



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

**CHARAKTERIZACE ROSTLINNÉ SLOŽKY VYBRANÝCH
POTRAVIN POMOCÍ TECHNIK MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE
A INSTRUMENTÁLNÍCH METOD**

CHARACTERIZATION OF PLANT-BASED COMPONENT OF SELECTED FOODSTUFFS USING
TECHNIQUES OF MOLECULAR BIOLOGY AND INSTRUMENTAL METHODS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Martin Tomíšek

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1452/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Bc. Martin Tomíšek**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

Název diplomové práce:

Charakterizace rostlinné složky vybraných potravin pomocí technik molekulární biologie a instrumentálních metod

Zadání diplomové práce:

Cíle práce:

- 1) Literární rešerše
- 2) Izolace DNA z rostlinného materiálu různými metodami, výběr nejvhodnější metody
- 3) Identifikace rostlinné DNA izolované z vybraných potravin
- 4) Charakterizace rostlinné složky vybraných potravin pomocí instrumentálních metod
- 5) Vyhodnocení a diskuse výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 31.7.2020:

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

Bc. Martin Tomíšek
student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt:

Cílem diplomové práce bylo srovnání hodnocení autenticity potravinářských výrobků s ovocnou složkou pomocí instrumentálních a molekulárních metod. Konkrétně byla prokazována přítomnost borůvek ve vybraných komerčně dostupných potravinách. Teoretická část je zaměřena na charakterizaci, chemické složení a botanické zařazení borůvek (borůvka evropská, borůvka kanadská), a na přehled instrumentálních a molekulárně diagnostických metod, které pro analýzu těchto plodů lze použít.

Experimentální část se zaměřuje na výběr vhodné metody izolace DNA a vhodných primerů pro molekulární důkaz borůvek v komerčních výrobcích. Analýza DNA byla provedena pomocí metody qPCR a HRM analýzy. DNA byla izolována v dostatečné kvalitě pro PCR a dále byla prokázána přítomnost borůvek u vybraných výrobků metodou qPCR. Pomocí HRM analýzy bylo možné odlišit borůvku evropskou (*Vaccinium myrtillus*) od borůvky kanadské (*Vaccinium corymbosum*), jak v kontrolních vzorcích, tak i ve vybraných komerčních výrobcích. Dále byly kapalinovou chromatografií detekovány určité fenolické kyseliny a některé flavonoidy specifické pro borůvky a spektrofotometricky byl stanoven celkový obsah polyfenolů a flavonoidů.

Abstract:

The aim of this work was to compare authenticity analysis in selected food products with fruit component by using, instrumental and molecular methods. Particularly, the presence of blueberries in fruit-based foodstuffs was verified. The theoretical part is focused on the characterization, chemical composition and botanical classification of blueberries (European blueberry and Canadian blueberry). It also contains an overview of instrumental and molecular diagnostic methods that can be used for the analysis of these fruits.

The experimental part focuses on the selection of a suitable method of DNA isolation, and primers for the detection of blueberries in commercial products. DNA analysis was performed by qPCR and HRM analysis. In the experimental part, DNA was isolated in sufficient quality for PCR and the presence of blueberries in foodstuffs was verified by qPCR. Using HRM analysis, we were able to differentiate between bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and blueberry (*Vaccinium corymbosum*) in control samples and in some commercial products. Certain phenolic acids and some flavonoids specific for blueberries were detected by HPLC. The total content of polyphenols and flavonoids was determined by UV / VIS spectrophotometry.

Klíčová slova:

Borůvka kanadská, Borůvka evropská, qPCR, HRM analýza, polyfenoly, fenolické sloučeniny, HPLC, UV/VIS spektrometrie

Key Words:

Blueberry, Bilberry, qPCR, qPCR-HRM, polyphenols phenolic compounds, HPLC, UV/VIS spectrophotometry

TOMÍŠEK, Martin. *Charakterizace rostlinné složky vybraných potravin pomocí technik molekulární biologie a instrumentálních metod*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/124234>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Tímto bych velmi rád poděkoval vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. a konzultantce Ing. Lence Fialové za odborné vedení, ochotu, čas a cenné rady při zpracování této diplomové práce.

Obsah

1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 Falšování potravin	8
2.1.1 Možnosti falšování potravin a jejich detekce	8
2.2 Borůvky	9
2.2.1 Borůvka evropská (<i>Vaccinium myrtillus</i>)	9
2.2.2 Borůvka kanadská (<i>Vaccinium corymbosum</i>)	10
2.3 Využití v potravinářství	11
2.4 Chemické složení plodů a listů borůvek	11
2.4.1 Aromatické a těkavé sloučeniny	11
2.4.2 Vitamíny	11
2.4.3 Minerální látky	12
2.4.4 Fenolické sloučeniny	12
2.5 Metody pro detekci chemických látek v ovoci a rozlišení jednotlivých druhů ovoce. 18	
2.5.1 UV/VIS spektrofotometrie	18
2.5.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	18
2.5.3 Hmotnostní spektrometrie (MS)	19
2.5.4 Polymerasová řetězová reakce (PCR)	20
3 CÍL PRÁCE	25
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
4.1 Rostlinný materiál a vybrané potraviny	26
4.2 Vybavení laboratoře	27
4.2.1 Přístroje a vybavení	27
4.2.2 Chemikálie	27
4.2.3 Komerční kity pro izolaci DNA	28
4.3 Metody	28
4.3.1 Izolace rostlinné DNA s využitím CTAB protokolu	28
4.3.2 Izolace rostlinné DNA pomocí komerčních izolačních kitů	29
4.3.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA	29
4.3.4 Příprava reakční směsi pro PCR a průběh reakce	29
4.3.5 Příprava agarózového gelu	30
4.3.6 Elektroforéza DNA fragmentů	30
4.3.7 Příprava extraktů pro analýzu instrumentálními metodami	31
4.3.8 Příprava extraktů pro HPLC a jejich analýza	31
4.3.9 Spektrofotometrické stanovení celkového obsahu fenolických látek	32
4.3.10 Spektrofotometrické stanovení celkového obsahu flavonoidů	32
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	33

5.1	Využití instrumentálních metod ke stanovení autenticity výrobků s obsahem borůvek	33
5.1.1	Spektrofotometrické stanovení celkových polyfenolů a flavonoidů.....	33
5.1.2	Vyhodnocení výsledků HPLC analýzy	35
5.2	Využití molekulárně diagnostických metod ke stanovení autenticity výrobků s obsahem borůvek.....	39
5.2.1	Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA.....	39
5.2.2	Výsledky qPCR a analýzy křivek tání za použití primerů ITS 2	41
5.2.3	Elektroforéza qPCR produktů borůvky evropské a borůvky kanadské po ověření amplifikovatelnosti s primery ITS 2.....	43
5.2.4	Elektroforéza produktů qPCR u komerčních výrobků s primery ITS 2	44
5.2.5	Výběr specifických primerů pro detekci borůvek ve vybraných komerčních vzorcích potravin s ovocnou složkou	45
5.2.6	Elektroforéza produktů qPCR s primery BHLH 1 a BHLH 3.....	49
5.2.7	Výsledky HRM analýzy DNA izolátů z borůvek a komerčních výrobků s ovocnou složkou.....	52
6	ZÁVĚR	55
7	ZDROJE:	57
8	PŘÍLOHY:	61

1 ÚVOD

V současné době je velkým trendem starat se o své zdraví a dodržovat zdravou životosprávu. Proto se konzumenti snaží do svého jídelníčku zařadit více výživově hodnotných potravin, které mají vysoký obsah vitamínů, minerálů, vlákniny a antioxidantů. Výborným zdrojem těchto látek je čerstvé ovoce a zelenina. Proto je kvalita, bezpečnost a analýza potravin stále důležitým společenským tématem.

V dnešní době vzrůstá počet civilizačních chorob, které souvisí s působením volných radikálů. Stoupá také snaha konzumentů ochraňovat organismus před jejich nadměrnou tvorbou. K eliminaci volných radikálů přispívá konzumace exogenních antioxidantů, které se nacházejí snad ve všech druzích ovoce včetně borůvek.

Rod *Vaccinium* sestává asi ze 450 druhů. Do tohoto rodu patří především borůvky, brusinky a klikvy, z nichž většina je široce rozšířena v subtropických a mírných pásech severní polokoule. Plody těchto druhů jsou relativně malé a vyznačují se masitou dužinou. Mají vysoký obsah antioxidantů (fenolické látky, flavonoidy, taniny), ovocných barviv (antokyany a karotenoidy), vitamínů (kyselina askorbová), cukrů (glukóza, fruktóza a galaktóza) a minerálů [1].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Falšování potravin

Falšování potravin je problém, který je znám od doby kdy se potraviny začaly vyrábět za účelem prodeje. Napříč historií se tedy lze setkat s nejrůznějšími druhy falšování potravin. Problémem falšování potravin a s tím spojenou kontrolou autenticity potravin se zabývá a kontroluje Státní zemědělská a potravinářská inspekce. Postupy falšování potravin se zásadně nemění a vychází z úpravy legislativy nebo změnou cen vstupních surovin na trhu. Hlavním důvodem, proč výrobci falšují potraviny je především ekonomický profit. S případným falšováním tedy lze nejvíce počítat u drahých potravin a potravin jako jsou lihoviny, víno, koření a některé druhy masných výrobků nebo u potravin prodávaných ve velkých objemech, jako oleje a tuky, ovocné šťávy, masné výrobky. Nejčastěji se tedy setkáváme například se záměnou dražších druhů ovoce za levnější. Typické může být použití jablečného pyré místo jahod nebo použití jablečné šťávy místo dražších šťáv. S tímto problémem se pojí další falšování potravin, jako jsou různé nápoje, nektary a ovocné šťávy, které se nastavují vodou, různými cukry, kyselinami a barvivy. Dále se lze setkat s nepovoleným nebo nedeklarovaným přibarvováním například u výrobků z červeného ovoce. V poslední řadě se můžeme setkat s klamáním spotřebitele, kdy výrobce uvádí vyšší obsah dané suroviny ve výrobku, než odpovídá skutečnosti, nebo používá etikety a označení, které neodpovídají jejímu složení, geografickému původu, způsobu výroby (označování obvyklé produkce za bio) nebo zneužívá známou značku.

Na rozdíl od minulých století, kdy nebyly výjimkou případy otravy spotřebitelů v důsledku falšování potravin, se v dnešní době setkáváme spíše s podváděním spotřebitele, který za stanovenou cenu nedostane produkt odpovídající kvality. I přesto se však objevilo několik případů, které vedly k vážným újmám na zdraví zákazníků. Například velmi často zmiňovaný, dnes již i zfilmovaný příklad je falšování lihovin pomocí přídavku methanolu z roku 2012, který si vyžádal několik úmrtí a řadu konzumentů s doživotními následky [2][3].

2.1.1 Možnosti falšování potravin a jejich detekce

Detekce falšovaných potravin je obecně spjata s faktem, že můžeme určitou analytickou metodou detekovat charakteristické látky, které pochází z použitých surovin, a jejich množství obsažené v analyzovaných potravinách. V potravinách se setkáme nejčastěji se špatně deklarovaným množstvím dané suroviny nebo použitím levnější složky. To může být například nedeklarované množství strojně odstraněného masa, které lze detekovat na základě obsahu vápníku ve výrobku, nedeklarované křehčení masa, které touto výrobní technologií bude mít vyšší podíl vody, kyseliny citronové a polyfosfátů pro zvýšení vaznosti masa. Nedeklarované křehčení masa však lze poznat již při kulinářské úpravě. Dalšími případy jsou například ředění vína, vydávání zahraničního vína za moravské, nepovolené používání barviv. U medu se pak můžeme setkat s doslazováním, použitím barviv, vydáváním zahraničního medu za český. U džemů a marmelád se nejčastěji setkáme s nahrazením dražšího ovoce levnějším, nejčastěji jsou tyto výrobky falšovány přidáním jablečné složky [2].

U kakaa a čokolády byly zjištěny případy přimíchání sacharózy, karobu nebo pomletých skořápek plodů kakaovníku. Dalším způsobem, jak falšovat výrobky z kakaa a jeho produktů, je použití jiného tuku než kakaového másla. Dalšími typy falšování mohou být záměny odrůd jablek, brambor nebo rýže [2].

Mezi hlavní analytické techniky využívané pro odhalování falšování potravin patří spektrofotometrické metody, kapalinová a plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie a v neposlední řadě molekulárně diagnostické metody, které v posledních deseti letech prodělaly velký pokrok. Náklady na analýzu DNA jsou podobné nákladům na hojně využívané chromatografické postupy pro testování pravosti potravin. Molekuly DNA jsou velmi stabilní, podléhají sice určitému stupni degradace na menší fragmenty, nicméně tyto fragmenty jsou stále analyzovatelné. DNA je stabilní i při nejtěžších podmínkách zpracování potravin, ty zahrnují vysoký tlak, teplotu a chemické zpracování. Metody založené na analýze DNA hrají stále větší roli při kontrole bezpečnosti potravin a detekci falšování potravin. Umožňují detekovat a charakterizovat patogenní mikroorganismy, což je celosvětový zdravotní problém, který způsobuje miliony případů onemocnění každý rok. Dalším použitím může být detekce rostlinných složek v mléčných a masných výrobcích [4] [5].

2.2 Borůvky

2.2.1 Borůvka evropská (*Vaccinium myrtillus*)

Jedná se o léčivou rostlinu z rodu brusnice. Odborně se nazývá brusnice borůvka a spadá do řádu vřesovcotvaré (*Ericales*), čeledi vřesovcovité (*Ericaceae*), rodu brusnice (*Vaccinium*). Borůvka je hustě rozvětvený, nízký keř s opadavými listy. Listy jsou okrouhlé a střídavě uspořádané, lysé s krátkými řapíky. Oproti tomu květ je stopkatý a objevuje se od dubna do června v závislosti na nadmořské výšce a podnebí. Květy mají světle zelenou korunu a zakrnělý kalich. Plodem těchto rostlin jsou borůvky, které mají modrou až tmavěfialovou barvu, a to jak slupku, tak i dužninu. V bobuli nalezneme mnoho drobných semen.

Borůvka tvoří kompaktní porost téměř ve všech typech lesů, rašeliništích, vřesovištích a pasekách. Je rozšířena v podstatě po celém mírném podnebném pásu severní polokoule. Původně pochází ze severní Evropy, ale dnes se vyskytuje také v Severní Americe a Asii. Preferuje spíše acidofilní půdy, humózní a s dostatečnou vlhkostí. Půda nemusí být bohatá na živiny pro růst této rostliny, proto je velmi rozšířena. Borůvkový keř s plody zobrazuje Obrázek 1 [6] [7].



Obrázek 1 Keř s plody evropské borůvky [8].

2.2.2 Borůvka kanadská (*Vaccinium corymbosum*)

Jedná se o rostlinu z čeledi vřesovcovitých. Pochází ze Severní Ameriky, v Evropě zdomácněla a je hojně pěstovaná. Kanadská borůvka je opadavý keř, který dorůstá do výšky až 2,5 m, s eliptickými listy a stopkatými květy v hroznovitém květenství. Barva květu je bílá až růžová a kvete od dubna do června. Plody jsou modré až fialové. Vyžaduje slabě kyselou půdu v rozmezí pH 4,5–5,5. Oblastí přirozeného výskytu jsou vlhké lesy, louky a rašeliniště ve východní části Severní Ameriky [9].

Od počátku 20. století byla šlechtěna a je známa celá řada odrůd. Samosprašné jsou jen některé odrůdy. Jednotlivé odrůdy se od sebe liší velikostí plodů a mírně i v jejich chuti. Odrůdy kanadských borůvek můžeme orientačně rozlišit podle doby dozrávání plodů na odrůdy rané (plody dozrávají od konce června do poloviny července) a pozdní (plody dozrávají v polovině srpna až do konce září). Mezi rané odrůdy patří např. Bluetta, Duke, Chanticleer, Darrow nebo Bluecrop, mezi pozdní pak Elliot, Chandler [10]. Mezi borůvkou kanadskou a borůvkou evropskou nalezneme značné množství rozdílů. Co se týče morfologické stránky, je borůvka kanadská značně větší keř, má také větší listy i plody než její evropská verze. Dalším rozdílem je barva dužniny plodů, která je u kanadské verze bílá a u evropské modrá až fialová. Kanadská varianta se více využívá pro komerční pěstování, přestože je náročnější na živiny, je při správném pěstování jeden keř schopen vyprodukovat až 5 kg ovoce za sezónu. Další výhodou je velikost plodů a jejich lepší skladovatelnost. Keř s plody zobrazuje Obrázek 2 [7] [11].



Obrázek 2 Keř s plody kanadské borůvky [12].

2.3 Využití v potravinářství

Borůvky jsou v potravinářství velmi hojně používané ovoce. Jsou konzumovány jak v čerstvé, tak i v průmyslově zpracované formě. Přibližně 45 % roční úrody se prodá jako čerstvé ovoce a 55 % produkce se průmyslově zpracovává. Krátká skladovatelnost je častým problémem, který omezuje dostupnost a spotřebu. Borůvky mají poměrně rychlou sklizňovou sezónu. Při kontrolovaných atmosférických podmínkách mohou být skladovány přibližně 1 až 2 měsíce, proto je důležité plody po sklizni co nejrychleji zpracovat. Při normálních podmínkách plody rychle měknou, hořknou a jsou náchylné na plesnivění.

Borůvky se dlouhodobě uchovávají ve zmraženém nebo sušeném stavu, kde se využívá sušení horkým vzduchem nebo lyofilizace. Pro konzervaci se také používá balení v upravené atmosféře. UV záření a použití oxidu siřičitého se používá především k posklizňové konzervaci, eliminaci posklizňového poškození a eliminaci mikroorganismů. Mezi nejčastěji vyráběné produkty z borůvek patří džemy, ovocné želé, džusy, zavařeniny, jogurty a mléčné výrobky, sladké pečivo a cukrovinky, nebo se v sušené podobě využívají především k přípravě čajů a do sypkých ovocných směsí např. müsli [6] [14] [15].

2.4 Chemické složení plodů a listů borůvek

Obecně jsou bobuloviny známé jako významný zdroj vitamínů a dalších biologicky aktivních látek (BAL), a to minerálů, vlákniny, sacharidů, karotenoidů, fytochemikálií a fenolických látek, které se využívají ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu. Mezi jednotlivými druhy borůvek existují významné rozdíly v obsahu BAL, s čímž souvisí i antioxidační kapacita. Z cukrů obsahují borůvky především fruktózu a glukózu, z karotenoidů především lutein a β -karoten. Obsah fenolických sloučenin je ovlivněn do značné míry stupněm zralosti při sklizni, pěstitelskými postupy, místem pěstování a environmentálními podmínkami [14].

Během zrání borůvek dochází k fenolové konverzi na syntézu antokyaninů, což vede k celkovému snížení obsahu jiných fenolových sloučenin. Různé metody skladování mají také vliv na obsah BAL. Z těchto prací by se dalo dojít k závěru, že sušení horkým vzduchem má negativnější účinek na antokyany než blanšírování nebo zmražení [16] [17]. Další práce pojednává o využití specifického složení fenolických látek pro určení jejich geografického původu [3].

2.4.1 Aromatické a těkavé sloučeniny

Vůně je jednou z hlavních charakteristik ovlivňujících kvalitu čerstvého nebo zpracovaného ovoce. Rovněž rovnováha kyselin a cukrů souvisí s chutí ovoce. Těkavé sloučeniny odpovědné za vůni ovoce jsou syntetizovány prostřednictvím metabolických drah během zrání, sklizně a skladování, a výrobní technologií při zpracování ovoce [6]. Podle práce [18] kde byly zkoumány aromatické látky v norských borůvkách pomocí GC/MS, se v borůvkách hojně vyskytuje 2-hexanon, (Z)-3-hexenylacetát, nonanal, decanal, 1,8-cineol.

2.4.2 Vitamíny

Je známo, že vitamíny jsou důležitou složkou ovoce. Jedná se o organické sloučeniny, které svou přítomností ovlivňují nebo umožňují metabolické procesy v organismech. Vitamíny jsou nepostradatelnou součástí stravy a jejich nedostatek vede k vážným onemocněním a může končit i smrtí organismu. Proto je nezbytné dbát na jejich pravidelný přísun v dostatečném množství [18].

Vitamíny se z pravidla rozdělují podle rozpustnosti, a to na rozpustné ve vodě (vitamíny skupiny B, vitamín C a H) a na vitamíny rozpustné v tucích (vitamín A, D, E, K). Obecně jsou tyto sloučeniny náchylné k degradaci při tepelném zpracování a jejich množství se tepelnou úpravou snižuje [16]. Bobuloviny obecně obsahují velké množství vitamínu A, C, E a komplex vitamínu B. Jsou také považovány za významný zdroj antioxidantů. Plody borůvek se řadí mezi plodiny s vysokým obsahem vitamínu C, i když jeho koncentrace se v plodech pohybuje v širokých intervalech 10–100 mg na 100 g čerstvé váhy. Obsah vitamínů je opět určován řadou faktorů od druhu odrůdy, environmentálních podmínek, zralosti, skladování apod. [14] [19].

2.4.3 Minerální látky

Většina bobulovin je bohatá také na biogenní prvky a další elementy, které jsou důležité pro lidský organismus. Hlavními prvky, které se v plodech vyskytují, jsou fosfor, draslík, vápník, hořčík, železo, mangan a sodík. Tyto hlavní a stopové minerální prvky se podílejí na důležitých biochemických procesech a ovlivňují nejrůznější metabolické reakce v lidském organismu. Obsah minerálních látek ve vybraných plodech zobrazuje Tabulka 1 [16].

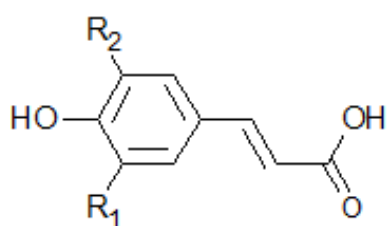
Tabulka 1 Množství minerálních látek v plodech vybraných bobulovin (mg/ 100g čerstvé váhy) [16].

	Ca	Mg	Fe	P	K	Na	Zn	Mn
Borůvka	15–35	6–10	0,15– 0,60	10–15	56–80	0,11– 0,22	0,06– 0,12	1,20– 3,90
Brusinka	3–5	3–7	0,16– 0,40	1–4	24–30	4–6	0,02– 0,04	0,1–0,3
Ostružina	20–30	17–20	1–2	25–30	100– 150	2–4	1,2–2,6	0,02– 0,04
Černý rybíz	35–45	15–18	1,3–2,5	35–40	300– 320	1,7–2,5	0,25– 0,31	0,35– 0,52

2.4.4 Fenolické sloučeniny

Fenolické sloučeniny, které jsou v rostlinách všudypřítomné, jsou velmi zajímavé a v posledních letech se jim díky jejich bioaktivním funkcím dostává stále větší pozornosti. Fenolické látky patří mezi nejžádanější fytochemikálie díky své antioxidační aktivitě. Tyto složky jsou známy jako sekundární rostlinné metabolity a mají také antimikrobiální, antivirové a protizánětlivé vlastnosti s vysokou antioxidační kapacitou. Tyto sloučeniny mají aromatický kruh nesoucí jednu nebo více hydroxylových skupin a jejich struktura se může pohybovat od struktury jednoduché fenolové molekuly po strukturu komplexního vysokomolekulárního polymeru. Mimo jiné mohou působit jako fytoalexiny, antifedanty, atraktanty pro opylovače a ochranné látky proti UV záření. Díky těmto bioaktivním vlastnostem hrají tyto sloučeniny důležitou roli v růstu a reprodukci rostlin a poskytují také účinnou ochranu proti patogenům a rostlinným škůdcům. Fenolické látky mají mnoho průmyslových aplikací. Používají se jako přírodní barviva a konzervační látky v potravinářském průmyslu nebo na výrobu barev, papíru a při výrobě kosmetiky [15] [16] [20].

Jak již bylo zmíněno výše, jsou tyto látky produkty sekundárního metabolismu a vznikají jen malým počtem několika základních biogenetických drah (šikimátová a polyketidová biosyntetická dráha), které vedou k omezenému počtu klíčových meziproduktů [17]. Dalšími enzymatickými transformacemi vzniká velmi široká a komplexní skupina látek. Ty zahrnují látky od jednoduchých fenolických molekul, až k vysoce polymerizovaným sloučeninám s molekulární hmotností větší než 30 kDa, jako jsou tanniny. Základními zástupci fenolových kyselin jsou kyselina benzoová a kyselina skořicová a jejich deriváty. Derivátů těchto kyselin je velké množství, od kyseliny benzoové to jsou například kyselina gallová, p-hydroxybenzoová, protokatechová, salicylová, vanillová a syringová kyselina. Od kyseliny skořicové pak kyselina p-kumarová, kávová, ferulová a chlorogenová. Strukturní vzorce vybraných fenolových sloučenin zobrazuje Obrázek 3 [9].



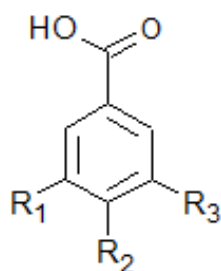
Deriváty kyseliny hydroxyskořicové:

Kyselina p-kumarová $R_1, R_2 = H$

Kyselina kávová $R_1 = OH; R_2 = H$

Kyselina ferulová $R_1 = OCH_3; R_2 = H$

Kyselina sinapová $R_1, R_2 = OCH_3$



Deriváty kyseliny benzoové:

Kyselina gallová $R_1, R_2, R_3 = OH$

Kyselina p-hydroxybenzoová $R_1, R_3 = H; R_2 = OH$

Kyselina protokatechová $R_1 = H; R_2, R_3 = OH$

Kyselina vanillová $R_1 = H; R_2 = OH; R_3 = OCH_3$

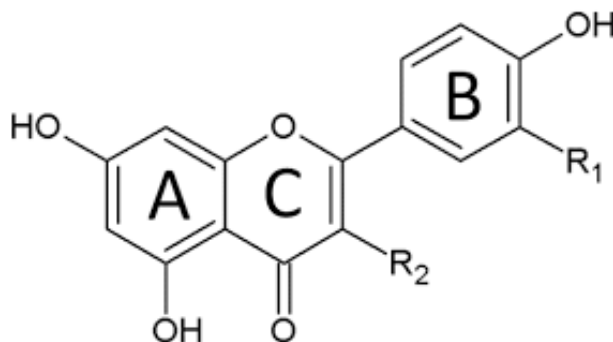
Kyselina syringová $R_1, R_3 = OCH_3; R_2 = OH$

Obrázek 3 Chemické struktury fenolických kyselin a jejich derivátů upraveno [9].

2.4.4.1 Flavonoidy

Flavonoidy tvoří jednu z nejpočetnějších skupin rostlinných patnáctiuhlíkatých fenolických látek. Patří sem antokyany, flavanoly, flavanony, flavonoly, flavonony, isoflavony katechiny a 3,4-flavandioly [21]. Jsou přítomny téměř ve všech druzích rostlin a jejich částech: listech, květech, oddencích, slupkách plodů, semenech a kůře. Díky tomu jsou nedílnou součástí výrobků rostlinného původu. Bývají účinnou složkou v převážné většině rostlinných léčivých preparátů s antialergickým, antibakteriálním, protizánětlivým, virostatickým, protinádorovým a vazodilatačním účinkem. Flavonoidy mají v rostlinách funkční roli jako barevné atraktanty pro ptáky a hmyz a jako buněčné nosné látky. Dále jsou důležitými antioxidanty díky svému vysokému redoxnímu potenciálu, který jim umožňuje působit jako redukční činidla nebo donory vodíku. Mají také chelatační potenciál [15] [20].

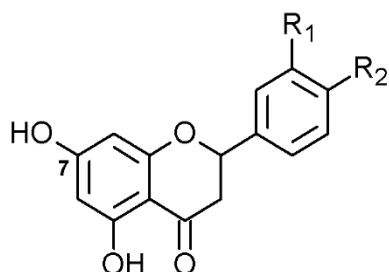
Struktura se v podstatě skládá ze dvou aromatických kruhů, A a B a heterocyklického kruhu C. Aromatický kruh A je odvozen od biochemické polyketidové cesty acetát/malonát. Kruh B je odvozen od fenylalaninu přes šikimátovou dráhu. Hlavní třídy flavonoidů se dělí podle substituentů na kruhu C. Substituce na kruzích A a B vedou ke vzniku různorodých sloučenin v každé třídě flavonoidů. Tyto substituce mohou zahrnovat alkylaci, glykosylaci, sulfonaci, acylaci a oxygenaci [6] [20]. Obecnou strukturu flavonoidů uvádí Obrázek 4.



Obrázek 4 Obecná struktura flavonoidů [22]

- **Flavanony:**

Sloučeniny této skupiny jsou obvykle glykosylovány disacharidem, nejčastěji rutinózou nebo neohesperidózou v poloze C7. Struktura flavanonů je zobrazena na Obrázku 5. Ve vysokých koncentracích je nalezneme pouze v citrusových plodech, jahodách, malinách a švestkách. Jsou obsaženy také v některých aromatických rostlinách jako je máta, rozmarýn. Hlavními zástupci jsou naringenin, hesperidin, neohesperidin, hesperetin, eriodictyol a eriocitrin [9] [20]. Deriváty těchto sloučenin se hojně využívají jako náhradní sladidla, např.: neohesperidin dihydrochalkon. V EU byl schválen v roce 1994 jako náhradní syntetické sladidlo a nalezneme ho pod zkratkou E959. V USA se ovšem označuje jako zvýrazňovač chuti. Jedná se o látku označovanou jako GRAS („Generally Recognized as Safe“), je syntetizován z naringinu nebo neohesperidinu reakcí se silnou zásadou (10–25% NaOH nebo KOH) v nadbytku izovanilínu a následnou katalytickou hydrogenací. Oproti ostatním sladidlům (aspartam, sacharin, cyklamát nebo alkoholické cukry) vykazuje silný synergický účinek, čili zesiluje chuť ostatních sladidel. Další výhodou například proti aspartamu je jeho vyšší stabilita vůči teplotě a zásaditým nebo kyselým podmínkám [23] [24] [25].



Flavanony:

Naringenin $R_1 = H$; $R_2 = OH$

Eriodictyol $R_1, R_2 = OH$

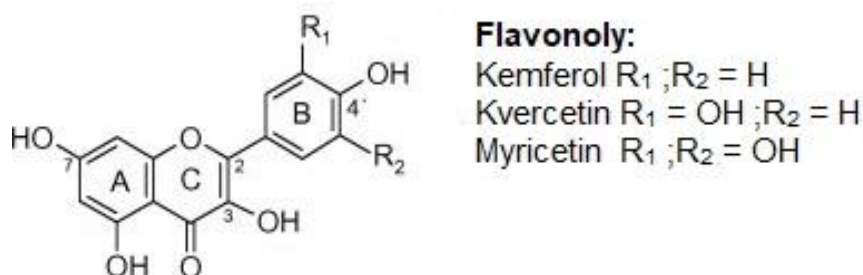
Hesperetin $R_1 = OH$; $R_2 = OCH_3$

Obrázek 5 Chemická struktura flavanonů [26].

- **Flavonoly:**

Struktura flavonolů a jeho vybraných derivátů je uvedena na Obrázku 6. Flavonoly jsou v ovoci zastoupeny v relativně nízkých koncentracích, 15–30 mg.kg⁻¹ čerstvé hmotnosti. Flavonoly se akumulují ve vnějších částech rostlinných tkání (slupka, listy), neboť jejich syntéza je stimulována světlem. V závislosti na expozici slunečnímu záření existují znatelné rozdíly v jejich obsahu u jednotlivých druhů rostlin.

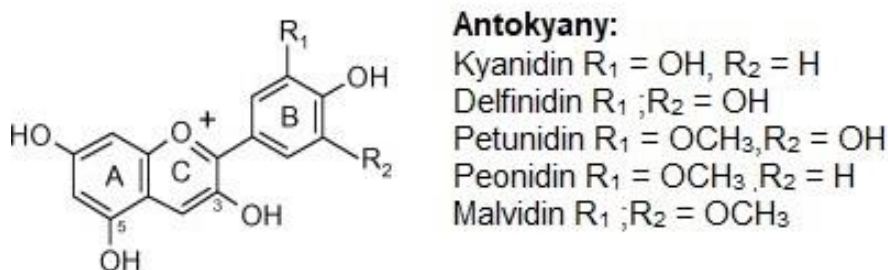
Nejbohatšími zdroji jsou česnek (až 1,2 g.kg⁻¹ čerstvé hmotnosti), pór, brokolice, borůvky a jablka. Nejznámějšími aglykony jsou kvercetin, kaempferol a myricetin. Ve větším množství se flavonoly a jejich glykosidy nachází v čaji a tím významně přispívají k trpké chuti čaje. Dále se hojně vyskytují ve víně. Kvercetin je všudypřítomný v ovoci a zelenině a je nejvíce zastoupen v rostlinné stravě. Kaempferol se nachází převážně v listové zelenině a ovoci. Myricetin najdeme v bobulích, kukuřici a čaji [9] [26].



Obrázek 6 Struktura flavonolů a její deriváty [4]

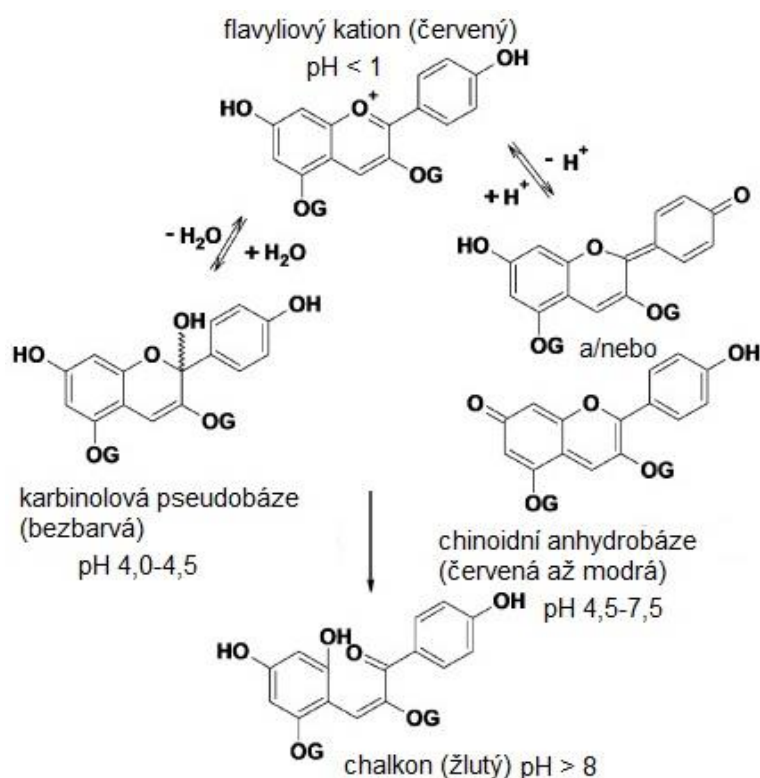
- **Antokyany:**

V rostlinách se vyskytuje nejčastěji šest antokyanů a to: pelargonidin, kyanidin, peonidin, delphinidin, petunidin a malvidin, jejich strukturu uvádí Obrázek 7. Antokyany jsou ve vodě rozpustné pigmenty různých aglykonů, které mění svoji barvu v závislosti na pH. V kyselém prostředí se jeví jako červené, při zvyšování pH se jejich barva mění přes fialovou až na sytě modrou barvu. O změně pigmentace v závislosti na pH pojednává Obrázek 8. Vyskytují se ve všech rostlinných tkáních (listy, stonky, kořeny, plody) v buněčných vakuolách. Sacharidovým substituentem nejčastěji vázaným na antokyany jsou monosacharidy a v borůvkových extraktech jsou to nejčastější tři typy cukrů (glukóza, galaktóza a arabinóza) [11] [27].



Obrázek 7 Chemická struktura antokyanů a vybrané deriváty [9]

Mnoho antokyanů má také zbytky cukru acylované aromatickými nebo alifatickými kyselinami. Izolované antokyany jsou poměrně nestabilní a jsou náchylné k degradaci. Jejich stabilitu ovlivňuje zejména pH, skladovací teplota, UV záření, kyslík, přítomnost enzymů apod. Disponují také antioxidační aktivitou, která je závislá zejména na počtu a uspořádání hydroxylových a metoxylových skupin a dále na přítomnosti a druhu dalších substituentů [24]. Obsah antokyanů v rostlinách také závisí na faktorech, jako je množství slunečního záření, teplota a složení půdního substrátu, především na koncentraci dusíku a fosforu v půdě. Antokyany se nalézají především v bobulovinách, plodech modrých odrůd révy vinné, jahodách, borůvkách, brusinkách apod. Dále v některých druzích listové a kořenové zeleniny (červené zelí, fazole, lilek baklažán, cibule a ředkvička). Antokyanová barviva byla povolena v potravinářském průmyslu k barvení potravin. Jejich toxicita a mutagenita nebyla prokázána nebo byla velmi nízká [10] [11] [21] [26].



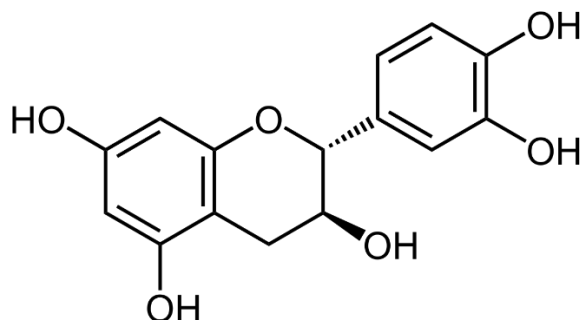
Obrázek 8 Změny pigmentace antokyaninů v závislosti na pH [4]

- **Flavanoly:**

Flavanoly existují jako monomery (katechiny) a polymery (proanthokyanidiny). Katechiny, jehož strukturu zobrazuje Obrázek 9, se nalézají v mnoha druzích ovoce, ale jsou také zastoupeny v révovém víně. Zelený čaj a čokoláda však představují zdaleka jejich nejbohatší zdroj. Šálek odvaru ze zeleného čaje obsahuje až 200 mg katechinů. Černý čaj obsahuje díky procesu fermentace méně monomerů flavanolů, neboť ty podléhají oxidaci za vzniku komplexnějších kondenzovaných polyfenolů známých jako teaflaviny a tearubigeny. Nejznámějšími flavanoly jsou již výše zmíněné katechiny a epikatechiny, které se nalézají především v ovoci, zatímco gallokatechiny, epigallokatechiny a epigallokatechin gallát nalezneme zejména v luštěninách, hroznech a významněji jsou zastoupeny v čaji [26] [28].

Taniny se dělí do dvou hlavních skupin, a to jsou hydrolyzovatelné a nehydrolyzovatelné také nazývané kondenzované taniny nebo proantokyanidiny. Kondenzované taniny jsou oligomery a polymery ze dvou až více než 200 monomerů flavan-3-olových jednotek. Hydrolyzovatelné taniny se dělí na gallotaniny a ellagotaniny. Taniny jsou vysoce hydroxylované molekuly a mohou tvořit nerozpustné komplexy se sacharidy a proteiny.

Kondenzované taniny jsou díky tvorbě komplexů se slinnými proteiny zodpovědné za svíravou chuť ovoce (vinná réva, broskve, bobule, jablka, hrušky), nápojů (víno, čaj, pivo, jablečný mošt) a za hořkost čokolády. Svíravost se mění i během procesu zrání a s dosažením zralosti mizí. V borůvkách se taniny nachází hlavně v listech, semenech a oddencích [6] [20].

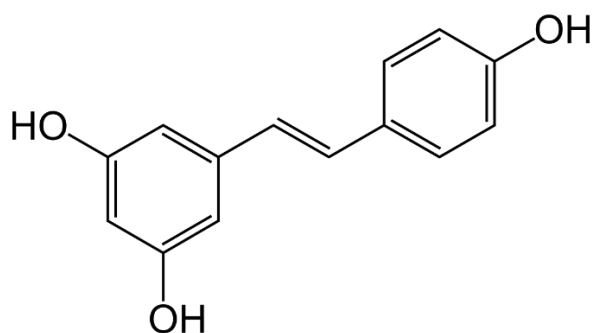


Obrázek 9 Chemická struktura katechinu [21]

2.4.4.2 Stilbeny a lignany

Tyto sloučeniny patří mezi neflavonoidní fenolické sloučeniny. Jedná se o sloučeniny s alespoň dvěma aromatickými kruhy ve struktuře, pouze taniny mají více aromatických kruhů. Základní chemickou strukturou stilbenů jsou dva benzenové kruhy spojené ethenem, přičemž nejběžnější je E izomer. V rostlinách se vyskytují jako volné sloučeniny nebo jako glykosidy. Kromě borůvek je můžeme nalézt v hroznech vinné révy, mandlích, brusinkách apod. Nejznámějším zástupcem stilbenů je resveratrol. Struktura resveratrolu je zobrazena na Obrázku 10. Jako barviva nemají stilbeny prakticky žádný význam [28].

Lignany jsou skupinou fenolových sloučenin řazených mezi fenylpropanoidy, odvozených od koniferylalkoholu a dalších skořicových alkoholů. Jedná se o dimery typu $(C_6-C_3)_2$. Vykazují různé biologické účinky jako např. fytoestrogeny nebo antioxidanty. Dělí se na čtyři základní skupiny (lignany, lignanoly, monoepoxy-lignany, bisepoxy-lignany). Mezi zástupce patří matairesinol, lariciresinol, pinoresinol, medioresinol a sytingaresinol. [4] [6] [11].



Obrázek 10 Chemická struktura resveratrolu [6]

2.5 Metody pro detekci chemických látek v ovoci a rozlišení jednotlivých druhů ovoce.

2.5.1 UV/VIS spektrofotometrie

Jedná se o fyzikálně-chemickou optickou metodu, při které dochází k absorpci elektromagnetického záření při průchodu vzorkem. Rozmezí vlnových délek se pohybuje od 200–800 nm. Platí zde Lambert-Beerův zákon ($A = \varepsilon \cdot c \cdot l$). UV/VIS spektrometrie je hojně využívanou metodou zejména pro její rychlost, experimentální nenáročnost, citlivost a poměrně nízké ekonomické náklady. Používá se ke stanovení antokyanů pH diferenciální metodou. V této metodě se využívá reverzní změny struktury antokyanů v závislosti na pH, která se projevuje změnou zbarvení roztoku a změnou absorbance, kterou je možné měřit.

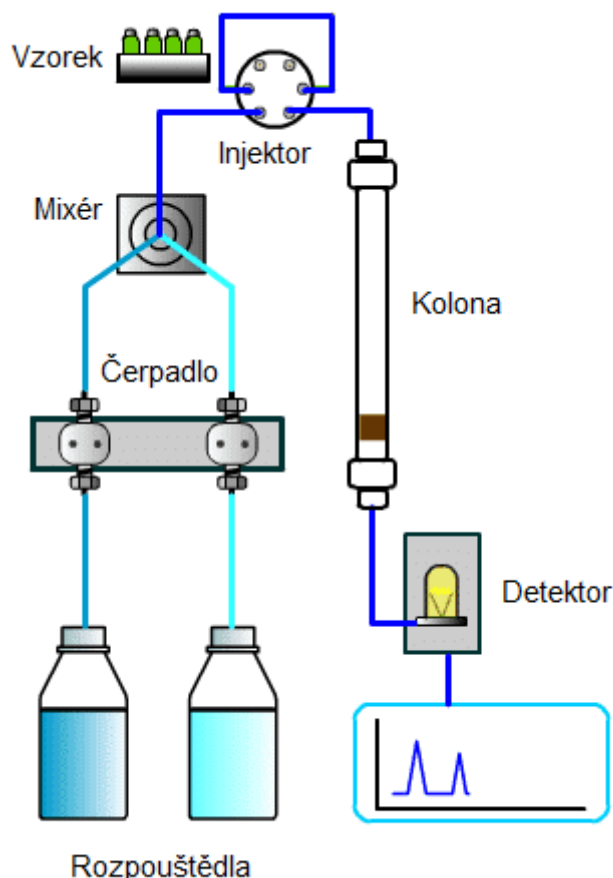
Celkový obsah polyfenolů v borůvkových extraktech lze měřit několika metodami. Jednoduchou a rychlou metodou je Folin-Ciocalteu test (FC test) nebo použití Folin-Denisova činidla. FC test je založen na reakci fenolických látek s redukčním činidlem za vzniku modrého komplexu. Tento test není selektivní a určuje jak polyfenolické, tak i monofenolické sloučeniny. Fenolové látky stanovené tímto testem se nejčastěji vyjadřují v ekvivalentech kyseliny gallové. Nejběžnější metodou pro izolaci polyfenolických látek je extrakce. Vzhledem k velkému množství fenolických látek neexistuje standardní metoda pro jejich extrakci. Nejčastějšími technikami jsou extrakce rozpouštědlem a superkritická fluidní extrakce. Před extrakcí se rostlinná matrice homogenizuje: mele, drtí, lyofilizuje apod. Dalšími metodami pro izolaci polyfenolů je extrakce ultrazvukem, mikrovlnná extrakce, extrakce tuhou fází, vysokotlaká extrakce rozpouštědlem [11].

2.5.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Separční proces chromatografie je založený na rozdělení vzorku mezi dvě nemísitelné fáze (mobilní a stacionární) a podle svojí afinity k jednotlivým fázím se molekuly vzorku dělí. Základní zapojení kapalinového chromatografu uvádí Obrázek 11. Stacionární fáze je zakotvena v koloně. Je důležité, aby stacionární fáze měla dostatečně malé částice a mobilní fáze dostatečný průtok, aby docházelo k účinné separaci látek obsažených ve vzorku. Pro zajištění dostatečného průtoku mobilní fáze se používají vysokotlaká čerpadla. V závislosti na povaze stacionární fáze probíhá separace analytu čtyřmi různými fyzikálně-chemickými procesy, což je adsorpce, iontová interakce, separace podle velikosti molekul a separace na základě vazby antigenu na specifickou protilátku. Podle polaritativy jednotlivých fází rozlišujeme HPLC s normálními nebo reverzními fázemi. Podle analyzovaného vzorku volíme typ rozpouštědla a kolonu. Nejběžnějším detektorem v této instrumentální metodě je termo-ionizační detektor (FID), UV-VIS detektor (PDA detektor), fluorescenční detektor. Tato instrumentální metoda se v dnešní době často používá ve spojení s hmotnostním spektrometrem [29].

Kapalinová chromatografie se používá pro různé typy látek jako sacharidy, lipidy, aminokyseliny, aditiva, kontaminanty, vitamíny, syntetická a přírodní barviva. Například při stanovení antokyanů pomocí HPLC s obrácenými fázemi dodržují antokyaniny obecný retenční řád založený na stupni polaritativy molekulární struktury, které jsou primárně ovlivněny třemi základními strukturami v antokyanu. Prvním typem jsou antokyaniny, které se liší jen svým druhem antokyanidinu. Ty by byly separovány podle elučního řádu (od nejkratšího po nejdelší retenční čas) takto: delphinidin, kyanidin, petunidin, pelargonidin, peonidin a malvidin.

Možným vysvětlením tohoto řádu jsou rozdíly v hydroxy a methoxy substituentech připojených k antokyanidinu. Delfinidin má nejvyšší stupeň polaritu, protože obsahuje nejvíce hydroxylových skupin, takže bude mít nejkratší retenční čas. Nejdéší retenční čas bude mít malvidin, protože obsahuje nejvíce methoxy skupin, což mu dává více hydrofobní charakter [4].



Obrázek 11 Schéma kapalinového chromatografu upraveno podle [29]

2.5.3 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Jedná se o analytickou metodu, která analyzuje vzorky na základě poměru hmotnosti iontu a jeho náboje m/Z . Používá se pro určení hmotnosti částic, stanovení prvkového složení molekuly. Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, do kterého se dává vzorek. Za iontovým zdrojem se nachází disperzní prvek, štěrbina a detektor. Spektrometr pracuje ve vakuu, které zajišťuje většinou soustava čerpadel jako jsou olejová a turbomolekulární čerpadla. Často se tato metoda spojuje s plynovou nebo kapalinovou chromatografií, nebo se používá tandemových technik. Byla použita například v práci [25] ve které bylo touto metodou stanoveno 25 základních antokyanů pomocí HPLC – MS². Mnoho antokyanů má identické hmotnosti a bez řádné chromatografické separace nemohou být tyto signály rozlišeny pomocí hmotnostní spektrometrie. Za použití elektronové ionizace je možné identifikovat přítomné antokyaniny bez použití standardů [1] [4].

2.5.4 Polymerasová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce vznikla v dnešní podobě v 80. letech minulého století. V té době se jednalo o naprosto revoluční techniku. Principem této metody je in vitro klonování specifického úseku nukleových kyselin pomocí enzymu DNA-polymerázy. Její specifčnost je určena použitím dvou výchozích oligonukleotidových jednotek (primerů), které komplementárně hybridizují na obou vlákních DNA a ohraničují cílovou sekvenci. PCR reakce se provádí v termocykleru a její průběh je podrobněji popsán v 2.5.4.2. Výsledným produktem PCR jsou amplikony, což jsou úseky DNA o definované délce [30].

Velikost těchto produktů je obvykle desítky až tisíce páru bazí (bp). Správný průběh PCR reakce je sledován systémem negativních (tato kontrola se používá pro sledování kontaminace PCR komponentů) a pozitivních kontrol (tato kontrola sleduje funkčnost všech složek reakce). K analýze amplikonů může být použita řada metod jako hybridizace, ELISA nebo sekvenační analýza. Hojně se pro rozdělení DNA fragmentů využívá gelová elektroforéza (ELFO), a to zejména pro svou jednoduchost a spolehlivost. Obecně je pohyblivost molekul v elektrickém poli určité intenzity závislá na jejich velikosti, náboji a tvaru [31].

Bílkoviny na rozdíl od nukleových kyselin mají tyto tři uvedené faktory variabilní. Nukleové kyseliny mají konstantní poměr hmotnosti a náboje, protože jednotlivé nukleotidy mají stejnou hmotnost a mají v zásaditém prostředí negativní náboj. Gel je používán nejčastěji agarosový nebo polyakrylamidový a fragmenty DNA se v gelu dělí na základě velikosti molekul (technika molekulového síta). Podle velikosti amplikonů volíme různou koncentraci agarosy v gelu, nejčastěji se používá 1–1,5% gel [31] [32].

2.5.4.1 Komponenty pro PCR reakci

Pro reakci PCR se používají následující komponenty a reakční směs se obvykle míchá v rozmezí od 25–100 μ l [32].

- **Matrice DNA (DNA templát)** – makromolekula DNA, podle které se komplementárně syntetizují nové řetězce DNA. Obsahuje cílová místa pro primery. Typická množství bakteriální a plasmidové DNA, přidávané do reakce, jsou 10–1 ng [32].

- **Oligonukleotidové primery** – bývají synteticky připravené a jsou komplementární k templátové DNA, která má být amplifikována. Primery jsou sekvencně specifické a nesmí obsahovat falešná vazebná místa na templátu. Typické primery mají 18–30 nukleotidů a obsahují 40–60 % GC bází. Teplota tání primerů bývá v rozmezí od 55–80°C. Primery by neměly být komplementární mezi sebou, zejména na 3' -konci, kde párování dvou nebo tří bází může vést ke vzniku dimerů primerů, zejména při nadbytku primerů. Potřebná koncentrace každého primeru pro jednu reakci je 0,1–0,5 μ M [32].

- **DNA-polymerasa** – syntetizuje novou DNA ve směru 5' \rightarrow 3' podle sekvence nukleotidů v komplementárním řetězci DNA. Ke katalýze se používají termostabilní polymerasy, např. Taq DNA-polymerasa izolovaná z mikroorganismu *Thermus aquaticus* [32].

- **3′-deoxynukleosid-5′-trifosfáty (dNTP)** – (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) – stavební kameny pro syntézu nové DNA. Doporučená koncentrace je kolem 200 μM, nicméně tolerované rozpětí koncentrace se pohybuje v rozmezí od 20–400 μM. Vysoké koncentrace dNTP (od 4 mM a více) působí inhibičně, protože vyvazují hořčnaté kationty (Mg^{2+}) [32].

- **Mg^{2+} ionty** – jsou nezbytné pro aktivitu DNA-polymerasy. Koncentrace Mg^{2+} musí být optimalizována pro každou kombinaci primerů a DNA templátu. Obvykle se používá koncentrace 1,5 mM Mg^{2+} . Toleranční rozmezí se pohybuje od 0,5 – 8 mM. Vyšší koncentrace iontů snižuje specifitu PCR. U primerů bohatých na G a C báze je ale použití vyšších koncentrací Mg^{2+} výhodnější [32].

- **Pufr pro PCR** – vytváří optimální prostředí pro DNA-polymerasu. Standardní reakční pufr obsahuje 10 mM Tris-HCl (pH 8,3–8,8), 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$. Pufr může obsahovat další pomocné látky jako například acetamid, albumin, DMSO, betain apod. Tyto látky zlepšují průběh reakce, stabilizují DNA-polymerázu, usnadňují separaci vláken dvouřetězcové DNA změnou charakteristiky T_m a jsou důležitými látkami při syntéze fragmentů DNA bohatých na GC páry, jelikož zabraňují vzniku sekundárních struktur, které vznikají díky vysokým obsahům právě těchto párů v molekule DNA [32] [33].

- **Voda pro PCR** – používá se na doplnění reakční směsi pro PCR na požadovaný objem. Nejvhodnější je voda o odporu 18 mΩ [32].

2.5.4.2 Fáze PCR v termocykleru

Denaturace DNA:

Spočívá v zahřátí DNA na teplotu kolem 95 °C. Tato teplota je potřebná k narušení vodíkových můstků mezi vlákny DNA. Tím se dvouřetězcová DNA (dsDNA) rozpadne na dvě jednořetězcové DNA (ssDNA). Ty slouží jako templát pro PCR [30] [32].

Hybridizace (připojení) primerů:

Probíhá často v rozmezí teplot kolem 50–65°C. Pokud jsou ve směsi pro PCR v nadbytku specifické oligonukleotidy, budou hybridizovat s komplementární sekvencí jednořetězcové molekuly DNA rychleji, než bude probíhat renaturace DNA, což je dáno velikostí jednořetězcové molekuly DNA a její koncentrací, která je oproti primerům nižší [30]. Teplota, při níž hybridizace probíhá, je pro výsledek PCR klíčová a musí být vhodně nastavena pro použitý pár primerů. Při příliš nízké teplotě mohou primery nasedat i na sekvence, které jsou komplementární jen zčásti, a vytvoří se tak nespecifický produkt PCR. Při příliš vysoké teplotě zase nebudou primery hybridizovat a produkt se nevytvoří v dostatečném množství [32].

Syntéza nového řetězce:

Syntéza nových řetězců probíhá při teplotě 65–75°C. Nové molekuly DNA se začínají syntetizovat od primeru. V prvním cyklu je jako templát použita dlouhá molekula původní DNA. Vzniknou řetězce, které jsou sice kratší než templát, ale vždy z jedné strany přesahují úsek vymezený oběma primery. Pokud v dalších cyklech jako templát slouží takto vytvořený primární produkt, vytvoří se podle něj úsek DNA přesně ohraničený polohou obou použitých primerů [31]. Právě těchto specifických produktů o přesně vymezené délce bude v průběhu PCR přibývat exponenciálně, zatímco delších řetězců jen lineárně. Po 30 cyklech PCR se teoreticky vytvoří asi 10^9 i více specifického produktu než ostatních úseků DNA, jejichž podíl je tak ve výsledné směsi prakticky zanedbatelný. Skutečný výtěžek PCR bývá podstatně nižší. To je dáno postupným vyčerpáváním složek reakce v průběhu amplifikace. Po určitém počtu cyklů dosáhne koncentrace produktu svého maxima a dále se již prakticky nezvyšuje [32].

2.5.4.3 Modifikace PCR

PCR v reálném čase (qPCR)

U konvenční PCR je vzniklý produkt detekován pomocí gelové elektroforézy. Tato metoda má však jen omezenou specifitu, jelikož se nerozlišují různé molekuly o stejné molekulové hmotnosti. Při PCR v reálném čase se sleduje vznikající produkt již během reakce v každém cyklu, a to pomocí fluorescenčního signálu. Je měřena změna intenzity fluorescenčního signálu. Tato technika také umožňuje kvantifikaci produktu, tedy přesné určení výchozího množství daného úseku DNA v analyzovaném vzorku, proto se označuje také jako qPCR. Průběh qPCR je podobný konvenční PCR. Stejně je i složení reakční směsi s rozdílem fluorescenční molekuly, kterou obsahuje směs pro qPCR. Díky tomuto fluoroforu je na každém konci cyklu měřena koncentrace produktu v reakční směsi [31].

Výsledkem je amplifikační křivka. Jedná se o závislost intenzity fluorescence na počtu cyklů. Křivka nabývá esovitěho tvaru a lze ji rozdělit na tři části. V první části je v reakční směsi velmi malá koncentrace amplifikované DNA, tudíž je i nízká intenzita fluorescenčního signálu nebo je koncentrace dsDNA tak nízká, že se nachází pod mezí detekce zařízení. V druhé části nastává exponenciální růst intenzity fluorescenčního signálu. Je to dáno exponenciálním růstem amplifikovaného produktu PCR. V třetí části dochází k saturaci systému produktem a koncentrace amplifikované DNA se nemění. Intenzita fluorescence je stále stejná, což může být dáno vyčerpáním PCR komponent v reakční směsi. Čím dříve nastane exponenciální fáze, tím více vzorek obsahoval templátové DNA.

Pro detekci produktu qPCR se používají nejrůznější metody založené na přítomnosti fluorescenčního substrátu, který se váže na přítomnou DNA. Bez navázání na DNA substrát neemituje záření. Jako zdroj fluorescence se používá např. nespecifické interkalační barvivo SYBRGreen, specifické Molecular Beacon sondy, TaqMan sondy nebo sondy FRET („fluorescence resonance energy transfer“). Nejpoužívanějším zdrojem je SYBRGreen, i když se na molekulu DNA váže nespecificky, což může snižovat přesnost výsledků, tak se hojně využívá zejména pro univerzálnost a relativně nízkou pořizovací cenu. Výhodami qPCR je amplifikace a identifikace produktu v jednom zařízení i v jedné zkumavce, čímž se předchází možné kontaminaci vzorku a vzniku dalších chyb [34] [35].

Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM analýza)

Vysokorozlišovací analýza křivek tání neboli „High Resolution Melting“ (HRM), je relativně nová metoda. Tato metoda je velice citlivá, a proto umožňuje rozpoznávat i velice malé rozdíly křivek tání DNA. Díky tomu je HRM vhodná i pro detekci úseků, které se liší pouze o jednu bázi a drobné inserce [35]. Velmi často se používá při polymerázové řetězové reakci v reálném čase, jako ověřovací metoda toho, zda byl syntetizován specifický PCR produkt. Dále se tato metoda využívá ke genotypizaci, při analýze mutací nebo pro identifikaci druhů, další možnosti je využití při metylační analýze.

HRM je velmi rychlá, jednoduchá a po zavedení i finančně nenáročná technika. Přesto je tato metoda velice specifická a senzitivní. Pro určení T_m není třeba žádné další izolace DNA, jak je tomu např. u sekvenovacích metod. HRM je nedestruktivní metoda a šetrná ke vzorku analyzované DNA [30] [35] [36].

Principem metody je sledování disociace dvoušroubovice DNA za postupného, vysoce přesného a stabilního zvyšování teploty (citlivost až $0,01\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$) a přeměna na jednořetězcovou DNA. Dvoušroubovice DNA (dsDNA) je poměrně stabilní při pokojové teplotě. Při vzrůstající teplotě dochází k disociaci, kdy se od sebe jednotlivá vlákna separují. Teplota, při které dojde k rozdělení 50 % dsDNA na jednotlivé řetězce, se nazývá teplotou tání (T_m). Teplota tání je závislá jak na délce DNA fragmentu, tak na obsahu párů guaninu a cytosinu. Jelikož jsou tyto báze vázány třemi vodíkovými vazbami, jsou stabilnější než páry adeninu a thyminu, které mají pouze dvě vodíkové vazby. Sekvence DNA s větším obsahem párů G/C mají vyšší teplotu tání než sekvence, které obsahují menší počet těchto vazebných párů. Aby mohly být křivky tání vyhodnoceny, musí být analýza prováděna za přítomnosti fluorescenčního barviva. V průběhu měření je snímána a zaznamenávána intenzita fluorescenčního signálu ve vysokém rozlišení [35].

Na počátku je intenzita fluorescence nejvyšší. To je způsobeno vysokým počtem dvouřetězcových molekul DNA s navázaným fluorescenčním barvivem. Při zvyšující se teplotě postupně dsDNA disociuje, dochází k uvolňování barviva a následnému snížení intenzity fluorescence. Výsledkem je křivka tání, která popisuje závislost intenzity fluorescence na teplotě. Pro lepší čitelnost výsledků bývá křivka převedena na normalizovanou křivku tání. Křivka tání je složena ze tří částí. Nejprve se jedná o tzv. „pre-melt“ fázi, v této fázi je DNA ve dvouřetězcové formě. Při této fázi je fluorescence největší. Poté následuje postupné zvyšování teploty, tato fáze se nazývá „melt“ fáze. Dochází k denaturaci dvouřetězcové molekuly, což způsobí pokles intenzity fluorescence. Z inflexního bodu křivky se určuje teplota tání. Poslední, třetí fáze je tzv. „post-melt“ fáze. V tomto okamžiku je přítomna pouze jednořetězcová DNA a intenzita fluorescence je minimální. Pro jednodušší odečet teploty tání se využívá diferenčních křivek. V takovémto případě se využívá závislosti derivované fluorescence na teplotě, kdy vznikají píky, které odpovídají teplotám tání ampliconu [36].

V HRM analýze nelze použít běžná fluorescenční barviva, která se používají v běžné qPCR, a to z několika důvodů. Většina těchto barviv je ve vyšších koncentracích pro DNA polymerázu toxická a dochází tak k následné inhibici PCR. Dalším důvodem je fakt, že u běžných barviv dochází k redistribuci barviva během denaturace, což omezuje snímání fluorescence ve vysokém rozlišení. Z těchto důvodů se pro HRM analýzu využívá saturačních barviv, která nejsou tak toxická pro polymerázu a v řetězci amplifikované DNA vyplní všechna vazebná místa. Nejvíce používaná saturační barviva jsou např. SYTO9, SYBR Green I, Eva Green, LC Green PLUS [31] [35].

HRM analýza nachází uplatnění také v analýze potravin, např. pro ověření totožnosti kultivarů vinné révy, detekce různých druhů rýže Basmati a odhalení jejího možného falšování, diferenciaci druhů citrusů a jejich kříženců, ověření pravosti kultivarů u třešní, detekci kravského mléka v buvolích mléčných výrobcích, identifikaci patogenů v potravinách (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*), analýzu geneticky modifikovaných potravin jako je geneticky modifikovaná (GM) rýže, GM kukuřice a GM brambory a nebo detekci potenciálních alergenů v potravinách (ořechy, ryby, mléko) [36].

3 CÍL PRÁCE

- Cílem této diplomové práce bylo:
- vypracování literární rešerše na dané téma
- výběr vhodné metody pro izolaci DNA z rostlinné matrice a její optimalizace
- izolace a identifikace rostlinné DNA z vybraných potravin pomocí metod molekulární biologie
- charakterizace vybraných látek pocházejících z rostlinné složky obsažené v potravinách
- stanovení těchto látek pomocí instrumentálních metod.
- diskuse výsledků, využitelnost různých přístupů ke stanovení autenticity potravin s obsahem rostlinné složky.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Rostlinný materiál a vybrané potraviny

- **Kanadská borůvka sušená mrazem (Wolfberry s.r.o.)**
Složení: Celé borůvky sušené mrazem.
- **Evropská borůvka mražená (Česká republika)**
Složení: Celé borůvky uchovávané při -18 °C.
- **Vzorek 1: Přesnídávka s borůvkami 190 g (Hamánek)**
Složení: Jablečná dřeň 45 % hm; Borůvková dřeň 15 %; cukr; fruktózový sirup (fruktoza, dextroza, maltoza); modifikovaný kukuřičný škrob; kyselina citronová; kyselina askorbová. Hmotnost borůvkové složky v produktu 28,5 g.
- **Vzorek 2: Jogurt s borůvkami 200 g (Agro-la)**
Složení: Nehomogenizované plnotučné mléko; ovocná složka 13,5 % (cukr, borůvky 30 %, přírodní aroma, koncentrát z mrkve a ibišku); sušené mléko, mléčné kultury. Tuk min 2,5 %. Hmotnost borůvkové složky v produktu 8,1 g.
- **Vzorek 3: Smetanový borůvkový jogurt 250 g (Pilos)**
Složení: Smetana; 30 % borůvková složka (60 % borůvková dřeň; cukr, pitná voda, karubin, pektiny, barvicí koncentrát z černé mrkve), sušené mléko, jogurtová kultura. Hmotnost borůvkové složky v produktu 45 g.
- **Vzorek 4: Přesnídávka s borůvkami 200 g (Hami)**
Složení: Jablečné pyré 64 %; Borůvkové pyré 20 %; Hruškové pyré 14 %; kyselina askorbová; rýžová mouka. Hmotnost borůvkové složky v produktu 40 g.
- **Vzorek 5: Bio přesnídávka s borůvkami 90 g (Lupilu)**
Složení: 79 % jablka; 15 % Hrušky; 4 % borůvka; 2 % maliny. Hmotnost borůvkové složky v produktu 3,6 g.

4.2 Vybavení laboratoře

4.2.1 Přístroje a vybavení

- Centrifuga MINI Spin (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga BOECO U-32R (Německo)
- HPLC Dionex Ultimate 3000 series (Teruo Scientific, USA)
- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, USA)
- Laboratorní váhy KERN CM 60-2N (UNIPRO-ALPHA, ČR)
- Laboratorní sklo, umělohmotný materiál (Eppendorfovy zkumavky, špičky, umělohmotné pomůcky, laboratorní pomůcky)
- LightCycler® Nano Instrument (Roche, Basel, Švýcarsko)
- Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Polsko)
- Mikrovlnná trouba (SENCOR, ČR)
- Miniinkubátor LABNET 230 V (Německo)
- Nanodrop Spectrophotometer 2000 (TeruoFisher, USA)
- Spektrofotometr BOECO S-200 (Německo)
- Sušárna Binder FD 53 (Německo)
- Termocyklér Rotor-Gene 6000 (Quigen, Austrálie)
- Transluminátor Azure Biosystems c200 (TeruoFisher, USA)
- Zařízení pro elektroforézu Easy – Cast, (Owl Scientific, USA)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, USA)

4.2.2 Chemikálie

- Acetonitril (CHROMASOLV™ Plus, for HPLC, ≥ 99,9%, Honeywell Riedel-de Haën™)
- Agaróza pro gelovou elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)
- Chlorid hlinitý (Lachema, Brno, ČR)
- Chlorid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Chloroform (Lachema, Brno, ČR)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- DNA standard 100 bp (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Dusitan sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Etanol (Penta, Chrudim, ČR)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Penta, Chrudim, ČR)
- Fenol (Penta, Chrudim, ČR)
- Folin – Ciocalteu činidlo (Sigma Aldrich, Německo)
- GelRed – fluorescenční barvivo (Biotium, Fremont, USA)
- Gel Loading Buffer (Sigma Aldrich, Německo)
- Hexan (Penta, Chrudim, ČR)
- Hydroxid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Isoamylalkohol (Lachema, Brno, ČR)
- Isopropanol (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina gallová, (Sigma-Aldrich, Německo)
- Katechin, (Sigma-Aldrich, Německo)
- Metanol (Penta, Chrudim, ČR)
- Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)

- Octan amonný (Lachema, Brno, ČR)
- Proteináza K (Serva, Heidelberg, Německo)
- Standardy fenolických látek pro HPLC (Sigma Aldrich, Německo)
- SYTO 9 (Top-Bio, ČR)
- Trifluorooctová kyselina 99% (ACROS Organics™)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris-báze), (Penta, Praha, ČR)

4.2.3 Komerční kity pro izolaci DNA

- EliGene Plant DNA Isolation Kit (Kit A) – Izolace DNA na kolonkách
- Chemagic DNA Plant Kit (Kit B) – Izolace DNA na magnetických nosičích

4.3 Metody

4.3.1 Izolace rostlinné DNA s využitím CTAB protokolu

Homogenizace a izolace rostlinné DNA z kanadských a evropských borůvek byla provedena podle modifikovaného protokolu z prací [37] a [38]. Do 2 ml mikrozkušavky bylo naváženo 100 mg zhomogenizovaného rostlinného materiálu. K rostlinnému materiálu byl připipetován 1 ml CTAB pufru (1 g cetyl triethylamonium bromidu se rozpustil v 10 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 8,0) a byl smíchán s 16 ml 5 M NaCl, 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 42 ml destilované vody) zahřátého na 65 °C a 1 μ l β -merkaptoetanolu. Za občasného promíchání se vzorek inkuboval při 65 °C 30 minut. Poté se nechal zchladnout a do zkumavky bylo přidáno 800 μ l směsi chloroform-oktanol 24:1. Vzniklý roztok byl centrifugován 10 000 g 10 minut. Následně byla horní (vodná) fáze (cca 800 μ l) přepipetována do sterilní 2 ml mikrozkušavky a bylo přidáno 0,6 objemu (480 μ l) isopropanolu.

Vzorek byl promíchán a centrifugován při 10 000 g 5 minut. Supernatant byl odlit jedním převrácením zkumavky a jeho zbytky byly ořeny do sterilní buničiny. K sedimentu bylo přidáno 500 μ l 10 mM octanu amonného v 70% etanolu a roztok byl inkubován po dobu 30 minut při laboratorní teplotě a následně centrifugován při 10 000 g 5 minut. Následně byl supernatant opatrně odlit a jeho zbytky byly oklepány do sterilní buničiny. Sediment byl vysušen při 37 °C. K sedimentu bylo přidáno 250 μ l TE pufru a vzorek byl resuspendován. Obsah zkumavky byl stočen na mikrocentrifuze a bylo přidáno 250 μ l 5 M chloridu sodného, 1/20 objemu 3 M octanu sodného (25 μ l) a 2,5x objemu (1,25 ml) studeného 96% etanolu. Výsledný roztok byl promíchán a inkubován 15 minut při -20 °C. Poté byl roztok centrifugován při 10 000 g 15 minut a supernatant byl odlit. Zbytky supernatantu byly oklepány do buničiny a sediment byl opět vysušen při 37 °C.

K vysušenému sedimentu bylo přidáno 500 μ l TE pufru. Následně byly přidány 4 μ l RNasy A (10 mg/ml) a vzorek byl inkubován 15 minut při 37 °C. Poté bylo přidáno 4 μ l proteinasy K (20 mg/ml) a vzorek byl inkubován 1 hodinu při teplotě 37 °C. Po inkubaci bylo přidáno 200 μ l fenolu a 200 μ l směsi chloroform-izoamylalkohol (24:1). Roztok byl promíchán a centrifugován při 10 000 g 2 minuty. Horní fáze (cca 500 μ l) byla přenesena do nové 2 ml mikrozkušavky. K horní fázi bylo přidáno 700 μ l směsi chloroform-izoamylalkohol (24:1). Vzorek byl promíchán a centrifugován při 10 000 g 2 minuty. Vodní fáze byla přepipetována do čisté 2 ml mikrozkušavky a bylo znovu provedeno srážení etanolem. Sediment byl vysušen při 37 °C a rozpuštěn ve 100 μ l TE pufru.

4.3.2 Izolace rostlinné DNA pomocí komerčních izolačních kitů

EliGene Plant DNA Isolation Kit (Kit A):

Izolace rostlinné DNA z komerčních výrobků a vzorků borůvek byla s úpravami provedena podle izolačního protokolu zasláného výrobcem [39]. Úprava protokolu byla provedena u homogenizace vzorku, kde byl odpipetován 1 ml vzorku a centrifugován při 10 000 rpm po dobu 15 minut. Supernatant byl odstraněn a ze sedimentu bylo odebráno 50 mg pro izolaci DNA bez použití homogenizačního písku. Poté se postupovalo v souladu s izolačním protokolem výrobce.

Chemagic DNA Plant Kit (Kit B):

Tímto kitem byla provedena pouze izolace DNA ze vzorků borůvek. Postup izolace proběhl podle protokolu dodaného výrobcem [40].

4.3.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

Spektrofotometrické stanovení bylo provedeno na přístroji nanospektrofotometr NanoDrop 2000. Jako blank byl zvolen TE pufr, ve kterém byla DNA eluována, popřípadě eluční pufr izolačních kitů. Na čočku spektrofotometru byly nanесeny 2 μl vzorku DNA nebo blanku a byla změřena absorbance v rozsahu vlnových délek 220–340 nm. Pomocí softwaru NanoDrop 2000 byly stanoveny hodnoty koncentrace DNA v $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a dále hodnoty poměrů absorbance A260/A280 a A280/A230, které vypovídají o čistotě vzorku DNA.

4.3.4 Příprava reakční směsi pro PCR a průběh reakce

Směs pro PCR reakci byla namíchána ve speciálním sterilním boxu podle Tabulky 2. DNA templát byl přidán odděleně od PCR směsi v jiném předem vysterilizovaném boxu. Sekvence jednotlivých použitých primerů uvádí Tabulka 3. Teplotní profily jednotlivých PCR reakcí jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 2 *Komponenty pro PCR směs a použité objemy pro jeden vzorek*

Komponent	Objem [μl]
Voda pro PCR	9,5
SYTO 9	12,5
Primer 1	1
Primer 2	1
DNA templát	1

Tabulka 3 Sekvence jednotlivých primerů. Primery S2-R a S2-F jsou dále nazývány „primery ITS 2“.

Název	Sekvence (5'→3')	Citace
S2-R	GAC GCT TCT CCA GAC TAC AAT	[41]
S2-F	ATG CGA TAC TTG GTG TGA AT	
BHLH1-R	TTC CCA TAA ACT TGA TTA GAG CC	[42]
BHLH1-F	AAC CAA TCC CTG AAG AAC AGA AT	
BHLH3-R	GGA ATC ATT AGG GAA ACT GGG TA	[42]
BHLH3-F	AAA TG GATT TGC TGT TAT GGG TG	

Tabulka 4 Teplotní profily PCR reakcí.

Prodloužená denaturace DNA	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Dosyntetizování DNA
Primery ITS 2 s počtem cyklů 40				
95 °C/5 min	95 °C/30 s	56 °C/30 s	72 °C/30 s	72 °C/5 min
Primery BHLH 1 a BHLH 3 s počtem cyklů 40				
95 °C/5 min	95 °C/30 s	60 °C/45 s	72 °C/30 s	72 °C/5 min
Touchdown u hybridizace primerů po dobu 10 cyklů s krokem 1 cyklus/0,5 °C na teplotu hybridizace primerů 55 °C				

4.3.5 Příprava agarózového gelu

Gel pro elektroforézu byl připraven z agarózy a TBE pufru (0,5x TBE pufr 54 g Tris báze; 27,5 g kyseliny borité; 40 ml 0,5 M EDTA; doplnit destilovanou vodou do 1 litru, následně 10x zředit). Byl připravován 1,2% a 2% agarózový gel. V Erlenmeyerově baňce bylo 100 ml TE pufru (100x TE pufr 121 g Tris báze, 37,2 g Na₂EDTA, pH 8, doplnit destilovanou vodou do 1 l) smícháno s požadovaným množstvím agarózy (1,2 g a 2 g). Poté byl roztok zahříván a opakovaně přiveden k varu v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění agarózy. Po zchlazení bylo do roztoku přidáno interkalační barvivo GelRed v objemu 10 µl a roztok byl nalit do předem připravené formy. Po třiceti minutách byl gel dostatečně tuhý pro elektroforézu.

4.3.6 Elektroforéza DNA fragmentů

Po PCR reakci byly vzorky smíchány s nanášecím pufr (5 µl). Následně bylo 15 µl roztoku vzorku napipetováno do jamek agarózového gelu. Forma s gelem byla vložena do určené elektroforetické vany a zalita TE pufr. U 2% gelů bylo zvoleno napětí 80 V a elektroforéza probíhala minimálně 2,5 hodiny. U 1,2% gelů bylo zvoleno napětí 80 V a elektroforéza probíhala minimálně 1,5 h.

4.3.7 Příprava extraktů pro analýzu instrumentálními metodami

Zakoupené sušené plody kanadských borůvek byly rehydratovány destilovanou vodou a následně homogenizovány v třecí misce. Plody evropských borůvek byly rozmrazeny a poté homogenizovány v třecí misce. Pro přípravu supernatantů byly naváženy 4 g homogenizovaných borůvek a komerčních výrobků, do plastových zkumavek (15 ml). Zkumavky se vzorky byly centrifugovány při 12 000 rpm po dobu 30 minut. Poté byl supernatant přepipetován do čistých plastových zkumavek (15 ml) a použit pro HPLC analýzu a spektrofotometrické stanovení polyfenolů a flavonoidů. Supernatanty byly uchovávány v mrazáku při -18 °C.

4.3.8 Příprava extraktů pro HPLC a jejich analýza

Pro extrakci byl použit supernatant připravený podle 4.3.7. 4 ml odpipetovaného supernatantu byly po dobu 48 hodin lyofilizovány. K takto upraveným extraktům byl přidán 1 ml hexanu v 15 ml plastové zkumavce. Vzniklý roztok byl 1 min promícháván opakovaným převrácením zkumavky při laboratorní teplotě. Poté byl přidán 1 ml methanolu a obsah zkumavky byl opět promíchán. Následovala inkubace po dobu 5 min při laboratorní teplotě a centrifugace při 4400 rpm po dobu 3 min při laboratorní teplotě. Dolní fáze byla odpipetována do vialky a vzniklý extrakt byl použit při HPLC analýze.

Parametry HPLC chromatografu:

Kolona:	Kinetex F5 C18 150 x 4,6 mm, velikost částic 2,6 µm
Nástřík vzorku:	20 µl
Mobilní fáze (MF):	MF A: 0,1% TFA v deionizované vodě MF B: acetonitril
Průtok mobilní fáze:	0,4 ml/min
Detektor:	ThermoScientific PDA detector
Teplota kolony:	35°C
Doba analýzy:	30 minut
Eluce:	gradientová

Analýza byla provedena gradientovou elucí s parametry, které uvádí Tabulka 5. Kolona a autosampler byly vyhřívány termostatem na teplotu 35°C. PDA detektor byl nastaven na vlnové délky 260, 280, 300, 680 nm.

Tabulka 5 Parametry gradientové eluce.

Čas [min]	MF A [%]	MF B [%]
0	10,0	90,0
1	10,0	90,0
5	12,0	88,0
10	25,0	75,0
15	40,0	60,0
20	55,0	45,0
22	70,0	30,0
30	10,0	10,0

4.3.9 Spektrofotometrické stanovení celkového obsahu fenolických látek

Celkový obsah fenolů byl stanoven metodou Folin–Ciocalteu. K analýze bylo použito 50 μ l borůvkového extraktu, který bylo nutné zředit 5x destilovanou vodou. Poté se ke vzorku přidal 1 ml destilované vody a 1 ml 10x zředěného F–C činidla. Vzorek byl promíchán a inkubován při laboratorní teplotě 5 minut. Dále byl přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného (29,4 g na 100 ml destilované vody) a vzorek se inkuboval při laboratorní teplotě dalších 15 minut. Po inkubaci byla změřena absorbance při 750 nm.

4.3.10 Spektrofotometrické stanovení celkového obsahu flavonoidů

Celkový obsah flavonoidů byl stanoven testem s chloridem hlinitým. K analýze bylo použito 0,5 ml vzorku, který byl 5x zředěný destilovanou vodou. K tomuto vzorku bylo přidáno 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% dusitanu sodného. Vzniklý roztok byl inkubován při laboratorní teplotě 5 minut. Poté bylo přidáno 0,2 ml 10% chloridu hlinitého a následovala další inkubace 5 minut. Po inkubaci bylo přidáno 1,5 ml 5% hydroxidu sodného a 1 ml destilované vody a roztok byl inkubován dalších 15 minut. Po inkubaci byla měřena absorbance při 510 nm.

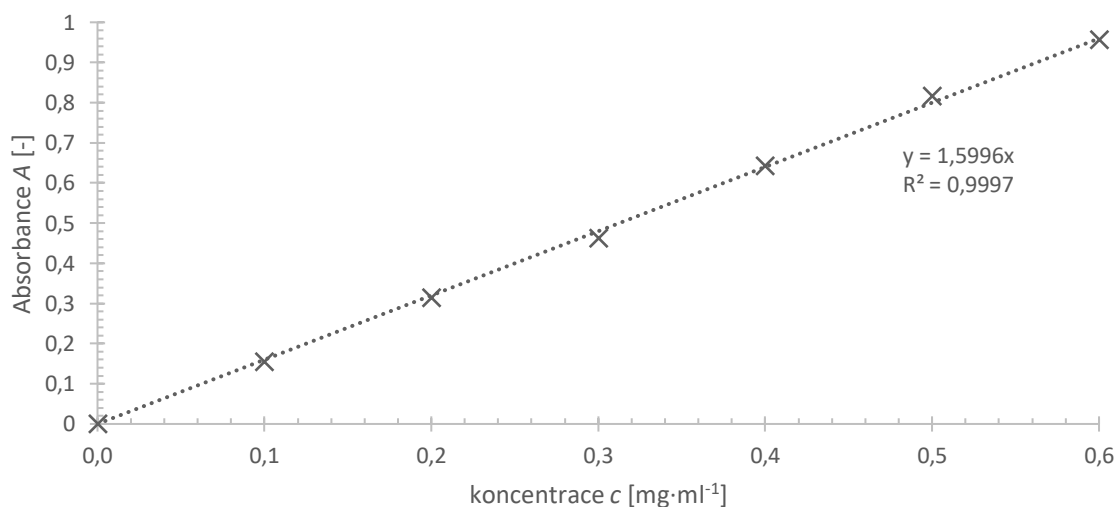
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Využití instrumentálních metod ke stanovení autenticity výrobků s obsahem borůvek

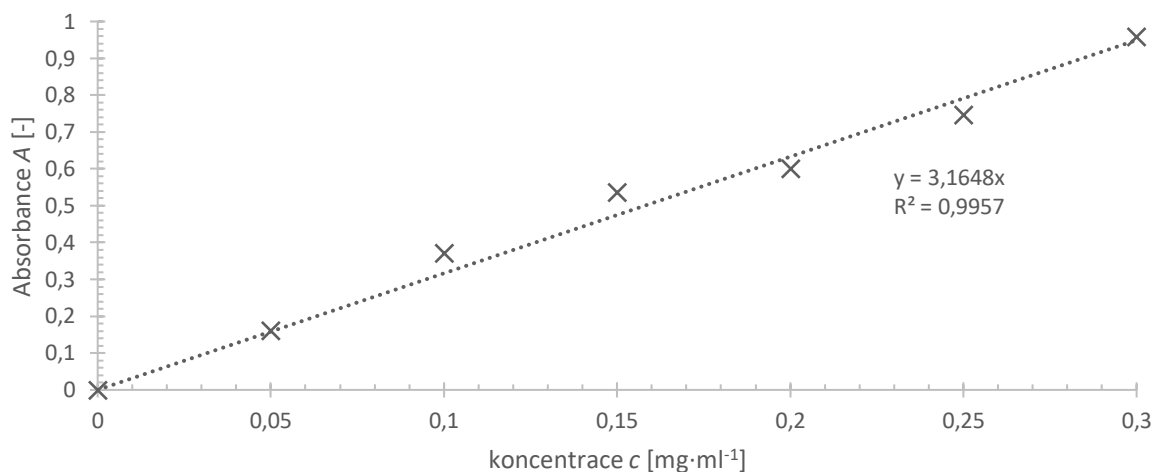
5.1.1 Spektrofotometrické stanovení celkových polyfenolů a flavonoidů

Stanovení celkových polyfenolů a flavonoidů v extraktech bylo provedeno podle postupů uvedených v kapitolách 4.3.9 a 4.3.10. Pomocí rovnice lineární regrese, která byla získána z Grafu 1 kalibrační křivky kyseliny gallové byla následně vypočtena koncentrace polyfenolů pro jednotlivé extrakty vzorků a přepočítána na miligramy polyfenolů na gram čerstvé váhy. Pro stanovení celkových flavonoidů byla použita lineární regrese, získaná z kalibrační křivky katechinu a je uvedena v Grafu 2. Vzorky byly analyzovány ve třech opakováních a výsledkem je tak průměrná hodnota se směrodatnou odchylkou. Tyto hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 6 a znázorněny v Grafu 3 pro celkové polyfenoly a v Grafu 4 pro celkové flavonoidy.

Nejvyšší množství polyfenolů bylo touto metodou stanoveno u přesnídávky Hami a nejnižší u jogurtu Agro-la. Nejvyšší koncentrace flavonoidů byla touto metodou stanovena u přesnídávky Hami a nejnižší u přesnídávky Hamánek. Tato metoda však má omezenou přesnost a je brána jako orientační.



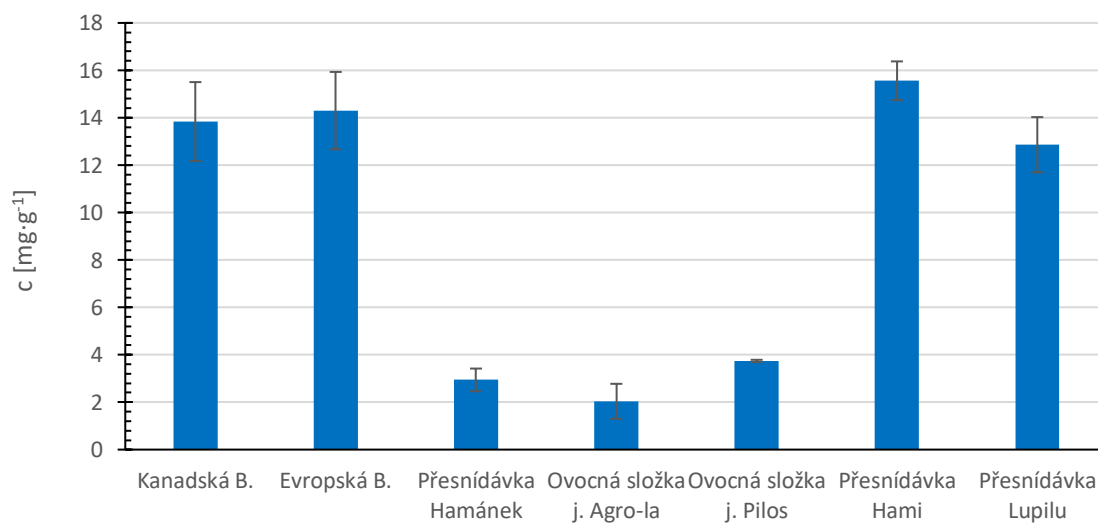
Graf 1 Kalibrační křivka kyseliny gallové pro stanovení koncentrace celkových polyfenolů.



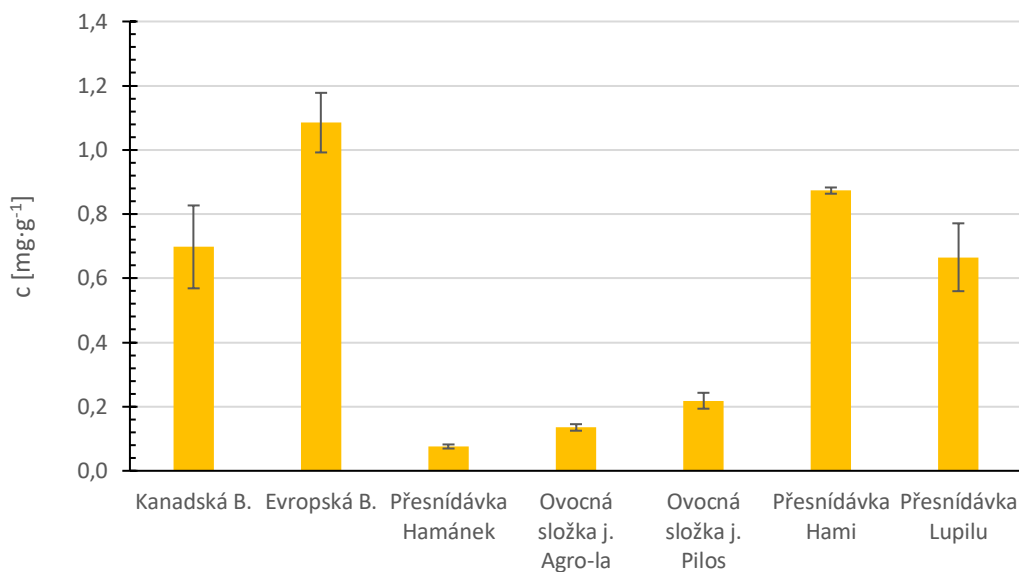
Graf 2 kalibrační křivka katechinu pro stanovení flavonoidů.

Tabulka 6 Hodnoty vypočtených koncentrací pro jednotlivé vzorky. Koncentrace celkových polyfenolů (c_p) koncentrace flavonoidů (c_f). Koncentrace je uvedena v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvé váhy.

Vzorek	c_p [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$]	c_f [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$]
Kanadská borůvka	$13,84\pm 1,67$	$0,70\pm 0,13$
Evropská borůvka	$14,30\pm 1,63$	$1,09\pm 0,09$
Přesnídávka Hamánek	$2,94\pm 0,48$	$0,08\pm 0,01$
Ovocná složka jogurtu (Agro-la)	$2,04\pm 0,74$	$0,14\pm 0,01$
Ovocná složka jogurtu (Pilos)	$3,74\pm 0,05$	$0,22\pm 0,02$
Přesnídávka Hami	$15,56\pm 0,82$	$0,87\pm 0,01$
Přesnídávka Lupilu	$12,86\pm 1,16$	$0,67\pm 0,11$



Graf 3 Obsah celkových polyfenolů v extraktech.



Graf 4 Obsah celkových flavonoidů v extraktech.

5.1.2 Vyhodnocení výsledků HPLC analýzy

Pro vyhodnocení výsledků byl použit program Chromeleon 7.3 CDS, pomocí kterého byly zjištěny retenční časy, plochy a výšky píků analytů ve standardech a vzorcích. Na základě těchto údajů byly poté za pomoci programu Microsoft Office Excel 2016 provedeny potřebné výpočty. V příloze 2 jsou uvedeny chromatogramy jednotlivých vzorků.

5.1.2.1 Kvalitativní vyhodnocení vzorků

V extraktech borůvky evropské a borůvky kanadské byla zjištěna celá řada fenolických látek. Látky, které se podařilo identifikovat, jsou uvedeny semikvantitativně v Tabulce 7. Z této tabulky zjistíme, že více druhů aktivních látek obsahovala borůvka evropská. Obsah těchto látek mohou ovlivňovat faktory jako je geografická poloha růstu borůvek a environmentální podmínky během zrání plodů. Následně tento obsah BAL ovlivňuje také doba sklizně a podmínky skladování zralých plodů. Látky zjištěné v komerčních vzorcích jsou uvedeny v Tabulce 8. U přesnídávek bylo identifikováno více fenolických sloučenin než u ovocné složky jogurtů, což je dáno pestřejší skladbou různých druhů ovoce při výrobě těchto produktů. Kromě jogurtu Agro-la byl ve všech vzorcích detekován pelargonidin-3-glukosid, který je typický pro borůvky. Tento flavonoid byl detekován také u obou vzorků čistých borůvek, což je jeden z důkazů, že rostlinné složky komerčních výrobků byly vyrobeny z určitého podílu borůvek. Zde můžeme vycházet z práce [3], která pojednává o fenolickém složení borůvek z různých částí Evropy a vypovídá o možnosti použít specifický fenolický profil pro stanovení autenticity borůvek. Lze tak rozlišit borůvku evropskou od borůvky kanadské, ale i jednotlivé druhy na základě geografického původu.

Kromě evropské borůvky a jogurtu Agro-la byl také u všech vzorků detekován kvercetin-3-glukosid, který u komerčních výrobků může pocházet z kanadských borůvek, použitých pro výrobu rostlinných složek těchto produktů. U komerčních výrobků byla dále detekována kyselina chlorogenová a floridzin, které zřejmě pochází z jiných ovocných pyré obsažených v ovocné složce produktů, pravděpodobně z jablečného pyré. U jogurtu Agro-la byla jako jediná látka detekována kyselina gallová.

Možným důvodem, proč se v tomto vzorku nepodařilo identifikovat další fenolické látky může být, že tento výrobek obsahuje celkově příliš málo rostlinných složek ve své ovocné matici (8,1 g, nejméně ze všech vzorků, kapitola 4.1), nebo byla použita rostlinná složka jogurtu příliš zředěná.

Tabulka 7 Fenolické látky detekované pomocí HPLC s PDA detektorem u Evropské a Kanadské borůvky. Látka byla detekována (+), látka nebyla detekována (-).

Detekovaná látka	Borůvka evropská	Borůvka kanadská
Kys. Gallová	+	+
Kys. Kumarová	+	-
Kys. Kávová	-	+
Kyselina Vanilová	+	-
Katechin	+	-
Epikatechin	+	-
Pelargonidin-3-glukosid	+	+
Kvercetin-3-glukosid	-	+
Hesperidin	+	+
Resveratrol	+	-

Tabulka 8 Detekované látky pomocí HPLC s PDA detektorem v komerčních vzorcích (+) látka byla detekována, (-) látka nebyla detekována.

Detekovaná látka	P. Hamánek	J. Agrola	J. Pilos	P. Hami	P. Lupilu
Kys. Gallová	+	+	+	+	+
Kys. Chlorogenová	+	-	+	+	+
Kys. Kumarová	+	-	+	+	+
Katechin	+	-	-	+	-
Epikatechin	+	-	-	-	+
Pelargonidin-3-glukosid	+	-	+	+	+
Kvercetin-3-glukosid	+	-	+	+	+
Hesperidin	+	-	+	+	+
Floridzin	+	-	-	+	+

5.1.2.2 Kvantitativní vyhodnocení fenolických látek

Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno na základě kalibračních křivek standardů níže uvedených fenolických sloučenin a plochy píku u identifikovaných sloučenin ve vzorcích. Kalibrační závislost byla měřena v rozsahu koncentrací 1–0,001 mg·ml⁻¹. Tabulka 9 zobrazuje směrnice lineární regrese jednotlivých standardů a jejich korelační koeficienty. Výpočty byly provedeny pomocí programu MS Excel 2016. Nebyly vyhodnoceny limity detekce a stanovitelnosti, proto je toto stanovení bráno jako předběžné a orientační.

V Tabulce 10 jsou zobrazeny hodnoty koncentrace jednotlivých fenolických látek u evropské a kanadské borůvky v mg·ml⁻¹ extraktu. Z látek, které byly změřeny u obou vzorků, má evropská borůvka více pelargonidin–3–glukosidu. U kanadské borůvky bylo detekováno více hesperidinu a kyseliny gallové. V porovnání s komerčními vzorky obsahovala evropská borůvka více katechinu, epikatechinu i kyseliny vanilové.

Z komerčních výrobků má nejvíce kvercetin a pelargonidin přesnídávka Hamánek. U jogurtu Pilos bylo změřeno nejvyšší množství kyseliny kumarové a hesperidinu. U přesnídávky Hami bylo změřeno nejvyšší množství kyseliny vanilové a u přesnídávky Lupilu bylo nejvíce floridzinu a kyseliny chlorogenové. Všechny naměřené hodnoty a hodnoty některých dalších látek jsou uvedeny v Tabulce 11. Na Obrázku 12 je zobrazen chromatogram přesnídávky Lupilu. Jelikož se u přesnídávek i ovocných složek jogurtů používá více druhů ovoce, nelze s přesností určit, jak koresponduje obsah naměřených fenolických látek s obsahem borůvkové složky v produktech.

Tabulka 9 Směrnice kalibračních standardů podle rovnice $y=a \cdot x$ a hodnoty korelačních koeficientů R^2 .

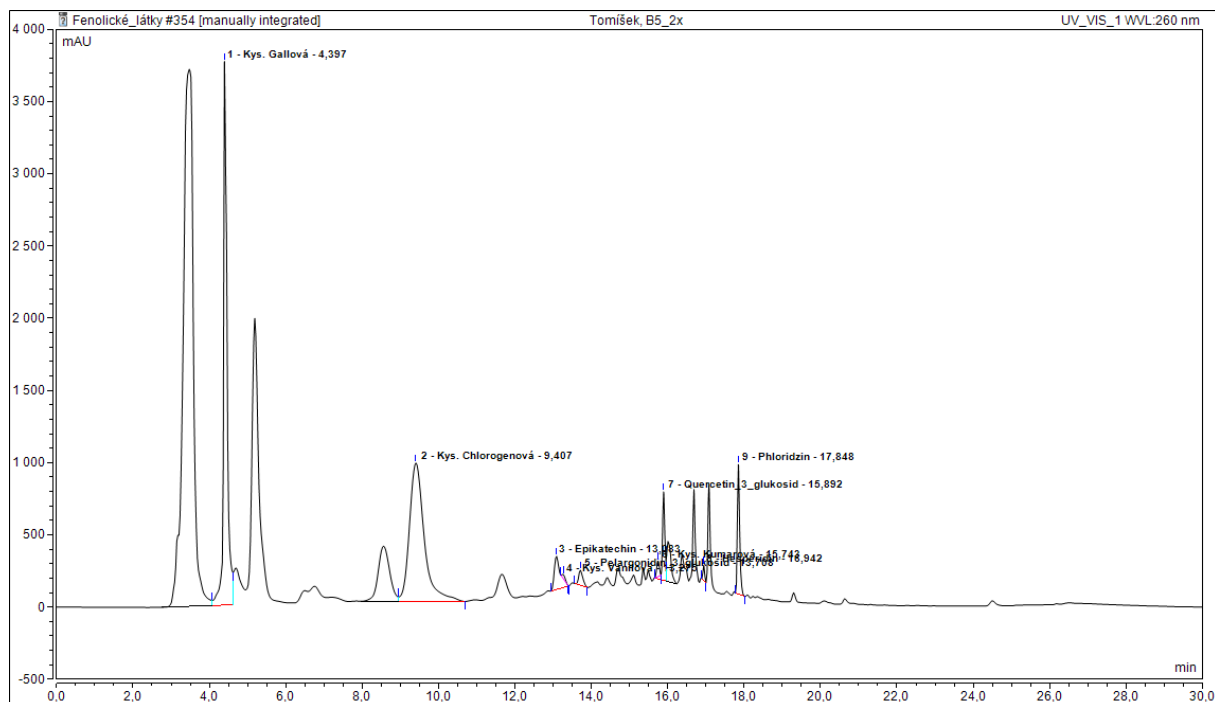
Standardy	a	R ²
Kys. gallová	5315,7	0,8853
Kys. kumarová	4962,2	0,9962
Kys. kávová	2047,2	0,9988
Kys. Chlorogenová	639,47	0,9851
Kys. Vanilová	4707,1	0,994
Pelargonidin-3-glukosid	6535	0,9999
Kvercetin-3-glukosid	19347	0,9942
Katechin	565,62	0,9896
Epikatechin	1154	0,9923
Hesperidin	3246,3	0,9974
Floridzin	3605,7	0,9895
Resveratrol	3036,8	0,9166

Tabulka 10 Kvantitativní HPLC analýza individuálních fenolických látek a jejich koncentrace [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$] extraktu z borůvek N=nedetekováno

	Borůvka kanadská	Borůvka evropská
Kyselina gallová	$1,58\cdot 10^{-3}$	$1,49\cdot 10^{-4}$
Kyselina kumarová	N	$3,89\cdot 10^{-5}$
Pelargonidin–3–glukosid	$5,17\cdot 10^{-5}$	$1,29\cdot 10^{-4}$
Kvercetin–3–glukosid	$2,06\cdot 10^{-4}$	N
Katechin	N	$4,41\cdot 10^{-4}$
Epikatechin	N	$1,81\cdot 10^{-3}$
Hesperidin	$3,73\cdot 10^{-4}$	$1,89\cdot 10^{-4}$
Kyselina kávová	$4,01\cdot 10^{-4}$	N
Kyselina vanilová	N	$1,93\cdot 10^{-4}$
Resveratrol	N	$3,40\cdot 10^{-5}$

Tabulka 11 Kvantitativní HPLC analýza individuálních fenolických látek a jejich koncentrace [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$] v extraktu z komerčních výrobků s obsahem ovocné složky. N=nedetekováno

	Přesnídávka Hamánek	Ovocná složka j. Agro-la	Ovocná složka j. Pilos	Přesnídávka Hami	Přesnídávka Lupilu
Kyselina gallová	$7,32\cdot 10^{-4}$	$2,90\cdot 10^{-5}$	$1,52\cdot 10^{-4}$	$4,46\cdot 10^{-4}$	$7,92\cdot 10^{-4}$
Kyselina kumarová	$7,27\cdot 10^{-6}$	N	$8,07\cdot 10^{-5}$	$1,28\cdot 10^{-5}$	$1,74\cdot 10^{-5}$
Kyselina chlorogenová	$2,38\cdot 10^{-3}$	N	$9,77\cdot 10^{-4}$	$6,09\cdot 10^{-3}$	$6,75\cdot 10^{-3}$
Kyselina vanilová	N	N	N	$1,61\cdot 10^{-4}$	$5,80\cdot 10^{-6}$
Pelargonidin–3–glukosid	$4,74\cdot 10^{-5}$	N	$2,09\cdot 10^{-5}$	$3,80\cdot 10^{-6}$	$1,97\cdot 10^{-5}$
Kvercetin–3–glukosid	$5,47\cdot 10^{-5}$	N	$9,67\cdot 10^{-6}$	$2,18\cdot 10^{-5}$	$2,30\cdot 10^{-5}$
Katechin	$1,21\cdot 10^{-4}$	N	N	$1,95\cdot 10^{-4}$	N
Epikatechin	$5,01\cdot 10^{-4}$	N	N	$3,68\cdot 10^{-5}$	$3,68\cdot 10^{-4}$
Hesperidin	$9,83\cdot 10^{-5}$	N	$9,88\cdot 10^{-5}$	$6,40\cdot 10^{-6}$	$1,62\cdot 10^{-5}$
Floridzin	$2,74\cdot 10^{-5}$	N	N	$5,06\cdot 10^{-5}$	$1,75\cdot 10^{-4}$



Obrázek 12 Chromatogram fenolických látek v extraktu vzorku č. 5 (Přesnídávka Lupilu)

5.2 Využití molekulárně diagnostických metod ke stanovení autenticity výrobků s obsahem borůvek

Byla provedena analýza DNA izolované z plodů evropské a kanadské borůvky a pěti komerčních vzorků obsahující borůvkou složku. Obsah deklarované borůvkové složky v komerčních výrobcích je uveden v kapitole 4.1. Izolace DNA byla provedena izolačními kity popsány v 4.3.2. Byla provedena také izolace DNA pomocí CTAB protokolu v kapitole 4.3.1.

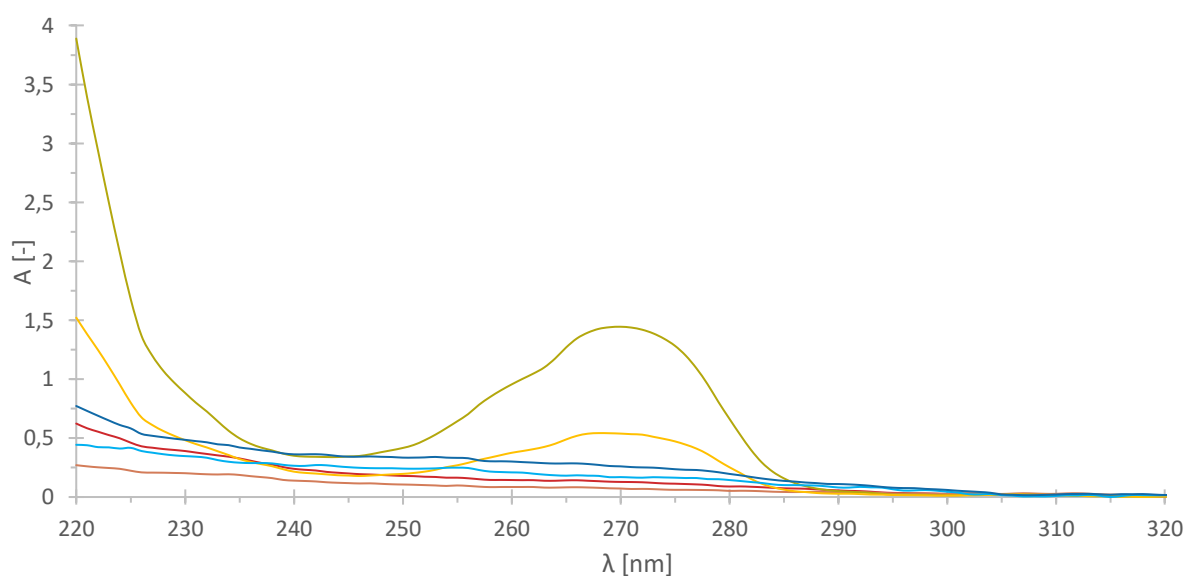
5.2.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA bylo provedeno na přístroji NanoDrop Spectrophotometer 2000. Postup je uveden v kapitole 4.3.3. V Tabulce 12 jsou uvedeny koncentrace izolované DNA z obou druhů borůvek podle použitých metod. Na Obrázku 13 jsou zobrazeny absorpční křivky izolované DNA protokolem CTAB a kitem A (Elisabeth Pharmacon) a kitem B (Perkin Elmer). Pro qPCR a následnou HRM analýzu byla použita DNA izolovaná pomocí kity A, a to z důvodu dostatečné koncentrace DNA a její čistoty, o které vypovídá poměr absorbancí A260/A280.

DNA izolovaná kitem B dosahuje sice vyšší čistoty než u kity A, kitem B se, ale izolovalo daleko méně DNA. DNA izolovaná CTAB protokolem dosahuje nejvyšší změřené koncentrace DNA, tedy nejvyšší výtěžky. DNA izolovaná tímto způsobem však vykazuje nejnižší čistotu. O tom vypovídá Obrázek 13, kde jsou v absorpčních spektrech DNA izolované CTAB protokolem píky s maximem přibližně 270 nm. Tyto píky značí kontaminaci DNA izolátů chemikáliemi použitými při její izolaci. Absorpční spektra DNA izolované kitem A z komerčních vzorků výrobků s rostlinnou složkou jsou zobrazeny na Obrázku 14. V Tabulce 13 jsou uvedeny koncentrace izolované DNA z jednotlivých vzorků a jejich čistota. Nejvyšší koncentrace DNA byla naměřena u jogurtu Pilos a nejmenší u přesnídávky Hami.

Tabulka 12 Koncentrace a čistota DNA izolované z borůvky evropské a kanadské a naměřené absorbance podle jednotlivých použitých kitů. Izolovaná DNA byla eluována ve 100 μ l elučního pufru

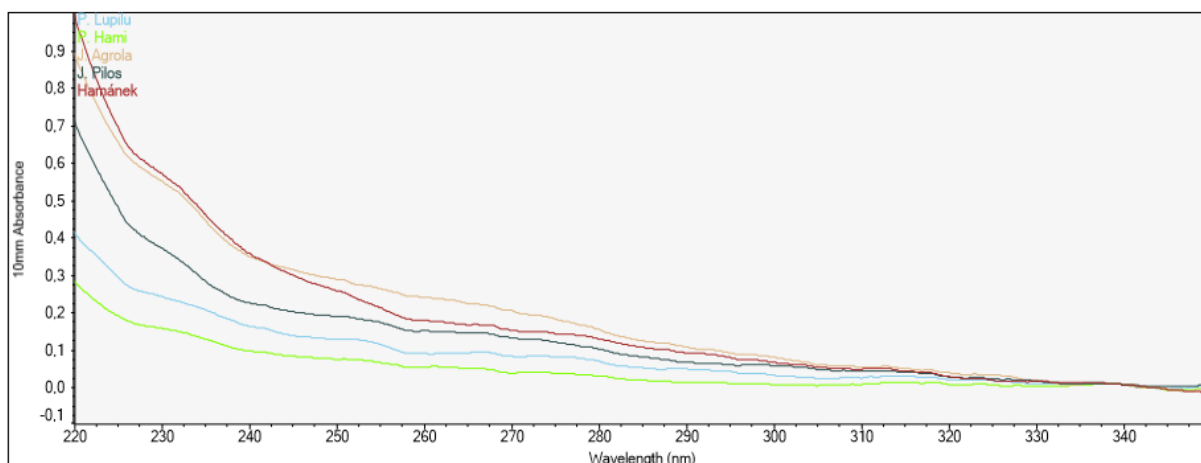
	Kit A		Kit B		CTAB	
	EB	KB	EB	KB	EB	KB
c [ng/μl]	15,0	10,4	4,2	7,2	18,7	47,8
A 260	0,301	0,209	0,085	0,144	0,375	0,665
A 280	0,196	0,144	0,052	0,089	0,253	0,665
A 260/280	1,54	1,46	1,63	1,61	1,48	1,44
A 260/230	0,62	0,60	0,42	0,37	0,78	1,08



Obrázek 13 Absorpční spektrum DNA izolované z borůvky evropské a kanadské kitem A, kitem B a protokolem CTAB.

Tabulka 13 Koncentrace a čistota DNA izolované z komerčních výrobků. DNA byla izolována izolačním kitem A. Izolovaná DNA byla eluována ve 100 μ l elučního pufru.

	Přesnídávka Hamánek	Jogurt Agro-la	Jogurt Pilos	Přesnídávka Hami	Přesnídávka Lupilu
c [ng/μl]	8,6	7,2	11,7	2,3	4,1
A 260	0,171	0,144	0,234	0,046	0,083
A 280	0,123	0,096	0,148	0,023	0,064
A 260/280	1,40	1,50	1,59	2,00	1,31
A 260/230	0,30	0,39	0,43	0,31	0,35



Obrázek 14 Absorpční spektra DNA izolované z komerčních výrobků.

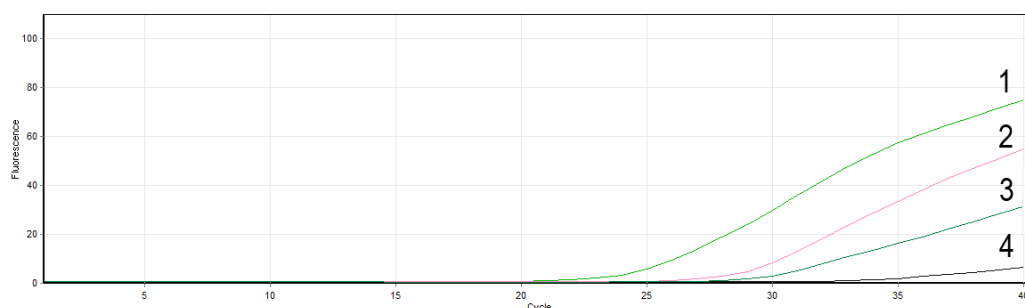
5.2.2 Výsledky qPCR a analýzy křivek tání za použití primerů ITS 2

Byla provedena qPCR na přístroji Rotor-gene 6000. Reakční směsi byly připraveny podle postupu v kapitole 4.3.4 Výsledky byly vyhodnoceny pomocí stejnojmenného programu. Byla použita DNA izolovaná kitem A. Orientační analýza křivek tání byla provedena na stejném přístroji se změnou teploty 0,1 °C/s.

5.2.2.1 Ověření amplifikovatelnosti DNA plodů borůvek

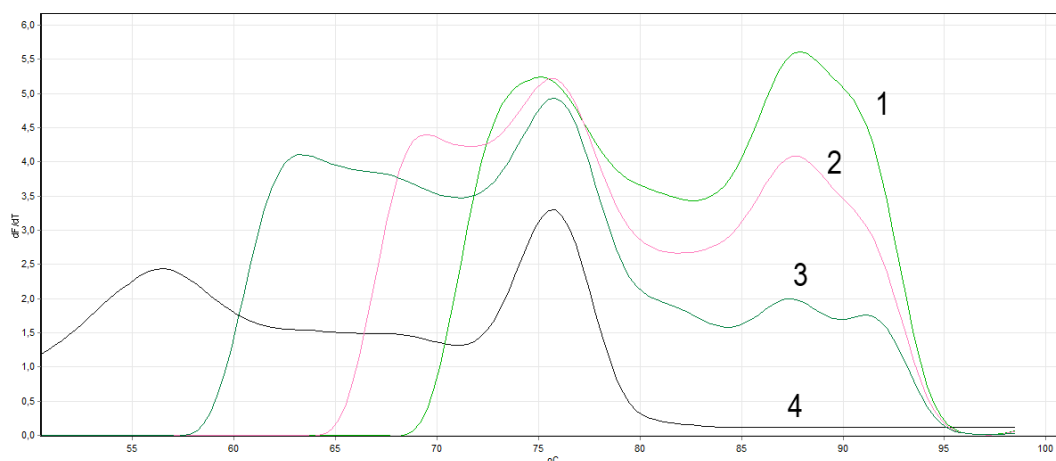
Pro ověření amplifikovatelnosti DNA izolované z plodů borůvek byly využity primery ITS2. Amplifikační křivky jsou zobrazeny na Obrázku 15. K detekci qPCR produktů došlo u pozitivní kontroly ve 23. cyklu. U vzorků borůvky evropské a kanadské došlo k detekci qPCR produktů později, a to v 27. cyklu.

Výsledek analýzy křivek tání je zobrazen na Obrázku 16. Z tohoto obrázku je patrné, že specifické amplikony pozitivní kontroly a evropské borůvky měly teplotu tání 87,7 °C. U vzorku kanadské borůvky jsou patrné dva píky při teplotách tání 87,5 °C a 91,1 °C. DNA izolované z borůvky evropské a kanadské byly amplifikovány a dále využity jako pozitivní kontroly při qPCR komerčních vzorků a analýze křivek tání.



Křivka	1	2	3	4
Vzorek	Pozitivní kontrola	Evropská borůvka	Kanadská borůvka	Neg. kontrola

Obrázek 15 qPCR vzorků borůvek za použití ITS 2 primerů.

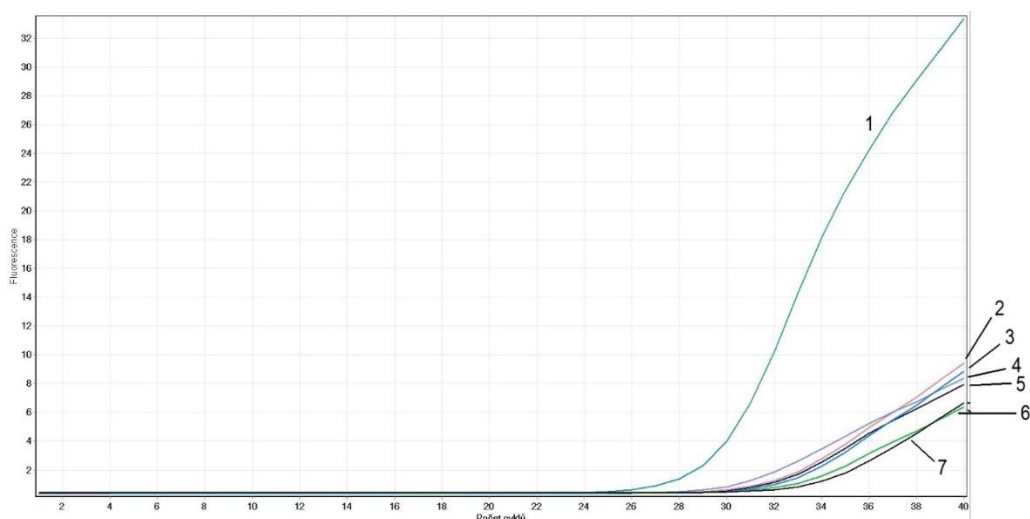


Křivka	1	2	3	4
Vzorek	Pozitivní kontrola	Evropská borůvka	Kanadská borůvka	Neg. kontrola

Obrázek 16 Analýza křivek tání vzorků borůvek za použití primerů ITS 2.

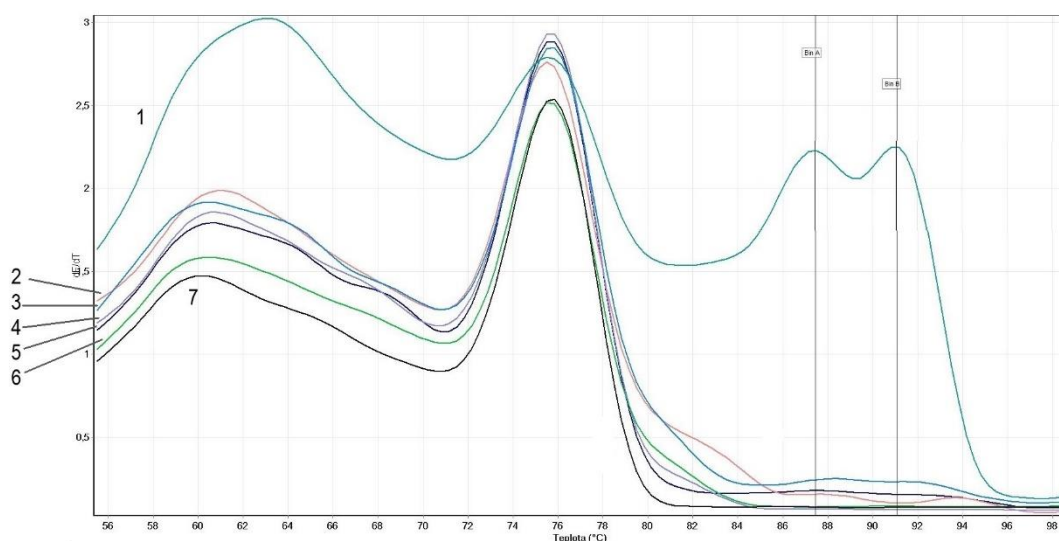
5.2.2.2 Ověření amplifikovatelnosti DNA izolované z komerčních výrobků za použití ITS 2 primerů

Pro ověření amplifikovatelnosti DNA izolované z komerčních výrobků s rostlinnou složkou byly opět využity primery ITS2. Amplifikační křivky jsou zobrazeny na Obrázku 17. U pozitivní kontroly byly produkty PCR detekovány v 25. amplifikačním cyklu. U komerčních vzorků došlo k detekci PCR produktů později, a to v 30–32 amplifikačním cyklu. Z Obrázku 18 je patrné, že u komerčních výrobků sice došlo k amplifikaci DNA, avšak vzniklo při ní výrazně menší množství specifických produktů než u DNA z plodů borůvek, která byla využita jako pozitivní kontrola. Píky komerčních vzorků, pozitivní i negativní kontroly s maximem při teplotě 75,5 °C jsou dimery primerů.



Křivka	1	2	3	4	5	6	7
Vzorek	Pozitivní kontrola	J. Agrola	P. Hami	J. Pilos	P. Hamánek	P. Lupilu	Negativní kontrola

Obrázek 17 qPCR komerčních vzorků za použití primerů ITS 2.

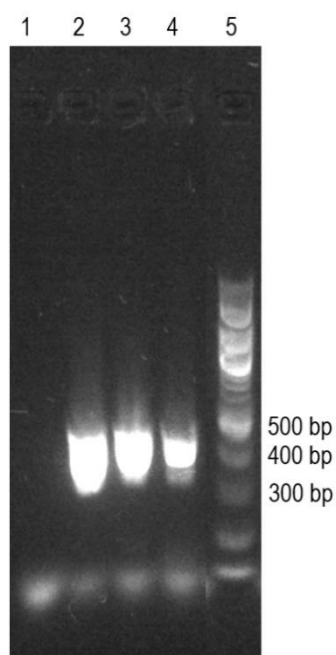


Křivka	1	2	3	4	5	6	7
Vzorek	Pozitivní kontrola	J. Agrola	P. Hami	J. Pilos	P. Hamánek	P. Lupilu	Neg. kontrola

Obrázek 18 Analýza křivek tání za použití ITS 2 primerů.

5.2.3 Elektroforéza qPCR produktů borůvky evropské a borůvky kanadské po ověření amplifikovatelnosti s primery ITS 2

Elektroforéza produktů PCR za použití ITS 2 primerů byla provedena v 1,2% agarozovém gelu. Její výsledek je zobrazen na Obrázku 19. Fragменты amplifikované DNA mají velikost přibližně 400 bp. Na gelu jsou také vidět dimery primerů.

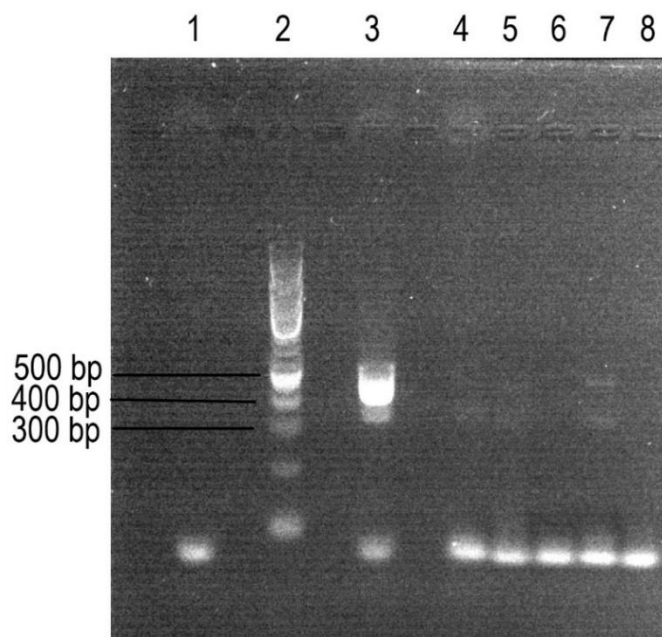


Běh	DNA	Detekce
1	Neg. kontrola	-
2	Pozitivní kontrola	+++
3	Evropská borůvka	+++
4	Kanadská borůvka	+++
5	DNA standard 100 bp	-

Obrázek 19 agarózový gel produktů qPCR pro ověření amplifikovatelnosti za použití ITS 2 primerů (+, ++, +++, intenzita detekovaného produktu PCR; - produkt PCR nebyl detekován)

5.2.4 Elektroforéza produktů qPCR u komerčních výrobků s primery ITS 2

Výsledek elektroforézy produktů qPCR je zobrazen na Obrázku 20. Opět je zde vidět výrazný band pozitivní kontroly (500–400 bp). Byly slabě detekovány také produkty qPCR u komerčních výrobků, a to u přesnídávky Hamánek, jogurtu Agro-la a přesnídávky Hami. DNA v těchto komerčních vzorcích byla špatně amplifikovatelná. Příčinou mohla být kontaminace v izolátech DNA z komerčních výrobků, které do určité míry mohly inhibovat qPCR reakci.



Běh	DNA	Detekce	Běh	DNA	Detekce
1	Neg. kontrola	-	5	J. Agrola	+
2	DNA Standard 100 bp	-	6	J. Pilos	-
3	Pozitivní kontrola Ev. borůvka	+++	7	P. Hami	+
4	P. Hamánek	+	8	P. Lupilu	-

Obrázek 20 agarózový gel produktů qPCR za použití ITS 2 primerů (+, ++, +++, intenzita detekovaného produktu PCR; - produkt PCR nebyl detekován)

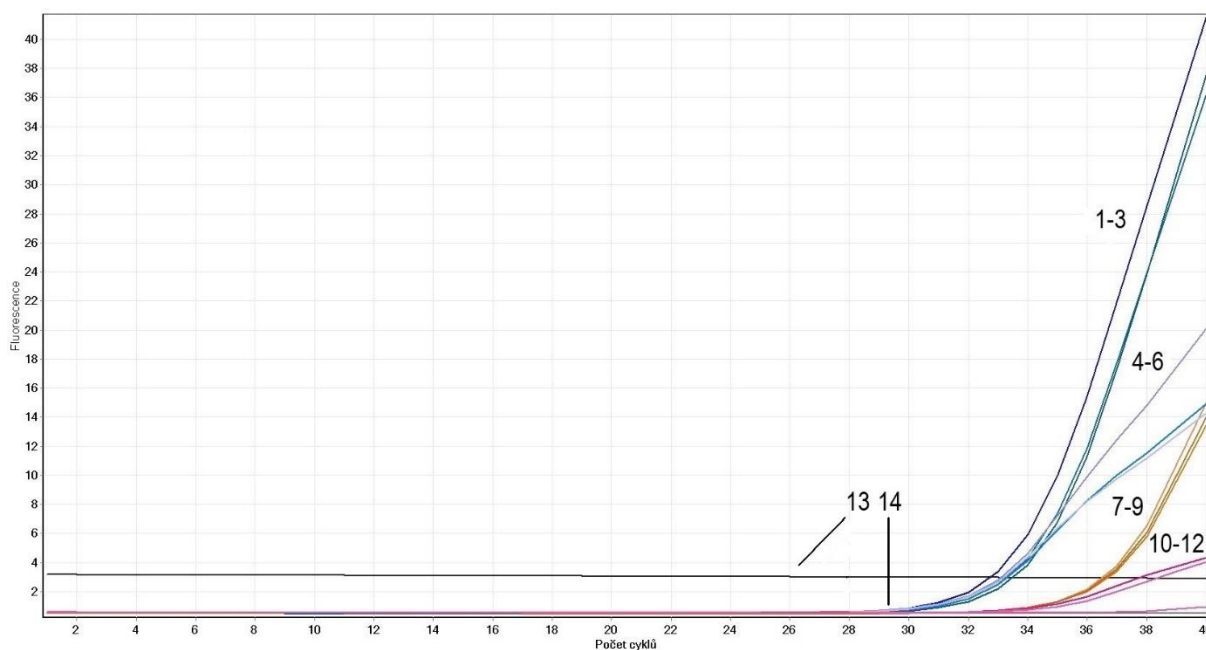
5.2.5 Výběr specifických primerů pro detekci borůvek ve vybraných komerčních vzorcích potravin s ovocnou složkou

5.2.5.1 Ověření funkčnosti primerů BHLH 1 a BHLH 3

Byla provedena qPCR za použití dvou různých párů primerů, a to BHLH 1 a BHLH 3. Sekvence těchto primerů jsou uvedeny v kapitole 4.3.4 v Tabulce 3. Obrázek 21 zobrazuje amplifikaci qPCR produktů z borůvky evropské a kanadské s oběma páry primerů.

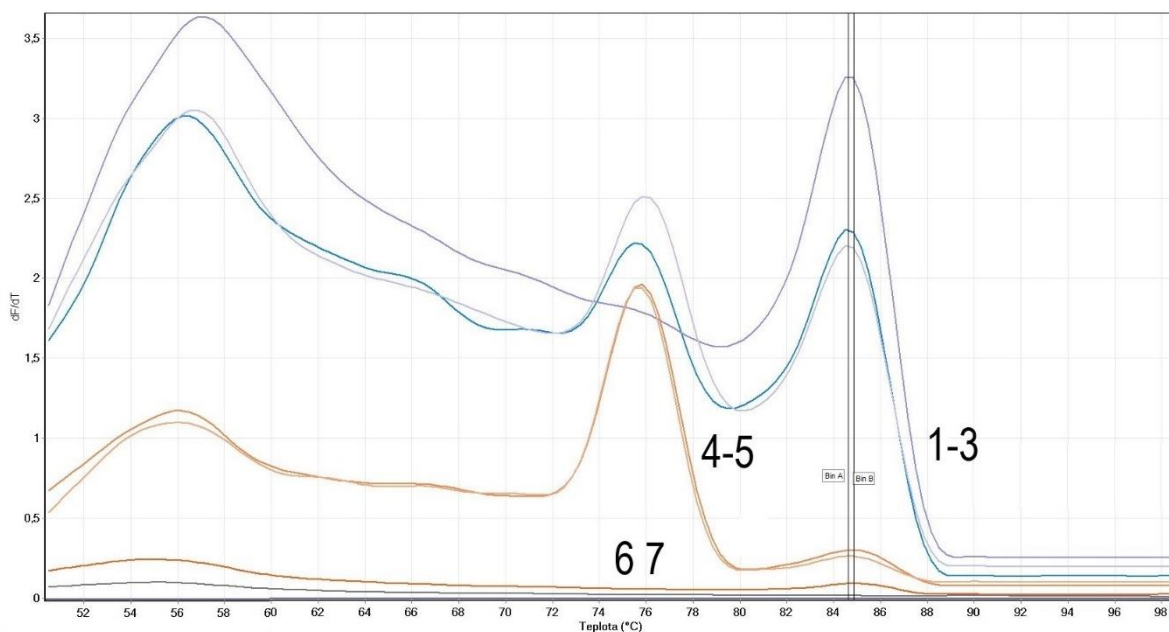
Produkty primerů BHLH 3 byly detekovány ve 30. amplifikačním cyklu, zatímco produkty primerů BHLH 1 byly detekovány ve 34. amplifikačním cyklu. Obrázek 22 zobrazuje křivky tání amplikonů vzniklých pomocí primerů BHLH 1. Jsou zde vidět píky s teplotou tání přibližně 74–75 °C a jedná se o dimery primerů, jak potvrzuje i výsledek následné elektroforózy těchto vzorků na Obrázku 28. Další píky jsou viditelné při teplotě 84,4 °C (evropská borůvka) a 84,5 °C (kanadská borůvka), což je produkt těchto primerů. Obrázek 23 zobrazuje analýzu křivek tání amplikonů vzniklých pomocí primerů BHLH 3. Píky specifických produktů těchto primerů se nachází u evropské borůvky při teplotě přibližně 83,4 °C a u kanadské borůvky při teplotě přibližně 84,0 °C.

Oba typy primerů fungovaly pro borůvkovou DNA Pro detekci borůvek v potravinách rostlinného původu byly vyhodnoceny primery BHLH 3 jako vhodnější. Prvním důvodem je vyšší účinnost PCR jak v reakcích s DNA plodů borůvek, tak i v reakcích s DNA izolovanou z komerčních výrobků. Dalším důvodem je větší rozdíl teplot tání specifických produktů ve srovnání s primery BHLH 1.



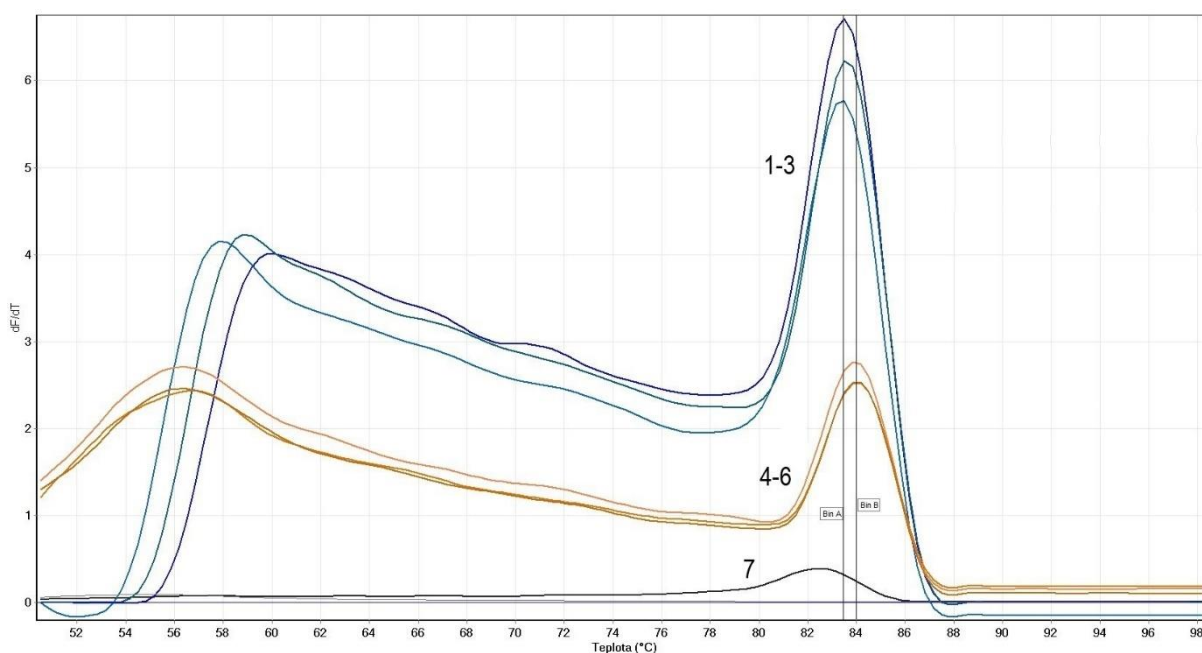
Křivky	1-3	4-6	7-9	10-12	13	14
Vzorky	Ev. borůvka	Kn. borůvka	Ev. borůvka	Kn. Borůvka	Neg. kontrola	Neg. kontrola
Primery	BHLH 3	BHLH 3	BHLH 1	BHLH 1	BHLH 3	BHLH 1

Obrázek 21 qPCR borůvky evropské a kanadské provedené v triplicátech za použití primerů BHLH 1 a BHLH 3



Křivky	1-3	4-5	6	7
Vzorek	Ev. borůvka	Kn. borůvka	Kn. borůvka	Negativní kontrola

Obrázek 22 Analýza křivek tání za použití primerů BHLH 1

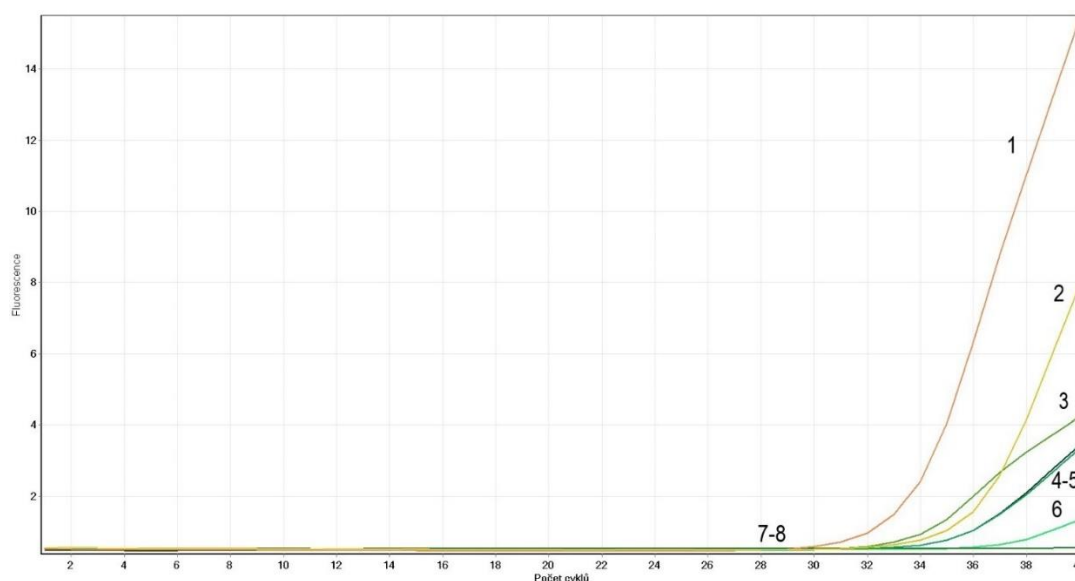


Křivky	1-3	4-6	7
Vzorek	Ev. borůvka	Kn. borůvka	Negativní kontrola

Obrázek 23 Analýza křivek tání za použití primerů BHLH 3

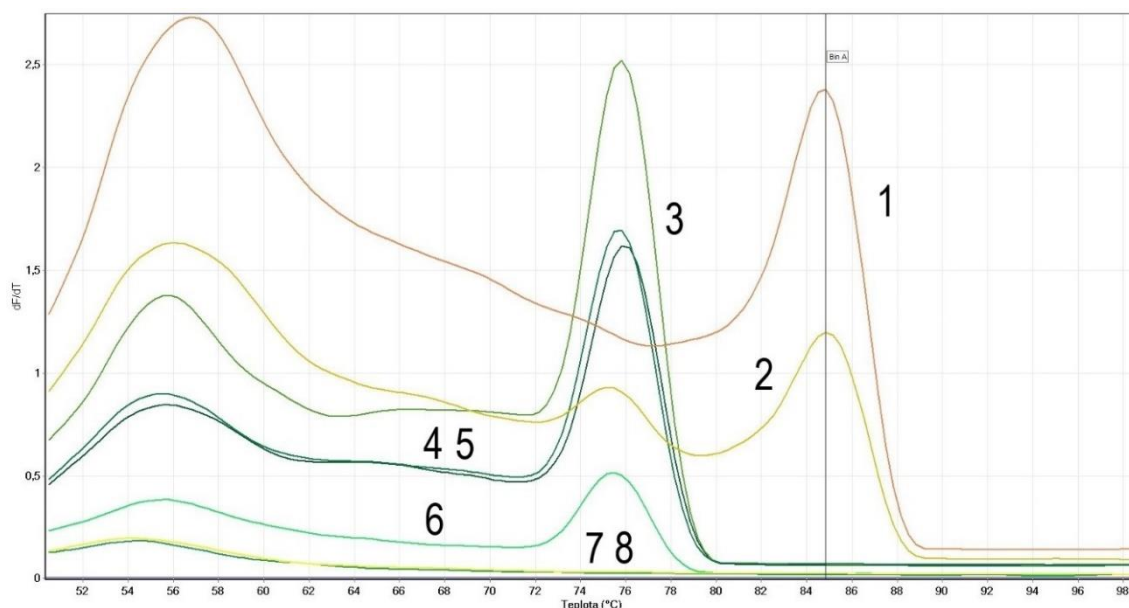
5.2.5.2 Výsledky qPCR za použití primerů BHLH 1 u komerčních výrobků.

Obrázek 24 zobrazuje amplifikaci produktů qPCR. Produkt qPCR byl detekován u pozitivní kontroly evropské borůvky ve 30. cyklu, u komerčních vzorků a pozitivní kontroly kanadské borůvky od 32. cyklu. Analýza křivek tání zobrazená na Obrázku 25 však ukázala, že se specifický produkt u izolátů DNA z komerčních výrobků, amplifikovaných těmito primery, nevytvořil. Amplikony pozitivních kontrol viditelných na Obrázku 25 mají teplotu tání srovnatelnou s teplotou tání uvedenou v kapitole 5.2.5.1. Amplifikace DNA izolátů z komerčních výrobků s primery BHLH 1 nebyla úspěšná, z tohoto důvodu byla HRM analýza provedena pouze u izolátů DNA z komerčních výrobků s použitím primerů BHLH 3. Důvodem neúspěšné amplifikace může být kontaminace v izolátech DNA u komerčních vzorků a následná inhibice qPCR reakce s těmito primery.



Křivka	1	2	3	4	5	6	7	8
Vzorek	Ev. borůvka	Kn. borůvka	J. Pilos	P. Hami	P. Hamánek	J. Agrola	P. Lupilu	Neg. kontrola

Obrázek 24 qPCR komerčních vzorků s pozitivními kontrolami.

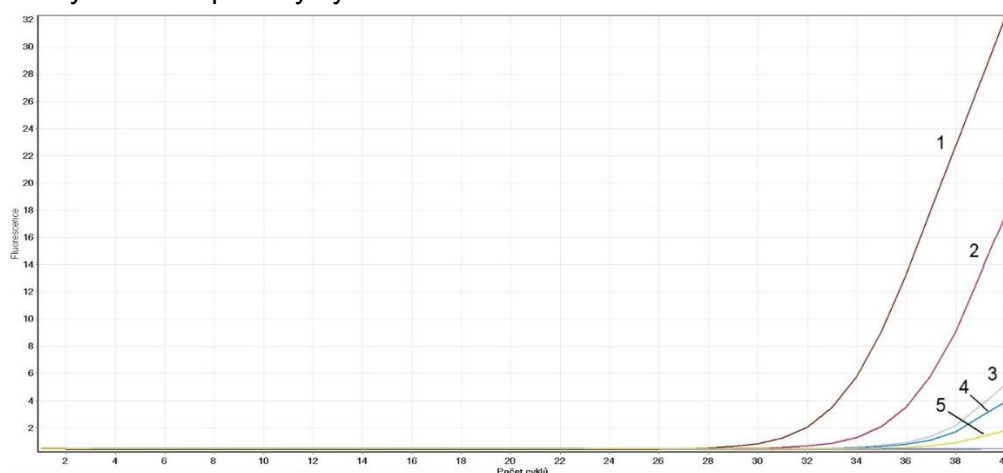


Křivka	1	2	3	4	5	6	7	8
Vzorek	Ev. borůvka	Kn. borůvka	J. Pilos	P. Hamánek	P. Hami	J. Agrola	P. Lupilu	Neg. kontrola

Obrázek 25 Analýza křivek tání u komerčních výrobků.

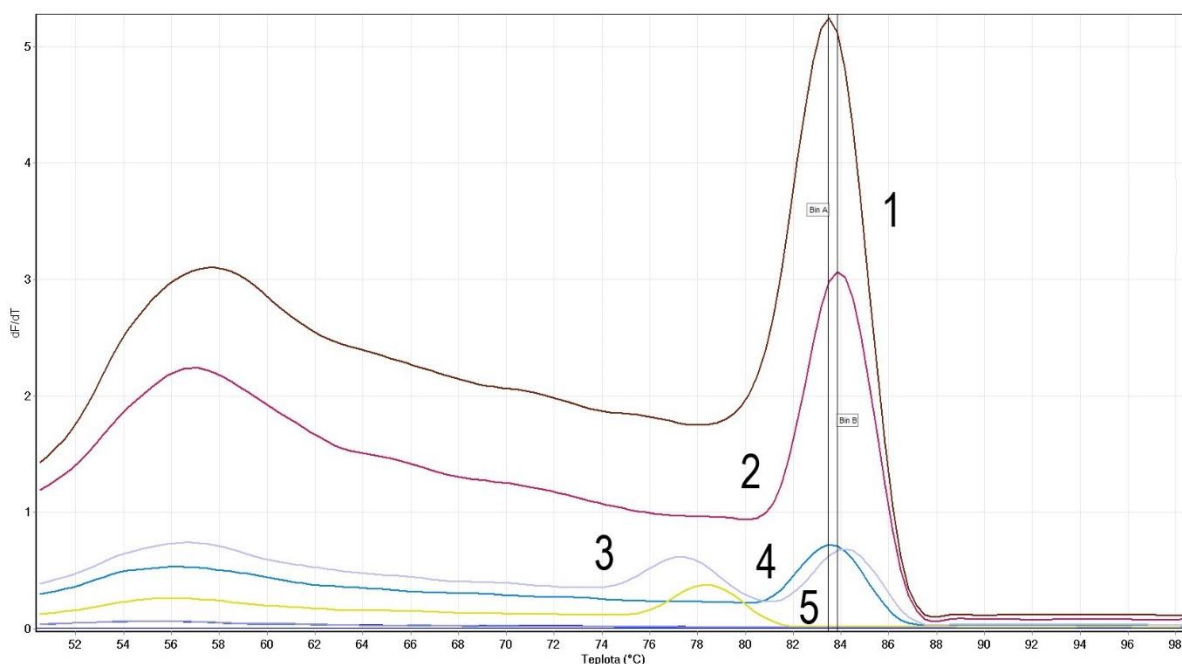
5.2.5.3 Výsledky qPCR a analýza křivek tání s primery BHLH 3 u komerčních výrobků

Obrázek 26 zobrazuje amplifikaci produktů qPCR. Produkt qPCR byl detekován u pozitivní kontroly evropské borůvky ve 28. cyklu a u pozitivní kontroly kanadské borůvky ve 30. cyklu. Produkty qPCR u izolátů DNA z komerčních výrobků byly detekovány ve 34. cyklu. Analýza křivek tání zobrazená na Obrázku 27 ukázala, že se specifický produkt u komerčních výrobků amplifikovaných těmito primery vytvořil.



Křivka	1	2	3	4	5
Vzorek	Ev. borůvka	Kn. borůvka	P. Lupilu	J. Pilos	Neg. kontrola

Obrázek 26 qPCR komerčních vzorků s pozitivními kontrolami za použití primerů BHLH 3.



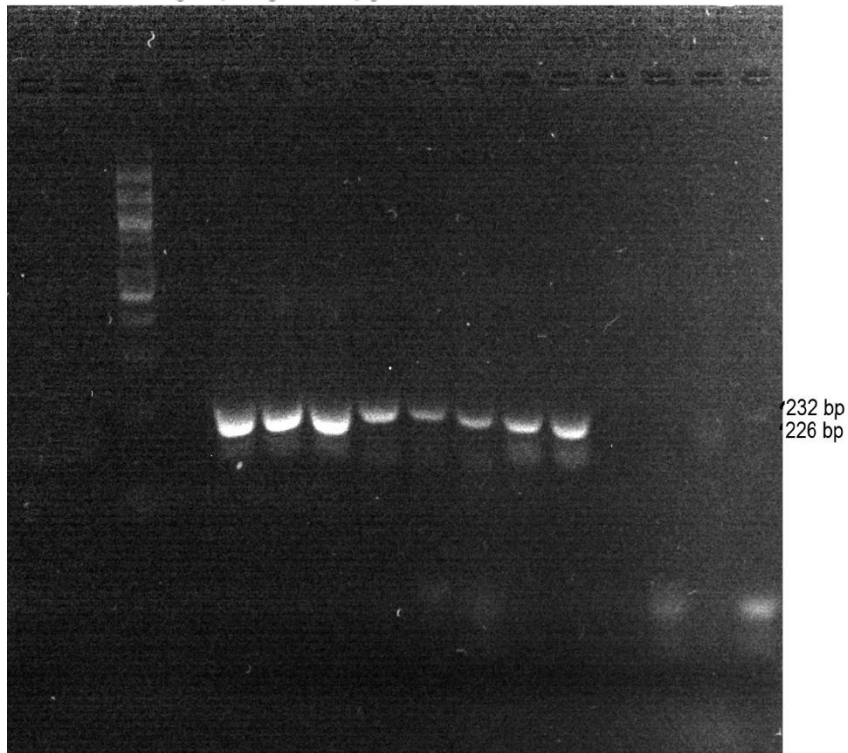
Křivka	1	2	3	4	5
Vzorek	Ev. borůvka	Kn. borůvka	P. Lupilu	J. Pilos	Neg. kontrola

Obrázek 27 Analýza křivek tání s primery BHLH 3 u komerčních výrobků.

5.2.6 Elektroforéza produktů qPCR s primery BHLH 1 a BHLH 3

Byla provedena elektroforéza produktů qPCR ve 2% agarozovém gelu. Fragmenty amplifikované těmito primery u evropské a kanadské borůvky jsou uvedeny na Obrázku 28. Analýza byla provedena v triplicátech. Obrázek 29 popisuje elektroforézu komerčních výrobků a evropské a kanadské borůvky použité jako pozitivní kontroly. PCR produkty pro amplikony syntetizované primery BHLH 1 mají velikost 232 bp a 226 bp pro amplikony syntetizované primery BHLH 3 podle [32]. DNA se amplifikovala primery BHLH 1 pouze u pozitivních kontrol. U primerů BHLH 3 se amplifikovala DNA i u některých komerčních výrobků, a to u jogurtu Pilos a přesnídávky Lupilu.

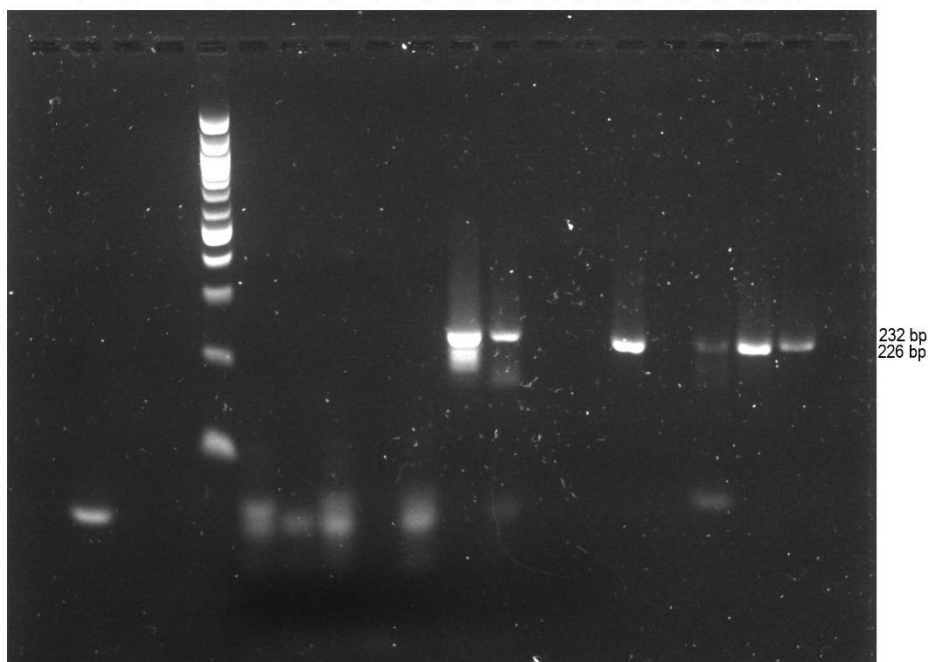
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Běh	DNA	Detekce	Běh	DNA	Detekce
1	Neg. kontrola BHLH 3	-	8	Ev. borůvka BHLH 1	++
2	Neg. kontrola BHLH 1	-	9	Kn. borůvka BHLH 3	++
3	DNA Standard 100 bp	-	10	Kn. borůvka BHLH 3	++
4	Ev. borůvka BHLH 3	+++	11	Kn. borůvka BHLH 3	-
5	Ev. borůvka BHLH 3	+++	13	Kn. borůvka BHLH 1	-
6	Ev. borůvka BHLH 3	+++	14	Kn. borůvka BHLH 1	+
7	Ev. borůvka BHLH 1	+++	15	Kn. borůvka BHLH 1	+
8	Ev. borůvka BHLH 1	+++			

Obrázek 28 Agarózový gel produktů qPCR z borůvky evropské a kanadské (+, ++, +++, intenzita detekovaného produktu PCR; - produkt PCR nebyl detekován)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



Běh	DNA	Detekce	Běh	DNA	Detekce
1	Negativní kontrola BHLH 1	-	10	Pozitivní kontrola Kn. borůvka	++
2	Negativní kontrola BHLH 3	-	11	P. Hamánek	-
3	DNA Standard 100 bp	-	12	J. Agrola	-
4	P. Hamánek	-	13	J. Pilos	+++
5	J. Agrola	-	14	P. Hami	-
6	J. Pilos	-	15	P. Lupilu	+
7	P. Hami	-	16	Pozitivní kontrola Ev. borůvka	+++
8	P. Lupilu	-	17	Pozitivní kontrola Kn. borůvka	++
9	Pozitivní kontrola Ev. borůvka	+++			

Obrázek 29 Agarózový gel produktů PCR izolovaných z komerčních výrobků kitem Eligene. (+, ++, +++, intenzita detekovaného produktu PCR; - produkt PCR nebyl detekován). V běhu 3–10 byly použity primery BHLH 1 u běhu 11–17 primery BHLH 3.

5.2.7 Výsledky HRM analýzy DNA izolátů z borůvek a komerčních výrobků s ovocnou složkou

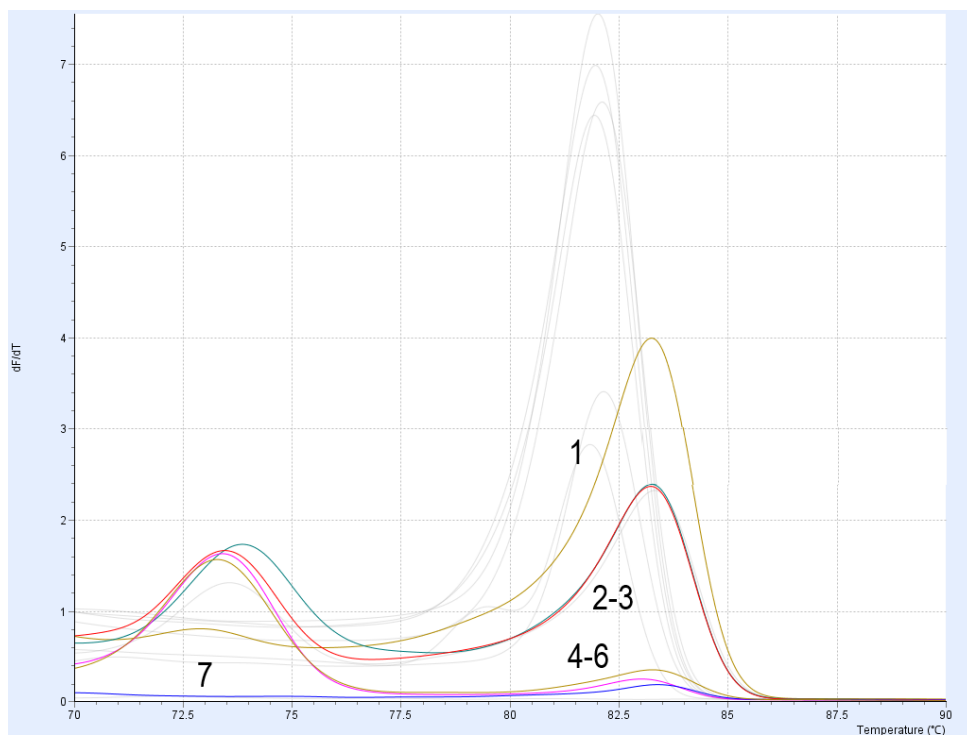
Amplikony byly podrobeny HRM analýze na přístroji LightCycler v rozsahu teplot 50–99 °C se změnou teploty 0,01 °C/s. Byla provedena HRM analýza izolátů DNA z evropské a kanadské borůvky za použití dvojice různých primerů. Obrázek 30 zobrazuje HRM analýzu s primery BHLH 1. Na tomto obrázku jsou patrné dvojice píků. Píky s teplotou tání přibližně 73–74 °C patří opět dimerům primerů. Druhé píky jsou specifické amplikony. Teplota tání amplikonů izolovaných z borůvky evropské je 83,24 °C a u amplikonů z borůvky kanadské 83,21 °C. Rozdíl teplot tání amplikonů nebyl v tomto případě dostatečný pro rozlišení evropské borůvky a kanadské borůvky. Obrázek 31 zobrazuje HRM analýzu s primery BHLH 3. Na tomto obrázku jsou patrné pouze píky specifických produktů těchto primerů. Teplota tání amplikonů z borůvky evropské je 81,96 °C a teplota tání amplikonů borůvky kanadské je 82,34 °C. Rozdíl teplot tání amplikonů byl v tomto případě dostatečný k rozlišení evropské borůvky a kanadské borůvky, čímž byl potvrzen závěr z předchozích kapitol, že primery BHLH 3 jsou vhodnější pro detekci borůvek v potravinách a identifikaci jejich druhu.

HRM analýzu izolátů DNA z komerčních výrobků s primery BHLH 3 zobrazuje Obrázek 32. Specifické amplikony byly detekovány u jogurtu Pilos (křivka 4) a u přesnídávky Lupilu (křivka 3). Jelikož amplikony DNA borůvky evropské a kanadské bude mít jiný poměr A/T a G/C bází, tím budou mít i různou teplotu tání v závislosti na tomto poměru. DNA kanadské borůvky bude pravděpodobně obsahovat vyšší počet G/C bází, a proto má o trochu vyšší teplotu tání než její evropská verze. Změny v teplotě tání budou patrné i u různých odrůd stejného druhu, protože mohou mít trochu jinou sekvenci DNA, kde se může nacházet více těchto bází [43].

Podle teploty tání se bude v jogurtu Pilos spíše nacházet borůvka evropská, zatímco u přesnídávky Lupilu spíše borůvka kanadská, i když se bude jednat o jinou odrůdu kanadské borůvky, než která byla použita jako pozitivní kontrola. Hodnoty teplot tání komerčních výrobků a pozitivních kontrol, u kterých byly detekovány specifické amplikony, jsou uvedeny v Tabulce 14.

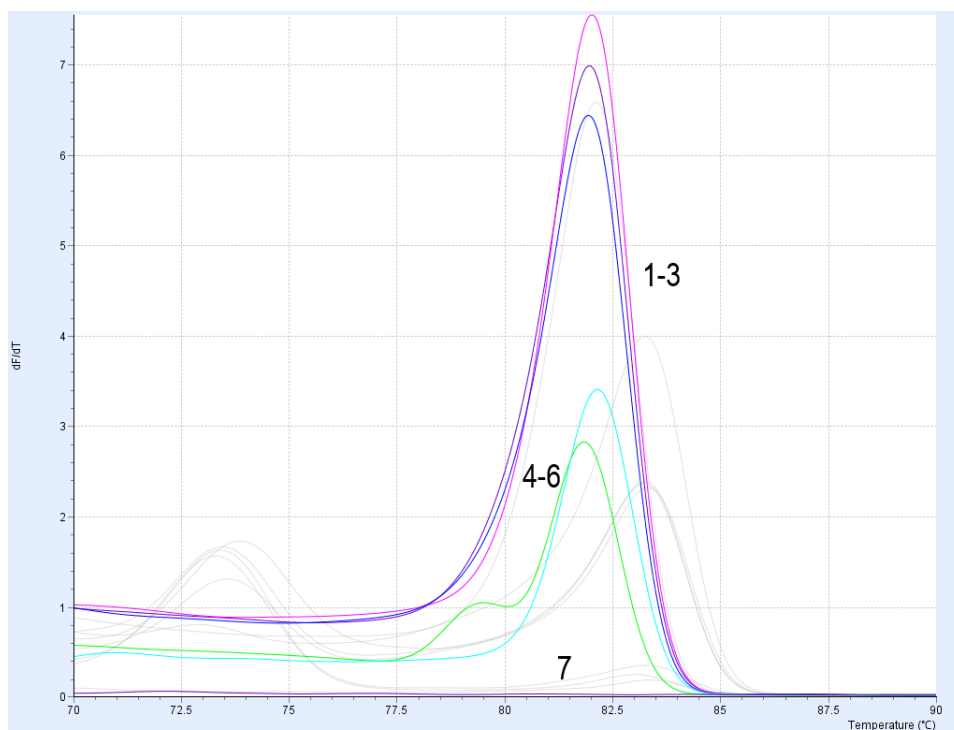
Tabulka 14 Teploty tání DNA amplifikované z komerčních výrobků s primery BHLH 3 z přístroje Light Cycler.

Vzorek	T _m [°C]
Kanadská borůvka	82,18
Evropská borůvka	82,03
Jogurt Pilos	82,06
Přesnídávka Lupilu	82,37



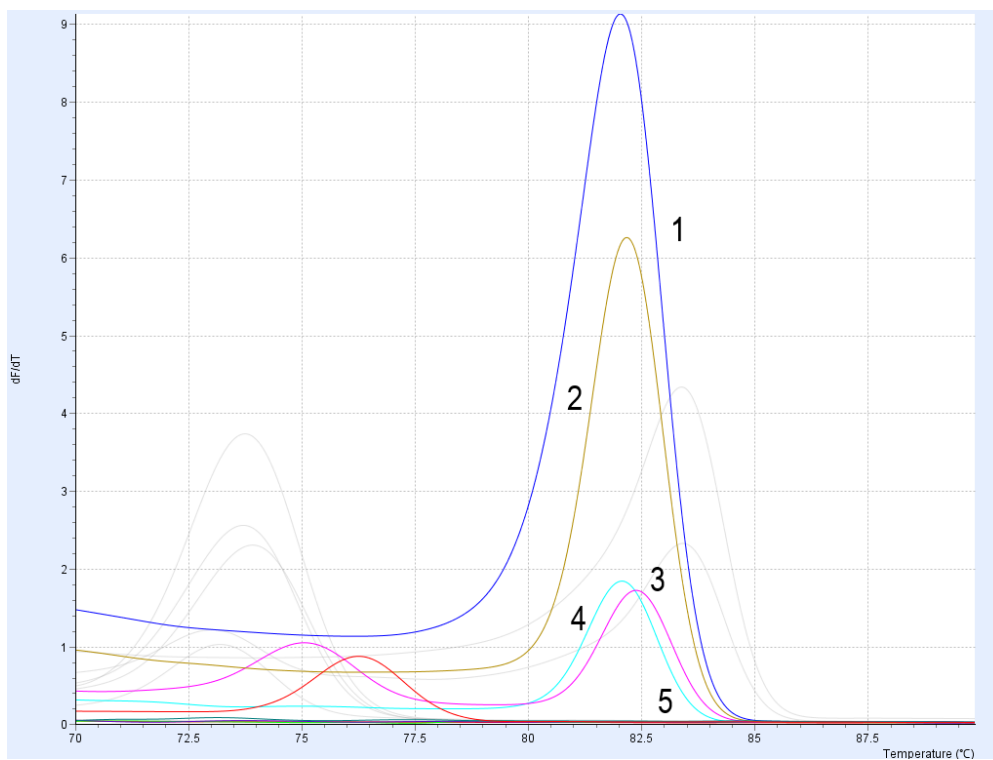
Křivka	1	2-3	4-6	7
Vzorek	Ev. borůvka	Ev. borůvka	Kn. borůvka	Neg. kontrola

Obrázek 30 HRM analýza DNA izolátů z borůvek s primery BHLH 1



Křivka	1-3	4-6	7
Vzorek	Ev. borůvka	Kn. borůvka	Neg. kontrola

Obrázek 31 HRM analýza DNA izolátů z borůvek s primery BHLH 3



Křivka	1	2	3	4	5
Vzorek	Ev. borůvka	Kn. borůvka	P. Lupilu	J. Pilos	Neg. kontrola

Obrázek 32 HRM analýza komerčních výrobků s ovocnou složkou.

6 ZÁVĚR

Předložená práce byla zaměřena na srovnání možnosti využití instrumentálních a molekulárních metod ke stanovení autenticity potravin s ovocnou složkou. Jako modelové ovoce byla vybrána borůvka, která byla identifikována v přírodním extraktu z ovoce a též v několika komerčních výrobcích s deklarovaným obsahem borůvky.

Jedním z cílů této práce bylo stanovení fenolických sloučenin u vzorku borůvky evropské a borůvky kanadské a vybraných komerčních vzorků potravin s ovocným podílem. Ze spektrofotometrického stanovení celkových polyfenolů a flavonoidů vyplývá, že vyšší obsah těchto látek je v evropské borůvce než v kanadské borůvce. Je však na místě vzít v úvahu, do jaké míry bylo toto stanovení ovlivněno různým typem skladování daných vzorků. Pro měření evropské borůvky byl použit mražený vzorek, zatímco u kanadské borůvky byly použity plody sušené mrazem a následně rehydratované v destilované vodě ze kterých byl poté připraven extrakt. Obsah fenolických látek byl dále spektrofotometricky stanoven u pěti komerčních vzorků potravin s ovocnou složkou. Zde je důležité vzít v úvahu další látky, které se do těchto ovocných výrobků přidávají. Jako další rostlinné složky jsou v nich obsaženy jablečné a hruškové pyré a jsou zde přítomna i další aditiva.

Z kvalitativní analýzy vyplývá, že obecně v přesnídávkách bylo identifikováno více fenolických sloučenin než ve vzorcích rostlinných složek z jogurtů. Což je dáno tím, že přesnídávky obsahovaly více různých druhů pyré, zatímco ovocná složka jogurtů byla z větší části složena jen z borůvek a jiných než ovocných aditiv. Fenolické látky identifikované v borůvkových extraktech byly identifikovány také v extraktech z rostlinných složek komerčních vzorků. Z těchto výsledků můžeme usoudit, že se v komerčních výrobcích vyskytovala borůvková složka, protože specifický flavonoid pelargonidin–3–glukosid by mohl pocházet z borůvek [44]. Přítomnost floridzinu nicméně potvrzuje přítomnost i jablečného pyré u přesnídávek, který byl u těchto výrobků detekován např. u jogurtu Pilos nebylo jablečné pyré deklarované a floridzin nebyl detekován.

Po analýze instrumentálními metodami byla provedena qPCR a HRM analýza. Nejdříve byla izolována DNA z borůvky evropské a kanadské za použití kitu A (EliGene Plant DNA Isolation Kit), kitu B (Chemagic DNA Plant Kit) a CTAB protokolu. Nejlepších výsledků bylo dosaženo za použití kitu A a proto byl dále použit pro izolaci DNA z komerčních vzorků. Amplifikovatelnost izolátů DNA získaných pomocí kitu A byla ověřena pomocí primerů ITS2 specifických pro rostlinnou DNA. U izolátů DNA z plodů obou druhů borůvek došlo k amplifikaci specifického produktu těchto primerů. U komerčních výrobků také došlo k amplifikaci DNA, ale v daleko menší míře. Na elektroforetickém gelu byly slabě viditelné zóny těchto produktů. Poté byla provedena qPCR za použití druhově specifických primerů BHLH 1 a BHLH 3 pro borůvky, následovaná HRM analýzou amplikonů.

Z výsledků vyplývá, že primery BHLH 3 jsou pro detekci borůvkové DNA a určení druhu borůvek vhodnější. Účinnost PCR reakce s těmito primery byla vyšší než u primerů BHLH 1, a to jak při amplifikaci DNA evropských borůvek, tak i při amplifikaci DNA kanadských borůvek. Rozdíl teplot tání specifických amplikonů u jednotlivých druhů borůvek byl v případě primerů BHLH 3 dostačující pro rozlišení těchto druhů, zatímco v případě primerů BHLH 1 tomu tak nebylo. Pomocí primerů BHLH 3 byla úspěšně prokázána přítomnost borůvek v komerčních vzorcích, a to u jogurtu Pilos a v přesnídávce Lupilu. Hodnoty teplot tání stanovené HRM analýzou vypovídají o tom, že u jogurtu Pilos byla pro rostlinou složku obsaženou v jogurtu použita borůvka evropská, zatímco u přesnídávky Lupilu byla použita borůvka kanadská. U této přesnídávky byla použita jiná odrůda kanadské borůvky, než která byla použita jako pozitivní kontrola, a proto se teploty tání mírně liší.

Z předložené pilotní studie je patrné, že jak instrumentální, tak i molekulární metody jsou použitelné k analýze autenticity potravin s deklarovanou ovocnou složkou. Oba přístupy vedly k prokázání přítomnosti specifických složek charakterizujících borůvky jak v extraktech z ovoce, tak i ve stejných komerčních vzorcích s obsahem ovocné složky (jogurt Pilos, přesnídávka Lupilu). Předběžně se molekulární metody jeví jako jednoznačnější. Obě procedury je však třeba dále optimalizovat a zohlednit typ matrice při návrhu extrakčního či izolačního postupu. Problematika tedy vyžaduje další intenzivní studium a tato práce tak představuje základ pro další experimenty.

7 ZDROJE:

- [1] DEBNATH, SAMIR. a JURAN GOYALI. In Vitro Propagation and Variation of Antioxidant Properties in Micropropagated Vaccinium Berry Plants—A Review. *Molecules*. 2020, 25(4), 788. DOI: 10.3390/molecules25040788. ISSN 1420-3049. Dostupné také z: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/4/788>
- [2] ČÍŽKOVÁ, HELENA, RUDOLF ŠEVČÍK, ALEŠ RAJCHL, JAN PIVOŇKA a MICHAL VOLDŘICH. Trendy v Autenticitě potravin a v přístupech k detekci falšování. *Chemické listy*. 2012, 106(10), 903-910
- [3] PRIMETTA, ANJA., LAURA JAAKOLA a FAIK AYZ. Anthocyanin fingerprinting for authenticity studies of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). *Food Control*. 2013, 30(2), 662-667. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.09.009. ISSN 09567135. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713512004926>
- [4] BARNES, JEREMY, HIEN NGUYEN, SIJIA SHEN a KEVIN SCHUG. General method for extraction of blueberry anthocyanins and identification using high performance liquid chromatography–electrospray ionization-ion trap-time of flight-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2009, 1216(23), 4728-4735. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.04.032. ISSN 00219673. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967309005573>
- [5] UNCU, AYSE OZGUR a ALI TEVFIK UNCU. A barcode-DNA analysis method for the identification of plant oil adulteration in milk and dairy products. *Food Chemistry*. 2020, 326. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.126986. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814620308487>
- [6] VELÍŠEK, JAN a JANA HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 572-573. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [7] CHU, WING-KWAN, SABRINA CHEUNG a ROXANA LAU, et al. Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2011. Chapter 4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92770/>
- [8] Pharmapoint. Pharmapoint Lékárna [online]. Praha: Phoenix, 2020 [cit. 2020-05-01]. Dostupné z: <http://www.pharmapoint.cz/herbar/brusnice-boruvka/>
- [9] RIIHINEN, KAISU, LAURA JAAKOLA, SIRPA KÄRENLAMPI a ANJA HOHTOLA. Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and „northblue“ blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*). *Food Chem*. 2008; 110: 156–160.
- [10] GIOVANELLI, GABRIELLA a SUSANNA BURATTI. Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. *Food Chemistry*. 2009, 112(4), 903-908. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.06.066. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608007760>
- [11] DURAZZO, ALESSANDRA, MASSIMO LUCARINI a ELIANA SOUTO. Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*. 2019, 33(9), 2221-2243. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.6419>.

- [12] Borůvková farma: Galerie. Farmaborůvky [online]. Provodov, 2020 [cit. 2020-05-01]. Dostupné z: <https://farmaboruvky.cz/galerie-foto-video/>
- [13] BUJOR, OANA-CRINA, CORNELIU TANASE a MONA ELENA POPA. Phenolic Antioxidants in Aerial Parts of Wild Vaccinium Species: Towards Pharmaceutical and Biological Properties. *Antioxidants*. 2019, 8(12). DOI: 10.3390/antiox8120649. ISSN 2076-3921. Dostupné také z: <https://www.mdpi.com/2076-3921/8/12/649>
- [14] SKROVANKOVA, SONA, DANIELA SUMCZYNSKI, JIRI MLCEK, TUNDE JURIKOVA a JIRI SOCHOR. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015, 16(10), 24673-24706. DOI: 10.3390/ijms161024673. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/16/10/24673>
- [15] HÄKKINEN, SARI a RIITTA TÖRRÖNEN. Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and Vaccinium species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research International*. 2000, 33(6), 517-524. DOI: 10.1016/S0963-9969(00)00086-7. ISSN 09639969. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996900000867>
- [16] NILE, SHIVRAJ HARIRAM a SE WON PARK. Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*. 2014, 30(2), 134-144. DOI: 10.1016/j.nut.2013.04.007. ISSN 08999007. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900713002207>
- [17] KARPPINEN, KATJA, LAURA ZORATTI, MARIAN CARVALHO, ELISABETE HIRSIMÄKI a LAURA JAAKOLA (2016). Carotenoid metabolism during bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit development under different light conditions is regulated by biosynthesis and degradation. *BMC Plant Biology*. 16. 10.1186/s12870-016-0785-5
- [18] ROHLOFF, JENS, ROFL a NES NESTBY a MARTINUSSEN ARNFINN. (2009). Volatile profiles of European blueberry: Few major players, but complex aroma patterns. *Latvian Journal of Agronomy*. 12. 98-103.
- [19] BUJOR, OANA-CRINA, CARINE LE BOURVELLEC, IRINA VOLF, VALENTIN POPA a CLAIRE DUFOUR. Seasonal variations of the phenolic constituents in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves, stems and fruits, and their antioxidant activity. *Food Chemistry*. 2016, 213, 58-68. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.06.042. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616309359>
- [20] IGNAT, IOANA, IRINA VOLF a VALENTIN POPA. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 2011, 126(4), 1821-1835. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.12.026. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610016353>
- [21] VELÍŠEK, JAN. *Chemie potravin 3*. 1. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902-3915-3.
- [22] *Chemické Listy*. 108. 2014. ISSN 1213-7103. Dostupné také z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/511/511>
- [23] RAUDONE, LINA, GABRIELE VILKICKYTE, LINA PITKAUSKAITE a RAIMONDAS RAUDONIS. Antioxidant Activities of *Vaccinium vitis-idaea* L. Leaves within Cultivars and Their Phenolic Compounds. *Molecules*. 2019, 24(5). DOI: 10.3390/molecules24050844. ISSN 1420-3049. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/24/5/844>

- [24] URAMOVÁ, Daniela. Farmakokinetika flavanonů. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové (FaF), 2017. Diplomová práce. Karlova univerzita, Farmaceutická fakulta, Katedra farmakologie a toxikologie. Vedoucí práce PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.
- [25] SALEHI, BAHARE, PATRICK FOKOU a MEHDI SHARIFI-RAD. The Therapeutic Potential of Naringenin: A Review of Clinical Trials. *Pharmaceuticals*. 2019, 12(1). DOI: 10.3390/ph12010011. ISSN 1424-8247. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1424-8247/12/1/11>
- [26] MANDELOVÁ, Lucie. Antimutagenní aktivita obsahových látek v zelenině a v ovoci [online]. Brno, 2006 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <<https://is.muni.cz/th/rlita/>>. Disertační práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta. Vedoucí práce Jiří Totušek.
- [27] BROWNMILLER, CINDI, LUKE HOWARD a RONALD PRIOR. Processing and Storage Effects on Procyandin Composition and Concentration of Processed Blueberry Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, 57(5), 1896-1902. DOI: 10.1021/jf803015s. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf803015s>
- [28] HARMATHA, JURAJ. (2002). FENYLPROPANOIDY, LIGNANY A JEJICH BIOLOGICKÉ ÚČINKY. 117-142.
- [29] HPLC introduction. CHROMacademy [online]. 2020 [cit. 2020-04-05]. Dostupné z: https://chromacademyliveblobs.blob.core.windows.net/chromacademy-live-blobs/7bf7de3a-083e-4ff4-a8be-3820db63aef1/0#/lessons/jJbPgw-n-3tiiDUKWO_0ikeYUgUI3bfB
- [30] RUML, TOMÁŠ, MICHAELA RUMLOVÁ a VÁCLAV PAČES. Genové inženýrství. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-708-0499-8.
- [31] ŠMARDA, JAN a JIŘÍ DOŠKAŘ. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [32] ŠPANOVÁ, ALENA a BOHUSLAV RITTICH. Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [33] JENSEN, MICHAEL, MARILYN FUKUSHIMA a RONALD DAVIS. DMSO and Betaine Greatly Improve Amplification of GC-Rich Constructs in De Novo Synthesis. *PLoS ONE*. 2010, 5(6). DOI: 10.1371/journal.pone.0011024. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0011024>
- [34] JAAKOLA, LAURA, MARKO SUOKAS a HELY HÄGGMAN. Novel approaches based on DNA barcoding and high-resolution melting of amplicons for authenticity analyses of berry species. *Food Chemistry*. 2010, 123(2), 494-500. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.04.069. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610005261>
- [35] DRUML, BARBARA a MARGIT CICHNA-MARKL. High resolution melting (HRM) analysis of DNA-its role and potential in food analysis. *Food chemistry* [online]. 2014, roč. 158, s. 245–54. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.111
- [36] VALCHOVA, Michaela. Biochemická analýza DNA interakčních partneru. Brno. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 56 s. Vedoucí diplomové práce doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

- [37] SAGHAI-MAROOF, SOLIMAN a JORGENSEN. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1984, 81(24), 8014-8018. DOI: 10.1073/pnas.81.24.8014. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.81.24.8014>
- [38] Fang, HAMRNAR a GRUMET. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biofeedback*. 1992;13(1):52–54
- [39] EliGene® Plant DNA Isolation Kit. Elisabeth Pharmacon [online]. Brno, 2018 [cit. 2020-05-28]. Dostupné z: <https://www.elisabeth.cz/produkt-eligene-plant-dna-isolation-extraction-kit.html>
- [40] PerkinElmer. PerkinElmer [online]. [cit. 2020-07-02]. Dostupné z: <https://chemagen.com/Kits/1220-plant-dna-kits/>
- [41] CHEN, SHILIN, HUI YAO, JIANPING HAN a CHANG LIU. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *PLoS ONE*. 2010, 5(1). DOI: 10.1371/journal.pone.0008613. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0008613>
- [42] SONG, YANG, HONG-DI LIU, QIANG ZHOU a HONG-JUN ZHANG. High-throughput sequencing of highbush blueberry transcriptome and analysis of basic helix-loop-helix transcription factors. *Journal of Integrative Agriculture*. 2017, 16(3), 591-604. DOI: 10.1016/S2095-3119(16)61461-2. ISSN 20953119. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095311916614612>
- [43] ROWLAND, LISA, ELIZABETH OGDEN a MARK EHLENFELDT. EST-PCR markers developed for highbush blueberry are also useful for genetic fingerprinting and relationship studies in rabbiteye blueberry. *Scientia Horticulturae*. 2010, 125(4), 779-784. DOI: 10.1016/j.scienta.2010.05.008. ISSN 03044238. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304423810002207>
- [44] MEDINA, SONIA, JORGE PEREIRA a PEDRO SILVA. Food fingerprints – A valuable tool to monitor food authenticity and safety. *Food Chemistry*. 2019, 278, 144-162. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.11.046. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618319848>

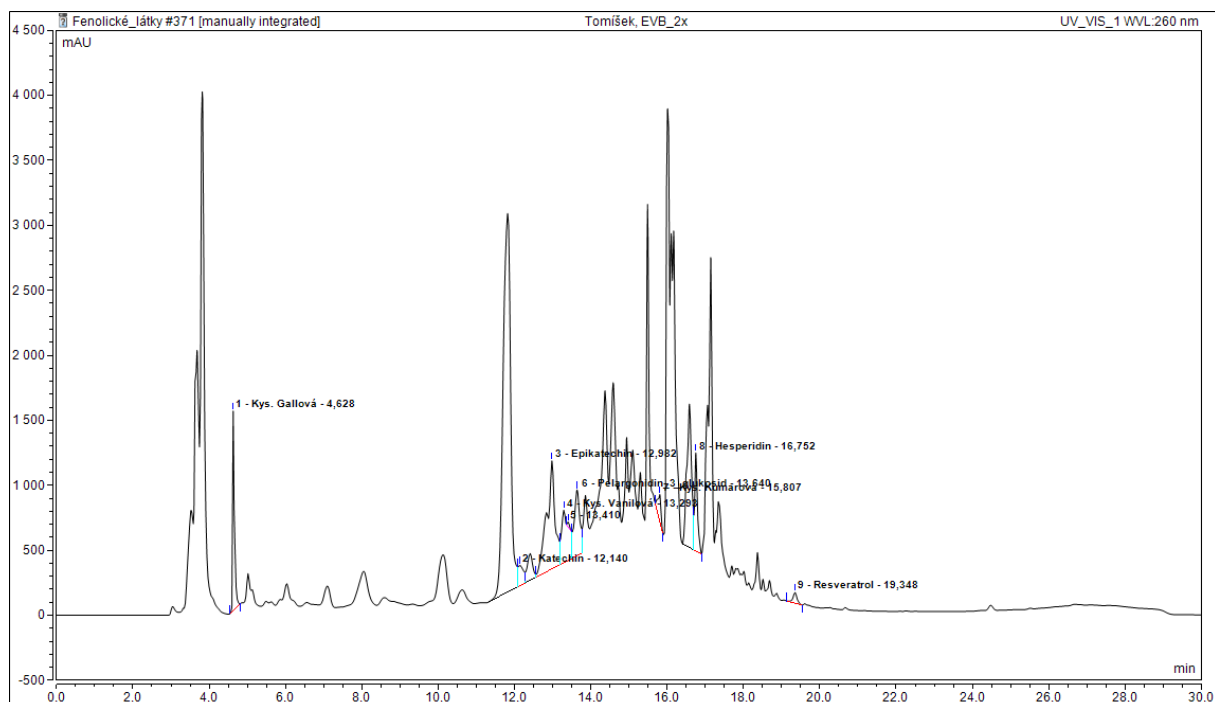
8 PŘÍLOHY:

Příloha 1:

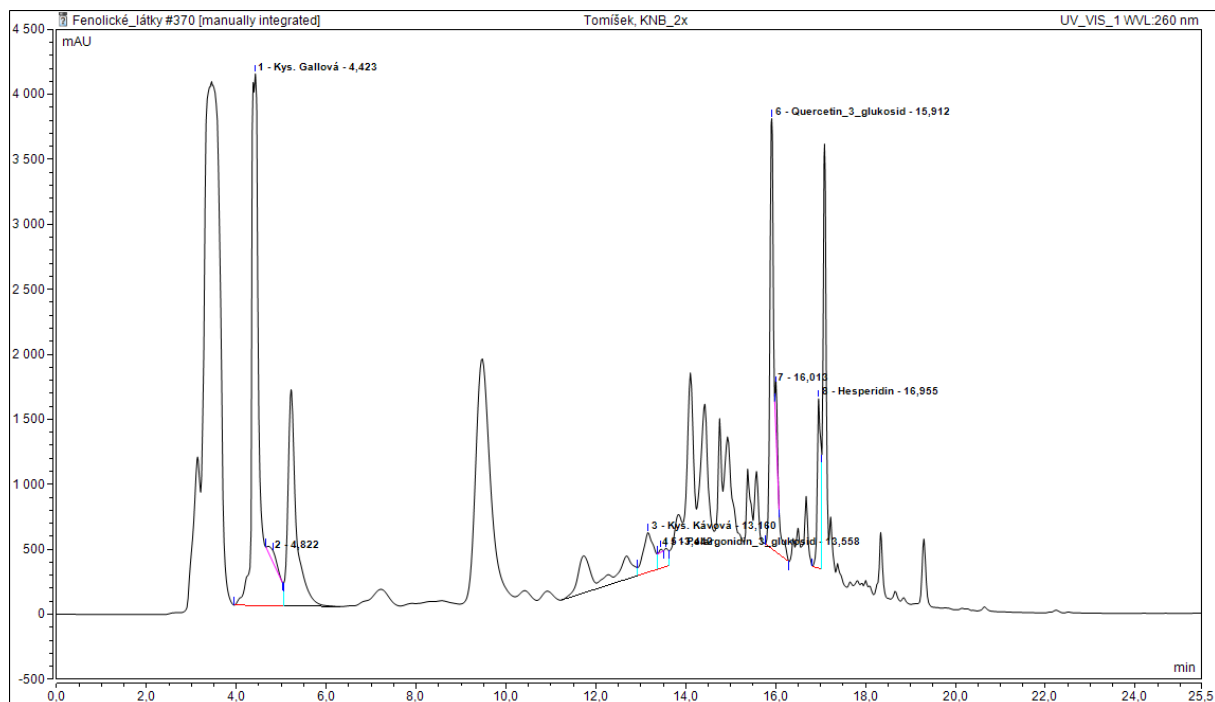


Obrázek 33 Komerční vzorky s rostlinou složkou obsahující určité množství borůvkového podílu.

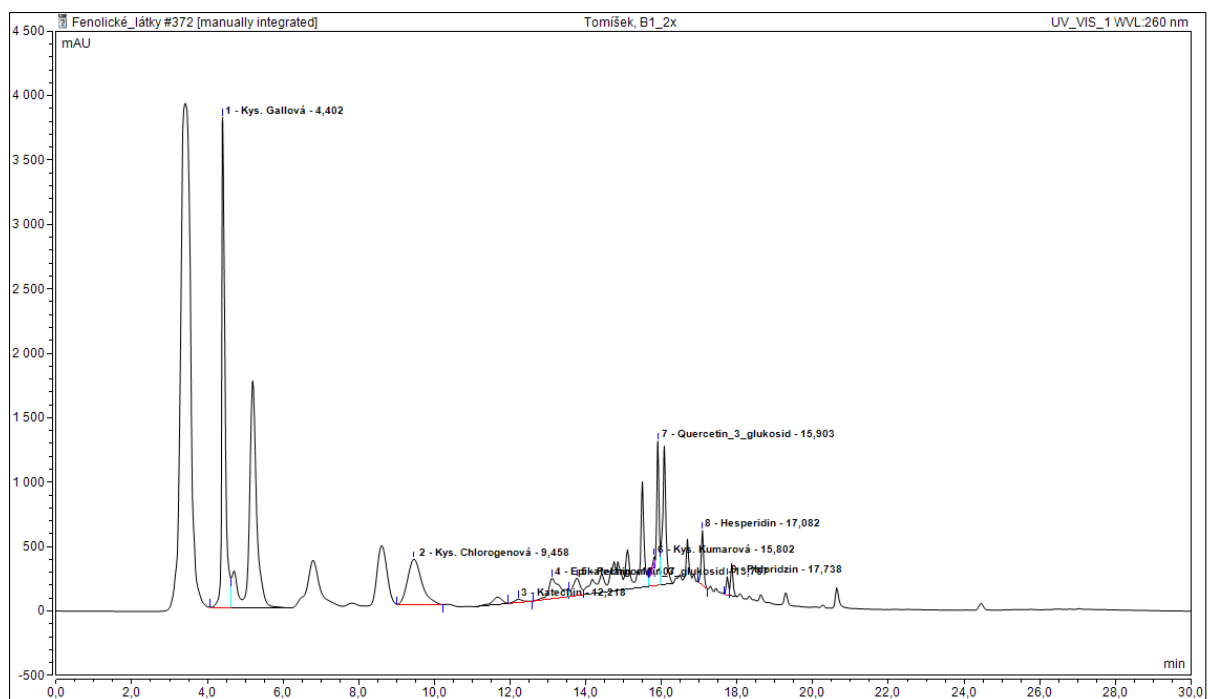
Příloha 2:



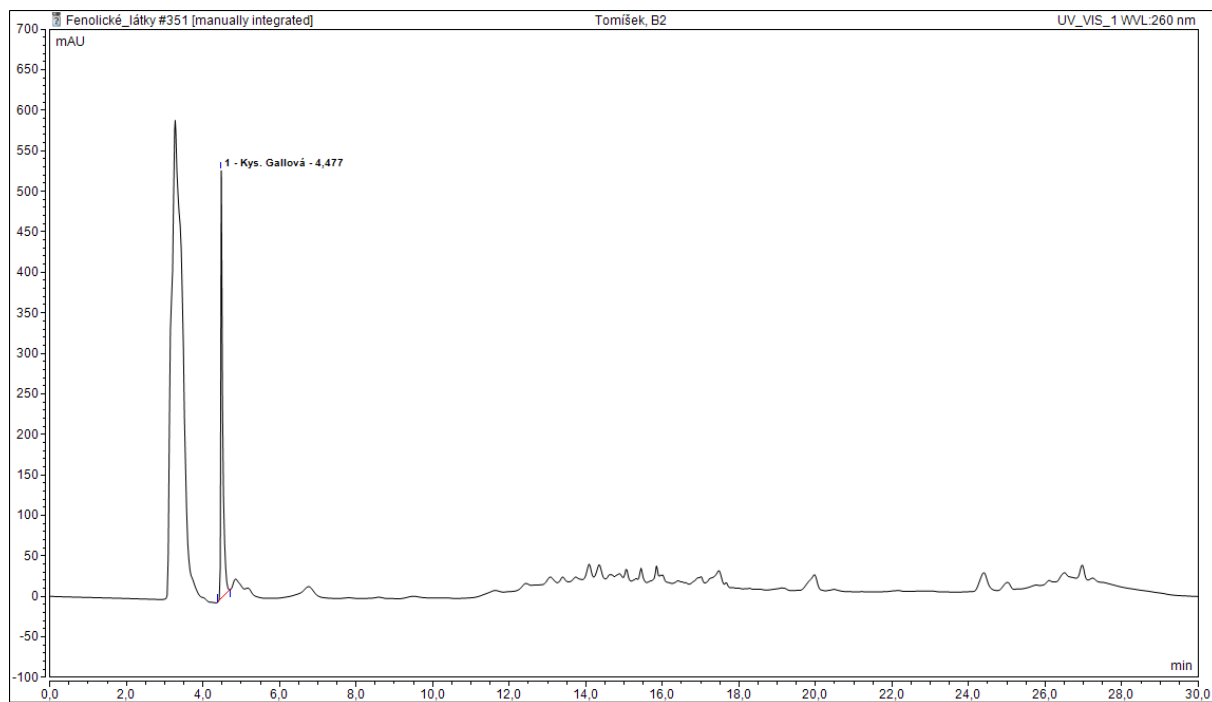
Obrázek 34 Chromatogram fenolických látek v extraktu evropské borůvky



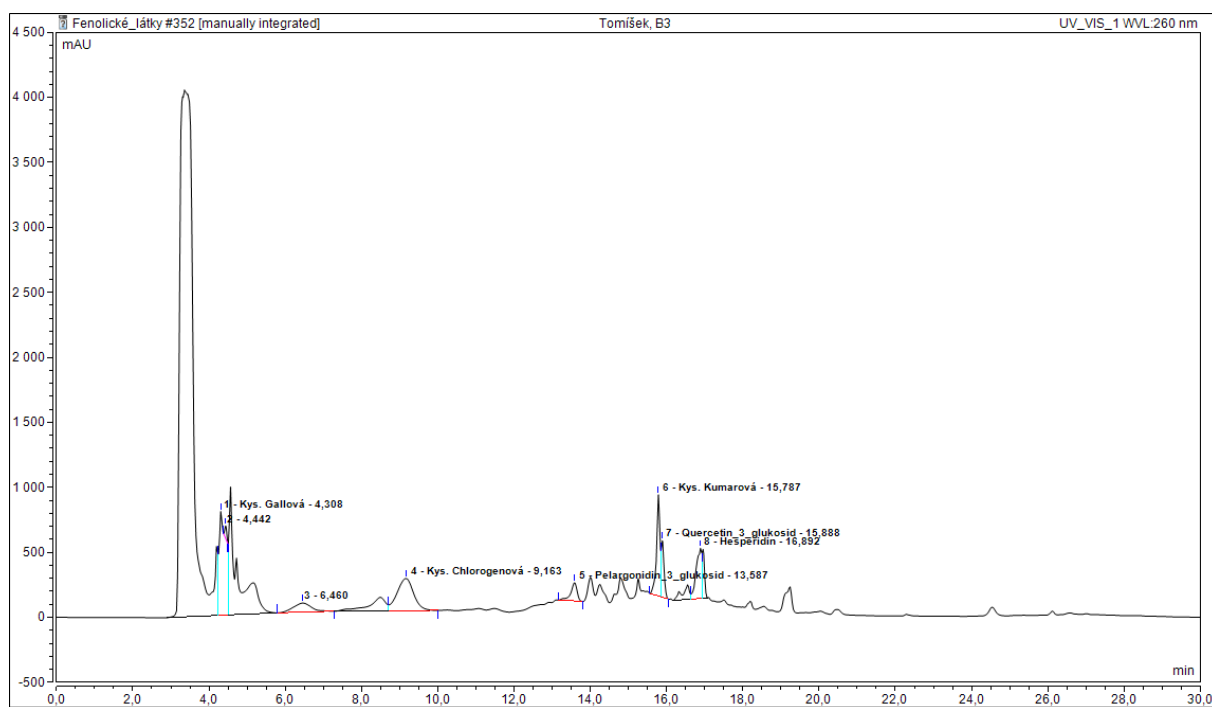
Obrázek 35 Chromatogram fenolických látek v extraktu kanadské borůvky



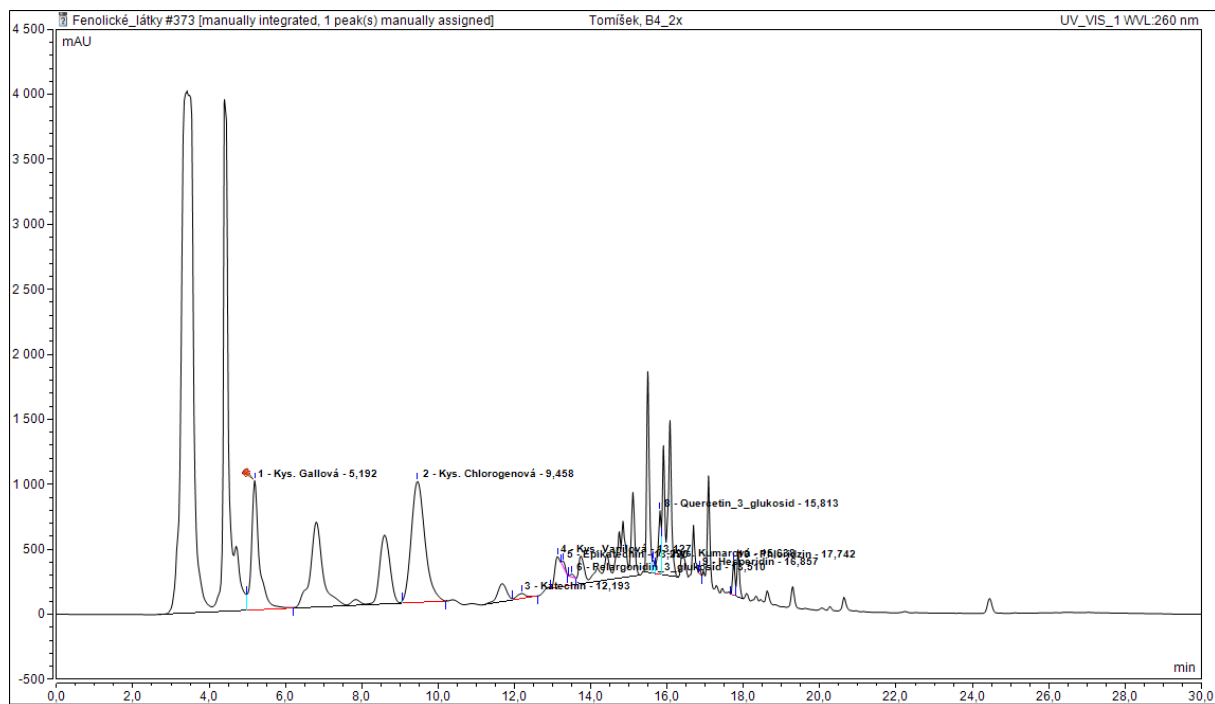
Obrázek 36 Chromatogram fenolických látek v extraktu vzorku 1 (Hamánek)



Obrázek 37 Chromatogram fenolických látek v extraktu vzorku 2 (jogurt Agro-la)



Obrázek 38 Chromatogram fenolických látek v extraktu vzorku 3 (jogurt Pilos)



Obrázek 39 Chromatogram fenolických látek v extraktu vzorku 4 (přesnídávka Hami)