

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality zemědělských produktů



**Rostlinné antioxidanty jako alternativa pro prodloužení
trvanlivosti masných výrobků**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Kateřina Havlová

Vedoucí práce: Ing. Pavel Nový, Ph.D.

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Rostlinné antioxidanty jako alternativa pro prodloužení trvanlivosti masných výrobků " jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové 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 diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10.4. 2015

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Pavlu Novému, Ph.D. za poskytnutí cenných rad, které byly pro tvorbu mé diplomové práce zásadní. Nakonec děkuji všem lidem, kteří přispěli k vytvoření této práce.

Rostlinné antioxidanty jako alternativa pro prodloužení trvanlivosti masných výrobků

Souhrn

Diplomová práce pojednává o oxidačních procesech probíhajících v potravinách se zaměřením na masné výrobky. Dále pak o následném možném využití rostlinných aditiv, které omezují oxidaci lipidů a způsoby stanovení antioxidační aktivity.

V praktické části byla sledována antioxidační aktivita extraktu ze zeleného čaje se 60% zastoupením katechinu v paštice. Potvrzení antioxidační aktivity bylo provedeno *in vitro* DPPH testem. Testovaný extrakt vykazoval podobnou antioxidační aktivitu jako srovnávací antioxidant trolox.

Na základě poznatků z odborné literatury byla látka aplikována v koncentracích 100, 200 a 500 mg/kg do vyrobené paštiky. Paštika byla skladována v temnu za chladírenských teplot. V průběhu skladování paštika oxidovala a docházelo k tvorbě oxidačních produktů. Poté byla sledována oxidace paštiky pomocí stanovení hodnoty TBA v průběhu skladování.

Klíčová slova: antioxidační aktivita, masné výrobky, rostlinné antioxidanty, volné radikály, potravinová aditiva

Plant antioxidants as an alternative to prolong the shelf life of meats products

Summary

This graduation thesis is about oxidation processes in food with focus on meat products. Than it deals about future possible using of plant supplements witch reduce oxidation of lipids and ways of antioxidant activity.

In the practice part an antioxidant activity of green tea with 60 % representation of catechins in pate was watched. The confirmation of antioxidant activity was made *in vitro* by DPPPH test. The tested extract had similar antioxidant activity as compared antioxidant trolox.

Based on knowledge from professional literature was the extract applicate in concentration 100, 200 and 500 mg/kg into made pate. The pate was stored in dark and cold temperature. During this storing the pate oxidized and oxidation products were created. Than the oxidation of pate with determination of TBA value during store was watched.

Keywords: antioxidant activity, meat products, plant antioxidants, free radicals, food aditives

Obsah

1 Úvod.....	8
2 Cíl práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Skladování a trvanlivost potravin.....	10
3.2 Oxidace.....	10
3.2.1 Autooxidace	11
3.2.2 Žluknutí tuků.....	11
3.2.2.1 Žluknutí hydrolytické	11
3.2.2.2 Žluknutí oxidační.....	12
3.2.2.3 Žluknutí ketonové.....	12
3.2.2.4 Chuťová reverze	12
3.3 Metody konzervace potravin.....	12
3.3.1 Sterilizace fyzikálními metodami	13
3.3.2 Chemosterilizace.....	14
3.3.3 Fyzikálně chemická konzervace potravin.....	14
3.3.4 Konzervace potravin chemickou úpravou	15
3.3.5 Konzervace pomocí biologických zásahů.....	15
3.4 Antioxidační látky	15
3.4.1 Vliv antioxidantů na lidské zdraví	16
3.4.1.1 Endogenní antioxidanty.....	16
3.4.1.2 Antioxidační enzymy.....	17
3.5 Volné radikály	18
3.5.1 Konvenční antioxidanty	20
3.5.2 Rostlinné antioxidanty	23

3.5.2.1	Čajové katechiny	24
3.5.3	Metody stanovení antioxidační aktivity.....	27
3.5.3.1	Metody založené na eliminaci radikálů	27
3.5.3.2	Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek	29
4	Materiál a metody	31
4.1	Použité přístroje	31
4.2	Použité chemikálie.....	31
4.3	DPPH.....	31
4.4	Příprava vzorků paštiky	32
4.5	Stanovení TBA hodnoty.....	32
4.6	Statistické vyhodnocení	33
5	Výsledky	34
5.1	DPPH hodnota.....	34
5.2	TBA hodnoty.....	35
6	Diskuse	38
7	Závěr.....	41
8	Použitá literatura	42

1 Úvod

Stále větší pozornost je věnována antioxidačním látkám, zvláště kvůli jejich vztahu k volným radikálům. Antioxidanty jsou velmi důležité látky ve stravě, které pozitivně působí na lidský organismus. Rovněž jsou důležitou složkou při výrobě masných výrobků. Maso je hlavní surovinou pro výrobu masných výrobků. Jedná se o surovinu pocházející z jatečných zvířat. Obsahuje velké množství vody, bílkovin, tuků, minerálních látek a malou část sacharidů. Díky bohatému nutričnímu složení je maso a následně masné výrobky velmi náchylné ke snížení kvality. Dochází k negativním chemickým i mikrobiálním změnám. Nejčastější chemickou změnou je oxidace tuků. Jedná se o složitý proces, který je ovlivňován složením masného výrobku, přístupem kyslíku, světla a skladovací teplotou. Dalším důležitým faktorem je technologické zpracování masa, při němž může docházet k senzorickým změnám ve výsledném masném výrobku. Oxidaci masných výrobků lze snížit nebo zcela inhibovat použitím antioxidantů. Ty jsou schopné zlepšit trvanlivost a kvalitu potravin. Látek, které mají antioxidační schopnost, je mnoho, ale jen málo z nich je vhodných pro použití v potravinách. Veškeré antioxidanty již používané v potravinách splňují všechny požadavky zdravotně nezávadných látek a jejich použití je pečlivě kontrolováno zákony a nejrůznějšími předpisy.

I přesto jsou synteticky vyráběné antioxidanty terčem kritiky právě kvůli možným negativním vlivům na lidský organismus. Vzhledem k těmto skutečnostem se mnohé studie zaměřují na testování nejrůznějších rostlinných extraktů, silic aj. Dále se výzkumy zabývají jejich potenciálním využitím jako látek omezujících oxidační procesy v masných výrobcích.

Vzhledem k výrobě nejrůznějších masných výrobků je výběr vhodných testovaných látek jako rostlinných aditiv poněkud omezený. Rostlinné antioxidanty musejí nutně splňovat zdravotní nezávadnost. Tento problém je často eliminován dlouhodobým využíváním testovaných rostlin ve formě koření. Dalšími parametry selektujícími výběr jsou dobrá rozpustnost ve vodě, tepelná stabilita, a v neposlední řadě vhodná antioxidační aktivita. Dalším výběrovým kritériem může být výrazné ovlivnění senzorických vlastností výsledného produktu. Tento fakt může být nežádoucí zvláště při použití silic.

2 Cíl práce

Cílem této diplomové práce je ze zjištěných údajů v odborné literatuře vybrat vhodné rostlinné antioxidanty, které budou otestovány nejdříve vhodným *in vitro* testem. Tím bude prokázána vhodná antioxidační aktivita. Následně bude provedeno testování v konkrétním masném výrobku.

Hypotéza

Mnohé rostlinné antioxidanty vykazují silné antioxidační účinky. Díky těmto poznatkům lze předpokládat, že použití těchto rostlinných antioxidantů v potravinách by mohlo nahradit mnohé antioxidační látky syntetického původu.

3 Literární rešerše

3.1 Skladování a trvanlivost potravin

Skladování má velmi významný vliv na kvalitu potravin. Během skladování je nutné vytvořit takové podmínky, aby byly vyloučeny veškeré nežádoucí změny. Může se jednat o změny mechanické a biochemické. K mechanickým změnám dochází v průběhu zpracování. Biochemické změny jsou ovlivňovány dalšími faktory. Jedná se o vliv teploty, světla, přítomností cizorodých látek a v neposlední řadě přítomností mikroorganismů (Ingr, 2005).

Mezi biochemické změny potravin se také řadí změny oxidační. Rychlost toho procesu závisí zejména na vrstvě tuku. Čím tenčí je vrstva tím je umožněna rychlejší oxidace potravin. Dále vliv světla a teploty. Přístup světla lze velmi snadno ovlivnit vhodnou volbou obalu. Další významný faktor je složení tuku. Při vysokém obsahu polynenasycených mastných kyselin tuk snadněji oxiduje a stejně tak je tomu i u rafinovaných tuků, které jsou rafinací zabaveny přirozeně se vyskytujícími antioxidanty. V neposlední řadě je podporuje oxidační reakce styk s kovem (Odstrčil a Odstrčilová, 2006).

3.2 Oxidace

Přírodní tuky a oleje obsahující nenasycené mastné kyseliny vázané v triacylglycerolech, které podléhají v průběhu skladování postupné oxidaci (Branen et al., 2002). Tento proces lze poměrně urychlit zvyšováním teploty nad 100°C. Živočišné tuky obsahují mnohem méně nenasycených mastných kyselin, než je tomu u rostlinných tuků. Z těchto důvodů podléhají rostlinné oleje snadněji oxidačním procesům. Je však nutné zmínit, že notnou výhodou rostlinných tuků je přirozený obsah antioxidantů, nejčastěji tokoferolů, které zvyšují odolnost oleje vůči oxidaci (Pokorný a Schmidt, 2003).

Následkem vzniku oxidačních produktů, může tedy dojít ke zhoršení sensorických vlastností a nutričních hodnot potravin. Stupeň oxidace lipidů je do určité míry ovlivněn mnoha faktory. Zejména se jedná o obsah nenasycených mastných kyselin, typ matrice, obsah vody, přítomnost pro-oxidačních kovových iontů a antioxidantů (Kim et al., 2015). Tento proces se netýká pouze masných výrobků, ale rovněž rostlinných olejů, které jsou také velmi náchylné na oxidaci lipidů. Například velmi známý řepkový olej, který dříve obsahoval škodlivou kyselinu erukovou. Později byla vyšlechtěna tzv. bezeruková odrůda. Hlavní aditiva řepkového oleje jsou látky butylhydroxyanisol (BHA), butylhydroxytoluen (BHT). Důvod použití právě jich je efektivita a výhodná cena (Shahidi a Wanasundara, 1995).

3.2.1 Autooxidace

Autooxidace je nejběžnějším pochodem probíhajícím za běžných podmínek zpracování a skladování v potravinách obsahujících tuk. Při běžných teplotách jsou vzdušným kyslíkem oxidovány pouze volné a neesterifikované mastné kyseliny. Při kulinárních úpravách typu pečení, smažení, pražení a fritování již dochází k oxidaci esterifikovaných mastných kyselin. Autooxidace uhlíkového řetězce probíhá ve třech stupních (Odstrčil a Odstrčilová, 2006; Velíšek, 2002).

V prvním stupni nazývaném iniciace dochází vlivem ozáření ultrafialovými nebo radioaktivními paprsky, dále vlivem tepla nebo světla k homolytickému štěpení vazby mezi uhlíkem a vodíkem. Dochází tedy ke vzniku vodíkového radikálu a volného radikálu mastné kyseliny (Odstrčil a Odstrčilová, 2006; Velíšek, 2002).

Druhým stupněm je propagační reakce, kdy vzniklý velmi reaktivní volný radikál mastné kyseliny se sloučí s molekulou kyslíku a tím vznikne peroxidový radikál. Tento radikál, který je také velmi reaktivní, odštěpí vodík z další nenasycené mastné kyseliny a dává tak vzniku hydroperoxidu mastné kyseliny a dalšího volného radikálu mastné kyseliny. Tento proces se může několikrát opakovat (Odstrčil a Odstrčilová, 2006; Velíšek, 2002).

Ve třetím tedy terminačním stupni se nacházejí vzniklé hydroperoxy mastných kyselin a jejich radikály spolu mohou dále reagovat. Díky těmto reakcím vznikají sekundární metabolity oxidace, tedy hydroxykyseliny a oxokyseliny. Štěpením molekul těchto vzniklých látek mohou vznikat aldehydy nebo uhlovodíky. Tuk obsahující tyto látky je nepoživatelný z důvodu silného zápachu a hořké chuti (Odstrčil a Odstrčilová, 2006; Velíšek, 2002).

3.2.2 Žluknutí tuků

Během oxidačních procesů dochází k mnoha pochodům, které označujeme jako žluknutí. Žluknutí je zapříčiněno především autooxidací, ale uplatňují se zde i další reakce. (Velíšek, 2002).

3.2.2.1 Žluknutí hydrolytické

Při hydrolyze tuků jsou uvolňovány pouze mastné kyseliny. Ty však ve většině případů nezpůsobují u tuků žluknutí, protože nejsou pro lidské smysly postřehnutelné. Jinak je tomu u tuků, kde jsou přítomny mastné kyseliny s kratším uhlíkatým řetězcem. Nejčastěji mastné kyseliny s počtem uhlíků 4 až 10 (Velíšek, 2002).

3.2.2.2 Žluknutí oxidační

Při oxidaci mastných kyselin vznikají hydroperoxydy, které ovšem nemají vliv na senzorickou jakost tuků. Nežádoucí charakteristické pachutě vyvolávají posléze vzniklé sekundární produkty v závislosti na jejich koncentraci a složení. Mezi oxidační žluknutí řadíme rovněž často žádoucí enzymové nebo neenzymové reakce, při kterých vzniká charakteristické aroma mnoha potravin (např. některé druhy zeleniny, ovoce, smažených jídel, aj.) (Velíšek, 2002).

3.2.2.3 Žluknutí ketonové

Se žluknutím tohoto typu se můžeme setkat hlavně u másla. Při uvolnění mastných kyselin o délce uhlíkatého řetězce 6 až 12 uhlíků dochází pomocí enzymů, převážně mikrobiálního původu, k jejich oxidaci. Následně po odštěpení karboxylu vznikají ketony. Nejčastěji se jedná o pentan-2-on, heptan-2-on, nonan-2-on a undekan-2-on. Vzniklé látky mají charakteristickou parfémovou příchut' (připomínající květiny), která není nebezpečná ani nepříjemná je pouze netypická pro jedlé tuky (Odstrčil a Odstrčilová, 2006; Velíšek, 2002).

3.2.2.4 Chuťová reverze

Chuťová reverze je charakteristická hlavně pro sójový olej, ale i pro další oleje, které obsahují linolenovou kyselinu např. řepkový olej. Objevuje se již při nízkém obsahu hydroperoxidů mastných kyselin. Tento jev je typický zápachem po trávě a fazolích, který lze odstranit rafinací. Ovšem vada se po určité době znovu projeví. Reverze je velmi nepříjemná zvláště spotřebitelům ve Spojených státech, kteří požadují jedlý olej naprosto bez chuti (Odstrčil a Odstrčilová, 2006; Velíšek, 2002).

3.3 Metody konzervace potravin

Potraviny jsou nedílnou součástí našeho života, proto je nutné dbát na jejich kvalitu a bezpečnost. Jelikož většina potravin podléhá velmi snadno zkáze, je konzervace pro jejich uchování naprosto nezbytná. První konzervační postupy spočívali v sušení na slunci, zmrazení, ponechání v chladu, upečením. Dále se zdokonalovalo prosolováním, skladováním v tuku, cukru a v neposlední řadě se začalo využívat procesů kvašení (Ingr, 2005).

V poslední době je častý požadavek na potraviny bez syntetických aditiv a výrobků s nižším dopadem na životní prostředí. Oblastí zájmu jsou tedy také aromatické rostliny a jejich možné antimikrobiální a antioxidační aktivity (Prakash et al., 2012).

3.3.1 Sterilizace fyzikálními metodami

Konzervování potravin pomocí tepelného záhřevu (sterilizace) je vhodnou konzervační metodou při, které dochází k denaturaci mikrobiálních a enzymových bílkovin. Je ovšem nutné brát v potaz že při procesu zahřátí potraviny dochází k urychlení reakcí (např. autooxidace lipidů nebo Mailardovy reakce), které jinak probíhají velmi pozvolně (Ingr, 2005).

Sterilizaci potravin lze provést i tzv. odporovým ohřevem. Teplo se vytvoří při průchodu elektrického proudu vodičem, kterým je sterilovaný materiál. Tímto ohřevem lze dosáhnout teplot do 80°C za použití střídavého proudu (Ingr, 2005).

Na rozdíl od odporového ohřevu je možné využít metody vysokofrekvenčního ohřevu, kde se využívá dielektrického nebo elektrodového ohřevu. Dielektrický ohřev probíhá v celé hmotě, kam až prostoupí vysokofrekvenční energie. Mezi vysokofrekvenční ohřev patří také mikrovlnný ohřev. Ten je používán převážně v domácnostech, nejčastěji pro ohřev již hotových pokrmů, z důvodu nerovnoměrného ohřevu potravin. Mohou vznikat tzv. studená místa a po dlouhodobějším skladování, může dojít k mikrobiální zkáze (Ingr, 2005).

Další metodou sterilizace potravin je radiosterilizace a radiopasterace. Jedná se o elektromagnetická záření, které mají vlnovou délku kratší než viditelné světlo, a ionizující korpuskulární záření se vyznačují schopností usmrcovat mikroorganismy (Ingr, 2005). Z elektromagnetických záření lze uplatnit pro konzervaci potravin krátkovlnné záření gama, paprsků X (Röntgenovo záření) a ultrafialové záření (UV-paprsky). Korpuskulární záření ve formě elektronové emise (Ingr, 2005).

Mezi fyzikální metody můžeme také zařadit sterilizaci ultrazvukem. Kde se využívá ultrakrátkých zvukových vln s frekvencí nad 20 tisíc kmitů za sekundu. Ultrazvuk má na nejen na mikroorganismy, ale i na enzymy destruktivní vliv. Další zmíněnou metodou sterilizace je použití vysokých tlaků (Ingr, 2005).

3.3.2 Chemosterilace

Použití chemikálií jako sterilačního prostředku se týká jen malého množství látek. Pouze těch, které sterilují úplně a rychle. Mezi tyto látky řadíme dimethyl- a diethylester kyseliny diuhličité, ethylenoxid a propylenoxid. Látky dimethyl- a diethylester kyseliny diuhličité byly dříve používány při konzervaci ovocných šťáv a vín proti kvasinkám a plísním. V praxi se ovšem neuplatňuje. Látky ethylenoxid a propylenoxid jsou nazývané jako fumiganty. Často se uplatňují ve formě plynu při dekontaminaci suchých materiálů (např. sušené ovoce, koření). Žádná z těchto látek není u nás výslovně povolena ke konzervaci potravin (Ingr, 2005).

3.3.3 Fyzikálně chemická konzervace potravin

Mezi tyto zákroky ředíme odnímání vlhkosti potravin. To lze provést sušením, odpařováním, vymrazováním nebo přidavkem osmoticky aktivních látek. Těmito způsoby je vždy odebráno tolik vody z přirozeně vlhkých potravin, aby zbylé množství nebylo pro bakterie způsobující zkázu dostačující.

Další velmi využívaným procesem konzervace je působení nízkými teplotami. Tento proces lze rozdělit na chlazení potravin tedy tzv. psychroanabiózu, kdy se teploty pohybují pod hranicí bodu mrznutí a zmrazování tzv. kryoanabiózu, kde se teploty pohybují hluboko pod bod mrznutí. Chlazení potravin slouží spíše pouze k prodloužení údržnosti potravin. Naopak zmrazování potravin slouží jako konzervační metoda. Vlivem nízkých teplot se snižuje rychlost biochemických reakcí nejen u mikroorganismů ale i u látkových systémů vůbec. Teploty v chladírnách se pohybují v rozmezí od 0 až do 5°C. Teplota by nikdy neměla klesnout pod 0°C. Vhodné mrazírenské teploty proti mikroorganismům jsou -12°C, ale na omezení enzymů potravinám vlastní jsou zapotřebí teploty -30°C a nižší (Ingr, 2005).

Konzervovat potraviny lze i odejmutím kyslíku a upravení skladovací atmosféry. Ten proces vychází z předpokladu, že zkázu potravin často započínají aerobní bakterie. K jejich potlačení tedy lze využít zavedení anaerobních podmínek. Odnímání kyslíku prodloužíme trvanlivost potravin jen na krátkou dobu. Z důvodu možného rozvoje anaerobních mikroorganismů, kterým jsme tímto vytvořili ideální podmínky, se absence kyslíku nahradí jiným plynem. Nejčastěji je využíván oxid uhličitý. Při konzervaci masa je využíváno vakuové balení do ochranné atmosféry s různými podíly kyslíku, oxidu uhličitého a dusíku se zvolenou teplotou skladování. Přesně stanovený podíl jednotlivých složek vždy závisí na druhu konzervovaného masa (Ingr, 2005).

3.3.4 Konzervace potravin chemickou úpravou

Tento proces se rovněž označuje jako chemoanabióza. Použité chemické látky mikroorganismy pouze potlačují, ale cíleně neusmrcují. Přesto se nedá vyloučit, že při určité koncentraci a době působení nedojde u některých mikroorganismů k jejich usmrcení. Nejběžnější konzervovadla jsou látky oxid siřičitý a siřičitany, kyselina mravenčí, kyselina benzoová a benzoáty, kyselina sorbová a sorbáty, kyselina propionová, dusičnany a dusitany. Mezi konzervace chemickou úpravou lze zařadit i konzervaci uzením, alkoholizacím, okyselováním organickými kyselinami a v neposlední řadě je nutné zmínit i konzervaci antibiotik, bakteriociny a fytoncidy (Ingr, 2005).

3.3.5 Konzervace pomocí biologických zásahů

V tomto případě konzervace tzv. cenobióze využíváme činnosti mikroorganismů. Nejčastěji se uplatňuje alkoholové a mléčné kvašení a také pyrolýza, která se uplatňuje u výroby olomouckých syrečků. Produkt je v podstatě konzervován metabolity přítomných mikroorganismů (Ingr, 2005).

3.4 Antioxidační látky

Antioxidanty jsou látky, které dokážou zastavit řetězové radikálové reakce typu peroxidace lipidů (Pláteník, 2009). Obecně se jedná o látky využívané v potravinách pro zachování kvality a prodloužení trvanlivosti potravin, ale rovněž jsou přínosné pro lidský organismus. Jsou to látky v potravinách typu zelenina a ovoce se přirozeně vyskytující a pro naše tělo velmi přínosné. Mohou být přírodního nebo syntetického původu. Mezi nejčastěji používané látky syntetického původu v masných výrobcích patří butylhydroxianisol (BHA), butylhydroxytoluen (BHT), terciální butylhydrochinon (TBHQ), propyl gallát (PG). V posledních letech jsou ovšem velmi žádané látky rostlinného původu, díky nespokojenosti zákazníků z důvodu možné toxicity syntetických antioxidantů. Mnohé rostliny jsou zdrojem antioxidačních látek, které se zdají být vhodnou alternativou dosud používaných syntetických aditiv. Proto jsou často testovány extrakty nejrůznějších rostlin a je sledována jejich aktivita v masných výrobcích. Nejčastějším problémem ovšem bývá aromaticnost těchto extraktů. Jejich aplikace může ve výsledku nevhodně ovlivnit senzorické vlastnosti masného produktu. Rostlinné extrakty jsou velmi bohaté na fenolické látky, které mají antioxidační schopnost. Proto se rostlinné extrakty ukázaly jako vhodná náhrada syntetických antioxidantů. Extrakty

z rostlin jsou obecně považovány za bezpečné, z důvodu už běžného používání rostlin ve formě koření. I přes to je třeba přezkoumat bezpečnost těchto rostlinných extraktů, zvláště v závislosti na množství (Shah et al. 2014).

3.4.1 Vliv antioxidantů na lidské zdraví

Lidský organismus je složitý soubor neustále probíhajících chemických reakcí. Při kterých mimo jiné vznikají, jako vedlejší produkt, volné radikály. Ty jsou ve velkém množství pro lidský organismus škodlivé. Jako regulátoři vzniku volných radikálů jsou právě antioxidanty. Konzumace ovoce a zeleniny má příznivý vliv na lidský organismus zvláště z důvodu přítomných antioxidačních fenolů. Podávání potravních doplňků s antioxidačními vitamíny C, E, β – karotenem, jsou prospěšné v případě předchozího nedostatku, jinak je příjem těchto doplňků na základě provedených studií neúčinný, nebo může dokonce škodit. Dietní suplementace vitaminy C, E a β -karotenem nad doporučené dávky u lidí s pestrou stravou na současné úrovni poznání postrádá medicínské zdůvodnění. Zvýšené množství vitamínu C se doporučuje pouze kuřákům a naopak by měli být varováni před potravními doplňky s β -karotenem (Pláteník, 2009).

Reaktivní formy kyslíku hrají významnou roli v rozvoji tak závažných a rozšířených onemocnění, jako je ateroskleróza, diabetes mellitus, hypertenze, chronické střevní záněty, některé typy rakoviny, ischemicko-reperfuzní poškození srdce a jiných orgánů, mozkové trauma/ischemie, Parkinsonova nemoc, Alzheimerova nemoc atd. Rovněž se předpokládá, že fyziologické stárnutí není nic jiného než akumulace malých chyb systémů antioxidační ochrany a údržby tělesných struktur (Pláteník, 2009).

3.4.1.1 Endogenní antioxidanty

Endogenní antioxidanty lze dělit na vysokomolekulární a nízkomolekulární. Mezi vysokomolekulár řadíme např. transferin, laktoferin, feritin, haptoglobin, hemopexin, ceruloplazmin, albumin. Jedná se o látky rostlinného původu, které přijímáme společně s potravou (Kalousová a kol., 2006). Do antioxidantů nízkomolekulárních jsou řazeny zejména vitamíny C, E a karotenoidy. V poslední době se větší pozornost věnuje polyfenolickým sloučeninám. Jedná se o např. flavonoidy, katechiny a fenolické kyseliny. Tyto látky jsou přítomny zejména v zelenině, ovoci, vláknině, čaji, víně a v aromatických bylinách. V oblasti výzkumu je hodnocení antioxidační aktivity věnována velká pozornost. Ovšem je nutné brát v potaz, že přijímané látky rostlinného původu podléhají v zažívacím

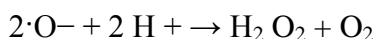
traktu metabolickým změnám. Tedy zjištěná antioxidační aktivita in vitro nemusí mít stejný účinek in vivo (Paulová a kol., 2004).

3.4.1.2 Antioxidační enzymy

Aby naše tělo bylo schopné odolávat bránit případně opravovat poškozené molekuly volnými radikály, je nezbytně nutné pro udržení optimálního fyziologického stavu dvou základních mechanismů. Jedná se využití antioxidačních enzymů a eliminace aktivity radikálů pomocí endogenních antioxidantů (Kalvach a kol., 2004). Účinné složky přirozeného obranného systému lidského organismu jsou některé proteiny obsahující selen, mangan, zinek a měď. Většinou se jedná o enzymy, jejichž funkcí je chránit organismus před volnými radikály a převádět je na méně účinné deriváty. Nejznámějšími proteiny s antioxidačními účinky jsou:

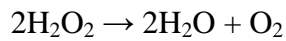
- *Superoxiddismutáza (SOD)*

Jedná se velmi efektivní enzym. Účastní se reakce s volnými radikály, kdy mění pomocí vody superoxidový radikál na kyslík a hydrogenperoxid. Hydrogen peroxid je dále rozložen enzymem katalázou na vodu a kyslík. Je známo více druhů superoxiddismutáz díky kovům, které mají v molekule (měď, zinek, mangan, železo). Přítomný kov určuje umístění enzymu v buňce a jeho účinnost a množství v jednotlivých tkáních. Během chronologického stárnutí se snižuje aktivita superoxiddismutázy a následkem toho se pomaleji rozkládají volné radikály. Díky tomu se urychlují degenerativní změny v tkáních. Při rozsáhlém poškození DNA, kdy už není možná oprava, mohou se aktivovat geny, které zahájí apoptózu, tedy programovanou buněčnou smrt. Likvidace poškozených buněk je geneticky zakódovaný mechanismus, který udržuje homeostázu v organismu (Kalvach a kol., 2004) V aktivním centru dismutáz se může nacházet mangan (Mnsuperoxid-dismutáza) nebo zinek s mědí (Zn,Cu –superoxid-dismutáza). Oba enzymy mají schopnost převádět superoxidový radikál na H₂O₂ a O₂:



- *Kataláza*

Tento enzym katalyzuje heterolytické štěpení dvou molekul peroxidu vodíku za vzniku kyslíku a vody.



Kataláza se liší od ostatních enzymů právě tím, že je schopná peroxid vodíku nejen redukovat ale i oxidovat. Nalezneme ji u téměř všech organismů s aerobním metabolismem. Hlavním úkolem tohoto organismu je chránit buňky, před velmi reaktivními molekulami s peroxidickou vazbou (Matoušková a kol., 2014).

- *Glutathion peroxidáza (GPx)*

Glutathion peroxidázy jsou selen-dependentní cytosolové enzymy, jako kofaktor je využíván glutathion. Nachází se jak v tělních tekutinách tak v cytosolu a v mitochondriích. Jejich úlohou je katalyzovat přeměnu peroxidu vodíku na vodu a spolu s tím spojená oxidace redukovaného glutathionu na oxidovatelnou formu (Matoušková a kol., 2014).

- *Glutathion reduktáza (GR)*

Zajišťuje zpětnou redukci oxidované formy glutathionu (Matoušková a kol., 2014).

3.5 Volné radikály

Většina volných radikálů, zvláště ty, které se nacházejí v lidském těle, jsou deriváty kyslíku a dusíku, mnohdy také nazývané reaktivní sloučeniny kyslíku a dusíku. Tyto sloučeniny obsahují jeden nebo více nepárových elektronů a díky tomu jsou schopné nezávislé existence. Mitochondrie jsou hlavními producenty těchto reaktivních sloučenin a rovněž terčem jejich poškození. Volné radikály v našem těle poškozují buňky a tkáně, zejména mitochondrie, buněčné membrány, DNA, proteiny, lipidy. Při vysokém obsahu volných radikálů dochází k jejich kumulaci a tím k tzv. oxidačnímu stresu (Kučera a kol. 2009).

Volné radikály jsou převážně, ne však vždy, nestabilní částice př. atomy, molekuly, které mají ve svém molekulovém orbitalu „slupce“ alespoň jeden nepárový elektron (mají lichý počet vazebných elektronů) (Volf, 2008).

Přesto, ale úplná eliminace reaktivních sloučenin kyslíku z organismu zřejmě není ani účelem antioxidační ochrany, protože kyslíkové radikály plní i řadu důležitých fyziologických funkcí. Mají v těle i signální úlohu. Například oxid dusnatý, který je jedovatý, na vzduchu nestabilní plyn, v organismu působí jako lokální mediátor mimo jiné s vasodilatačními a

neuromodulačními účinky, je z chemického hlediska také považován za volný radikál a jeho metabolismus a účinky v těle s reaktivními sloučeninami kyslíku úzce souvisí (Pláteník, 2009).

- *Superoxidový radikál*

O_2^- vzniká redukcí kyslíku. Není reaktivní, pokud nepřijde do kontaktu s dalšími volnými radikály. V přítomnosti enzymu superoxiddismutázy dochází k jeho dismutaci a tvoří se peroxid vodíku (Kučera a kol. 2009). Největším generátorem superoxidového radikálu v lidském těle je překvapivě sám dýchací řetězec mitochondrií a také aktivované fagocyty, které pomocí enzymu NADPH oxidázy produkují O_2^- cíleně jako jednu ze svých zbraní proti mikrobům a v propagaci zánětlivé reakce (Pláteník, 2009).

- *Peroxid vodíku*

Na produkci peroxidu vodíku v lidském těle se podílí mnoho enzymů. Vzhledem k tomu že peroxid vodíku nemá párový elektron, není brán jako volný radikál. Přesto tvoří velmi důležitou funkci v biologických systémech (Kučera a kol., 2009). Rovněž je specifický reaktivitou s redukovanými redoxně aktivními přechodnými kovy typicky v těle atomy železa nebo mědi. Tato tzv. Fentonova reakce poskytuje velmi reaktivní hydroxylový radikál (Pláteník, 2009).

- *Hydroxylový radikál*

Řadí se mezi nejúčinnější radikály a poškozují většinu buněčných složek. Často vzniká v průběhu Fentonovy reakce (Kučera a kol., 2009).

- *Hypochlorovaná kyselina*

Hypochlorová kyselina je velmi reaktivní a má schopnost rozpouštět tuky. Je produkován reakcí peroxidu vodíku s enzymem myeloperoxidázou. Zvláště nebezpečný je pro proteinové struktury a může okysličovat a poškozovat biomolekuly (Kučera a kol., 2009).

- *Peroxylový radikál*

Jedná se o velmi nestabilní organické radikály, které vznikají při peroxidačních reakcích. Ochotně reagují s molekulárním kyslíkem, za vzniku ROO nebo RO radikály mastných kyselin. Nově vyprodukované radikály jsou rovněž velmi reaktivní a mohou reagovat s dalšími molekulami mastných kyselin za vzniku jiných radikálů mastných kyselin a peroxidu vodíku (Kučera a kol., 2009).

- *Oxid dusnatý*

Jedná se o vysoce reaktivní plyn, který je ovšem velmi důležitou signální molekulou v těle. V těle je utvářen pomocí enzymu syntetázy oxidu dusíku. Oxid dusnatý je škodlivý pouze při nadměrném uvolňování (Kučera a kol., 2009).

- *Peroxynitril*

Peroxynitril je oxidační a nitrační činidlo. Tento radikál vzniká při reakci kyslíku s oxidem dusným. Poškozuje široké spektrum biomolekul, včetně bílkovin a DNA (Kučera a kol., 2009).

3.5.1 Konvenční antioxidanty

Do průmyslově vyráběných potravin se běžně přidávají nejrůznější aditiva. Tedy látky, které upravují technologické vlastnosti potravin. Při výrobě je možné použít pouze taková aditiva, která byla pro použití v potravinách předem schválena právními předpisy EU. Uvedení látky mezi povolená aditiva, vždy předchází posouzení její bezpečnosti. Právě nařízením (ES) č. 1333/2008 o potravinářských přídatných látkách. Stanovuje základní podmínky, které musí být splněny, aby se potravinářská přídatná látka mohla zahrnout do seznamu povolených látek v EU. Použití přídatných látek do potravin je povoleno pouze v případě splnění níže uvedených podmínek (Kundříková a Pavelková, 2014):

- použití přídatné látky nesmí představovat žádná zdravotní rizika pro spotřebitele,
- v případě odůvodněné technologické potřeby přídatné látky,
- za předpokladu že použití přídatné látky do potravin neuvádí spotřebitele v omyl pro
- spotřebitele musí použitá přídatná látka poskytovat určité výhody a přínosy

Jednotlivá aditiva se přidávají pouze do potravin pro, která jsou povolena. Stejně tak je pro každou aditivní látku a konkrétní potravinu stanovené nejvyšší povolené množství tj. limitní hodnoty. V případě potravin, které se ještě dále zpracovávají, přidáváme aditiva pouze za předpokladu, že výsledný produkt může použité povolené přídatné látky obsahovat. U některých přídatných látek není určeno nejvyšší povolené množství číselnou hodnotou. V takovém případě se při výrobě potravin řídíme zásadou *quantum satis, tzn.*, použije se pouze nezbytně nutné množství (Kundříková a Pavelková, 2014).

Veškerá přidaná aditiva do potravin musejí být uvedeny na obale. Označení přídatných látek na obale se řídí požadavky části C přílohy VII nařízení (EU) č. 1169/2011 o poskytování informací o potravinách spotřebitelům takovým způsobem, že se nejdříve uvede skupina, do které se přídatná látka řadí a po ní následuje její specifický název nebo číselný E kód. E kód je

složen z písmene E a trojmístného čísla. Přídavné látky je udělen E kód pouze v případě, že prošla posouzením bezpečnosti a byla povolena EU (Kundříková a Pavelková, 2014).

Za červenou barvu masa je převážně zodpovědný myoglobin. Jedná se o pigment, který při procesu ohřívání denaturuje a barva masa se změní z červené na hnědočervenou. Tento oxidační proces je u některých masných výrobků považován za senzoricou vadu. Z těchto důvodů se přidávají nejrůznější aditiva se schopností zabraňovat oxidaci svalového barviva a tím zachovat červenou barvu masného produktu. Oxidace masného výrobku má významný dopad na jeho chuť. Dochází k oxidaci lipidů, konkrétně polynenasycených mastných kyselin. Při rozpadu těchto kyselin vznikají sekundární oxidační sloučeniny jako je hexanal, pentanal a oktanal (Ahn et al. 2007).

V roce 1920, díky vzestupu chemického průmyslu a zjištění mechanismu oxidace, začal vývoj aditivních látek ovlivňující oxidaci potravin. Úmyslně se do potravin začali dodávat až v letech 1940 a 1950 (Decker et al., 2010).

Zvýšené nároky na přirozeně se vyskytující konzervační látky vedli k využívání účinnějších a bezpečných látek v masném průmyslu. Proto jsou nutné další studie, které stanoví účinné koncentrace přírodních sloučenin, aby bylo dosaženo antimikrobiální a antioxidační aktivity v masných výrobcích, aniž by byly nepříznivě ovlivněny organoleptické vlastnosti (Ahn et al. 2007).

- **Seznam povolených potravinářských přídatných látek – Antioxidanty** (Státní zdravotní ústav, 2012)

Kód	Látka	Funkce
E 220	Oxid siřičitý	Konzervant, antioxidant
E 221	Siřičitan sodný	Konzervant, antioxidant
E 222	Hydrogensiřičitan sodný	Konzervant, antioxidant
E 223	Disiřičitan sodný	Konzervant, antioxidant, bělicí činidlo
E 224	Disiřičitan draselný	Konzervant, antioxidant
E 226	Siřičitan vápenatý	Konzervant, antioxidant
E 227	Hydrogensiřičitan vápenatý	Konzervant, antioxidant
E 228	Hydrogensiřičitan draselný	Konzervant, antioxidant
E 300	Kyselina L-askorbová	Antioxidant
E 301	Askorban sodný	Antioxidant
E 302	Askorban vápenatý	Antioxidant

E 304	Estery mastných kyselín s kyselinou askorbovou	Antioxidant
E 306	Extrakt s vysokým obsahom tokoferolů	Antioxidant
E 307	Alfa-tokoferol (α -tokoferol)	Antioxidant
E 308	Gama-tokoferol (γ -tokoferol)	Antioxidant
E 309	Delta-tokoferol (δ -tokoferol)	Antioxidant
E 310	Propylgallát	Antioxidant
E 311	Oktylgallát	Antioxidant
E 312	Dodecylgallát	Antioxidant
E 315	Kyselina erythorbová (kyselina isoaskorbová)	Antioxidant
E 316	Erythorban sodný (isoaskorban sodný)	Antioxidant
E 319	Terciální butylhydrochinon (TBHQ)	Antioxidant
E 320	Butylhydroxyanisol (BHA)	Antioxidant
E 321	Butylhydroxytoluen (BHT)	Antioxidant
E 322	Lecitiny	Antioxidant, emulgátor
E 325	Mléčnan sodný	Antioxidant, plnidlo, zvlhčující látka
E 326	Mléčnan draselný	Antioxidant, regulátor kyselosti
E 330	Kyselina citronová	Regulátor kyselosti, antioxidant, sekvestrant
E 334	Kyselina vinná (L(+)-)	Regulátor kyselosti, antioxidant, sekvestrant
E 338	Kyselina fosforečná	Regulátor kyselosti, antioxidant
E 385	Dvojsodnovápenatá sůl kyseliny diamintetraoctové (kalcium-dinatrium EDTA)	Antioxidant, sekvestrant, konzervant
E 392	Výtažky z rozmarýnu	Antioxidant
E 512	Chlorid cínatý	Antioxidant, stabilizátor barviva
E 586	4-hexylresorcinol	Antioxidant
E 620	Kyselina glutamová	Stabilizátor barviva, antioxidant

3.5.2 Rostlinné antioxidanty

Mezi rostlinné antioxidanty patří široká skupina látek hydrofilního a lipofilního charakteru. Jedná se například o tokoferoly, polyfenolové sloučeniny, terpenoidy atd. (Sabalová a kol., 2012). Do skupiny polyfenolických sloučenin jsou řazeny polyfenolické kyseliny, flavonoidy, přírodní barviva, lignany (Boros et al., 2010). Obecně se řadíme mezi sekundární metabolity rostlin (Daníhelová a Šturdík, 2011). Vhodným potenciálním zdrojem těchto látek jsou mimo jiné rostliny patřící do čeledi Hluchavkovité, Vavřínovité a Myrtovité (Boros et al., 2010).

Významnou antioxidační aktivitu vykazala kyselina rozmarýnová, která je dominantní složkou u druhů rodu *Thymus*, kde byla naměřena její koncentrace v rozmezí od 83,49 µg/g do 1436,36 µg/g (Boros et al., 2010). Kyselinu rozmarýnovou také samozřejmě obsahuje rozmarýna lékařská (*Rosmarinus officinalis* L.) Z jejích listů byl rovněž izolován karnosol, kyselina karnosolová, rosmanol, rosmaridiphenol a rosmariquinone (Hudson, 1990). U rosmaridiphenolu byl zjištěn lepší antioxidační efekt než u syntetického antioxidantu BHT (Min and Smouse, 1985).

Významnými antioxidanty v čerstvém sezamovém oleji jsou sesamol, sesamin, sesamolin a γ -tokoferol. Další látky s významným antioxidačním efektem jsou β -karoteny, kávová, chininová, ferulová kyselina, flavonoidy, koniferil alkohol aj. (Hudson, 1990). Zmíněné flavonoidy jsou nejhojněji se vyskytující fenolické sloučeniny obsažené v rostlinách a působící jako silný antioxidant (Carpenter et al., 2007). Mají přímý antioxidační účinek, ovlivňující tvorbu volných radikálů i nepřímo aktivací nebo deaktivací antioxidačních enzymů, které se podílejí na vzniku různých volných radikálů (Volf, 2008).

Další silné antioxidační účinky byly prokázány u oregana a mnoha dalších hluchavkovitých rostlin (Duke, 2006). Také byla pozorována významná antioxidační aktivita ve slunečnicovém a řepkovém oleji po smažení u šalvěže lékařské (*Salvia officinalis* L.) a tymiánu (*Thymus vulgaris* L.) v čerstvém ale i sušeném stavu (Roubíčková et al., 2012). Podobně byla zaznamenána stabilita vepřového sádla po přidání sušených a čerstvých listů meduňky lékařské (*Melissa officinalis* L.) (Sabalová a kol., 2012). Teixeira et al. (2013) také uvádějí, že antioxidační aktivita esenciálního oleje dobromysly a hřebíčku byla podobná aktivitě často používaného syntetického přípravku BHT (butylhydroxytoluen).

Potenciální antioxidační aktivita byla také prokázána u semen hroznového vína. Téměř dvacet až padesátkrát vyšší než u vitamínu C a E. Účinek vyplývá ze zvýšeného obsahu polyfenolů a oligomerů. Ve studii bylo, spolu se semeny hroznů, testován extrakt medvědice

lékařské (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng.) na vepřovém mase. Přidání extraktu do vepřových placiček v koncentracích 80 μ g/g a 1000 μ g/g výrazně snížili oxidaci lipidů. Dále bylo prokázáno účinné snížení oxidace lipidů v průběhu vaření vepřových placiček po přidání extraktů z medvědice lékařské (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng.) a semen vinných hroznů. Toto zjištění poukazuje i na tepelnou stabilitu získaných extraktů (Carpenter et al., 2007).

Polyfenolické látky dodané do mletého krůtího masa ve formě extraktu ze semen hroznového vína, rovněž prokázaly svou antioxidační schopnost. Krůtí maso je velmi bohaté na polynenasycené mastné kyseliny, díky tomu je mnohem náchylnější k oxidaci a tím dochází k zhoršení chuti, barvy, textury a nutriční hodnotě masa. Extrakt byl do mletého krůtího masa aplikován v koncentracích od 0,4 do 1,6 g/kg masa. Koncentrace 0,4 a 0,8g/kg se ukázali být jako méně účinné a vyšší koncentrace účinnější (Mielnik et al. 2006).

3.5.2.1 Čajové katechiny

Zelený čaj je nejvíce konzumovaným nápojem na světě. Čaj se připravuje z nefermentovaných čajových lístků rostliny čajovník čínský (*Camellia sinensis* L.). Rostlina pochází z Číny a rozeznáváme dva původní druhy *C. sinensis sinensis* a *C. sinensis assamica*. V Číně se zelený čaj používá jako bylinný lék již 5000 let (Senanayake, 20013). Rozeznáváme několik druhů čaje. Čaj černý, bílý, oolong a Pu-erh (zelený a červený čaj). Sklizené čajové lísky je nutné usušit. Působením horka se zničí přírodní enzymy a nemůže tak dojít k oxidaci.



Obrázek 1 – Čajovník čínský (*Camellia sinensis* L.)

(http://en.wikipedia.org/wiki/Camellia_sinensis)

Procesy při zpracování:

- *Zavadnutí*

Nasbírané listy zeleného čaje se rozprostřou po bambusových listech nebo na slaměné rohože a vystaví se slunečnímu záření a teplému vzduchu. Je nutné, aby se rovnoměrně prosušili, a proto se pravidelně obrazejí.

- *Pražení*

Listy se po zavadnutí praží a přitom mohou měnit barvu. Nabývají odstínů šedozelených, žlutozelených, světle zelených či tmavozelených. Pražení zeleného čaje se provádí na typických wok pánvích přímo nad ohněm.

- *Napařování*

Bambusové listy se zavěšují nad horkou vodu a tím se stávají lístky poddajnějšími. Někde se mohou používat otočné napařovací stroje nebo pásové napařování.

- *Tvarování*

Lístky jsou tvarovány pomocí stroje, kde jsou svinovány nebo ručně tj. čechráním, stáčením, rolováním do tvaru kuliček a jehliček. Pro zelené čínské čaje vyšší kvality je typické ruční tvarování (Rosen, 2000).

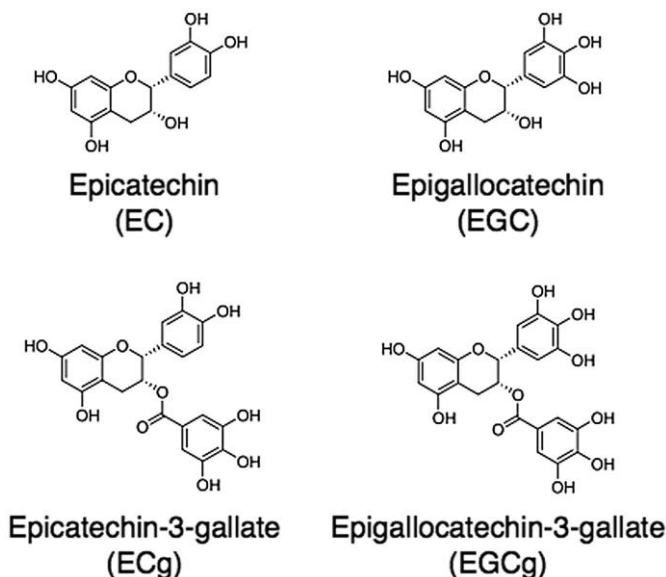
Hlavními složkami čajových lístků jsou polyfenoly. Čerstvé čajové lístky také obsahují kofein (přibližně 3,5% z celkové sušiny), theobromin (0,15 - 0,2%), theofylin (0,02 – 0,04%), a další methylxanthiny, lignin (6,5%), organické kyseliny (1,5%), chlorofyl (0,5%), a jiné pigmenty, theanin (4%) a volné aminokyseliny (1 – 5,5%), a četné aromatické sloučeniny. Kromě celé řady komponent obsahuje zelený čaj flavony, fenolické kyseliny, sacharidy, alkaloidy, minerály, vitamíny a enzymy. Čaj obsahuje rovněž flavonoly, z toho převážně quercetin, kaempferol, myricetin a jejich glykosidy (Senanayake, 20013).

Dále v zeleném čaji nalezneme polyfenoly a z nich hlavně katechiny. Bylo provedeno mnoho šetření pro antioxidační vlastnosti zeleného čaje. Ty jsou připisovány právě přítomným čajovým katechinům (TC), včetně epigallokatechin gallat (EGCG), epigallokatechin (EGC), epikatechin gallat a epikatechin (EC). Katechinové sloučeniny podporují zdraví tím, že brání oxidaci lipidů, rovněž byly prokázány antibakteriální a antivirové účinky (Senanayake, 20013; Pokorny et al., 2001).

Obsah katechinů, ale závisí na zpracování listů před sušením. Fermentace a ohřev čajových lístků v průběhu výrobního procesu, může způsobit polymeraci monopolyfenolických katechinů, což vede ke konformačním změnám a tím se mění jejich vlastnosti. Zelený čaj obsahuje v porovnání s černým čajem podstatně větší množství

polyfenolů. Antioxidační aktivita flavonoidů v podstatě závisí na počtu a poloze hydroxylových skupin v molekule. Stabilita katechinů ze zeleného čaje závisí na teplotě a pH (Senanayake, 20013).

Bylo zjištěno, že katechiny účinněji snižují tvorbu peroxidu než α -tokoferol a BHA v řepkovém oleji, vepřovém sádle a kuřecím tuku. Rovněž byla potvrzena účinnost čajových katechinů v mletých vařených karbanátčích, kde snížili oxidaci lipidů. Schopnost čajových katechinů inhibovat oxidaci lipidů lze vysvětlit jejich afinitou k lipidové dvojvrstvě a jejich schopností vychytávat volné radikály (Tang a kol., 2001). Rovněž byl zjištěn významný antioxidační efekt epikatechin galatu na sádle při koncentraci 200 mg/kg. Byl také zjištěn účinek katechinů ve formě čajového extraktu, kde ale mohou aktivitu ovlivňovat další látky, které jsou v extraktu přítomné např. chlorofyl (He and Shahidi, 1997).



Obrázek 2 – Katechiny

(<http://www.spandidos-publications.com/etm/8/1/59>)

- Epigallokatechin gallat

Často je řazen mezi nejhojněji se vyskytující katechiny a obvykle je používán jako ukazatel kvality čajových katechinů. Také vykazuje silnou antioxidační aktivitu.

Obecně je stabilita čajových katechinů ve vodném prostředí závislá na obsahu teplotě a pH. Čím nižší je teplota a pH tím jsou čajové katechiny stabilnější (Ananingsih et al., 2013). Obsah EGCG v zelených listech se pohybuje kolem 127 až 550 mg/l zeleného a oolong čaje. Zatím co černý čaj může obsahovat EGCG 300 mg/l (Yilmaz, 2006). Pozitivní antioxidační

efekt byl potvrzen na rybím mase, kde byl porovnáván spolu s ostatními katechiny proti umělým antioxidantům (He and Shahidi, 1997).

Byly testovány extrakty z několika druhů čajů, kde všechny pozitivně ovlivnili oxidační stabilitu v rybím mase modrého šprotu. Nejlepší účinnost ovšem prokázal extrakt s obsahem epigallocatechin gallatu (Seto et al., 2005).

3.5.3 Metody stanovení antioxidační aktivity

Metod, pomocí kterých lze stanovit antioxidační aktivitu, je široké spektrum. Toto zjištění vyplývá ze zjištění různého mechanismu působení nízkomolekulárních antioxidantů. Velmi častými způsoby reakce antioxidantů s volnými radikály je přímá reakce nebo reakce s přechodnými kovy. Valná většina metod je založená na rozličných principech stanovení (Paulová a kol., 2004).

3.5.3.1 Metody založené na eliminaci radikálů

Jedná se o metodu hodnotící schopnost vzorku vychytávat volné radikály. Ty mohou být v reakční směsi generovány nebo jsou do směsi přidávány. Z chemického hlediska se může jednat o dva druhy volných radikálů. Radikály kyslíkové (hydroxyl, peroxy, superoxydový anion-radikál) nebo stabilnější radikály syntetického původu (DPPH, ABTS^{•+}, galvinoxyl) (Paulová a kol., 2004).

3.5.3.1.1 Metody hodnotící eliminaci syntetických radikálů

- *Metoda používající ABTS (metoda TEAC)*

Tato metoda je jedna z nepoužívanějších pro zjištění celkové antioxidační aktivity TAA. Metodou lze zjistit schopnost testované látky zhaset kation-radikál ABTS^{•+}. Také je označována jako metoda TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), právě z důvodu porovnávání antiradikálové aktivity se syntetickou látkou Trolox. Je sledována schopnost testované látky zhaset radikál ABTS^{•+}. Účinnost testované látky se zjišťuje pomocí spektrofotometru na základě změn absorpčního spektra ABTS^{•+} při vlnové délce 734 nm (Paulová a kol., 2004).

- *Metoda používající DPPH*

Pomocí této metody lze zjistit antioxidační aktivitu nejen čistých látek, ale i různých směsných vzorků. Principem je reakce testované látky s radikálem difenylpikrylhydrazylem – DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl) hydrazyl). Při reakci je radikál redukován za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). Výsledná reakce je nejčastěji sledována spektrofotometricky při vlnové délce 517 nm. Absorbance se buď měří po určité době, nebo je sledována v kinetickém režimu. Další možné varianty tohoto testu lze provést v mikrotitračních destičkách, metodou spinové rezonance, použití HPLC (Paulová a kol., 2004).

- *Metoda používající galvinoxyl*

Tento test je založený na reakci testovaného antioxidantu se stabilním radikálem, v tomto případě galvinoxylem. Princip je velmi podobný testu DPPH, kde dochází k redukci radikálu galvinoxylu látkami poskytující vodík. Výsledná reakce je měřena pomocí spektrofotometru při vlnové délce 423 nm nebo na základě spinové rezonance (Paulová a kol., 2004).

3.5.3.1.2 Metoda hodnotící eliminaci kyslíkových radikálů

- *Metoda ORAC*

V metodě ORAC (oxygen radical absorbance capacity) se využívá generace kyslíkových radikálů přímo v systému. Je hodnocena schopnost testované látky zpomalit nebo úplně zastavit radikálovou reakci. Metoda je založená na sledování úbytku fluorescence β -fykoerytrinu po náporu radikálů. Jako generátor peroxylových radikálů se používá AAPH(2,2.-azobis(isobutyrimidamid)-dihydrochlorid) a generaci hydroxylových radikálů se využívá systému $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cu}^{2+}$. bylo však zjištěno omezení při stanovení polyfenolů. Týkají se fotostability používané fluorescenční sondy β -fykoerytrinu (Paulová a kol., 2004).

- *Metoda založená vychytávání OH-radikálů*

Hydroxylové radikály jsou zde generovány několika způsoby (Fentonovou reakcí, UV fotolýzou peroxidu vodíku). Antioxidační aktivita je založena na zjišťování snadno stanovitelných produktů látek, které vychytávají volné radikály. Jedno z variant je vychytávání hydroxylového radikálu kyselinou salicylovou, kde vznikají hydroxylované produkty salicylové kyseliny. Detekce těchto produktů je prováděna metodou HPLC s UV detekcí. Další možné postupy vychytávání hydroxylového radikálu jsou použití 2,2-dimethyl-2H-pyrrol-1-oxidu (DMPO), nebo HPLC-ECD. Také vychytávání pomocí deoxyribosy, kde jsou degradační produkty stanoveny s kyselinou thiobarbiturovou (Paulová a kol., 2004).

- *Metody založené na vychytávání superoxidového anion-radikálu*

Tato metoda k produkci radikálu využívána např.: neenzymové reakce 5-methylfenazinium-methyl-sulfátu a NADH nebo systém xanthin/xanthinoxidasa. Produkované radikály reagují s nitrotetrazoilovou modří. Následné stanovení probíhá na spektrofotometru při nastavené vlnové délce 550-560 nm. Metodu je možné provést také na mikrotitračních destičkách, dále metodou spinové rezonance. Další možné postupy zahrnují HPLC a chemiluminiscenci (Paulová a kol., 2004).

3.5.3.1.3 Metody hodnotící eliminaci lipidové peroxidace

Látky používané na potlačení lipidové peroxidace mohou vyloučit nejen samotné kyslíkové radikály, ale i vznikající sekundární radikálové meziprodukty (peroxyl, alkoxy) a rovněž mohou působit jako látky se schopností chelatovat ionty přechodných kovů.

Jedna z jednodušších metod je detekce produktů peroxidace linolové kyseliny. Jako iniciátor radikálové reakce je velmi využíván AAPH. Následné produkty jsou stanoveny spektrofotometricky při 234 nm (Paulová a kol., 2004).

Další z velmi využívaných metod je metoda TBA-MDA. Spočívá ve stanovení vzniklého sekundárního metabolitu malondialdehydu (MDA) při lipidové peroxidaci díky vzniklé barevné reakci s kyselinou thiobarbiturovou (TBA). Barevná reakce je měřena na spektrofotometru při vlnové délce 532 nm (Paulová a kol., 2004; Pokorný et al., 2001; Decker et al., 2010).

3.5.3.2 Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek

Antioxidanty neenzymové povahy, které reagují a oxidanty a tím je redukují, dochází tím k jejich inaktivaci. Proto lze antioxidační aktivitu lze posuzovat na základě redukčních schopností (Paulová a kol., 2004).

3.5.3.2.1 Metody chemické

- *Metoda FRAP*

Metoda FRAP (ferric reducing antioxidant potential) je založena na schopnosti antioxidantů redukovat ze vzorku komplex Fe^{3+} -2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin) (Fe^{3+} -TPTZ). Pomocí této metody sledujeme pouze schopnost testovaných látek redukovat ionty Fe^{3+} a proto s celkovou antioxidační aktivitou nemusí pozitivně souviset (Paulová a kol., 2004).

3.5.3.2.2 Elektrochemické metody

- *Cyklická voltametrie*

Další vhodnou metodou zjišťování redoxních vlastností je cyklická voltametrie, která sleduje schopnost látek odštěpovat elektrony. Na pracovní elektrodě je vkládán potenciálový pulz s danou rychlostí polarizace a zároveň jsou sledovány proudové odezvy roztoku s testovanou látkou. Získané výsledky jsou zaznamenány pomocí křivky tzv. cyklického voltamogramu. Výsledky jsou vyhodnoceny pomocí dvou získaných parametrů. Jedná se potenciál anodického oxidačního píku E_A a jeho anodického proudu I_A . Čím je hodnota E_A nižší tím látka snadněji odevzdává elektrony a tím má určité předpoklady pro vhodnou antioxidační aktivitu. Následně lze zvolit konkrétní metodu pro stanovení antioxidační kapacity (Paulová a kol, 2004).

3.5.3.2.3 HPLC metoda s elektrochemickou detekcí

Při této metodě je na pracovní elektrodu detektoru vkládán určitý kladný potenciál. Výsledek je zaznamenán ve formě píku, který se projeví pouze v případě, že je látka při tomto potenciálu oxidována. Díky této metodě lze zjistit v komplexních směsích konkrétní účinné antioxidační složky, právě díky hodnotě potenciálu aplikovaného na elektrodu (Paulová a kol., 2004).

4 Materiál a metody

4.1 Použité přístroje

Pro přípravu vzorků byly použity mikropipety s nastavitelným objemem 10 – 1000 μl . Na promíchání vzorků v mikrozkušavkách byl použit vortex (Chromoservis). Dále byla použita mikrocentrifuga Hettich EBA 2 na oddělení pevného podílu vzorku od kapalného v mikrozkušavce. Měření antioxidační aktivity bylo provedeno na spektrofotometru UV-2900 PC.

4.2 Použité chemikálie

Thiobarbitursäure rein (TBA) (Loba Feinchemie, Fischamend, AT)

Kyselina trichloroctová p.a. (TCA) (Lach-ner)

Kyselina chlorovodíková 35% p.a. (HCl) (Lach-ner)

Polyphenon 60 (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)

Methylalkohol p.a. (Penta s.r.o.)

2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl, approx. 90% (DPPH) (Sigma-Aldrich)

6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid parum 98% (Trolox) (Sigma-Aldrich)

4.3 DPPH

Pro stanovení DPPH byly použity mikrotitrační destičky. Test byl proveden ve třech opakováních. U každé mikrotitrační destičky byla první a pátá řádka jamek prázdná. Do všech ostatních jamek mimo prvního sloupce bylo pipetováno 100 μl methanolu. Do ponechaného prázdného prvního sloupce bylo napipetováno 200 μl testovaného Polyphenonu 60 a kontrolního antioxidantu Troloxu. Poté bylo provedeno ředění geometrickou řadou pouze po sloupec jedenáct. V posledním sloupci jamek nebyl Polyphenon 60 ani Trolox sloužil jako tzv. kontrola. Geometrickým ředěním byly získány koncentrace 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 a 0,5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Polyphenonu 60 a Troloxu. Následně bylo do všech jamek napipetováno 75 μl methanolu a 25 μl připraveného roztoku DPPH. Takto připravené mikrotitrační destičky byly ponechány 30 minut na tmavém místě. Poté byla změřena absorbance při 520 nm.

4.4 Příprava vzorků paštiky

Vzorky byly připraveny pouze ze základních dvou složek. Tedy vepřových jater a sádla. Pro přípravu vzorků paštiky byly použity 4 kg vepřových jater a 2 kg vepřového sádla. Játra byla nakrájena na kostky a opečené na rozpuštěném sádle. Opečená játra byla namleta na mechanickém mlýnku na maso. Do čtyř nádob bylo odváženo 650 g namletého materiálu (paštiky). Takto připravená paštika byla rozdělena na čtyři části. První část paštiky sloužila jako kontrola, tedy paštika bez žádného množství přidané testované látky a do dalších třech byly přidány koncentrace Polyphenon 60 (ze zeleného čaje) 100 mg/kg, 200 mg/kg a 500 mg/kg. Přidané koncentrace testované látky byly důkladně mechanicky vmíchány do celého obsahu paštiky. Následně se paštika plnila do 50 ml plastových kelímků a uzavřena strečovou folií. Takto připravené paštiky byly pasterovány ve vodní lázni po dobu 20 minut poté vyjmuty překryty pouze ze svrchní části alobalovou folií a vloženy do chladicího zařízení do temna při teplotě 3-7°C.



Obrázek 3 – Vzorky paštiky obsahující koncentrace Polyphenonu (Kontrola OX- bez koncentrace; 100 OX-100 mg/kg; 200 OX-200 mg/kg; 500 OX-500 mg/kg)

4.5 Stanovení TBA hodnoty

Tato metoda byla použita z odborného článku, kde ji uvádí Bekhit et al., 2003. Pro stanovení TBA hodnoty bylo odváženo 0,5g do dvou mikrozkušavek (tzv. ependorfek) o objemu 2,5 ml po 0,25g. K odebranému vzorku bylo přidáno do každé ependorfky 1,25 ml roztoku (0,375% Thiobarbitursäure rein (TBA) -15% kyselina trichloroctová (TCA) -0,25N

kyselina chlorovodíková 35% (HCl). Takto připravené vzorky byly vortexovány a poté vloženy do lázně o teplotě 95-100°C po dobu 10 minut. Následně byly vzorky zchlazeny pod proudem studené vody a odstředěny v odstředivce po dobu 5 minut při 1500 otáčkách. Byla měřena absorbance tekutého podílu na spektrofotometru při vlnové délce 532nm. Hodnota TBA čísla byla vypočtena (Tangl et al., 2001b):

$$c_{\text{malodialdehydu}}[\text{mg/g}] = 7,8 \cdot A (\text{absorbance}) \cdot b^{-1} \cdot n^{-1}$$

A.....absorbance

b^{-1}tloušťka kyvety (10 mm)

n^{-1} navážka vzorku (g)

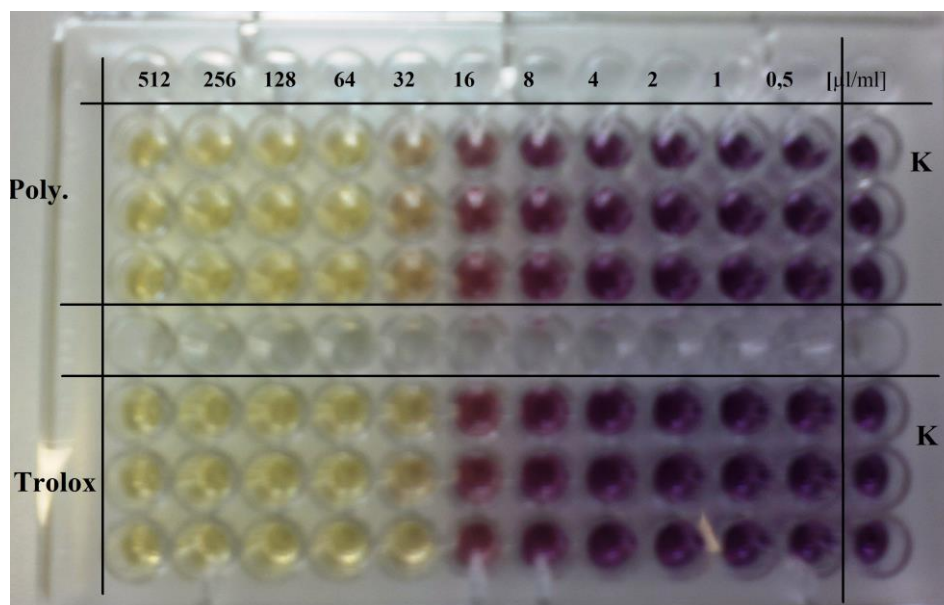
4.6 Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno pomocí programu Statistica, verze 12. K hodnocení byla použita vícefaktoriální ANOVA, hladina významnosti byla na hladině $\alpha = 0,05$.

5 Výsledky

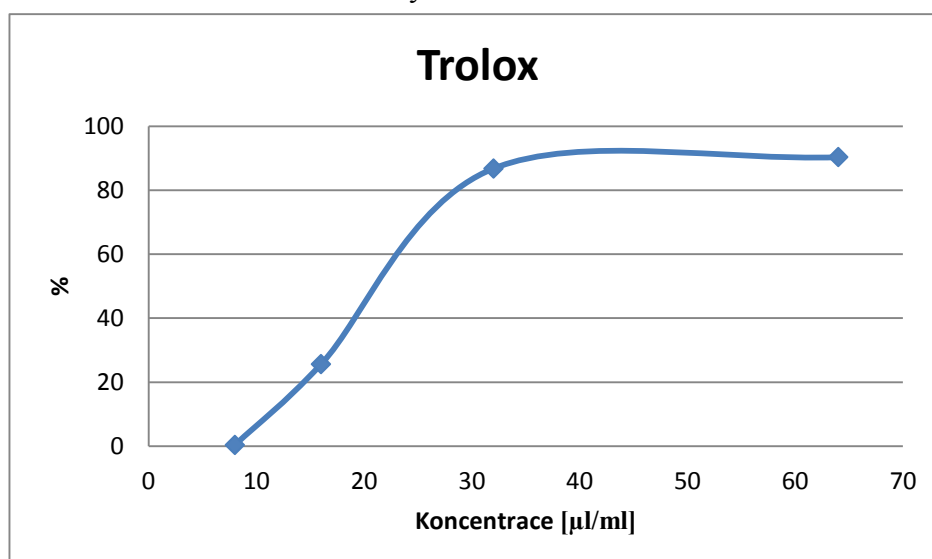
5.1 DPPH hodnota

Antioxidační aktivita polyphenonu 60 byla ověřena rychlou in-vitro metodou DPPH. Byla zjištěna jeho inhibiční koncentrace IC_{50} $25,3 \pm 3,4 \mu\text{l/ml}$. IC_{50} referenčního antioxidantu troloxu činila $22,7 \pm 1,2 \mu\text{l/ml}$.

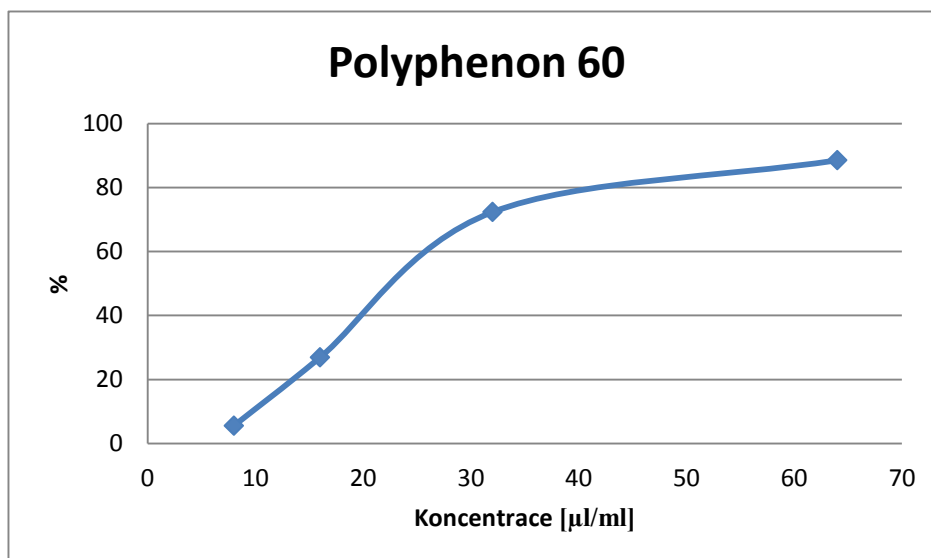


Obrázek 4 – Mikrotitrační destička; V horní části destičky byl aplikován Polyphenon (Poly.) po třech řádcích. Do dolní části byl aplikován Trolox jako kontrolní antioxidant. Na vodorovné ose jsou znázorněny koncentrace obou látek v $\mu\text{l/ml}$. Na pravé straně jsou kontroly K.

Graf 1 – Průběh inhibiční křivky Troloxu



Graf 2 – Inhibiční křivka Polyphenonu 60



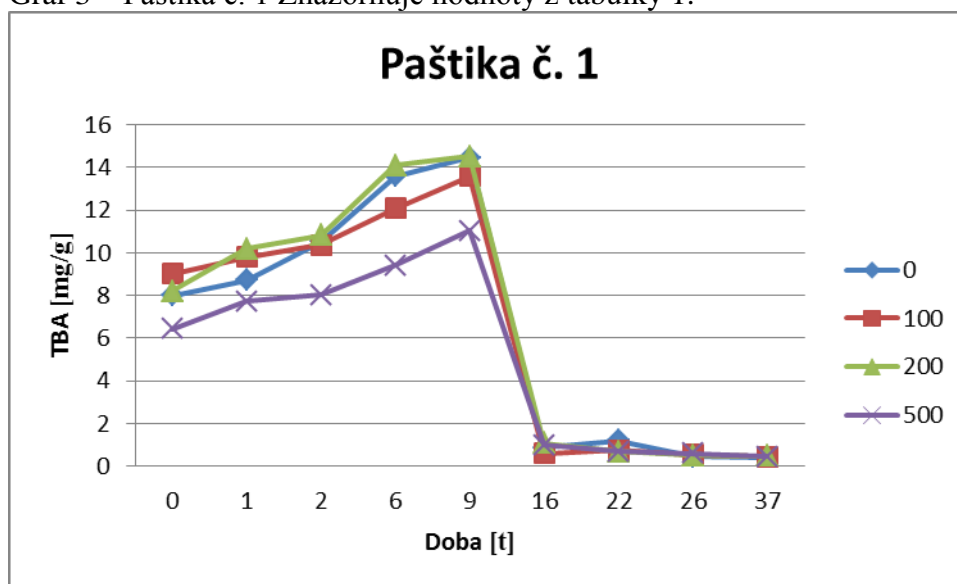
5.2 TBA hodnoty

Antioxidační aktivita polyphenonu 60 byla dále testována v játrové pašticce ve dvou nezávisle probíhajících experimentech. Použité koncentrace byly vybrány na základě dřívějších studií antioxidační aktivity čajových katechinů v mase a masných produktech (Tang et al., 2001 a, b). Z tabulky č. 1 s naměřenými hodnotami TBA při použitých koncentracích 100, 200, 500 mg/kg použitého Polyphenonu je patrné, že významnou antioxidační aktivitu má právě koncentrace 500 mg/kg. Průběh oxidace skladované paštiky 1 je rovněž znázorněn v grafu č. 1. Naměřené hodnoty TBA od nultého dne měření po den devátý vykazují vzestupnou tendenci. Šestnáctý den skladování se hodnoty TBA náhle snížily na $0,86 \pm 0,18$ mg/g u kontroly, $0,58 \pm 0,09$ mg/g u koncentrace 100 mg/kg, $1,08 \pm 0,18$ mg/g u koncentrace 200 mg/kg a $0,98 \pm 0,14$ mg/g u koncentrace 500 mg/kg. Důvod snížení TBA hodnoty, jak u paštik s koncentrací Polyphenonu, tak u kontroly, je pravděpodobně pokročení oxidace.

Tabulka 1 – Paštika č. 1 Obsahuje hodnoty TBA v mg/g, které byly získány na základě použitých koncentrací Polyphenonu 60 a době trvání.

Doba [t]	Koncentrace Polyphenon 60 [mg/kg]			
	0	100	200	500
0	8,00 ± 1,44	9,01 ± 3,45	8,19 ± 1,04	6,43 ± 0,10
1	8,72 ± 1,58	9,80 ± 2,38	10,19 ± 0,70	7,73 ± 0,34
2	10,52 ± 0,72	10,38 ± 0,47	10,82 ± 1,30	8,03 ± 0,81
6	13,60 ± 0,59	12,09 ± 0,57	14,10 ± 2,67	9,40 ± 0,73
9	14,47 ± 0,75	13,60 ± 1,85	14,51 ± 2,31	11,02 ± 2,05
16	0,86 ± 0,18	0,58 ± 0,09	1,08 ± 0,18	0,98 ± 0,14
22	1,19 ± 0,68	0,74 ± 0,11	0,68 ± 0,23	0,68 ± 0,21
26	0,46 ± 0,14	0,53 ± 0,08	0,49 ± 0,05	0,60 ± 0,12
37	0,41 ± 0,02	0,46 ± 0,03	0,48 ± 0,22	0,44 ± 0,11

Graf 3 – Paštika č. 1 Znáznorňuje hodnoty z tabulky 1.

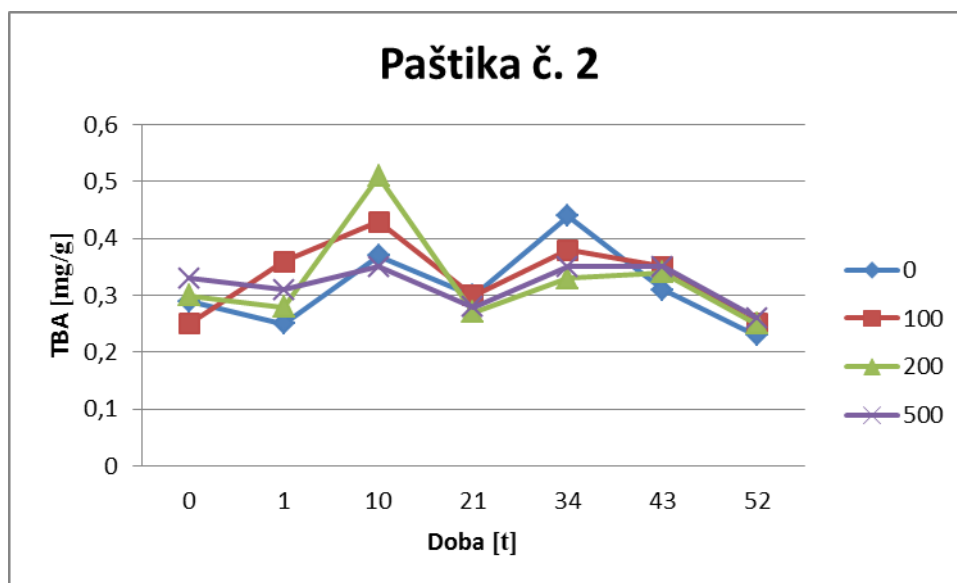


Výsledky u druhé paštiky nevykazují významnou antioxidační účinnost konkrétní koncentrace Polyphenonu. Tabulka 2 znázorňuje průběh oxidace během skladování u vyrobené druhé paštiky, graficky je pak průběh znázorněn v grafu 2.

Tabulka 2 – Paštika č. 2 Obsahuje hodnoty TBA v mg/g, které byly získány na základě použitých koncentrací Polyphenonu 60 a době trvání.

Doba [t]	Koncentrace Polyphenon 60 [mg/kg]			
	0	100	200	500
0	0,29 ± 0,05	0,25 ± 0,01	0,3 ± 0,03	0,33 ± 0,01
1	0,25 ± 0,03	0,36 ± 0,09	0,28 ± 0,01	0,31 ± 0,03
10	0,37 ± 0,03	0,43 ± 0,06	0,51 ± 0,02	0,35 ± 0,04
21	0,3 ± 0,05	0,3 ± 0,03	0,27 ± 0,07	0,28 ± 0,15
34	0,44 ± 0,09	0,38 ± 0,09	0,33 ± 0,03	0,35 ± 0,05
43	0,31 ± 0,03	0,35 ± 0,03	0,34 ± 0,02	0,35 ± 0,03
52	0,23 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,26 ± 0,02

Graf 4 – Zobrazuje průběh koncentrace TBA v závislosti na čase hodnoty z tabulky č. 2.



6 Diskuse

Testovaný extrakt ze zeleného čaje Polyphenon 60, který obsahuje 60% katechinů, byl nejdříve podroben *in vitro* testu DPPH. Pomocí toho testu byla potvrzena antioxidační aktivita testovaného extraktu při IC_{50} (inhibiční koncentrace) $25,3 \pm 3,4 \mu\text{l/ml}$. Tato zjištěná koncentrace, se velmi přibližovala použitému torloxu s ověřenou antioxidační aktivitou, která byla $22,7 \pm 1,2 \mu\text{l/ml}$. DPPH test také aplikovali Jo et al., (2002), přičemž zjistili 62,0% antioxidační účinnost ozářeného lyofilizovaného extraktu ze zeleného čaje.

Na základě potvrzení antioxidační aktivity byl extrakt Polyphenon 60 aplikován do paštiky v koncentracích 100, 200 a 500 mg/kg. Spolu s připravenými koncentracemi byl připraven vzorek bez testovaného extraktu, kdy se jednalo o tzv. kontrolu. Paštiky byly skladovány v chladicím zařízení při teplotě 3-7 °C v temnu po dobu 37 dnů.

Ze zjištěných výsledků měření oxidace paštiky 1, byl pozorován významný antioxidační efekt u koncentrace 500 mg/kg. U Paštiky 1, jak je patrné z grafu, nebyl zjištěn mezi koncentracemi 100, 200 mg/kg a kontrolou žádný statisticky významný rozdíl, kdy $p > 0,05$. Naopak koncentrace 500 mg/kg vykazuje výraznější antioxidační aktivitu. Rovněž byl zaznamenán statisticky významný rozdíl této nejvyšší testované koncentrace vůči ostatním koncentracím a kontrole, kdy $p < 0,05$.

Antioxidační aktivitu extraktu ze zeleného čaje rovněž potvrzuje Nissen et al. (2004). He a Shahidi (1997) uvádí účinnost extraktu ze zeleného čaje již v koncentraci 200 mg/kg u ryb. Stejnou účinnost extraktu ze zeleného čaje, kde jsou hlavní složkou katechiny uvádí Shahidi and Alexander (1998). Také Tang et al. (2001) uvádí, že čajové katechiny aplikované do mletého uvařeného masa účinně inhibovaly oxidaci lipidů.

Z grafu u paštiky jedna je rovněž zřetelný náhlý sestup hodnot šestnáctého dne měření. Tento jev mohl být způsoben již velmi pokročilou oxidací paštiky, ke které pravděpodobně došlo při dlouhém neprofesionálním procesu zpracování paštiky (od čištění a zpracování, přes tepelnou úpravu, homogenizaci, zpracování testovaných koncentrací polyphenonu 60 až po plnění do nádob. Dembele et al. (2011) uvádí, že náhlé snižování hodnot TBA po předchozím zvyšování je způsobeno nestabilitou karbonylů, které snadno reagují s dalšími sloučeninami a následně nemohou tvořit barevný komplex.

Ve zhotovené paštice 2 není z tabulky 2 ani z grafu 2 patrný žádný významný antioxidační efekt. Stejně tak nebyl prokázán žádný statisticky významný rozdíl u žádné ze zvolených koncentrací. Ve všech případech statistického porovnání byla hodnota $p > 0,05$. Z těchto zjištěných faktů lze tedy předpokládat, že důvod neprokázání antioxidační aktivity u

žádné z testovaných koncentrací v případě paštiky 2 má jiné důvody než neschopnost látky zpomalovat oxidační procesy. Může zde být hned několik důvodů. Jedním důvodem je možnost použití vepřového sádla, které mohlo být již v pokročilém stádiu oxidace. Zakoupené sádlo mohlo být skladováno za nevhodných podmínek již v obchodě, které podpořily oxidační procesy. Nebo mohlo dojít díky pomalému zpracování paštiky k oxidaci již v průběhu její výroby.

Tabulka 3 – Přehled vybraných výzkumů provádějící testy extraktů ze zeleného čaje na mase

Autor	Tang et al., (2001a)	Tang et al., (2001b)	Lui et al., (2010)	Jo et al., (2002)
Testovaná látka	Čajové katechiny + 1% NaCl	Čajové katechiny	Čajové katechiny + karnosin + α - tokoferol	Ozářený lyofilizovaný extrakt ze zeleného čaje
Testy <i>in vivo</i>	/	/	/	DPPH
Materiál	Hovězí a kuřecí maso	Hovězí, kachní, kuřecí, vepřové maso a maso tresky, makrely	Hovězí maso	Hovězí maso
Testy v potravině	TBARS	TBARS	TBARS	TBARS
Použitá koncentrace testované látky	300 mg/kg	300 mg/kg	0,03 mg/g	0,1%
Způsoby skladování	4°C; světlo (616 lux); 10 dní	4°C; 10dní	2°C; temno; 7dní	4°C; 15dní

Inhibiční účinek čajových katechinů na oxidační procesy v mase byl již dříve demonstrován v několika studiích (Tabulka3). Tang et al. (2001b) uvedl, že vysoký obsah polynenasycených mastných kyselin v mase, potažmo masném produktu, zvyšuje rovněž oxidační nestabilitu. Ve výše uvedené tabulce jsou zpřehledněny některé studie, které se rovněž zabývali zlepšením oxidační stability masa. Autoři Tang et al. (2001a); Tang et al. (2001b) uvádí zlepšení oxidační stability 50 g uvařených hovězích a kuřecích karbanátků připravených z namletého masa. Spolu s katechiny bylo do vzorků dále přidáno 1 % NaCl.

Přídavek chloridu sodného ovšem prokázal zhoršení oxidační stability. Vzorky byly skladovány při nižší teplotě než vzorky paštiky. Další parametr, kterým se liší podmínky skladování je osvětlení vzorků a následně dobou skladování.

Tang et al. (2001a) uvádí, pozitivní vliv 300 mg/kg katechinů na oxidaci lipidů u karbanátků o 30g připravené z hovězího, kachního, kuřecího, vepřového, masa a z masa ryb tresky a makrely. Vzorky byly skladovány při 4°C a balené do fólie propustné pro kyslík.

Lui et al. (2010) uvádí pozitivní efekt čajových katechinů spolu s karnosinem a α -tokoferolem v syrových placičkách z namletého hovězího masa 180g při koncentraci 0,03 mg/g. Skladování proběhlo při 2°C, za temna.

Byl zjištěn také pozitivní efekt ozářeného lyofilizovaného extraktu ze zeleného čaje 0,1% na syrovém a vařeném hovězím mase skladovaném ve 4 °C a zabalené do folie propustné pro kyslík (Jo et al., 2002).

Porovnávání výsledků této práce s ostatními výzkumy může být poněkud zavádějící, jelikož jsou patrné rozdíly ve zpracování a způsobu skladování.

Je tedy nutné zmínit, že rozdíly mezi testovanou paštikou v této práci a zde uvedenými studii jsou zejména v době skladování, teplotě, přístupu či nepřístupu světla a kyslíku, složení masa.

Vliv na oxidaci má také obsah tuku. Tang et al. (2001a) uvádí, že při přípravě byla odstraněna kůže a viditelný tuk z masa. K přípravě paštiky v této práci byla použita játra, která obsahují tuku naprosté minimum. Suková (2007) uvádí, že obsah tuku v játrech činí 3,3% tuku. Jeho množství se ovšem navýšilo přidáním vepřového sádla. Na 1kg jater bylo použito 0,5kg vepřového sádla. Vzhledem k této skutečnosti je jasné, že paštika bude mít mnohem horší oxidační stabilitu nežli připravené vzorky z namletého masa s minimem tuku.

Další vliv na výsledky mohlo mít provedení měření hodnoty TBA, kdy mohlo docházet k oxidaci odebraných paštik již v průběhu měření. Řešením by se mohlo stát přidání některého antioxidantu se známou antioxidační aktivitou do odebraného vzorku paštiky. Tím by se zamezilo možné oxidaci v průběhu měření, která může ovlivnit výsledky.

Ačkoliv antioxidační aktivita Polyphenonu 60 ve vzorcích paštiky se podařila potvrdit jen částečně, z výsledků in vitro testů, stejně tak jako z výsledků výše jmenovaných studií (Tabulka 3) je patrný značný antioxidační potenciál čajových katechinů v syrovém i tepelně zpracovaném mase. Nesrovnalosti ve výsledcích dvou testů upozorňují na pravděpodobné nedostatky ve zvolené metodice. Pro případné další pokusy bude nutné zdokonalit zejména proces výroby paštiky, způsob zpracování testovaných látek, techniku balení a systém odebírání vzorků.

7 Závěr

Na základě výsledků metody DPPH byla prokázána antioxidační aktivita u testovaného extraktu ze zeleného čaje se 60% obsahem katechinů. Zjištěnému rozdílu v prokázání antioxidační aktivity u paštiky 1 v nejvyšší testované koncentraci 500 mg/kg a žádnému účinku u paštiky 2 mohlo dojít vlivem nevhodného zpracování.

Výsledek testování antioxidační aktivity na připravené paštice v laboratorních podmínkách může být zavádějící. V každém případě je nutné brát v potaz neprofesionální přípravu paštiky, která v potravinářském průmyslu probíhá mnohem efektivněji. Suroviny jsou nakupovány od dodavatelů o známé kvalitě, která je předem ověřena v laboratoři. Stroje, pomocí kterých jsou suroviny zpracovávány, pracují rychleji a je dosaženo lepší kvality výsledného produktu.

Přesto získané výsledky této práce naznačují slibný antioxidační potenciál čajových katechinů pro použití v paštikách. Ten nebyl plně prokázán pravděpodobně kvůli některým nedostatkům v metodice, kterou je potřeba před dalšími experimenty patřičně upravit.

8 Použitá literatura

- Ahn, J., Grün, I. U., Mustapha, A. 2007. Effects of plant extracts on microbial growth, color change and lipid oxidation in cooked beef. *Food microbiology*. 24. 7-14.
- Ananingsih, V. K., Sharma, A., Zhou, W. 2013. Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection. *Food resechar international*. 50. 469-479.
- Bekhit, A. E. D., Geesink, G. H., Ilian, M. A., Morton, J. D., Bickerstaffe, R. The effects of natural antioxidants on oxidative processes and metmyoglobin reducing activity in beef patties 2003. *Food chemistry*. 81. 175-187.
- Boros, B., Jakabová, S., Dörnyei, Á., Horváth, G., Pluhár, Z., Kilar, F., Felinger, A. 2010. Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography-mass spektrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*. 1217. 7972-7980.
- Branen, L. A., Davidson, M. P., Salminen, S., Thorngate III, H. J. 2002. *Food additives*. Marcel Dekker. New York. p. 938. ISBN: 0-8247-9343-9.
- Carpenter. R., O'Grady M. N., O'Callaghan, Y. C., O'Brien, N. M., Kerry, J.P. 2007. Evaluation of the antioxidant potential of grape seed and bearberry extracts in raw and cooked pork. *Meat science*. 76. 604-610.
- Decker, A. E., Elias, J. R., McClements , J. D. 2010. *Oxidation in food and beverages and antioxidant applications Volume 2: Management in different industry sectors*. Woodhead Publishing. Oxford. p. 528. ISBN: 978-1-84569-983-3.
- Decker, A. E., Elias, J. R., McClements , J. D. 2010. *Oxidation in food and beverages and antioxidant applications Volume 1: Understanding mechanisms of oxidation and antioxidant activity*. Woodhead Publishing. Oxford. p. 408. ISBN: 978-1-84569-648-1.
- Duke, J.A., 2006. *Zelená lékárna*. Parsons/Walton/Press. Praha. 576s. ISBN: 80-86880-23-0.

- Dembele, S., Wang, D. F., Sun, J. P., Dong, S. Y. 2011. Comparasion study of the effects of different crude green tea polyphenols on the quality of dried catfish during ambient storage. *Journal of food proces engineering*. 34. 566-579.
- He, Y., Shahidi, F. 1997. Antioxidant aktivty of green tea and its catechins in a fish meat model system. *Journal of agricultural and food chemistry*. 45. 4626-4266.
- Hudson, F. J. B. 1990. *Food antioxidants*. Elsevier applied science. London. p. 317. ISBN: 1-85166-440-8.
- Ingr, I. 2005. *Základy konzervace potravin*. Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. Brno. 119 s. ISBN: 80-7157-849-5.
- Kalousová, M., Fialová, L., Kraml, J., Křepela, E., Mrázová, K., Pačes, J., Pláteník, J., Šebesta, I., Štěpán, J., Štípek, S., Vejražka, M., Zeman, M., Zima, T., Žák, A. 2006. *Patobiochemi ve schématech*. Grada Publishing, a.s., Praha. 264 s. ISBN: 80-247-1522-8.
- Kalvach, Z., Zadák, Z., Jiráek, R., Zavázalová a kolektiv, 2004. *Geriatie a gerontologie*. Grada. Publishing a.s. 864 s. ISBN: 8024770385.
- Kim, Y. J., Kim, Mi-Ja, Yi, B., Jo, S., Lee, J. 2015. Antioxidant properties of ascorbic acid in bulk oils at different relative humidity. *Food chemistry*. 176. 302-307.
- Kučera, J., Jirásek, T., Huml, O., Mužík, P. 2009. *Veterinary clinics – of north America*. Praxe malých zvířat. Pierot, spol. s r. o. Havlíčkův Brod. 220 s. ISBN: 978-80-7353-135-5. mám v zadání
- Kundříková, P., Pavelková, K.. *Přídavné látky (Aitiva)*. Státní zemědělská a potravinářská inspekce. [online]. 11.12.2014 [cit. 2015-03-07]. Dostupné z <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1005724&docType=ART>
- Matoušková, M., Ruttkay-Nedecký, B., Kizek, R. 2014 *Antioxidační enzymy – biochemické markery oxidačního stresu*. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*. 3. 53-56 s.
- Mielnik, M. B., Olsen, E., Vogt, G., Adeline, D., Skrede, G. 2006. Grape seed extract as antioxidant in cooked, cold stored turkey meat. *LWT*. 39. 191-198.

Min, D. B., Smouse, T. H. 1985. Flavor chemistry of fats and oils. The American oil chemists society. St. Louis. p. 309. ISBN: 0-935315-12-8.

Ministerstvo zemědělství a Ústav zemědělské ekonomiky a informací. A-Z Slovník pro spotřebitele Žluknutí. [online]. Informační centrum bezpečnosti potravin. 2012 [cit. 2012-3-29]. Dostupné z <<http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76817.aspx>>

Nissen, L. R., Bryne, D. V., Bertelsen, G., Skibsted, L. H. 2004. The antioxidative activity of plant extracts in cooked pork patties. Meat science. 68. 485-495.

Odstrčil J., Odstrčilová, M. 2006. Chemie potravin. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů. Brno. 164 s. ISBN: 80-7013-435-6.

Paulová, H., Bochořáková, H., Táborská, E. 2004. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. Chemické listy. 98. 174-179.

Pláteník, J. Volné radikály, antioxidanty a stárnutí. Interní medicína pro praxi [online]. listopad 2009 [cit. 2015-1-3]. Dostupné z <<http://www.solen.cz/pdfs/int/2009/01/06.pdf>>

Pokorný, J. Schmidt, Š. Trendy použití přírodních antioxidantů pro stabilizaci tuků a olejů proti oxidačnímu žluknutí. Vitaminy 2003 - Přírodní antioxidanty a volné radikály. Pardubice. 2003. Dostupné z <http://www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/1/L_31.doc>

Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. 2001. Antioxidants in food. Woodhead publishing limited. Cambridge England. p. 380. ISBN: 1-85573-463-X.

Prakash, B., Singh, P., Kedia, A., Dubey, N. K. 2012. Assessment of essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and *in vivo* efficacy in food system. Food Research International. 49 (1). 201-208.

Rosen, D. Rádce milovníka zeleného čaje. Praha: Pragma, 2000. 139 s. ISBN 80-7205-755-3.

Roubíčková, I., Chrpová, D., Sabalová, M., Ilko, V., Kouřimská, L., Pánek, J. 2012. Použití některých aromatických bylin ke stabilizaci smažících olejů. In: Neugebauerová, J., Kaffková, K. (eds.) Sborník příspěvků – 18. Odborný seminář s mezinárodní účastí Aktuální otázky pěstování léčivých, aromatických a kořeninových rostlin. PELERO CZ o. s.. Lednice. 89-94. ISBN: 978-80-7375-670-3.

Sabalová, M., Roubíčková, I., Ilko, V., Chrpová, D., Kouřimská, L., Pánek, J. 2012. Antioxidační potenciál meduňky lékařské. In: Neugebauerová, J., Kaffková, K. (eds.) Sborník příspěvků – 18. Odborný seminář s mezinárodní účastí Aktuální otázky pěstování léčivých, aromatických a kořeninových rostlin. PELERO CZ o. s.. Lednice. 11-17. ISBN: 978-80-7375-670-3.

Senanayake, N.J.P.S., 2013. Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications. *Journal of functional food*. 5. 1529-1541.

Seto, Y., Lin, Chih-Cheng, Endo, Y., Fujimoto, K. 2005. Retardation of lipid oxidation in blue sprat by hot water tea extracts. *Journal of the science of food and agriculture*. 85. 1119-1124.

Shah, M. A., Bosco, S. J. D., Mir, S. A. 2014. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Science*. 98. 21-33.

Shahidi, F., Alexander, D. M. 1998. Green tea catechins as inhibitors of oxidation of meat lipids. *Jurnal of food lipids*. 5. 125-133.

Shahidi, F., Wanasundara, U. 1995. Effect of antioxidants on the stability of canolia oil. *Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence*. 469-479.

Státní zdravotní ústav. 2012. Seznam povolených potravinářských přídatných látek. Dostupné z <http://www.szu.cz/uploads/documents/czzp/vyziva/legislativa/E_kody.pdf>

Suková, I. Vnitřnosti ve výživě. 2006. ÚZEL, Agronavigator.cz. 11. 18-23.

Tang, S., Kerry, P. J., Sheehan, D., Buckley, J. D. 2001a. A comparative study of tea catechins and α -tocopherol as antioxidants in cooked beef and chicken meat. *European food research technology*. 213. 286-289.

Tang, S., Sheehan, D., Buckley, J. D., Morrissey, A. P., Kerry, P. J. 2001b. Anti-oxidant activity of added tea catechins on lipid oxidation of raw minced red meat, poultry and fish muscle. *International Jurnal of food science and technology*. 36. 685-692.

Tang, S., Kerry, P. J., Sheehan, D., Buckley, J. D., Morrissey, A. P. 2001c. Antioxidative effect of added tea catechins on susceptibility of cooked red meat, poultry and fish patties to lipid oxidation. *Food research international*. 34. 651-657.

Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Saraiva, J. A., Nunes, M. L. 2013. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial crops and products*. 43. 587-595.

Velíšek, J. 2002. *Chemie potravin 1*. OSSIS. Havlíčkův Brod. 331 s. ISBN: 80-86659-00-3.

Volf, K. 2008. *Flavonoidy a jejich biologické působení*. 174 s.

Yilmaz, Y. 2006. Novel uses of catechins in foods. *Trends in food science & technology*. 17. 64-71.