0,59 g·l⁻¹; červené Dobrovodské 1,15 ± 0,63 g·l⁻¹) došlo během kvasného procesu k navýšení kyselin ve hmotě. U bílého vzorku zelí Oklahoma až na desetinásobek (z 0,94 ± 0,59 na 9,16 ± 0,80 g·l⁻¹) a u vzorku červeného Dobrovodského na čtyřnásobek (z 1,15 ± 0,63 na 4,98 ± 0,71 g·l⁻¹) počáteční hodnoty. Pro vzorek bílého zelí Oklahoma byly naměřeny konečné hodnoty o 4 g·l⁻¹ vyšší (9,16 ± 0,80 g·l⁻¹), než u stejného ročníku červené odrůdy zelí Dobrovodského (4,98 ± 0,71 g·l⁻¹).



Graf 2: Vývoj hodnot naměřených titračních kyselin vyjádřených jako kyselina mléčná [g*l⁻¹] v průběhu procesu kvašení vzorků bílého (Portoza F1) a červeného (Pourovo) zelí v roce 2015

V grafu 2 jsou zobrazeny hodnoty titračních kyselin pro vzorky zelného materiálu z roku 2015 Portoza F1 (bílé) a Pourova (červené). I zde je jasně vidět vzestup kyselin v průběhu kvašení materiálu z původních hodnot blízkých 1 g*l⁻¹ (bílé Portoza F1 1,13 ± 0,60 g*l⁻¹; červené Pourovo 1,15 ± 0,59 g*l⁻¹) až na sedminásobek této hodnoty na konci doby kvašení (u bílého z 1,13 ± 0,60 na 7,94 ± 0,69 g*l⁻¹ a u červeného z 1,15 ± 0,59 na 7,61 ± 0,78 g*l⁻¹).

V porovnání všech vzorků z obou let je patrný vzestup kyselin v průběhu kvašení. V grafu 7 analýzy ANOVA v příloze je znázorněn nárůst průměrných hodnot všech vzorků během kvašení z počáteční hodnoty 1 g*l⁻¹ na 7,3 g*l⁻¹ na konci kvašení, což je téměř sedminásobné množství kyselin než na počátku kvašení. V bodovém grafu korelace (graf 8 v příloze) je znázorněná silná závislost (0,765) naměřených hodnot titračních kyselin na dni odběru vzorků.

Z grafu 9 v příloze můžeme určit, že nejméně kyselin bylo u vzorků odrůdy Dobrovodského zelí (červené 2014) a naopak nejlepší výsledky se projeví u odrůd Pourovo (červené 2015) a Oklahoma (bílé 2014), kde byl obsah kyselin vyšší než 5,5 g*l⁻¹.

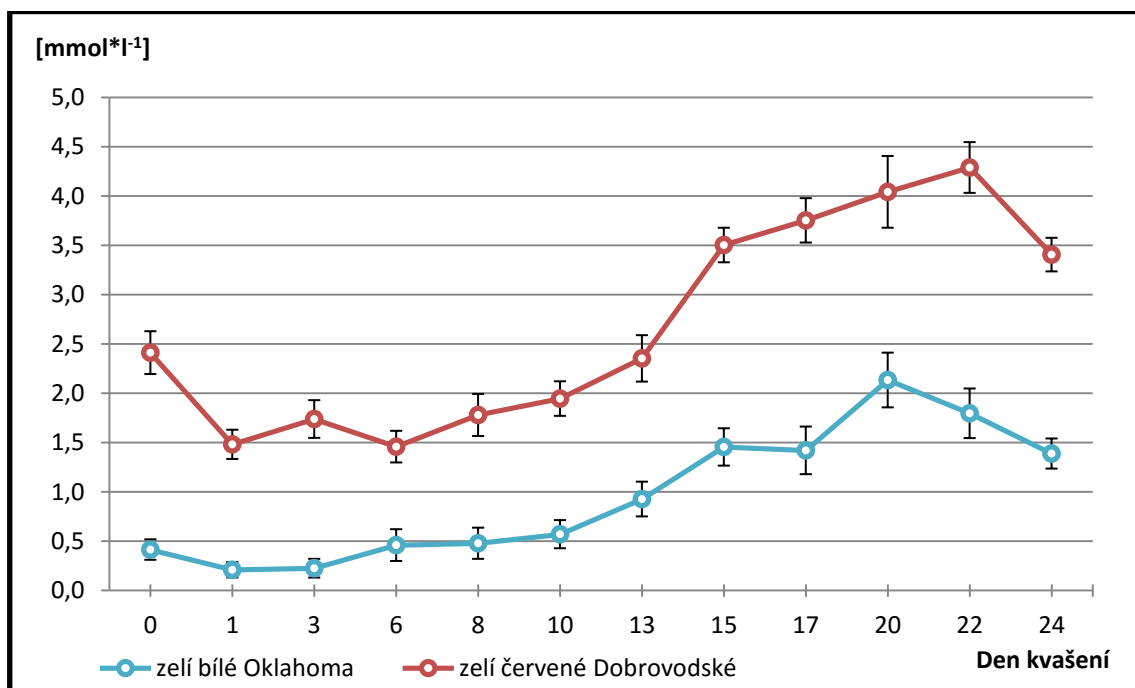
Vývoj kyselin sledovaných vzorků kvašeného zelí se shoduje s výsledky, které udává Hunaefi (2013). Během kvašení dochází k menšímu poklesu kyselin v prvních dnech a následně k výraznému nárůstu obsahu titračních kyselin v prvním týdnu kvašení. To je následováno po zbytek doby kvašení dalším pozvolným nárůstem kyselin.

Počáteční pokles hodnot titračních kyselin u vzorků z roku 2014 mohl být způsoben tím, že po přípravě zelné hmoty ke kvašení a při následném uvolňování tekutiny, došlo k částečné oxidaci zbývajícím, nedokonale odstraněným vzduchem ve hmotě.

Hunaefi (2013) dále uvádí, že oproti vzorkům, u kterých byl použito očkování čistými kulturami, mají vzorky kvašené spontánně pomalejší nárůst titračních kyselin, protože se bakterie mléčného kvašení musí prvně namnožit.

5.2 Vývoj hodnot antioxidační kapacity stanovených metodou FRAP

Hodnoty naměřené metodou FRAP byly zaznamenány do tabulek a jejich průměrné hodnoty a hodnoty rozptylu byly použity pro grafy vývoje antioxidační kapacity v průběhu kvašení zelného materiálu a k analýze. Tabulka 6 v příloze obsahuje hodnoty naměřené metodou FRAP pro vzorky z let 2014 a 2015.

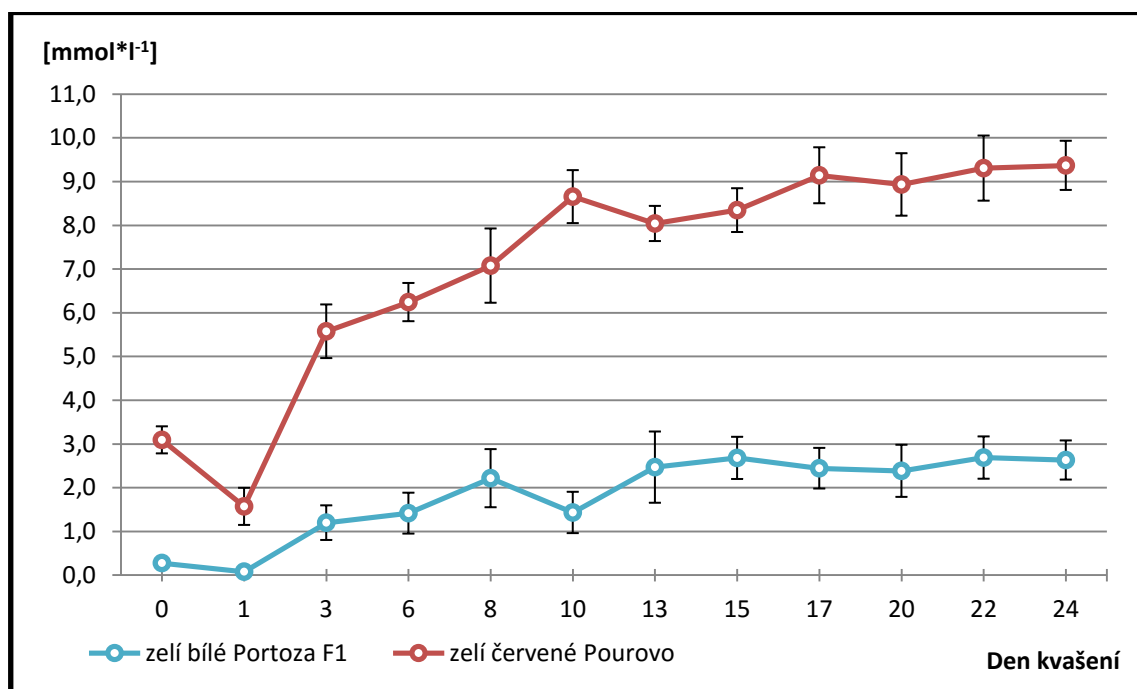


Graf 3: Vývoj hodnot antioxidační kapacity naměřených metodou FRAP vyjádřených Trolox [mmol·l⁻¹] v průběhu procesu kvašení vzorků bílého (Oklahoma) a červeného (Dobrovodské) zelí v roce 2014

V grafu 3 vidíme zaznamenané hodnoty antioxidační kapacity vzorků zelí Oklahoma (bílé 2014) a Dobrovodské (červené 2014) z roku 2014. Po počátečním poklesu je patrná vzestupná tendence u obou vzorků, která klesá ke konci doby kvašení. Rozdíly antioxidační kapacity vzorků bílého (Oklahoma) a červeného (Dobrovodské) v počátku doby kvašení, na jejím konci i ve svých maximech se pohybovaly kolem 2 mmol·l⁻¹, kdy vyšší hodnoty antioxidační kapacity jsou patrné u červeného zelí (Dobrovodské).

Vzestup u vzorků bílého Oklahoma je v průběhu kvašení až na trojnásobek počáteční hodnoty (z 0,415 ± 0,322 na 1,389 ± 0,391 mmol·l⁻¹) a ve svém maximu dosáhla až pětinasobku počáteční hodnoty (z 0,415 ± 0,322

na $2,134 \pm 0,527 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). U vzorku červeného Dobrovodského se antioxidační kapacita v maximu dostala na dvojnásobek počáteční hodnoty daného vzorku (z $2,412 \pm 0,446$ na $4,289 \pm 0,507 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$).



Graf 4: Vývoj hodnot antioxidační kapacity naměřených metodou FRAP vyjádřených Trolox [mmol·l⁻¹] v průběhu procesu kvašení vzorků bílého (Portoza F1) a červeného (Pourovo) zelí v roce 2015

U vzorků z roku 2015 v grafu 4 je vidět průběh naměřených hodnot vzorků Portoza F1 (bílé 2015) a Pourovo (červené 2015). Opět je patrná vzestupná tendence, u počátečních hodnot je rozdíl v antioxidační kapacitě červeného a bílého zelí $2,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, ale v maximu a na konci doby kvašení vzorků se rozdíl mezi hodnotami antioxidační kapacity těchto vzorků liší o $6,7 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Opět jsou vyšší hodnoty zaznamenány u vzorků červeného zelí (Pourovo).

Hodnoty antioxidační kapacity u vzorků červeného zelí (Pourovo) vzrostly v průběhu kvašení na trojnásobek počáteční hodnoty (z $3,092 \pm 0,556$ na $9,369 \pm 0,750 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). U vzorků bílého zelí (Portoza F1) došlo k navýšení antioxidační kapacity až na devítinásobek (z $0,227 \pm 0,302$ na $2,631 \pm 0,669 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), v maximu až na desetinásobek počáteční hodnoty (z $0,227 \pm 0,302$ na $2,688 \pm 0,700 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$).

U jednotlivých odrůd byly zřetelné rozdíly v naměřených hodnotách antioxidační kapacity, které jsou znázorněny grafem 13 v příloze. Nejvyšší hodnoty zaznamenala odrůda Pourova (červené 2015), naopak nejnižší hodnoty antioxidační kapacity naměřené metodou FRAP byly u vzorků bílého zelí Oklahoma (bílé 2014).

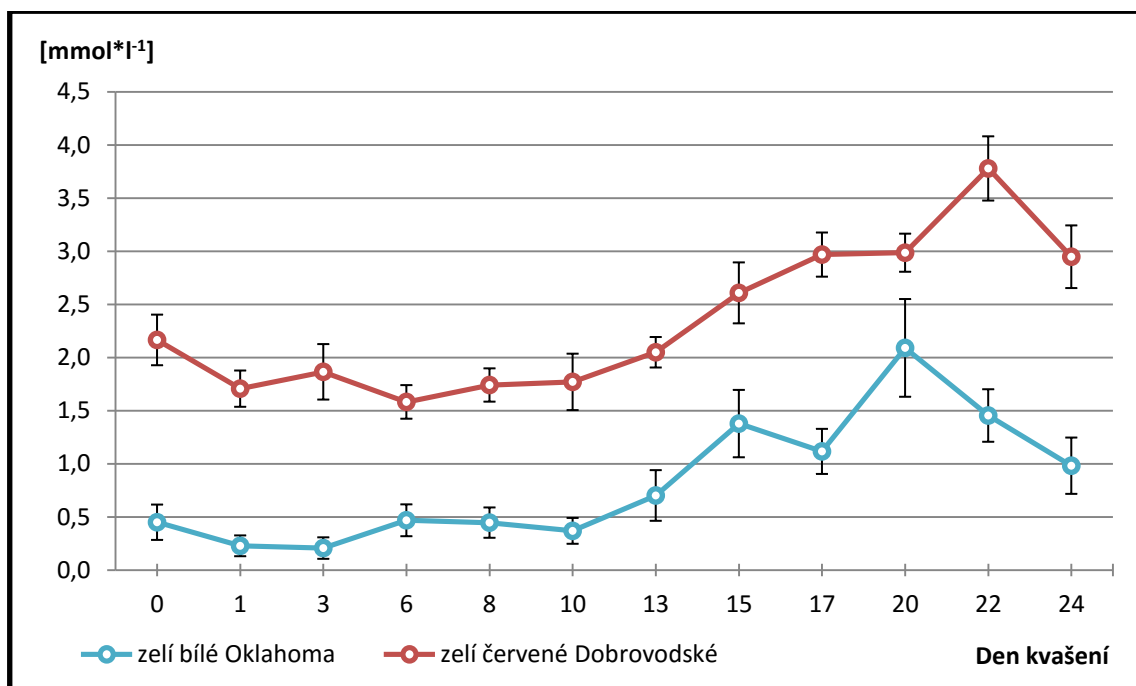
Pro oba ročníky je typický vzestup antioxidační kapacity během mléčného kvašení zelného materiálu, kdy vyšší počáteční i koncové hodnoty jsou u vzorků zelí červeného. Vývoj antioxidační kapacity v průběhu kvašení vzorků po počátečním poklesu roste a v závěru doby kvašení mírně osciluje. To je patrné i z grafu 10 v příloze, kde je zobrazen celkový vývoj vzorků za oba roky.

Možným vysvětlením poklesu hodnot antioxidační kapacity na počátku kvašení a pomalého nárůstu u vzorků z roku 2014 by mohla být počáteční oxidace zelného materiálu. K té mohlo dojít v průběhu přípravy vzorků pro kvašení nebo mohla být způsobena reakcí zelné hmoty se zbývajícím vzduchem ve hmotě v uzavřené kvasné nádobě.

Z analýzy korelace vyplývá, že u hodnot antioxidační kapacity je významná závislost na dni odběru a na obsahu kyselin ve hmotě. Výsledky této analýzy jsou zaznamenány v tabulce 9 v příloze. Výsledné grafy 11 a 12 znázorňující tyto korelační závislosti jsou umístěny také v příloze.

5.3 Vývoj hodnot antioxidační kapacity stanovených metodou DPPH

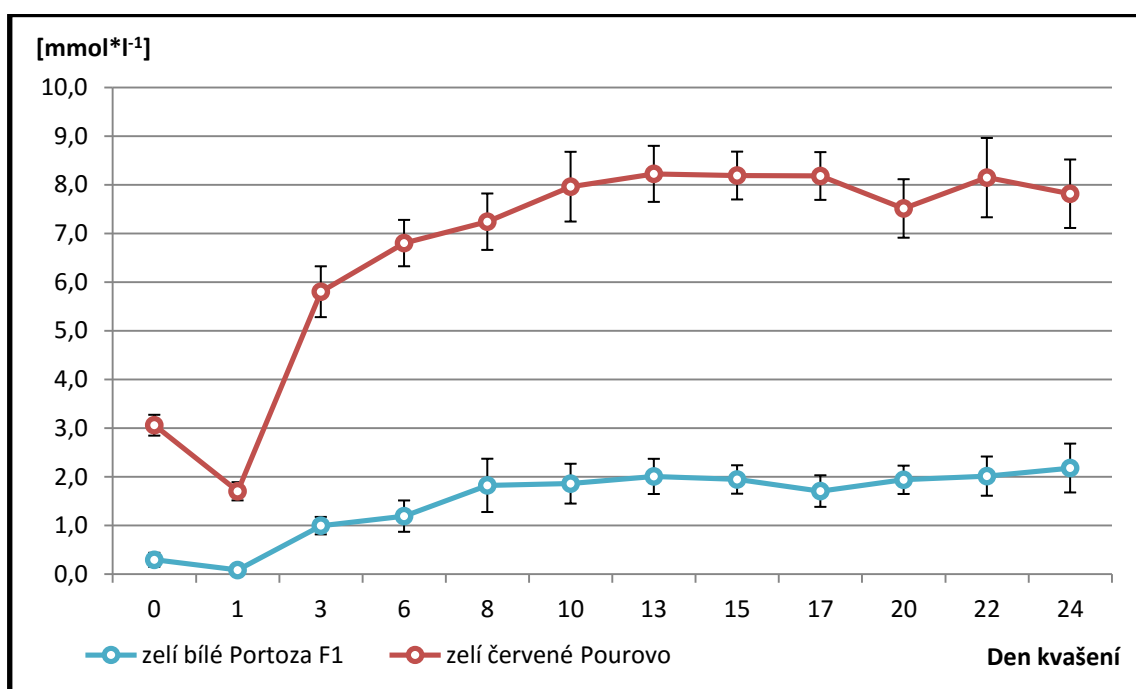
Metodou DPPH byly naměřeny hodnoty antioxidační kapacity u všech vzorků a ty byly zapsány do tabulky 7 zařazené v příloze. Tyto hodnoty byly dále použity k sestrojení grafů 5 a 6 vývoje antioxidační kapacity v průběhu kvašení vzorků a k analýze korelace.



Graf 5: Vývoj hodnot antioxidační kapacity naměřených metodou DPPH vyjádřených Trolox [mmol·l⁻¹] v průběhu procesu kvašení vzorků bílého (Oklahoma) a červeného (Dobrovodské) zelí v roce 2014

Výše uvedený graf 5 znázorňuje vývoj hodnot antioxidační kapacity naměřené metodou DPPH u vzorků zelí Oklahoma (bílé 2014) a Dobrovodské (červené 2014) v roce 2014. Je patrná vzestupná tendence obou vzorků po počátečním mírném poklesu hodnot a také pokles na konci. Na počátku kvašení a ve svých maximech jsou naměřené rozdíly u vzorků bílého (Oklahoma) a červeného (Dobrovodské) zelí přibližně 1,7 mmol·l⁻¹. Na konci byly hodnoty rozdílné o 2 mmol·l⁻¹ a vyšších hodnot antioxidační kapacity dosáhlo zelí červené (Dobrovodské).

U vzorků bílého zelí (Oklahoma) došlo v průběhu kvašení ke zvýšení hodnot antioxidační kapacity na dvojnásobek počáteční hodnoty (z $0,449 \pm 0,408$ na konečných $0,981 \pm 0,515 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Ve 20. dni kvašení dosáhly naměřené hodnoty antioxidační kapacity maximálních hodnot - až pětinasobku počátečních hodnot (nárůst z $0,449 \pm 0,408$ na $2,090 \pm 0,378 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). U červeného zelí (Dobrovodské) došlo ke zdvojnásobení naměřené antioxidační kapacity během kvašení, kdy ve 22. dni kvašení dosáhly hodnoty maxima $3,779 \pm 0,550 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.



Graf 6: Vývoj hodnot antioxidační kapacity naměřených metodou DPPH vyjádřených Trolox [mmol·l⁻¹] v průběhu procesu kvašení vzorků bílého (Portoza F1) a červeného (Pourovo) zelí v roce 2015

Graf 6 znázorňuje průběh hodnot naměřených metodou DPPH u vzorků Portoza F1 (bílý 2015) a Pourovo (červený 2015). Po počátečním poklesu hodnoty naměřené antioxidační kapacity stoupají, ve druhé polovině doby kvašení jsou změny jen malé a hodnoty spíše stagnují. Rozdíl mezi hodnotami vzorků bílého a červeného zelí se v počátku doby kvašení pohyboval kolem $2,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, ke konci této doby dosáhl $5,6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a v maximu vzrostl až na $6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Opět vyšších hodnot bylo naměřeno u vzorků zelí červeného Pourova.

U vzorků Portoza F1 (bílé 2015) se hodnoty antioxidační kapacity zvýšily z počátečních $0,295 \pm 0,380 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ na $2,818 \pm 0,708 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, což představuje sedminásobek počátečních hodnot. U vzorků červeného Pourova (červené 2015) naměřené hodnoty vzrostly v maximu na trojnásobek počáteční hodnoty z $3,060 \pm 0,463 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ na $8,224 \pm 0,759 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Během mléčného kvašení zelných materiálů je i u metody DPPH zřetelný vzestup hodnot antioxidační kapacity. Celkový náhled na vývoj je zobrazen v grafu 14 v příloze, kde je patrné, že hodnoty i přes počáteční pokles mají stále vzestupnou tendenci. V tomto grafu je zřetelný nárůst počátečních průměrných hodnot blízkých $1,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ až k hodnotám přes $3,7 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Stejně jako u předchozího měření antioxidační kapacity metodou FRAP i v tomto případě je možnou příčinou, proč v počátku kvašení hodnoty poklesly a u vzorků z roku 2014 stoupaly pozvolna, zbývající kyslík v připravené zelné hmotě. Následkem toho byla možná oxidace materiálu i přes znepřístupnění obsahu kvasné nádoby uzávěrem po dobu kvašení.

Z hlediska odrůd jsou patrné v grafu 17 v příloze podstatné rozdíly. Nejnižší hodnoty antioxidační kapacity byly zaznamenány u odrůdy bílého zelí Oklahoma (2014) a nejvyšší hodnoty naměřené antioxidační kapacity metodou DPPH byly u odrůdy Pourova červeného zelí (2015).

Závislosti naměřených hodnot antioxidační kapacity vzorků zelí metodou DPPH na dni kvašení a na vývoji kyselin znázorňují grafy 15 a 16 v příloze. Z grafu 15 v příloze je vidět, že závislost hodnot antioxidační kapacity na dni odběru vzorků (dni kvašení) je mírná (0,31). Z druhého grafu korelace (graf 16 v příloze) kyselin a hodnot antioxidační kapacity naměřené metodou DPPH lze vyčíst, že existuje závislost vývoje antioxidační kapacity na vývoji kyselin během mléčného kvašení vzorků zelí (0,38). Hodnoty korelace jsou zaznamenány v tabulce 9 v příloze.

5.4 Vývoj antioxidační kapacity v průběhu mléčného kvašení suroviny

Vývoj hodnot naměřených metodami FRAP a DPPH mají všechny vzestupnou tendenci. V porovnání s prvním vzorkem (den 0) docházelo u všech čtyř odrůd k nárůstu antioxidační kapacity. To je shodné s výsledky, které uvádí Sum (2009), který prováděl podobný experiment na čínském zelí a Hunaefi (2013), který se zabýval vzorky červeného zelí. V počátku kvašení je v grafech 10 a 14 v příloze zřetelný pokles hodnot antioxidační kapacity o $0,6 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, který je následován jejich nárůstem. Po 15. dni kvašení dochází ve vzorcích už jen k pozvolnému nárůstu antioxidační kapacity. Shodné výsledky vývoje dokládají ve svých pracích Sum (2009) a Kusznierevitz (2008). Uvádí, že u spontánně kvašeného zelného materiálu dochází v závislosti na podmínkách ke stagnaci nárůstu antioxidační kapacity v druhé polovině kvašení.

Zmíněný pokles hodnot antioxidační kapacity, který je zřejmý i v grafech hodnot měřených metodami FRAP a DPPH pro jednotlivé roky (grafy 3 - 6 v kapitole 5) byl pravděpodobně způsoben zoxidováním uvolněných zelných šťáv kyslíkem, který zbyl v surovině. Následně došlo k nárůstu hodnot antioxidační kapacity vlivem biologické aktivity bakterií mléčného kvašení.

Jak uvádí shodně Kusznierevitz (2008) a Hunaefi (2013), mléčné kvašení zelného materiálu může způsobovat strukturální zhroucení rostlinných buněk při poklesu pH hmoty s navýšením obsahu kyselin ve hmotě. To může tvořit podmínky pro uvolnění vázaných fenolických složek v nich vázaných a následně osvobození a/nebo syntézu různých bioaktivních látek. Tento proces potenciálně vede k navýšení antioxidační kapacity suroviny. Z toho vyplývá, že mléčné kvašení může vést k modifikaci přirozeně se vyskytujících rostlinných sloučenin v surovině, a tím i k posílení antioxidačních účinků. Touto hypotézou se ale tato práce nezabývá a pro její ověření by bylo třeba jiného experimentu.

U naměřených hodnot antioxidační kapacity sledovaných vzorků se projevuje závislost na obsahu kyselin ve vzorcích a také závislost na ročníku

odrůdy zelí. To dokazuje i tabulka výsledných hodnot analýzy korelace zařazená v příloze (tabulka 9).

Hodnoty antioxidační kapacity naměřené metodami DPPH a FRAP spolu silně souvisí, hodnota korelační závislosti je zde 0,97. Je to patrné z grafu 18 v příloze, který korelaci hodnot FRAP a DPPH znázorňuje a také z tabulky 9 v příloze, kde jsou zaznamenány vypočtené hodnoty korelace.

Vyšší hodnoty antioxidační kapacity obě metody prokázaly u vzorků kvašeného červeného zelí (Dobrovodské 2014 a Pourovo 2015), kdy větší antioxidační kapacitu projevila vzorek Pourova červeného zelí (2015). Nejnižší hodnoty byly oběma metodami stanoveny u vzorků kvašeného bílého zelí Oklahoma (2014), jak ukazují grafy 13 a 17 v příloze.

7 Závěr

Způsob uchovávání zeleninových druhů mléčným kvašením je tradiční metodou a je upřednostňován například u zelí. Prodlužuje dobu možného skladování i konzumace a toto mléčně kvašené zelí je cenným potravinovým zdrojem prebiotických i probiotických složek jako jsou vláknina a bakterie mléčného kvašení. Důležitý je i obsah mléčných kyselin vzniklých během procesu kvašení.

Při hledání možností, jak předcházet v dnešní době civilizačním chorobám, je pohled zaměřen na potravinové zdroje bohaté na antioxidanty. Ty fungují v organismu jako obranný systém a podílejí se na eliminaci nežádoucích volných radikálů. Proces mléčného kvašení potenciálně vede k navýšení antioxidační kapacity suroviny modifikací přirozeně se vyskytujících sloučenin v surovině.

U sledovaných vzorků zelí došlo během mléčného kvašení k nárůstu kyselin na sedminásobek počáteční hodnoty. Navýšení během kvašení bylo zaznamenáno i u antioxidační kapacity vzorků, kde hodnoty naměřené metodami FRAP a DPPH měly po počátečním mírném poklesu (pravděpodobně způsobeném oxidací suroviny zbytkovým kyslíkem v surovině) vzestupnou tendenci. U naměřených hodnot se projevuje závislost na ročníku odrůdy a obsahu kyselin v surovině a hodnoty byly podstatně vyšší u vzorků červeného zelí než u vzorků zelí bílého, což mohlo být zapříčiněno zastoupením antokyanů jako barviva v červeném zelí.

U vzorků červených odrůd dochází k nárůstu na dvojnásobek (Dobrovodské 2014) a trojnásobek (Pourovo 2015) hodnot antioxidační kapacity v průběhu kvašení a u vzorků bílých odrůd k nárůstu na pětinašobek (Oklahoma 2014) a osminásobek (Portoza F1 2015) původních hodnot. V celkovém hodnocení všech vzorků došlo k navýšení antioxidační kapacity během mléčného kvašení na čtyřnásobek počáteční hodnoty.

Kysané zelí má větší antioxidační kapacitu, než zelí nekysané, což může být zapříčiněno tím, že zvyšující se obsah kyselin v zelné surovině pomáhá

vytvářet podmínky pro vyvázání složek z buněk narušených přípravou materiálu i kvašením samotným. Tyto uvolněné složky v surovině se mohou dále podílet na syntéze bioaktivních látek ve kvašeném zelí, čehož následkem může být potenciálně i zvýšení antioxidační kapacity suroviny. Mléčné kvašení tedy může vést k přeměně sloučenin rostlinného materiálu (zelí), které se v něm přirozeně vyskytují, a tak posílit antioxidační kapacitu kvašené suroviny.

Mléčné kvašení zeleniny je jednou z jednoduchých a osvědčených metod pro uchování zeleniny, ale také jednou z nejlepších metod pro zlepšení antioxidační kapacity zeleniny (v tomto případě zelí). V jeho průběhu dochází k prokazatelnému několikanásobnému navýšení antioxidační kapacity zelí, a proto by mělo být bráno v úvahu jako možný zdroj antioxidantů. Zmíněné procesy syntézy bioaktivních látek v průběhu mléčného kvašení a jejich vliv na zvyšování antioxidační kapacity suroviny by byly zajímavým námětem pro pokračování a rozšíření povědomí o vývoji antioxidační kapacity v průběhu mléčného kvašení zeleniny.

8 Souhrn – Resume

Souhrn

Tato diplomová práce na téma „Vývoj antioxidační kapacity v průběhu mléčného kvašení zeleniny“ byla zpracována v letech 2014 – 2016 na Ústavu posklizňových technologií zahradnických produktů Zahradnické fakulty v Lednici, Mendelovy univerzity v Brně. Cílem práce bylo zhodnotit vývoj antioxidační kapacity v průběhu mléčného kvašení vybraného zeleninového druhu.

V úvodní teoretické části se práce zabývá charakteristikou zeleniny, zdraví prospěšných látek, antioxidantů a mléčného kvašení. V praktické části byly založeny vzorky, kdy za vybraný zeleninový druh bylo zvoleno červené a bílé zelí. Na těchto vzorcích zeleného materiálu byly v průběhu mléčného kvašení sledovány změny základních parametrů a vývoj antioxidační kapacity, který byl stanoven pomocí metod FRAP a DPPH.

Vyšší hodnoty antioxidační kapacity byly zaznamenány u zelí kvašeného oproti zelí nekvašenému a také hodnoty u zástupců červených odrůd zelí byly vyšší, než u zelí bílého. Na základě výsledků měření bylo vyhodnoceno, že mléčné kvašení zeleninového materiálu, zvláště pak zelí, je jednou z nejslibnějších metod, jak uchovat a zvýšit jeho antioxidační kapacitu.

Klíčová slova:

Zelí, mléčné kvašení, kvašená zelenina, antioxidanty, antioxidační kapacita, potenciometrie, FRAP, DPPH

Resume

This thesis, themed „Development of antioxidant capacity during the lactic fermentation of vegetables“ was elaborated between 2014 and 2016 at the Department of Post-Harvest Technology of Horticultural Products, Faculty of Horticulture in Lednice, Mendel University in Brno. The aim of the study was to evaluate the development of antioxidant capacity during the lactic fermentation of selected vegetable species.

The theoretical part includes characteristics of vegetables, health-promoting substances, antioxidants and lactic fermentation. In the practical part were made samples and as vegetable samples were chosen red and white cabbage. On these samples were during lactic fermentation monitored changes in the basic parameters and development of antioxidant capacity has been established using the FRAP and DPPH methods.

Higher values of antioxidant capacity were observed for fermented cabbage compared with unleavened and also values among representatives of red cabbage varieties were higher than for white ones. Based on the measurement results were evaluated that the lactic fermentation of vegetable material, especially cabbage, is one of the most promising methods to preserve and uplift its antioxidant capacity.

Keywords:

Cabbage, lactic fermentation, fermented vegetable, antioxidants, antioxidant capacity, potentiometry, FRAP, DPPH

9 Použitá literatura

Ames, B. N., Shigenaga, M. K., Hagen, T.M., Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993, 90,7915-7922

Apak, R., Güçlü, K.G., Özyürek, M., Karademir, S.E., Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric iron reducing capability in the presence of neocuproine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, 7970-7981

Arts, M.J.T.J., Dallinga, J.S., Voss, H.P., Haenen, G.R.M.M., Bast, A., A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidants structures. *Food Chemistry*, 2003, 80, 409-414

Balaščík, J., Konzervovanie v domácnosti. 1. vyd. *Bratislava: Topas*, 2001, 206 s. ISBN 80-85353-11-3.

Balaščík, J., Konzervujeme a zmrazujeme ovoce, zeleninu, maso: určeno pro zahrádkáře, vinaře, živnostníky, podnikatele, rodinné školy. 1. vyd. *Ostrožská Nová Ves: vlastním nákladem*, 1992. 93 s.

Bartoš, J., Kopec, K., Výrobní systémy zeleniny. Výroba kysaného zelí. *Olomouc: VŠÚZ*, 1989. 40 s.

Battcock, M., Azam-Ali, S., Fermented fruits and vegetables. A global perspective. *Rome: FAO*, 1998. ISBN 92-5-104226-8 [dostupné on-line 14.1.2016 www.fao.org/docrep/x0560e/x0560e00.htm]

Benzie, I.F.F., Strain, J.J., The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of „antioxidant power“: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 1996, 239, 70-76

Bondet, V., Brand-Williams, W., Berset, C., Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 1997, 30, 609-615.

Cadenas, E., Packer, L., Handbook of antioxidants. 2nd ed. / . *New York: Marcel Dekker, 2002, 1 online resource. ISBN 978-0-203-90404-6.*

Cagno, R.D., Coda, R., Angelis, M., Gobbetti, M. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology.* 33 (2013) 1-10

Cano, A. Acosta, M., Arnao, M.B., A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins. *Redox Report,* 2000, 5, 365-370.

Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L., Antioxidants and prooxidant behaviour of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine,* 1997, 22 (5), 749-760.

Databáze složení potravin České Republiky. Centrum pro databázi složení potravin. [online].[cit. 2016-04-02]. Dostupné z: <http://www.nutridatabaze.cz/>

Davis, C., D., Milner, J., A. Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 2009, vol. 20, no. 10, s. 743-752. ISSN 0955-2863

Dittrich, K., Leitzmann, C., Bioaktivní látky proti rakovině a infarktu. *Olomouc,* 1999. ISBN 80-861-7951-6

Dostálová, J. et al. Konečné znění Výživových doporučení pro obyvatelstvo ČR. Praha: Společnost pro výživu, 2004. [dostupné online 6.2.2016 <http://www.vyzivaspol.cz/rubrika-dokumenty/konecne-zneni-vyzivovych-doporuceni.html>]

Drdák, M., Technológia rastlinných neúdržných potravín. *Bratislava: Alfa,* 1989, 304 s. ISBN 80-050-0121-5.

Đuračková, Z. Volné radikály a antioxidanty v medicíně I. *Bratislava: Slovak Academic pres.,* 1998

Enrique, C., Lester, P., Handbook of antioxidants. *New York: Marcel Dekker.* 2002.

Eremin, A. N. Coimmobilization of Superoxide Dismutase, Catalase and Peroxidase. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2001, 37 (1), 45-54

Frankel, E.N., Meyer, A.S., The problems of using onedimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, 80, 1925-1941

Gil, M.I., Ferreres, F., Tomas-Barberan, F.A., Effect of postharvest storage and processing on the antioxidant constituents (flavonoids and vitamin C) of fresh-cut spinach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47, 2213-2217.

Gilliland, S., E. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 1990, vol. 7, no. 1-2, s. 175-188. ISSN 1574-6976

Görner, F., Valík, L., Aplikovaná mikrobiológia požívateľín: princípy mikrobiológie požívateľín, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodky sú prenášané požívateľinami. *Bratislava: Malé centrum*, 2004, 528 s. ISBN 80- 967-0649-7.

Herbert, V. Vitamin B-12, plant sources, requirements and assay. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1988, vol. 48, no. 3, s. 852-858. ISSN 0002-9165

Herrmann, W., Obeid, R. Causes and early diagnosis of vitamin B12 deficiency. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2008, vol. 105, no. 40, s. 680-685. ISSN 1866-0452

Híc, P., Stúdium antioxidačnej kapacity, *Disertační práce*, 2009, 144.

Horčín, V. Technológia spracovania ovocia a zeleniny. 1. vyd. *Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita*, 2004. 142 s. ISBN 80-8069-399-4.

Hostašová, B., Němec, E., Vlachová, L. Domáci konzervování ovoce a zeleniny. 3. vydání. *Praha: Avicenum*, 1987. 320 s.

Hřebíčková, Š. Antioxidanty a volné radikály: rozdělení, jejich kapacita a aktivita, *Výživa a potraviny*, 2009, 2, 30-32

Huang et al., D. J., Ou, B.X., Prior, R.L. The chemismy blind antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2005, 53, 1841-1856

Huang, D.J., Ou, B., Hampsch- Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, E.K., Development and Validation of Oxigen Radical Absorbance Capacity Assay for Lipophilic Antioxidants using Randomly Methylated-Cyclodextrin as the Solubility Enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50 (7), 1815-1921.

Hunaefi, D., AKUMO, D. N., Smetanska, I. Effect of Fermentation on Antioxidant Properties of Red Cabbages. *Food Biotechnology* [online]. 2013, 27(1), 66-85 [cit. 2016-04-25]. DOI: 10.1080/08905436.2012.755694. ISSN 08905436.

Hunaefi, D., Gruda, N., Riedel, H., Akumo, D. N., Saw, N. M. M. T., Smetanska, I. Improvement of Antioxidant Activities in Red Cabbage Sprouts by Lactic Acid Bacterial Fermentation. *Food Biotechnology* [online]. 2013, 27(4), 279-302 [cit. 2016-04-25]. DOI: 10.1080/08905436.2013.836709. ISSN 08905436.

Ingr, I. Základy konzervace potravin. 1. vyd. *Brno: Edič. stř. MZLU*, 1999. 119 s. ISBN 80-7157-396-5.

Kailasapathy, K., Chin, J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and Cell Biology*. 2000, vol. 78, no. 1, s. 80-88. ISSN 1440-1711

Karovičová, J., Kohajdová, Z. Biogenic amines in food. *Chemical Papers*. 2005, vol. 59, no. 1, s. 70-79. ISSN 0366-6352

Komprda, T. Obecná hygiena potravin. 1. vydání. *Brno: MZLU*, 2004. 148 s. ISBN 978-80-7157-757-7

Kopec, K. Jakost mléčně kvašené zeleniny. *Výživa a potraviny*. 2000, vol. 55, no. 3, s. 93-94. ISSN 1211-846X

Kopec, K. Tabulky nutričních hodnot ovoce a zeleniny. Vyd. 1. *Praha*, 1998, 72s. ISBN 80-861-5364-9

Kopec, K. Zelenina ve výživě člověka. 1. vydání. *Praha: Grada*, 2010. 168 stran. ISBN 978- 80-247-2845-2

Kopřiva, V. Antioxidační kapacita potravin. [online]. 2011 [cit. 2016-04-10]. Dostupné z: <http://cit.vfu.cz/ivbp/wpcontent/uploads/2011/07/ANTIOXIDA%C4%8CN%C3%8D-KAPACITAPOTRAVIN.pdf>

Kusznierewitz, B., Śmiechowska, A., Namieśnik, J., Bartoszek, A. The effect of heating and fermenting on antioxidant properties of white cabbage. *Food Chemistry* [online]. 2008, 108(3), 853 - 861 [cit. 2016-04-25]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.11.049. ISSN 03088146.

Kvasničková, A. Minerální látky a stopové prvky: esenciální minerální prvky ve výživě. 1. vyd. *Praha: ÚZPI-Ústav zemědělských a potravinářských informací*, 1998. ISBN 80-851-2094-1

Kvasničková, A. Potravinářství IV: Přírodní antioxidanty v potravinách. *Praha: ÚZPI*, 2000.

Kyzlink, V. Skladování a zpracování zahradnických plodin. 1. vyd. *Praha: SPN*, 1958, 443 s.

Kyzlink, V. Teoretické základy konzervace potravin. *Praha: SNTL*, 1988, 512 s.

Lichtenthaler, R., Marx, F., Total oxidant scavenging capacities of common European fruit and vegetable juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 103-110.

Lonnrot, K., Metsa-Ketela, T., Molnar, G., Ahonen, J.P., Latvala, M., Peltola, J., Pietila, T., Alho, H. The effect of ascorbate and ubiquinone supplementation on plasma and CSF total antioxidant capacity. *Free Radical Biology and Medicine*, 1996, 21 (2), 211-217

Machala, K. Kvašená zelenina pro zdraví a vitalitu. *Olomouc: ANAG*, 2008. 157 s. ISBN 978-80-7263-482-8

Martínez-Tomé, M., Jiménez, M.A., Ruggieri, S., Frega, N., Strabbioli, R., Murcia, M.A., Antioxidants properties of Mediterranean species compared with common food additives. *Journal of Food Protection*, 2001, 64, 1412-1419.

Mcmurray, H.N., Wilson, B.P., Mechanistic and spatial study of ultrasonically induced luminol chemiluminescence. *The Journal of Physical Chemistry*, 1999, 103(20), 3955-3962.

Mindell, E. Vitaminová bible pro 21. století: vše o vitamínech, které budete v tomto století potřebovat. Vyd. 1. V Praze: *Knížní klub*, 2000, 303 s. ISBN 80-242-0406-1

Němec, E. Domácí konzervování ovoce a zeleniny. 3. vyd. *Praha: Zdravotnické nakladatelství Avicemum*, 1987. 320 s.

Ou, B.X., Huang, D.J., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer, E.K., Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50 (11), 3122-3128.

Parvez, S. et al. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*. 2006, vol. 100, no. 6, s. 1171-1185. ISSN 1365-2672 38.

Paulová, H., Bochořáková, H., Táborská, E. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek INVITRO. [online]. 2003 [cit.2016-02-10]. Dostupné z: http://www.chemickelisty.cz/docs/full/2004_04_03.pdf

Pekárková, E. Když zelenina neroste. 1. vyd. *Vimperk: Víkend*, 2001. 127s. ISBN 80-7222-154-X.

Pellegrini, N., Seraini, M., Colombi, B., Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy by free different in vitro assays. *Journal of Nutrition*, 2003, 133, 2812-2819.

Pospíšil, J. Antioxidanty. *Praha: Academia*, 1968. ISBN 509-21-875

Price, M.L., Butler, L.G., Prussian blue assay for total phenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1977, 25, 1268-1273.

Prior, R.L., Cao, G., In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 27 (11/12), 1173-1181.

Prior, R.L., Xianli, W., Schaich, K., Standardized methods for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 4290-4302.

Proteggente, A., Pannala, A.S., Paganga, G., Van Buren, L., Wagner, E., Wiseman, S., et al., The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radical Research*, 2002, 36 (2), 217-233.

Půhoný, K. Konzervace a ukládání potravin v domácnosti, 6. vyd. *Státní zemědělské nakladatelství Praha*, 1988 320 s.

Réblová, Z. Vliv vnějších faktorů na aktivitu antioxidantů. [online]. 2011[cit.2016-02-10]. Dostupné z:http://www.chemickelisty.cz/docs/full/2011_09_667-673.pdf

Roberfroid, M., B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *American Journal of Clinical Nutrition*. 2000, vol. 71, no. 6, s. 1682S-1687S. ISSN 0002-9165

Ross, R., P., Morgan, S., Hill, C. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*. 2002, vol. 79, no. 1-2, s. 3-16. ISSN 0168-1605

Sanders, M., E. Probiotics: definition, sources, selection and uses. *Clinical Infectious Disease*. 2008, vol. 46, Suppl 2, s. 58-61. ISSN 1058-4838

Sharma, V., Mishra, N., Unstructured kinetic modeling of growth and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* NCDC 414 during fermentation of vegetable juices. *LWT - Food Science and Technology*. 2014, 59(2), 1123-1128. ISSN 00236438.

Schleisier, K., Harwat, M., Bohm, V., Bitsch, R., Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research*, 2002, 36, 177-187.

Scholz-Ahrens, K. et al. Prebiotics, probiotics and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content and bone structure. *Journal of Nutrition*. 2007, vol. 137, no. 3, s. 838S-846S. ISSN 0022-3166

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, 1999, 299, 152-178.

Stratil, P. Fenolové látky v poživatinách a metody stanovení jejich antioxidační aktivity. *Brno: Habilitační práce*, 2007.

Stratil, P., Klejdus, B., Kuban, V., Determination of total phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables-evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54, 607-616.

Sun, Y.-P., Chou, C.-C., Yu, R.-C., Antioxidant activity of lactic-fermented Chinese cabbage. *Food Chemistry* [online]. 2009, 115(3), 912-917 [cit. 2016-04-25]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.12.097. ISSN 03088146.

Svačina, Š. et al. Klinická dietologie. 1. vydání. *Praha: Grada*, 2008. 381 s. ISBN 978-80-247-2256-6

Štípek, S. Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. 1. vyd. *Praha: Grada*, 2000, 314 s. ISBN 80-7169-704-4.

Šulc, M., Lachman, J., Hamouz, K., Orsák, M., Dvořák, P., Horáčková, V. Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidační aktivity fialových a červených odrůd brambor. *Chemické listy*, 2007, roč. 101, 7, 584-591.

Velíšek, J. Chemie potravin 1. *Tábor: OSSIS*, 2002. 331 s. ISBN 80-86659-03-8.

Velíšek, J. Chemie potravin 2. *Tábor: OSSIS*, 2002. 303 s. ISBN 80-86659-03-8.

Velíšek, J. Chemie potravin 3. Vyd. 2., upr. *Tábor: OSSIS*, 2002, 343 s. ISBN 80-86659-02-x

Whitehead, T.P., Thorpe, G.H.G., Maxwell, S.M., Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids. *Analytica Chimica Acta*, 1992, 266, 265-77.

Wright, J.S., Johnson, E.R., DiLabio, G.A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 123, 2001, 1173-1183.

Wu, X., Gu, L., Holden, J., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., Beecher, G., Prior, R.L., Development of a database for total antioxidant capacity on foods: a preliminary study. *Journal Food Comp Analysis*, 2004, 17 (3-4), 407-422.

Yingchun, N., Jiayan, Ch., Yan, Y., Jiagen, L., *Flow-sonochemiluminescence method for antioxidant capacity analysis*. *Food Chemistry*, 2010, 122, 360-365.

Žamboch, J. Vitamíny. 1. vyd. *Praha: Grada*, 1996, 77 s. ISBN 80-716-9322-7

10 Přílohy

Seznam příloh

Obr. 4: Tvorba zelné krouhanky manuálním krouhačem při zakládání pokusů

Obr. 5: Plnění sklenic krouhankou se solí při zakládání pokusů

Obr. 6: Připravené nádoby s pokusným materiálem překryté igelitem a gumou pro znepřístupnění materiálu vzduchu

Obr. 7: Nařaděné vzorky připravené k analýze FRAP a DPPH

Tab. 5: Výsledné hodnoty naměřených titračních kyselin vyjádřených jako obsah kyseliny mléčné [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] v průběhu procesu kvašení vzorků bílého (Oklahoma) a červeného (Dobrovodské) zelí v roce 2014 a bílého (Portoza F1) a červeného (Pourovo) zelí v roce 2015

Tab. 6: Výsledné hodnoty antioxidační kapacity naměřené metodou FRAP vyjádřené jako Trolox [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$] v průběhu procesu kvašení vzorků bílého (Oklahoma) a červeného (Dobrovodské) zelí v roce 2014 a bílého (Portoza F1) a červeného (Pourovo) zelí v roce 2015

Tab. 7: Výsledné hodnoty antioxidační kapacity naměřené metodou DPPH vyjádřené jako Trolox [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$] v průběhu procesu kvašení vzorků bílého (Oklahoma) a červeného (Dobrovodské) zelí v roce 2014 a bílého (Portoza F1) a červeného (Pourovo) zelí v roce 2015

Tab. 8: Základní popisné statistiky pro naměřené hodnoty titračních kyselin a antioxidační kapacity pro metody FRAP a DPPH

Tab. 9: Vzájemné korelační závislosti sledovaných faktorů u všech vzorků

Graf 7: Vývoj průměrných hodnot naměřených titračních kyselin vyjádřených jako obsah kyseliny mléčné [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] v průběhu procesu kvašení vzorků v roce 2014 a 2015

Graf 8: Znázornění korelační závislosti vývoje hodnot naměřených titračních kyselin vyjádřených jako obsah kyseliny mléčné [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] na dni odběru vzorků

Graf 9: Znázornění vývoje hodnot naměřených titračních kyselin vyjádřených jako obsah kyseliny mléčné [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] v závislosti na použité odrůdě zelí

Graf 10: Vývoj průměrných hodnot antioxidační kapacity vyjádřené jako Trolox [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$] naměřené metodou FRAP v průběhu procesu kvašení vzorků v roce 2014 a 2015

Graf 11: Znázornění korelační závislosti vývoje hodnot antioxidační kapacity vyjádřené jako Trolox [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$] naměřených metodou FRAP na dni odběru vzorků

Graf 12: Znázornění korelační závislosti vývoje hodnot antioxidační kapacity vyjádřené jako Trolox [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$] naměřených metodou FRAP na vývoji hodnot naměřených titračních kyselin vyjádřených jako obsah kyseliny mléčné [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]

Graf 13: Znázornění vývoje hodnot antioxidační kapacity vyjádřené jako Trolox [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$] naměřených metodou FRAP v závislosti na použité odrůdě zelí

Graf 14: Vývoj průměrných hodnot antioxidační kapacity vyjádřené jako Trolox [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$] naměřené metodou DPPH v průběhu procesu kvašení vzorků v roce 2014 a 2015

Graf 15: Znázornění korelační závislosti vývoje hodnot antioxidační kapacity vyjádřené jako Trolox [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$] naměřených metodou DPPH na dni odběru vzorků

Graf 16: Znázornění korelační závislosti vývoje hodnot antioxidační kapacity vyjádřené jako Trolox [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$] naměřených metodou DPPH na vývoji hodnot naměřených titračních kyselin vyjádřených jako obsah kyseliny mléčné [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]

Graf 17: Znázornění vývoje hodnot antioxidační kapacity vyjádřené jako Trolox [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$] naměřených metodou DPPH v závislosti na použité odrůdě zelí

Graf 18: Znázornění korelační závislosti vývoje hodnot antioxidační kapacity vyjádřené jako Trolox [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$] naměřených metodou FRAP a vývoje hodnot antioxidační kapacity vyjádřené jako Trolox [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$] naměřených metodou DPPH



Obr. 4: Tvorba zelné krouhanky manuálním krouhačem při zakládání pokusů



Obr. 6: Připravené nádoby s pokusným materiálem překryté igelitem a gumou pro znepřístupnění materiálu vzduchu



Obr. 5: Plnění sklenic krouhankou se solí při zakládání pokusů



Obr. 7: Nařaděné vzorky připravené k analýze FRAP a DPPH

Tab. 5: Výsledné hodnoty naměřených titračních kyselin vyjádřených jako obsah kyseliny mléčné [$g \cdot l^{-1}$] v průběhu procesu kvašení vzorků bílého (Oklahoma) a červeného (Dobrovodské) zelí v roce 2014 a bílého (Portoza F1) a červeného (Pourovo) zelí v roce 2015

Den kvašení	Zelí bílé Oklahoma 2014	Zelí červené Dobrovodské 2014	Zelí bílé Portoza F1 2015	Zelí červené Pourovo 2015
0	0,94 ± 0,59	1,15 ± 0,63	1,13 ± 0,60	1,15 ± 0,59
1	0,73 ± 0,42	0,87 ± 0,55	1,20 ± 0,54	1,45 ± 0,58
3	0,66 ± 0,48	1,25 ± 0,54	2,47 ± 0,54	5,26 ± 0,79
6	4,28 ± 0,77	3,62 ± 0,74	2,79 ± 0,62	5,95 ± 0,73
8	5,26 ± 0,65	4,25 ± 0,62	4,37 ± 0,59	6,75 ± 0,78
10	6,13 ± 0,61	4,35 ± 0,69	5,48 ± 0,57	7,12 ± 0,75
13	7,83 ± 0,79	4,42 ± 0,66	6,23 ± 0,71	6,60 ± 0,63
15	8,04 ± 0,57	4,63 ± 0,57	6,93 ± 0,53	7,09 ± 0,70
17	8,57 ± 0,65	4,77 ± 0,66	6,98 ± 0,59	7,16 ± 0,60
20	9,16 ± 0,80	4,84 ± 0,73	7,07 ± 0,70	6,91 ± 0,70
22	8,74 ± 0,72	4,98 ± 0,71	7,69 ± 0,68	7,00 ± 0,53
24	8,67 ± 0,72	4,81 ± 0,62	7,94 ± 0,69	7,61 ± 0,78

Tab. 6: Výsledné hodnoty antioxidační kapacity naměřené metodou FRAP vyjádřené jako Trolox [$mmol \cdot l^{-1}$] v průběhu procesu kvašení vzorků bílého (Oklahoma) a červeného (Dobrovodské) zelí v roce 2014 a bílého (Portoza F1) a červeného (Pourovo) zelí v roce 2015

Den kvašení	Zelí bílé Oklahoma 2014	Zelí červené Dobrovodské 2014	Zelí bílé Portoza F1 2015	Zelí červené Pourovo 2015
0	0,415 ± 0,322	2,412 ± 0,466	0,277 ± 0,302	3,092 ± 0,556
1	0,210 ± 0,279	1,482 ± 0,385	0,080 ± 0,162	1,572 ± 0,651
3	0,226 ± 0,308	1,739 ± 0,437	1,199 ± 0,629	5,576 ± 0,783
6	0,460 ± 0,401	1,459 ± 0,401	1,416 ± 0,684	6,243 ± 0,661
8	0,479 ± 0,398	1,780 ± 0,462	2,216 ± 0,815	7,077 ± 0,922
10	0,571 ± 0,378	1,946 ± 0,418	1,432 ± 0,387	8,655 ± 0,778
13	0,927 ± 0,420	2,354 ± 0,485	2,469 ± 0,903	8,040 ± 0,634
15	1,455 ± 0,435	3,503 ± 0,419	2,680 ± 0,695	8,346 ± 0,708
17	1,421 ± 0,491	3,753 ± 0,475	2,444 ± 0,682	9,143 ± 0,800
20	2,134 ± 0,527	4,042 ± 0,603	2,384 ± 0,772	8,933 ± 0,845
22	1,797 ± 0,502	4,289 ± 0,507	2,688 ± 0,700	9,306 ± 0,863
24	1,389 ± 0,391	3,406 ± 0,413	2,631 ± 0,669	9,369 ± 0,750

Tab. 7: Výsledné hodnoty antioxidační kapacity naměřené metodou DPPH vyjádřené jako Trolox [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$] v průběhu procesu kvašení vzorků bílého (Oklahoma) a červeného (Dobrovodské) zelí v roce 2014 a bílého (Portoza F1) a červeného (Pourovo) zelí v roce 2015

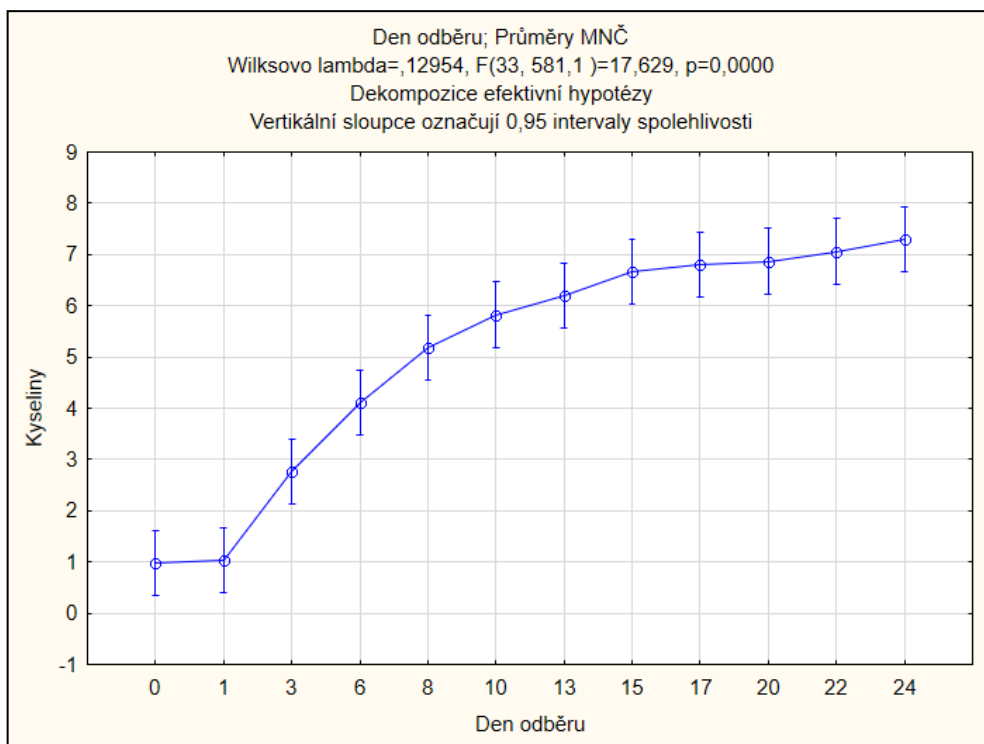
Den kvašení	Zelí bílé Oklahoma 2014	Zelí červené Dobrovodské 2014	Zelí bílé Portoza F1 2015	Zelí červené Pourovo 2015
0	0,449 ± 0,408	2,165 ± 0,488	0,295 ± 0,380	3,060 ± 0,463
1	0,228 ± 0,313	1,707 ± 0,413	0,084 ± 0,172	1,703 ± 0,433
3	0,206 ± 0,318	1,865 ± 0,511	0,997 ± 0,424	5,803 ± 0,723
6	0,468 ± 0,387	1,582 ± 0,398	1,192 ± 0,567	6,802 ± 0,690
8	0,446 ± 0,378	1,741 ± 0,396	1,824 ± 0,740	7,241 ± 0,761
10	0,368 ± 0,349	1,770 ± 0,515	1,860 ± 0,640	7,960 ± 0,846
13	0,701 ± 0,488	2,049 ± 0,379	2,008 ± 0,601	8,224 ± 0,759
15	1,378 ± 0,563	2,608 ± 0,536	1,945 ± 0,540	8,189 ± 0,701
17	1,116 ± 0,460	2,968 ± 0,456	1,707 ± 0,570	8,180 ± 0,701
20	2,090 ± 0,378	2,986 ± 0,423	1,939 ± 0,539	7,513 ± 0,775
22	1,454 ± 0,497	3,779 ± 0,550	2,014 ± 0,635	8,146 ± 0,903
24	0,981 ± 0,515	2,984 ± 0,543	2,181 ± 0,708	7,815 ± 0,839

Tab. 8: Základní popisné statistiky pro naměřené hodnoty titračních kyselin a antioxidační kapacity pro metody FRAP a DPPH

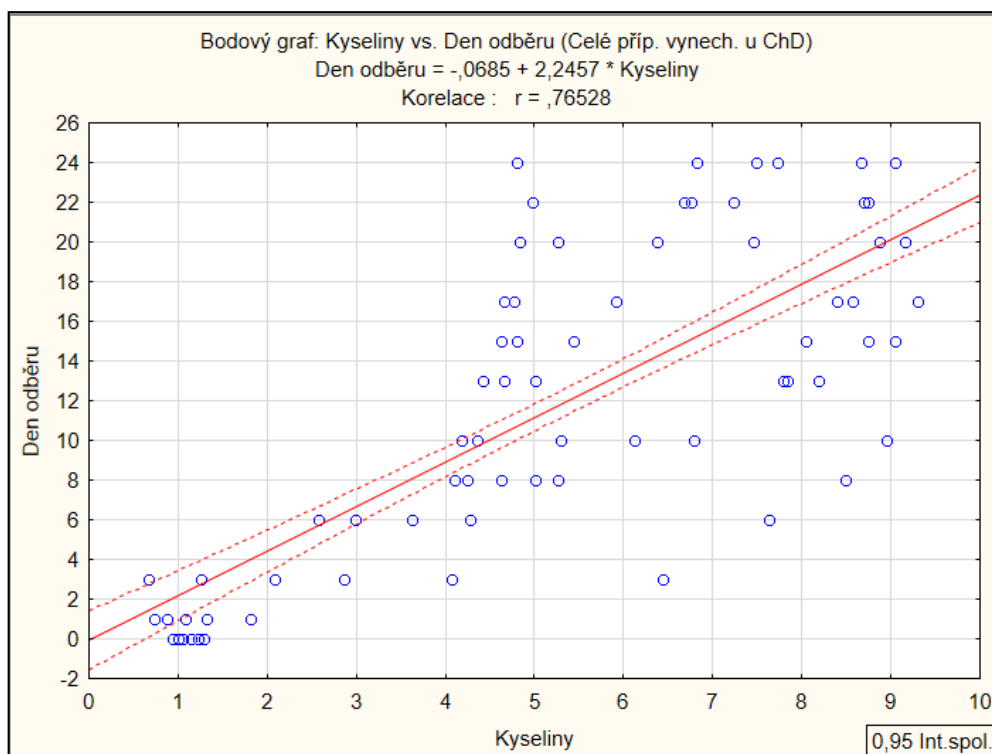
Proměnná	Popisné statistiky (DP data pro analýzu ANOVA)						
	N platných	Průměr	Minimum	Maximum	Rozptyl	Sm.odch.	Var.koef.
Kyseliny	216	5,188492	0,661496	9,29577	7,222793	2,687525	51,79782
FRAP	216	3,585867	0,068000	10,95990	9,311444	3,051466	85,09701
DPPH	216	3,269639	0,060140	9,32180	8,153013	2,855348	87,32915

Tab. 9: Vzájemné korelační závislosti sledovaných faktorů u všech vzorků

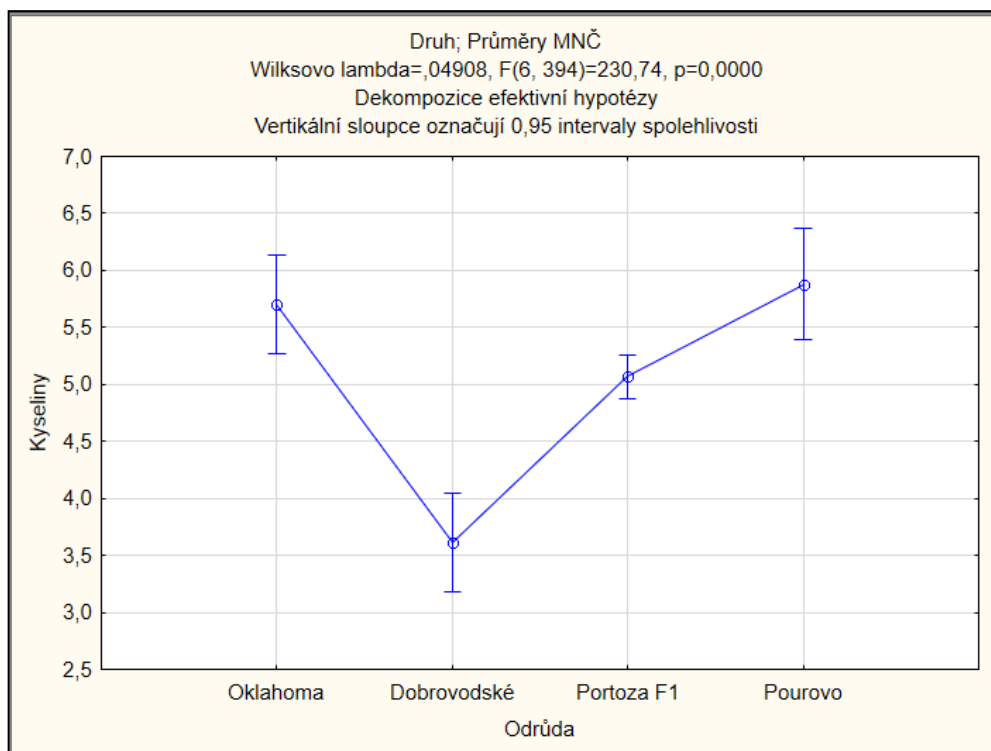
Proměnná	Korelace (DP data pro analýzu ANOVA) Označ. korelace jsou významné na hlad. $p < ,05000$ N=216 (Celé případy vynechány u ChD)					
	Ročník	Den odběru	Opakování	Kyseliny	FRAP	DPPH
Ročník	1,000000	0,000000	0,000000	0,127266	0,410448	0,418032
Den odběru	0,000000	1,000000	0,000000	0,765276	0,400004	0,310563
Opakování	0,000000	0,000000	1,000000	0,000000	0,003959	0,000527
Kyseliny	0,127266	0,765276	0,000000	1,000000	0,419440	0,383508
FRAP	0,410448	0,400004	0,003959	0,419440	1,000000	0,977743
DPPH	0,418032	0,310563	0,000527	0,383508	0,977743	1,000000



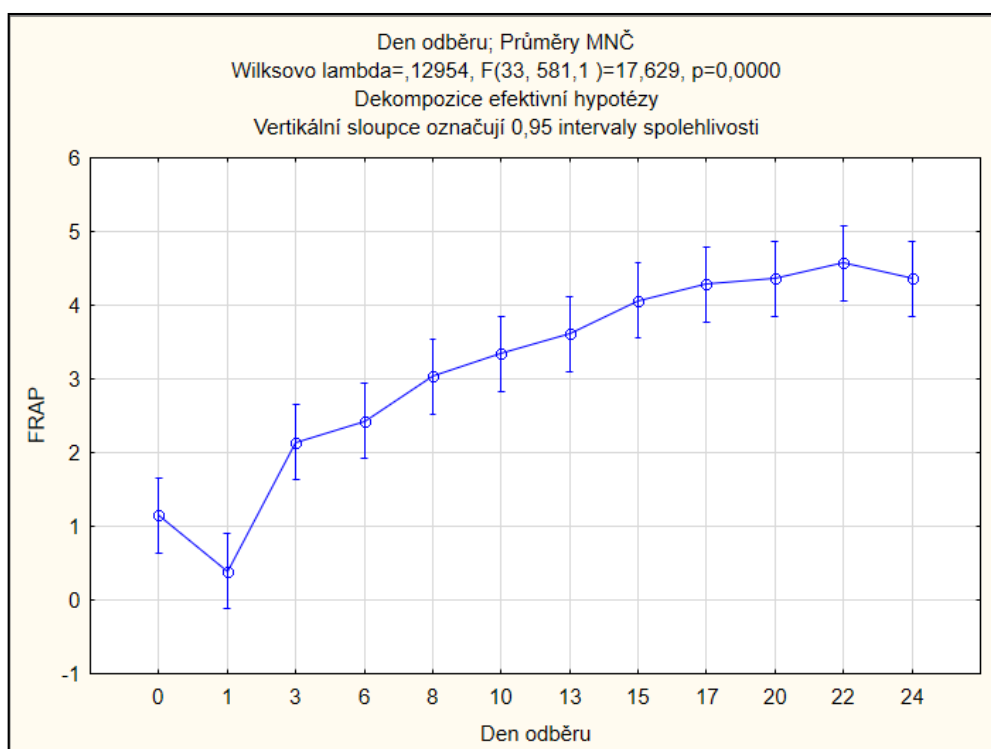
Graf 7: Vývoj průměrných hodnot naměřených titračních kyselin vyjádřených jako obsah kyseliny mléčné [$g \cdot l^{-1}$] v průběhu procesu kvašení vzorků v roce 2014 a 2015



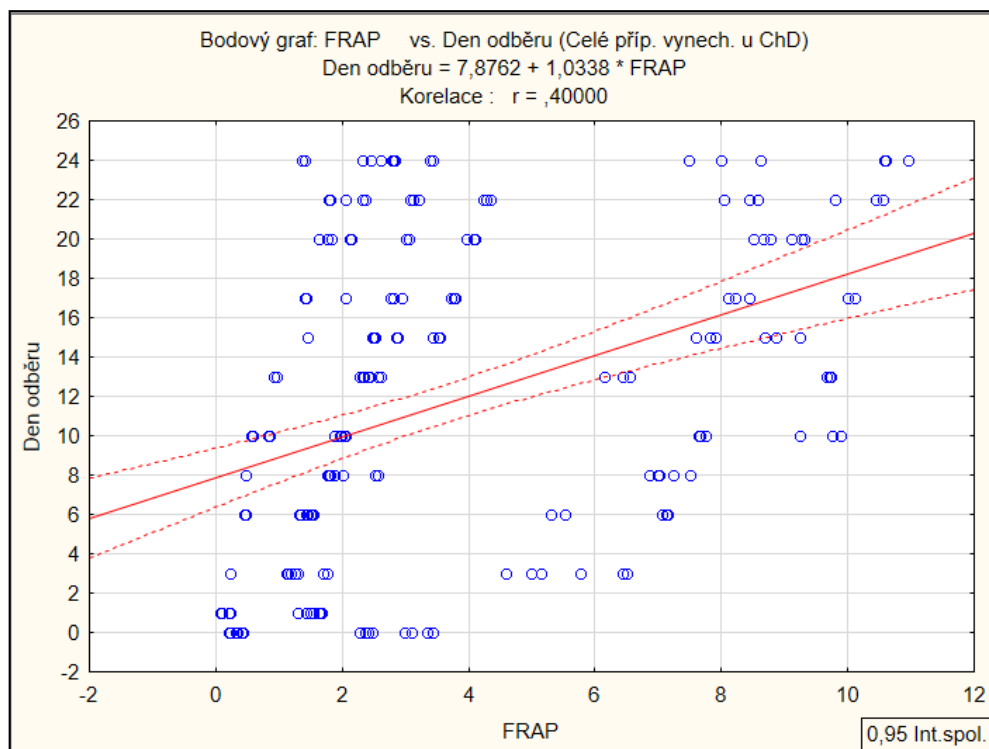
Graf 8: Znáornění korelační závislosti vývoje hodnot naměřených titračních kyselin vyjádřených jako obsah kyseliny mléčné [$g \cdot l^{-1}$] na dni odběru vzorků



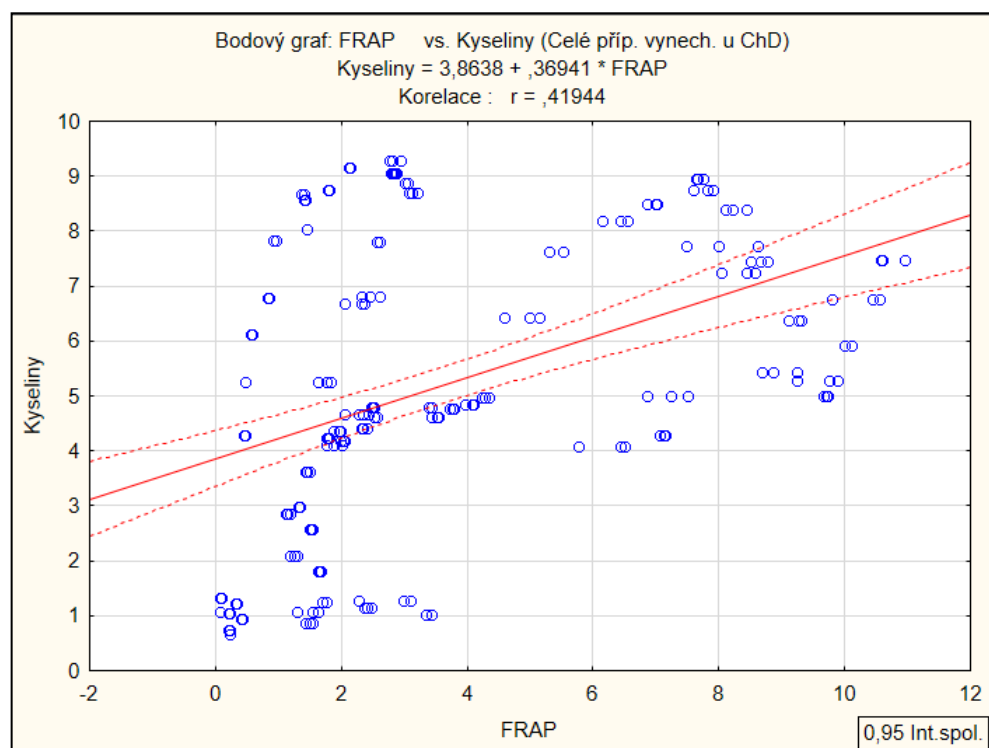
Graf 9: Znárodnění vývoje hodnot naměřených titračních kyselin vyjádřených jako obsah kyseliny mléčné [g*l⁻¹] v závislosti na použité odrůdě zelí



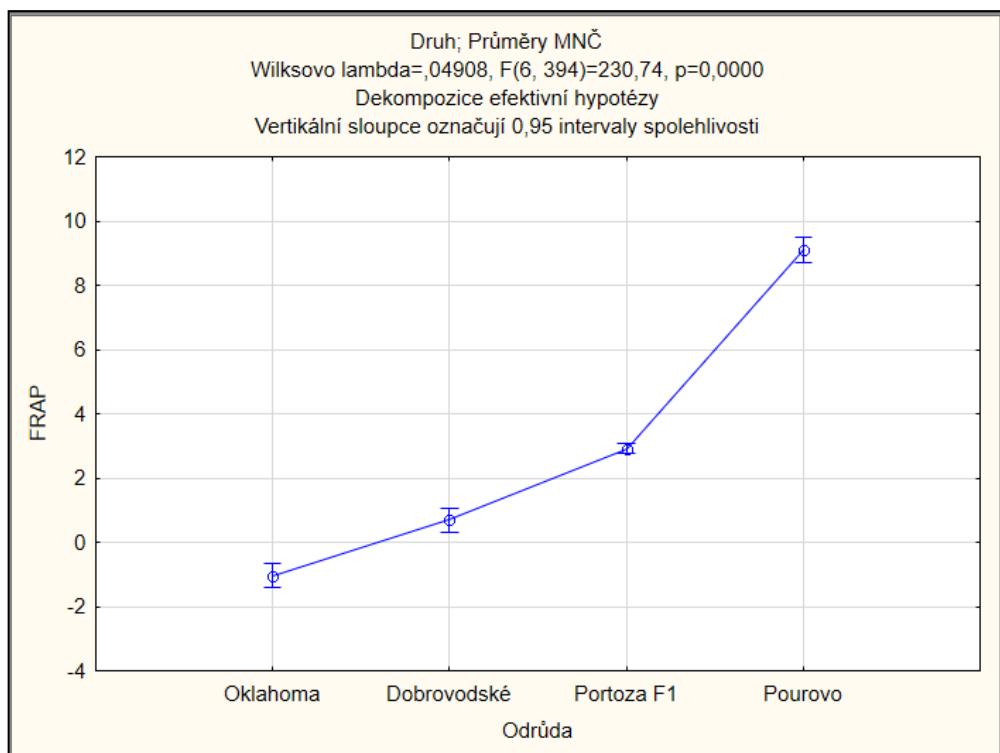
Graf 10: Vývoj průměrných hodnot antioxidační kapacity vyjádřené jako Trolox [mmol*l⁻¹] naměřené metodou FRAP v průběhu procesu kvašení vzorků v roce 2014 a 2015



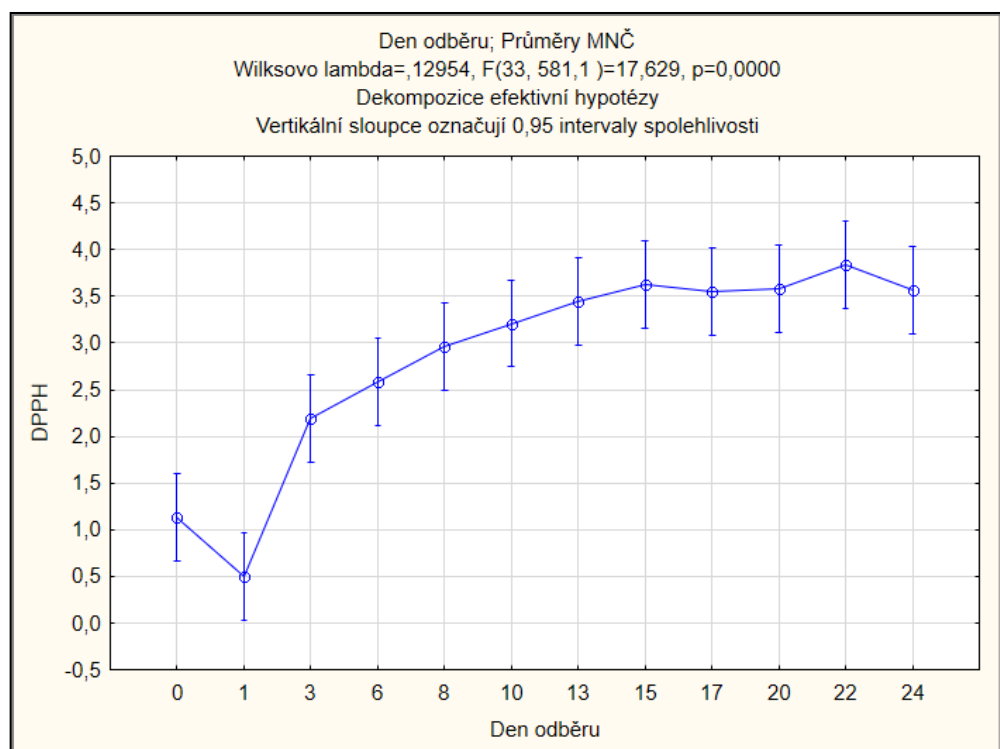
Graf 11: Znáornění korelační závislosti vývoje hodnot antioxidační kapacity vyjádřené jako Trolox [$mmol \cdot l^{-1}$] naměřených metodou FRAP na dni odběru vzorků



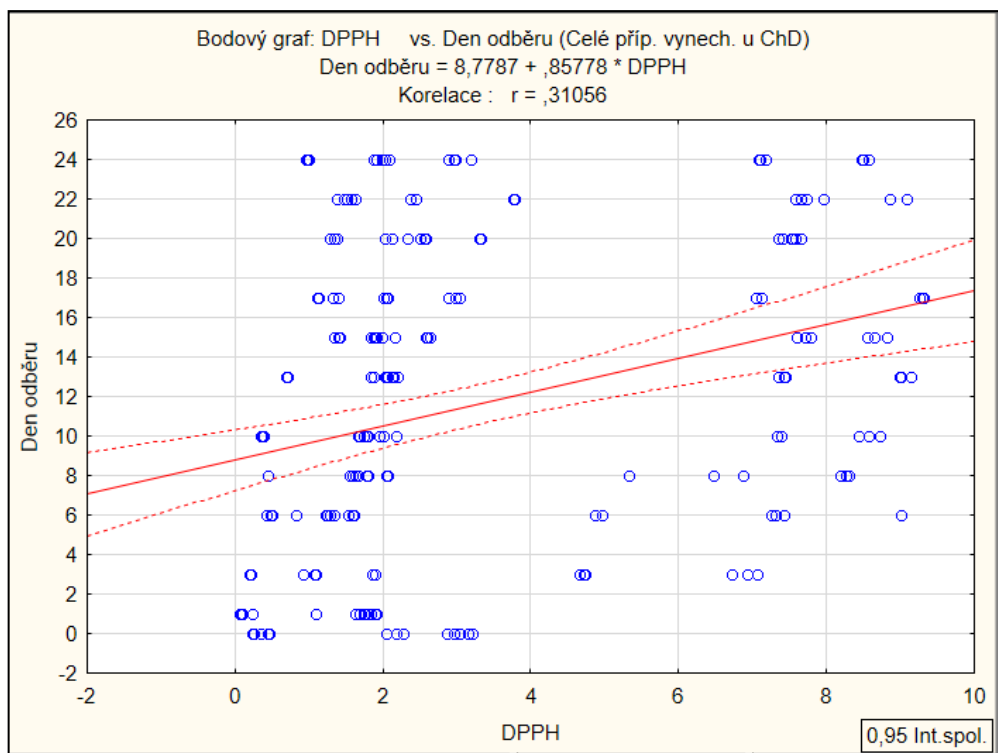
Graf 12: Znáornění korelační závislosti vývoje hodnot antioxidační kapacity vyjádřené jako Trolox [$mmol \cdot l^{-1}$] naměřených metodou FRAP na vývoji hodnot naměřených titračních kyselin vyjádřených jako obsah kyseliny mléčné [$g \cdot l^{-1}$]



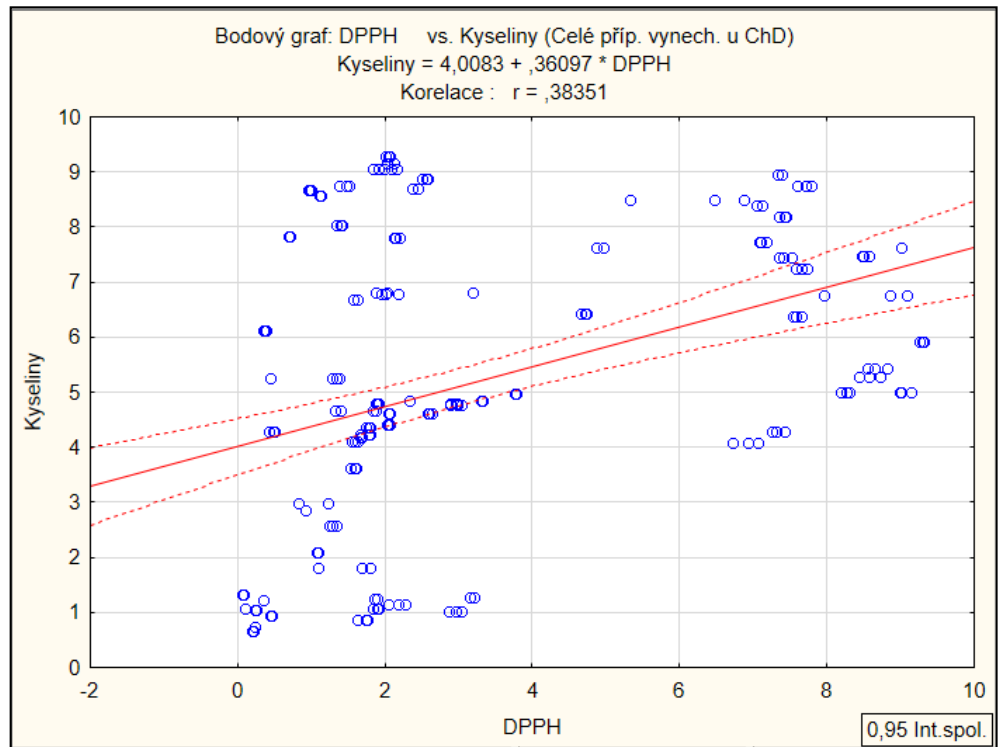
Graf 13: Znáornění vývoje hodnot antioxidační kapacity vyjádřené jako Trolox [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$] naměřených metodou FRAP v závislosti na použité odrůdě zelí



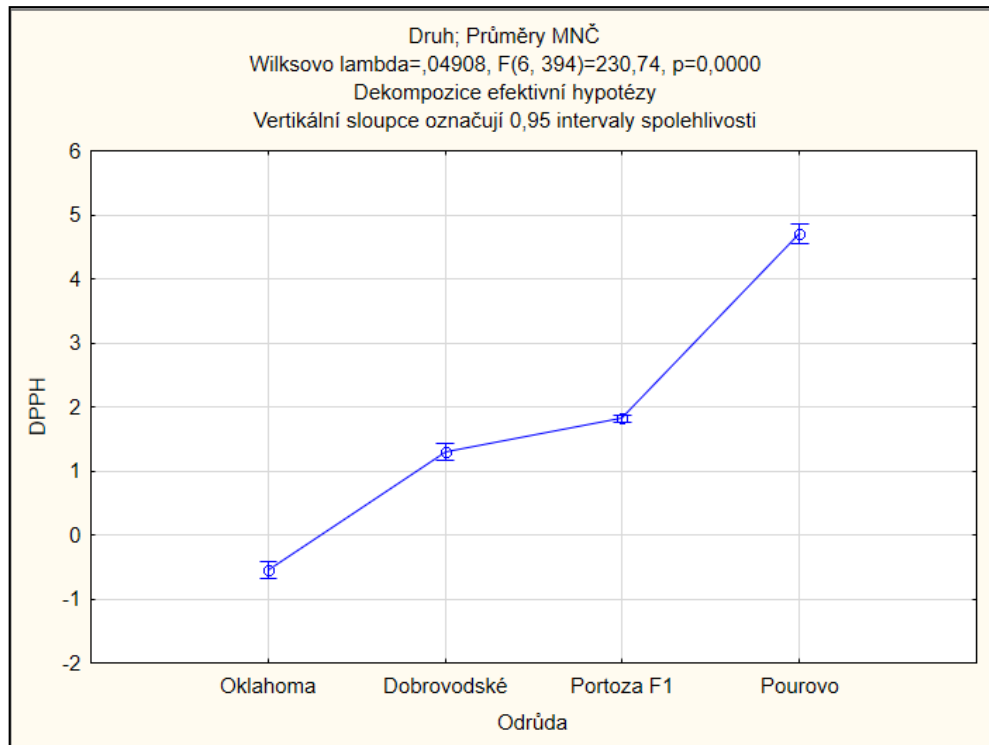
Graf 14: Vývoj průměrných hodnot antioxidační kapacity vyjádřené jako Trolox [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$] naměřené metodou DPPH v průběhu procesu kvašení vzorků v roce 2014 a 2015



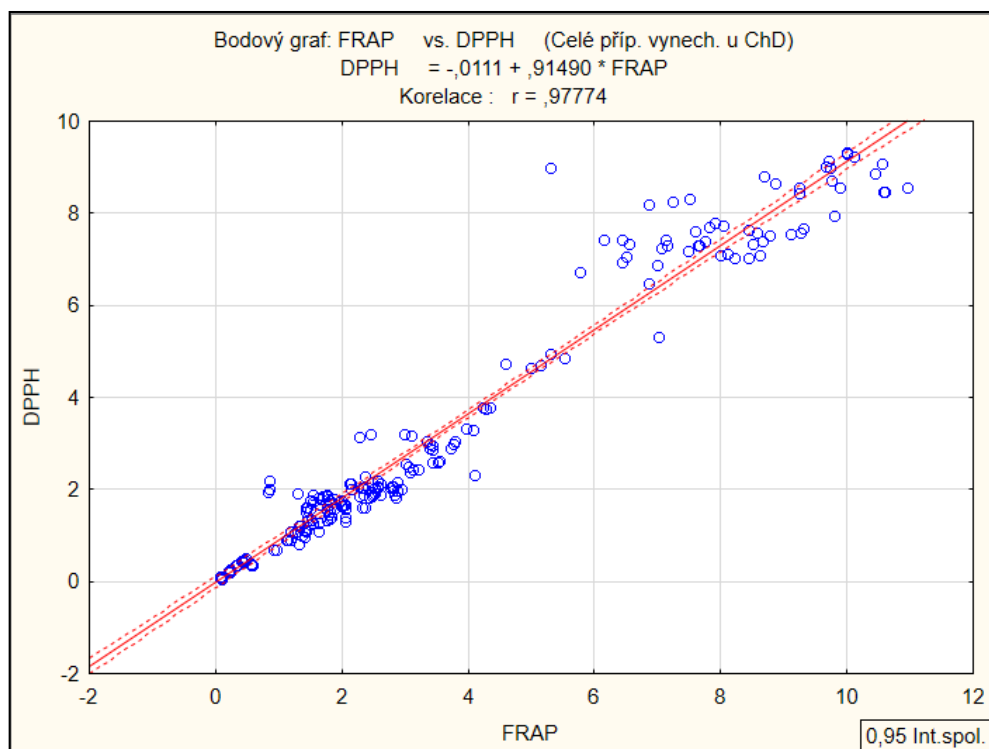
Graf 15: Znáornění korelační závislosti vývoje hodnot antioxidační kapacity vyjádřené jako Trolox [$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$] naměřených metodou DPPH na dni odběru vzorků



Graf 16: Znáornění korelační závislosti vývoje hodnot antioxidační kapacity vyjádřené jako Trolox [$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$] naměřených metodou DPPH na vývoji hodnot naměřených titračních kyselin vyjádřených jako obsah kyseliny mléčné [$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$]



Graf 17: Znáornění vývoje hodnot antioxidační kapacity vyjádřené jako Trolox [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$] naměřených metodou DPPH v závislosti na použité odrůdě zelí



Graf 18: Znáornění korelační závislosti vývoje hodnot antioxidační kapacity vyjádřené jako Trolox [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$] naměřených metodou FRAP a vývoje hodnot antioxidační kapacity vyjádřené jako Trolox [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$] naměřených metodou DPPH