



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**DETEKCE NEDEKLAROVANÝCH DRUHŮ OVOCE V
POTRAVINOVÝCH VÝROBCÍCH POMOCÍ MOLEKULÁRNĚ-
BIOLOGICKÝCH A INSTRUMENTÁLNÍCH METOD**

DETECTION OF UNDECLARED FRUIT SPECIES IN FOODSTUFFS USING METHODS OF MOLECULAR
BIOLOGY AND INSTRUMENTAL METHODS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Petra Svobodová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Lenka Fialová

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1698/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Petra Svobodová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **Ing. Lenka Fialová**

Název bakalářské práce:

Detekce nedeklarovaných druhů ovoce v potravinových výrobcích pomocí molekulárně–biologických a instrumentálních metod

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše
2. Izolace a charakterizace DNA z vybraných ovocných výrobků
3. Extrakce a charakterizace vybraných látek z ovocných výrobků pomocí instrumentálních metod
4. Vyhodnocení a diskuse výsledků

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

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

Petra Svobodová
student(ka)

Ing. Lenka Fialová
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato práce je zaměřena na detekci jablečné složky v dětských ovocných příkrmech. Teoretická část se zabývá samotným plodem – jablkem; falšováním potravin, jakožto důvodem ke kontrole složení a metodami, jak molekulárně-biologickými, tak instrumentálními, kterými lze falšování potravin prokázat. V rámci experimentální části byly zakoupeny komerční produkty s obsahem jablečného pyré a byly připraveny modelové směsi jako repliky zakoupených produktů. Z těchto vzorků byla izolována DNA, ověřena její amplifikovatelnost a po výběru vhodných primerů pro detekci jablka byla prokázána přítomnost jablečné složky. Ze stejných vzorků byly připraveny methanолоvé extrakty pro HPLC postupem, který byl již dříve využitý pro extrakci fenolických látek z dužiny jablka [1]. Pomocí této analýzy mělo být identifikováno jablko v ovocných pyré s využitím floridzinu jako markeru přítomnosti jablečné složky.

Výsledkem bylo zjištění jablečné složky jak v komerčních výrobcích, tak v modelových směsích pomocí qPCR. Testovaná metoda extrakce fenolických látek se však ukázala jako nevhodná pro využití v analýze ovocných pyré, jelikož floridzin nebyl detekován ani v extraktu z jablečného pyré, ani v modelových směsích, kam toto pyré bylo přidáno.

ABSTRACT

This thesis is focused on the detection of apple component in fruit-based baby food. The theoretical part deals with the fruit itself – the apple; food adulteration as a reason for the control of food composition and methods, both instrumental and those of molecular biology, by which food adulteration can be detected. In the experimental part, commercial products containing apple puree were purchased and model mixtures were prepared as replicas of the purchased products. DNA was isolated from these samples, its amplifiability was verified, and the presence of the apple component was detected after the selection of suitable species-specific primers. Methanol extracts for HPLC were prepared from the above-mentioned samples using a procedure previously used for the extraction of phenolic substances from apple pulp [1]. Using this analysis, apple in fruit purees was to be identified using phloridzin as a marker for the presence of the apple component.

The result was a successful detection of the apple component in both commercial products and model mixtures using qPCR. However, the tested method of phenolic substance extraction proved to be unsuitable for use in the analysis of fruit purees, as phloridzin was not detected either in the apple puree extract or in the model mixtures to which this puree was added.

KLÍČOVÁ SLOVA

Dětský příkrm, falšování potravin, HPLC, izolace DNA, jablko, ovocné pyré, qPCR.

KEY WORDS

Baby food, food adulteration, HPLC, DNA isolation, apple, fruit puree, qPCR.

SVOBODOVÁ, Petra. *Detekce nedeklarovaných druhů ovoce v potravinových výrobcích pomocí molekulárně-biologických a instrumentálních metod* [online]. Brno, 2021 [cit. 2021-07-28]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131414>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Lenka Fialová.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studentky

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala své vedoucí Ing. Lence Fialové za neskutečnou ochotu, trpělivost, čas a snahu mě mnohé naučit. Mé díky patří taktéž podporujícím rodičům a partnerovi.

OBSAH

1. ÚVOD.....	8
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1. OVOCE.....	9
2.1.1. Význam ovoce ve výživě	9
2.1.2. Ovocné výrobky	10
2.1.2.1. Ovocné protlaky	10
2.1.3. Jablň domáci.....	10
2.1.3.1. Chemické složení jablka.....	10
2.2. FALŠOVÁNÍ POTRAVIN	11
2.2.1. Metody falšování potravin	11
2.2.2. Způsoby detekce a kontrola výrobků	12
2.3. MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÉ METODY	12
2.3.1. DNA	12
2.3.1.1. Struktura DNA.....	12
2.3.2. Izolace DNA.....	13
2.3.2.1. Výběr materiálu	13
2.3.2.2. Homogenizace tkání a pletiv	13
2.3.2.3. Lyze buňky	13
2.3.2.4. Odstranění hrubých nečistot.....	13
2.3.3. Purifikace DNA.....	13
2.3.3.1. Ochrana před rozkladem DNA.....	13
2.3.3.2. Odstranění proteinů a RNA	14
2.3.3.3. Odstranění polyfenolů	14
2.3.3.4. Odstranění polysacharidů	14
2.3.3.5. Adsorpce DNA na pevné fázi	14
2.3.3.6. Srážení DNA	14
2.3.4. Skladování DNA	14
2.3.5. Stanovení koncentrace a čistoty DNA	15
2.4. POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR).....	16
2.4.1. Komponenty PCR	16
2.4.1.1. Primery	16
2.4.1.2. DNA-polymeráza	16
2.4.1.3. Deoxyribonukleotidtrifosfáty (dNTP).....	16
2.4.1.4. Pufr s hořčnatými ionty	16
2.4.2. Konvenční PCR.....	16
2.4.3. Real-time PCR.....	18
2.4.3.1. Detekce a kvantifikace produktu	18
2.4.3.2. Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM).....	18
2.4.4. Elektroforéza	18
2.4.4.1. Gelová elektroforéza	19
2.5. INSTRUMENTÁLNÍ ANALYTICKÉ METODY	19
2.5.1. Chromatografie.....	20
2.5.1.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	20
3. CÍL PRÁCE.....	21
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	22
4.1. ROSTLINNÝ MATERIÁL A KOMERČNÍ VÝROBKY	22
4.1.1. Rostlinný materiál	22
4.1.2. Komerční výrobky.....	22

4.1.2.1. Kubík ovocná kapsička – 100% husté ovocné pyré s přidavkem vitamínu C	22
4.1.2.2. Babylove bio ovocný příkrm broskev, maracuja a jablko.....	22
4.1.2.3. Kojenecká výživa – Ovocná přesnídávka s meruňkami	22
4.2. VYBAVENÍ LABORATOŘE.....	22
4.2.1. Chemikálie	22
4.2.2. Komerční kit.....	23
4.2.3. Přístroje a pomůcky	23
4.3. PRACOVNÍ POSTUPY	23
4.3.1. Příprava modelových směsí	23
4.3.2. Izolace rostlinné DNA pomocí komerčního kitu	24
4.3.3. Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA	24
4.3.4. Příprava směsí pro PCR	24
4.3.5. PCR	25
4.3.6. Příprava agarózového gelu	26
4.3.7. Elektroforéza	26
4.3.8. Příprava extraktů pro HPLC.....	26
4.3.9. HPLC.....	26
5. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	27
5.1. MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÉ METODY	27
5.1.1. Izolace a spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA z ovoce ..	27
5.1.2. Ověření amplifikovatelnosti DNA z listů a dužiny ovoce pomocí qPCR.....	27
5.1.3. Výběr primerů pro důkaz přítomnosti jablka v ovocných pyré	29
5.1.3.1. Test funkčnosti primerů specifických pro jablko	29
5.1.3.2. Optimalizace teplotního profilu PCR pro primery specifické pro jablko	30
5.1.3.3. Ověření specifity primerů FT MDP; MdFKBP42a; MdFKBP65a.....	32
5.1.4. Stanovení citlivosti	36
5.1.4.1. Citlivost primerů MdFKBP42a	36
5.1.4.2. Citlivost primerů MdFKBP65a	38
5.1.5. Izolace a spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA z komerčních výrobků.....	40
5.1.6. Ověření amplifikovatelnosti DNA z komerčních výrobků pomocí qPCR.....	41
5.1.7. Izolace a spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA z domácích pyré a modelových směsí	43
5.1.8. Ověření amplifikovatelnosti DNA z domácích pyré a modelových směsí pomocí qPCR	45
5.1.9. Průkaz přítomnosti jablka v komerčních výrobcích a modelových směsích .	47
5.2. INSTRUMENTÁLNÍ ANALYTICKÉ METODY	50
5.2.1. Stanovení fenolických látek v ovocných pyré pomocí HPLC	50
6. ZÁVĚR	53
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	54
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	59
9. SEZNAM PŘÍLOH.....	60
10. PŘÍLOHY	61

1. ÚVOD

Ačkoli falšování potravin není v České republice nijak častým problémem, je zapotřebí provádět pravidelné kontroly potravinových produktů, aby nedošlo ke klamání spotřebitele. Jedna ze skupin komerčních produktů, co bývá cílem falšování, jsou právě ovocné výrobky. Vzhledem k vysoké ceně některých druhů ovoce na trhu dochází k nahrazování těchto surovin za suroviny levnější; a to buď za želírující látky a vodu, nebo v lepším případě za levnější ovoce – jablka a hrušky [2]. Specifickým produktem z ovoce jsou právě dětské příkrmy, které by měly být maximálně sledovány a kontrolovány vzhledem k cílové skupině konzumentů.

Dětské příkrmy se mohou dětem servírovat od 6 měsíců a často bývají prvním setkáním dětí s běžným jídlem. O to důležitější je jejich složení a nutriční hodnota. Cukry a polysacharidy z ovoce jsou hodnotnějším zdrojem energie než přidaný bílý cukr a škrobová plnidla. Zároveň i vláknina, fenolické látky a další antioxidanty z ovocných složek mají pozitivní vliv na dětský organismus [3].

V této práci je sledována jablečná složka dětských příkrmů pomocí molekulárně-biologických a instrumentálních metod, a to z důvodu jejího využití k falšování, jakožto nejlevnější ovocné suroviny na trhu v našich klimatických podmínkách. Důkaz přítomnosti jablka byl proveden dvěma metodami, a to real-time PCR a HPLC. Oba přístupy skýtají určité výhody i nevýhody. Jelikož qPCR využívá působení enzymu polymerázy, je tato metoda citlivá na inhibitory, kterých se v rostlinných matricích nachází mnoho. Naopak předností je její rychlost (vzorky se analyzují současně), citlivost detekce a malé množství vzorku i chemikálií potřebných k analýze. Mezi výhody HPLC lze zařadit větší spektrum markerů (od fenolických látek, přes karotenoidy až k aminokyselinám) narozdíl od PCR, která využívá pouze DNA nebo RNA. Naopak provedení HPLC je zdlouhavé vzhledem k tomu, že se vzorky analyzují postupně a nevýhody skýtají také některé nebezpečné látky, které se využívají jako mobilní fáze (např. methanol).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Ovoce

Pojem ovoce je lehce představitelný, obtížnější je ale jeho přesná klasifikace. Dle vyhlášky č. 157/2003 Sb. se ovoce definuje jako: „jedlé plody a semena stromů, keřů nebo bylin uváděné do oběhu bezprostředně po sklizni nebo po určité době skladování v syrovém stavu“ [4]. Tato státem určená definice stanovující především rozdíl mezi ovocem a zeleninou však není jednoznačná. Existují různé druhy klasifikací jako botanická nebo kulinářská, a každá se staví v pohledu na ovoce či zeleninu jinak [5].

2.1.1. Význam ovoce ve výživě

Ovoce má ve stravě člověka nezastupitelný charakter. Díky jeho přírodnímu původu obsahuje mnoho biologicky aktivních látek. Tyto látky působí preventivně proti různým neinfekčním onemocněním jako je rakovina, nemoci srdce, zažívacích orgánů, nervového systému i poruchy látkové výměny [6; 7].

Vzhledem k nízké energetické hodnotě (ve srovnání s průmyslově zpracovanými produkty), vysokému obsahu vody a vlákniny, je ovoce výborným pomocníkem v boji proti obezitě. Navíc svými až 95 % vody pomáhá hydratovat organismus. Vláknina (ač se řadí mezi polysacharidy) je pro tělo nestravitelná, tudíž napomáhá k pocitu nasycení a zároveň při průchodu trávicím traktem čistí střeva a podporuje výskyt pozitivních mikroorganismů [8; 6; 7]

Významnou hodnotu mají také minerály a vitamíny. Mezi minerální látky patří například draslík (důležitý pro správnou funkci ledvin a předávání nervových impulsů), železo (pro správnou krevotvorbu), měď, fluor (podporuje stavbu kostí a zubů) nebo mangan [6; 7]. Vitamíny obsahuje ovoce jak rozpustné v tucích (A, D, E, K), tak i rozpustné ve vodě (vitamíny skupiny B a vitamín C). Jejich potřeba je především v metabolických a regulačních dějích a také jsou nutností pro optimální enzymovou aktivitu (např. vitamín B1 – enzym dekarboxyláza nebo vitamín B7 – enzym pyruvátkarboxyláza) [7; 9; 10].

Vitamín A se v ovoci nachází ve formě provitaminů – karotenů, které si tělo na vitamín A přemění. Obsahují ho žluté, oranžové až červené potraviny jako například meruňky. Vitamín K nalezneme jako K₁ v jahodách (druhý typ – K₂ syntetizují bakterie ve střevech). Avšak nejvýraznější složkou je vitamín C – kyselina askorbová [7; 9; 10]. Tuto kyselinu nalezneme hlavně v citrusových plodech nebo bobulovitém ovoci. Napomáhá organismu v odolnosti proti infekcím, je nezbytná pro tvorbu kolagenu a podporuje vstřebávání železa [11].

Některé vitamíny se považují i za antioxidanty, a to z důvodu, že působí proti volným radikálům. Tyto radikály vznikají v lidském organismu buď samovolně nebo působením různých vnějších vlivů (vystavení znečištěnému prostředí, extrémní tělesná námaha...). S některými radikály si umí tělo poradit, pokud ale dojde k přemíře výskytu těchto reaktivních částic, dostává se organismus do oxidačního stresu a je oslabený. Právě antioxidanty umí volné radikály neutralizovat a tím předcházet různým onemocněním (především mutacím DNA a s nimi spojenými chorobami). Mezi antioxidanty se řadí vitamíny C, E, karotenoidy, flavonoidy a další [7; 9].

Světová zdravotnická organizace doporučuje konzumovat minimálně 400 g ovoce a zeleniny denně (s převahou zeleniny) [8; 6]. Což odpovídá zhruba například jednomu jablku, dvěma rajčatům a půlce salátové okurky.

2.1.2. Ovocné výrobky

Vzhledem k rychlé degradaci ovoce, sezónnosti a potřebě celoroční konzumace se tyto potraviny často zpracovávají v různé ovocné výrobky. Typicky marmelády, džemy, protlaky, povidla, klevely, kompoty nebo ovocné šťávy. Ovoce také může být uchovávané sušené nebo zmrazené. Každý z těchto druhů ovocných výrobků má zákonem stanovené požadavky na složení. Například džemy musí obsahovat minimálně 350 g ovoce v 1 kg výrobku (existují výjimky pro speciální druhy), klevely 1500 g ovoce v 1 kg výrobku [4].

Během zpracování projde ovoce širokým spektrem předběžných technologických operací, kdy nejprve dochází ke sklizni, poté k čištění (odstranění kontaminantů), třídění a odstranění nepoživatelných částí (především odstropkování) [7]. Poté už se výroba řídí dle typu požadovaného výrobku.

2.1.2.1. Ovocné protlaky

Ovocný protlak je charakterizován řídkou až kašovitou konzistencí. Musí být vyroben z jedlé části ovoce, tedy bez slupek, jader, kůry apod. Zároveň musí být propasírován a určitým způsobem konzervován [4].

Proces výroby začíná rozvažením ovoce, na které navazuje pasírování (prostírání). Někdy tento krok nahrazuje i odstranění nepoživatelných částí, neboť se zachytí na prostěračce. Poslední fází je konzervace, která může být chemická, tepelná nebo zmrazením. Chemickou konzervací se rozumí přidavek oxidu siřičitého (v dnešní době se od něj odstupuje, popřípadě se využívá pro méně jakostní výrobky). Kvalitní protlaky jsou spíše konzervovány tepelně [7].

2.1.3. Jablň domácí

Jablň domácí (*Malus domestica*) se řadí do třídy Magnoliopsida – dvouděložné, řádu Rosales – růžotvaré, čeledi Rosaceae – růžovité [12].

Původně jablň pocházela z Asie, odkud doputovala do střední Evropy. Dnes se pěstuje v mírném pásu téměř po celém světě. V České republice pěstovaná jablň domácí vznikla zkřížením a šlechtěním několika druhů [5; 8].

Tento listnatý, opadavý, otužilý, středně vysoký strom plodí malvice, které se nazývají jablka. Tyto plody jsou nejvíce konzumovaným ovocem v Česku. Kromě okamžité konzumace se jablka různě zpracovávají, stromy mají i okrasné využití a dřevo jabloní bývá využíváno k výrobě golfových holí nebo udíren [5; 12].

2.1.3.1. Chemické složení jablka

Jablko, jako každé ovoce, je tvořeno především vodou. Následují sacharidy (především fruktóza, sacharóza a glukóza), které tvoří částečně i vlákninu. Tuky a bílkoviny obsahuje jablko ve stopovém množství a není dobrým zdrojem těchto živin [13]. Přehledné složení plodu jablka je uvedeno v Tabulce 1.

Tabulka 1: Složení jablka (na 100 g) [13]

Látka	koncentrace [g]
Voda	85,6
Sacharidy	13,8
Bílkoviny	0,3
Tuky	0,2
Vláknina	2,4
Minerály	0,2

Důležitější význam mají bioaktivní látky, mezi které se řadí polyfenoly, polysacharidy nebo organické kyseliny. Typickým zástupcem polysacharidů je pektin, který zastává funkci vlákniny [14]. Do organických kyselin se řadí například kyselina jablečná, v nižší koncentraci kyselina citrónová nebo salicylová [6].

Jablečné polyfenoly zahrnují fenolové kyseliny, dihydrochalkony a flavonoidy. Například kyselinu chlorogenovou, kávovou, maleinovou apod. Mezi flavonoidy se řadí katechiny, antokyany, flavonoly nebo flavanoly. Polyfenolické látky dávají jablku (zejména slupce) barvu a chuť. Těmto látkám se také přisuzují významné zdravotní benefity zahrnující antioxidační a antidegenerativní účinky [14; 15]. Mimo to ale značně ztěžují izolaci DNA, neboť se na ni vážou a nejdou odstranit běžnou extrakcí [16].

Dalšími mikronutrienty v jablku jsou především kyselina askorbová a různé minerály jako draslík, vápník, hořčík, fosfor, měď, železo nebo mangan (i když ve stopovém množství) [6; 13].

2.2. Falšování potravin

Státní zemědělská a potravinářská inspekce (což je kontrolní orgán České republiky, který se mimo jiné zabývá i odhalováním falšovaných potravin) nahlíží na falšování takto: „Zákon o potravinách a tabákových výrobcích č. 110/1997 Sb. pojem "falšovaná potravina" či "falšování" přímo nedefinuje. Podle § 10 tohoto zákona je však zakázáno uvádět do oběhu potraviny klamavě označené. Falšování potravinářských výrobků lze v konečném důsledku považovat právě za klamavé označování, protože zákon č. 634/1992 Sb., o ochraně spotřebitele, přímo v § 8 říká, že nikdo nesmí klamat spotřebitele, zejména uvádět nepravdivé, nedoložené, neúplné, nepřesné, nejasné, dvojsmyslné nebo přehnané údaje anebo zamlčet údaje o skutečných vlastnostech výrobků, služeb či úrovni nákupních podmínek.“ [2].

2.2.1. Metody falšování potravin

V praxi se tedy falšování nejčastěji provádí z ekonomických důvodů a to tak, že se dražší složka nahrazuje levnější, která není deklarovaná. Typicky se tento jev vyskytuje u luxusních produktů jako jsou lihoviny (přítomnost methanolu na úkor ethanolu), med (uměle přidaný cukr), čokoláda (náhrada kakaového másla za jiné rostlinné) nebo ovocné výrobky (cukr, želírující látka nahrazují ovocnou složku nebo je dražší ovocná složka nahrazena levnější) [2; 17].

Dalšími metodami je například nedodržení deklarovaných technologií (výroba olejů), nesprávné uvedení místa původu (především u vína nebo u jistých druhů ovoce a

zeleniny – česnek), dále přídavek vody a aditiv (typicky ředění ovocných šťáv, umělé vázání vody do ryb, rybích a masných výrobků) [2; 17].

2.2.2. Způsoby detekce a kontrola výrobků

K odhalení falšování se využívá několik přístupů. Jednou z původních metod je izotopová analýza, při které se stanovuje poměr izotopů uhlíku, vodíku, kyslíku nebo dusíku pomocí hmotnostní spektrometrie. Tímto způsobem lze určit pravost lihovin, masných výrobků nebo geografický původ rostlin a výrobků z nich [17; 18].

Dalším z přístupů jsou postupy založené na analýze DNA. Tyto metody využívají jedinečnosti struktury DNA – detekce polymorfismu nebo polymerázová řetězová reakce v reálném čase. Vhodným využitím je identifikace použitých složek masa, druhů rýže nebo ovoce [18].

Chromatografické metody naopak využívají speciálních markerů pro konkrétní druh. Instrumentace je u plynové nebo kapalinové chromatografie většinou ve spojení s hmotnostní spektrometrií nebo UV-VIS detekcí. Chromatografie se využívají především k autentizaci potravin – profily polyfenolických sloučenin u rostlinných materiálů, triacylglycerolů, sterolů apod. Typickým jablečným markerem, který bývá sledován, je floridzin. Jedná se o flavonoid, který je specifický pro jablka a není v dostatečném množství přítomný v jiných druzích ovoce [17; 18].

Mimo uvedené lze využít i proteomických způsobů (analýza aminokyselin v bílkovinách) nebo spektroskopických metod jako infračervená spektrometrie nebo Ramanova spektrometrie [18].

2.3. Molekulárně-biologické metody

Molekulární biologie se zabývá strukturami a mechanismy buněčných systémů. Tudiž zkoumá především DNA, RNA a proteiny. Do metod molekulární biologie se řadí izolace nukleových kyselin, jejich purifikace, následná amplifikace, sekvenování, klonování apod [19].

2.3.1. DNA

Základem každé buňky je deoxyribonukleová kyselina, která uchovává genetickou informaci [20].

2.3.1.1. Struktura DNA

DNA je tvořena dvěma polynukleotidovými vlákny, která jsou stočena do šroubovice. Jednotlivé nukleotidy jsou tvořeny fosfátem, sacharidovou složkou, což je v případě DNA deoxyribóza a dusíkatou bází. Báze se vyskytují dvojího typu dle heterocyklu, od kterého jsou odvozeny: purinové (kombinace pyrimidinu a imidazolu) – adenin, guanin a pyrimidinové (aromatický kruh se 2 dusíky) – cytosin a thymin. Na základě bází odlišujeme 4 nukleotidy, které tvoří celou dvoušroubovici. Jednotlivé nukleotidy jsou spojeny kovalentní vazbou a tvoří páteř (fosfodiesterová vazba mezi deoxyribózami). Dvě vlákna jsou propojena vodíkovými můstky, přičemž záleží na komplementaritě jednotlivých bází, které se snaží nalézt energeticky nejvhodnější konformaci. Proto se adenin váže s thyminem – tvoří 2 vodíkové můstky a guanin s cytosinem – ty tvoří 3 vodíkové můstky, jejich vazba je tudíž pevnější [20; 21; 22].

2.3.2. Izolace DNA

Prvním krokem před analýzou je příprava samotné DNA. Cílem této operace je získání dostatečného množství nukleové kyseliny v kvalitě vhodné pro analýzu. DNA je potřeba izolovat z vybraného materiálu a potažmo z buněk, ve kterých je uložena. Metody izolace se liší v závislosti na požadavcích následných operací [23].

V dnešní době se pro izolaci DNA využívají především komerčně vyráběné kity, které jsou specializované přímo na vybraný materiál a zahrnují postupy uvedené níže [24].

2.3.2.1. Výběr materiálu

Důležitý je vhodný zdroj buněk. V ideálním případě by se mělo jednat o mladý zdravý materiál. Pokud izolujeme rostlinnou DNA, dobrým zdrojem jsou mladé listy, kde je velké množství buněk a zároveň malé množství látek ztěžujících izolaci, např. škrobu. Naopak starší listy obsahují vysokou koncentraci tříslovin, polyfenolů nebo sekundárních metabolitů [25].

Vhodným skladováním před samotnou izolací zabráníme aktivitě některých enzymů, které by degradovaly samotnou DNA. Toho se dosahuje nejčastěji pomocí zmrazení [25].

2.3.2.2. Homogenizace tkání a pletiv

U buněk, které obsahují buněčnou stěnu (i rostlinné buňky), je izolace ztížená. Využívá se degradace jak mechanické, tak enzymové [26]. Rozmělnění v tekutém dusíku a rozetření v třence jsou nejčastějšími postupy. K chemické homogenizaci se nejčastěji využívají enzymy jako celulózy, hemicelulózy nebo pektinázy [25; 26].

2.3.2.3. Lyze buňky

Po rozrušení buněčné stěny se pokračuje přidáním detergentů, které způsobují solubilizaci cytoplazmatické membrány [23]. Mezi silné detergenty se řadí iontové povrchově aktivní látky jako laurylsíran sodný. Jemnější metodou je využití neiontového detergentu – Triton X-100 [23; 25].

V jednodušším případě není zapotřebí detergentů a buňky samy popraskají vlivem roztoku s nižší osmolaritou [26].

2.3.2.4. Odstranění hrubých nečistot

Pomocí centrifugace se následně odstraní nerozpustné buněčné zbytky [26]. Tyto nečistoty se usadí na dně zkumavky a výsledkem je odebíraný supernatant [24].

2.3.3. Purifikace DNA

Jelikož se nyní DNA nachází v roztoku s kontaminanty jako je RNA, proteiny, polyfenoly či polysacharidy, je zapotřebí její přečištění [25]. Mimo jiné je potřeba zabránit i aktivitě enzymů, které by DNA rozkládaly [26].

2.3.3.1. Ochrana před rozkladem DNA

Vzhledem k přirozenému výskytu enzymů v buňce dochází ihned po rozvolnění struktury k degradaci DNA. Enzymy způsobující rozklad – nukleázy jsou aktivovány hořčičnými kationty. Z tohoto důvodu se přidávají chelatační činidla jako kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), která váže dvojmocné kationty [26].

2.3.3.2. Odstranění proteinů a RNA

Odstranění RNA se provádí působením ribonukleázy, popřípadě pomocí chloridu lithného [25]. Proteiny se odstraňují různými způsoby. Moderním přístupem jsou chemikálie jako je dodecylsírán sodný (SDS), dithiotreitol (DTT) a 2-merkaptoethanol, které rozrušují strukturu. Na stejném principu pracují i proteázy (pronáza nebo proteináza K), které degradují peptidovou vazbu. Konvenční způsob využívá extrakci směsí fenol-chloroform, kde tato směs tvoří organickou fázi oproti vodné fázi lyzátu. Proteiny jsou vysráženy, koncentrují se na fázovém rozhraní a DNA zůstává ve vodné fázi. Od této metody se ale vzhledem k toxicitě a velkým ztrátám vzorku postupně ustupuje [23; 25; 26].

2.3.3.3. Odstranění polyfenolů

V rostlinných materiálech se nachází mnoho polyfenolů jako jsou třísloviny, flavonoidy nebo terpenoidy. To výrazně ztěžuje izolaci DNA z rostlinné matrice. Při lyzi buněk totiž dochází k oxidaci polyfenolů, které následně interagují s DNA a způsobují její enzymatické hnědnutí. K jejich odstranění se využívá polyvinylpyrrolidon (PVP) a polyvinylpolypyrrolidon (PVPP), což jsou chemikálie, které na sebe váží pomocí vodíkových vazeb polyfenoly, tvoří s nimi komplexy, a tím snižují jejich obsah v roztoku. Kromě těchto látek se využívají i antioxidanty typu DTT, kyselina askorbová nebo 2-merkaptoethanol [25].

2.3.3.4. Odstranění polysacharidů

Polysacharidy zvyšují viskozitu roztoku tím, že se spolu s DNA sráží, taktéž interferují s některými enzymy, a tudíž činí DNA nevhodnou pro další zpracování. Odstraňují se nejčastěji přidávkem chloridu sodného (NaCl), nebo přidáním NaCl spolu s detergentem cetrimoniumbromidem (CTAB). Při nízké koncentraci solí tvoří DNA s CTAB komplex. Naopak při vysoké iontové síle roztoku dochází k tvorbě nerozpustných komplexů s polysacharidy a DNA zůstává v roztoku [25].

2.3.3.5. Adsorpce DNA na pevné fázi

K tomuto účelu se využívají chromatografické kolonky (uložené v centrifugačních mikrozku-mavkách), které jsou tvořeny porézním materiálem – speciálním sklem, které tvoří kuličky nebo fritu. Přes tento materiál snadno prostupují malé molekuly, soli apod. Naopak vysokomolekulární DNA je zachytávána na povrchu a následně se z něj uvolňuje. K vymytí DNA z kolonky se využívá snížení iontové síly nebo použití jiného pufru. Produktem je poté nukleová kyselina o vysoké čistotě [23; 26; 27].

2.3.3.6. Srážení DNA

Po odstranění všech nežádoucích látek máme vzorek, který je většinou velmi naředěný, a tudíž je potřeba ho zkoncentrovat. K tomu se nejčastěji využívá ethanolové srážení. Přidávkem 96% ethanolu a solí (především octanu sodného) dojde k precipitaci DNA a částečně i přídavných solí. Ty se následně odstraňují promytím 70% ethanolem. Po odpaření alkoholových par se sraženina rozpouští ve vhodném pufru [23; 26; 28].

2.3.4. Skladování DNA

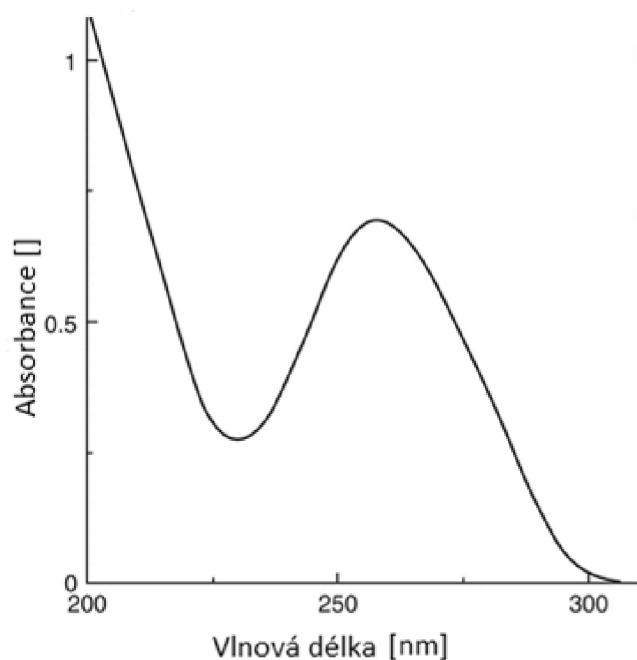
Připravený vzorek DNA je většinou potřeba uchovat delší dobu. To se zajišťuje pomocí nízké teploty – DNA se uchovává při teplotě cca 4 °C. Velmi nízké teploty (mrazení a rozmrazování)

DNA neprosívají a jednoduše se láme. Mrazení se proto využívá pouze při dlouhodobém uchování [23].

2.3.5. Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Ke stanovení čistoty a odhadu koncentrace se nejčastěji využívá UV-VIS spektrometrie. Nukleové kyseliny absorbují díky purinovým a pyrimidinovým bázím nejintenzivněji při vlnové délce 260 nm [26]. Dle absorbance lze následně vypočítat přibližnou koncentraci DNA v roztoku, avšak tato metoda není zcela přesná. Absorbanci totiž ovlivňují i další přítomné látky jako je RNA nebo proteiny. Jelikož ale bílkoviny nejvíce absorbují při 280 nm, lze z poměru absorbancí měřených při 260/280 nm zjistit kontaminaci proteiny. V ideálním případě by měl být poměr absorbancí 1,8. Pokud jsou hodnoty menší, jedná se o znečištění proteiny, a bylo by vhodné DNA znovu purifikovat. V případě vyššího poměru absorbancí než 1,8 se jedná o kontaminaci RNA [23; 25; 27].

Analýza DNA izolované z rostlinné matrice je navíc ztížena přítomností polysacharidů a polyfenolů. Z tohoto důvodu se měří absorbance i při 230 a 270 nm a opět se z poměrů absorbancí (A_{260}/A_{230} a A_{260}/A_{270}) stanovuje čistota [25].



Obrázek 1: Absorpční spektrum DNA (převzato a upraveno z ref. [29])

Stanovení koncentrace lze v krajním případě provést pomocí UV-VIS spektrofotometrie, ale DNA nesmí být příliš znečištěná a musí mít dostatečnou koncentraci [27]. Vhodnějším způsobem je fluorimetrické stanovení. Do roztoku se přidává fluorescenční barvivo, které se vmezeří mezi báze nukleových kyselin. Komplex nukleové kyseliny a barviva po ozáření UV světlem vykazuje fluorescenci, která může být detekována [23; 25].

2.4. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce je technika molekulární biologie k amplifikaci nukleových kyselin. Tato metoda byla vyvinuta roku 1984 americkým biochemikem Kary Mullisem [30].

Základem této metody je replikace DNA. Jedná se o cyklicky opakovanou enzymovou syntézu nových řetězců vybraných úseků nukleové kyseliny. Celý proces tvoří denaturace DNA, hybridizace (neboli dosednutí primerů, annealing) a syntéza DNA (neboli elongace) [23; 27; 30].

2.4.1. Komponenty PCR

Všechny komponenty PCR tvoří směs, ve které samotná reakce probíhá. Základem je molekula DNA, kterou chceme amplifikovat (templátová DNA) [26]. Ta je získána izolací z jakéhokoli materiálu postupem uvedeným výše. Voda, která je speciální pro PCR, doplňuje objem pro lepší manipulaci se směsí [28].

2.4.1.1. Primery

Primery neboli oligonukleotidy jsou krátké úseky DNA o známé sekvenci, které jsou synteticky připravované. Jsou tvořeny zhruba 20–25 nukleotidy. Tyto úseky musí být specifické jen pro určitou oblast, kterou chceme amplifikovat. Vždy se jedná o dva úseky, které jsou komplementární pro koncové oblasti templátové DNA [27]. Vhodným výběrem primerů zajišťujeme přesnost a úspěšnost reakce [23].

2.4.1.2. DNA-polymeráza

Enzym, který zprostředkovává celou reakci, je DNA-polymeráza. Nejčastěji se využívá termostabilní DNA-polymeráza, která byla izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* (odtud název Taq-DNA-polymeráza). Tento enzym odolává vysokým teplotám, při kterých DNA denaturuje [23; 27].

2.4.1.3. Deoxyribonukleotidtrifosfáty (dNTP)

Aby mohla syntéza nových vláken probíhat, je zapotřebí základních nukleotidů, které bude DNA-polymeráza vázat na templátovou DNA. Tyto nukleotidy musí být čtyř druhů, odpovídajících nukleovým bázím – dTTP, dATP, dCTP a dGTP [27; 30].

2.4.1.4. Pufř s hořčnatými ionty

Ideální prostředí pro aktivitu DNA-polymerázy je pH v rozmezí 8,0–9,5. Toho je dosahováno pomocí pufřu, který je tvořen solemi. Jedna z přítomných solí je i chlorid hořčnatý. Hořčnaté kationty jsou důležité pro správnou syntézu. Mg^{2+} tvoří s dNTP rozpustné komplexy, které jsou detekované DNA-polymerázou a připojovány na templátovou DNA [23; 28].

Ať se jedná o templátovou DNA, primery, DNA-polymerázu, dNTP, pufř nebo hořčnaté ionty, vždy je potřeba propočítat vhodnou koncentraci. Při přebytku nebo nedostatku některé z komponent může docházet ke vzniku nescifických produktů a k chybám [23].

2.4.2. Konvenční PCR

Základní metodou je klasická PCR. Proces probíhá v zařízení nazývaném termocykler. Tento přístroj umí skokově měnit teploty dle předem nastaveného programu [23].

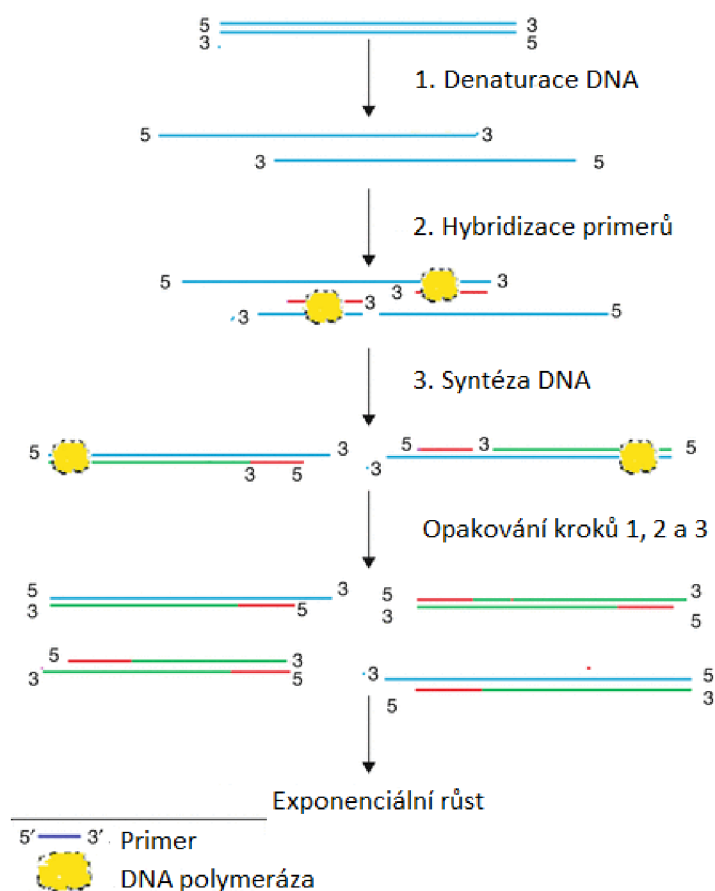
Technika PCR začíná na vysoké teplotě (zhruba 95–97 °C), kdy dochází k denaturaci DNA neboli rozpletení dvoušroubovice na jednotlivá vlákna. Tento počáteční rozklad trvá zhruba 2–5 minut. Při opakovaných denaturacích amplikonů se využívá už kratší časové období a to zhruba 45 s [23; 26].

Dalším krokem je hybridizace primerů, při níž dochází ke snížení teploty na rozmezí 45–68 °C. Tato teplota se odvíjí od teploty tání primerů (dáno počtem párů GC – čím více GC párů, tím vyšší teplota) a délce oligonukleotidů. Při této teplotě se systém podrží 30–60 s. Během druhé fáze dojde k nasednutí primerů na amplifikovanou DNA [23; 26].

Třetí a poslední krok PCR je elongace. Tento proces probíhá nejčastěji při 72 °C, jelikož se jedná o teplotní optimum Taq-DNA-polymerázy. Elongace trvá 2–3 minuty, protože DNA-polymeráza připojuje báze rychlostí zhruba 60 bází/s [23; 26].

Tyto kroky se opakují v jednotlivých cyklech, kdy je růst koncentrace vznikajících fragmentů dán exponenciálně. Výsledné množství fragmentů určuje vztah 2^n , kde n je počet cyklů. V praxi se využívá protokolů obsahujících 15–30 cyklů, dle potřeby namnožení DNA [23; 30].

Konečným produktem PCR jsou amplikony – ty odpovídají restrikcčním fragmentům DNA. Amplikony je následně třeba analyzovat pomocí elektroforézy nebo jinými způsoby [23].



Obrázek 2: Proces polymerázové řetězové reakce (převzato a upraveno z ref. [31])

2.4.3. Real-time PCR

Aby nebyla zapotřebí následná analýza amplikonů po provedení konvenční PCR, využívá se různých modifikací této metody. Jednou z modifikací je právě real-time PCR neboli kvantitativní PCR (qPCR).

2.4.3.1. Detekce a kvantifikace produktu

Real-time PCR umožňuje kvantifikovat množství vznikající DNA už v průběhu reakce. Toho se dosahuje pomocí fluorescenčních barviv, fluoroforů (molekuly emitující světlo jiné vlnové délky, než původně pohltily) a speciálních termocyklerů. Tyto přístroje umí nejen rychle měnit teploty, ale zároveň mají i světelný zdroj vhodný pro excitaci fluorescenčního barviva. Vzorek je v tomto případě po každém cyklu ozářen světlem, které indukuje fluorescenci a ta je zaznamenávána detektorem [27; 30].

Jednou z možností je využití fluorescenčního barviva, které se na jednořetězcovou DNA neváže a volně v roztoku je jeho fluorescence výrazně méně intenzivní než při navázání na dvouřetězcovou DNA. Typickým příkladem je kyaninové barvivo SYBR Green [23; 27].

Další metodou je využití fluorescenčně značených sond. Tyto sondy hybridizují s molekulou DNA stejně jako primery. Ve stejnou dobu nasedají k templátové DNA mezi oba primery. Při působení DNA-polymerázy dochází k odbourávání sondy a navázání nukleotidů. Jakmile se uvolní navázaná sonda do roztoku, inaktivuje se zhášeč, který při vazbě s DNA pohlcoval energii fluoroforu. Takto dojde k emisi fluorescence, která může být detekována. Na podobném principu fluoroforů fungují i fluorescenčně značené primery [23; 27].

2.4.3.2. Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM)

HRM analýza je jedna z pokročilých metod, která navazuje na real-time PCR. Princip této metody je založen na disociaci vláken dvoušroubovice DNA. Při zvyšování teploty dochází k porušení vazeb a oddělení obou vláken od sebe. Moment, kdy je od sebe oddělena právě polovina vlákn, se nazývá teplota tání. Teplota tání dané konkrétní DNA záleží na spoustě faktorů jako na délce řetězce nebo na počtu GC vazeb. Těchto detailů se využívá k ověření, jestli byly vytvořeny správné amplikony. Mimo jiné lze HRM analýzu využít i k identifikaci a rozlišení blízké příbuzných druhů například u ovoce [32; 33].

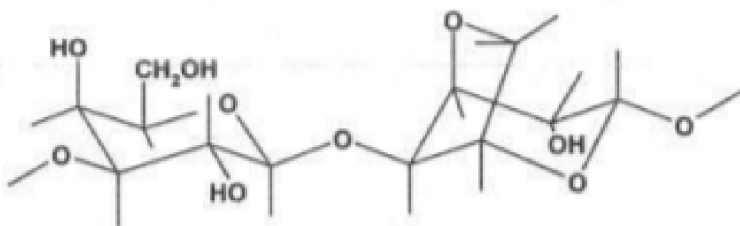
Analýza se provádí zvyšováním teploty po doběhnutí real-time PCR. Opět je zapotřebí využití fluorescenční sondy, nebo lépe barviva, které budou poskytovat odezvu. Postupným zvyšováním teploty a oddělování vláken dochází k uvolnění barviva, které bylo navázáno ve dvoušroubovici, a tím pádem i k poklesu intenzity fluorescence. Typicky využívaná barviva jsou Eva Green nebo SYTO-9 [32].

2.4.4. Elektroforéza

Pokud není využívána real-time PCR, je zapotřebí produkt konvenční PCR analyzovat. K tomu se běžně využívá elektroforéza [34]. Tato metoda je založena na separaci nukleových kyselin v elektrickém poli. Jelikož je každá nukleová kyselina díky fosfátové skupině nabitá negativně, snadno putuje v elektrickém poli k anodě. Podle vzdálenosti, jak daleko daná molekula DNA doputuje, můžeme usuzovat na velikosti fragmentu, popř. na čistotu vzorku [23; 27].

2.4.4.1. Gelová elektroforéza

Jednou z elektroforetických metod je právě gelová elektroforéza. Ta se provádí ve vhodném nosiči, který je tvořen pomocí polymerních organických látek – agaróza, polyakrylamid. Obě látky tvoří síťovou strukturu s póry, které odpovídají koncentraci (čím vyšší koncentrace polymeru, tím menší póry). Agarózové gely jsou vhodnější pro separaci delších fragmentů a příprava gelu je výrazně jednodušší. Naopak polyakrylamid je složitější na přípravu (musí se připravovat bez přístupu vzduchu) a nezpolymerizovaný je toxický. Jeho hlavní výhodou ale spočívá v rozdělení fragmentů DNA, které se liší i o jediný pár bází [23; 27].



Obrázek 3: Struktura agarózy (převzato z ref. [23])

Do připraveného gelu, který na jedné straně obsahuje jamky, se vloží analyzovaná DNA a zároveň délkové standardy, u kterých je známá velikost fragmentů DNA. Tento gel se umístí do aparatury se dvěma elektrodami a je zalit vodivým pufrům. Díky vloženému stejnosměrnému napětí a záporně nabitým fosfátovým skupinám putují fragmenty DNA gelem dle jejich velikosti. Malé fragmenty DNA doputují dál, protože snadněji procházejí síťovanou strukturou. Naopak delší fragmenty jsou více zadržovány [27].

Jelikož analyzovaná DNA v gelu není vidět, dochází k barvení vzorků pomocí barviv. Dříve se hojně využíval ethidiumbromid, který se výborně váže do struktury DNA a poskytuje citlivé výsledky. Na druhou stranu se ale jedná o karcinogen, a tak se od něj snaží upouštět. Alternativní barviva jsou například SYBR Green, SYBR Gold nebo Crystal Violet. Žádné z nich sice není tolik toxické, ale jejich nevýhodou je nižší citlivost nebo vyšší cena [35].

Většinu barviv je nutné zviditelnit pomocí UV světla, pod kterým je vidět rozdělení fragmentů v gelu a případná čistota vzorku. Pokud by se jednalo o degradovanou DNA, která je tvořena různými fragmenty, projeví se jako nedefinovaný pruh. Na rozdíl od čisté DNA, která bývá zobrazena jediným, ostře daným pruhem [27].

2.5. Instrumentální analytické metody

Zcela jiným přístupem jsou instrumentální analytické metody, které na rozdíl od molekulárně-biologických nevyužívají DNA. Jejich principy jsou založeny na klasických chemických metodách. Typické instrumentální postupy jsou separační – chromatografie, optické – spektrofotometrie nebo elektrochemické – polarografie [36; 37].

2.5.1. Chromatografie

Chromatografie je jedna ze separačních metod, která dělí látky na základě jejich struktury nebo složení. Jedná se o proces, kdy je většinou směs rozdělena do jednotlivých frakcí, popřípadě na jednotlivé látky. K tomu je zapotřebí následných identifikačních analýz jako hmotnostní spektrometrie, infračervené spektroskopie nebo UV-VIS spektrometrie [37].

Chromatografií existuje několik typů – plynová chromatografie, kapalinová chromatografie nebo tenkovrstvá chromatografie. Všechny tyto metody využívají principu stacionární (nepohyblivé) fáze a fáze mobilní. Tyto fáze jsou nemísitelné a při průtoku mobilní fáze je analyzovaný vzorek unášen skrz fázi stacionární. Dle afinity různých frakcí směsi k oběma fázím, jsou látky více či méně zadržovány, a tím dochází k postupné eluci. Díky tomu mohou být látky snadno a jednotlivě detekovány [36; 37].

2.5.1.1. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Chromatografická technika, HPLC, se vyznačuje velmi malými částicemi, které tvoří stacionární fázi. Tyto částice jsou tak drobné, že tvoří téměř homogenní výplň kolony, a tudíž je zapotřebí vysokého tlaku, aby mohlo docházet k průtoku mobilní fáze [36; 38].

Pomocí HPLC se dosahuje velmi přesných výsledků, zvláště pokud je vhodně zvolený detektor. Taktéž je její velkou výhodou široká aplikovatelnost od iontů, tepelně nestabilních látek až po látky polární i nepolární [38].

Samotný proces začíná u čerpadla, které čerpá kapalinu (mobilní fázi) ze zásobníku. Tuto kapalinu je zapotřebí zbavit absorbovaných molekul plynu v odplyňovači. Mobilní fáze poté proudí skrz kolonu pomocí vysokotlakých pump. Vzorek se dávkuje na kolonu pomocí dávkovacího kohoutu a proudí spolu s mobilní fází skrz fázi stacionární. Nakonec se využívají různé typy detektorů k zachycení signálu [36; 37].

Chromatografie se liší v různých ohledech. Jedním ze základních dělení HPLC je izokratická a gradientová eluce. Při izokratické eluci má mobilní fáze konstantní složení, naopak při gradientové se její složení mění dle nastaveného programu. Dalším rozdílem je polarita fází. Pokud vzorek proudí s mobilní nepolární fází skrz stacionární fázi polární, jedná se o chromatografii s normálními fázemi. V opačném případě, kdy je mobilní fáze polární a stacionární nepolární, používá se termín reverzní fáze. Reverzní chromatografie je mnohem běžnější, ale historicky mladší, a proto se pojem normální fáze využívá trochu atypicky [38].

3. CÍL PRÁCE

1. Vypracování literární rešerše
2. Izolace a charakterizace DNA z vybraných ovocných výrobků
3. Extrakce a charakterizace vybraných látek z ovocných výrobků pomocí instrumentálních metod
4. Vyhodnocení a diskuse výsledků

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Rostlinný materiál a komerční výrobky

4.1.1. Rostlinný materiál

K izolaci DNA a k přípravě modelových směsí bylo využito ovoce (jablka, broskve, meruňky, banány, maracuja) z obchodního řetězce. K izolaci DNA z jablka a broskve byl použit list.

4.1.2. Komerční výrobky

4.1.2.1. *Kubík ovocná kapsička – 100% husté ovocné pyré s přidavkem vitamínu C*

Složení: protlak z: banánu (66 %), jablka (34 %), vitamín C.

4.1.2.2. *Babylove bio ovocný příkrm broskve, maracuja a jablko*

Složení: 47 % hm. broskve, 43 % hm. jablka, 7 % hm. banány, 3 % hm. maracujová šťáva, antioxidant: kyselina askorbová.

4.1.2.3. *Kojenecká výživa – Ovocná přesnídávka s meruňkami*

Složení: meruňková dřev (40 % hm.), voda, jablečná dřev (20 % hm.), cukr, fruktózový sirup (fruktóza, dextróza, maltóza), zahušřovadlo: kukuřičný modifikovaný škrob, regulátor kyselosti: kyselina citrónová, antioxidant: kyselina askorbová.



Obrázek 4: Analyzované komerční výrobky

4.2. Vybavení laboratoře

4.2.1. Chemikálie

- Acetonitril CHROMASOLV, for HPLC $\geq 99,9$ % (Honeywell Riedel-de Haën, Charlotte, USA)
- Agaróza pro gelovou elektroforézu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- FastGene 100 bp DNA Marker (NIPPON Genetics EUROPE, Düren, Německo)
- EDTA (Penta, Chrudim, ČR)
- Ethanol (Penta, Chrudim, ČR)
- GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, Fremont, USA)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina trifluoroctová 99% (Acros Organics, Geel, Belgie)

- Methanol (Penta, Chrudim, ČR)
- Midori Green Advance DNA Stain (NIPPON Genetics EUROPE, Düren, Německo)
- PCR H₂O (Top-Bio, Vestec, ČR)
- PCR loading buffer (Top-Bio, Vestec, ČR)
- Pektináza z *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Primery – viz Tabulka 4 (Generi biotech, Hradec Králové, ČR a Elisabeth Pharmacon, Brno, ČR)
- qPCR 2x SYTO-9 Master Mix (Top-Bio, Vestec, ČR)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Penta, Chrudim, ČR)

4.2.2. Komerční kit

- EliGene Plant DNA Isolation Kit (Elisabeth Pharmacon, Brno, ČR)

4.2.3. Přístroje a pomůcky

- Combi-spin FVL-2400N Mini centrifuge (Biosan, Lotyšsko)
- Centrifuga Z216 MK (Hermle, Německo)
- DNA/RNA UV-cleaner box UVC/T-AR (Biosan, Lotyšsko)
- HPLC sestava: Dionex UltiMate 3000 series, PDA detektor Vanquish, Autosampler Dionex UltiMate 3000, Pump UltiMate (ThermoFisher Scientific, USA), kolona Kinetex F5, 2,6 μm, 4,6 x 150 mm (Phenomenex, USA)
- Laboratorní váhy KERN CM 60-2N (UNIPRO-ALPHA, ČR)
- Lyofilizátor FreeZone Triad (Labconco, USA)
- Mikrovlnná trouba (SENCOR, ČR)
- Mini inkubátor 230 V (Labnet International, USA)
- MS2 Minishaker Vortexer (IKA, Německo)
- NanoDrop Spectrophotometer 2000 (ThermoFisher Scientific, USA)
- Pipety Discovery Comfort (HTL, Polsko)
- Pipety BioPette (Labnet International, USA)
- Pipety FinnTimer (ThermoFisher Scientific, USA)
- Termocykler Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Nizozemí)
- Transluminátor Azure Biosystems c200 (ThermoFisher Scientific, USA)
- Ultrazvuková lázeň PS 02000 (POWERSONIC, Čína)
- Zařízení pro elektroforézu EasyCast (ThermoFisher Scientific, USA)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, USA)

4.3. Pracovní postupy

4.3.1. Příprava modelových směsí

Modelové směsi byly připraveny téměř jako repliky komerčních výrobků. Ovoce (broskve, meruňky, jablka) bylo oloupano, odpeckováno, zbaveno jádřinců a nakrájeno na malé kousky. Podlité vodou bylo vařeno na mírném plameni do změknutí. Považené ovoce bylo propasírováno přes síto, aby vznikl protlak [39]. Bez vaření, pouze prostíráním byl připraven protlak banánový.

Jednotlivé protlaky byly smíchány v hmotnostním poměru dle složení komerčních výrobků (viz Tabulka 2) s přidávkem ingrediencí: kukuřičný modifikovaný škrob, cukr, voda, kyselina

citrónová (vzhledem k nemožnosti sehnat v obchodních řetězcích fruktózový sirup nebo čistý vitamín C, nebyly do modelových směsí přidány). Celkové připravené množství bylo 40 g každé směsi.

Tabulka 2: Složení modelových směsí

Směs	jablko [g]	další ingredience [g]
Kubík	13,6	banán 26,4
Babylove	17,2	banán 2,8; broskev 18,8
Kojenecká výživa	8,0	meruňka 16,0; voda 10,0; cukr 5,0; kukuřičný škrob; kyselina citrónová

4.3.2. Izolace rostlinné DNA pomocí komerčního kitu

Izolace DNA byla provedena podle modifikovaného izolačního protokolu, který byl přiložen ke kitu [40]. První krok protokolu byl vždy upraven:

V případě izolace z listu jabloně bylo odváženo 0,1 g izolovaného materiálu (místo 0,05 g), při izolaci z plodů ovoce 0,2 g vzorku. V případě izolací z modelových směsí a komerčních výrobků nebyl využit homogenizační písek, ale 1 g vzorku se nechal inkubovat s pektinázou při 37 °C 2 hodiny. Po inkubaci byly vzorky zmrazeny na –80 °C a poté byly zlyofilizovány přes noc.

4.3.3. Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Pomocí spektrofotometru NanoDrop 2000 byla stanovována koncentrace a čistota DNA v izolovaných vzorcích DNA. Stanovení probíhalo proti elučnímu pufru z komerčního kitu, ve kterém byla DNA rozpuštěná. Pro samotné měření byly využity 2 µl elučního pufru i měřených vzorků. Následně byla proměřena absorbance v rozmezí vlnové délky 220–350 nm a z hodnoty absorbance při 260 nm byla určena koncentrace DNA v ng/µl. Kromě koncentrace byla určena i čistota, a to z poměrů absorbancí: A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230} .

4.3.4. Příprava směsí pro PCR

K přípravě směsí byly využity tyto komponenty: komerční produkt SYTO-9 Master Mix obsahující hot-start Taq DNA polymerázu, ekvimolární směs deoxynukleotidtrifosfátů a interkalační barvivo, PCR voda ze stejné sady a páry vybraných primerů. Směs byla smíchána podle poměrů uvedených v Tabulce 3.

Tabulka 3: Objemy komponent pro přípravu směsi na PCR (pro jeden vzorek)

Komponenta	objemy (pro 1 µl DNA) [µl]	objemy (pro 5 µl DNA) [µl]
PCR voda	9,5	5,5
SYTO-9	12,5	12,5
Primer reverse	1,0	1,0
Primer forward	1,0	1,0

Uvedená směs byla rozpipetována ve sterilním boxu do mikrozkušavek a do každé zkumavky byl přidán 1 µl, popř. 5 µl templátové DNA. Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4: Sekvence použitých primerů

Primer	sekvence 5' → 3'	Citace
S2F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	[41]
S3R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT	
FT MDP F	GCCAGCGAGGTTTCAACTTCTT	[42]
FT MDP R	TGCCGCAGTAGTTGCTGGAATA	
MdFKBP42a F	TCGTCTCTTCAGGCTCGAAA	[43]
MdFKBP42a R	CATCTAAACTCCCTCCCGCA	
MdFKBP53a F	GTTGGGGTTAACGGTATGCG	[43]
MdFKBP53a R	ACTCAAAAGTCGGAAGCGGA	
MDP F	CCTCAGTTCTTCGGAATCCA	[44]
MDP R	CCAACTCCATCTTGACACCA	
MdFKBP65a F	GATGACCATCGACAGCAAGG	[43]
MdFKBP65a R	TGACAGATCCCAGGCTTTACA	

4.3.5. PCR

Pro samotnou reakci byl využit přístroj RotorGene 6000, který pracoval dle předem nastavených teplotních profilů (uvedeny v Tabulce 5).

Tabulka 5: Teplotní profily PCR

Počet cyklů	počáteční denaturace DNA	denaturace DNA	hybridizace primerů	elongace	závěrečná elongace
Profil pro primery S2F, S3R (amplifikovatelnost listu z jabloně)					
35	95 °C/5 min	–	52 °C/30 s	72 °C/45 s	72 °C/10 min
Profil pro primery S2F, S3R (amplifikovatelnost ostatních vzorků)					
40	95 °C/5 min	95 °C/30 s	52 °C/30 s	72 °C/45 s	72 °C/10 min
Profil pro specifické jablečné primery před optimalizací					
40	95 °C/3 min	95 °C/10 s	53 °C/30 s	72 °C/15 s	72 °C/3 min
Profil pro specifické jablečné primery po optimalizaci					
40	95 °C/3 min	95 °C/10 s	53 °C/20 s	72 °C/30 s	72 °C/3 min

4.3.6. Příprava agarózového gelu

Pro elektroforézu byl připraven 1,2% agarózový gel. Na 100 ml gelu bylo využito 1,20 g agarózy. Ta byla smíchaná se 100 ml 0,5x TBE pufru (Tris-báze 54 g; kyselina boritá 27,5 g – navážka rozpuštěna v destilované vodě, přidáno 20 ml 0,5 M EDTA a doplněno destilovanou vodou na 1 litr. Před použitím 10x zředěno destilovanou vodou na 0,5x TBE [28]).

Připravený roztok byl zahříván v mikrovlnné troubě a několikrát přiveden k varu, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění agarózy. Po vychladnutí bylo přidáno fluorescenční barvivo (10 μ l GelRed, případně 5 μ l Midori Green) a roztok byl nalit do předem připravené formy s hřebínkem. Byly odstraněny nežádoucí bubliny vzduchu a gel se nechal 30 minut ztuhnout.

4.3.7. Elektroforéza

Po ztuhnutí byl vyjmut hřebínek a do jamek byly nanášeny jednotlivé vzorky, které byly předem smíchány s nanášecím pufrem v poměru 5:1. Nanášeno bylo 15 μ l vzorků, vzhledem k velikosti jamek. Mimo vzorky byl do jedné jamky nanesen i délkový standard (5 μ l).

Forma byla vložena do elektroforetické vany, zalita 0,5x TBE pufrem a po zapojení elektrod byl zapnut elektrický zdroj napětí, který byl nastaven na 80 V a 2 hodiny. Po 2 hodinách experimentu byl gel vyfocen pod UV světlem na transluminátoru Azure Biosystems c200.

4.3.8. Příprava extraktů pro HPLC

Extrakty pro HPLC byly připraveny z komerčních produktů i z jejich replik a samostatných protlaků. Jednotlivé vzorky byly zmrazeny na -80 °C a poté byly zlyofilizovány přes noc. Z lyofilizovaných výrobků bylo naváženo 0,25 g do zkumavek a bylo přidáno 1,25 ml extrakčního činidla (methanol). Vzorky byly umístěny na 30 minut do ultrazvuku a poté stočeny na centrifuze (3000 rpm/min, 10 min). Ze vzorků byl odsán supernatant a celá extrakce se opakovala ještě jednou. Oba vzniklé extrakty byly zfiltrány přes membránový PTFE filtr (velikost pórů 0,45 μ m) [1].

4.3.9. HPLC

HPLC byla realizována pomocí sestavy Dionex UltiMate 3000 series s PDA detektorem Vanquish a kolonou Kinetex F5, (velikost částic 2,6 μ m, rozměry 4,6 x 150 mm). Parametry provedené chromatografie jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6: Parametry HPLC

Nástřik	20 μ l	Dávkování mobilní fáze B	
Mobilní fáze A	0,1% kyselina trifluoroctová	0–5 min	10 %
Mobilní fáze B	acetonitril	5–10 min	12–25 %
Průtok mobilní fáze	0,4 ml/min	10–15 min	25–40 %
Teplota kolony	35 °C	15–20 min	40–55 %
Doba analýzy	30 min	20–22 min	55–70 %
Eluce	gradientová	22–30 min	70–10 %
Vlnové délky detektoru	260, 280, 300, 680 nm		

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1. Molekulárně-biologické metody

5.1.1. Izolace a spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA z ovoce

Izolací dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.2 byly získány vzorky DNA z jablka, broskve a maracuji. U vyizolované DNA byla stanovena koncentrace a čistota (postup uvedený v kapitole 4.3.3). Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 7: Výsledky měření koncentrace a čistoty DNA z ovoce

Druh ovoce	c [ng/μl]	A _{260/280} []	A _{260/230} []
Jablko	1	47,4	2,01
	2	49,9	1,92
	3	48,9	1,96
Průměr	48,7 ± 1,3	1,96 ± 0,05	1,28 ± 0,02
Broskev	1	7,2	2,15
	2	6,9	2,11
	3	7,1	2,06
Průměr	7,1 ± 0,2	2,11 ± 0,05	0,86 ± 0,09
Maracuja	1	5,6	2,53
	2	6,2	2,21
	3	5,2	2,57
Průměr	5,7 ± 0,50	2,44 ± 0,20	0,32 ± 0,01

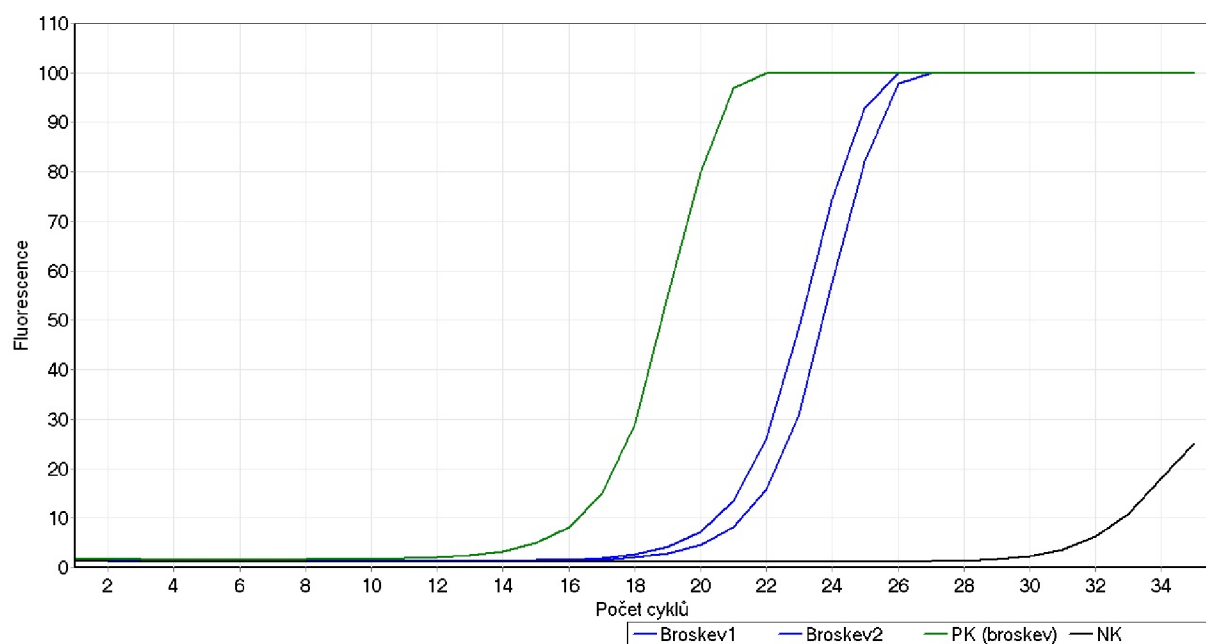
DNA z jablečného listu dosahuje koncentrace $48,7 \pm 1,3$ ng/μl. Jelikož poměr $A_{260/280}$ má hodnotu blízkou 2,0, naměřená hodnota koncentrace je zřejmě nadsazena kvůli přítomnosti RNA. Izolovaná DNA také vykazuje kontaminaci fenolickými látkami či zbytky činidel z izolačního kitu a zároveň znečištění polysacharidy, což je u izolace z listu pochopitelné (hodnota poměru absorbancí $A_{260/230}$ je nižší než 1,8) [25; 45].

Koncentrace DNA z listů broskve ($7,1 \pm 0,2$ ng/μl) a z plodu maracuji ($5,7 \pm 0,50$ ng/μl) je přibližně desetkrát nižší než koncentrace DNA z listu jablka. Poměr absorbancí $A_{260/280}$ značí přítomnost RNA, poměr absorbancí $A_{260/230}$ významnou kontaminaci polysacharidy a polyfenoly [25]. Jelikož se jedná o izolaci z dužiny nezralého plodu a listu, přítomnost polyfenolů a polysacharidů je pochopitelná [46].

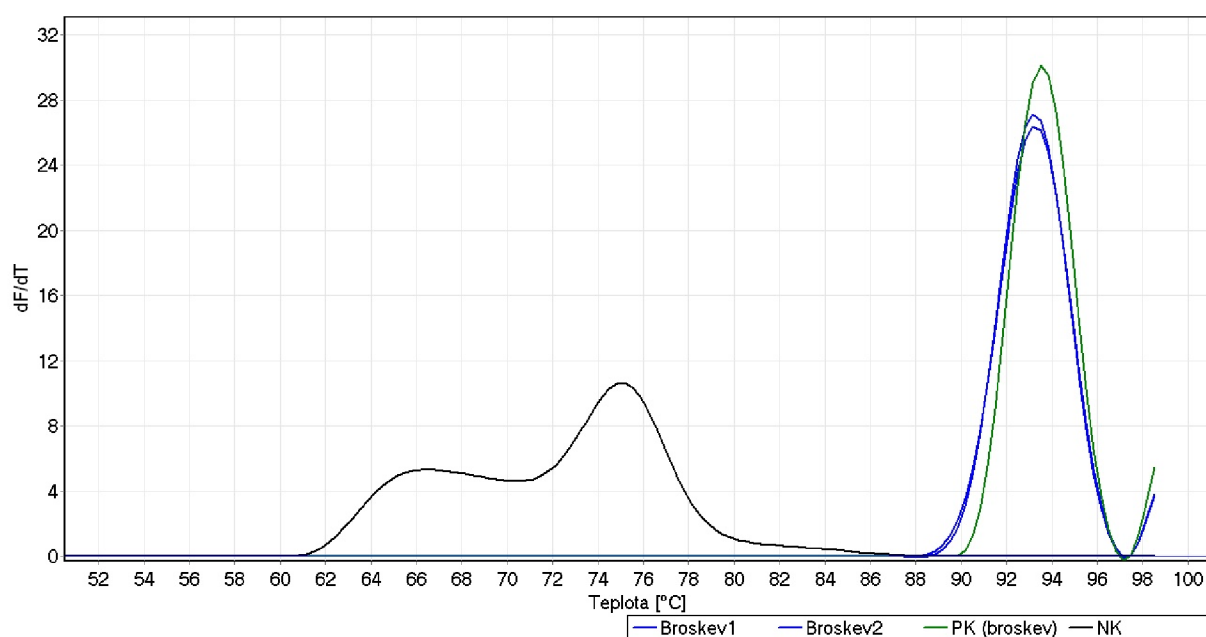
5.1.2. Ověření amplifikovatelnosti DNA z listů a dužiny ovoce pomocí qPCR

Pro ověření amplifikovatelnosti DNA byla připravena reakční směs dle postupu v kapitole 4.3.4. Jelikož se jednalo o vzorky s koncentrací DNA v řádech desítek, popř. jednotek ng/μl, byl pipetován pouze 1 μl DNA a byly využity primery S2F a S3R. Použitý teplotní profil je uvedený v Tabulce 5.

Pro ilustraci jsou uvedeny amplifikační křivky (Obrázek 5) a křivky tání (Obrázek 6) pro vzorky broskve, další grafy jsou uvedeny v příloze.



Obrázek 5: Amplifikační křivky DNA izolované z listu broskve s pozitivní (PK) a negativní (NK) kontrolou



Obrázek 6: Křivky tání DNA izolované z listu broskve

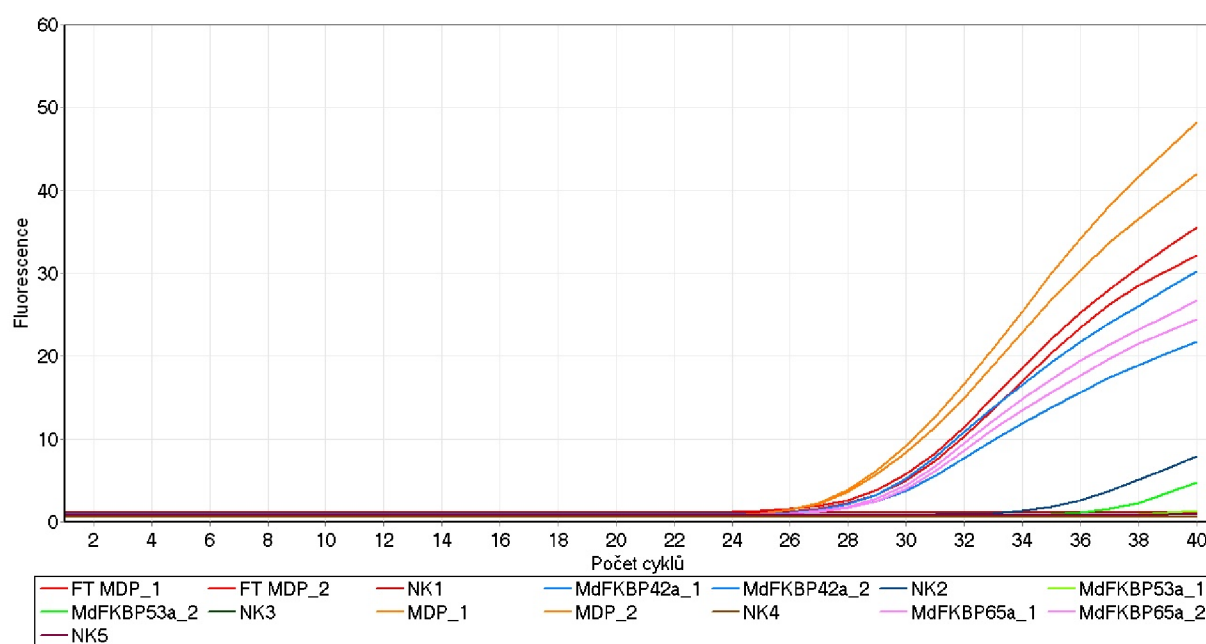
Z Obrázku 5 lze vidět, že od 18 cyklu byla zachycena fluorescence a vzorky byly úspěšně zamplifikovány. Mírně rostoucí negativní kontrolu lze vysvětlit tvorbou dimerů primerů při jiné teplotě, než vznikaly specifické produkty, jak je patrné z Obrázku 6. Křivky tání broskvových vzorků jsou shodné a zároveň peak při 93,5 °C je stejný jako u pozitivní kontroly. Jelikož byla DNA z ovoce amplifikovatelná, byla využita v dalších analýzách.

5.1.3. Výběr primerů pro důkaz přítomnosti jablka v ovocných pyré

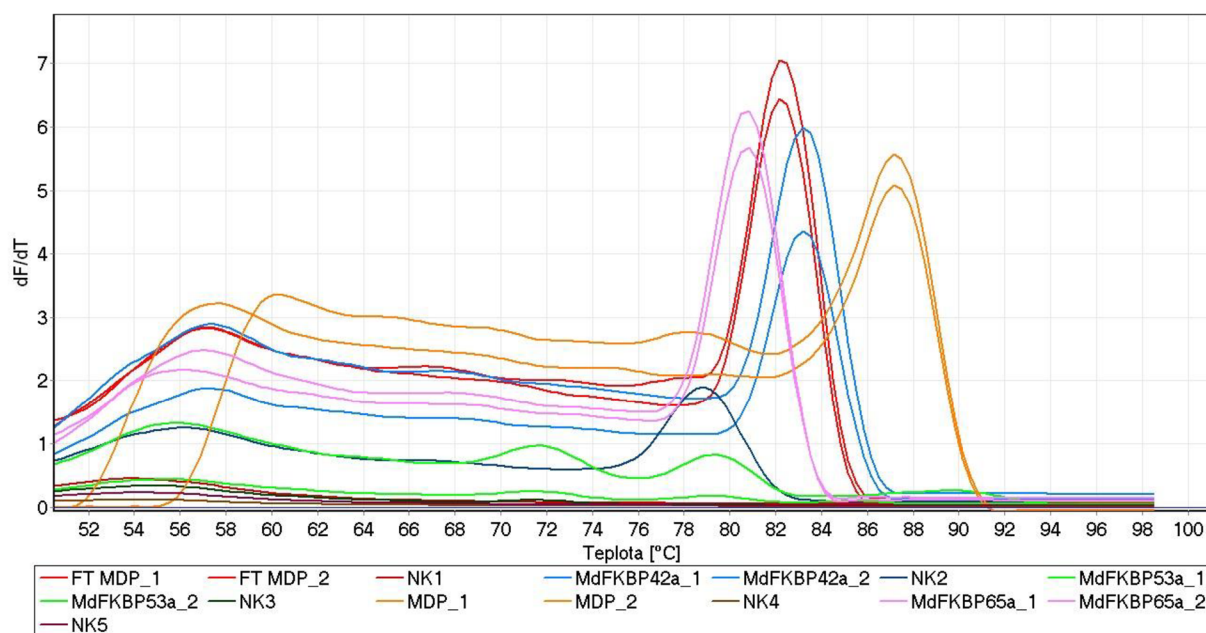
Pro ověření přítomnosti jablka v ovocných pyré bylo vybráno pět párů primerů (viz Tabulka 4) a poté byla pomocí qPCR ověřena jejich funkčnost s DNA z listu jablka, u níž byla ověřena amplifikovatelnost (kapitola 5.1.2). Následně byl optimalizován teplotní profil PCR a byla ověřena specifita primerů. U vybraných párů primerů bylo dále pokračováno se stanovením jejich citlivosti.

5.1.3.1. Test funkčnosti primerů specifických pro jablko

Podle postupu uvedeného v kapitole 4.3.4 byly připraveny PCR směsi (pro 1 μ l DNA z jablka) s pěti různými páry primerů uvedenými v Tabulce 4. Teplotní profil je uvedený v Tabulce 5 a v tomto případě byl převzat od Dong et al. beze změn [43].



Obrázek 7: Amplifikační křivky DNA izolované z jablka s pěti různými páry primerů

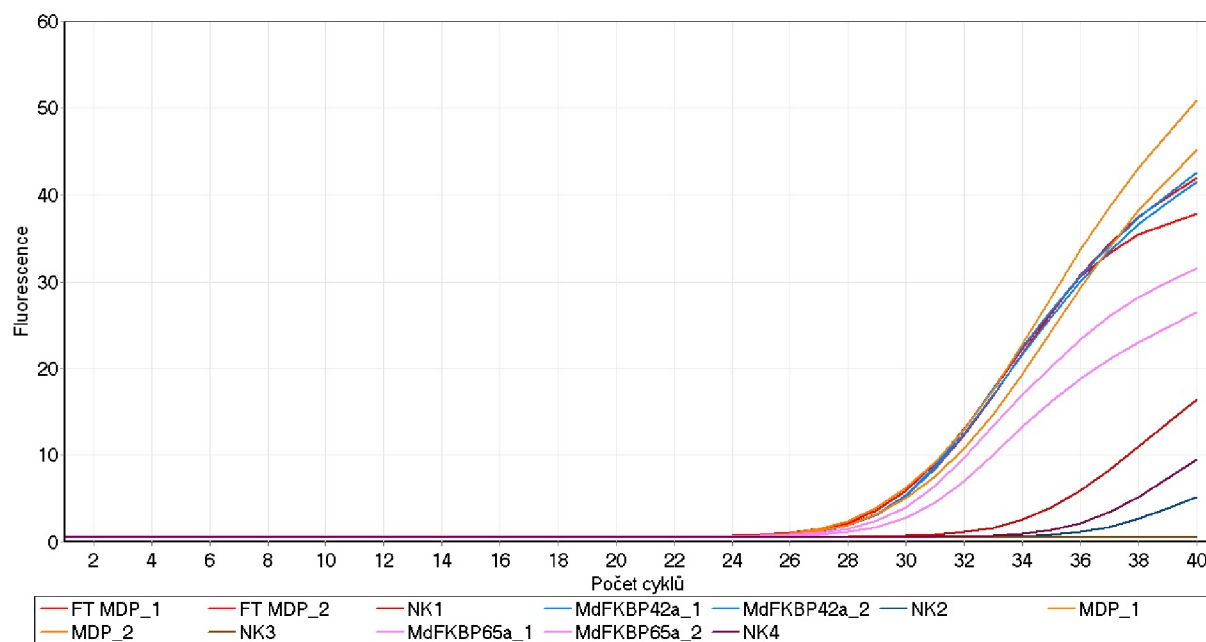


Obrázek 8: Křivky tání DNA izolované z jablka s pěti různými páry primerů

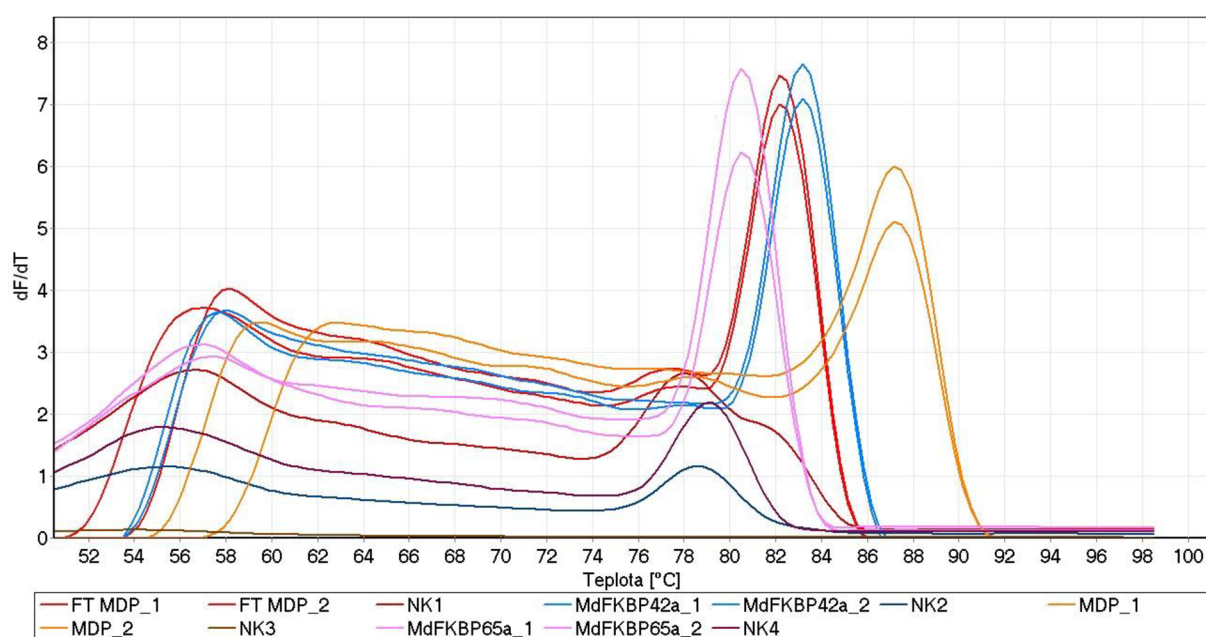
Amplifikační křivky na Obrázku 7 ukazují, že u čtyř z pěti párů primerů došlo k amplifikaci DNA. Výjimka jsou primery MdfKBP53a. Z křivek tání na Obrázku 10 můžeme usoudit, že ostatní primery (FT MDP, MdfKBP42a, MDP a MdfKBP65a) tvoří specifické produkty, a proto bylo s těmito primery pokračováno v dalších analýzách.

5.1.3.2. Optimalizace teplotního profilu PCR pro primery specifické pro jablko

Pro čtyři páry primerů vybrané v předchozí kapitole byly připraveny PCR směsi dle kapitoly 4.3.4 a teplotní profil byl optimalizován (uveden v Tabulce 5). Reakce opět probíhala s 1 μ l DNA z jablka.



Obrázek 9: Amplifikační křivky DNA izolované z jablka se čtyřmi různými páry primerů

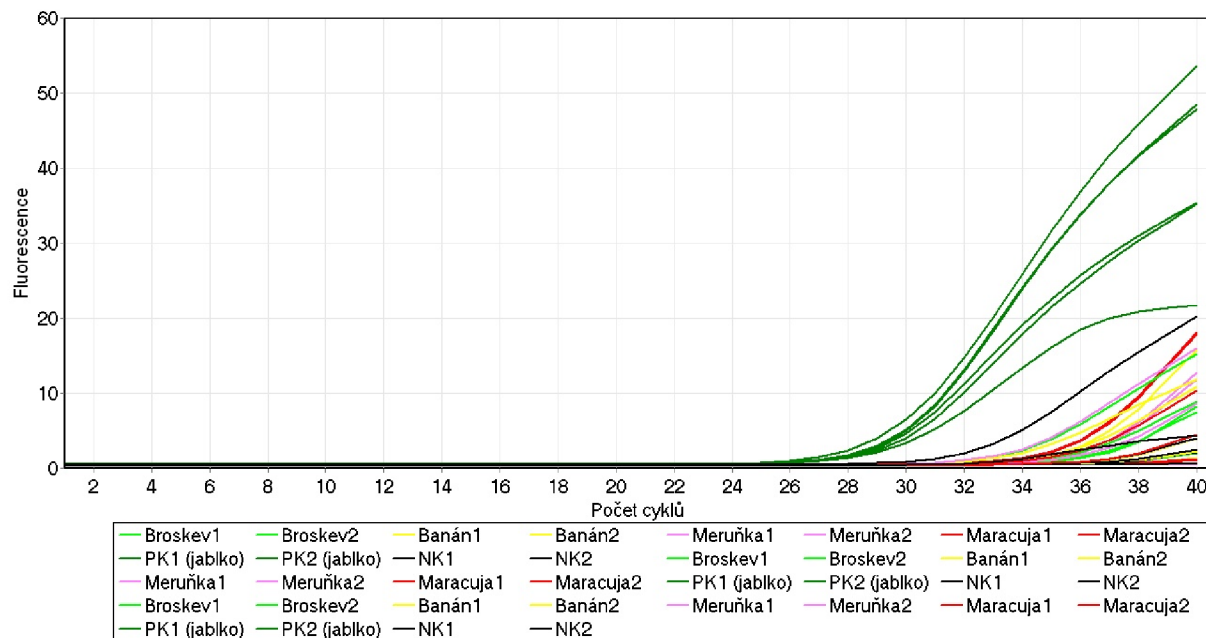


Obrázek 10: Křivky tání DNA izolované z jablka se čtyřmi různými páry primerů

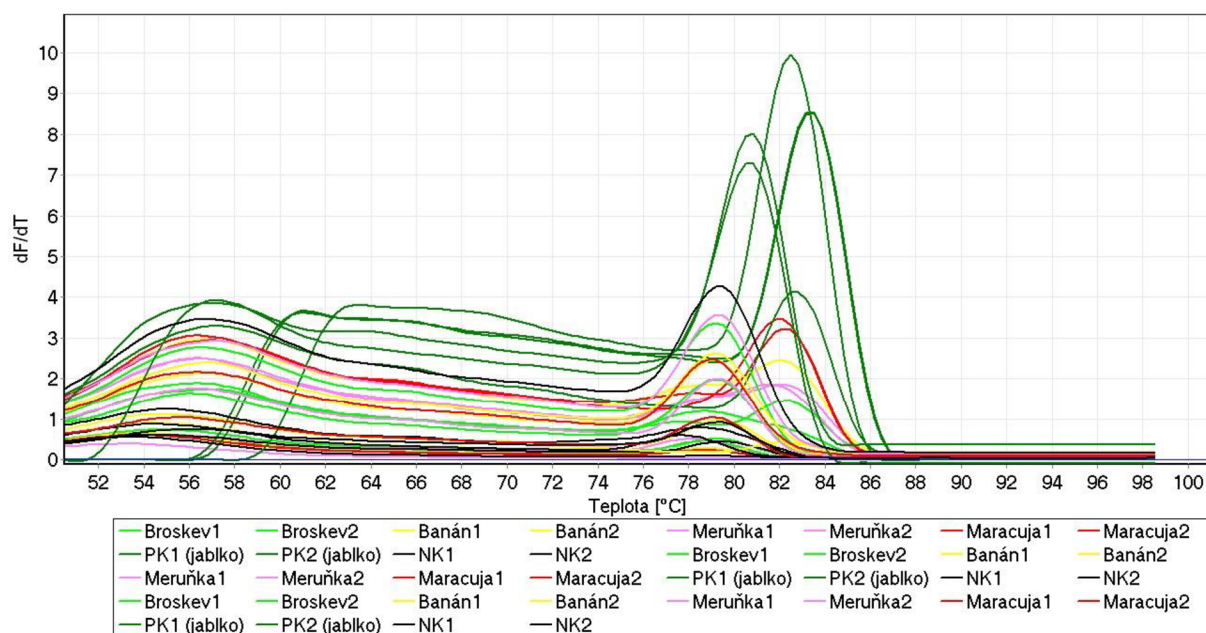
Z amplifikačních křivek (Obrázek 9) i křivek tání (Obrázek 10) je patrné, že ve všech PCR reakcích vznikly specifické amplikony. Vysvětlení zdánlivé amplifikace negativních kontrol lze vyvodit z grafu na Obrázku 10. Ze tvaru křivek tání odpovídajících negativním kontrolám je patrné, že zde vznikly pouze dimery primerů, jelikož jejich peaky jsou v jiné oblasti než u vzorků. Vzhledem k nižším peakům (a tudíž menšímu množství specifického produktu) u vzorků s primery MDP byly pro další analýzu využity pouze primery FT MDP, MdFKBP42a a MdFKBP65a.

5.1.3.3. Ověření specifity primerů FT MDP; MdFKBP42a; MdFKBP65a

S primery FT MDP, MdFKBP42a a MdFKBP65a byly připraveny PCR směsi, do kterých byla namísto DNA z jablka přidána DNA z ovocných druhů deklarovaných na obalu komerčních výrobků. Opět byl využit postup uvedený v kapitole 4.3.4, pipetován 1 µl DNA a reakce probíhala podle optimalizovaného teplotního profilu, který je uvedený Tabulce 5.

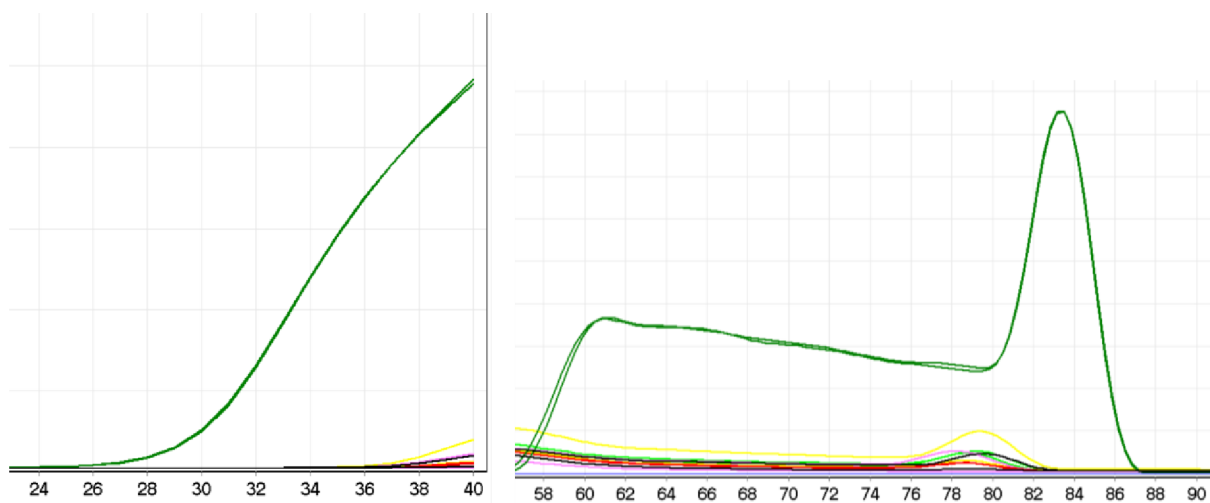


Obrázek 11: Amplifikační křivky pro ovoce v komerčních výrobcích a páry primerů MdFKBP42a (prvních 12 vzorků – vodorovně, zleva doprava), FT MDP (13.–24. vzorek) a MdFKBP65a (posledních 12 vzorků)



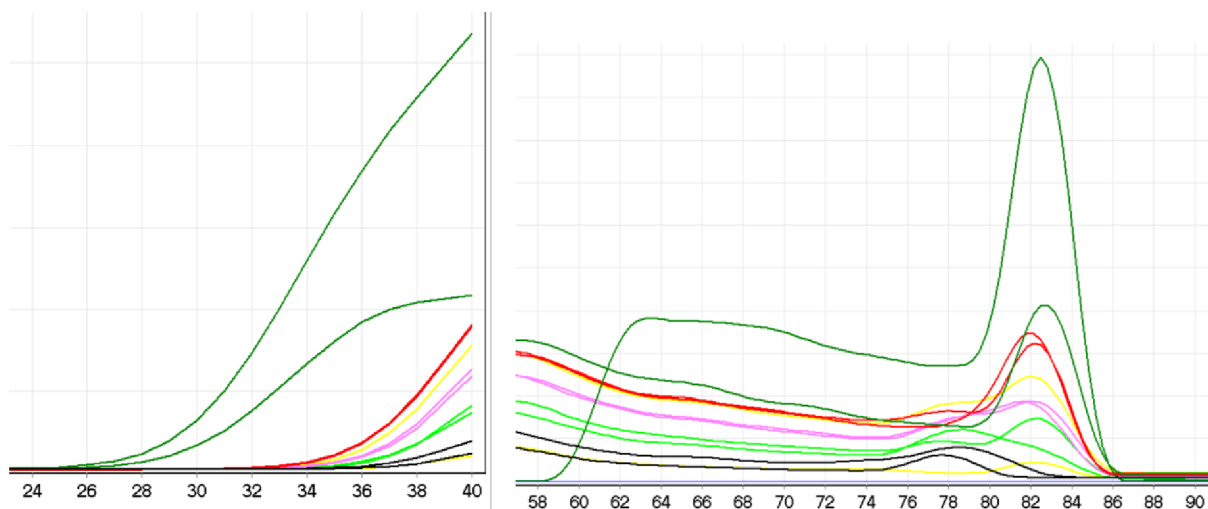
Obrázek 12: Křivky tání pro ovoce v komerčních výrobcích a páry prumerů M_dFKBP42a (prvních 12 vzorků – vodorovně, zleva doprava), FT MDP (13.–24. vzorek) a M_dFKBP65a (posledních 12 vzorků)

Pro větší názornost jsou přiloženy detailní výřezy z Obrázků 11 a 12.



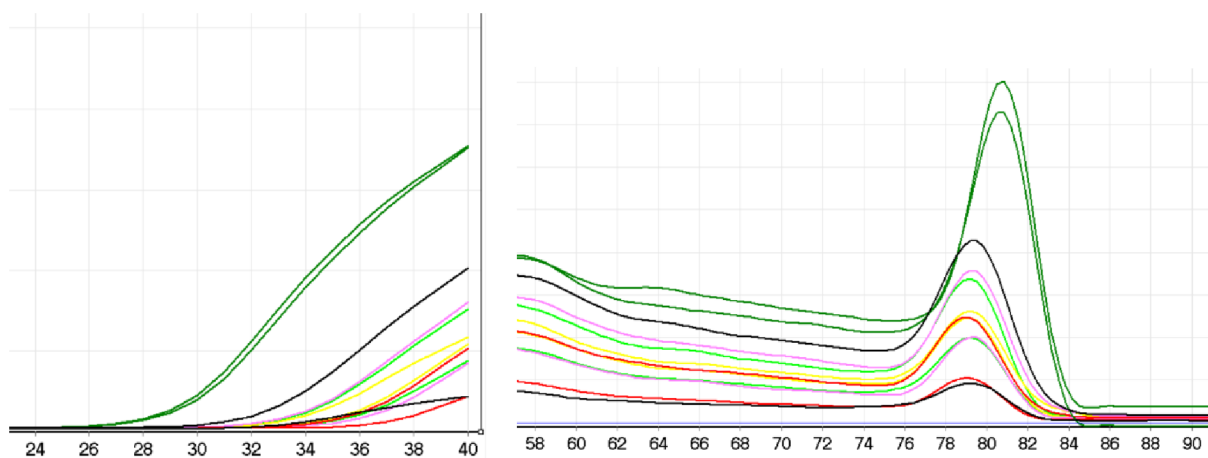
Obrázky 13 a 14: Amplifikační křivky (vlevo) a křivky tání (vpravo) pro pár prumerů M_dFKBP42a

Detailní výřezy (Obrázky 13 a 14) ukazují, že se amplifikovala pouze pozitivní kontrola DNA jablka. Na křivkách tání odpovídajících vzorkům s ostatními druhy ovoce a negativním kontrolám jsou vidět pouze dimery prumerů.



Obrázky 15 a 16: Amplifikační křivky (vlevo) a křivky tání (vpravo) pro pár primerů FT MDP

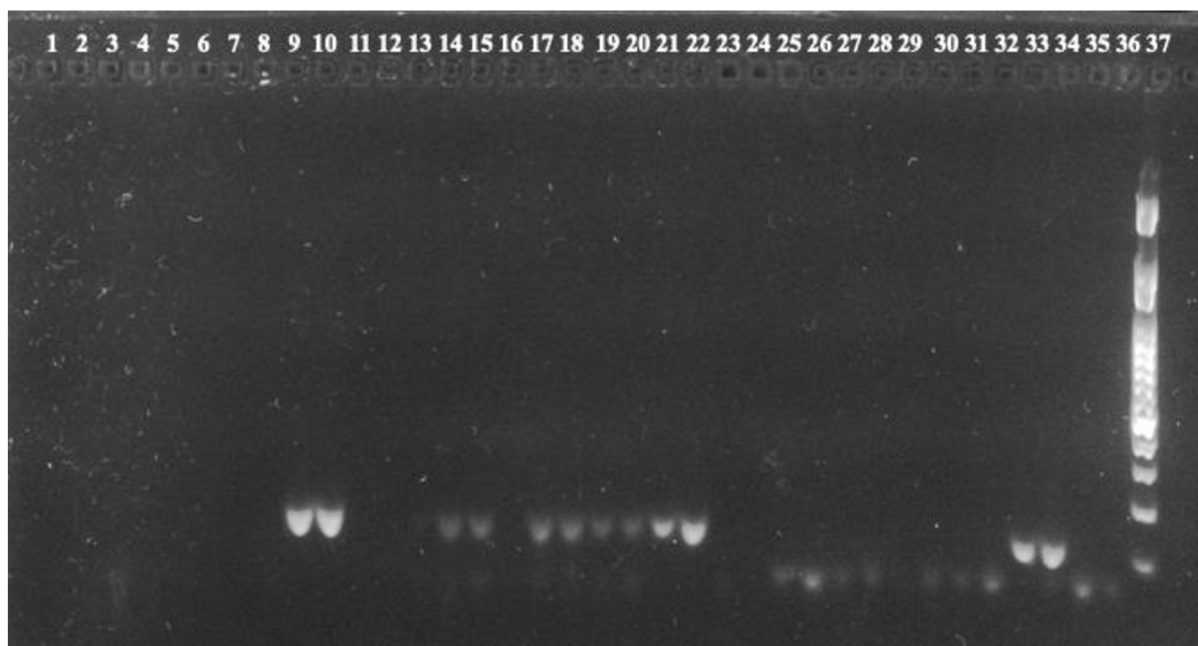
Primery FT MDP se ukazují jako nedostatečně specifické, jelikož docházelo ke vzniku produktů se stejnou teplotou tání a stejnou velikostí jako u pozitivní kontroly u všech vzorků s ostatními druhy ovoce (viz Obrázky 15, 16 a 19).



Obrázky 17 a 18: Amplifikační křivky (vlevo) a křivky tání (vpravo) pro pár primerů MdFKBP65a

V případě primerů MdFKBP65a byl vznik specifických produktů pozorován pouze v pozitivních kontrolách (PCR směsi s DNA jablka). Na Obrázku 17 je vidět zdánlivá amplifikace i u vzorků obsahujících DNA z broskve, banánu, meruňky a maracuji, avšak výřez křivek tání (Obrázek 18) ukazuje, že se jedná o dimery primerů (stejný peak tvoří i negativní kontroly a specifický produkt vzniklý v pozitivních kontrolách má odlišnou teplotu tání).

Pro potvrzení správné interpretace výsledku PCR byla provedena elektroforéza na agarózovém gelu (postupy uvedené v kapitolách 4.3.6 a 4.3.7).



Obrázek 19: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR – ověření specifity

Tabulka 8: Legenda k elektroforéze na Obrázku 19 (– nedetekováno, + detekováno)

Běh	vzorek	specifický produkt	Běh	vzorek	specifický produkt
primer MdfKBP42a			19	Meruňka1	+
1	Broskev1	–	20	Meruňka2	+
2	Broskev2	–	21	PK1	+
3	Banán1	–	22	PK2	+
4	Banán2	–	23	NK1	–
5	Maracuja1	–	24	NK2	–
6	Maracuja2	–	primer MdfKBP65a		
7	Meruňka1	–	25	Broskev1	–
8	Meruňka2	–	26	Broskev2	–
9	PK1	+	27	Banán1	–
10	PK2	+	28	Banán2	–
11	NK1	–	29	Maracuja1	–
12	NK2	–	30	Maracuja2	–
primer FT MDP			31	Meruňka1	–
13	Broskev1	–	32	Meruňka2	–
14	Broskev2	+	33	PK1	+
15	Banán1	+	34	PK2	+
16	Banán2	–	35	NK1	–
17	Maracuja1	+	36	NK2	–
18	Maracuja2	+	37	DNA standard	–

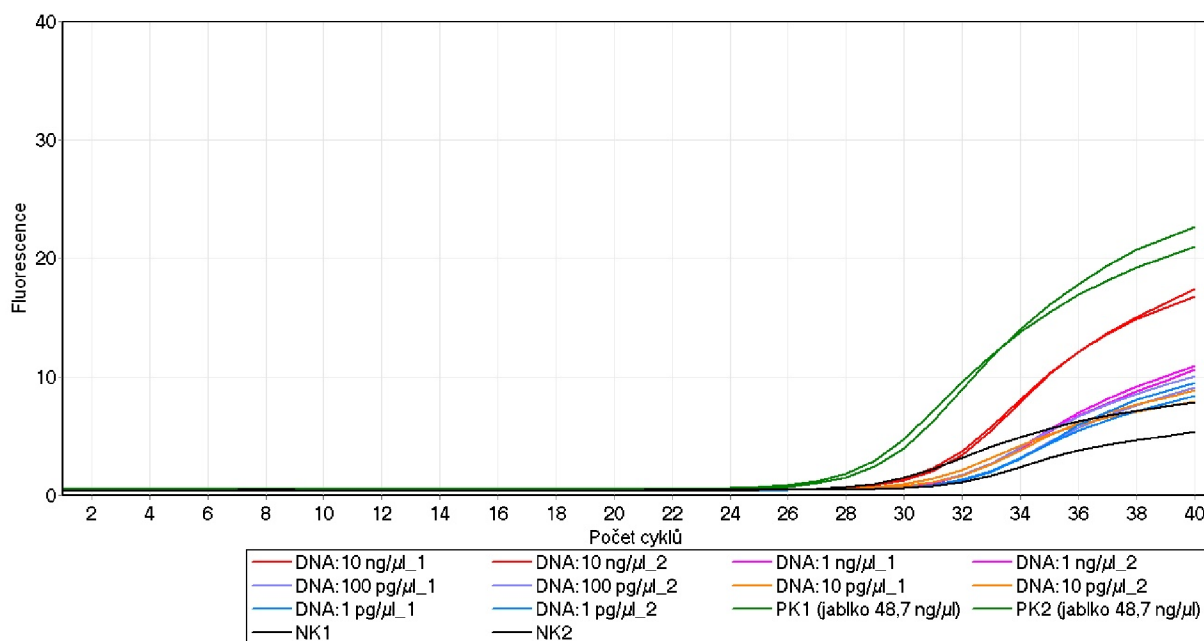
Ze záznamu elektroforézy (Obrázek 19) plyne, že primery MdfKBP42a byly dostatečně specifické. Specifické produkty byly detekovány pouze v běžích č. 9 a 10, kde se jedná o pozitivní kontroly. Jinak je tomu u primerů FT MDP, kde byly detekovány specifické produkty o velikosti přibližně 200 bp jak u pozitivní kontroly, tak u většiny vzorků s různými druhy ovoce (viz Tabulka 8). U primerů MdfKBP65a byl detekován specifický produkt opět pouze u pozitivní kontroly, a to o velikosti 120 bp. U ostatních vzorků jsou pak viditelné pouze dimery primerů (stejně jako u křivek tání na Obrázku 18).

Vzhledem k nedostatečné specifitě primerů FT MDP, byly pro další analýzy využity pouze primery MdfKBP42a a MdfKBP65a.

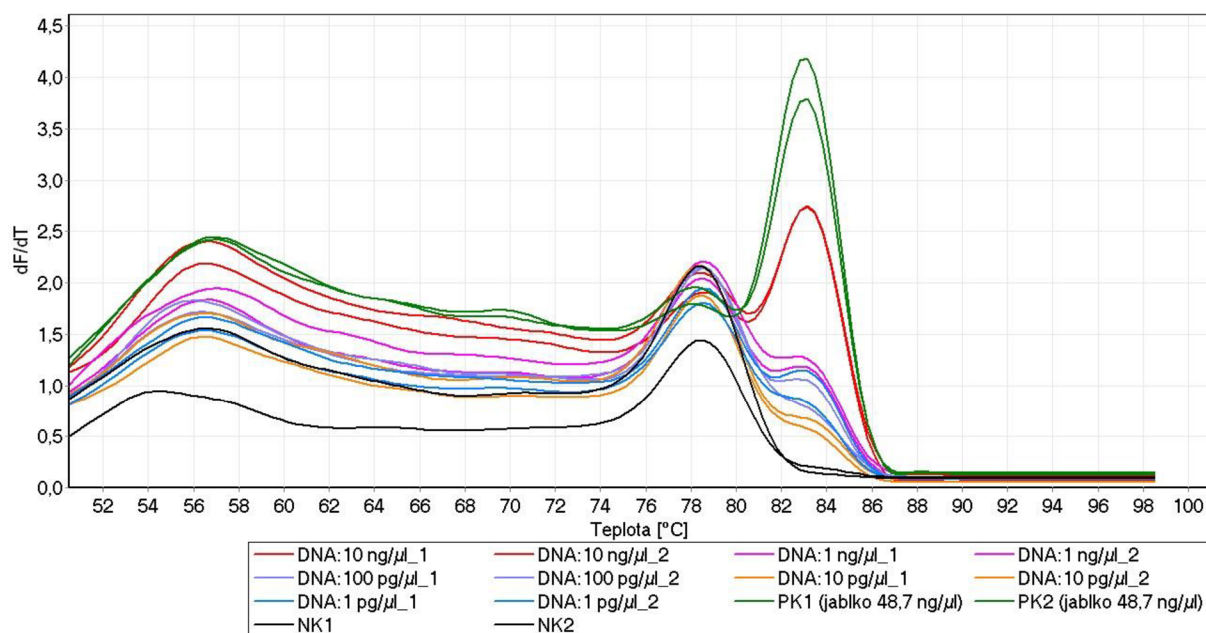
5.1.4. Stanovení citlivosti

Pro stanovení citlivosti primerů MdfKBP42a a MdfKBP65a byla naředěna DNA z jablka až na 1 pg/μl desítkovým ředěním. Směsi na PCR byly připraveny podle postupu v kapitole 4.3.4 (pro 1 μl DNA). Teplotní profil byl využit optimalizovaný (viz Tabulka 5).

5.1.4.1. Citlivost primerů MdfKBP42a



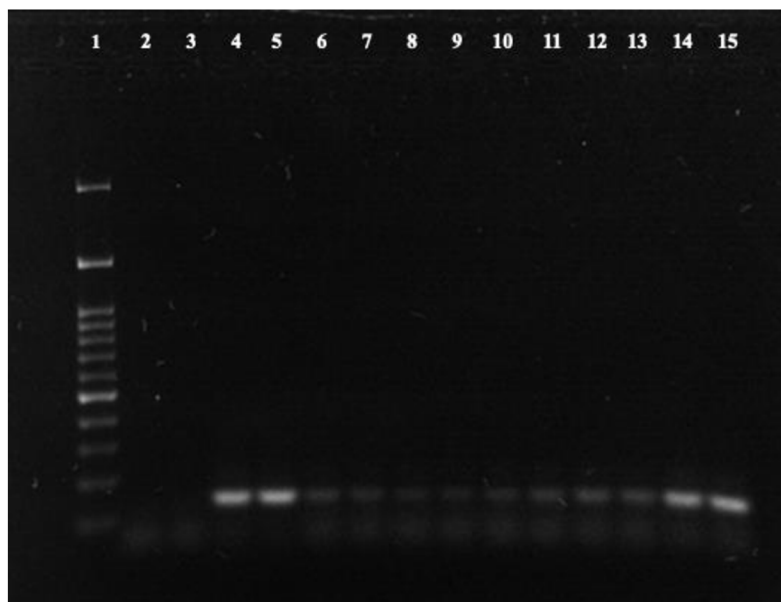
Obrázek 20: Amplifikační křivky řaděných vzorků DNA z jablka s primery MdfKBP42a



Obrázek 21: Křivky tání ředěných vzorků DNA z jablka s primery *MdFKBP42a*

Z křivek na Obrázku 20 je patrná postupná amplifikace DNA u všech vzorků. Z křivek tání (Obrázek 21) je patrné, že specifický produkt byl detekován ve všech vzorcích a nejmenší množství DNA detekované pomocí primerů *MdFKBP42a* bylo 1 pg.

Pro potvrzení výsledku PCR byla provedena elektroforéza (viz 4.3.6 a 4.3.7).



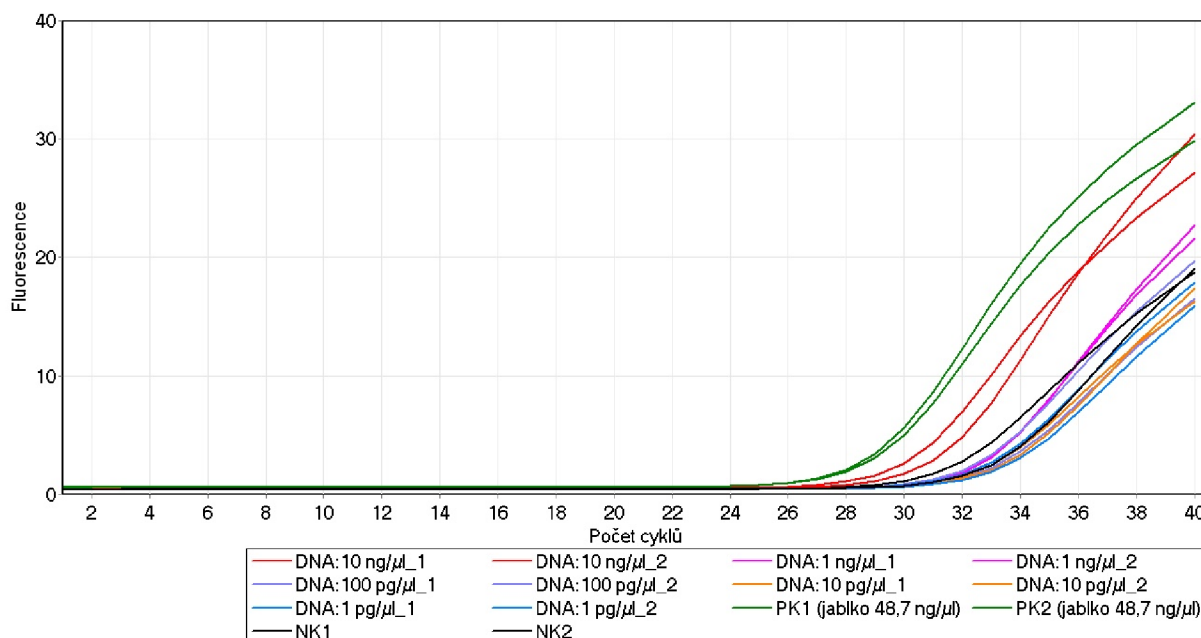
Obrázek 22: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR – ověření citlivosti primerů *MdFKBP42a*

Tabulka 9: Legenda k elektroforéze na Obrázku 22

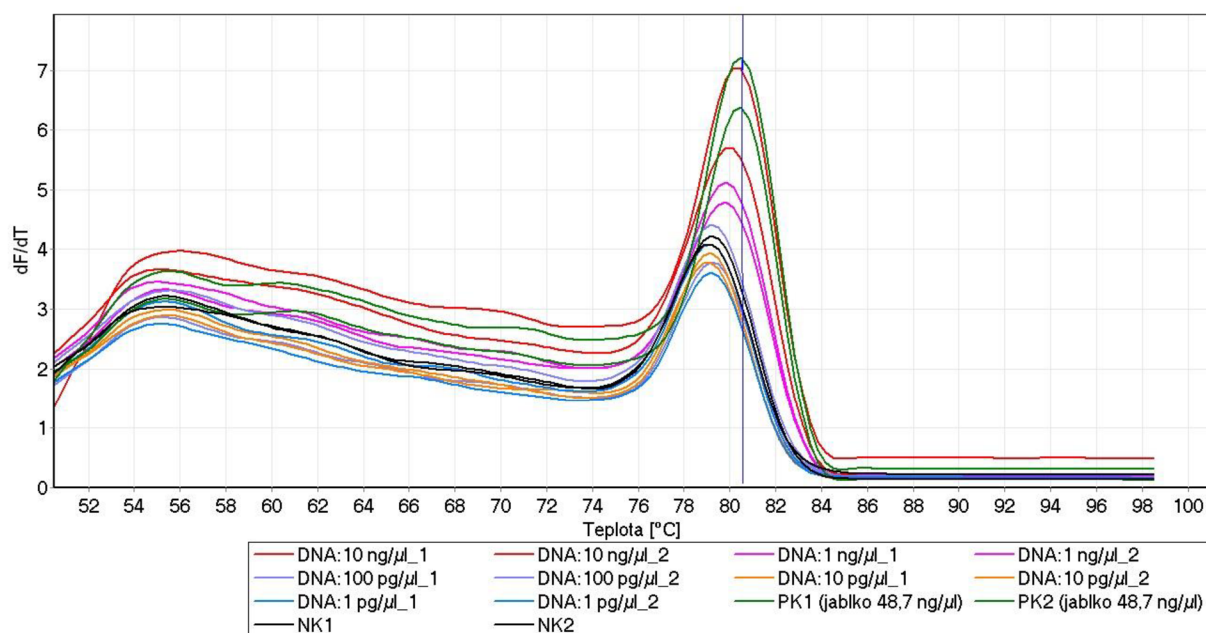
Běh	vzorek	specifický produkt	Běh	vzorek	specifický produkt
1	DNA standard	-	9	DNA 10 pg/μl_1	+
2	NK2	-	10	DNA 100 pg/μl_2	+
3	NK1	-	11	DNA 100 pg/μl_1	+
4	PK2	+	12	DNA 1 ng/μl_2	+
5	PK1	+	13	DNA 1 ng/μl_1	+
6	DNA 1 pg/μl_2	+	14	DNA 10 ng/μl_2	+
7	DNA 1 pg/μl_1	+	15	DNA 10 ng/μl_1	+
8	DNA 10 pg/μl_2	+	-	-	-

Na gelu (Obrázek 22) lze pozorovat vytvoření specifických produktů ve všech vzorcích. Bandy odpovídající specifickým produktům jsou nejintenzivnější v případě pozitivních kontrol (koncentrace 48,7 ng/μl), podobnou intenzitu mají i bandy ve vzorcích, které obsahovaly 10 ng templátové DNA. U ostatních vzorků se intenzita bandů odpovídajících specifickým produktům snižuje s klesajícím množstvím templátové DNA použité k amplifikaci. Za všemi vzorky (včetně negativních kontrol) jsou patrné také dimery primerů, které jsou vidět i na Obrázku 21 při teplotě 78,5 °C.

5.1.4.2. Citlivost primerů *MdFKBP65a*



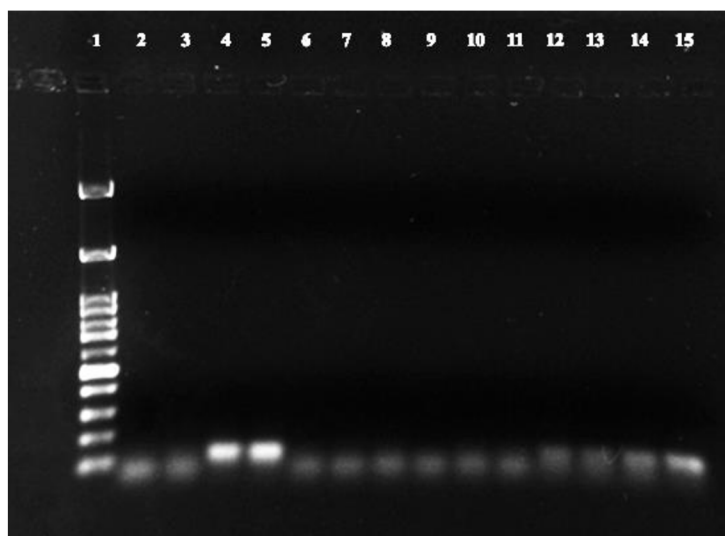
Obrázek 23: Amplifikační křivky řaděných vzorků DNA z jablka s primery *MdFKBP65a*



Obrázek 24: Křivky tání ředěných vzorků DNA z jablka s primery *MdFKBP65a*

Podle tvaru amplifikačních křivek na Obrázku 23 by bylo možné usoudit, že primery *MdFKBP65a* jsou citlivější než primery *MdFKBP42a*, avšak při pohledu na křivky tání na Obrázek 24 je patrné, že peaky pozitivních kontrol mají jinou teplotu tání než peaky u vzorků s nejnižšími množstvími templátové DNA (pomocná osa při teplotě 80,5 °C). Křivky tání vzorků, které obsahovaly 100 pg templátové DNA nebo méně, mají stejný tvar jako křivky tání negativních kontrol, a byly v nich detekovány pouze dimery primerů.

Pro potvrzení této interpretace byla provedena elektroforéza (postupy uvedené v kapitolách 4.3.6 a 4.3.7).



Obrázek 25: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR – ověření citlivosti primerů *MdFKBP65a*

Tabulka 10: Legenda k elektroforéze na Obrázku 25

Běh	vzorek	specifický produkt	Běh	vzorek	specifický produkt
1	DNA standard	–	9	DNA 10 pg/μl_1	–
2	NK2	–	10	DNA 100 pg/μl_2	–
3	NK1	–	11	DNA 100 pg/μl_1	–
4	PK2	+	12	DNA 1 ng/μl_2	+
5	PK1	+	13	DNA 1 ng/μl_1	+
6	DNA 1 pg/μl_2	–	14	DNA 10 ng/μl_2	+
7	DNA 1 pg/μl_1	–	15	DNA 10 ng/μl_1	+
8	DNA 10 pg/μl_2	–	–	–	–

Výsledek elektroforézy (Obrázek 25) potvrzuje interpretaci křivek tání. Viditelné bandy specifických produktů jsou detekovatelné pouze u pozitivních kontrol a vzorků s množstvím templatové DNA nad 100 pg.

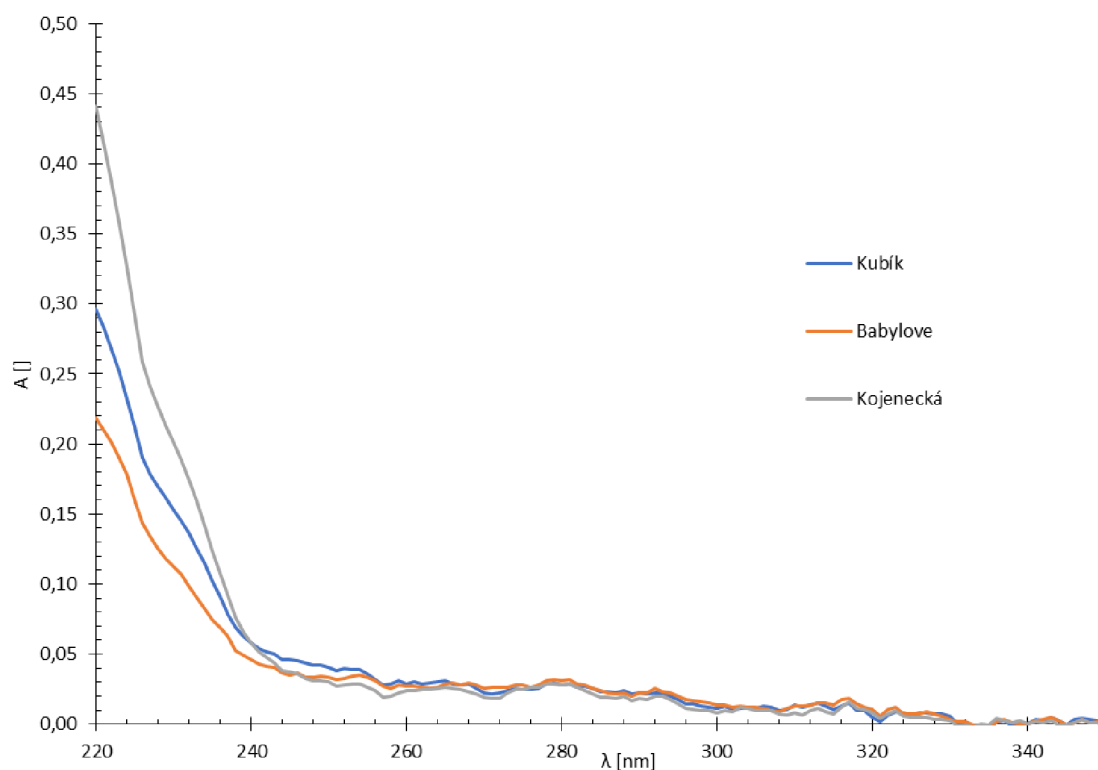
Citlivost primerů MdFKBP65a byla nižší než citlivost primerů MdFKBP42a. Na základě tohoto výsledku byly jako nejvhodnější pro důkaz přítomnosti jablečné složky v ovocných pyré zvoleny primery MdFKBP42a.

5.1.5. Izolace a spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA z komerčních výrobků

Izolace DNA byla provedena z lyofilizovaných vzorků tří komerčních výrobků (postup uveden v kapitole 4.3.2) a následně byla spektrofotometricky stanovena koncentrace a čistota DNA (postup v kapitole 4.3.3). Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 11.

Tabulka 11: Výsledky měření koncentrace a čistoty DNA z komerčních výrobků

Příkrm	c [ng/μl]	A _{260/280} []	A _{260/230} []	
Kubík	1	1,4	1,02	0,19
	2	1,6	1,14	0,19
	3	1,4	0,99	0,19
Průměr	1,5 ± 0,1	1,05 ± 0,08	0,19 ± 0,00	
Babylove	1	1,3	0,93	0,24
	2	1,4	0,76	0,23
	3	1,3	0,92	0,23
Průměr	1,3 ± 0,1	0,87 ± 0,10	0,23 ± 0,01	
Kojenecká	1	1,2	0,79	0,12
	2	1,2	0,87	0,12
	3	1,1	0,83	0,11
Průměr	1,2 ± 0,1	0,83 ± 0,04	0,12 ± 0,01	



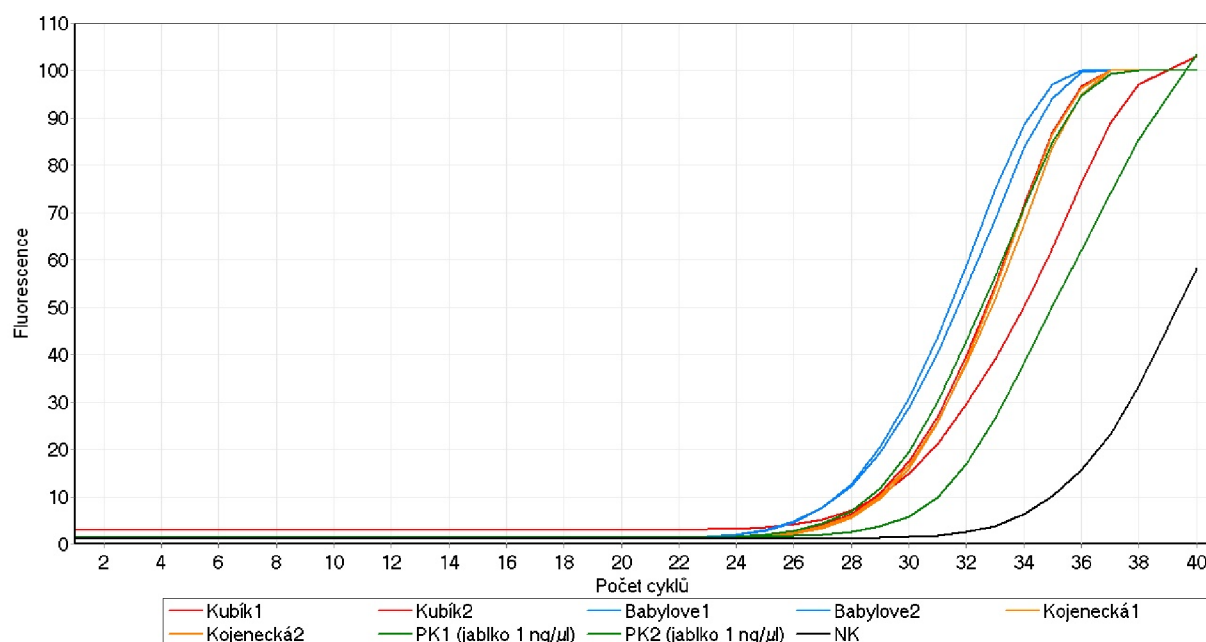
Obrázek 26: Absorpční spektrum DNA z komerčních výrobků

Stanovené koncentrace DNA z komerčních výrobků jsou velmi nízké. U všech vzorků vychází koncentrace mírně přes 1 ng/μl (viz Tabulka 11). Zároveň i hodnoty poměrů absorbancí $A_{260/280}$ a $A_{260/230}$ jsou vzdálené od optimální hodnoty 1,8. Nižší hodnoty u poměru $A_{260/280}$ naznačují znečištění proteiny, u poměru $A_{260/230}$ přítomnost polysacharidů a polyfenolů [25].

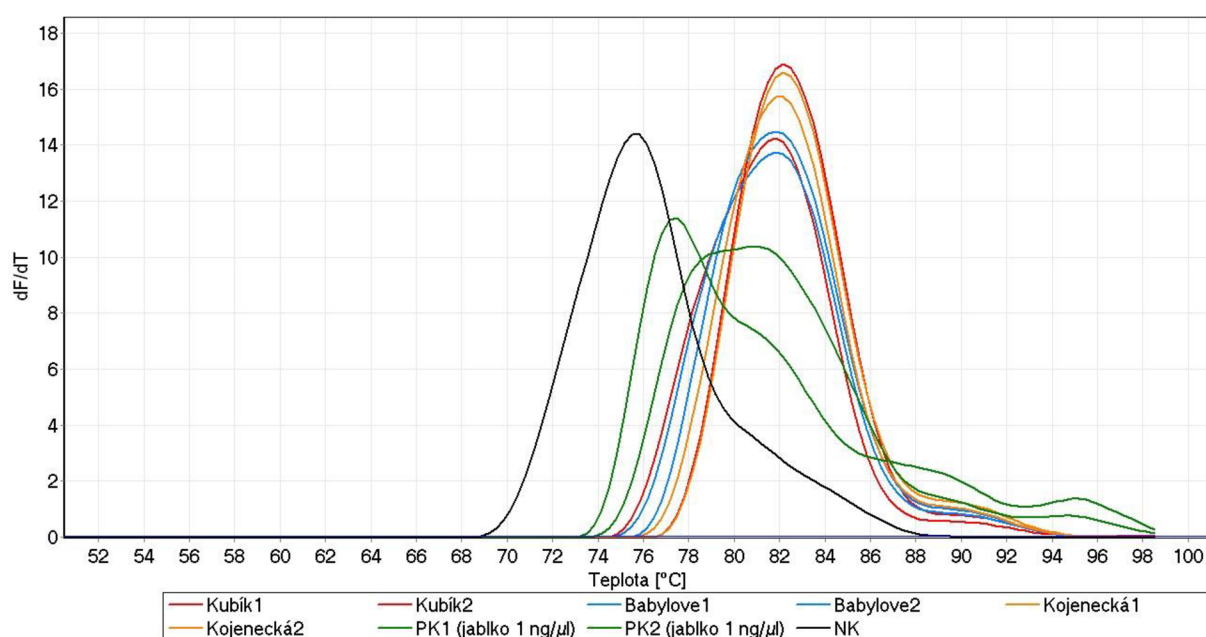
Nízkou koncentraci DNA dokládá i graf na Obrázku 26, ve kterém není patrné absorpční maximum při vlnové délce 260 nm.

5.1.6. Ověření amplifikovatelnosti DNA z komerčních výrobků pomocí qPCR

Pro ověření amplifikovatelnosti DNA byla připravena směs na PCR s primery S2F, S3R pro objem 5 μl DNA (viz kapitola 4.3.4). Využitý teplotní profil je uveden v Tabulce 5.



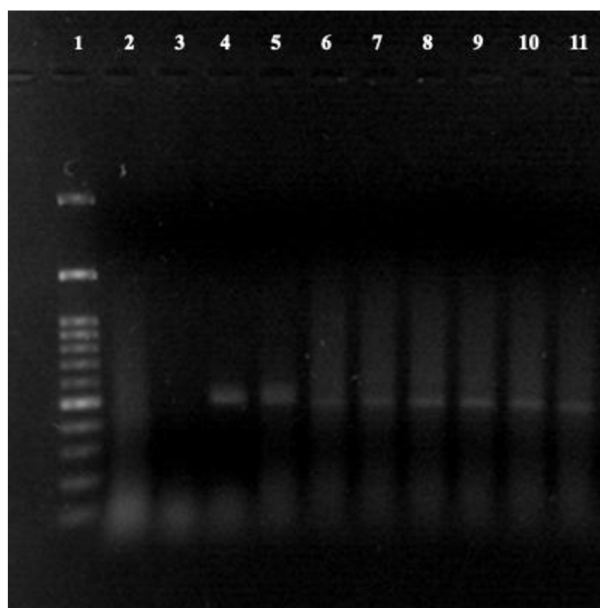
Obrázek 27: Amplifikační křivky vzorků komerčních výrobků



Obrázek 28: Křivky tání vzorků komerčních výrobků

Z tvaru křivek na Obrázku 27 by se dalo usoudit, že při amplifikaci DNA izolované z komerčních výrobků nedocházelo k inhibici amplifikace, nicméně na Obrázku 28 můžeme vidět především dimery primerů. Specifické produkty najdeme na křivkách pozitivních kontrol při teplotách 89 a 95 °C (DNA z jablka tvoří dva peaky). Malé množství specifických produktů u vzorků obsahujících DNA z komerčních výrobků bylo detekováno při 89 °C.

Pro ověření výsledku byla provedena elektroforéza (viz kapitola 4.3.6 a 4.3.7).



Obrázek 29: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR – ověření amplifikovatelnosti komerčních výrobků

Tabulka 12: Legenda k elektroforéze na Obrázku 29

Běh	vzorek	specifický produkt	Běh	vzorek	specifický produkt
1	DNA standard	–	7	Kubík1	+
2	NK2	–	8	Kojenecká výživa2	+
3	NK1	–	9	Kojenecká výživa1	+
4	PK2	+	10	Babylove2	+
5	PK1	+	11	Babylove1	+
6	Kubík2	+	–	–	–

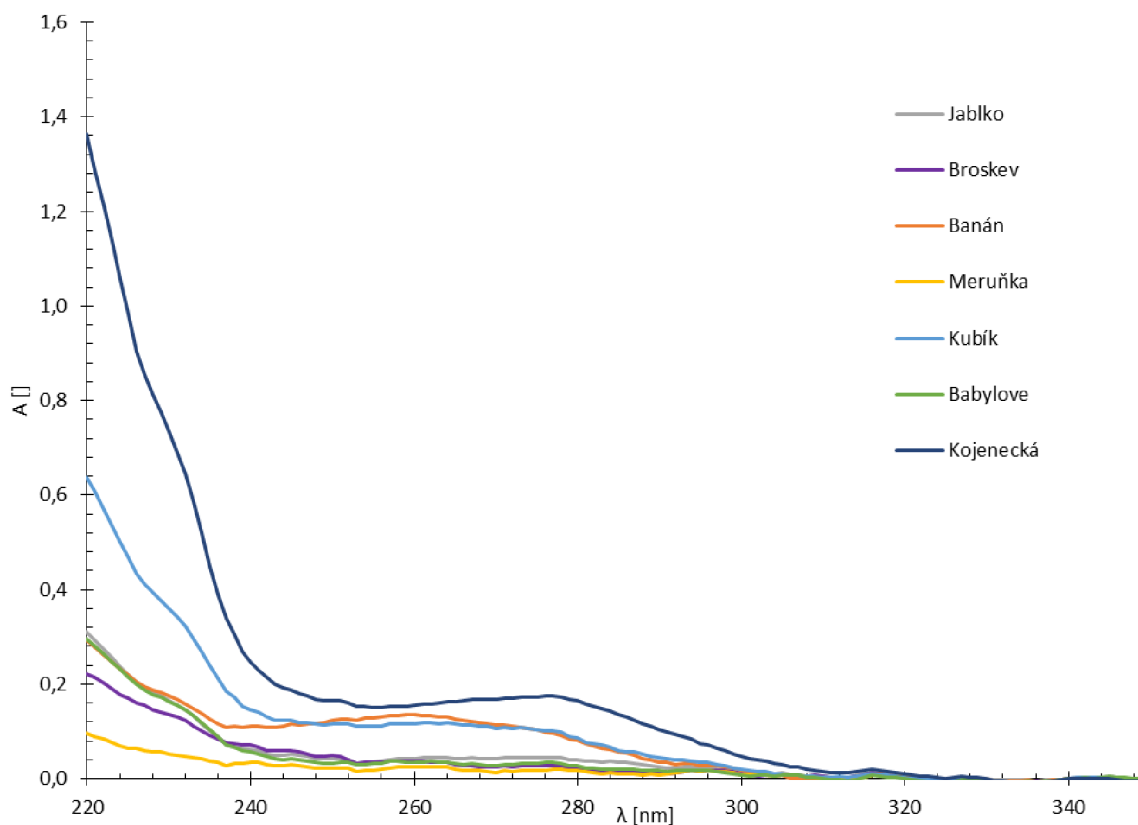
Na snímku agarózového gelu (Obrázek 29) lze pozorovat v oblasti 500 bp specifické produkty pozitivních kontrol v běžích č. 4 a 5. Méně intenzivní bandy tvoří i jednotlivé komerční vzorky v následujících běžích. Naopak v běžích negativních kontrol můžeme detekovat pouze dimery primerů, které se nacházejí i u komerčních vzorků a pozitivních kontrol.

5.1.7. Izolace a spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA z domácích pyré a modelových směsí

Dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.1 byly připraveny repliky komerčních pyré, ze kterých byla vyizolována DNA (viz kapitola 4.3.2). Následně bylo provedeno spektrofotometrické stanovení její koncentrace a čistoty dle postupu v kapitole 4.3.3. Výsledky stanovení jsou uvedeny v Tabulce 13, přesnější informace o kvalitě DNA lze vyčíst z přiloženého absorpčního spektra (Obrázek 30).

Tabulka 13: Výsledky měření koncentrace a čistoty DNA z domácích pyré a modelových směsí

Pyré/replika	c [ng/μl]	A _{260/280} []	A _{260/230} []	
Jablko	1	1,3	0,97	0,19
	2	3,1	1,14	0,31
	3	2,1	1,20	0,25
Průměr	2,2 ± 0,9	1,10 ± 0,12	0,25 ± 0,06	
Broskev	1	2,1	1,54	0,32
	2	1,8	1,79	0,25
	3	1,6	1,52	0,24
Průměr	1,8 ± 0,3	1,62 ± 0,15	0,27 ± 0,04	
Banán	1	6,4	1,79	0,74
	2	6,7	1,69	0,83
	3	7,2	1,55	0,77
Průměr	6,8 ± 0,4	1,68 ± 0,12	0,78 ± 0,05	
Meruňka	1	1,5	1,29	0,48
	2	1,3	1,53	0,44
	3	1,0	1,71	0,55
Průměr	1,3 ± 0,3	1,51 ± 0,21	0,49 ± 0,06	
Kubík	1	5,8	1,39	0,33
	2	6,0	1,35	0,33
	3	5,8	1,38	0,32
Průměr	5,9 ± 0,1	1,37 ± 0,02	0,33 ± 0,01	
Babylove	1	1,7	1,48	0,21
	2	2,1	1,38	0,25
	3	1,5	1,18	0,19
Průměr	1,8 ± 0,3	1,35 ± 0,15	0,22 ± 0,03	
Kojenecká	1	9,6	1,07	0,23
	2	7,4	0,88	0,21
	3	6,2	0,85	0,19
Průměr	7,7 ± 1,7	0,93 ± 0,12	0,21 ± 0,02	



Obrázek 30: Absorpční spektrum DNA z domácích pyré a modelových směsí

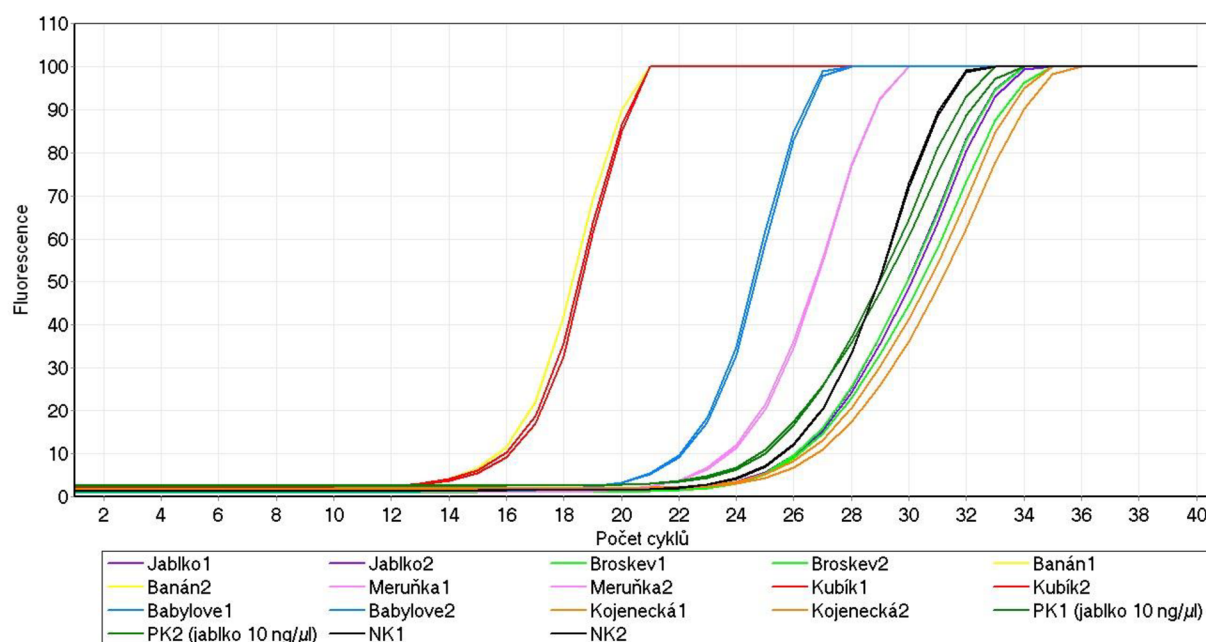
Z Tabulky 13 můžeme usoudit, že největší koncentrace DNA se podařilo získat z banánového pyré – $6,8 \pm 0,4$ ng/ μ l, repliky komerčního výrobku Kubík – $5,9 \pm 0,1$ ng/ μ l a repliky Kojenecké výživy – $7,7 \pm 1,7$ ng/ μ l. Znečištění lze opět vidět na hodnotách poměrů absorbcí $A_{260/0230}$, které značí přítomnost polysacharidů a polyfenolů [25].

Vyšší hodnota koncentrace DNA z banánového pyré je pravděpodobně dána způsobem přípravy protlaku z banánu, který vzhledem ke své konzistenci nebyl poškozen, a tudíž nedošlo k degradaci DNA. Tomu odpovídá i vyšší koncentrace DNA z repliky Kubíku, ve které bylo banánové pyré zastoupeno z 66 %. Hodnota koncentrace DNA z repliky Kojenecké výživy je ovlivněna také složením, a to pravděpodobně přidávkem kukuřičného škrobu, který jako polysacharid (a tím pádem těžko odstranitelná kontaminující látka – kapitola 2.3.3.4) mohl být izolován společně s DNA a při spektrofotometrickém stanovení koncentrace této DNA mohl nadsadit naměřenou hodnotu.

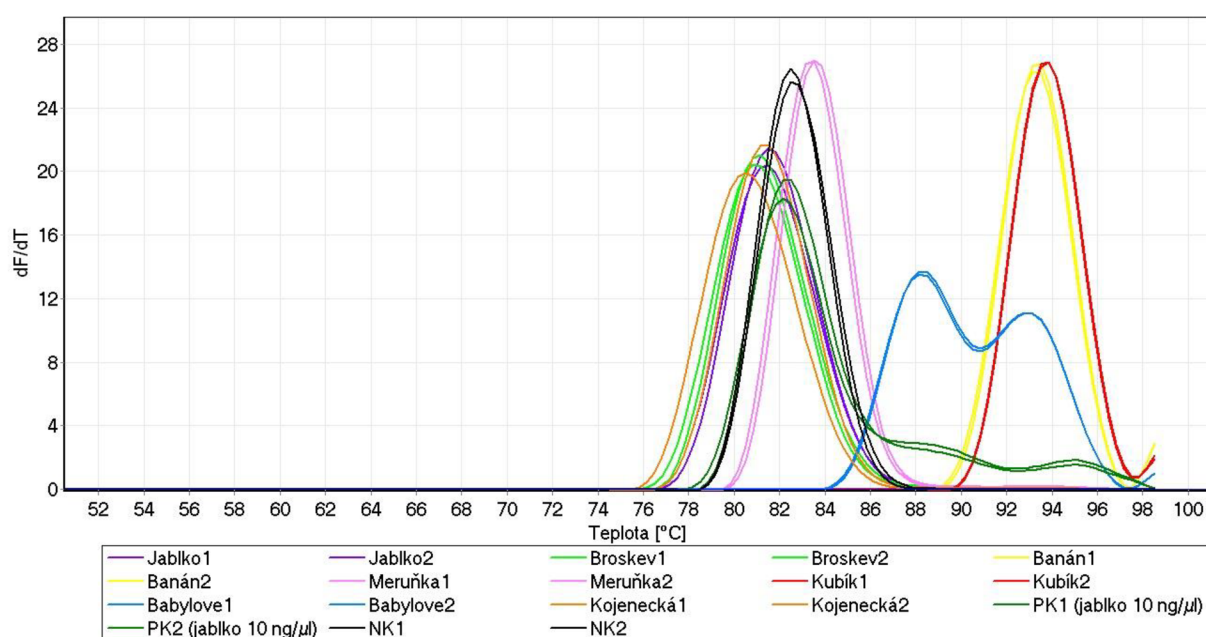
Ověřit hodnoty koncentrací můžeme z grafu (Obrázek 30), kde je vidět nízký peak s maximum při vlnové délce 260 nm na křivce banánu a repliky Kubíku. Vysoká hodnota v oblasti 230 nm u repliky Kojenecké výživy naopak ukazuje znečištění polysacharidy [45].

5.1.8. Ověření amplifikovatelnosti DNA z domácích pyré a modelových směsí pomocí qPCR

Amplifikovatelnost byla ověřena pomocí primerů S2F a S3R s 5 μ l DNA (viz kapitola 4.3.4) a teplotního profilu uvedeného v Tabulce 5.



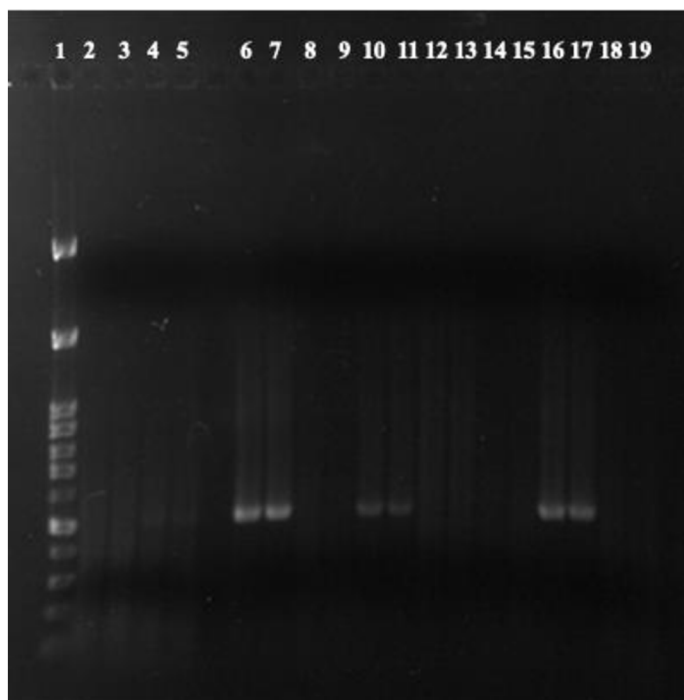
Obrázek 31: Amplifikační křivky vzorků modelových směsí a domácích pyré



Obrázek 32: Křivky tání vzorků modelových směsí a domácích pyré

Z křivek (Obrázek 31) pro banán a repliku Kubíku lze vidět začátek amplifikace již od 13. cyklu PCR, následně se amplifikuje i DNA z repliky příkrmu Babylove, která obsahuje taktéž banánové pyré (7 %). Křivky tání (Obrázek 32) dokládají přítomnost specifických produktů u vzorku banánu, repliky Kubíku a repliky Babylove. Ostatní vzorky tvořily pouze dimery primerů ve stejné oblasti jako negativní kontroly.

K ověření výsledku reakce PCR byla provedena elektroforéza (viz kapitoly 4.3.6 a 4.3.7).



Obrázek 33: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR – ověření amplifikovatelnosti modelových směsí a domácích pyré

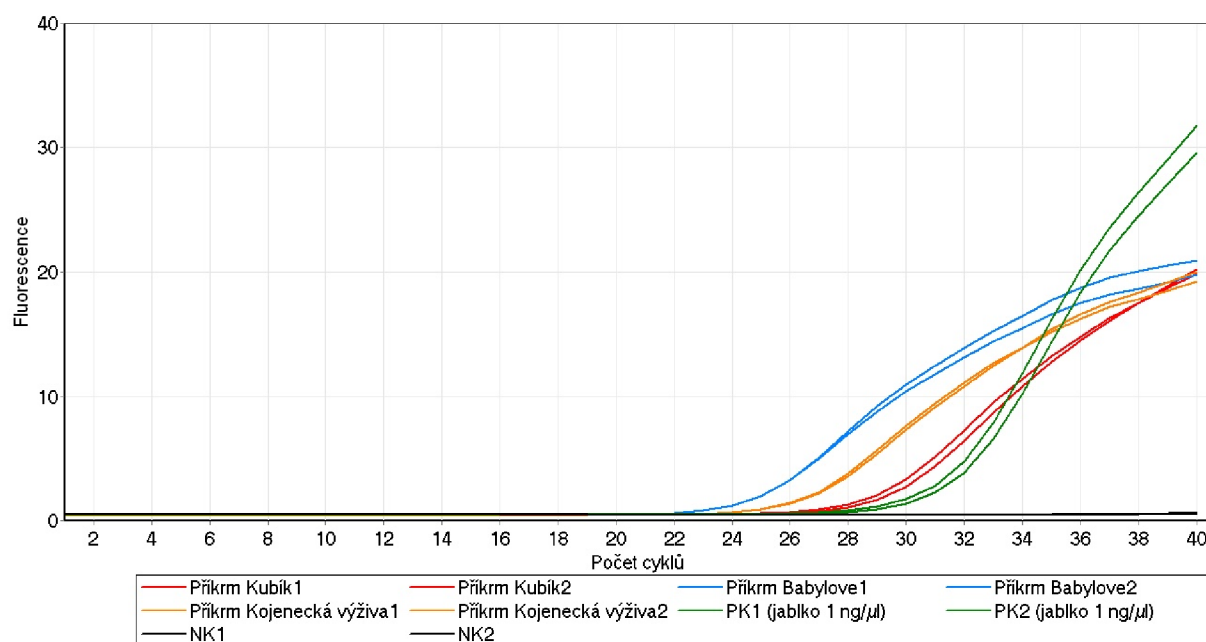
Tabulka 14: Legenda k elektroforéze na Obrázku 33

Běh	vzorek	specifický produkt	Běh	vzorek	specifický produkt
1	DNA standard	-	11	Babylove1	+
2	NK2	-	12	Meruňka2	-
3	NK1	-	13	Meruňka1	-
4	PK2	+	14	Jablko2	-
5	PK1	+	15	Jablko1	-
6	Kubík2	+	16	Banán2	+
7	Kubík1	+	17	Banán1	+
8	Kojenecká výživa2	-	18	Broskev2	-
9	Kojenecká výživa1	-	19	Broskev1	-
10	Babylove2	+	-	-	-

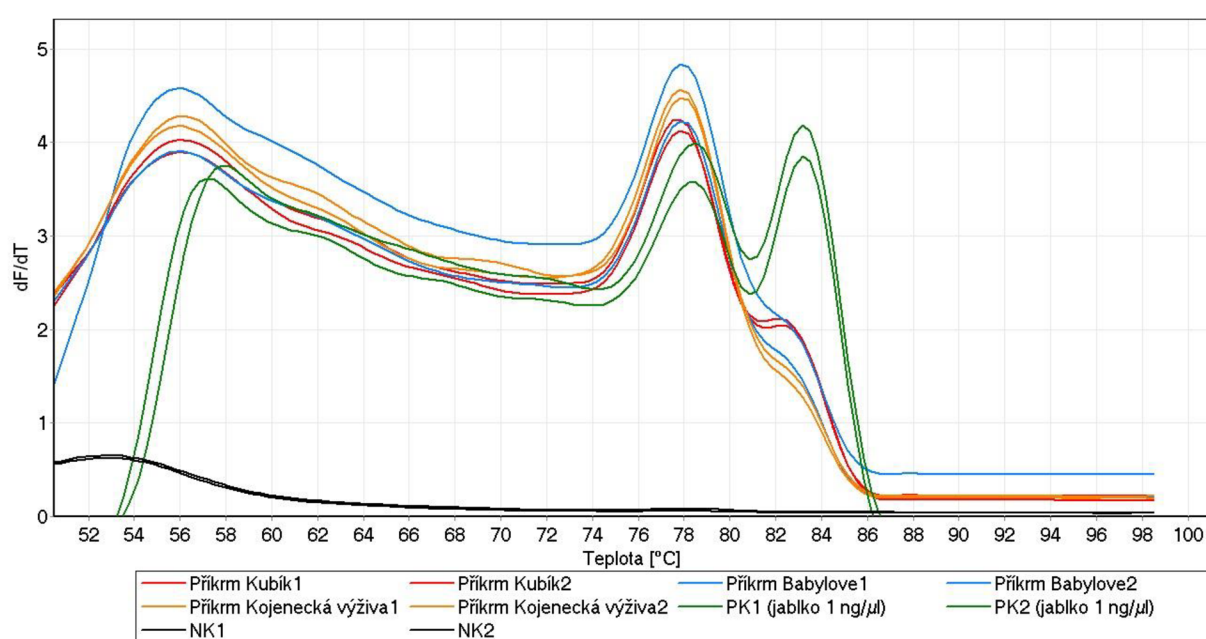
Na Obrázku 33 můžeme vidět v běžích č. 4 a 5 bandy o slabé intenzitě (pozitivní kontroly), jejichž velikost byla přibližně 500 bp. Bandy stejné velikosti byly detekovány i u vzorků replik Kubíku (běhy č. 6 a 7), replik Babylove (běhy č. 10 a 11) a banánového pyré (běhy č. 16 a 17).

5.1.9. Průkaz přítomnosti jablka v komerčních výrobcích a modelových směsích

K průkazu přítomnosti jablka byla využita reakce PCR s optimalizovaným teplotním profilem (viz Tabulka 5). Využity byly primery MdfKB42a a směs byla připravena pro 5 μ l DNA (viz kapitola 4.3.4).

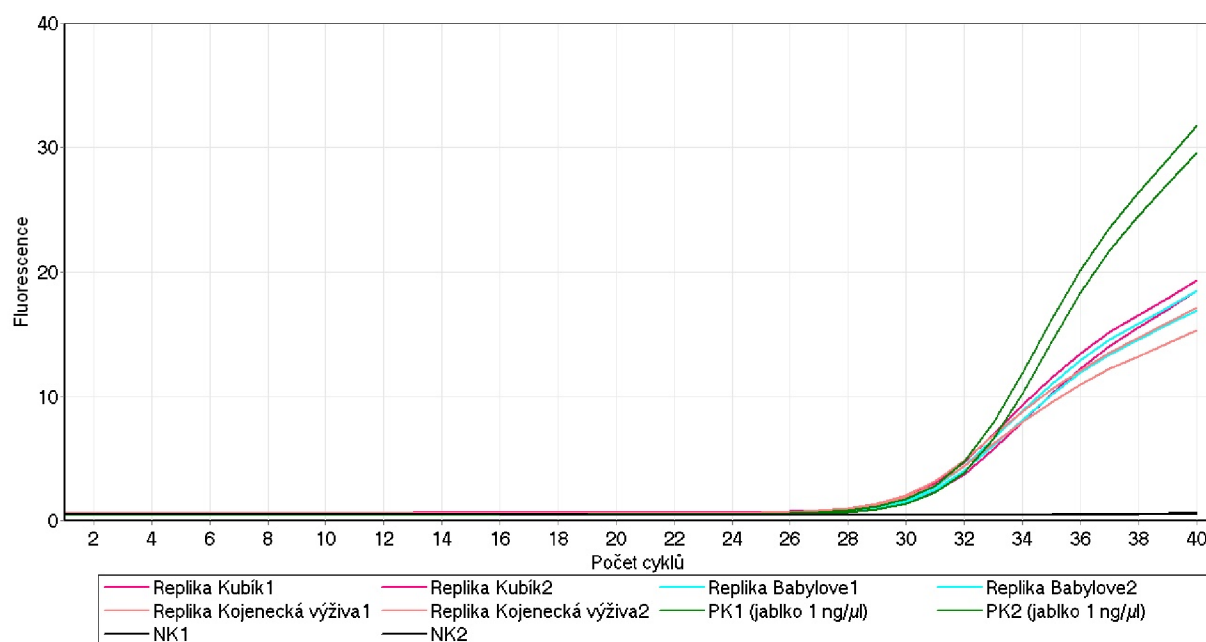


Obrázek 34: Amplifikační křivky vzorků k průkazu přítomnosti jablka (komerční výrobky)

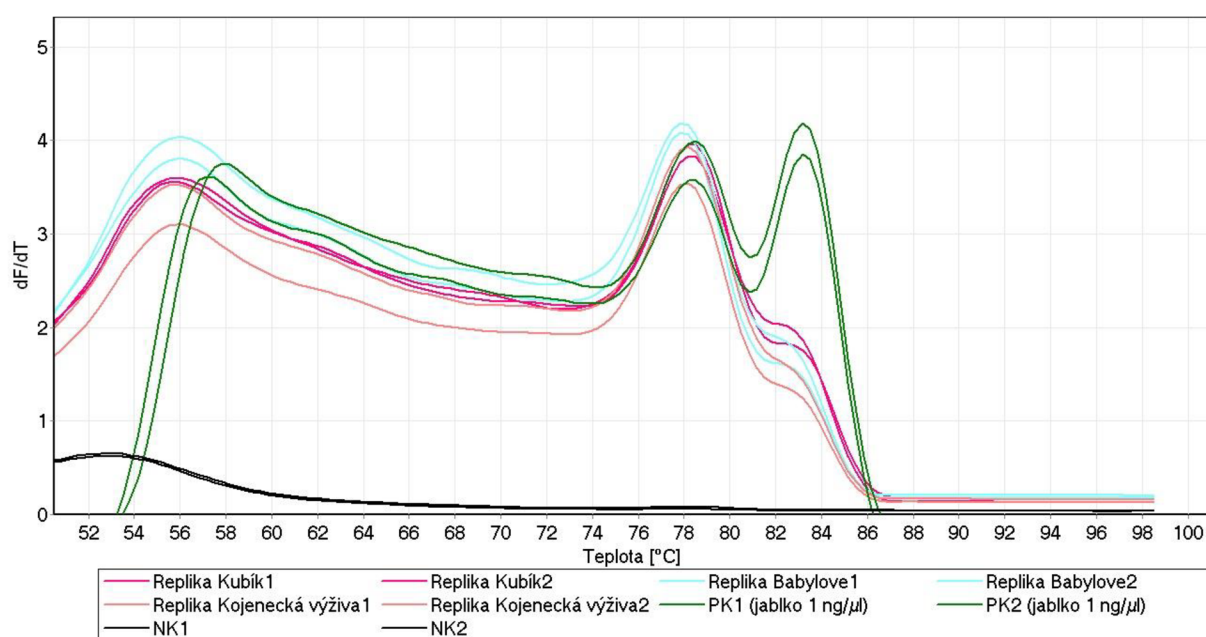


Obrázek 35: Křivky tání vzorků k průkazu přítomnosti jablka (komerční výrobky)

Na Obrázku 35 můžeme pozorovat peaky pozitivních kontrol při 83 °C. Ve vzorcích, které obsahovaly DNA izolovanou z komerčních produktů, byly detekovány amplikony se stejnou teplotou tání jako u pozitivních kontrol. Z výsledku vyplývá, že přítomnost jablka byla prokázána ve všech komerčních pyré.



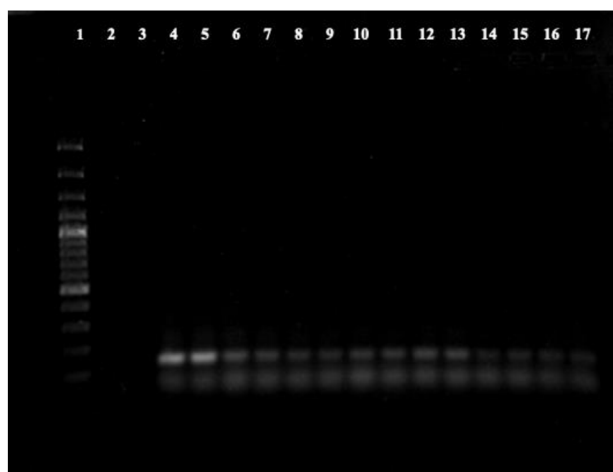
Obrázek 36: Amplifikační křivky vzorků k průkazu přítomnosti jablka (modelové směsi)



Obrázek 37: Křivky tání vzorků k průkazu přítomnosti jablka (modelové směsi)

Křivky tání na Obrázku 37 jsou velmi podobné křivkám na Obrázku 35. Specifické produkty s teplotou tání 83 °C byly detekovány ve všech replikách komerčních výrobků.

Pro ověření výsledku PCR byla provedena elektroforéza dle postupů v kapitolách 4.3.6 a 4.3.7.



Obrázek 38: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR – ověření přítomnosti jablka

Tabulka 15: Legenda k elektroforéze na Obrázku 38

Běh	vzorek	specifický produkt	Běh	vzorek	specifický produkt
1	DNA standard	–	10	Replika Babylove2	+
2	NK2	–	11	Replika Babylove1	+
3	NK1	–	12	Příkrm Kubík2	+
4	PK2	+	13	Příkrm Kubík1	+
5	PK1	+	14	Příkrm Kojenecká2	+
6	Replika Kubík2	+	15	Příkrm Kojenecká1	+
7	Replika Kubík1	+	16	Příkrm Babylove2	+
8	Replika Kojenecká2	+	17	Příkrm Babylove1	+
9	Replika Kojenecká1	+	–	–	–

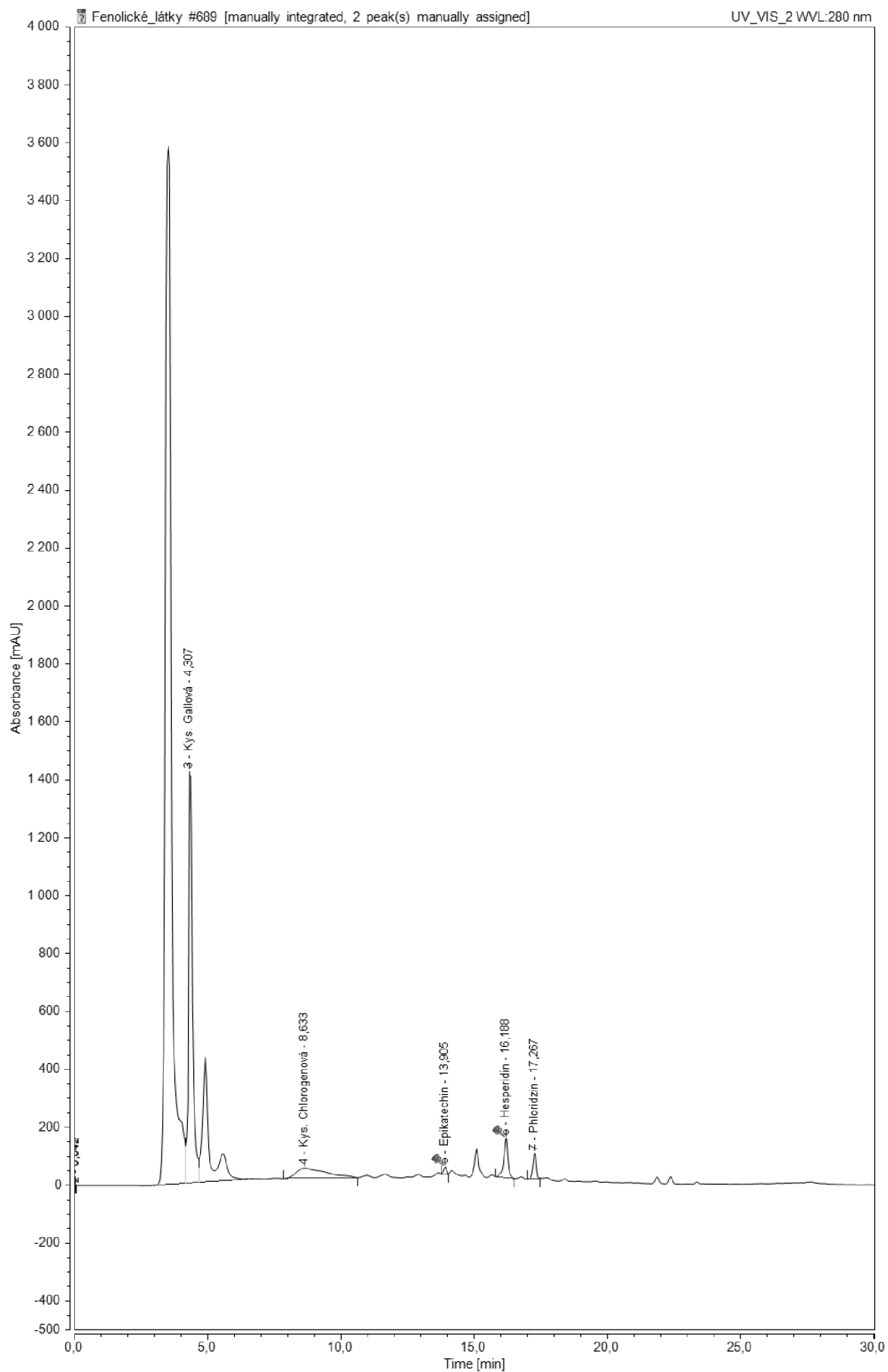
Snímek gelu na Obrázku 38 dokládá přítomnost jablka jak v komerčních, tak modelových výrobcích.

PCR i gelová elektroforéza s primery MdFKBP42a poskytují stejné výsledky jak se vzorky DNA z komerčních produktů, tak se vzorky DNA z modelových směsí. Z toho vyplývá, že primery MdFKBP42a jsou vhodné pro důkaz přítomnosti jablečné složky v dětských příkrmech. Tyto primery zjevně amplifikují sekvenci (viz Tabulka 4), která má vhodnou délku pro amplifikaci degradované DNA z komerčních výrobků, které byly dlouhodobě skladovány a vystaveny různým teplotám. Zároveň je tato sekvence v genomu jablka dostatečně zastoupena na to, aby analýza poskytla správný výsledek i s malým množstvím templátové DNA.

5.2. Instrumentální analytické metody

5.2.1. Stanovení fenolických látek v ovocných pyré pomocí HPLC

Z lyofilizovaných vzorků byly dle postupu v kapitole 4.3.8 připraveny extrakty pro chromatografii. Samotná HPLC probíhala na sestavě uvedené v kapitole 4.3.9 s parametry uvedenými v Tabulce 6.



Obrázek 39: Chromatogram fenolických látek v extraktu z příkrmu Kubik

Chromatogram na Obrázku 39 ukazuje přítomnost těchto fenolických látek: kyseliny gallové, kyseliny chlorogenové, epikatechinu, hesperidinu a floridzinu. Tyto látky byly detekovány pouze v komerčním produktu Kubík. V čase 17 minut je zachycen nízký peak floridzinu, který potvrzuje přítomnost jablečné složky (jakožto jablečný marker – viz kapitola 2.2.2). Další fenolické látky jako kyselina chlorogenová nebo epikatechin jsou typicky přítomny ve většině druhů ovoce [47]. Chromatogramy dalších vzorků (komerční produkty, domácí pyré a modelové směsi) jsou přiloženy v příloze.

Tabulka 16: Detekované fenolické látky pomocí HPLC (– nedetekováno, + detekováno)

Fenolická látka/ vzorek	kyselina gallová	kyselina chlorogenová	epikatechin	hesperidin	floridzin
příkrm Kubík	+	+	+	+	+
příkrm Babylove	–	–	–	–	–
příkrm Kojenecká výživa	–	–	–	–	–
jablečné pyré	–	–	–	–	–
broskvové pyré	–	–	–	–	–
banánové pyré	–	–	–	–	–
meruňkové pyré	–	–	–	–	–
replika Kubíka	–	–	–	–	–
replika Babylove	–	–	–	–	–
replika Kojenecké výživy	–	–	–	–	–

Jelikož jediné zachycené fenolické látky byly v extraktu z příkrmu Kubík (1 z 10 vzorků), a to v relativně malém množství, zvolený postup extrakce pravděpodobně nebyl ideální. Využitá metoda přípravy extraktů byla převzata od Stefova et al. a byla původně vyvinuta pro dužinu, slupku jablka a listy jabloně [1]. Pro extrakci fenolických látek z ovocných pyré se však tato metoda ukázala jako nevhodná.

6. ZÁVĚR

Předložená práce se zabývala detekcí jablečné složky v dětských ovocných příkrmech pomocí dvou přístupů, a to qPCR a HPLC.

Z odborných publikací bylo převzato pět párů primerů (FT MDP, MdFKBP42a, MdFKBP53a, MDP a MdFKBP65a), které byly podrobeny ověření funkčnosti, stanovení specifity a nakonec citlivosti. Závěrem byl vybrán pár primerů MdFKBP42a, který byl čistě specifický pro jablko a jeho citlivost dosahovala až 1 pg DNA z jablka. Tento pár primerů byl aplikován jak na tři vzorky komerčních produktů, tak na tři vzorky modelových směsí, které byly připraveny jako repliky zakoupených výrobků. Výsledky qPCR ukázaly, že vybraný pár primerů MdFKBP42a fungoval až nadstandardně. Poskytl stejné specifické produkty jak s DNA z modelových směsí, tak i s DNA z komerčních produktů, která byla pravděpodobně degradovaná vzhledem k dlouhodobému skladování, měla nízkou koncentraci a byla značně kontaminovaná. Z tohoto důvodu je qPCR za využití primerů MdFKBP42a vhodná k průkazu jablečné složky v ovocných pyré.

Instrumentální metodou v podobě HPLC s připravenými methanolvými extrakty ke stanovení specifické fenolické látky pro jablko, floridzinu, nebylo dosaženo vypovídajících výsledků. Vzhledem k nevhodně zvolené přípravě extraktů byl jablečný marker floridzin detekován pouze u jednoho komerčního produktu a u modelových směsí nikoli. Z důvodu časové tísně nedošlo k optimalizaci postupu. Vyšší koncentrace fenolických látek v extraktu by však mohlo být dosaženo změnou jednoho či více parametrů postupu extrakce, např. použitím většího množství ovocného pyré, prodloužením doby extrakce či zakoncentrováním extraktu odpařením methanolu do sucha a rozpuštěním získaného zbytku v menším objemu rozpouštědla.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] STEFOVA, Marina, Ana PETKOVSKA, Sonja UGARKOVIC a Jasmina PETERSKA STANOEVA. Strategy for optimized use of LC-MSn for determination of the polyphenolic profiles of apple peel, flesh and leaves. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2019, (12), 5180-5186 [cit. 2021-07-06]. ISSN 1878-5352. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.12.009>.
- [2] *Státní zemědělská a potravinářská inspekce* [online]. 2020 [cit. 2020-12-01]. Dostupné z: <https://www.szpi.gov.cz/>.
- [3] ČÍŽKOVÁ, H., R. ŠEVČÍK, A. RAJCHL a M. VOLDŘICH. Nutritional Quality of Commercial Fruit Baby Food. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. Praha, 2009(27), 134-137 [cit. 2021-07-27]. Dostupné z: <https://ukp.vscht.cz/files/uzel/0007349/Cizkova+2009.pdf?redirected>.
- [4] ČESKO. *Vyhláška č. 157/2003 Sb. ze dne 12. května 2003, kterou se stanoví požadavky pro čerstvé ovoce a čerstvou zeleninu, zpracované ovoce a zpracované vanou zeleninu, suché skořápkové plody, houby, brambory a výrobky z nich, jakož i další způsoby jejich označování*. In: . Sbíрка zákonů České republiky, ročník 2003.
- [5] BIGGS, Matthew, Jekka MCVICAR a Bob FLOWERDEW. *Velká kniha zeleniny, bylin a ovoce*. 1. vyd. Praha: Volvox Globator, 2004. ISBN 80-7207-537-3.
- [6] ŠAPIRO, David Kopelevič. *Ovoce a zelenina ve výživě člověka*. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1988. Rostlinná výroba (Státní zemědělské nakladatelství).
- [7] TAUFEROVÁ, Alexandra. *Technologie a hygiena potravin rostlinného původu I., II.* Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-692-6.
- [8] RICHTÁROVÁ, Eva. *S ovocem a zeleninou zdravěji*. [Ludgeřovice]: Pali, 2010. ISBN 978-80-87389-07-2.
- [9] KALACĚ, Pavel. *Funkční potraviny: kroky ke zdraví*. České Budějovice: Dona, 2003. ISBN 80-7322-029-6.
- [10] BUREŠ, Jan a Jiří HORÁČEK. *Základy vnitřního lékařství*. 1. vyd. Praha: Galén, 2003. ISBN 80-7262-208-0.
- [11] TLÁSKAL, Petr, Jarmila BLATTNÁ, Pavel DLOUHÝ, Jana DOSTÁLOVÁ, Ctibor PERLÍN, Jan PIVOŇKA, Václava KUNOVÁ a Olga ŠTIKOVÁ. *Výživa a potraviny pro zdraví*. Praha: Společnost pro výživu, z.s., 2016. ISBN 978-80-906659-0-3.
- [12] MLÍKOVSKÝ, Jiří a Petr STÝBLO, ed. *Nepůvodní druhy fauny a flóry České republiky*. Praha: ČSOP, 2006. ISBN 80-86770-17-6.
- [13] PREEDY, Victor a Monique SIMMONDS. *Nutritional composition of fruit cultivars*. Academic Press, 2016. ISBN 978-0-12-408117-8.
- [14] PATOCKA, Jiri, Kanchan BHARDWAJ, Blanka KLIMOVA et al. *Malus domestica: A Review on Nutritional Features, Chemical Composition, Traditional and Medicinal*

- Value. *Plants* [online]. 2020, **9**(11) [cit. 2020-11-30]. ISSN 2223-7747. Dostupné z: doi:10.3390/plants9111408.
- [15] HYSON, Dianne A. A Comprehensive Review of Apples and Apple Components and Their Relationship to Human Health. *Advances in Nutrition* [online]. 2011, **2**(5), 408-420 [cit. 2020-11-30]. ISSN 2161-8313. Dostupné z: doi:10.3945/an.111.000513.
- [16] JOHN, Maliyakal E. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Research* [online]. 1992, **20**(9) [cit. 2020-11-30]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/20.9.2381.
- [17] KUBÁŇ, Vlastimil a Petr KUBÁŇ. *Analýza potravin*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. ISBN 978-80-7375-036-7.
- [18] ČÍŽKOVÁ, H., R. ŠEVČÍK, A. RAJCHL, J. PIVOŇKA a M. VOLDŘICH. Trends in Food Authenticity and Detection of Food Adulteration. *Chemické listy*. Department of Food Preservation, Institute of Chemical Technology, Prague, 2012, **106**, 903-910.
- [19] DAVIS, Leonard, James BATTEY a Mark DIBNER. *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier, 1986. ISBN 978-0-444-01082-7.
- [20] ALBERTS, Bruce, Dennis BRAY, Alexander JOHNSON, Julian LEWIS, Martin RAFF, Keith ROBERTS a Peter WALTER. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Ilustroval Nigel ORME, přeložil Arnošt KOTYK, přeložil Bohumil BOUZEK, přeložil Pavel HOZÁK. Ústí nad Labem: Espero, 2001. ISBN 80-902906-0-4.
- [21] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. oprav. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 978-80-200-0600-4.
- [22] KLOUDA, Pavel. *Základy biochemie*. 2., přeprac. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2005. ISBN 80-86369-11-0.
- [23] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [24] ZVÁROVÁ, Jana a Ivan MAZURA. *Metody molekulární biologie a bioinformatiky*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2012. Biomedicínská informatika. ISBN 978-80-246-2150-0.
- [25] VARMA, Astha, Harish PADH a Neeta SHRIVASTAVA. Plant genomic DNA isolation: An art or a science. *Biotechnology Journal*. 2007, **2**(3), 386-392. Dostupné z: doi:10.1002/biot.200600195.
- [26] VONDREJS, Vladimír a Zuzana STORCHOVÁ. *Genové inženýrství*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1997-2003. ISBN 80-246-0586-4.
- [27] KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. Vyd. 1. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2007. ISBN 978-80-7013-450-4.
- [28] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. ISBN 978-80-214-4004-3.

- [29] RODGER, A. UV Absorbance Spectroscopy of Biological Macromolecules. *Encyclopedia of Biophysics*. Berlin: Springer, 2013, s. 2679-2718. ISBN 978-3-642-16711-9.
- [30] JOSHI, M. a J. DESHPANDE. POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION. *International Journal of Biomedical Research*. 2011, **2**(1), 81-97. Dostupné z :<https://doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83>.
- [31] MA, KS., Y. MA a F. CHIOU. Nanotechnology Applications in Polymerase Chain Reaction (PCR). *Encyclopedia of Nanotechnology*. Dordrecht: Springer, 2016, s. 2293-2983. ISBN 978-94-017-9779-5.
- [32] DRUML, Barbara a Margit CICHNA-MARKL. High resolution melting (HRM) analysis of DNA – Its role and potential in food analysis. *Food Chemistry* [online]. 2014, (158), 245-254 [cit. 2020-08-30]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814614002969>.
- [33] WINDER, Louise, Craig PHILLIPS, Nicky RICHARDS, Francisco OCHOA-CORONA, Scott HARDWICK, Cor VINK a Stephen GOLDSON. Evaluation of DNA melting analysis as a tool for species identification. *Methods in Ecology and Evolution* [online]. 2011, **2**(3), 312-320 [cit. 2021-02-10]. ISSN 2041210X. Dostupné z: doi:10.1111/j.2041-210X.2010.00079.x.
- [34] NIDHI, Avashia a Nidhi GARIBYAN. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013, **133**(3), 1-4. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>.
- [35] LEE, Pei, John COSTUMBRADO, Chih-Yuan HSU a Yong KIM. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2012, (62) [cit. 2020-08-30]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/3923.
- [36] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [37] PERTILE, Eva. *Instrumental methods of analysis*. 1st edition. Ostrava: VŠB - Technical University of Ostrava, 2017. ISBN 978-80-248-4124-3.
- [38] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [39] KARMEL, Annabel. *Vaříme pro kojence a batolata: 200 rychlých, snadných a zdravých receptů pro vaše dítě*. Olomouc: ANAG, 2007. ISBN 978-80-7263-417-0.
- [40] EliGene® Plant DNA Isolation Kit. *Elisabeth Pharmacon* [online]. Brno, 2015 [cit. 2021-07-05]. Dostupné z: <https://www.elisabeth.cz/produkt-eligene-plant-dna-isolation-extraction-kit.html>.
- [41] CHEN, Shilin, Hui YAO, Jianping HAN et al. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *PLoS ONE* [online]. 2010, **5**(1) [cit. 2020-11-10]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0008613
- [42] ZHANG, Songwen, Dong ZHANG, Sheng FAN et al. Effect of exogenous GA 3 and its inhibitor paclobutrazol on floral formation, endogenous hormones, and flowering-associated genes in 'Fuji' apple (*Malus domestica* Borkh.). *Plant Physiology and*

- Biochemistry* [online]. 2016, **107**, 178-186 [cit. 2021-07-09]. ISSN 09819428. Dostupné z: doi:10.1016/j.plaphy.2016.06.005.
- [43] DONG, Qinglong, Ke MAO, Dingyue DUAN et al. Genome-wide analyses of genes encoding FK506-binding proteins reveal their involvement in abiotic stress responses in apple. *BMC Genomics* [online]. 2018, **19**(1) [cit. 2021-07-12]. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/s12864-018-5097-8.
- [44] MA, Baiquan, Yangyang YUAN, Meng GAO, Libo XING, Cuiying LI, Mingjun LI a Fengwang MA. Genome-wide Identification, Classification, Molecular Evolution and Expression Analysis of Malate Dehydrogenases in Apple. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, **19**(11) [cit. 2021-07-12]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19113312.
- [45] MATLOCK, Brian. Assessment of Nucleic Acid Purity. *Thermo Fisher Scientific: Technical Note 52646* [online]. 2015 [cit. 2021-07-26]. Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>.
- [46] YAHIA, Elhadi M. *Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry and human health*. 2nd edition. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Ltd, 2018. ISBN 9781119157946.
- [47] MANACH, Claudine, Augustin SCALBERT, Christine MORAND, Christian RÉMÉSY a Liliana JIMÉNEZ. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. **2004**(79), 727–747 [cit. 2021-07-27]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

UV-VIS – ultrafialovo-viditelná (detekce/spektrometrie)

DNA – deoxyribonukleová kyselina

RNA – ribonukleová kyselina

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina (ethylenediaminetetraacetic acid)

SDS – dodecylsírán sodný (sodium dodecyl sulfate)

DTT – dithiotreitol

PVP – polyvinylpyrrolidon

PVPP – polyvinylpolypyrrolidon

NaCl – chlorid sodný

CTAB – cetrimoniumbromid

PCR – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

dNTP – deoxyribonukleotidtrifosfáty

dTTP – deoxythymidintrifosfát

dATP – deoxyadenosintrifosfát

dCTC – deoxycytidintrifosfát

dGTC – deoxyguanosintrifosfát

GC – vazba guanin–cytosin

qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce (quantitative polymerase chain reaction)

HRM – vysokorozlišovací analýza křivek tání (high resolution melt)

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)

PDA – detektor s diodovým polem (photodiode array)

PTFE – polytetrafluorethylen

Tris-báze – tris-hydroxymethyl-aminomethan

PK – pozitivní kontrola

NK – negativní kontrola

9. SEZNAM PŘÍLOH

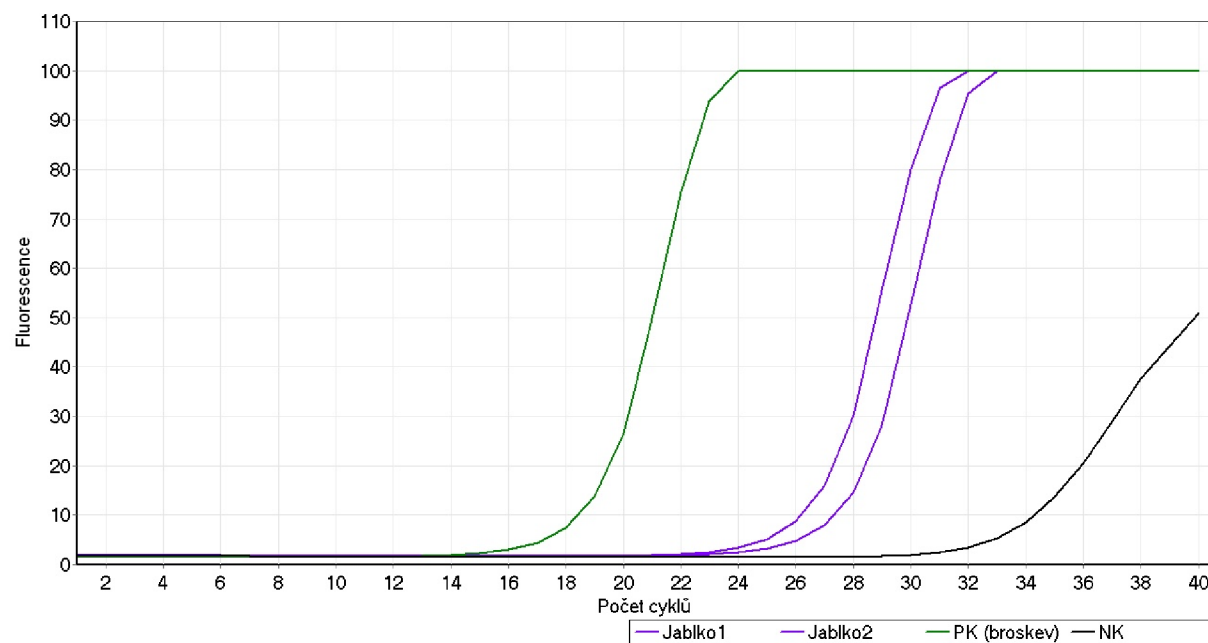
Příloha 1 – ověření amplifikovatelnosti DNA z jablka a maracuji

Příloha 2 – průkaz přítomnosti jablka v komerčních výrobcích a modelových směsích (souhrnné grafy)

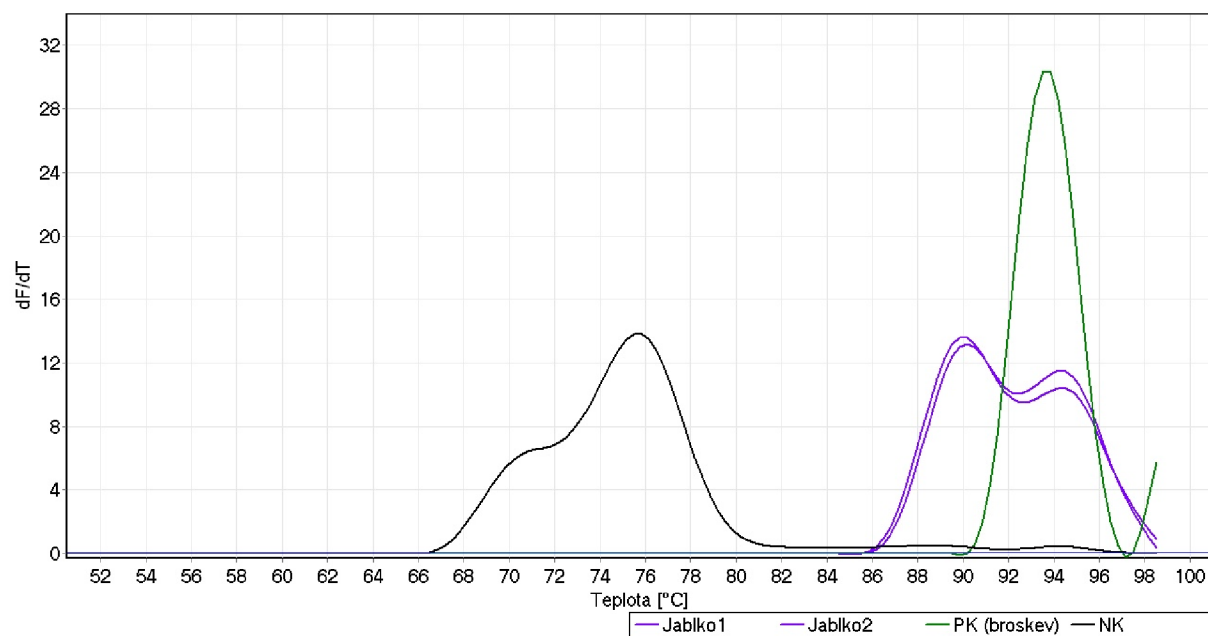
Příloha 3 – Stanovení fenolických látek pomocí HPLC

10. PŘÍLOHY

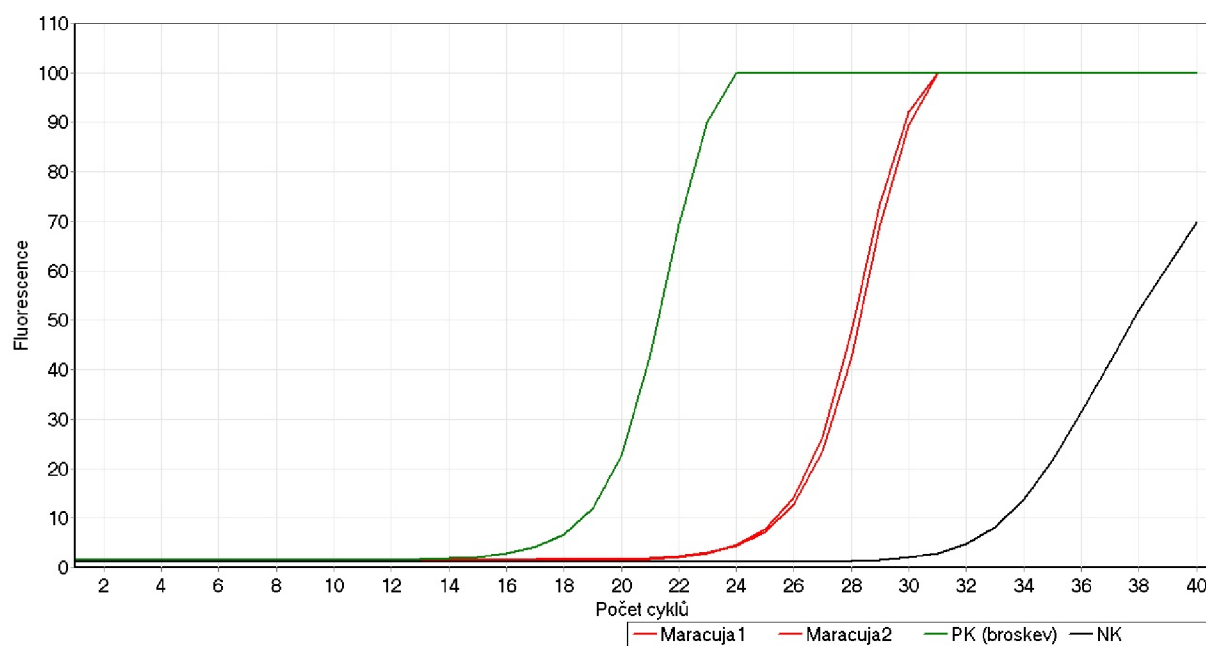
10.1. Příloha 1: Ověření amplifikovatelnosti DNA z jablka a maracuji



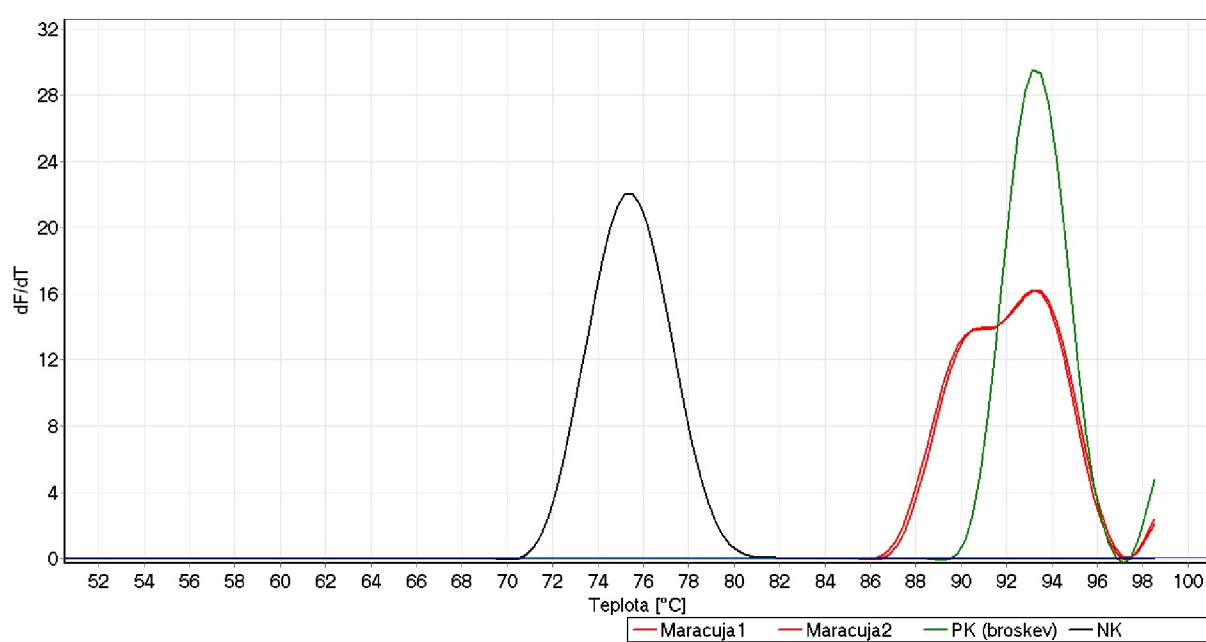
Obrázek 40: Amplifikační křivky DNA izolované z listu jablka



Obrázek 41: Křivky tání DNA izolované z listu jablka

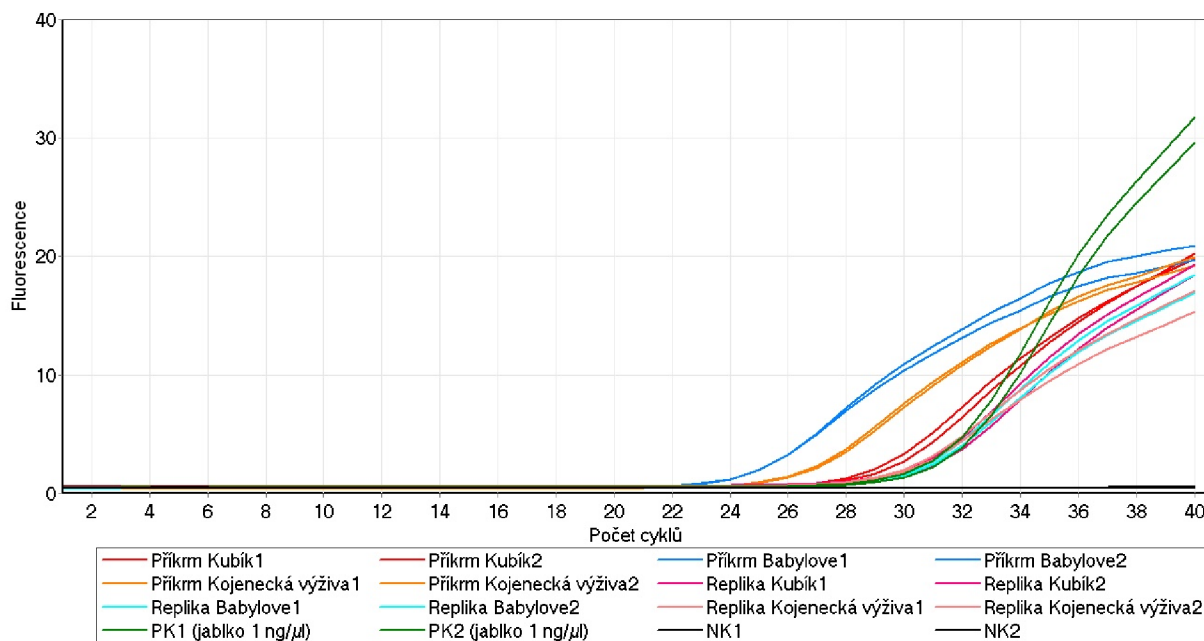


Obrázek 42: Amplifikační křivky DNA izolované z dužiny maracuji

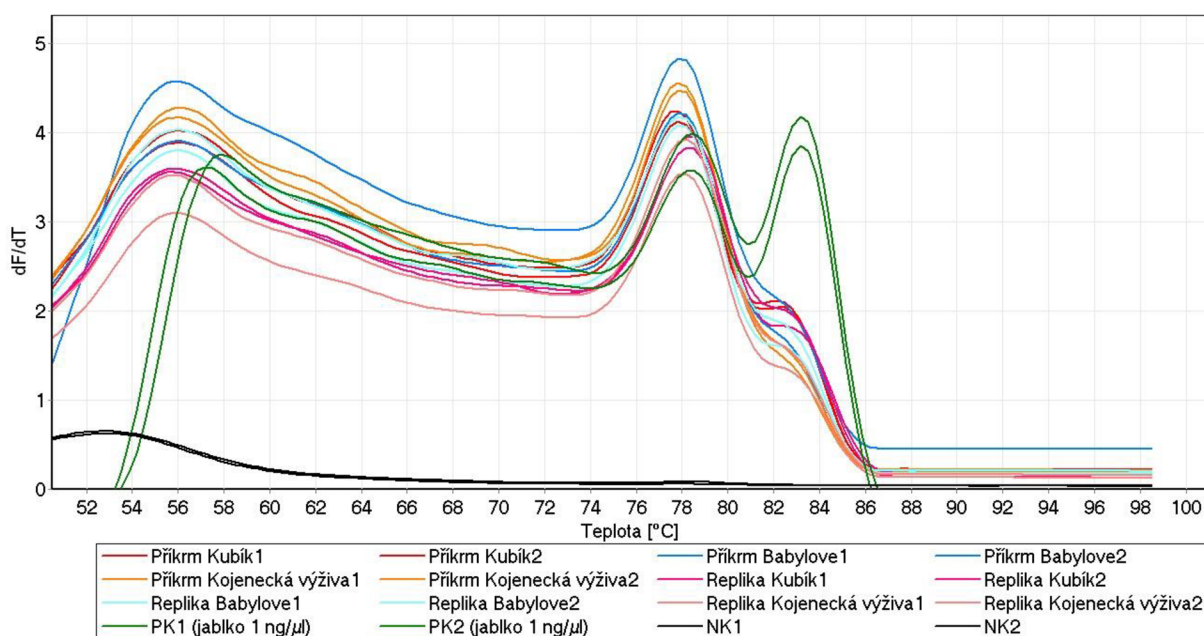


Obrázek 43: Křivky tání DNA izolované z dužiny maracuji

10.2. Příloha 2: Průkaz přítomnosti jablka v komerčních výrobcích a modelových směsích (souhrnné grafy)

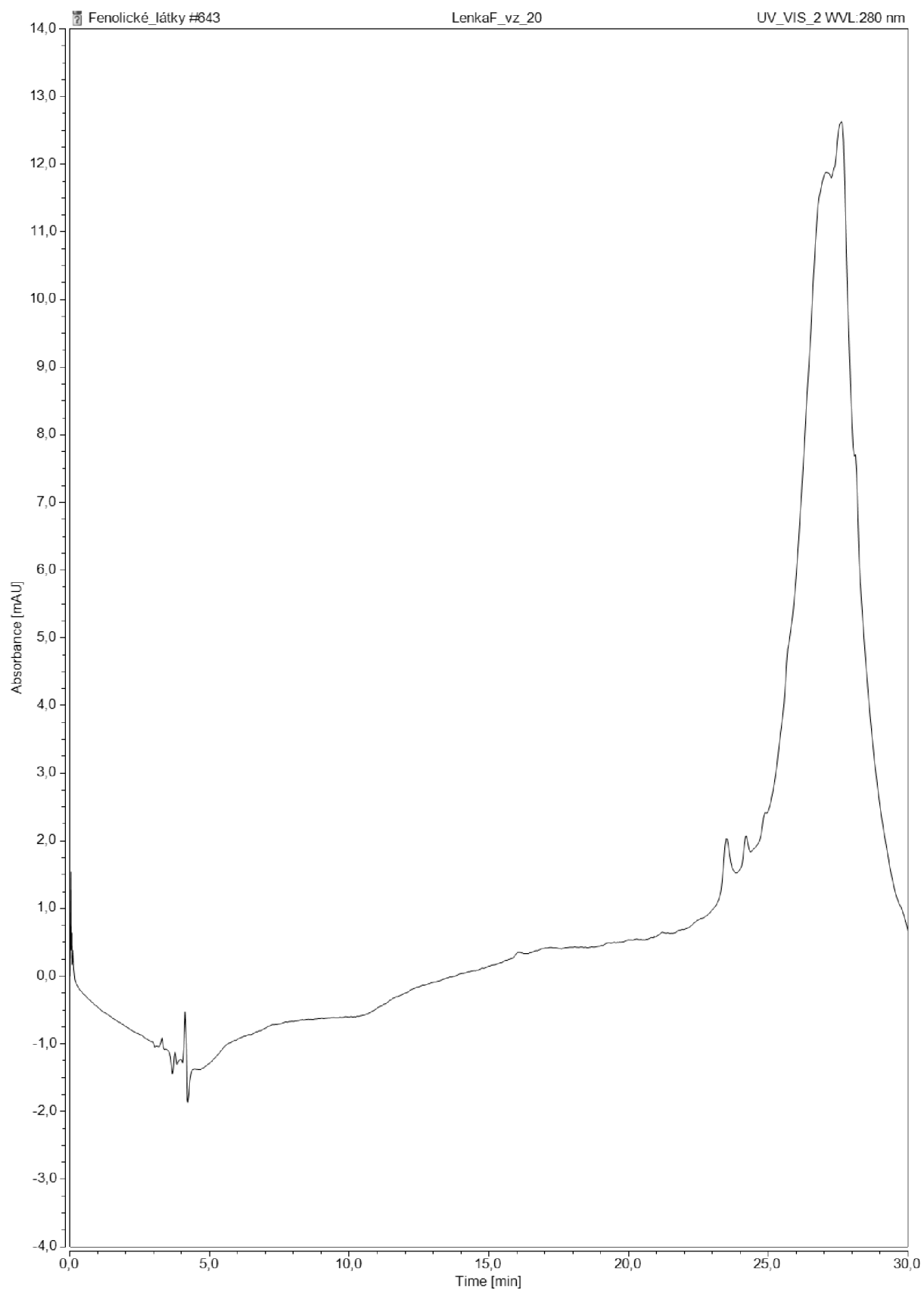


Obrázek 44: Amplifikační křivky vzorků k průkazu přítomnosti jablka

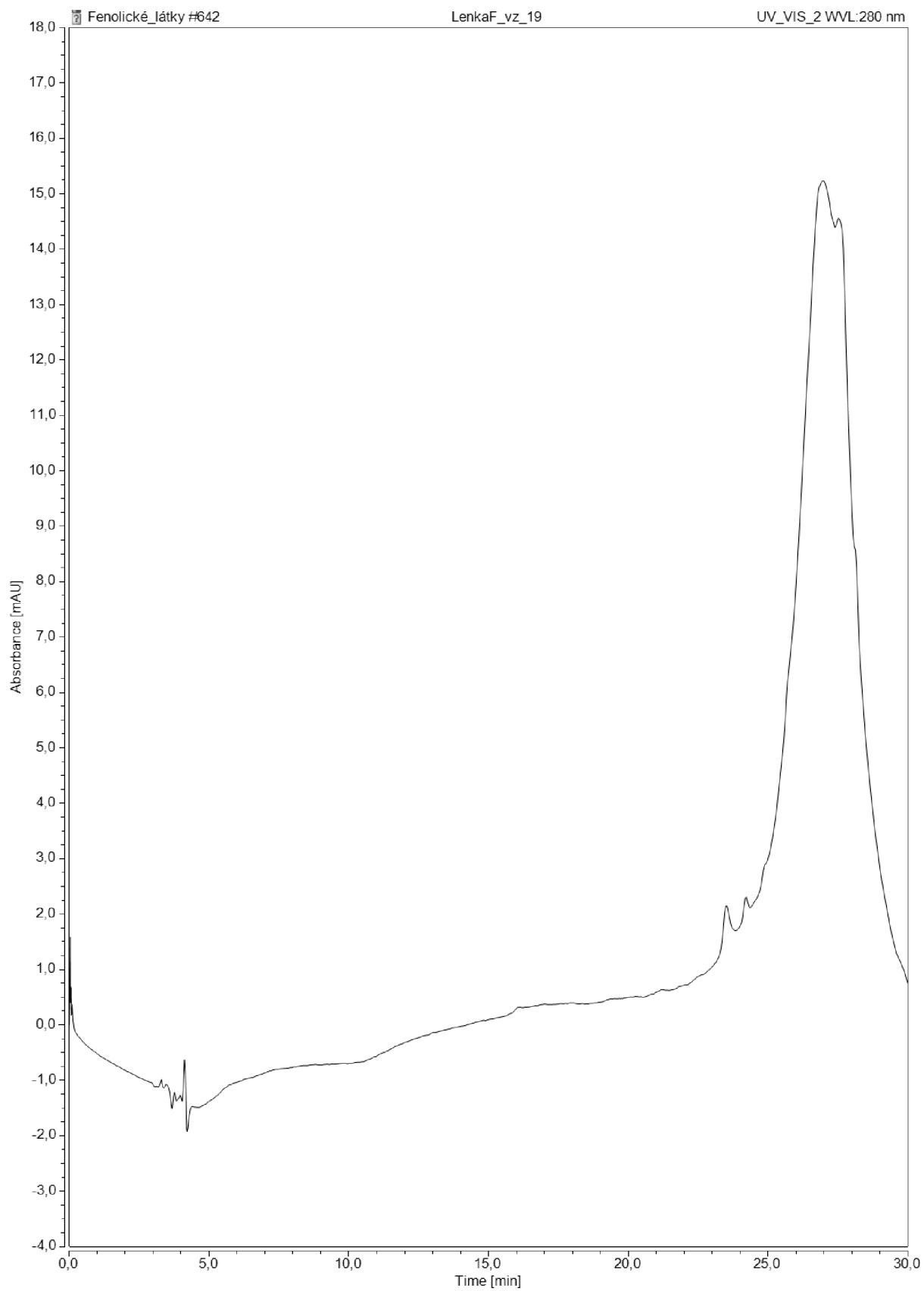


Obrázek 45: Křivky tání vzorků k průkazu přítomnosti jablka

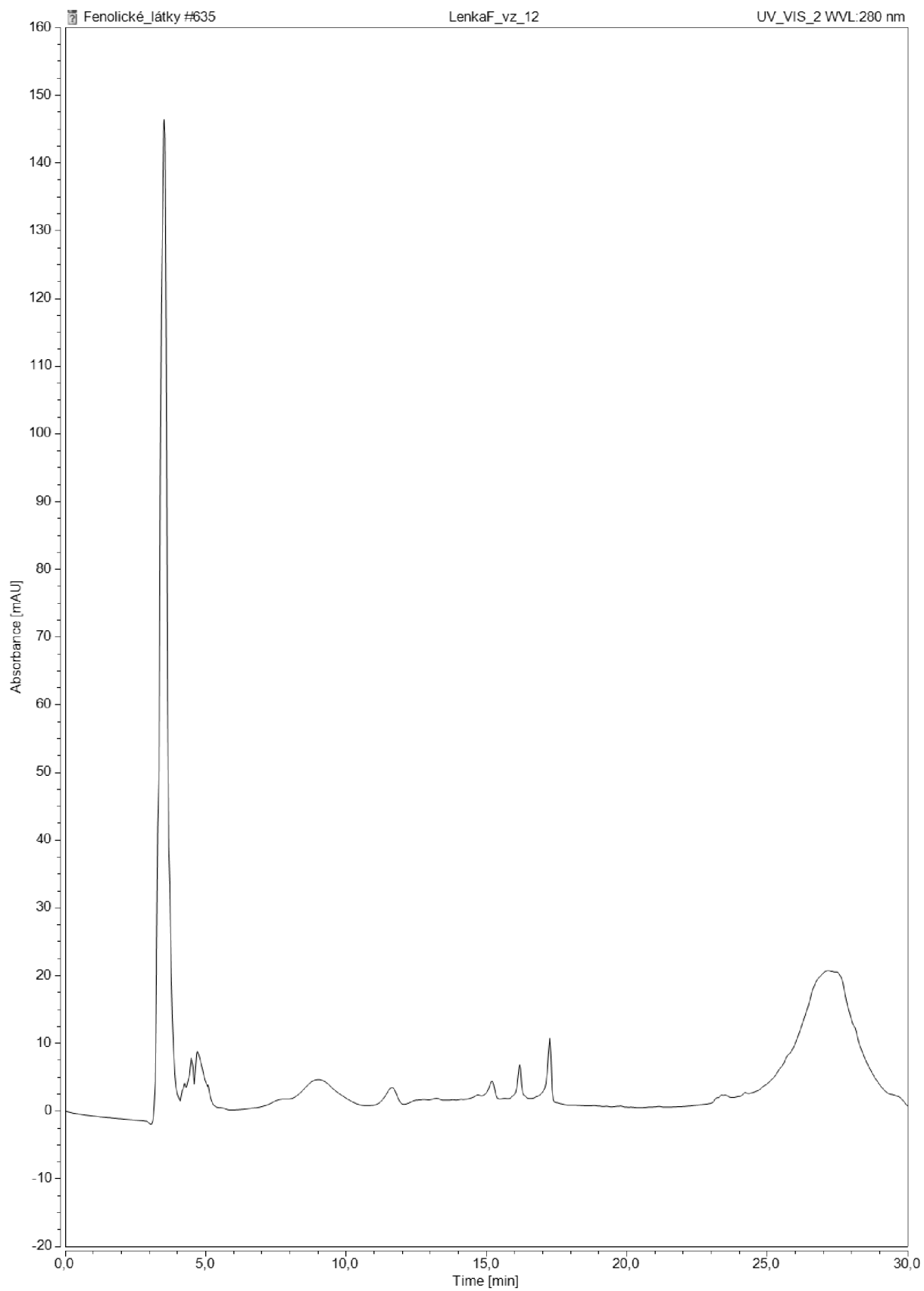
10.3. Příloha 3: Stanovení fenolických látek v ovocných pyré pomocí HPLC



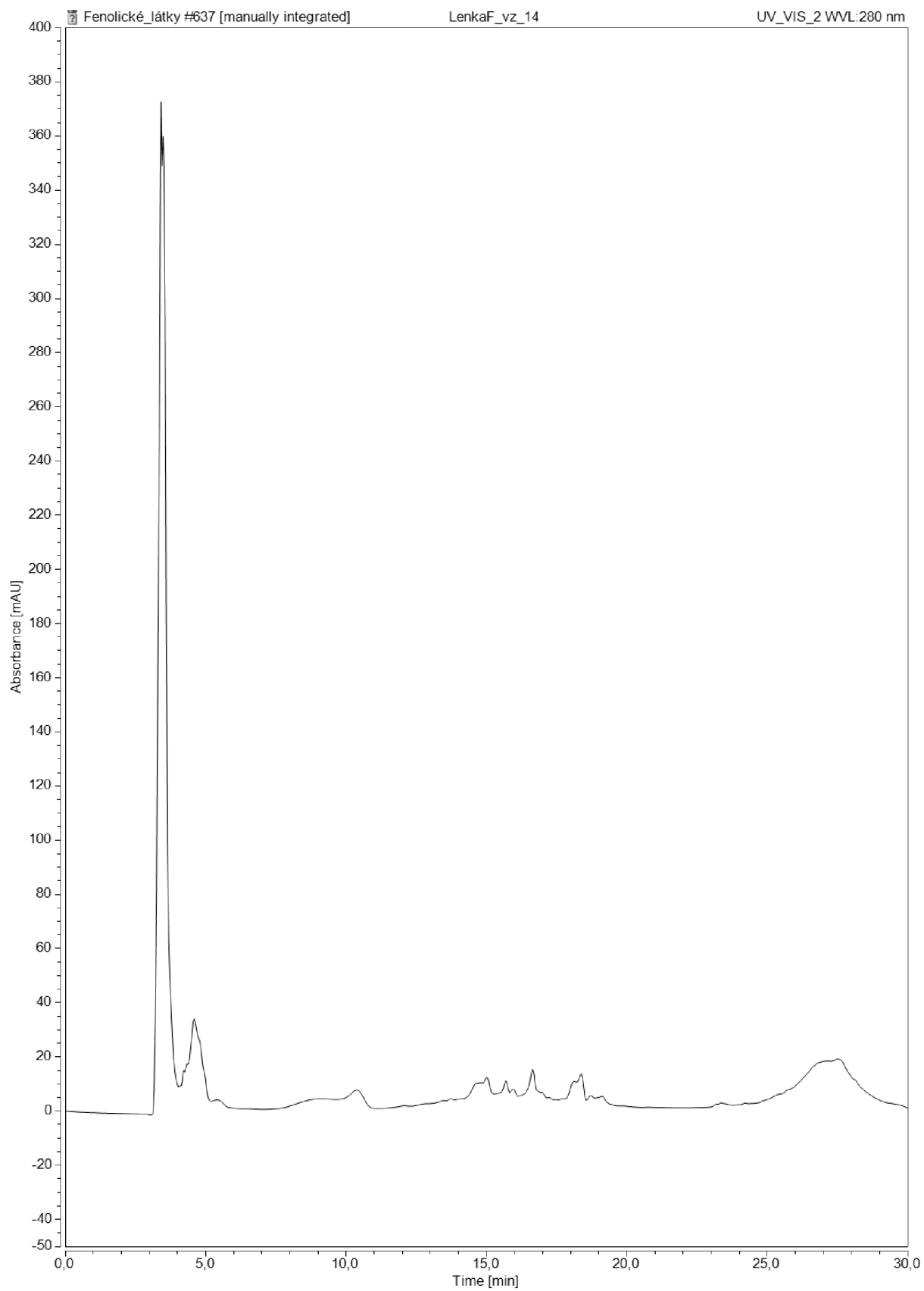
Obrázek 46: Chromatogram fenolických látek v extraktu z příkrmu Babylove



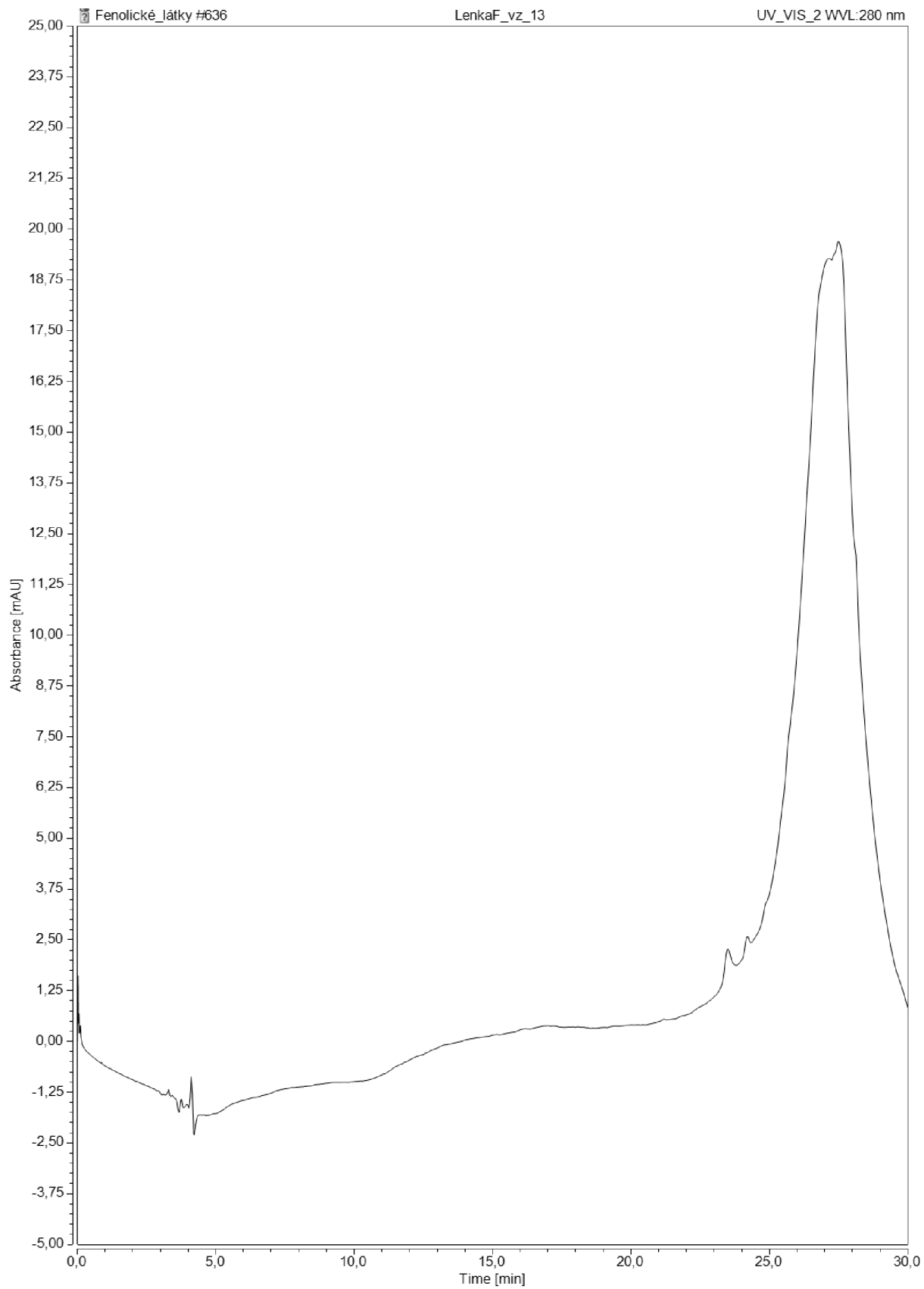
Obrázek 47: Chromatogram fenolických látek v extraktu z příkrmu Kojenecká výživa



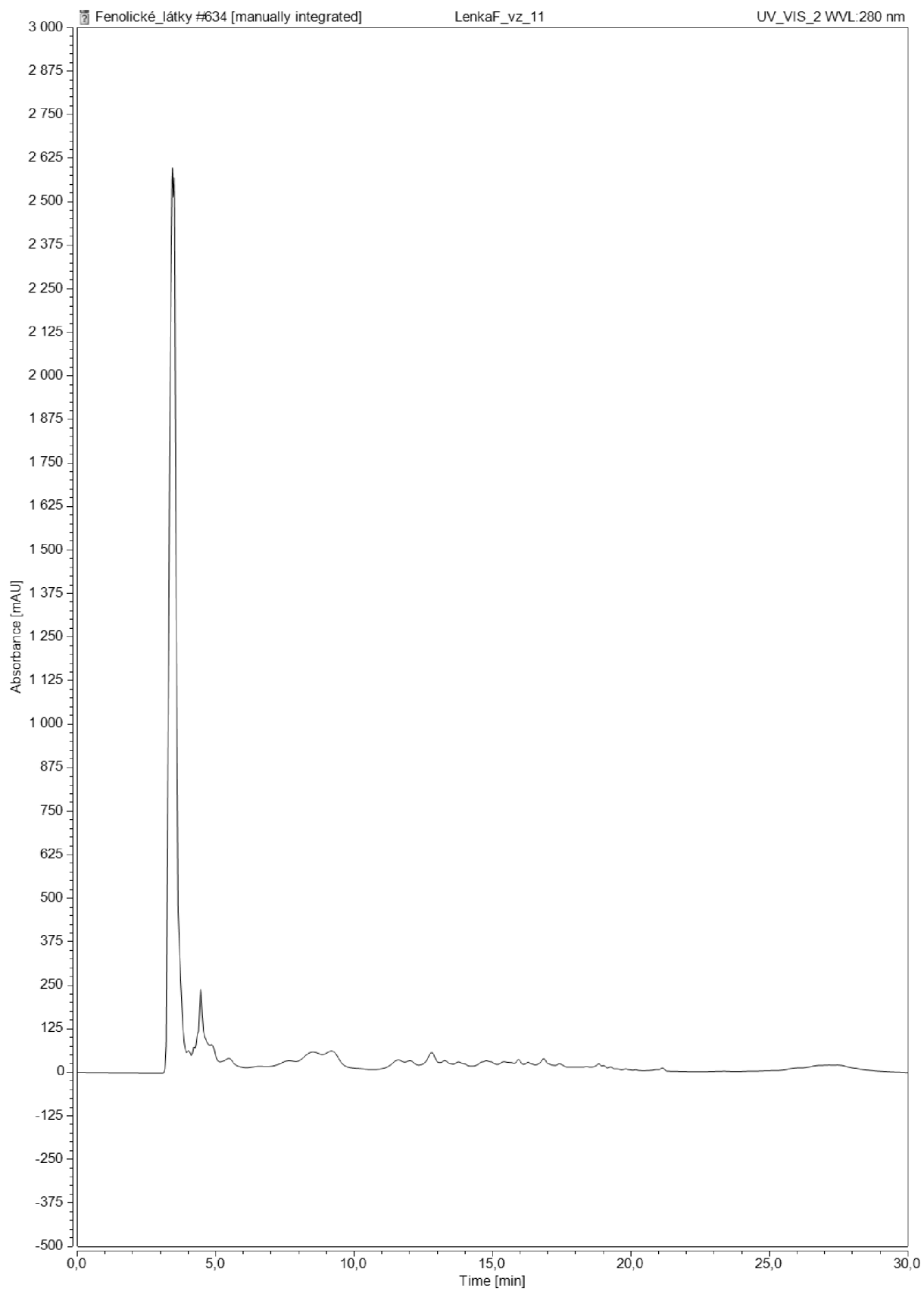
Obrázek 48: Chromatogram fenolických látek v extraktu z domácího jablečného pyré



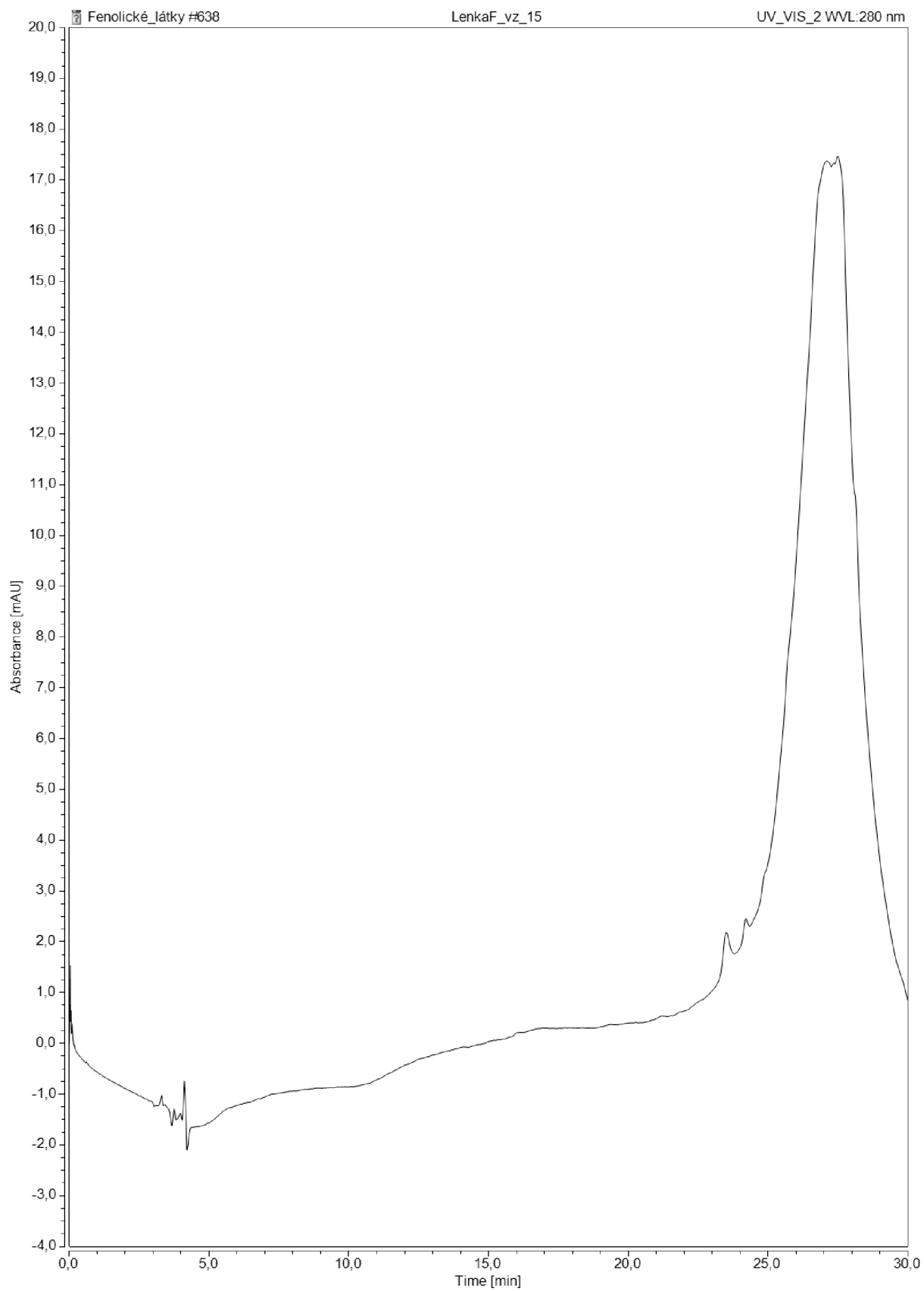
Obrázek 49: Chromatogram fenolických látek v extraktu z domácího broskvového pyré



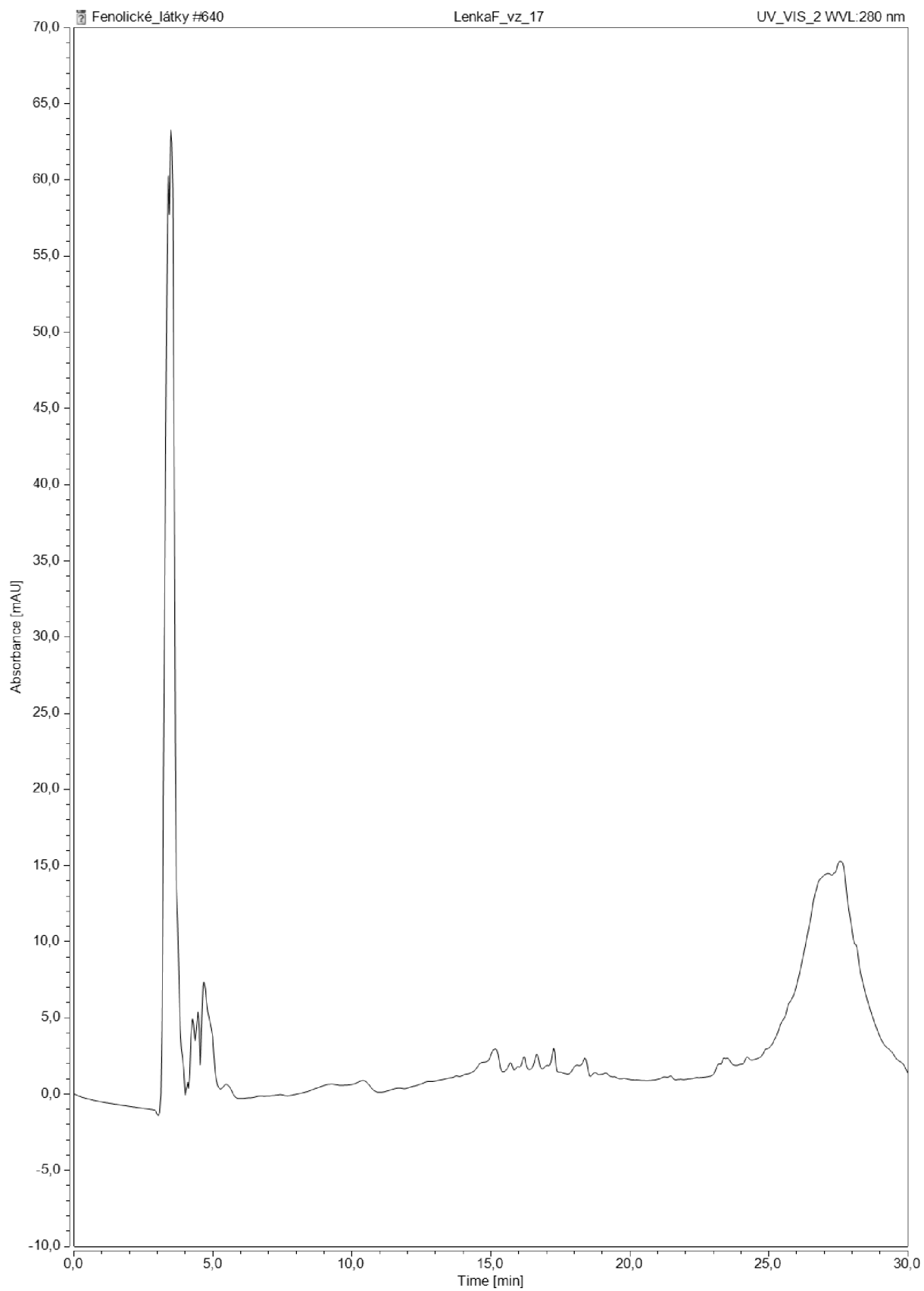
Obrázek 50: Chromatogram fenolických látek v extraktu z domácího banánového pyré



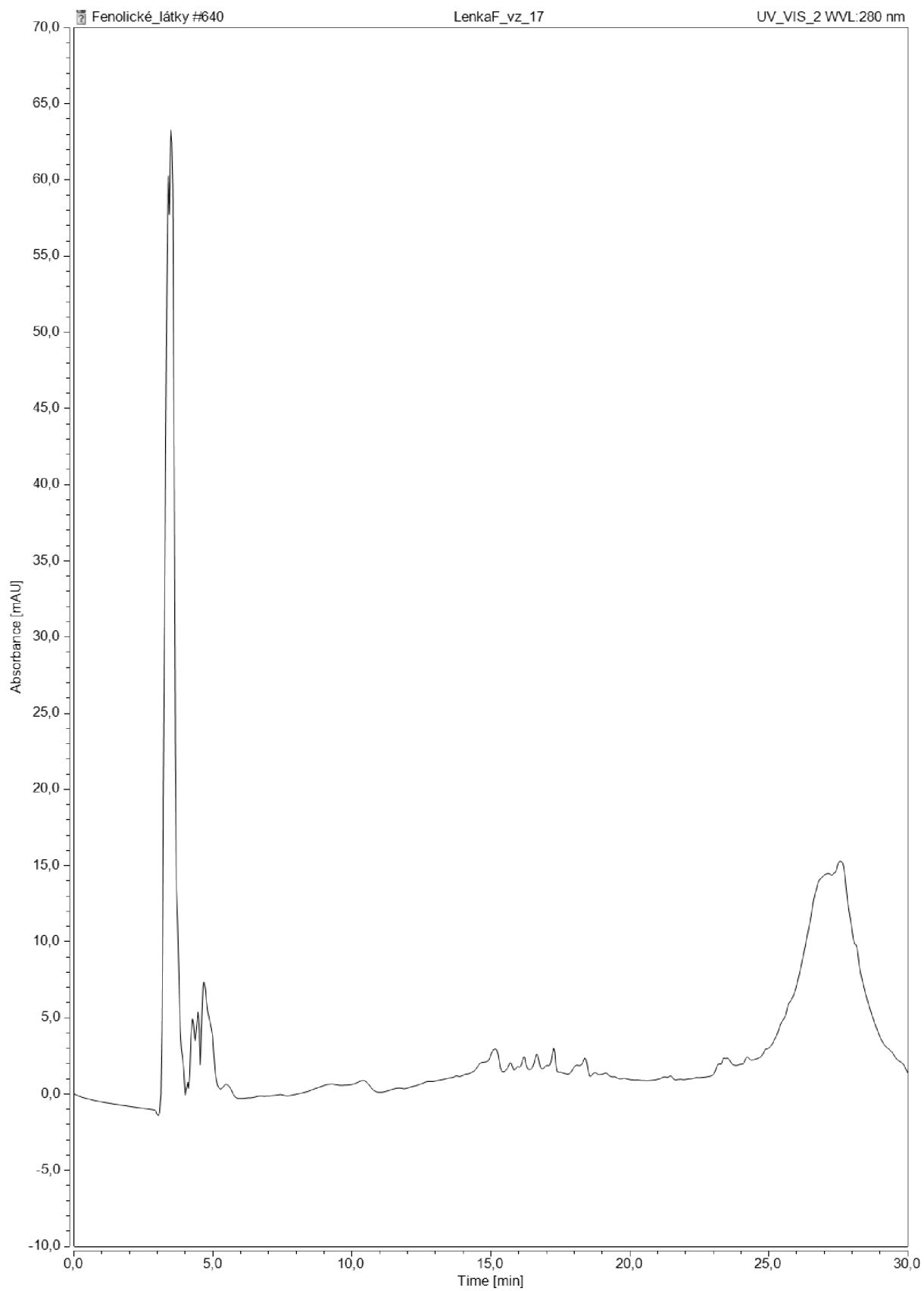
Obrázek 51: Chromatogram fenolických látek v extraktu z domácího meruňkového pyré



Obrázek 52: Chromatogram fenolických látek v extraktu z repliky Kubika



Obrázek 53: Chromatogram fenolických látek v extraktu z repliky Babylove



Obrázek 54: Chromatogram fenolických látek v extraktu z repliky Kojenecké výživy