

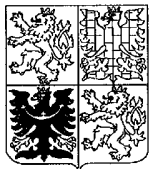
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 893

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **02.10.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **03.10.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/9720929**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.06.2000**
(Věstník č. 6/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/GB98/02962**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/18233**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 Q 1/26

(71) Přihlašovatel:

NOTTINGHAM TRENT UNIVERSITY,
Nottingham, GB;

(72) Původce:

Cobb Andrew Howard, Newport, GB;

(74) Zástupce:

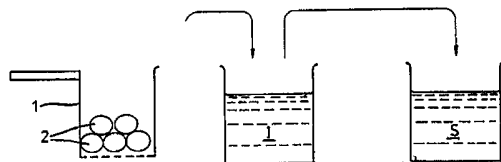
PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
140 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Testovací způsob detekce poškození plodin,
použití fenolových látek anebo enzymového
inhibitoru a testovací kit**

(57) Anotace:

Způsob detekce poškození plodin zahrnuje odstranění slupky plodiny a stanovení přítomnosti nebo nepřítomnosti indikátoru poškození plodinových buněk, jímž je výhodně enzymová aktivita.



TESTOVACÍ ZPŮSOB DETEKCE POŠKOZENÍ PLODIN, POUŽITÍ FENOLOVÝCH LÁTEK ANEBO ENZYMOVÉHO INHIBITORU A TESTOVACÍ KIT

OBLAST TECHNIKY

Předkládaný vynález se týká testu na zjištění poškození sklizně a zejména testu na poškození kořenové zeleniny, zvláště pak brambor. Vynález je popsán za využití brambor jako příkladu úrody.

DOSAVADNÍ STAV TECHNIKY

Vznik pohmožděniny je přirozenou reakcí buněk poškozených úderem. Takové úderové poškození obvykle vzniká při vyhrabávání brambor ze země při sklizni nebo když jsou brambory transportovány anebo zpracovávány.

Zpracování brambor za vzniku množství výrobků, jako jsou smažené brambůrky a tvarované potraviny pro pečení v troubě, se v posledních letech prudce zvětšilo. Proto je tedy potřeba k přípravě těchto výrobků vysoká kvalita nepoškozených brambor.

Bylo odhadnuto, že brambory v ceně od 30 do 50 miliónů liber jsou každoročně vyhozeny jen ve Velké Británii jako výsledek poškození pohmožděním. Důležitý problém při poškození brambor pohmožděním je to, že poškození není běžně znatelné, dokud není odstraněna bramborová slupka (periderm), například loupáním.

Dosud byly vyvíjeny pouze laboratorní testy zkoumající poškození brambor pohmožděním. Obvyklý test zahrnuje umístění brambor při teplotě okolo 25 °C po dobu 18 až 24 hodin, aby se stimuloval vznik pohmoždění. Zpoždění výsledku testu 24 hodin je při velkoobjemovém zpracování neakceptovatelné. Tudiž běžné zařízení není jen drahé, ale také pomalé.

PODSTATA VYNÁLEZU

Předkládaný vynález má za cíl vyřešit výše zmíněné i jiné problémy běžných testů na stanovení poškození úrody.

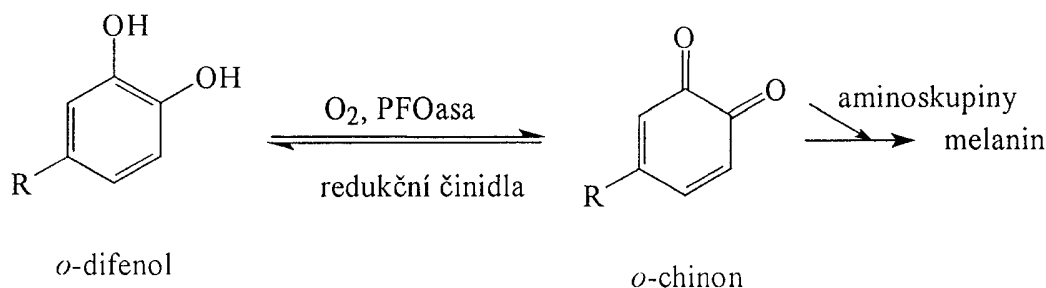
Vzhledem k vynálezu je prováděna testovací způsob detekce poškození plodin, který zahrnuje kroky poskytující vzorek úrody pro testování, odstranění slupky brambor a stanovení přítomnosti nebo nepřítomnosti buněčných indikátorů poškození úrody.

Výrazem „stanovení“ se míní způsob analytického zákroku, tedy tento termín nepokrývá známé metody skládající se jen z viditelné kontroly přirozeného vývinu pohmoždění při dané teplotě.

Výraz „indikátor poškození“ je myšlen tak, že zahrnuje látky vylučované z poškozených buněk a jiné fyziologické změny spojené s poškozením buňky, například enzymová aktivita, příjem kyslíku, využití fenolových substrátů v buněčných vakuolách atd.

Přednostně je indikátorem poškození určitý enzym, zvláště oxidující enzym, jehož aktivita může být stanovena a může indikovat přítomnost nebo nepřítomnost poškození úrody. Nejvíce upřednostňovaným enzymem pro použití ve vynálezu jako indikátoru poškození je enzym, odpovědný za počáteční reakci, způsobující hnědnutí poškozeného rostlinného materiálu, dále označovaný jako polyfenoloxidas (PFOasa). Nicméně stejný enzym je také označován jako fenolasa, katecholasa, *o*-difenoloxidas nebo tyrosinasa v závislosti na jeho fenolovém substrátu. (Viz Walker J. R. L., & Ferrar P. H., *Chemistry & Industry*, 836-839, 16. října 1995, tyto závěry jsou zde uvedené referencí.)

Nepoškozené ovoce a zelenina nehnědnou, protože ačkoli enzym a jeho substráty jsou přítomné v tkáni, jsou oddělené membránami v buňkách, tenze kyslíku je nízká a tak reakce neprobíhá v neporušených buňkách. Nicméně, jakmile je vnitřní buněčná organizace porušena, enzym a substráty interagují za vzniku chinonových sloučenin. Tyto chinony se kombinují s proteiny a aminokyselinami za vzniku komplexních černo/hnědých „melaninových“ pigmentů, které je možné pozorovat jako pohmožděnou plochu úrody.



Ačkoliv kyslíková elektroda poskytuje velmi citlivé a rychlé stanovení PFOasové aktivity, jsou upřednostňovány kolorimetrické metody pro jejich jednoduché použití v rukou laické osoby.

Ve vhodném provedení vynálezu je úroda testovaná na přítomnost PFOasy aplikací substrátu enzymu, který je oxidován za vzniku barevného produktu. Tedy v tomto provedení je poškození úrody zobrazeno jako barevná část úrody.

V upřednostňovaných případech je organickým substrátem fenolová sloučenina. Vhodné fenolové sloučeniny pro použití v metodě vynálezu obsahují difenoly. Nejvíce upřednostňované fenolové sloučeniny obsahují jednu nebo kombinaci dvou nebo více látek jako je

4-methylkatechol, katechol, „chlorogenová“ kyselina, dopamin, L-DOPA (3,4-dihydroxy-fenylalanin), pyrogallol, katechin a kyselina kávová.

Je bráno v úvahu, že faktory týkající se výběru fenolového substrátu budou obsahovat dostupnost a cenu a také rychlost jeho reakce s enzymem za vzniku detekovatelného produktu. Jednoduše, čím rychlejší reakce, tím rychlejší výsledek testu.

Optimální koncentrace jednotlivého substrátu pro enzym při dané teplotě může být lehce stanovená za použití standardního optimalizačního pokusu, tj. stanovení enzymové aktivity při různé koncentraci substrátu a vynesení grafu, ze kterého se určí koncentrace, při které je nejvyšší aktivity enzymu.

Například, ve vhodném provedení vynálezu může být přítomnost indikátoru poškození, PFOasy, v oloupaných bramborách detekovatelná pomocí změny barvy za použití fenolového substrátu 4-methylkatecholu za dobu menší, než je dvacet minut. Toto je obrovská výhoda oproti běžné testovací metodě, která trvá od 18 do 24 hodin.

Přednostně obsahuje dále testovací metoda aplikování enzymového inhibitoru na úrodu v účinném množství, které inhibuje vývin barevného pozadí během průběhu testu v důsledku malého poškození sklizně při odstraňování slupky (označované dále jako „poškození řezem“). Takové stříhové poškození způsobuje menší poškození buňky ve srovnání s poškozením vzniklým pohmožděním (narázové poškození).

Aplikace enzymového inhibitoru ke zpomalení aktivity PFOasy, jak je popsáno výše, zabraňuje stříhovému poškození na tmavých plochách nárazového poškození. Proto aplikace enzymového inhibitoru má za následek jasnější výsledky testu.

Množství enzymového inhibitoru účinného pro zastavení vývinu zbarvení během poškození řezem může být lehce zpětně stanovené provedením sérií testů, při kterých je inhibitor aplikován při různých koncentracích na vzorek oloupané úrody. Účinné množství, jak je uvedeno výše, je množství, které inhibuje zbarvení způsobené poškozením řezem, zatímco dovoluje vzniku zbarvení způsobeném nárazovým poškozením.

Jak je uvedeno podle Walker & Ferrar (1995) *ibid.*, mnoho reagentů inhibuje aktivitu PFOasy a mohou být rozděleny do skupin podle jejich způsobu účinku. Ty mohou být způsobené chelatací Cu-prostetické skupiny, kompeticí se substrátem nebo interakcí s reakčními produkty. Například, tak málo jako je 10 μM kyseliny salicylhydroxamová (SHAM) úplně a specificky inhibuje jablečnou a bramborovou PFOasu. (Allan, A. C. & Walker, J. R. L., *Phytochem.*, 1988, 27, 3075-76.)

Ponoření do solného roztoku může být také použito, protože chloridové ionty jsou kompetitivní inhibitory PFOasy a solný roztok je levný.

Kyselé látky jsou zvláště vhodné, protože snižují pH a proto snižují aktivitu PFOasy. Kyselina citrónová je vhodná kyselá látka.

Enzymově katalyzovaná reakce, která vede ke zhnědnutí je reversibilní a jakož to je oxidační reakci, může běžet zpět za přítomnosti redukujícího činidla. Upřednostňované redukční činidlo je kyselina askorbová (vitamín C).

Siřičité sloučeniny mohou být také použité pro inhibici PFOasy. Tyto sloučeniny zabraňují hnědnutí různými způsoby, jenž zahrnují vznik komplexů s chinony za vzniku sulfo-chinonů jako je metabisiřičitan sodný.

Sírné aminokyseliny, jako je cystein mohou být použity jako inhibitory PFOasy. Podle Walker & Ferrar (1995) *ibid.*, 1995, derivát (N-acetyl-L-cystein) byl označen stejně účinný jako siřičitany při inhibici hnědnutí džusů, jablek a brambor. (Friedman, M., Batistuta, F. F., *J. Agric. Food Chem.*, 1995, **43**, 69-76. Přirozeně produkovaný tripeptid glutathionu (γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycin), který účinkuje jako přirozený inhibitor hnědnutí v grepech, (Macheix, J.-J., Sapis, J.-C., Fleuriet, A., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1991, **30**, 441-486) je také účinný.

Skořicové kyseliny jsou také inhibitory PFOasy a jejich inhibiční účinek vzniká v důsledku jejich blízké strukturní podobnosti k přirozeným enzymovým fenolovým substrátům. Skořicové kyseliny a jejich deriváty a homology se vyskytují přirozeně ve většině rostlinných potravin.

Mnoho skořicové kyselin inhibuje PFOasu mnoho aromatických a alifatických karboxylových kyselin. Potenciálně užitečné komerční inhibitory obsahují kyselinu sorbovou, krotonovou a kojovou kyselinu. (Chen, J. S., Wei, C.-I., & Marshall, M. R., *J. Agric. Food Chem.*, 1991, **39**, 1897-1990.)

Walker & Ferrar (1995) *ibid.*, 1995, také uvádějí, že dobře známá vlastnost askorbové kyseliny, jako krátkodobé ošetření proti hnědnutí, byla podrobena pokusu zvýšit její účinnost pomocí derivatizace (Sapers, G. M., *et al*, *J. Food Sci.*, 1989, **54**, 997-1002.) Například, estery mastné kyseliny a askorbové kyseliny jsou účinné při inhibici hnědnutí v jablečném džusu. Podobně di- a trifosforečné deriváty byly zkoumány a bylo nalezeno, že jsou neúčinné v džusu, ale účinné na řezných plochách jablek, kde se předpokládá, že fosfátová skupina je hydrolyzovaná pomocí kyselých fosfatů. Ve srovnávací studii askorbové kyseliny proti dehydroaskorbové kyselině, isoaskorbové kyselině („erythorbová kyselina“), 2-fosforečnanu askorbové kyseliny a 2-síranu askorbové kyselin, žádná z nich nebyla tak účinná jako kyselina askorbová při inhibici fenolasové aktivity, (Hsu, A. F., *et al*, *ibid*, 1988, **53**, 765-771) ačkoliv „erythorbová kyselina“ ukázala účinnost při určitých modelových systémech. (Sapers, G. M., *et al*, *J. Food Sci.*, 1989, **54**, 997-1002 a Sapers, G. M., Ziolkowski, M. A., *ibid*, 1987, **52**, 1732-1733.)

Příklady inhibitorů PFOasy od Walker & Ferrar, ibid, 1995:

Skupina I, redukční činidla.

Askorbová kyselina, SO₂, metabisulfát sodný, thioglykolát, merkaptoethanol, 2-merkaptobenzothiazol.

Skupina II, chelatační činidla mědi.

Diethyldithiokarbamat sodný (DIECA), oxid uhelnatý, kyanid, tropolon.

Skupina III, chinonové párové činidla.

Cystein, glutathion, penicilamin, benzensulfíniová kyselina, SO₂, metabisulfát sodný.

Skupina IV, substrátové analogy

Kyselina skořicová, *p*-kumarová kyselina, ferulová kyselina.

Skupina VI, Jiné inhibitory

Kyselina salicylhydroxamová (SHAM), 4-hexyl-resorcinol, kojová kyselina, sorbová kyselina, PVP a PVPP, cyklodextriny, halogenidy.

Jiné enzymové aktivity, které mohou být použity jako indikátory poškození v metodě vynálezu obsahují aktivity superoxidásmutasy (SOD) a katalasy.

Pokud kyslík vstoupí do biologického systému, je dostatečně reaktivní, aby vznikaly aktivní kyslíkové sloučeniny, jako jsou atomární kyslíkové a superoxidové anionty, které jsou potenciálně toxické pro buňky přes jejich schopnost reakce s nenasycenými lipidy v membránách. Tyto radikály jsou zhašeny *in vivo* pomocí antioxidantů a enzymů, obsahujících SOD a katalasu. Aktivity těchto enzymů vzrůstají jako výsledek nárazového poškození. Oba dva mohou být stanoveny spektrofotometricky v odsoleném bezbuněčném bramborovém extraktu.

SOD vytváří peroxid vodíku ze superoxidových radikálů a stanovení je založeno na vzniku barvy při 595 nm podle množství přítomného superoxidu. Proto je vznik barvy snížen v přítomnosti enzymu při kompetitivním stanovení.

Katalasa rozkládá peroxid vodíku, vzniklý pomocí SOD a poměr enzymové aktivity může být sledován pomocí zápisu změny absorbance při 240 nm. Oba enzymy tedy měří odezvu na oxidační stres. Poněvadž oxidační stres může být způsobený jinými faktory, než je nárazové

poškození, katalasa a SOD aktivita je méně specifická a tedy méně upřednostňovaný indikátor buněčného poškození než aktivita PFOasy.

Jako indikátor buněčného poškození může být také použita spotřeba kyslíku, protože reakce při poškození spotřebovávají kyslík. Pro přesné měření spotřeby kyslíku může být použita bioluminiscence. Tento velmi citlivý způsob je založený na luciferin/luciferasové oxidaci, při které je substrát luciferin oxidován enzymem luciferasou v přítomnosti ATP a množství produkovaného světla je úměrné koncentraci přítomného kyslíku. Nicméně, toto je velmi citlivý biologický indikátor kyslíku a může detekovat dýchání, a tak je nepravděpodobné, aby byl specifický pro reakce při poškození. Jinak, spotřeba kyslíku není velmi specifický indikátor buněčného poškození způsobeného pohmožděním.

Zatímco výše zmíněné indikátory buněčného poškození mohou být podle vynálezu použity, bylo zjištěno, že nejvíce specifický a tedy nejlepší indikátor pohmožděnin je PFOasová aktivita.

Za druhé se vynález zabývá použitím fenolové sloučeniny jako substrátu pro enzymovou indikaci poškození v testovacím způsobu podle vynálezu.

Za třetí se vynález zabývá použitím enzymového inhibitoru v testovací metodě podle vynálezu.

Za čtvrté se vynález zabývá použitím fenolové sloučeniny anebo enzymového inhibitoru při přípravě kitu pro provedení testovací metody podle vynálezu.

Za páté je poskytován kit, který je vhodně přenosný, obsahující pracovní plochu pro provedení metody podle vynálezu, jak je uvedeno výše.

Přednostně, činidla pro provedení metody vynálezu jsou poskytovány ve formě kitu obsahujícího jednu nebo více ampulí obsahující činidla, přednostně fenolovou sloučeninu jako substrát pro enzymovou indikaci poškození a volitelně jednu nebo více ampulí obsahující enzymový inhibitor, přednostně okyselující látku.

Vhodné provedení vynálezu bude nyní popsáno za použití nelimitujících příkladů s odkazem na připojený Obr. 1, kde je schématicky ukázáno použití vhodného kitu vynálezu.

PŘÍKLADY PROVEDENÍ VYNÁLEZU

Příklad 1: Rychlý test na pohmoždění bramborových hlíz (*S. tuberosum*).

Výběr odrůdy

Hlavními plodinami používanými pro testování byly vybrány odrůdy Cara, Maris Piper, Romano a Pentland Dell. Jedná se o reprezentativní typ bramborových hlíz. Výběr je ze stejné sezónní skupiny, ačkoliv je tato odrůda určena k výrobě smažených brambůrek. Vzhledem k přítomnosti sezónní skupiny, druhé ranné, byla použita odrůda Estima.

Předběžné ošetření

Předběžné ošetření vyžaduje uskladnění nebo uchování hlíz při teplotě 10 °C, popř. 5 °C. Tento 24 hodinový způsob standardizuje hlízy před účinkem působení nárazu. Stupeň vnitřního poškození byl větší, pokud byla teplota hlíz nízká.

Mechanické poškození

Morfologické rozdíly mezi stonkem a konci pupenů hlízy způsobují rozdíly v citlivosti poranění. Je známo, že konec stonku je mnohem snadněji náchylný na náraz, protože buňky jsou na konci stonku obvykle větší a mají tenčí buněčné stěny a jsou proto vývojově starší než konec pupenu. Pro poškození tkáně na stonkovém konci byl použit 235 gramový buchar, jenž byl uvolněn z výšky 300 mm. Na hlízu byla vynaložena síla 0,7 J. Zaoblené konce bucharu byly namočený do inkoustu, aby označily přesnou plochu působení.

30 minutová přestávka

Hlízy byly zanechány 30 minut při pokojové teplotě. Tato doba byla určena k tomu, aby se simulovala přibližná doba mezi sklizní bramborových hlíz a vypracováním rychlého detekčního testu na pohmoždění.

Ošetření enzymovými inhibitory (okyselující látka): ponoření do 2 hmotn. % kyseliny citrónové
Černá skvrna vzniklá v důsledku otláčení je obvykle umístěna pod peridermem (slupkou) a má velikost 5 až 10 mm v průměru. Proto, když byl stonkový konec odstraněn, nepřesahovala tloušťka řezu 5 mm. Tím se zaručilo, aby měl řez povrchu přesnou plochu, kde jsou buňky poškozené nárazem. Následně byl řez slupky na 15 minut ponořen do 2 hmotn. % kyseliny citrónové.

Během optimalizace antioxidantu 1 hmotn. % kyseliny askorbové a 2 hmotn. % kyseliny citrónové bylo zjištěno, že kyselina askorbová nebyla esenciální složkou směsi. Optimální koncentrace kyseliny citrónové byla 2 % a ona sama zpomaluje oxidaci v buňkách, jež jsou poškozeny řezem a umožňuje oxidaci, jenž nastává v buňkách poškozených nárazem.

Ošetření PFOasou (indikátor poškození nárazem): ponoření do 10 mM 4-methylcatecholu o pH 5

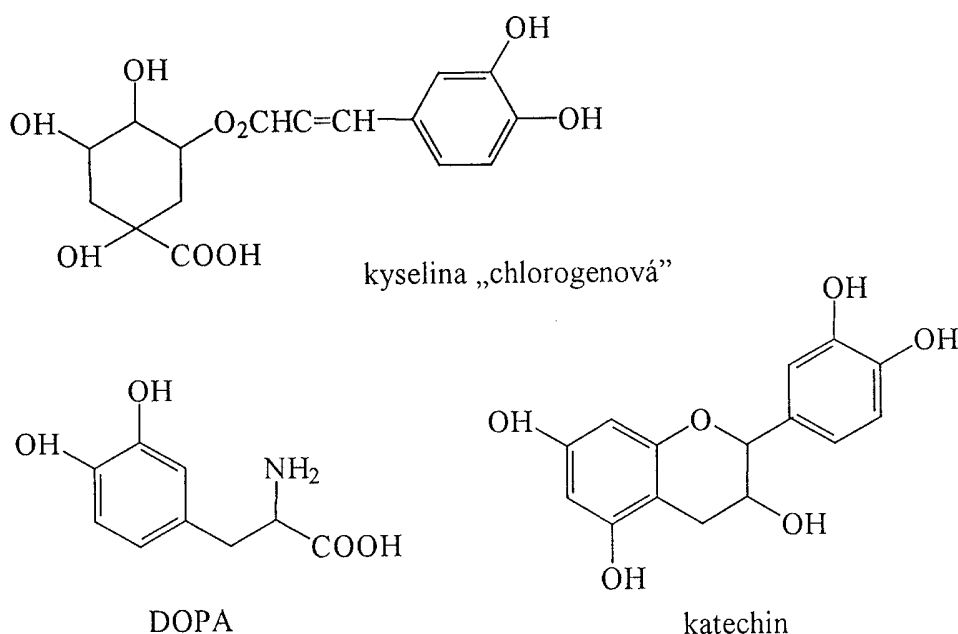
Řez slupky byl ponořen do 10 mM 4-methylcatecholu na 2 minuty. Počáteční vývoj polarografie v enzymologii PFOasy byl spojen s použitím kyslíkových elektrod typu Clark, aby bylo dosaženo způsobu identifikace fenolových substrátů, které jsou v této testovací metodě vynálezu

použity. Di- a trihydroxyfenolové sloučeniny byly prověřeny a porovnány s původně přírodními substráty hlíz, tyrosinem a kyselinou „chlorogenovou“. 4-methylkatechol byl oxidován při poměru 152 % ke kyselině „chlorogenové“. Optimalizační pokusy usuzují, že 4-methylkatechol měl největší specifickou aktivitu při 25 až 30 °C, při 10 mM koncentraci a pH 5.

Zbarvení

Hlízy byly ponechány při pokojové teplotě a zbarvení se projevilo po 10 a 20 minutách. Rychlost, jakou se hlízy zbarvovaly, je závislá na typu odrůdy, ale dané časy je dosti dlouhé pro jakoukoliv dosud zkoumanou odrůdu brambor.

Příklad 1a - Výběr fenolových substrátů



Vzorky stonkových konců bramborových hlíz byly homogenizovány v pufru, např. 100 mM MES při pH 6 a odsoleny přes kolonu Sephadex PD10™.

Extrakt byl poté použit jako surový enzymový preparát v polarografickém enzymovém stanovení s použitím elektrody typu Clark.

Enzymová aktivita je vyjádřena v mikromolech příjmu kyslíku na minutu a miligram proteinu.

Přírodními substráty pro PFOasu v bramborech jsou tyrosin, zatímco nejhojnějším fenolem je kyselina „chlorogenová“. První uvedený je přítomný v 10-krát větším množství než druhý, ale je mnohem méně reaktivnější při stanovení PFOasové aktivity.

Je upřednostňováno, že fenolový substrát vyvolává alespoň 20% aktivitu a lépe více než 50%, zvláště 70% a více než je vyvolána kyselinou „chlorogenovou“.

Tabulka 1 ukazuje polarografické testy s různými fenolovými substráty jako možnými substráty PFOasy.

Substrát	Průměrná specifická aktivita	% podíl „chlorogenové“ kyseliny
(10mM)	$\mu\text{mol}(\text{O}_2) \cdot \text{mg protein} \cdot \text{min.}^{-1}$	
4-methylkatechol	0,3719	152
„chlorogenová“ kyselina	0,2444	
katechol	0,3093	148
„chlorogenová“ kyselina	0,2089	
katechol a 4-methylkatechol	0,2898	119
„chlorogenová“ kyselina	0,2444	
dopamin	0,3591	75
„chlorogenová“ kyselina	0,4807	
L-DOPA	0,0619	61
„chlorogenová“ kyselina	0,102	
pyrogallol	0,1415	58
„chlorogenová“ kyselina	0,2444	
katechol	0,1369	56
„chlorogenová“ kyselina	0,2444	
katechin	0,0717	29
„chlorogenová“ kyselina	0,02444	
kyselina kávová	0,0537	20
„chlorogenová“ kyselina	0,2647	
kyselina gentisinová	0,0027	4
„chlorogenová“ kyselina	0,0727	
resorcinol	0,0051	3
„chlorogenová“ kyselina	0,1768	
kyselina galová	0,0038	2
„chlorogenová“ kyselina	0,1788	
methylhydrochinon	0,0034	2

„chlorogenová“ kyselina	0,222	
kyselina 0-hydroxyfenyloctová	0,0026	1
„chlorogenová“ kyselina	0,222	
kyselina „šikimová“	0,0029	1
„chlorogenová“ kyselina	0,2803	
hydrochinon	0	0
„chlorogenová“ kyselina	0,1788	

Odborníci v oboru si budou vědomi, že kombinace dvou nebo více fenolových látek anebo dvou nebo více inhibitorů enzymů by mohla zvýšit rychlost anebo citlivost testu určeného pro určitý typ sklizně.

Příklad 2:

Hlavními plodinami byly vybrány odrůdy Estima, Marfona a Maris Piper, protože odrůda Estima se snadno otláčuje, zatímco odrůda Marfona méně a Maris Piper se nejméně otláčuje. Testovací způsob vynálezu byl optimalizován pro každou odrůdu následovně.

Namáčení pěti omytých a lehce oloupaných hlíz v 5% vodném roztoku kyseliny citrónové o pH 5 po dobu 17 minut (Marfona) nebo 20 minut (Estima). Odrůda Maris Piper byla namočena 17 minut v 4% kyselině citrónové. Poté byly hlízy umístěny do 10 mM vodného roztoku 4-methylcatecholu o pH 5 na 1,5 minuty. Hlízy byly jemně osušeny papírovým ručníkem a uloženy v dobře větrané místnosti při pokojové teplotě. Zaznamenání zbarvení po 30 a 60 minutách ve formě purpurově růžového dopachromu ukazuje otláčené plochy.

Chemikálie byly použity v jedolitrových objemech a každá dávka zůstala funkční po přibližně 100 hlízách, jež byly testovány při pokojové teplotě.

Zbarvení bylo nejvíce zřejmé, pokud byla hlíza uskladněna při teplotě nižší než 15 °C. Test byl méně účinný s hlízami, jež byly předem ošetřeny při pokojové teplotě (23,5 °C).

Je oceňováno, že optimalizace metody vynálezu pro konkrétní plodiny je v možnostech pracovníků v této oblasti technologie.

Příklad 3: Kit určený pro tuto metodu.

Kit přednostně obsahuje cedník (1), tj. nádoba s perforovaným dnem pro přecedění a propláchnutí vzorku, jež má takovou velikost, aby padla na nádobu s fenolovým substrátem (S) indikátoru enzymového poškození. Výhodně kit dále obsahuje nádobu na enzymový inhibitor (I).

Použití kitu je velmi jednoduché. Vzorek (2) testované plodiny je oloupán a umístěn do cedníku (1), jenž je promýván vodným roztokem fenolového substrátu (S) po dobu 2 minut nebo tak. Otlačení je detekováno jako černá/hnědá plocha na plodině.

V upřednostňovaném případě zobrazeném na obrázku 1, je cedník (1) obsahující vzorek oloupané plodiny (2) nejprve namočen do roztoku enzymového inhibitoru (I) na vhodnou dobu např. 15 minut.

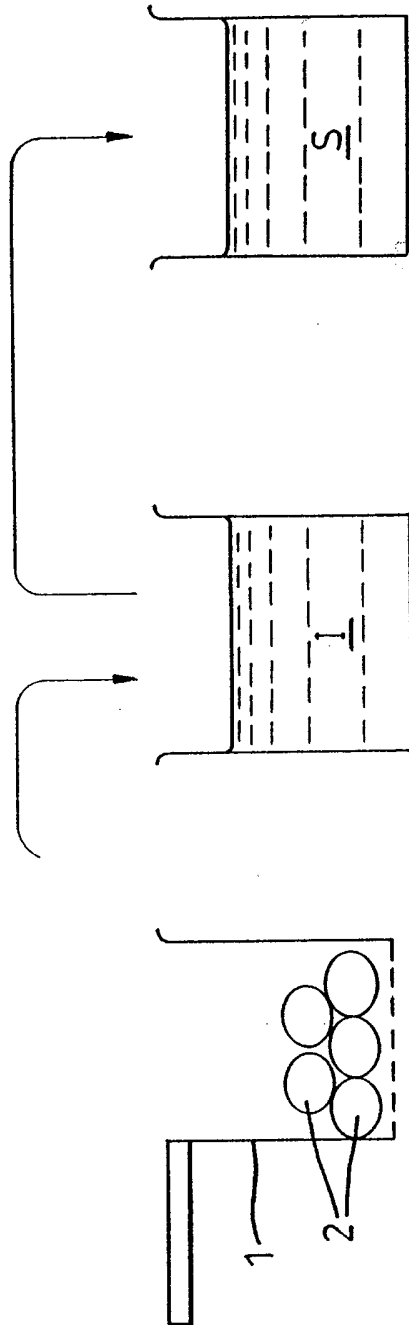
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Testovací způsob detekce poškození plodin vyznačující se tím, že obsahuje kroky zajišťující testovaný vzorek plodiny, odstranění slupky plodiny a stanovení přítomnosti nebo nepřítomnosti indikátoru poškození buněk plodiny.
2. Způsob podle nároku 1 vyznačující se tím, že indikátor poškození je oxidační enzymová aktivita.
3. Způsob podle nároku 2 vyznačující se tím, že enzym je polyfenoloxidas.
4. Způsob podle nároku 2 nebo 3 vyznačující se tím, že enzymová aktivita na substrát vede k tvorbě barevného produktu.
5. Způsob podle nároku 3 nebo 4 vyznačující se tím, že substrát je fenolová sloučenina vybraná z jednoho nebo více substrátů 4-methylkatecholu, katecholu, kyseliny „chlorogenové“, dopaminu, L-DOPA, pyrogallolu, katechinu a kyseliny kávové.
6. Způsob podle nároku 5 vyznačující se tím, že fenolová látka je 4-methylkatechol anebo katechol.
7. Způsob podle jakéhokoliv z nároků 2 až 6 vyznačující se tím, že způsob dále obsahuje aplikování množství enzymového inhibitoru účinného k prokázání enzymové aktivity v buňkách poraněných řezem, ale ne v buňkách poraněných nárazem.
8. Způsob podle nároku 7 vyznačující se tím, že inhibitor je vybrán jako samotný nebo směs z solného roztoku, okyselujících látek a redukčních činidel.
9. Způsob podle nároku 8 vyznačující se tím, že okyselující látky je kyselina citrónová.
10. Způsob podle nároku 8 vyznačující se tím, že redukčním činidlem je kyselina askorbová.
11. Způsob podle jakéhokoliv z předcházejících nároků vyznačující se tím, že plodinou je kořenová zelenina.

12. Způsob podle nároku 11 vyznačující se tím, že kořenová zelenina jsou brambory.
13. Použití fenolových látek jako substrátu pro indikátor enzymového poškození v testovacím způsobu podle jakéhokoliv z předcházejících nároků.
14. Použití enzymového inhibitoru v testovacím způsobu podle jakéhokoliv z předcházejících nároků.
15. Použití fenolové látky anebo enzymového inhibitoru pro výrobu kitu pro provedení testovacího způsobu podle jakéhokoliv z nároků 1 až 12.
16. Kit pro provedení testovacího způsobu podle jakéhokoliv z předcházejících nároků vyznačující se tím, že obsahuje nádobu, která je přednostně přenosná, pracovní plochu pro stanovení přítomnosti indikátoru poškození ve vzorku oloupané plodiny.
17. Testovací způsob pro detekci značně poškozené plodiny, jak je zde popsáno v jednom nebo více doprovodných příkladech.
18. Testovací kit jak je zde popsán v jednom nebo více doprovodných příkladech.

10.03.00

PV 2000-893



Obr. 1