

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



Rostlinná barviva - studium stability chlorofylu

Bakalářská práce

Autor práce: Nikola Lesková

Vedoucí práce: Ing. Matyáš Orsák, Ph.D.

© 2013 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Rostlinná barviva - studium stability chlorofylu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala panu Ing. Matyášovi Orsákovi, Ph.D. za cenné rady a dohled nad zpracování mé bakalářské práce a dále všem členům Katedry chemie patří poděkování za veškerou pomoc a ochotu.

Rostlinná barviva - studium stability chlorofylu

Plant pigments - study of chlorophyll stability

Souhrn

V současné době se stále častěji hovoří o pozitivním účinku chlorofylu a věnuje se více pozornosti na jeho využití v oblasti medicíny, farmacie a potravinářství. Kvůli nestabilní molekule chlorofylu je důležitý mechanismus, kterým se chlorofyl stabilizuje a umožní tak jeho efektivní rozvoj. Studium stability rostlinného chlorofylu bylo provedeno spektrofotometricky ve viditelné oblasti na základě pohlcování světla v různých vlnových délkách spektra. Cílem této práce bylo zhodnotit stálost chlorofylu *in vitro* za daných chemických a fyzikálních podmínek. Chlorofylový extrakt Kopřivy dvoudomé (*Urtica dioica*) byl podroben vlivu rozpouštědla acetonu a ethanolu, roztokům obsahující kovové ionty a prostředí tepla, chladu, světla a tmy. Kombinací všech těchto faktorů bylo získáno dvaatřicet vzorků, u nichž se měřila hodnota absorbance při vlnových délkách 411, 438, 470 a 665 nm v časovém intervalu. Zaznamenané změny v intenzitě zbarvení poukazují na to, že chlorofyl je nejvíce stabilní v podmínkách chladu a bez přístupu světla. Rychlý a okamžitý průběh degradace nastal u chlorofylového extraktu, který byl vystaven světlu a teplu. Přítomnost měďnatých iontů ve vzorku s ethanolem stabilizovala chlorofyl výrazně víc, než extrakt s železnatými či hořečnatými ionty. Kovové deriváty chlorofylu vytváří po zavedení do porfyrinového kruhu pevné pouto, které je mnohem odolnější vůči kyselinám a teplu, než přirozeně se vyskytující hořečnaté komplexy chlorofylu. Této výměně iontů hořčíku může být využíváno při přípravě chlorofylového potravinářského barviva, jelikož komerční příprava barviva obsahující čistý chlorofyl není možná, kvůli nestabilní molekule.

Klíčová slova: pigmenty, chlorofyl, degradace, kovové komplexy, stabilita

Summary

The positive effect of chlorophyll is recently discussed more and more often. The research nowadays is focused on its application at the field of medicine, pharmacy and food processing. Because of the significantly low stability of the chlorophyll molecule, the mechanism of its stabilization is important. It is not possible to reach the effective development without finding a suitable conditions to increase its stability. Chlorophyll stability was investigated by the spectrophotometry in the visible region, based on the light absorption at the different wavelengths of the spectrum. The target of the thesis was to evaluate the stability of the chlorophyll tested in vitro at the specified chemical and physical conditions. Chlorophyll extract of the stinging nettle (*Urtica dioica*) was subjected to the influence of solvent, specifically acetone and ethanol, the influence of metal ions in the solutions and finally the effect of heat, cold, light and dark. By the combination of all these factors, thirty-two samples were obtained. These were used for the measurements of the absorbance at 411, 438, 470 and 665 nm, depending on the time interval. Observed changes in the color intensity indicate that the chlorophyll is the most stable in cold with exclusion of light. In contrast, it is shown that the chlorophyll extract measured in the hot conditions with the access of light was rapidly degraded. Presence of copper(II) ions in the ethanol solution samples has significantly higher stabilizing effect than the presence of iron(II) ions or magnesium(II) ions in the same solution. Metal chlorophyll derivatives provide a strong linkage with the porphyrin cycle that is much more resistant against acids and heat than naturally occurring magnesium-chlorophyll complexes. This exchange can be used in a preparation of the chlorophyll food coloring, because, due to the low stability of the chlorophyll molecule, it is not possible to obtain food coloring that contains pure chlorophyll.

Keywords: pigments, chlorophyll, degradation, metal complexes, stability

Obsah

1	ÚVOD	1
2	CÍL PRÁCE.....	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Plastidy.....	3
3.1.1	Protoplasty.....	3
3.1.2	Leukoplasty	4
3.1.3	Chromoplasty	4
3.1.4	Chloroplasty	4
3.1.4.1	Morfologie a fyziologie chloroplastu.....	4
3.1.4.2	Struktura a význam thylakoidní membrány	5
3.1.4.3	Chloroplast a DNA.....	7
3.2	Chlorofyl.....	7
3.2.1	Historie výzkumu chlorofylu.....	7
3.2.2	Chemická struktura chlorofylu.....	9
3.2.3	Výskyt	9
3.2.4	Biosyntéza chlorofylu	9
3.2.5	Produkce chlorofylu	12
3.3	Stabilita chlorofylu.....	12
3.3.1	Degradace chlorofylu	13
3.3.1.1	Produkty degradace chlorofylu	15
3.3.2	Faktory ovlivňující změnu barvy	17
3.3.2.1	Posklizňové vlivy	17
3.3.2.2	Zpracování potravin	18
3.3.2.3	Světlo.....	19
3.3.2.4	Kovy a jejich sloučeniny	20
3.4	Využití chlorofylu.....	21
3.4.1	Zdravotní hlediska.....	21
3.4.2	Role v potravinářství.....	22
4	MATERIÁL A METODY	24
4.1	Rostlinný materiál.....	24
4.2	Použité chemikálie	24
4.3	Laboratorní pomůcky	24
4.4	Izolace chlorofylu	24
4.5	Příprava vzorků.....	25
4.5.1	Roztoky Fe, Cu a Mg	25

4.5.2	Rozpouštědla.....	26
4.5.3	Rozdělení vzorků.....	26
4.5.4	Způsob skladování vzorků	27
4.6	Měření vzorků.....	28
5	VÝSLEDKY	29
6	DISKUSE.....	31
7	ZÁVĚR.....	33
8	SEZNAM LITERATURY	34
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	42

1 Úvod

Chlorofyl je přírodní rostlinné barvivo, které způsobuje zelené zbarvení rostlin. Molekuly chlorofylu mají charakteristickou vlastnost přeměňovat sluneční energii na energii chemickou prostřednictvím fotosyntézy. Takto zelené rostliny vyrábějí sacharidy, základní zdroj energie pro další biochemické a biologické procesy na Zemi.

Do popředí zájmu moderních výzkumů se chlorofyl dostal až v 1. pol. 19. století. Bylo zjištěno, že má až na centrální prvek téměř totožnou chemickou strukturu jako hemoglobin, červené krevní barvivo. Centrálním prvkem chlorofylu je hořčík, zatímco centrálním prvkem hemoglobinu je železo. Množství známých struktur izolovaných z fotosyntetických organismů se od roku 1960 po součastnost zvýšilo ze tří na více než padesát.

Chlorofyl se ukazuje jako látka nezbytná pro všechny organismy na světě. Rostliny obsahující toto barvivo by měly být základem zdravého jídelníčku. Mezi běžné zdroje patří zelená listová zelenina, divoce rostoucí byliny a v nejkvalitnější formě ho můžeme najít v některých sladkovodních a mořských řasách, jako je například *Chlorela* a *Spirulina*. Rozložení a obsah chlorofylu v ovoci a zelenině jsou závislé na řadě faktorů, včetně druhu, klimatických podmínek, před a posklizňovém zacházení a způsobu zpracování potravin. Obecně platí, že rostliny netvoří chlorofyl, pokud nejsou vystaveny viditelnému záření.

Chlorofylové pigmenty jsou náchylné k mnoha degradačním reakcím, ať už chemické nebo enzymatické. Současná akce enzymů, slabých kyselin, kyslíku, světla a tepla, může vést ke vzniku velkého počtu rozkladných produktů. Chlorofyly a jeho deriváty mají pestré využití převážně ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu. Při přípravě potravinářského barviva chlorofylu se výměny hořečnatých iontů, jelikož není možné komerčně připravit barvivo obsahující čistý chlorofyl, kvůli nestabilní molekule. Měďnaté komplexy chlorofylů nejsou zdaleka tak citlivé na světlo jako chlorofyly a mají intenzivnější barvu, proto jsou vhodná, jako potravinářská aditiva.

2 Cíl práce

Cílem této práce je zpracovat literární přehled z vědeckých článků dané problematiky a zjistit stabilitu rostlinného chlorofylu *in vitro* na základě průběžných změn absorbance daného extraktu.

Předpokládané hypotézy zohledňují jednotlivé chemické a fyzikálních vlivy:

- Zamezením přístupu světla bude chlorofyl méně náchylný k degradaci
- Roztoky kovových iontů ovlivní stabilitu a intenzitu zbarvení extraktu chlorofylu
- Uchování extraktu při nižších teplotách příznivě ovlivní stálost chlorofylu

3 Literární přehled

3.1 Plastidy

Plastidy tvoří výraznou skupinu organel ve vyšších a nižších rostlinách a jsou jedním z určujících znaků, kterými se rostliny liší od zvířat (Pyke, 2007).

V rostlinném světě známe mnoho barevných sloučenin, které se jmenují pigmenty. Rostlinné fytochromy, které se nacházejí v protoplasmě, jsou soustředěny do zvláštních útvarů bílkovinné povahy, do plastidů, dosahujících velikosti až 10 μm (Gjubbnet, 1953).

Plastidy jsou charakteristické pro rostlinné buňky. Vykonávají mnoho specializovaných funkcí, které jsou nezbytné pro růst a vývoj rostlin, například fotosyntéza, asimilace dusičnanů a sulfátů, syntéza aminokyselin a mastných kyselin, ukládání sacharidů a tuků nebo tvorba barvy v některých plodech a květech. K dosažení tohoto cíle, vykonávají jejich membránové systémy specializované transportní funkce, včetně transportu a třídění proteinů a výměny metabolitů pro přijímání obou obalů, a rovněž transport protonů a elektronů pro přijímání thylakoidní membrány chloroplastů (Finkemeier et al., 2010).

Pyke (2009) definuje plastid, jako organelu obklopenou dvojitou membránou, která obsahuje DNA, je schopna rozmnožování dělením, je místem výroby a skladování důležitých chemikálií, a nevykazuje typ dýchání nalezený v mitochondriích. Fotosynteticky aktivní chloroplasty obsahující chlorofyl se nacházejí v mnoha rostlinných buňkách. Nechlorofylované plastidy jsou všudypřítomné v buňkách fotosyntetických a nefotosyntetických orgánů rostlin, například v meristémech, kořenech, vnitřních stoncích, listí a okvětních lístcích.

3.1.1 Protoplasty

Všechny plastidy uvnitř rostlin jsou nakonec odvozeny z těchto progenitorových plastidů, které se nacházejí v meristematických buňkách, zvané proplastidy. Protoplasty byly odvozeny z několika málo proplastidů, které byly přítomny v zygotě a odvozené potenciálně, jak z mateřské vaječné buňky, tak otcovského pylového zrna. Znalost proplastidů buněčné biologie a jejich jemná ultrastruktura je omezena, většinou z důvodu obtížné analýzy malých organel bez pigmentu v malé oblasti husté tkáně. Fyzický vzhled proplastidů byl odvozen z velké části elektronovým mikroskopem, který zobrazuje proplastidy, jako malé organely obsahující omezenou vnitřní strukturu, která je rozptýlena po celé cytoplasmě (Pyke, 2007).

3.1.2 Leukoplasty

Leukoplasty jsou plastidy neobsahující pigmenty. Na světle se mohou měnit v chloroplasty (Kubát a kol., 2003).

Tyto skladovací plastidy byly rozděleny na amyloplasty shromažďující škrob, elaioplasty skladující lipidy a proteinoplasty obsahující proteiny (Wise, 2007).

3.1.3 Chromoplasty

Chromoplasty jsou zodpovědné za žluté, oranžové a červené barvy mnoha květů a plodů. Jsou také obsaženy v některých kořenech a hlízách, např. mrkev či sladké brambory. Dostává se jím nejvíce pozornosti, neboť hromadí pigmenty, které jsou nezbytné pro smyslové kvality zahradnických produktů (Pyke, 2007).

Funkce chromoplastů je především ekologická, jejich zbarvení láká opylovače popř. živočichy, kteří se podílejí na rozšiřování semen (Kubát a kol., 2003).

Chromoplasty jsou velikostně menší, než chloroplasty a mohou vznikat přímo z proplastidů, nepřímo z chloroplastů nebo z amyloplastů (Waters et al., 2004).

3.1.4 Chloroplasty

Chloroplasty je možné z hlediska existence života na Zemi považovat za nejdůležitější orgány, protože jsou místem, kde se z anorganických látek vytvářejí látky organické, které slouží jako zdroj energie a stavebních látek pro jiné organismy. Jejich činností také vznikly veškeré energetické zásoby fosilních paliv (Kubát a kol., 2003).

Ukázalo se, že pro jemné studium stavby chloroplastů nepostačuje mikroskop. Nutné je proniknout do submikroskopické morfologie plastidů, aby se mohly objasnit chemické struktury a pochody v plastidech (Gjubbnet, 1953).

Typický chloroplast má většinou oválný nebo čočkovitý tvar, jejich velikost je mezi 4 – 6 μm . Jedna buňka listu může obsahovat 40 – 50 chloroplastů, jeden mm^2 listu více než 500 00 (Kubát a kol., 2003).

Gerontoplasty jsou chloroplasty, které prochází degenerativními změnami v zestárlých tkáních (Waters et al., 2004).

3.1.4.1 Morfologie a fyziologie chloroplastu

Chloroplasty v rostlinách jsou vázány dvěma membránami, tzv. vnějším a vnitřním obalem. Membrány jsou odděleny mezimembránovým prostorem, uvnitř plastidu je stroma,

vodnatá tekutina. Stroma obsahuje mnoho membrán thylakoidů. Lumen thylakoidů se nazývá prostor mezi dvěma membránami thylakoidů. V mnoha rostlinách se thylakoidy skládají do sloupců membrán, tzv. grana. Fotosyntetický aparát se nachází v thylakoidech i granách. (Bréhélin et al., 2007).

Význam chloroplastů pro přežití rostlin je zřejmý. Chloroplasty produkují cukry, tedy energii. Jsou také zdrojem aminokyselin a glykolipidů. Chloroplasty jsou také primární místo pro syntézu mastných kyselin v zelených rostlinách (Cavalier-Smith, 2000).

Charakteristickým rysem chloroplastů rostlin a řas je jejich rozsáhlý, vnitřní, zelený, chlorofyl obsahující membránové systémy zvané thylakoidní membrány, kde dochází k primární reakci fotosyntézy. Tento systém fotosyntetických reakčních center převádí světelnou energii na chemickou energii, která slouží k řízení buněčného metabolismu (Gillham, 1994).

3.1.4.2 Struktura a význam thylakoidní membrány

Thylakoidní membrána je zploštělá lipidová dvojvrstva složená převážně z galaktolipidů a malých částí fosfolipidů. Mastné kyseliny z části thylakoidních lipidů jsou bohaté na linolenové a linolové kyseliny, které způsobují nezvyklou tekutost thylakoidní membrány a tím jsou sloučeniny v nich relativně mobilní. Nejdůležitější z těchto složek jsou chlorofyly. Chlorofyly jsou zapuštěny do membrány a připojeny nekovalentními vazbami na proteiny (Salisbury et al., 1985).

Vnitřní thylakoidní membránový systém se skládá ze zploštělých naskládaných či nenaskládaných membránových váčků, které se nazývají grana a stroma lamely. Primární reakce fotosyntézy jsou katalyzovány čtyřmi hlavními pigmenty - proteinové komplexy membrány thylakoidů: fotosystém II a fotosystém I a jejich přidružené chlorofylové antény, komplex cytochromů b6 / f, a ATP-syntasa. Světelnou energii snímají antény a odesílají jí do reakčních center fotosystému II a fotosystému I (Olive et al., 1991).

Uvnitř membrány je kanál naplněný vodou a rozpuštěnými solemi, tzv. thylakoidní kanál. Kanál obsahuje fotosyntetické substráty a produkty, jak H^+ ionty přemístěné z protonových kanálů a pumpy, tak také jako H^+ ATPasy. Nakonec se v kanálu nachází fotosystémy I a II, které jsou hnací silou fotosyntézy. Fotosystém I je bohatý na chlorofyl A a má pouze minimální množství chlorofylu B v porovnání s fotosystémem II. V těchto systémech většina pigmentů slouží k příjmu světelné energie, která se převádí na energii chemickou (Heaton et al., 1996).

Energie se používá k napájení elektronu v chlorofylu a vytvoření stabilního náboje odděleného membránou. Vznikají tím oxido-redukční řady podél fotosyntetického elektronového transportního řetězce. Na jednom konci tohoto řetězce je voda oxidována fotosystémem II při současném vzniku kyslíku a uvolnění protonů do lumenu. Poté jsou elektrony přeneseny do plastochinonu ke komplexu cytochromů b6 / f, který funguje jako protonová pumpa a rozpustný přenašeč elektronů plastokyaninu v thylakoidu lumenu. Na druhém konci řetězce fotosystému I oxiduje plastokyanin, na světle vstřebává a přenáší elektrony do ferredoxinu a pak se z NADP vytváří NADPH. Výsledná hodnota gradientu pH je použita ve čtvrtém komplexu ATP-synthasy, produkce ATP v části stromatu. Tento enzym také funguje v opačném směru hydrolýzou ATP pro čerpání protonů do lumenu thylakoidů a tím vytváří gradient pH (Olive et al., 1991).

Degradace thylakoidní membrány

Degradaci thylakoidní membrány následuje poměrně uspořádaný proces, ačkoliv důvod, který degradaci spouští není znám. Hormony jako ethylén, které byly zapleteny do posílení procesu stárnutí, mohou být počátečním spouštěčem degradace membrány (Paliyath et al., 1992).

Výsledek degradace membrány plastidu se skládá z lipidů a proteinů (Bréhélin et al., 2007).

Tukové kapénky, které se tvoří v raném stádiu degradace thylakoidů, obsahují karotenoidy. Karotenoidy mají v membráně dvě hlavní funkce: za prvé absorbují světlo, a proto se podílejí na fotosyntéze; za druhé se vychytávají volné radikály. Tím, že jsou z membrány odstraněny, membrány a její složky se stanou citlivější na poškození volnými radikály. Volné radikály jsou známy tím, že způsobují konformační změny v proteinech a tím jsou vazebné proteiny chlorofylu A/B velmi náchylné k poškození. Tyto konformační změny mohou způsobit jejich větší náchylnost k proteolytické degradaci (Nooden et al., 1988).

Jenkins a Woolhouse (1981) poznamenali, že když byly tukové kapénky uvolněny z membrány, rovněž obsahovaly plastochinon (PQ). Plastochinon je nedílnou součástí necyklického elektronového transportního řetězce. Během fotosyntézy je PQ redukován na PQH tím, že přijímá dva ionty vodíku ze stromální strany membrány. Pokud koncentrace PQ klesá, bude se H^+ pohybovat do thylakoidních kanálů, dojde ke změně gradientu pH, což vede k nižší pH na stromální straně membrány.

Tento pokles pH mohl zahájit aktivitu proteolytických enzymů a tím zvýšit rychlost degradace proteinů (Heaton et al., 1996).

3.1.4.3 Chloroplast a DNA

Chloroplasty společně s mitochondriemi jsou jediné buněčné organely, které obsahují vlastní aparát pro biosyntézu bílkovin. Skládá se z chloroplastové DNA, RNA polymeras, enzymů podílejících se na metabolismu RNA, ribosomů, transferové RNA, a několik translačních faktorů. Chloroplastové ribosomy se podobají bakteriím a mají podobné ribosomální RNA, bílkoviny a citlivost na podobné spektrum antibiotik. Kruhové chloroplastové molekuly DNA dosahují velikosti mezi 70 KB a 400 KB a jsou přítomny asi ve sto kopiích na chloroplast (Sugiura, 1996).

Typická mezofilní buňka obsahuje téměř 100 plastidů a tedy okolo 10 000 kruhových chloroplastových DNA. Byla odhalena existence zhruba 120 chloroplastových genů v rostlinách a zelených řasách. Patří mezi ně asi 50 genů, které kódují komponenty transkripčního aparátu (podjednotky RNA polymerasy) a translačního aparátu (ribosomální RNA, ribosomální proteiny, přenos RNA a translační faktory). Zhruba 40 genů je zapojeno do fotosyntézy a kódují některé podjednotky fotosystému I a II, komplex cytochromů b6/f, ATP-synthasy a Rubisco. Ostatní podjednotky těchto komplexů jsou kódovány jaderným genomem, převedeny na cytoplazmatické ribosomy a posttranslačně dovezeny do chloroplastu. Ostatní chloroplastové geny, však nebývají všeobecně zachovány. Jedenáct genů kódujících podjednotky NADH dehydrogenasy jsou přítomny v chloroplastech rostlin, ale ne v řasách (Bennoun, 1982).

3.2 Chlorofyl

Chlorofyly jsou jasně zelené přírodní pigmenty nalezené výhradně ve fotosyntetických rostlinách a vybraných bakteriích (Dailey, 1990).

Chemicky se řadí mezi porfyriny obsahující hořčík. Procento celkového hořčíku, které je vázáno na chlorofyl, je relativně nízké a pohybuje se od 0,2 % do 15,4 %. Za extrémních podmínek, jakými je nedostatek hořčíku v listech rostlin, které jsou ve stínu, se může procento vázaného chlorofylového hořčíku z celkového hořčíku zvýšit na téměř 60 % (Bohn et al., 2004).

3.2.1 Historie výzkumu chlorofylu

Berzelius byl první, kdo se pokusil v roce 1838 o izolaci chlorofylu a jeho práce vydláždili cestu pro pozdější badatelé, z nichž většina používala tak drastické metody, že se jim podařilo izolovat pouze směs produktu rozkladu chlorofylu (Kephart, 1955).

Měl za to, že je možné rozlišovat tři druhy této látky, je třeba však přiznat, že způsob jejich získávání a charakteristika jsou velmi neurčité. Potom obrátil Berzelius pozornost k účinkům slunečního světla. Předpokládal, že se na podzim v listech přeměňuje chlorofyl v xantofyl (Timirjazev, 1953).

Stokes v roce 1864 spektroskopicky zjistili, že chlorofyl je směs pigmentů a oddělil podle oddílu mezi nemísitelná rozpouštědla (Kephart, 1955).

Stokes popsal ve spektru chlorofylu pět absorpčních pásů; jeho popis však není zcela jasný, jak o tom svědčí skutečnost, že všichni překladatelé a interpreti jeho prací pochopili jeho výklad opačně. Stokes zaměřil své výzkumy k vyslovenému předpokladu o totožnosti chlorofylu s biliverdinem a dokázal, že tato domněnka není správná. Pokud jde o chlorofyl, dospěl k závěru, že se skládá ze čtyř látek, dvou zelených a dvou žlutých. Zelené látky silně červeně fluoreskují, žluté nikoliv (Timirjazev, 1953).

Vztah mezi zeleným pigmentem rostlin a krevním červeným barvivem krve předpokládal Verdeil (1851). Tato hypotéza byla rozpracována v roce 1879 Schunckem, Marchlewskim a Hoppe-Seilerem a některé fáze těchto hypotéz jsou nyní známy za správné. Vzhledem ke své extrémní citlivosti, rozpustnosti a obtížnosti separace od kontaminovaných látek, bylo zkoumání chlorofylového izolátu opuštěno v práci Hoppe-Seiler, a přenecháno pro Willstaetera a jeho studenty, kteří izolovali a chemicky určovali zelené rostlinné pigmenty. Práce Willstaetera v letech 1906 a 1913 označovala chlorofyl, jako nestabilní vodě rozpustné sloučeniny hořčičku, charakterizována esterovou methyl skupinou a fytyl alkoholem (Kephart, 1955).

Fisher navrhl systém číslování, který se značně liší od toho, které navrhla Mezinárodní Unie pro Chemii, díky své jednoduchosti je preferována v chemii chlorofylu. V letech výzkumu, které byly stimulovány hypotézou Verdeila, vyvrcholila série oslnivého vyšetřování Hanse Fishera, pro něž mu byla udělena Nobelova cena v roce 1930. On a jeho spolupracovníci konečně stanovili správnou strukturu heminu, část hemoglobinu a ukázali skutečný vztah k chlorofylu (Bowers, 1947).

Při ozařování rostlin se chlorofyl rychle rozvíjel a bylo navrženo, že existuje předchůdce chlorofylu v rostlinách pěstovaných ve tmě. Tato látka byla nazývána protochlorofyl a byla izolována a strukturálně identifikována. Nejdůležitější údaje o chlorofylu pocházejí od Berzelia, Fremyho a Stokese (Timirjazev, 1953).

3.2.2 Chemická struktura chlorofylu

Tyto pigmenty jsou založeny na makrocyclických tetrapyrrolech vázané methylenovými můstky, tato struktura je známa jako porfyrin (Dailey, 1990).

Chlorofylová porfyrinová struktura je rozšířena o přídavek pátého isocyklického kruhu (kruh E) spojující pozici δ a γ (Gross, 1991).

Čtyři kruhy jsou koordinovány hořčnatými ionty (Mg^{2+}). Pátý izocyklický kruh se nachází v blízkosti třetího pyrrolového kruhu. Na čtvrtém kruhu je substituentem kyselina propionová, která je esterifikována hydrofobním diterpenickým alkoholem fytolem (Lichtenthaler et al., 1981).

Ačkoli porfyrin má hydrofilní charakter, nepolární charakter fytolu je pro molekuly chlorofylů významnější a jsou proto dobře rozpustné v nepolárních rozpouštědlech, jako je etanol, aceton, benzen, atd. (Jackson, 1976).

Chlorofyl A je modrozelený a má na druhém pyrrolovém kruhu methylovou skupinu, chlorofyl B je žlutozelený a má na pyrrolovém jádře aldehydickou skupinu. Chlorofyl D je chemicky podobný chlorofylu A, ale má jiné absorpční spektrum a nachází se u skupiny *Rhodophyta*, poprvé popsán u druhu *Girgatinia gardii* (Deman, 1999).

3.2.3 Výskyt

Z této základní struktury existuje pět tříd chlorofylů v rostlinách a fotosyntetických organismech - A, B, C, D, E. Chlorofyly A a B samozřejmě převažují u všech vyšších rostlin, zatímco chlorofyly C, D a E se nacházejí ve všech částech různých fotosyntetických řas, a dvouatomových druhů včetně hnědých, červených, žlutých a zelených řas. Vedle toho byly izolovány čtyři třídy bakteriochlorofylu ve fotosyntetických bakteriích, bakteriochlorofyl A a B převládá v purpurových bakteriích, zatímco C a D se nachází v zelených a purpurových sírových bakteriích. Vysoký obsah chlorofylu byl nalezen v listové zelenině, jako špenát a salát (Wrolstad et al., 2004).

3.2.4 Biosyntéza chlorofylu

Syntéza chlorofylu je velmi složitý proces, na kterém se podílí mnoho enzymů. Při důležitosti tetrapyrrolů v metabolismu je jasné, že porucha této dráhy může vést k velmi závažným poruchám. I přes velké množství informací o tomto procesu, není zdaleka vše vysvětleno (Von Wettstein et al., 1995).

Pro lepší pochopení biochemických změn, které se podílejí na tvorbě chlorofylu, je vhodné vzít v úvahu různá stádia: 1. tvorba kyseliny δ -aminolevulové (ALA), 2. vznik monopyrrolu (porfobilinogenu), 3. vytvoření uroporfyriinogenu (první makrocyclický tetrapyrrol), 4. tvorba protoporfyriinogenu, 5. vznik protoporfyriinu IX dehydrogenací makrocyccklu, 6. chelace Mg^{2+} a předání hořčíku protoporfyriinu IX, 7. vytvoření isocycckického kruhu a protochlorofylidu A, 8. redukce protochlorofylidu na chlorofylid, 9. vytvoření chlorofylu, 10. biosyntéza chlorofylu B (MacDougall et al., 2002).

Prvním meziproduktem biosyntetické dráhy chlorofylu je δ -aminolevulinová kyselina (ALA). Ta může vznikat dvěma různými drahami. První je charakteristická pro α -proteobakterie a zvířata, kde ALA vzniká kondenzací sukcinyl-CoA s glycinem pomocí enzymu ALA - synthasy. U rostlin vede k ALA druhá dráha, zvaná C5 (Reinbothe et al., 1996).

Dalším krokem je kondenzace dvou molekul ALA, při němž se uvolní dvě molekuly vody, čímž vznikne porfobilinogen. Tento krok je katalyzován porfobilinogen synthasou. Následně dojde ke kondenzaci čtyř molekul porfobilinogenu a vznikne lineární tetrapyrrol hydroxymethylbilan. Tato fáze je katalyzována za pomoci hydroxymethylbilan synthasy, dochází k deaminaci molekul porfobilinogenu. Na tento krok bezprostředně navazuje vznik uroporfyriinogenu III, katalyzovaný uroporfyriinogen III kosyntethasou. Dalším meziproduktem biosyntetické dráhy je koproporfyriinogen III, který vzniká dekarboxylací všech acetylových postranních řetězců za vzniku methylů. Enzymem katalyzujícím tento úsek je uroporfyriinogen III dekarboxylasa. Následuje další úprava postranních řetězců, propionylové zbytky koproporfyriinogenu III na jádrech A a B jsou dekarboxylovány za tvorby vinylů koproporfyriinogen III oxidativní dekarboxylasou. Touto dekarboxylací vzniká protoporfyriinogen IX (Von Wettstein et al., 1995).

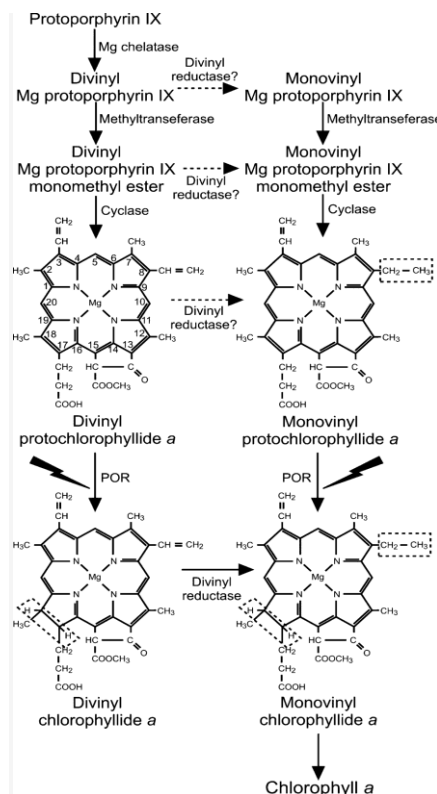
Protoporfyriinogen IX oxidasa, tedy enzym katalyzující odejmutí 6 elektronů z protoporfyriinogenu IX za tvorby konjugovaného systému dvojných vazeb, je prvním enzymem biosyntézy tetrapyrrolů, který se nevyskytuje výhradně na chloroplasty. Reakcí, která potřebuje ke svému průběhu kyslík, vzniká protoporfyriin IX, první porfyriin biosyntetické dráhy. Vysvětlení, proč syntéza probíhá přes porfobiliny a ne porfyriiny, spočívá v tom, že porfobiliny, na rozdíl od porfyriinů, nezpůsobují při ozáření tak masivní vznik reaktivních meziproduktů kyslíku a způsobují tedy rostlinám menší fotooxidativní poškození, než by za stejné situace způsobily porfyriiny (Reinbothe et al., 1996).

Prvním zásadním krokem syntézy chlorofylu je chelatace protoporfyriinu IX hořčíkem. Tato reakce je katalyzovaná Mg chelatalasou. I když by se zdálo, že mezi chelatací

protoporfyrinu IX hořčíkem a železem nemůže být velký rozdíl, není to pravda. Zatímco ferrochelatasa je monomerní enzym, katalyzující chelataci samovolně, a tedy bez ATP, Mg chelatáza je složená ze tří podjednotek, které katalyzují chelataci jen za přítomnosti ATP (MacDougall et al., 2002).

Další fází je vytvoření isocyklického kruhu, katalyzované enzymatickým komplexem S-adenosylmetionin Mg protoporfyrin IX-O-methyltransferázy a Mg protoporfyrin IX monomethylester oxidativní cyklasy. V první fázi reakce je za přítomnosti S-adenosylmetioninu a methyltransferasy esterifikována karboxylová skupina propionylu na jádře C, aby se zabránilo dekarboxylaci této skupiny v průběhu dalších reakcí. Při cyklizaci je pomocí oxidativní cyklasy hydroxylován β -uhlík propionylu, poté dojde k jeho dehydrataci a vzniku oxo skupiny. Kruh E vznikne spojením α -uhlíku propionylu s můstkovým atomem, čímž vznikne divinylprotochlorofylid. Vinylová skupina na jádře A nebo B je redukována pomocí vinyl reduktasy. K redukci vinylových skupin může pravděpodobně dojít kdykoliv od protoporfyrinu IX až po chlorofylid. Protochlorofylid je redukován na dvojně vazbě kruhu D za vzniku chlorofylidu, přičemž k redukci vedou dvě dráhy: na světle nezávislá a na světle závislá. Posledním krokem syntézy chlorofylu je esterifikace propionylu 4. kruhu fytolpyrofosfátem nebo jeho derivátem geranylgeraniolpyrofosfátem. Enzymem zodpovědným za tuto esterifikaci je chlorofyl syntethasa (Von Wettstein et al., 1995).

Obrázek 1: Schéma chlorofylové biosyntézy převzato od Heyese et al. (2006)



3.2.5 Produkce chlorofylu

Hendry a Houghton (1996) odhadují roční produkci chlorofylu zhruba 1 100 000 000 tun, přibližně ze 75 % vyrobené ve vodním prostředí, především mořském. Je zřejmé, že chlorofyl, jako zdroj syrového materiálu pro potravinářská barviva, nepředstavuje žádný problém s nabídkou.

Rozložení a obsah chlorofylu v ovoci a zelenině jsou závislé na řadě faktorů, včetně druhu, agroklimatických podmínek, před a posklizňovém zacházení a druhu a míře zpracování potravin (Gross, 1991).

Ačkoli je obtížné zobecnit přes rozmanitost rostlinného pletiva obsahu chlorofylu z běžně konzumované zeleniny, zpravidla překračuje hodnoty dalších bioaktivních pigmentů, například karotenoidů, a to až pětinasobně (Ferruzzi et al., 2007).

Denně se obnoví přibližně 5 – 8 % celkového množství chlorofylu. Podmínkou je světlo, přítomnost proto-chlorofylu a alespoň nepatrné množství dvojmocného železa. Obecně platí, že rostliny netvoří chlorofyl, pokud nejsou vystaveny viditelnému záření (Kephart, 1955).

3.3 Stabilita chlorofylu

Chlorofyly jsou extrémně citlivé na fyzikální a chemické změny, s nimiž se setkávají prostřednictvím zpracování potravin (Schwartz et al., 1990).

Haisman a Clark (2006) zjistili, že stabilita chlorofylu v poškozených buňkách je závislá na koncentraci a povaze buněčných kyselin a na vztahu mezi chlorofylem a lipoproteiny v chloroplastu.

Pro stabilizaci chlorofylu se používá celá řada neutralizačních činidel, včetně hydroxidu hořečnatého. Většina postupů na stabilizaci chlorofylu měla značný vliv na chuť a texturu potravin (Deman, 1999).

Přeměna chlorofylu A a B příslušných epimerů nastává rychle v organických rozpouštědlech (MacDougall et al., 2002).

Citlivost přírodních chlorofylů vůči extrémním hodnotám pH a teploty, umožňuje vytvoření několika odlišných derivátů prostřednictvím zpracování rostlinné tkáně a lidského trávení (Ferruzzi et al., 2007).

3.3.1 Degradace chlorofylu

Chlorofylové pigmenty jsou náchylné k mnoha degradačním reakcím, ať už chemické nebo enzymatické. Současná akce enzymů, slabých kyselin, kyslíku, světla a tepla, může vést ke vzniku velkého počtu rozkladných produktů (Mangos et al., 1997).

Chlorofyl je degradován ne jen proto, že jeho produkty přispívají k opakovanému použití, ale především proto, že jinak by došlo k zablokování přístupu k více hodnotným materiálům. Dusík a uhlík, ze kterých je vyroben chlorofyl zůstává v buňce navždy (Matile et al., 1999).

Odhaduje se, že každý rok je degradováno přibližně 1,2 miliard tun chlorofylu (Hendry et al., 1987).

Degradační dráha

Všeobecně uznávaná dráha degradace chlorofylu se skládá ze dvou fází, před (v rané fázi) a po (pozdní fáze) štěpení makrocyclického kruhu tetrapyrrolu. Produkty v počáteční fázi jsou nazelenalé, zatímco ty v pozdní fázi jsou v podstatě bezbarvé (Vicentini et al., 1995).

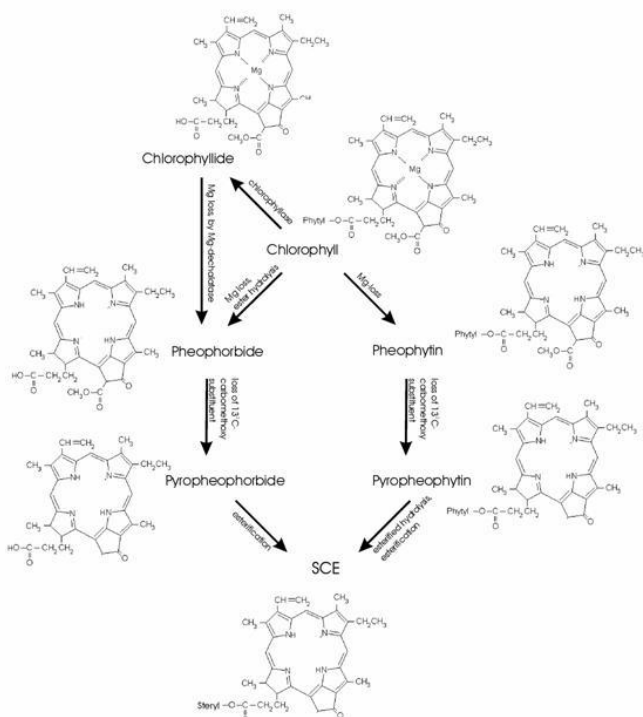
Výsledkem degradace chlorofylu je vytvoření pěti skupin meziproduktů, kde jeden z nich je považován za konečný produkt. Příčinou jejich zařazení do skupin na rozdíl od individuálních sloučenin je, že polovina bočních řetězců chlorofylu je často substituována různými skupinami, pravděpodobně výsledek faktorů životního prostředí, jako je pH a enzymatické změny. Degradační dráha zahrnuje pět kroků. První krok spočívá v štěpení fytolového řetězce chlorofylu enzymem chlorofylasou, což má za následek vznik chlorofylidu. Druhý krok, který je vlastně paralelní s prvním krokem je kyselinové odstranění z atomu Mg^{2+} a tvorba feofytinu. Chlorofylid se potom převede na feoforbid prostřednictvím ztráty jeho hořečnatého iontu, a feofytin je následně převeden na feoforbid při ztrátě jeho fytolového řetězce. Feoforbid je pak přeměněn na fluorescenční sloučeniny. Přeměna se týká štěpení porfyrinového kruhu a je s největší pravděpodobností důsledkem akce dioxygenasy (Matile et al., 1989).

Struktura této sloučeniny se může lišit ve své skupině R, nicméně kvůli jednoduchosti, jsme popsali, že jsou všechny stejné. Posledním krokem je přeměna sloučenin fluorescenčních na sloučeniny nefluorescenční. Tento poslední krok je výsledkem přesunu systému delokalizované dvojně vazby, což vede k ztrátě fluorescence. Konečný produkt (rezavý pigment) je bezbarvý, a k tomu nedojde, dokud nebyl použit značně radioaktivní chlorofyl k studii degradace, kdy bylo možné RPS detekovat. Existuje několik rozporů týkajících se totožnosti původních katabolitů během rozkladu chlorofylu (Heaton et al., 1996).

Amir-Shapira et al. (1987) zjistili, že chlorofylid A a jiné polární defytalaty (tj. ztráta řetězu R) jsou ve velkém množství nahromaděné ve stárnoucích citrusových slupkách, zatímco ve stárnoucí petrželové nati došlo k zvýšení feofytinu A.

Postupujícím stárnutím dochází také k akumulaci meziprojektu feoforbidu v některých rostlinách. Feoforbid je defytalátová molekula chlorofylu, která postrádá jeho centrální atom hořčíku. Během skladování nebo zpracování potravin, dochází k akumulaci mnoha různých meziprojektů (Heaton et al., 1996).

Obrázek 2: Degradace chlorofylu dle Susanne Fietz et al. (2004)



Všechny tyto deriváty mají jednu vlastnost společnou. Je tím snadná detekce jejich charakteristickou absorpcí světelného spektra, což je činí snadno rozpoznatelnými a kvantifikovanými. Během stárnutí se sledování chlorofylových derivátů stává obtížné, jelikož katabolity zmizí bez zanechání stopy (Krautler et al., 1991).

Počáteční krok degradace chlorofylu v zestárlých tkáních je iniciován vnějšími faktory, jako je vodní stres, snížené denní světlo, změny teplot, zvýšené hladiny etylénu nebo nějaký jiný faktor či jejich kombinace. To vyvolává změny v genové expresi, což zahájí senescenci. Změny v genové expresi vyvolávají proteosyntézu, degradaci bílkovin a mnoho dalších změn. Jsou to změny uvnitř buněk, které přinášejí postupnou degradaci chlorofylu. Jak bylo uvedeno výše, první krok degradace chlorofylu ve zpracovaných potravinách je narušení tkáně vnějšími silami opracovávání, které směřují k změnám chemickým,

enzymatickým a popřípadě změnám genové exprese, které přinášejí snížení koncentrace chlorofylu (Heaton et al., 1996).

3.3.1.1 Produkty degradace chlorofylu

S omezenými, ale stále narůstajícími důkazy, že vybrané chlorofylové deriváty mohou být vstřebatelné u lidí, byly zahájeny snahy o objasnění faktorů ovlivňujících střevní absorpci a potenciální biologické dostupnosti. Vzhledem k tomu, že chlorofylové deriváty pokrývají širokou škálu polarit z lipofilních přírodních chlorofylů a ve vodě vysoce rozpustný chlorofylin sodíku a mědi, a mají variabilní citlivost na pH, individuální rozdíly v zaživacím chování a trasy absorpce, jsou tyto domněnky pravděpodobné (Ferruzzi et al., 2007).

Chlorofylidy

Fytyl esterová skupina chlorofylu může snadno hydrolyzovat a podpořit tvorbu chlorofylidu a fytolu. Hydrolýza může probíhat za mírných podmínek buď kyseliny, nebo zásady. Nicméně, obecně jsou chlorofylidy připravovány enzymaticky, hydrolýza je katalyzovaná enzymem chlorofylasou, který se zdá být přítomný ve všech zelených rostlinných pletivech, bývá ho více v listech a méně v kořenech a semenech. Navíc, její činnost se mění podle druhu rostliny. Cukrová řepa (*Beta vulgaris*) je příkladem druhem rostlin, jejichž listy jsou obzvláště bohaté na chlorofylasu (Holden, 1961).

Chlorofylasa je vnitřní membránou glykoproteinu nacházející se v thylakoidní membráně (Terpstra, 1981).

Není běžně ovlivňována chlorofylovým substrátem, ačkoliv chlorofyl se nachází ve stejné membráně. V neporušeném rostlinném pletivu je chlorofylasa udržována v neaktivní a stabilní konformaci přilehlá k lipidům thylakoidní membrány (Lambers et al., 1985).

Musí dojít k narušení thylakoidní membrány, aby bylo možné aktivovat chlorofylasu. Pokud nedojde k aktivaci enzymu pomocí tepla, mechanickým poškozením nebo jiným druhem narušení, tak v čerstvém rostlinném pletivu nevzniknou chlorofylidy. Optimální teplota pro tepelnou aktivaci chlorofylasy v zelenině je v rozmezí od 60 do 82 ° C, zatímco blanšírování při 100 ° C enzym inaktivuje (MacDougall et al., 2002).

Feofytiny

Feofytiny jsou deriváty chlorofylu, které neobsahují hořčík. Většina obecných mechanismů chlorofylu A a B degradují acidokatalitickou přeměnou na feofytin A a B, kterou provádí buněčné kyseliny. V tomto procesu se vytěsnily hořečnaté ionty z chlorofylů se dvěma vodíky vedoucí k odpovídajícím feofytinům. Odstranění centrálního iontu hořčíku v

chlorofylech může být také provedeno pomocí enzymu hořčíku dechelatasy. Rostlinný materiál změni barvu z modrozelené až na matně olivově zelenou přeměnou chlorofylu A a B na jejich příslušné feofytiny. Tato změna je nejvíce rozšířena v zelené zelenině a probíhá při tepelném zpracování, zmrazení a skladování (Jones et al., 1961).

Feofobitiny

Feoforbitiny jsou hydrolyzované chlorofyly bez fytole, které ztratily hořečnaté ionty. Feoforbitiny mohou být buď vyrobeny enzymatickou hydrolyzou z feofytinů, proces, který je katalyzován chlorofylasou, nebo odstraněním centrálních hořečnatých iontů z chlorofylidů, které je provedeno, např. v buněčných kyselinách nebo enzimech hořčíku dechelatasy.

Feoforbidy

Ukázalo se, že pigmenty převládají v nálevu okurek, což naznačuje, že v solném laku je podpořena chlorofylasová činnost a že pH solného médi dále podporuje výměnu hořčíku v chlorofylech a chlorofylidech vodíkem (Jones et al., 1961).

Pyrochlorofylové, pyrochlorofylidové, pyrofeofytinové a pyrofeoforbidynové pyroderiváty chlorofylů jsou sloučeniny, které ztratili karbomethoxy skupinu z desátého uhlíku isocyklického kruhu, skupina byla nahrazen vodíkem. Nedávné výsledky ukazují, že pyrofeofytiny A a B jsou hlavní chlorofylové deriváty, které jsou odpovědné za olivově zelené barvy v konzervované zelenině (Gross, 1991).

Hydroxychlorofyly

Hydroxychlorofyly jsou oxidované chlorofyly s hydroxy skupinou umístěnou na desátém uhlíku. Hydroxychlorofyly chlorofylů A a B se nazývají chlorofyly A-1 a B-1. V poslední době bylo prokázáno, že oxidace chlorofylů na hydroxychlorofyly pokračuje přes mechanismus volných radikálů, autooxidace je inhibována karotenoidy (Hynninen, 1981).

Hydroxychlorofyly mohou vznikat během vaření zelených rostlinných pletiv a dále byly prokázány v dehydratovaném špenátu spolu s hydroxyfeofytinem (Gauthier-Jaques et al., 2001).

Kovové komplexy

Kovové komplexy chlorofylových derivátů během tepelného zpracování jsou slibnou metodou pro zachování barvy zelené konzervované zeleniny. Zinek a měď jsou zavedeny do chlorofylového porfyrinového kruhu. Kovové deriváty chlorofylu vytvářejí pevný pouto, které je mnohem odolnější vůči kyselinám a teple, než přirozeně se vyskytující hořečnaté komplexy chlorofylu (Humphrey, 1980).

Společnost Crown Cork and Seal zkomercializovala tuto konzervační technologii pro využití zelených fazolek pod ověřeným obchodním názvem VERI-GREEN (Segner et al., 1984).

Von Elbe et al. (1986) zkoumali složení VERI-GREEN fazolek a zjistili, že se skládá především ze zinko-feofytinu *a* a zinko-pyrofeofytinu *a*.

V následujících studiích bylo zjištěno, že tvorba komplexů zinku byla závislá na druhu chlorofylu, pH, teplotě a koncentraci iontů (LaBorde et al., 1990).

Během rozdělení těchto chlorofylových sloučenin jsou detekovatelné pouze ve stopových množstvích (pokud vůbec), což naznačuje, že po odstranění fytolu a centrálního atomu hořčíku rychle následují procesy, které způsobují ztrátu zelené barvy (Amir-Shapira et al., 1987).

Fytol

Enzymatické odstranění esterifikovaného fytolu pomocí chlorofylasy vede k vytvoření chlorofylových derivátů rozpustných ve vodě (Schwartz et al., 1990).

Pokud je chlorofyl degradován, značné podíly fytolu zůstávají esterifikované, s mastnými kyselinami a s kyselinou octovou. U stárnoucích listů se volné a esterifikované formy fytolu nacházejí v tukových kapénkách rozvíjejících gerontoplastů. Ztráty celkového fytolu během stárnutí listů byly přičítány fotooxidační konverzi na různé isoprenoidní sloučeniny (Matile et al., 1999).

3.3.2 Faktory ovlivňující změnu barvy

3.3.2.1 Posklizňové vlivy

Ztráta zeleně je jeden z hlavních příznaků posklizňového stárnutí sklizené zeleniny. V zestárlých listech se barva změní ze zelené na žlutou, červenou a nakonec hnědou a v důsledku selhání chlorofylů na bezbarvé nebo vybělené produkty (Gross, 1991).

Faktory životního prostředí mohou vyvolat nebo zvýšit stárnutí, které nelze regulovat. Bývá geneticky upraveno nebo kontrolováno (Leshem, 1988).

Ethylén urychluje rychlost rozkladu chlorofylu v zelenině, zatímco teplota a řízená atmosféra rozklad zpomalují (MacDougall et al., 2002).

Lers et al. (1998) ukázali, že ethylén urychlil počáteční degradaci chlorofylu listů petržele skladovanou osm dní v temnu při teplotě 25 ° C. Na rozdíl zvýšené koncentrace CO₂ zpomalují všechny procesy stárnutí a vysoké koncentrace CO₂ anulovaly stárnutí indukčním účinkem ethylénu.

Paradis et al. (1996), ukázali, že obsah chlorofylu v brokolici byl zachován po dobu šest týdnů skladování v 2% O₂ + 6% CO₂ při 4 °C. Na vzduchu byly 60% ztráty chlorofylu během čtyř týdnů skladování.

3.3.2.2 Zpracování potravin

3.3.2.2.1 Zahřívání a vliv vysokých teplot

Chlorofyl je při nízkých teplotách velmi stálý, naopak při zahřátí se mění na velmi labilní sloučeninu, především pak v kyselém prostředí, kdy se rychle uvolňuje hořčík a je nahrazován vodíkem. Tyto vzniklé sloučeniny tzv. feofytiny, mají olivově zelenou a žlutou barvu. Stálost chlorofylu i při mírně kyselém prostředí je způsobena vazbou na lipoproteiny, které je chrání před feofytinací. Zvýšením teploty při technologických operacích se lipoprotein denaturuje a uvolňuje se tak volný chlorofyl, který se přítomnými organickými kyselinami rychle mění na feofytin (Deman , 1999).

Ohřev je nezbytný pro stabilizaci zeleniny a k inaktivaci enzymů zhoršující kvalitu. Při teplotách nad 60 ° C je živá buňka zabita, pektinové látky jsou rozděleny a buněčná struktura je nevratně změněna (Katsaboxakis, 1984).

Při fermentaci, kde není využito ohřevu, však může mikrobiální růst způsobit podobnou poruchu buněčné struktury (Gunawan et al., 2007).

Walker (1964) navrhuje, aby poměr chlorofylu a feofytinu mohl být používán, jako barevný index pro ohřívání zelené zeleniny. Odraz měření zeleně nebo její kombinace, byly rovněž použity pro objektivní posouzení celkové změny barvy při ohřevu zelené zeleniny.

Přeměna chlorofylu na feofytin během ohřevu je závislá na teplotě, délce tepelného zpracování a pH (Ryan-Stoneham et al., 2006).

Těžší tepelné zpracování, které nastává při činnostech konzervace, má za následek ztrátu C₁₀ dekarbolaxymethoxyly a vytváří se deriváty známé, jako pyrofeofytiny (Schwartz et al., 1983).

Pyrochlorofyly také prošly C₁₀ dekarboxymethoxylací, ale zachovaly centrální atom hořčíku izolovaný jak při vaření, tak při mikrovlnném zpracování (Teng et al., 1999).

Mírnější podmínky zpracování mají také za následek změnu hlavních chlorofylových derivátů. S tvorbou C₁₀ epimerů v původní chlorofylové struktuře se snadno setkáváme během zmrazení, sušení a mírném ohřívání, jako je blanšírování (Schwarz et al., 1990).

Zatímco ostatní přeměny ovlivňují barvu konečného produktu, tvorba epimeru nevytváří žádný nepříznivý vliv, neboť spektrální vlastnosti epimeru zůstávají stejné, jako jejich původní molekuly chlorofylu (Sheer, 1991).

Chlorofyl A je více citlivý na teplo, než chlorofyl B (Weemaes et al., 1999).

3.3.2.2.2 Zmražení a důsledek nízkých teplot

Hrášek, fazolové lusky, růžičková kapusta a špenát je nejvíce konzumovaná mražená zelenina. Tato zelenina je blanširovaná před zmrazením, aby se zabránilo enzymatickým změnám zabarvení a zástavě rozvoji chuti. Degradace pigmentu souvisí se skladovací teplotou, druhem zpracované zeleniny, nezbytnými přípravnými kroky plodiny před blanširováním, blanširování a době mrazení (Dietrich et al., 1959).

Při dlouhodobém skladování zelené mražené zeleniny dochází ke změně barvy v důsledku převodu chlorofylů na příslušné feofytiny (Walker, 1964).

Buckle a Edwards (1970) sledovali degradaci chlorofylu blanširovaného hrášek skladovaného při -9°C v dusíku během 20 měsíců. Obsah chlorofylu se snížil a obsah chlorofylidu, feofytinu a feoforbidu zvýšil. Nicméně, zvýšení by mohlo vysvětlovat celkovou ztrátu.

Jedná se o chlorofylasy a v menší míře peroxidasy, které jsou v první řadě odpovědné za přeměny pigmentu v blanširované mražené zelenině (Williams et al., 1986).

Lipidové hydroperoxydy a hydroperoxidové radikály produkované lipoxygenasami jsou zapojeny do sekundární reakce, která způsobuje chlorofylové bělení (MacDougall et al., 2002).

Örűn-Concha et al. (1997) studovali účinky 12 měsíců mraženého skladovaného při -22°C na obsah chlorofylu A a B blanširovaných zelených fazolek a paprik. V blanširovaných fazolích klesl obsah chlorofylu během prvních měsíců a poté se stabilizoval.

Přesvědčivější mechanismus rozkladu chlorofylu při skladování zmražené zelené zeleniny stále ještě není navržen, protože metody používané dříve k identifikaci a kvantifikaci produktů chlorofylové degradace, byly náchylnější k chybě (MacDougall et al., 2002).

V poslední době Gauthier-Jaques et al. (2001) publikovali výsledky zlepšené metody HPLC. Tato metoda může sledovat všechny barevné pigmenty, nicméně k fluorescenční detekci je zapotřebí sledovat všechny bezbarvé chlorofylové deriváty.

3.3.2.3 Světlo

Efektivita poškození vyvolaná světlem se zvyšuje s klesající vlnovou délkou. Z přirozeného slunečního světla, nejvyšší škodlivý potenciál má UV-B (280-315 nm). Z důvodu, nedávné snížení stratosférické ozonové vrstvy, které zvyšuje intenzitu UV-B na povrchu Země a ekologicky významných hlubiny oceánu, byly zahájeny rozsáhlé investice do

výzkumu na objasnění molekulárních mechanismů regulující reakce různých organismů na UV-B záření. Ačkoli fotosyntetické pigmenty, jako jsou chlorofyly a karotenoidy, především absorbují ve viditelné oblasti, jejich složení je významně ovlivněno při vystavení UV záření in vivo a in vitro. UV-B záření může mít tedy vliv na fotosyntézu nepřímo na základě fotobělení a fotooxidací fotosyntetických pigmentů. Vysoké hladiny UV-B záření v kombinaci s nízkou úrovní fotosynteticky aktivního záření (PAR), mohou významně snížit obsah chlorofylu v rostlinách. Studií o poškození mechanismu UV-A (329-400nm) je nedostatek a to i přesto, že intenzita posledně uvedeného spektra v přirozeném slunečním světle je nejméně desetkrát vyšší než u UV-B. Detailní studie provedena v izolovaných a neporušených thylakoidech, ukázala PSII komplex jako nejvíce citlivou složku na světlo v rámci fotosyntetického aparátu (Zvezdanović, 2009a).

3.3.2.4 Kovy a jejich sloučeniny

Působením těžkých kovů dochází ke změnám velikosti buněk a k jejich narušení. Nejvíce zásadní změny v ultrastruktuře mezofylových buněk listů jsou patrné na úrovni chloroplastů. Obecně lze říci, že působením těžkých kovů jsou pozorovány změny ve stavbě a vzhledu thylakoidů, jejich organizace je často narušena, mění se obsah chlorofylu. Grana chloroplastů vlivem působení těžkých kovů buď ubývají, nebo naopak zduří. Polypeptidové složení membrány thylakoidů je působením stresu vyvolaného těžkými kovy degradováno (Cheng, 2003).

Rostliny snadno absorbují mnoho toxických těžkých kovů. Jakmile je vstřebávají, pronikají pletivem rostlin (včetně listů) a ve vyšších koncentracích mohou inhibovat fotosyntézu. V nižších koncentracích jsou měď, železo a zinek samy o sobě základní mikroživiny pro vyšší rostliny, řasy a složky fotosyntetického aparátu- fotosystému I a II (Cu - protein-plastokyanin, Fe, obsahující elektron - nosič v cytochromovém komplexu). Těžké kovy mohou nahradit labilní vázaný centrální atom chlorofylu Mg k vytvoření náhradního nebo centrálního Chl-HMS komplexu (heavy metal complex), nebo mohou hrát roli koordinátora mezi dvěma O-atomy na periférii chlorofylové molekuly k vytvoření cyklického šestičlenného periferního chelátového komplexu. Cu inhibuje nahromadění pigmentu a zpomaluje začlenění chlorofylu do fotosystému (Zvezdanović et al., 2009b).

Pätsikkä et al. (2002) ukázali, že Cu^{2+} předurčuje odchod fotoinhibice (vysoká fotosenzitivita z fotosystému II) prostřednictvím snížení koncentrace chlorofylu. Koncentrace chlorofylu v listech byla snížena vlivem Cu^{2+} , spolu s nárůstem poměru Chl A: B. Snížená koncentrace chlorofylu byla doprovázena redukcí struktury thylakoidní membrány v

rostlinách pěstovaných v nadbytku za přítomnosti Cu. Nicméně, ztrátu chlorofylu a citlivost na fotoinhibici může překonat přidáním přebytečného Fe společně s nadbytkem Cu do růstového média.

Samotná měď může ovlivnit všechny druhy fotosyntetických aktivit, stejně jako elektronového transportu a výroby ATP. Zinek-porfyriny vznikají při biosyntéze chlorofylu, ale jsou také nalezené v degradačních produktech chlorofylu. Zinek lze zařadit k degradaci chloroplastu, bílkovin stromatu (Zvezdanović et al., 2009b).

3.4 Využití chlorofylu

3.4.1 Zdravotní hlediska

Chlorofyl a jeho různé deriváty mají dlouhou historii v použití pro tradiční medicínu a léčebné účely (Kephart, 1955).

Použití chlorofylu má velký význam při hojení ran. Otevřená zranění se po použití chlorofylu rychleji hojí, dochází ke zmírnění krvácení, snižuje se bolestivost ran a minimalizuje se tvorba jizev. Přiložení chlorofylu na ránu dezinfikuje a zároveň působí antibakteriálně (Dallen, 2010).

Účinným přípravkem na trhu je Dermochlorophyl. Vyrábí ve formě spreje nebo gelu, podporuje granulaci a epitelizaci rány, brání růstu bakterií. Účinnou látkou přípravku Dermochlorophyl spreje je v oleji rozpustná forma měďnatého komplexu chlorofylu. Účinnou látkou gelu je sodná sůl měďnatého komplexu rozpustná ve vodě. Sprej se aplikuje přímo na ránu, v jedné vrstvě ze vzdálenosti alespoň 20 cm. Gel se nanáší ve slabé vrstvě, maximálně 1-3 mm. Po nanesení vytvoří zelenou vrstvu, která rychle zasychá a na ránu působí chladivě. Oba se používají především lokálně a lze je aplikovat opakovaně (Stryja a kol., 2011).

Výhoda při používání chlorofylu spočívá v tom, že opakovaným používáním se jeho příznivé účinky nesnižují, ale naopak rostou. Nevyužívá se pouze při hojení ran, ale také popálenin. Za přispění chlorofylu se rychleji hojí popáleniny způsobené ohněm, kyselinami i radiací. Chlorofyl má pozitivní vliv na onemocnění kůže. Úspěchy byly zaznamenány u různých typů kožních onemocnění, například v léčbě kožních vředů nebo impetiga. Podobně jako při hojení ran, pacienti, kterým byl aplikován chlorofyl na postižené místo, pocítovali zmírnění negativních projevů jako svědění a pálení. Dále chlorofyl nalézá uplatnění při léčbě akné, a to nejen při vnitřním užívání, ale i při vnějším použití (Dallen, 2010).

Za zmínku také stojí látka zvaná chlorelin, obsažená v řase *Chlorella pyrenoidosa*. Jedná se o přírodní antibiotikum. Chlorelin zneškodňuje pouze patogeny, nijak nepoškozuje prospěšnou střevní mikroflóru. Výhodou chlorellinu také je, že škodlivé mikroorganismy si proti němu nedokážou rozvinout rezistenci (Rathouský, 2008).

Chlorofylin sodíku a mědi a přírodní chlorofylové deriváty prokázaly značné biologické aktivity in vitro a in vivo v souladu s prevencí rakoviny, včetně antioxidační aktivity, antimutagenních činností, modulaci cizorodých metabolizujících enzymů a vyvolání apoptózy vlivem nádorových linií. Tyto povzbudivé výsledky vedly k vyšetřování chemopreventivních účinků u člověka a dále stimulovaly zájem o absorpci a potenciální distribuci pletiv těchto pigmentů. Úsilí v oblasti výzkumu začaly nabízet důkazy o představě, že chlorofylové deriváty mohou být ve skutečnosti biologicky využitelné (Egner et al., 2003).

Chlorofyly mohou být uplatňovány také jako přírodní biocidy nefotosyntetických organismů: následné ozáření světlem umožňuje prostorovou a časovou kontrolu fototoxicity, například ve fotodynamické terapii rakoviny (Scheer, 2006).

Chlorofylin je účinný antimutagenních prostředek a byl použit jako stravovací doplněk snižující intenzitu nepříjemných vedlejších účinků cyklofosamidové léčby. Cyklofosamid je silný protinádorový prostředek a je používán proti mnoha formám rakoviny a dalších onemocnění (MacDougall, 2002).

3.4.2 Role v potravinářství

Další využití chlorofylů je jako potravinářské barvivo, ale velká nestabilita zabraňuje většímu rozšíření (Velíšek, 1999).

Není možné komerčně připravit barvivo obsahující čistý chlorofyl, kvůli nestabilitě molekuly. Snahy vytvořit potravinářské barvivo z chlorofylu jsou soustředěny kolem pokusu o stabilizaci molekuly zachováním nebo výměnou iontů hořčíku. Největší část použitých chlorofylových barviv jsou ve formách rozpustných ve vodě a jsou používány do mléčných výrobků, polévek, olejů, cukrovinek, nápojů a kosmetiky (Francis, 1999).

Komerčně rozšířené třídy chlorofylových derivátů rozpustné ve vodě, známé jako chloriny, jsou používány jako barviva v potravinářském průmyslu. Přestože jsou v chelátu k dispozici s různými přechodnými kovy (Zn, Fe, Co, Cu) pro výraznou barvu a stabilitu, nejčastější forma je chlorofylin sodíku a mědi. Chlorofylin sodíku a mědi je syntetizován z přírodního chlorofylového methanického extraktu působením hydroxidu sodného s následnou výměnou centrálního atomu hořčíku za atom mědi (Kephart, 1955).

Konečný produkt se skládá ze směsi četných sloučenin chlorinového typu odvozený od přírodního chlorofylu, jsou to primární složky, které se označují Cu-chlorin e₄ and Cu-chlorin e₆ a někdy menší množství Cu-chlorin e₄ ethyl esteru (Chernomorsky, 1994).

Chlorofyly jsou jako potravinářská barviva téměř ve všech zemích akceptována (Velíšek, 1999).

Výbor JECFA klasifikoval chlorofyl v rámci List A, což znamená, že barvivo bylo plně očištěno a jeho použití není toxikologicky omezeno, neboť je-li používán správný výrobní postup, nepředstavuje nebezpečí pro zdraví. Subchronické orální toxicity neprokázaly žádný nepříznivý účinek (Furukawa et al., 1998).

4 Materiál a metody

4.1 Rostlinný materiál

Zdrojem chlorofylu v tomto experimentu byla Kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*). Sběr čerstvých rostlin kopřiv byl proveden dne 22. 4. 2012, v pražské čtvrti Dejvice, ulice Na Kotlářce.

4.2 Použité chemikálie

- Aceton (99,5 %)
- Ethanol (80 %)
- Destilovaná voda
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

4.3 Laboratorní pomůcky

- Laboratorní nádobí
- Mixér
- Filtrační aparatura
- Vakuová rotační odparka (Büchy, Německo)
- Laboratorní váhy
- Spektrometr Helis GAMA UV

4.4 Izolace chlorofylu

Izolace chlorofylu byla provedena z čerstvého materiálu kopřiv. Chlorofyl byl extrahován mixováním rostlin s acetonem a filtrován, aby došlo k oddělení nežádoucích částí. Opakovaná macerace několika menšími dávkami rozpouštědla je účinnější než macerace celým množstvím rozpouštědla najednou.

Po odfiltrování tuhých částí byl filtr promyt acetonem a následně zahuštěn na vakuové rotační odparce (Büchy, Německo). Získaný extrakt byl experimentálně ředěn na výslednou absorbanci 0,6.

Obrázek 2: Filtrace



Obrázek 3: Vakuová rotační odparka



4.5 Příprava vzorků

Chlorofylový extrakt byl podroben různým fyzikálním a chemickým podmínkám. Prostředí tepla, chladu, světla, tmy, vliv rozpouštědel a přítomnost kovů.

Obrázek 3: Příprava roztoků



4.5.1 Roztoky Fe, Cu a Mg

Jeden ze zkoumaných vlivů, byl přidavek kovových sloučenin železa, mědi a hořčíku v koncentraci 0,001 M. Tyto kovové roztoky byly připraveny navážením 2,78 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 2,49 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ a 2,46 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, kvantitativním převedením do 100 ml odměrných baněk a doplněním destilovanou vodou po rysku.

4.5.2 Rozpouštědla

Dále byly vzorky rozlišeny použitím jednotlivých rozpouštědel. Polovina z celkového počtu vzorků byla rozpuštěna v acetonu a druhá část v ethanolu.

Do čtyř 100 ml baněk byl přidán 1 ml chlorofylového extraktu, k první baňce 1 ml roztoku Fe, do druhé 1 ml roztoku Cu, k třetí 1 ml roztoku Mg a čtvrtá baňka byla ponechána bez přídavku kovových roztoků. Všechny čtyři baňky byly doplněny acetonem na daný objem.

Zbylé čtyři baňky byly připraveny obdobným způsobem s tím rozdílem, že baňky byly místo acetonem naplněny ethanolom.

Tabulka 1: Rozdělení vzorku podle rozpouštědel

ACETON	1 ml chlorofylové extraktu			
	1 ml Fe	1 ml Cu	1 ml Mg	-
ETHANOL	1 ml chlorofylového extraktu			
	1 ml Fe	1 ml Cu	1 ml Mg	-

Vzorky Fe-Aceton, Cu-Aceton a Mg- Ethanol byly filtrovány, z důvodu vzniklého zákalu.

4.5.3 Rozdělení vzorků

Každá z těchto osmi připravených baněk byla rozdělena do čtyř uzavíratelných lahviček, kterým byly následně připraveny odlišné podmínky. Získalo se tak celkem dvaatřicet vzorků. Průsvitné plastové lahvičky byly označeny příslušnými údaji o složení a podmínkách. Souhr jednotlivých vzorků, které byly sledovány po celou dobu experimentu, byly zaznamenány v níže uvedené Tabulce 2.

Tabulka 2: Přehled jednotlivých vzorků

Rozpouštědlo	Přídavek kovu	Podmínky	Označení vzorku
ACETON	Fe	Tma, Chlad	1.
		Světlo, Teplo	2.
		Tma, Teplo	3.
		Světlo, Chlad	4.
	Cu	Tma, Teplo	5.
		Tma, Chlad	6.
		Světlo, Teplo	7.
		Světlo, Chlad	8.
	Mg	Tma, Teplo	9.
		Tma, Chlad	10.
		Světlo, Teplo	11.
		Světlo, Chlad	12.
	–	Tma, Teplo	13.
		Tma, Chlad	14.
		Světlo, Teplo	15.
		Světlo, Chlad	16.
ETHANOL	Fe	Tma, Teplo	17.
		Tma, Chlad	18.
		Světlo, Teplo	19.
		Světlo, Chlad	20.
	Cu	Tma, Teplo	21.
		Tma, Chlad	22.
		Světlo, Teplo	23.
		Světlo, Chlad	24.
	Mg	Tma, Teplo	25.
		Tma, Chlad	26.
		Světlo, Teplo	27.
		Světlo, Chlad	28.
	–	Tma, Teplo	29.
		Tma, Chlad	30.
		Světlo, Teplo	31.
		Světlo, Chlad	32.

4.5.4 Způsob skladování vzorků

Průsvitné lahvičky se vzorky sledované bez přístupu světla a tepla, byly obaleny alobalem a uchovány při pokojové teplotě. Za podmínek tmy a chladu byly vzorky také obaleny alobalem a skladovány v chladničce při teplotě 5 – 7 °C.

Vzorky vystavené světlu a teple byly uchovány v průsvitné nádobě při pokojové teplotě. Lahvičky se vzorky, které byly měřeny za podmínek světla a chladu, byly skladovány v chladničce s průsvitnými dvířky při teplotě 5 – 7 °C.

4.6 Měření vzorků

Měření vzorků bylo prováděno spektrofotometricky na spektrometru Helis GAMA UV. Spektrofotometrické hodnocení obsahu chlorofylu bylo založeno na absorpčních spektrech těchto pigmentů. Hodnoty absorbance ukazují průběžné změny v intenzitě zbarvení chlorofylového extraktu a zachycují změnu koncentrace chlorofylu.

Před vlastním měření byl nejprve přednastaven rozsah vlnových délek a počet vzorků. Každý vzorek byl proměřen při vlnových délkách 411 nm, 438 nm, 470 nm a 665 nm. Nejprve byl změřen blank (slepý vzorek), jenž představoval dané rozpouštědlo jednotlivých vzorků bez chlorofylu. Kyvety byly naprosto čisté, z vnější strany suché a obsah měřeného vzorku čirý. Blank byl vložen do přístroje a spustilo se měření. Jakmile proběhlo proměření a vynulování, mohly být změřeny vzorky oproti příslušnému blanku. Celý postup byl tak opakován podle počtu vzorků. Naměřené hodnoty byly z každého měření zaznamenány a vyhodnoceny.

Vzorky byly takto sledovány v období od 26.4 – 12. 7. 2012 v týdenním intervalu a dále v měsíčních prodlevách do 12. 10. 2012.

5 Výsledky

Výsledky byly zpracovány do tabulek a grafů sjednocující různé podmínky a prostředí. Na základě těchto ukazatelů, byly vyhodnoceny změny v absorbanci jednotlivých vzorků a stanovena stabilita chlorofylu.

Obecně lze říct že, intenzita zbarvení chlorofylového extraktu na světle klesala podstatně rapidněji než ve tmě. Průnikem světla skrz vzorky při pokojové teplotě, docházelo k okamžité degradaci chlorofylu již po dvou týdnech měření. Podmínky světla a chladu vedly k tomu, že chlorofyl se nerozkládal prudce, jak tomu bylo u extraktu za tepla, ale pokles absorbací probíhal průběžně. Hodnota absorbance u chlorofylového extraktu za podmínek světla/tepla představovala na konci měření pouze 1 % z počáteční zaznamenané absorbance. Oproti tomu výsledná absorbance vzorku v prostředí světla a chladu činila 36 % z původní hodnoty.

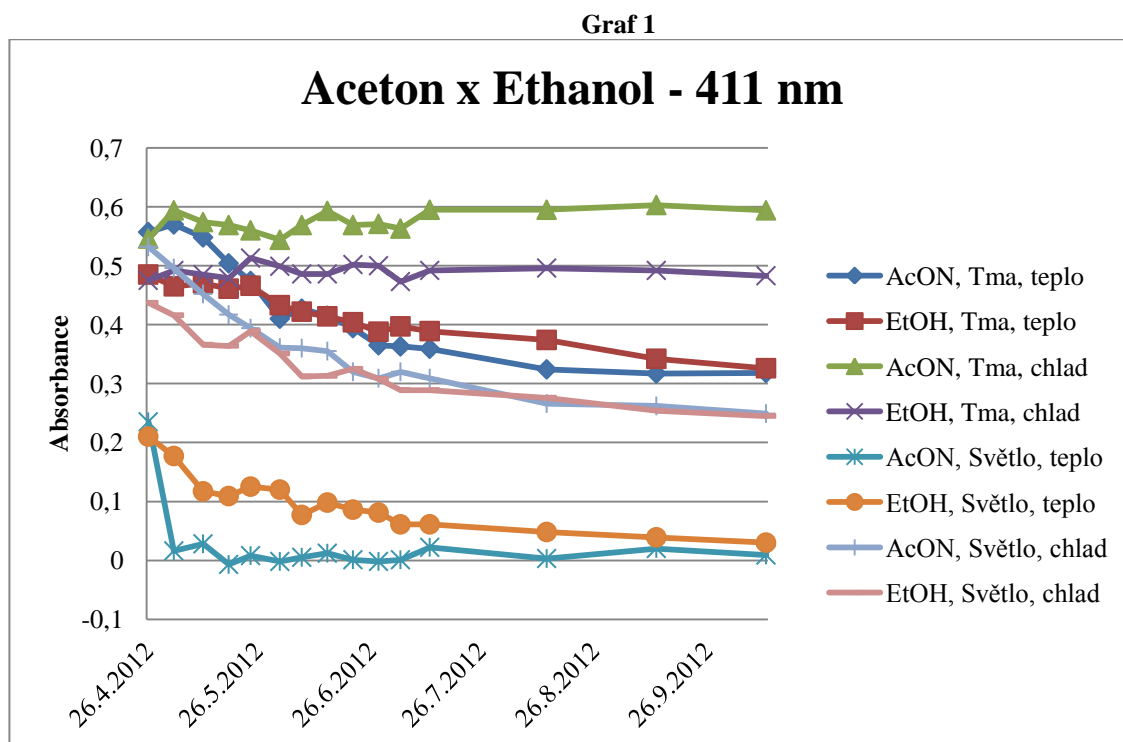
Extrakt sledovaný bez přístupu světla byl daleko stabilnější a barva vzorku výraznější. V nastavených podmínkách tmy a chladu byla absorbance během celého průběhu měření téměř konstantní. Absorbance vzorků udržovaných ve tmě a teple byla při měření mírně změněna a průběh hodnot měl sestupnou tendenci. Za chladných a temných podmínek, tvořila konečná hodnota absorbance 87 % z původně naměřené hodnoty. V teple a tmě představovala výsledná absorbance jen 46 % z počáteční absorbance.

Tabulka 3: Vývoj změn absorbancí za daných podmínek

Datum	Tma, teplo		Tma, chlad		Světlo, teplo		Světlo, chlad	
	Absorbance	Pokles (%)	Absorbance	Pokles (%)	Absorbance	Pokles (%)	Absorbance	Pokles (%)
23.4.2012	0,686	100%	0,686	100%	0,686	100%	0,686	100%
26.4.2012	0,557	81%	0,546	80%	0,235	34%	0,532	78%
3.5.2012	0,57	83%	0,594	87%	0,016	2%	0,496	72%
11.5.2012	0,548	80%	0,574	84%	0,028	4%	0,452	66%
18.5.2012	0,504	73%	0,569	83%	-0,007	-1%	0,417	61%
24.5.2012	0,474	69%	0,56	82%	0,008	1%	0,394	57%
1.6.2012	0,41	60%	0,544	79%	-0,002	0%	0,361	53%
7.6.2012	0,427	62%	0,569	83%	0,005	1%	0,36	52%
14.6.2012	0,415	60%	0,593	86%	0,012	2%	0,355	52%
21.6.2012	0,394	57%	0,569	83%	0,001	0%	0,32	47%
28.6.2012	0,365	53%	0,571	83%	-0,002	0%	0,309	45%
4.7.2012	0,363	53%	0,563	82%	0,001	0%	0,32	47%
12.7.2012	0,359	52%	0,595	87%	0,022	3%	0,309	45%
13.8.2012	0,324	47%	0,595	87%	0,003	0%	0,266	39%
12.9.2012	0,317	46%	0,603	88%	0,02	3%	0,262	38%
12.10.2012	0,318	46%	0,594	87%	0,009	1%	0,249	36%

Měření ukázalo, že odlišným faktorem mezi jednotlivými rozpouštědly byla stálost chlorofylového extraktu. Intenzita zbarvení a hodnoty absorbance byly sníženy více u vzorků,

kde byl rozpouštědlem aceton oproti vzorkům s ethanol. Graf 1 znázorňuje větší stabilitu chlorofylového extraktu v etanolu.

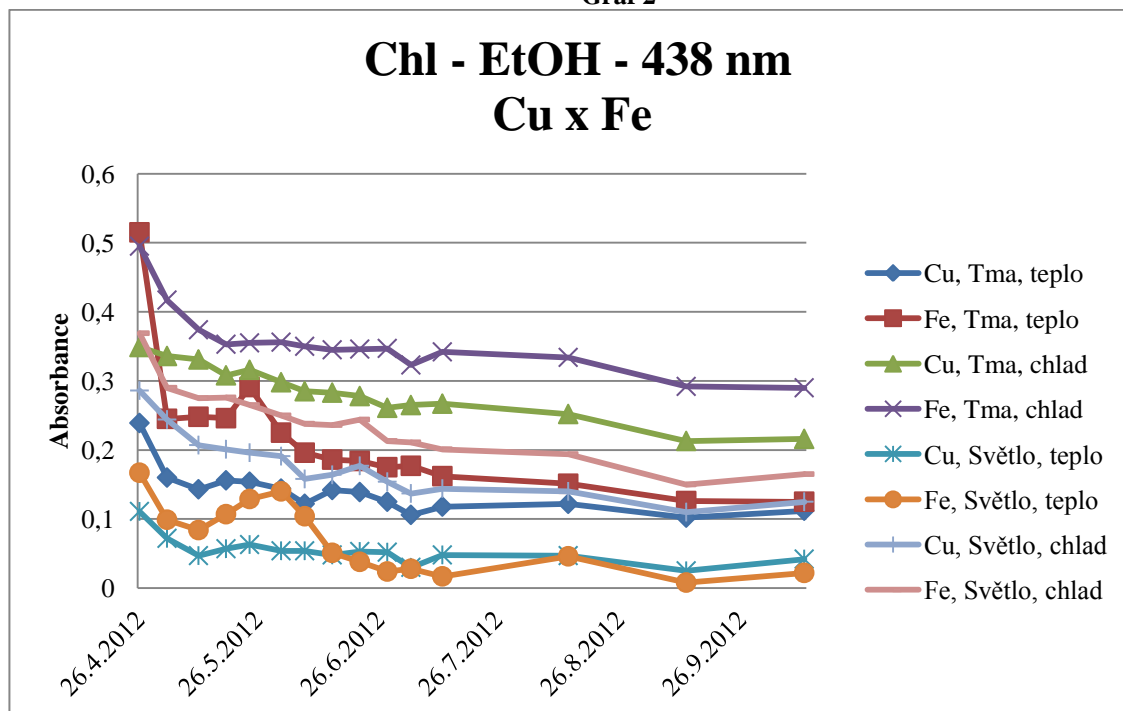


Dále byl posuzován vztah kovových iontů a chlorofylového extraktu, na základě poklesů absorbancí jednotlivých vzorků. Měření mezi nimi ukázalo rozdíly v úbytku chlorofylů, což je patrné z Grafu 2. Stabilita chlorofylového extraktu v přítomnosti kovů:

- Aceton = Mg > Fe > Cu
- Ethanol = Cu > Mg > Fe

Odlišnou stabilitu chlorofylu s kovovými ionty, lze vysvětlit tím, že aceton vykazuje menší rozpustnost, tudíž se ionty v něm přítomné rozpouštějí hůře, než v etanolu.

Graf 2



6 Diskuse

Výsledky jednoznačně dokazují, že chlorofyl je stabilnější v ethanolu, než v acetonu, c Ritchie (2006) uvádí, že aceton je nevhodné rozpouštědlo pro běžnou práci a často se ukazuje být neefektivním extrakčním činidlem chlorofylu. Ethanol na bázi chlorofylové extrakce je mnohem vhodnější pro stanovení a pro rutinní testy. Použití ethanolu rovněž nabízí pohodlí v tom, že se mohou používat polystyrenové kyvety.

Chlorofyl, který byl vystaven světelnému záření, podléhal prudší degradaci. Hodnota absorbance u chlorofylového extraktu za podmínek světlo/teplo představovala na konci měření pouze 1 % z počáteční zaznamenané absorbance, kdežto v prostředí tmy a tepla 46 %. Jen a MacKinney (1970) se také shodují, že jak UV-záření, tak osvětlení ve viditelném světle roztoků obsahující chlorofyly v organických rozpouštědlech vede k jednotnému bělení pigmentu.

Nieuwenburg et al. (2003), poukazují na to, že chlorofyl D, který je méně stabilní, než chlorofyl A, se zdá být stabilní v acetonu, methanolu a ethanolu pokud jsou v temnu při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Küpper et al. (1996) vedli studii *in vivo* zatížením rostlin mědí ve stinných podmínkách. Obsah chlorofylu klesal pouze nepatrně a minimálně v případě rostlin

stresovaných mědí. Modro-zelená barva rostlin zatěžovaných mědí byla velmi stabilní, což je typické pro Cu-Chl. V našem provedení *in vitro* vykazala přítomnost měďnatých iontů v chlorofylovém extraktu nejlepší stabilitu v prostředí tmy, tepla a ethanolu. Vzorky uchovávané v chladu a bez přístupu světla, měli horší stabilitu v acetonu i ethanolu. Snížení absorbance by mohlo být otázkou nízké absorptivity Cu-Chl.

V kontrastu s intenzivním světlem, kdy Küpper et al. (1996) ošetřili rostliny těžkými kovy, byly vyběleny téměř úplně kvůli rozpadu chlorofylu, a to i v případě Cu^{2+} . Po bělení rostlin zatěžovaných mědí obsahoval zbývající pigment Cu-Chl, ale méně než 2 %. Cu-Chl a je tak stabilní, že nejsou vyběleny ani po týdnech vystavení přímému slunečnímu světlu, ani v roztoku, ani v rostlinách, která jsou zastíněny. Výstupy měření dokazují, že degradace chlorofylu s měďnatými ionty probíhala intenzivněji na světle při pokojové teplotě v acetonu, než při stejných podmínkách bez přidání měďnatých iontů.

Schwartz et al. (1983) ukazují, že podle Falkovy rovnice je stabilita Chl-HMS komplexů organizován takto: $\text{Mg-Chl} \sim \text{Zn-Chl} < \text{Fe-Chl} < \text{Cu-Chl}$. V porovnání s našimi vzorky, které byly rozpuštěny v ethanolu, vyplynula stabilita kovových komplexů v této posloupnosti: $\text{Fe-Chl} < \text{Mg-Chl} < \text{Cu-Chl}$. Stabilizace chlorofylu mědí se potvrdila. Jinak tomu bylo v extraktu s acetonem: $\text{Cu-Chl} < \text{Fe-Chl} < \text{Mg-Chl}$. Tuto různorodou stabilitu Cu-Chl v souvislosti s rozpouštědly lze vysvětlit tím, že aceton vykazuje menší rozpustnost, tudíž se ionty v něm přítomné rozpouštějí hůře, než v ethanolu.

Wang et al. (2011) uvedli, že ať už na základě ultrazvukové, nebo viditelné světlo ozařování, se zvyšuje absorbance při 563 nm v pořadí $\text{Cu-Chl} < \text{Mg-Chl} < \text{Fe-Chl}$.

7 Závěr

Lze konstatovat, že výsledky bakalářské práce prokázaly variabilní citlivost chlorofylu na fyzikální a chemické změny. Poznatky tohoto experimentu budou dále sloužit k bližšímu studiu stability chlorofylu v diplomové práci.

- Stálost chlorofylového extraktu se mění použitím jednotlivých rozpouštědel
- Chlorofyl je více stabilní v ethanolu, než v acetonu
- Extrakt je méně náchylný k degradaci při zamezení přístupu světla
- Nižší teplota vede k menšímu úbytku chlorofylu
- Roztoky kovových iontů ovlivňují intenzitu zbarvení extraktu chlorofylu
- Kombinace chlorofylu, mědi a etanolu vykazuje největší stabilitu

8 Seznam literatury

Amir-Shapira, D., Goldschmidt, E. E., Altman, A. 1987. Chlorophyll catabolism in senescing plant tissues: in vivo breakdown intermediates suggest different degradative pathways for citrus fruit and parsley leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 84 (7). 1901-1905.

Bennoun, P. 1982. Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 79 (14). 4352-4356.

Bohn, T., Walczyk, T., Leisibach, S., Hurrell, R. F. 2004. Chlorophyll-bound Magnesium in Commonly Consumed Vegetables and Fruits: Relevance to Magnesium Nutrition. *Journal of food science*. 69 (9). 347-350.

Bowers, W. F. 1947. Chlorophyll in wound healing and suppurative disease. *American journal of surgery*. 73 (1). 37.

Bréhélin, C., Kessler, F., Van Wijk, K. J. 2007. Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids. *Trends in plant science*. 12 (6). 260-266.

Buckle, K., Edwards, R. A. 1970. Chlorophyll degradation and lipid oxidation in frozen unblanched peas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 21 (6). 307-312.

Cavalier – Smith, T. 2000. Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends in Plant Science*. 5 (4). 174-182

Daily, H. A. 1990. Biosynthesis of heme and chlorophylls. McGraw-Hill, New York. p. 594. ISBN: 0070150885.

Dallen, M. 2010. Zelené potraviny, když jídlo je naším lékem. Ratio Bona spol. s r.o., Praha. 118 s. ISBN: 978-80-254-4590-7

Demian J., M. 1999. Principles of Food Chemistry (3rd Edition). Aspen Publisher. USA. p. 520. ISBN: 0-8342-1234-X.

Dietrich, W. C., Olson, R. L., Nutting M. D., Neumann, H. J., Boggs, M. M. 1959. Time-temperature tolerance of frozen foods. XVIII. Effect of blanching conditions on color stability of frozen beans. *Food Technology*. 13 (2). 258-261.

Egner, P. A., Muñoz, A., Kensler, T. W. 2003. Chemoprevention with chlorophyllin in individuals exposed to dietary aflatoxin. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 523. 209-216.

Ferruzzi, M. G., Blakeslee, J. 2007. Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutrition Research*. 27 (1). 1-12.

Fietz, S., Nicklisch, A. 2004. Susanne Fietz: Recent and fossil phytoplankton pigments in Lake Baikal as markers for community structure and environmental changes. *Freshwater Biology*. 49. 332-345.

Finkemeier, I., Leister, D. 2010. *Plant Chloroplasts and Other Plastids*. eLS. Oxford.

Francis, F. J. 1999. *Colorants*. St. Paul: Eagan Press. USA: Minnesota. p. 144. ISBN: 1891127004

Furukawa, F., Kasahara, K., Nishikawa, A., Imazawa, T., Hirose, M. 1998. A 13-week subchronic oral toxicity study of chlorophyll in F344 rats. *Bulletin of National Institute of Health Sciences*. 116. 107-112.

Gauthier J. A., Bortlik K., Hau J., Fay L. B. 2001. Improved method to track chlorophyll degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (3). 1117-1122

Gillham, N. W. 1994. *Organelle Genes and Genomes*. Oxford University Press. New York. p. 424. ISBN: 0-19-508248-6

Gjubbenet, E. R. 1953. *Rostliny a chlorofyl*. Československé akademie věd. Praha. 208 s.

Gross, J. 1991. *Pigments in vegetables, chlorophyll and carotenoids*. Van Nostrand-Reinhold, New York. p. 351. ISBN: 04-420-06578

Gunawan, M. I., Barringer, S. A. 2007. Green color degradation of blanched broccoli (*Brassica oleracea*) due to acid and microbial growth. *Journal of food processing and preservation*, 24 (3). 253-263.

Haisman, D. R., Clarke, M. W. 2006. The interfacial factor in the heat-induced conversion of chlorophyll to pheophytin in green leaves. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 26 (8). 1111-1126.

Heaton J. W., Marangoni, A. G. 1996. Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. *Trends in Food Science & Technology*. 7 (1). 8-15.

- Hendry, G. A., Houghton, J. D. 1996. Natural food colorants. Chapman and Hall. London. 359 p. ISBN: 0 7514 0231 1
- Hendry, G. A., Houghton, J. D., Brown, S. B. 1987. The degradation of chlorophyll-a biological enigma. *New Phytologist*. 107 (2). 2255-302.
- Heyes, D. J., Kruk, J., Hunter, C. N. 2006. Spectroscopic and kinetic characterization of the light-dependent enzyme protochlorophyllide oxidoreductase (POR) using monovinyl and divinyl substrates. *Biochemical Journal*. 394. 243.
- Holden, M. 1961. The breakdown of chlorophyll by chlorophyllase. *Biochemistry Journal*. 78 (2). 359-364.
- Humphrey, A. M. 1980. Chlorophyll. *Food Chemistry*. 5 (1). 57-67.
- Hynninen, P. H. 1981. Mechanism of the allomerization of chlorophyll: inhibition of the allomerization by carotenoid pigments. *Zeitschrift fuer Naturforschung section c Biosciences*. 36b. 1010-1016.
- Cheng, S. 2003. Effects of heavy metals on plants and resistance mechanisms. *Environmental Science and Pollution Research*. 10 (4). 256-264.
- Chernomorsky, S. 1994. Quantitative procedure for chlorophyllin copper complex. *Journal of AOAC International*. 77 (3). 756-757.
- Imsande, J. 1998. Iron, sulfur, and chlorophyll deficiencies: a need for an integrative approach in plant physiology. *Physiologia Plantarum*. 103 (1). 139-144.
- Jackson, A. H. 1976. Structure, properties and distribution of chlorophyll. In: Goodwin, T. W. (ed.). *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Academic Press. London. p. 1-63. ISBN: 0-12-289847-8.
- Jen, J. J., MacKinney, G. 1970. On the photodecomposition of chlorophyll in vitro-II. Intermediates and breakdown products. *Photochemistry and Photobiology*. 11 (5). 303-308.
- Jenkins, G. I., Woolhouse, H. W. 1981. Photosynthetic electron transport during senescence of the primary leaves of *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Experimental Botany*. 32 (3). 989-997
- Jones, I. D., White, R. C., Gibbs E. 1961. The formation of pheophorbides during brine preservation of cucumbers. *Food Technology*. 15. 172.

Katsaboxakis, K. Z. 1984. The influence of the degree of blanching on the quality of frozen vegetables. *Thermal Processing and Quality of Foods*. 559-565.

Kephart, J. C. 1955. Chlorophyll derivatives- their chemistry, commercial preparation and uses. *Economic Botany*. 9 (1). 3-38.

Krautler, B., Juan, B., Bortlik, K., Schellenberg, M., Matile, P. 1991. On the Enigma of Chlorophyll Degradation - The Constitution of a Secoporphinoid Catabolite. *Angewandte chemie – International edition in English*. 30 (10). 1315-1318.

Kubát, K., Kalina T., Kováč, J., Kubátová, D., Prach, K., Urban, Z. 2003. *Botanika. Scientia*. Praha. 231 s. ISBN: 80-7183-266-9.

Küpper, H., Küpper, F., Spiller, M. 1996. Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *Journal of Experimental Botany*. 47 (2). 259-266.

LaBorde, L. F., von Elbe, J. H. 1990. Zinc complex formation in heated vegetable purees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 28 (2). 437-439.

Lambers, J. W. J., Terpstra, W. 1985. Inactivation of chlorophyllase by negatively charged plant membrane lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 831 (2). 225-235.

Lers, A., Jiang, W. B., Lomaniec, E., Aharoni, N. 1998. Gibberellic acid and CO₂ additive effect in retarding postharvestsenescence of parsley. *Journal Food Science*. 63 (1). 66-68.

Leshem, Y. 1988. Plant senescence processes and free radicals. *Free Radical Biology and Medicine*. 5 (1). 39-49.

Lichtenthaler, H. K., Burkhardt G., Kuhn G., Prenzel U. 1981. Light induced accumulation and stability of chlorophyll and chlorophyll proteins during chloroplast development in radish seedlings. *Zeitschrift fuer Naturforschung section c Biosciences*. 36. 421-430.

MacDougall, D. B. 2002. *Colour in Food – Improving Quality*. CRC Press p. 378. ISBN: 0849315425.

Mangos, T. J., Berger, R. G. 1997. Determination of major chlorophyll degradation products. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*. 204 (5). 345-350.

Matile, P., Dugglin, T., Schellenberg, M., Rentsch, D., Bortlik, K., Peisker, C., Thomas, H. 1989. How and Why is Chlorophyll Broken Down in Senescent Leaves. *Plant Physiology*. 27. 545-604.

Matile, P., Hörtensteiner, S., Thomas, H. 1999. Chlorophyll degradation. *Annual review of plant biology*. 50 (1). 67-95.

Nieuwenburg, P., Clarke, R. J., Cai, Z. L., Chen, M., Larkum, A. W., Cabral, N. M., Reimers, J. R. 2003. Photosynthesis and bio/chemiluminescence-examination of the photophysical processes of chlorophyll d leading to a clarification of proposed uphill energy transfer processes in cells of. *Photochemistry and Photobiology*. 77 (6). 628-637.

Nooden, L. D., Leopold, A., C. 1988. *Postlude and Prospects in Senescence and Aging in Plants*. Academic Press. p. 499-518.

Olive, J., Vallon, O. 1991. Structural organization of the thylakoid membrane: Freeze-fracture and immunocytochemical analysis. *Journal of Electron Microscopy Technique*. 18 (4). 360–374 August.

Oruña-Concha, M. J., González-Castro, M. J., López-Hernández, J., Simal-Lozano, J. 1997. Effects of freezing on the pigment content in green beans and Padrón peppers. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*. 205 (2). 148-152.

Paliyath, C., Droillard, M. J. 1992. The Mechanisms of Membrane Deterioration and Disassembly During Senescence. *Plant Physiology and Biochemistry*. 30 (6). 789 – 812

Paradis, C., Castaigne, F., Desrosiers, T., Fortin, J., Rodrigue, N., Willemot, C. 1996. Sensory, nutrient and chlorophyll changes in broccoli florets during controlled atmosphere storage. *Journal of Food Quality*. 19 (4). 303–316.

Pätsikkä, E., Kairavuo, M., Šeršen, F., Aro, E. M., Tyystijärvi, E. 2002. Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition in vivo by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll. *Plant Physiology*. 129 (3). 1-9.

Pyke, K. 2007. Plastid biogenesis and differentiation. In: Bock, R. (ed.). *Cell and Molecular Biology of Plastids*. Springer. Heidelberg. p. 1-28. ISBN: 978-3-540-75375-9.

Pyke, K. 2009. *Plastid Biology*. Cambridge. Cambridge University Press. p. 200. ISBN 978-0521711975.

Rathouský, V. 2008. Učebnice zelených potravin – *Chlorella pyrenoidosa*. Green Ways s.r.o., Staré Město, 180 s. ISBN: 978-80-254-3143-6

Reinbothe, S., Reinbothe, C. 1996. Regulation of chlorophyll biosynthesis in angiosperms. *Plant physiology*. 111 (1). 1-7.

Ritchie, R. J. 2006. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynthesis Research*. 89 (1). 27-41.

Ryan-Stoneham, T., Tong, C. H. 2006. Degradation kinetics of chlorophyll in peas as a function of pH. *Journal of Food Science*. 65 (8). 1296-1302.

Salisbury, F. B., Ross, C. W. 1985. *Photosynthesis: Chloroplasts and tight in Plant Physiology*. p. 179-194. Wadsworth Publishing. Belmont. USA.

Segner, W. P., Ragusa, T. J., Nank, W. K., Hoyle, W. C. 1984. Process for the preservation of green color in canned green vegetables. U. S. Patent No. 4. 473,591. September 25.

Scheer, H. 1991. *The chlorophylls*. CRC Press, Boca Raton, Fla.

Scheer, H. 2006. An overview of chlorophylls and bacteriochlorophylls: biochemistry, biophysics, functions and applications. *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls*. p. 1-26.

Schwartz, S. J., Lorenzo, T. V. 1990. Chlorophyll in food. *Critical Review in Food Science and Nutrition*. 29 (1). 1-17

Schwartz, S. J., von Elbe, J. H. 1983. Kinetics of chlorophyll degradation to pyropheophytins in green vegetables. *Journal of Food Science*. 30. 320-326.

Stryja, J., Krawczyk, M. P., Hájek, M. M., Jalůvka, M. F. 2011. *Repetitorium hojení ran 2*. Geum. Praha. 348 s. ISBN 978-80-86256-79-5

Sugiura, M. 1996. Light regulation of nuclear-encoded thylakoid proteins. In: Andersson, B., Salter, A. H., Barber, J., (eds.). *Molecular Genetics of Photosynthesis*. Oxford University Press. Oxford. New York, p 58–74. ISBN: 0-19-963447-5

Teng, S. S., Chen, B. H. 1999. Formation of pyrochlorophylls and their derivatives in spinach leaves during heating. *Food Chemistry* 65. 367-373.

Terpstra, W. 1981. Identification of chlorophyllase as a glycoprotein. *FEBS Letters*, 126 (2). 231-235.

Timirjazez, K. A. 1953. Vybranné práce o chlorofylu a asimilaci světla rostlinou. Nakladatelství Československé akademie věd. Praha. 272 s.

Velíšek, J. 1999. Chemie potravin 3. 1. vydání. Tábor. OSSIS. 368 s. ISBN 80-902391-5-3.

Vicentini, F., Hortensteiner, S., Schellenberg, M., Thomas, H., Matile, P. 1995. Chlorophyll breakdown in senescent leaves: identification of the biochemical lesion in a stay-green genotype of *Festuca pratensis* Huds. *New Phytologist*. 129. 247-252.

Von Elbe, J. H., Huang, A. S., Attoe, E. L., Nank, E. L. 1986. Pigment composition and colour of conventional and Veri-Green canned beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 34 (1). 52-54.

Von Wettstein, D., Gough, S., Kannangara, C. G. 1995. Chlorophyll biosynthesis. *The Plant Cell*. 7 (7). 1039-1057.

Walker, G. C. 1964. Color deterioration in frozen French beans (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Food Science*. 29 (4). 383-388.

Wang, J., Guo, Y., Gao, J., Jin, X., Wang, Z., Wang, B., Li, Y. 2011. Detection and comparison of reactive oxygen species (ROS) generated by chlorophyllin metal (Fe, Mg and Cu) complexes under ultrasonic and visible-light irradiation. *Ultrasonics sonochemistry*. 18 (5). 1028-1034.

Waters, M. T., Fray, R. G., Pyke K. 2004. Stromule formation is dependent upon plastid size, plastid differentiation status and the density of plastids within the cell. *The Plant Journal*. 39 (4). 655-667.

Weemaes, C. A., Ooms, V., Van Loey, A. M., Hendrickx, M. E. 1999. Kinetics of chlorophyll degradation and color loss in heated broccoli juice. *Journal of agricultural and food chemistry*. 47 (6). 2404-2409.

Williams, D. C., Lim, M. H., Chen, A. O., Pangborn, R. M., Whitaker, J. R. 1986. Blanching of vegetables for freezing: Which indicator enzyme to choose. *Food Technology*. 40.

Wise, R. R. 2007. The diversity of plastid form and function. In: Wise, R. R., Hooper, R. K. (Eds.). *Advances in Photosynthesis and Respiration, Volume 23. The Structure and Function of Plastids*. Springer. Amsterdam. p. 2-26. ISBN: 1 - 4020 - 4060 - 1.

Wrolstad, R. E., Acree, T. E., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. H. F., Smith, D. M., Sporns, P. 2004. Handbook of food analytical chemistry pigments, colorants, flavours, texture and bioactive food components. Wiley-Interscience. p. 624. ISBN: 0471721875

Zvezdanović, J., Cvetić, T., Veljović-Jovanović, S., Marković, D. 2009a. Chlorophyll bleaching by UV-irradiation in vitro and in situ: Absorption and fluorescence studies. Radiation Physics and Chemistry. 78 (1). 25-32.

Zvezdanović, J., Marković, D. 2009b. Copper, iron, and zinc interactions with chlorophyll in extracts of photosynthetic pigments studied by VIS spectroscopy. Russian Journal of Physical Chemistry A, Focus on Chemistry. 83 (9). 1542-1546.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

AcON	aceton
ALA	δ -aminolevulová kyselina
EtOH	ethanol
HMS	heavy metal complex
Chl	chlorofyl
JECFA	The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
PAR	fotosynteticky aktivní radiace
PQ	plastoquinon
PS II	fotosystém II
UV	ultrafialové sluneční záření