

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



Degradace chlorofylu v potravinách

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Nikola Lesková

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

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Degradace chlorofylu v potravinách" 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 neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala panu Ing. Matyášovi Orsákovi, Ph.D. za podnětné připomínky a dohled nad zpracováním mé diplomové práce. Poděkování patří také všem členům Katedry chemie za jejich ochotu a cenné rady a panu Ing. Miroslavu Jursíkovi, Ph.D. za poskytnutí prostoru Demonstračního a pokusného pozemku ČZU k zajištění materiálu pro praktickou část této práce.

Degradace chlorofylu v potravinách

Souhrn

Tato práce „Degradace chlorofylu v potravinách“ se v první části zabývá obecnou charakteristikou zeleného barviva a jeho syntetickými a degradačními pochody. Následně je stabilita chlorofylové struktury sledována v laboratorních podmínkách *in vitro*.

Rostlinným materiálem pro izolaci chlorofylu byl Špenát setý (*Spinacia oleracea*). Bylo sledováno, do jaké míry ovlivní degradaci chlorofylu mechanická námaha při mixování špenátu a přidavek uhličitanu hořečnatého během této procedury. Sledován byl také vliv nízkých a vysokých teplot při zpracování špenátu a delší doba odležení jednotlivých vzorků. Špenát byl nejprve rozmixován s přídavkem MgCO_3 , z něhož byla odvážena a provedena sušina a zhotoveny vzorky o dvou gramech ve čtyřech opakování. Následně byl chlorofyl extrahován acetonem. Jednotlivé extrakty byly filtrovány a doplněny acetonem na objem 100 ml. U takto připravených vzorků bylo provedeno spektrofotometrické měření absorbance ve viditelné oblasti při vlnových délkách 644 a 663 nm. Výsledné hodnoty byly zprůměrovány a přepočítány na koncentraci chlorofylu A a B (mg/g) v sušině rostlinného materiálu. Obdobně byly zhotoveny vzorky mixovaného špenátu bez přídavku MgCO_3 a vzorky v časovém odstupu 30 a 120 minut od tohoto mixování. Zároveň byla tato část rozmixovaného špenátu zamrazena při teplotě $-18\text{ }^\circ\text{C}$ a uchována k dlouhodobějšímu sledování. V další etapě experimentu byl špenát před mixováním blanširován při teplotě $100\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 1 minuty a mixován s MgCO_3 . Další část blanširovaných vzorků byla mixována bez MgCO_3 a sledována ve stejném časovém odstupu, jako předešlé vzorky. I tyto vzorky byly zmrazeny a uchovány. Analýza blanširovaných vzorků byla totožná, jako u vzorků předešlých. V poslední řadě byly měřeny vzorky rozmražené blanširované a neblanširované po 18. týdnu, 21. týdnu, 35. týdnu a po 40. týdnu od data zmražení. Výsledkem analýzy a porovnáním jednotlivých vzorků mezi sebou bylo prokázáno, že vyšší stabilita chlorofylu je u vzorků mixovaných za přídavku MgCO_3 , zpracovaných ihned po mixování a blanširovaných před zmražením.

Klíčová slova: Chlorofyl, degradace, potraviny

Chlorophyll degradation in foods

Summary

The presented thesis consists of two major parts, the first one focuses on the general characteristics of the green dye and its synthetic and degradation processes. The stability of chlorophyll structure is then studied *in vitro*, which is presented in the second part of the dissertation.

The chlorophyll has been continuously isolated from spinach (*Spinacia oleracea*) with simultaneous studying of the degradation depending on the mechanical stress during the spinach mixing and also depending on the addition of magnesium carbonate during the procedure. The influence of lower and higher temperatures has been studied as well during the processing of spinach and finally the influence of time maturing the samples. First of all, spinach was mixed with the addition of MgCO_3 and converted to the dry matter. The samples containing two grams of dry matter were prepared in four repetitions. Chlorophyll was then extracted with acetone. The extract was filtrated and the acetone was added up to 100 ml. The absorbance spectra was then recorded at 644 and 663 nm using the UV/Vis spectrophotometry. The resulting values were averaged and the concentration (in mg/g) of chlorophyll A and B in the dry matter was calculated using the Lambert-Beer law. The same procedure has been used with the samples of mixed spinach prepared without the addition of MgCO_3 and samples prepared with the time gap (30 and 120 mins) between the mixing phase and the extraction with acetone. At the same time, the part of the mixed spinach was also freezed at $-18\text{ }^\circ\text{C}$ and preserved for the longterm monitoring. The spinach was also blanched for 1 minute at $100\text{ }^\circ\text{C}$ before the mixing in the next phase of the experiment. It was again mixed with and without addition of MgCO_3 and also the samples were prepared with the time gaps between the mixing and the extraction. Also these samples were freezed and preserved for the longterm monitoring. The analysis of the blanched samples was exactly the same as the analysis described before. Finally, the freezed blanched and not blanched samples were defrosted and analyzed in the 18th, 21st, 35th and 40th week after the date of freezing.

The results proved the higher stability of chlorophyll in the samples mixed with the addition of MgCO_3 processed immediately after mixing and blanched before the freezing.

Keywords: Chlorophyll, degradation, foods

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíl práce	2
	Hypotézy.....	2
3	Literární přehled.....	3
3.1	Pigmenty v rostlinách.....	3
3.2	Zelené barvivo.....	3
3.3	Struktura chlorofylu	4
3.4	Syntéza chlorofylu	5
3.4.1	Tvorba protoporfyrinu IX	5
3.4.2	Vznik chlorofylidu A	7
3.5	Degradace chlorofylu	8
3.5.1	Počáteční fáze	9
3.5.2	Pozdní fáze.....	10
3.6	Produkty degradace chlorofylu	10
3.6.1	Chlorofylidy.....	10
3.6.2	Feofytiny	11
3.6.3	Feofobitiny.....	11
3.6.4	Feoforbidy.....	11
3.6.5	Hydroxychlorofyly.....	12
3.6.6	Kovové komplexy.....	12
3.6.7	Fytol	12
3.7	Vliv kulinářských úprav na stabilitu chlorofylu v potravinách.....	13
3.7.1	Mražení	14
3.7.2	Tepelné zpracování	15
3.7.3	Blanšírování	16

3.7.4	Vysokotlaké zpracování.....	17
3.8	Využití chlorofylu	18
3.8.1	Zdravotní benefity.....	18
3.8.2	Potravinářství	19
3.8.3	Potravinové doplňky	20
4	Metodika	21
4.1	Rostlinný materiál	21
4.2	Použité chemikálie	21
4.3	Laboratorní pomůcky	21
4.4	Vlastní analýza	22
4.4.1	Mixování špenátu.....	22
4.4.2	Blanšírování špenátu.....	26
4.4.3	Rozmražení špenátu	28
5	Výsledky	29
6	Diskuse.....	35
7	Závěr	38
8	Seznam použité literatury.....	39
9	Seznam zkratek	44

1 Úvod

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

Tento zelený pigment se jeví jako látka nezbytná pro všechny organismy na světě. Rostliny obsahující toto barvivo by měly být základem každého zdravého jídelníčku. Mezi běžné zdroje patří zelená listová zelenina, byliny a v nejkvalitnější formě ho můžeme najít v některých sladkovodních a mořských řasách, jako je například *Chlorella sp.* a *Spirulina sp.* 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 nevytváří chlorofyl, pokud nejsou vystaveny viditelnému záření.

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. Průmyslová výroba potravinářských barviv se, vzhledem k jejich velké spotřebě, stala v posledních desetiletích velmi zásadní. Spotřebitelé preferují před syntetickými barvivy barviva přírodní, které jsou však méně stabilní a poměrně snadno degradují. Je tak za potřebí aplikace většího množství přírodních barviv a tím se jejich využití stává finančně nevýhodné. Podstatný je proto mechanismus, kterým se přírodní barviva stabilizují a usnadní tak jejich efektivní rozvoj. Při přípravě chlorofylového potravinářského barviva dochází například k výměně hořečnatých iontů. Měďnaté komplexy chlorofylů nejsou zdaleka tak citlivé na světlo jako chlorofyly a mají intenzivnější barvu, proto jsou vhodné, jako potravinářská aditiva.

Chlorofylové pigmenty jsou náchylné k mnoha degradačním reakcím, ať už jsou to chemické či enzymatické. Současná akce enzymů, slabých kyselin, kyslíku, světla a tepla, může vést ke vzniku velkého množství rozkladných produktů. Chlorofyly a jeho deriváty mají pestré využití převážně ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu.

2 Cíl práce

Cílem této práce je zpracovat literární přehled z vědeckých článků dané problematiky a sledovat stabilitu zeleného barviva při tepelné a mechanické úpravě Špenátu setého (*Spinacia oleracea*).

- Připravit vzorky špenátu a tepelně a mechanicky je upravit
- Stanovit vliv zpracování špenátu na stabilitu chlorofylu
- Porovnat změny obsahu chlorofylu u různě zpracovaných vzorků v časovém odstupu

Hypotézy

- Tepelné zpracování má vliv na stabilitu chlorofylu u špenátu
- Vlivem skladování zmraženého špenátu se mění množství chlorofylu
- Tepelně ošetřený špenát po zamražení a skladováním snižuje obsah chlorofylu

3 Literární přehled

3.1 Pigmenty v rostlinách

Potravinářský průmysl a průmyslová výroba barviv se staly v posledních desetiletích velmi zásadní. Tuny umělých a přírodních barviv se používají každý den, většinou ke zvýšení nebo změně přirozené barvy výrobků. Požadavky zákazníků jsou vysoké, protože potraviny by měly mít příjemné barvy a měly by obsahovat přírodní ingredience. Také existuje silnější preference biologické produkce pigmentů (např. karotenoidy), oproti pigmentům syntetizovaným. Dalším důležitým bodem pigmentů je jejich biologická, většinou antioxidační, aktivita (Agócs a Deli, 2011). Vzhledem k problémům syntetických pigmentů, které v lidském těle způsobují toxicitu a karcinogenitu, jejich použití postupně klesá. Z tohoto důvodu nastal zájem o přírodní pigmenty, jako vhodná náhrada za syntetické, které byly příčinou mnoha vedlejších účinků (Wang a Mazza, 2002). Z hlediska lidského zdraví a bezpečnosti jsou přidávány přírodní látky k přírodnímu barvení, zdravým funkčním potravinám a kosmetickým výrobkům (Bener et al., 2010).

V současné době jsou pigmenty různých druhů a forem používány jako aditiva či doplňky v potravinářském průmyslu, kosmetice, farmacii a v krmivech pro hospodářská zvířata (Lazze et al., 2004).

Pigmenty rostlin zahrnují celou řadu různých druhů složek, včetně antokyanů, karotenoidů, betalainů a chlorofylů (Gandía-Herrero et al., 2010). Rostlinné pigmenty mohou být převážně klasifikovány, jako pigmenty rozpustné v tucích, které se nacházejí v plastidech rostlinné protoplasty (protoplastech) a dále pak ve vodě rozpustné, které jsou rozpuštěné v buněčné míze (Humphrey, 2004). Pigmenty rozpustné v tucích jsou chlorofyly a karotenoidy a ve vodě rozpustné pigmenty zahrnují antoxantiny (běžné flavonoidy) a antokyany (Burdulis et al., 2008).

3.2 Zelené barvivo

Chlorofyl se nachází u vyšších rostlin, řas a některých bakterií. V rostlinné buňce vytváří komplexy s bílkoviny a nachází se ve fotosyntetizujících organelách - chloroplastech. Hraje zde zásadní roli při fotosyntéze, kde umožňuje syntézu sacharidů z oxidu uhličitého a vody absorpcí energie světelného záření (Von Wettstein et al., 1995).

Je známo pět tříd chlorofylů v rostlinách a fotosyntetických organismech - A, B, C, D, E. Chlorofyly A a B 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. 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 sp.* Poprvé popsán u druhu *Girgatinia gardii* (Wrolstad et al., 2004).

Chlorofyl je obvykle extrahován z různých druhů rostlin, jako je například špenát, vojtěška, kopřiva nebo tráva, za použití organických rozpouštědel (acetonu a hexanu). Výhodou je extrakce v tlumeném světle za účelem minimalizovat degradaci pigmentu. Vystavení světlu, vzduchu, tepla a extrémnímu pH může nepříznivě ovlivňovat jeho stabilitu (Simpson, 2012).

3.3 Struktura chlorofylu

Po chemické stránce se jedná o makrocyclické tetrapyrroly vázané methinovými můstky. Tato struktura je známa, jako porfyrin (Dailey, 1990). Chlorofylový porfyrin je navíc rozšířen o pátý isocyclický kruh E spojující pozici 6 a γ (Gross, 1991). Čtyři kruhy jsou koordinovány hořčnatými ionty (Mg^{2+}). Pátý isocyclický kruh se nachází v blízkosti třetího pyrrolového kruhu. Na čtvrtém kruhu je substituentem propionová kyselina, která je esterifikována hydrofobním diterpenickým alkoholem fytolem (Lichtenthaler et al., 1981).

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

Naprosto přesné určení chlorofylové struktury trvalo několik desítek let a bylo z velké části prosazeno důležitou prací Willstättera na počátku roku 1900, kdy izoloval pigment a dokázal, že jeho molekulární složení je $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$. Obecná struktura chlorofylu A byla navržena Hansem Fischerem v 1940, kdy došlo ke zjištění, že "extra" vodíkové atomy makrocycliku chlorinu jsou umístěny na sousedních atomech uhlíku C_{17} a C_{18} . Dále pak, že makrocycklus zachovává svou nepřetržitou konjugaci (prostřednictvím svých absorpčních vlastností) a také, že je sloučenina opticky aktivní. Chlorofyl A nese až šest asymetrických

center (v závislosti na navázání centrálního hořčíku). Ficken et al., stanovili relativní konfiguraci kruhu D, methylové a propionové esterové skupiny C₁₇ a C₁₈. Woodward znovu potvrdil správnost této struktury v roce 1960 prostřednictvím celkové syntézy, i když dokončení relativní konfigurace bočních řetězců trvala téměř deset let. Relativní konfigurace na C₁₃₂ byla stanovena Inhoffenem, přičemž je postranní skupina methylester trans na fytyl postranního řetězce C₁₇. Stereochemie a absolutní konfigurace řetězce fytylu byla objasněna Burrellem jako P7'R, P11'R. Dokončení přesné struktury chlorofylu je výsledkem práce Fleminga, čímž byla stanovena absolutní konfigurace na C₁₇ a C₁₈ (S, S). Celkové uspořádání chlorofylu je 17S, 18S, 132R, P7'R, P11'R (Senge et al., 2014).

3.4 Syntéza chlorofylu

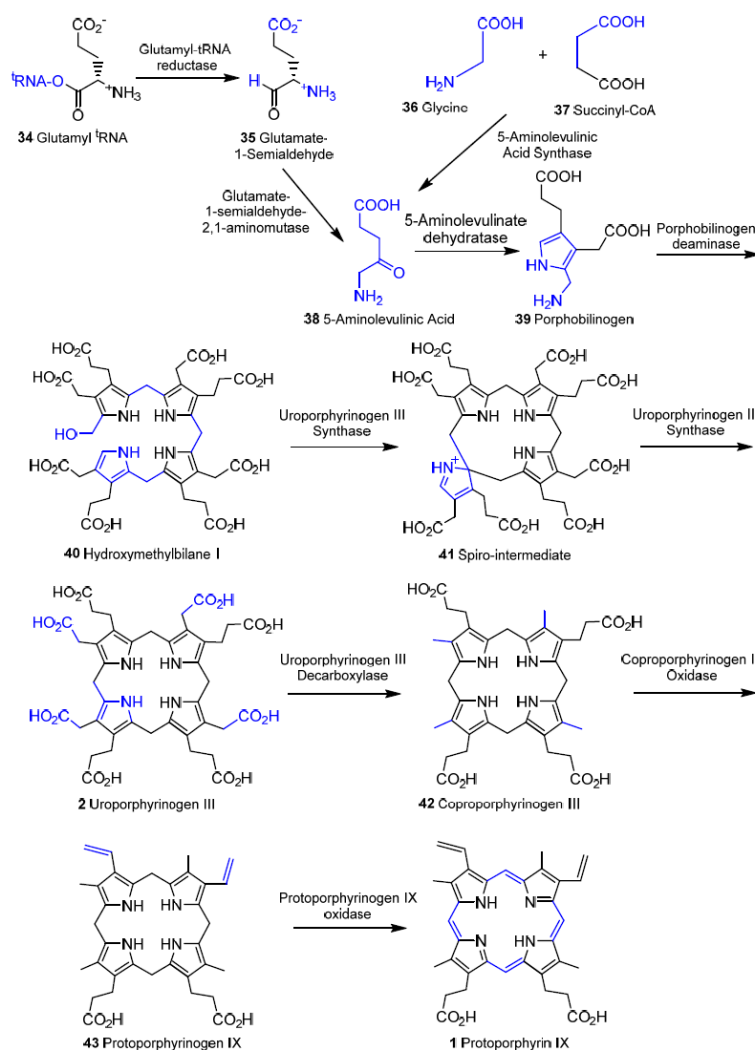
Syntéza chlorofylu je velmi složitý proces, na kterém se podílí mnoho enzymů. Vzhledem k významnosti tetrapyrrolů v metabolismu je zřejmé, že porucha této dráhy může vést k velmi závažným poruchám (Von Wettstein et al., 1995). Pro snadnější pochopení probíhajících biochemických změn, které nastávají při tvorbě chlorofylu, je vhodné vzít v úvahu různá stadia tohoto procesu. Za prvé je to tvorba kyseliny δ -aminolevulové (ALA). V druhé řadě jde o vznik monopyrrolu (porfobilinogenu). Za třetí dochází k vytvoření uroporfyrinogenu (první makrocyclický tetrapyrrol). Čtvrtým stádiem bude tvorba protoporfyrinogenu. V pátém stádiu vzniká protoporfyrin IX dehydrogenací makrocyccklu. V šesté fázi nastává chelace Mg²⁺ a předání hořčíku protoporfyrinu IX. Za sedmé se vytváří isocyclické kruh a protochlorofylid A. V osmé fázi dochází k redukcí protochlorofylidu na chlorofylid. Za deváté vytvoření chlorofylu A a desátým bodem je biosyntéza chlorofylu B (MacDougall, 2002).

3.4.1 Tvorba protoporfyrinu IX

Počátečním meziproduktem biosyntetické dráhy chlorofylu je δ -aminolevulinová kyselina (ALA). ALA může vznikat dvěma různými způsoby. První možnost je charakteristická pro α -proteobakterie a zvířata. ALA vzniká kondenzací sukcinyl-CoA s glycinem pomocí enzymu ALA-synthasy. U rostlin vede k ALA druhá dráha, zvaná C₅ (Reinbothe a Reinbothe, 1996). Dalším krokem je kondenzace dvou molekul ALA, při němž se uvolní dvě molekuly vody, čímž vzniká porfobilinogen. Tento krok je katalyzován enzymem porfobilinogen synthasou (Von Wettstein et al., 1995). Tato fáze zahrnuje vytvoření Schiffovy báze s aminoskupinou enzymu. Stabilizovaný karbanion pak reaguje s druhou

molekulou ALA a po aldolové kondenzaci enzym usnadňuje odběr vody. Nukleofilní napadení aminoskupiny na uhlíku atomu Schiffovy báze ve druhé molekule ALA, má za následek transaminaci a formování pyrolu. To znamená, že mechanismus se podobá transaldolase (Yaronskaya a Grimm, 2006). Následně dojde ke kondenzaci čtyř molekul porfobilinogenu a vznikne lineární tetrapyrrol hydroxymethylbilan. Tato fáze je katalyzována za pomoci hydroxymethylbilan synthasy a dochází k deaminaci molekul porfobilinogenu. Na tento krok bezprostředně navazuje vznik uroporfyrinogenu III, katalyzovaný uroporfyrinogen III kosyntetasou. Dalším meziproduktem biosyntetické dráhy je koproporfyrinogen III, který vzniká dekarboxylací všech acetylových postranních řetězců za vzniku methylů. Tento úsek katalyzuje enzym uroporfyrinogen III dekarboxylasa. Následuje další úprava postranních řetězců. Propionylové zbytky koproporfyrinogenu III na jádrech A a B jsou dekarboxylovány za tvorby vinylů koproporfyrinogen III oxidativní dekarboxylasou. Touto dekarboxylací vzniká protoporfyrinogen IX (Von Wettstein et al., 1995). Protoporfyrinogen IX oxidasa, enzym katalyzující odejmutí šesti elektronů z protoporfyrinogenu IX za tvorby konjugovaného systému dvojných vazeb, je prvním enzymem biosyntézy tetrapyrrolů, který se nevyskytuje výhradně v chloroplastech. Reakcí, která potřebuje ke svému průběhu kyslík, vzniká protoporfyrin IX, první porfyrin biosyntetické dráhy (viz. Obrázek 1). Důvodem, proč syntéza probíhá přes porfobiliny a ne porfyriny, spočívá v tom, že porfobiliny, na rozdíl od porfyrinů, nezpůsobují při ozáření tak masivní vznik reaktivních meziproduktů kyslíku a způsobují tedy rostlinám menší fotooxidativní poškození, než by za stejné situace způsobily porfyriny (Reinbothe a Reinbothe, 1996).

Obrázek 1- Schéma biosyntézy protoporfyrinu IX převzato od Senge et al. (2014)

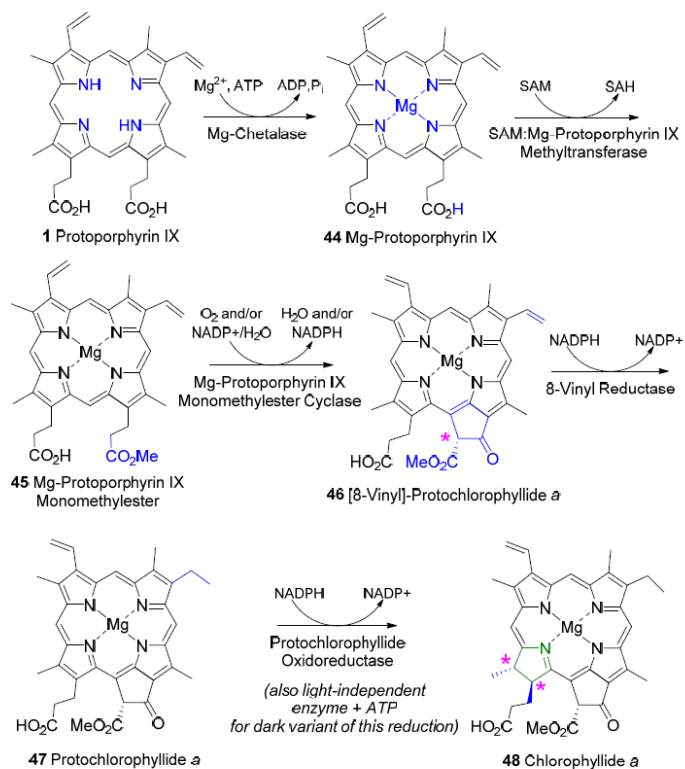


3.4.2 Vznik chlorofylidu A

Prvním zásadním krokem syntézy chlorofylu je chelatace protoporfyrinu IX hořčíkem. Tato reakce je katalyzovaná Mg chelatalasou. I když by se zdálo, že mezi chelatací protoporfyrinu IX hořčíkem a železem nemůže být příliš velký rozdíl, není tomu tak. Zatímco ferrochelataza je monomerní enzym katalyzující chelataci samovolně, a tedy bez ATP, Mg chelataza je složená ze tří podjednotek, které katalyzují chelataci jen za přítomnosti ATP (MacDougall, 2002). Další fází je vytvoření isocyklického kruhu, katalyzované enzymatickým komplexem S-adenosylmetionin Mg protoporfyrin IX-O-methyltransferasy a Mg protoporfyrin IX monomethylester oxidativní cyklasy. V první etapě 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 hydroxylovan 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 dvojné vazbě kruhu D za vzniku chlorofylidu (viz. Obrázek 2), 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 2 - Biosyntéza chlorofylidu A dle Senge et al. (2014)



3.5 Degradace chlorofylu

Degradace chlorofylu je projevem přechodu chloroplastů do gerontoplastů. Rozlišování termínů pro proces stárnutí je oprávněné, jelikož metabolismus gerontoplastů je, na rozdíl od všech ostatních plastidových forem, pouze katabolický. Žloutnutí zestárlých listů je důsledkem odhalení a částečného zachování karotenoidů, nikoliv nová biosyntéza žlutých

pigmentů. Rozvoj gerontoplastů přetrvává beze změny po celou dobu stárnutí listů. Ztrácejí objem a hustotu v důsledku rozsáhlých ztrát stromálních komponentů a thylakoidů a zvyšuje se počet a velikost lipofilní plastoglobulů (Matile et al., 1999). Existuje několik cest degradace chlorofylu prostřednictvím chemické a biochemické změny. Mezi chemické reakce patří odstranění hořčíku z porfyrinového kruhu pomocí kyselé substituce nebo tepla, příkladem je přeměna chlorofylu na feofytin. Dále se může jednat o dekarbomethoxylaci, kdy jde o přeměnu feofytinu na pyrofeofytin či feoforbidu na pyrofeoforbid. Enzymatické změny jsou zprostředkovány působením chlorofylas na chlorofyl, což vede ke vzniku chlorofylidů a feofytinů až ke konečným feoforbidům. Nicméně ztráta fytolu může nastat také z důvodu chemické změny a ztráta hořčíku může být rovněž katalyzována pomocí enzymu dechetalasy (Van Boekel, 1999). Obecně uznávaná dráha degradace chlorofylu se skládá ze dvou fází: před (zahájení činnosti) a po (pozdní fáze) štěpení tetrapyrrolového makrocyclického kruhu. Produkty počáteční fáze jsou nazelenalé, zatímco v pozdní fázi téměř bezbarvé (Vicentini et al., 1995).

3.5.1 Počáteční fáze

Počáteční fáze zahrnuje modifikaci postranního řetězce tetrapyrrolového makrocycly. Jedná se o hydrolýzu zbytku fytolu v kruhu IV (defytylace), uvolňování Mg^{2+} z tetrapyrrolového makrocycly vytěsněním $2H^+$ (dechelatase) a některé změny makrocycly, které jsou pravděpodobně specifické pro jednotlivé druhy rostlin (Vicentini et al., 1995).

3.5.1.1 Defytylace

Enzymem katalyzující defytylaci je chlorofylasa. Byl jeden z prvních rostlinných enzymů, který byl zkoumán. Existuje mnoho zpráv o činnosti chlorofylasy, vlastnosti tohoto enzymu a vliv vnitřních a vnějších faktorů na aktivitu, jako jsou fytohormony a teplotních stres. Reakce chlorofylasy je prvním krokem v degradaci chlorofylu, a proto je umístění chlorofylasy určujícím faktorem pro místo degradace chlorofylu. K dispozici je více než jeden prostor pro lokalizaci chlorofylasy, což znamená existenci více způsobů pro degradaci chlorofylu (Drazkiewicz, 1994).

3.5.1.2 Dechelatace hořčíku

Dechelatace hořčíku probíhá po defytylaci za vzniku feoforbidu. Zpočátku, *in vivo* a *in vitro* akumulace feopigmentů během degradace chlorofylu řas a vyšších rostlin udává přítomnost enzymu magnesium dechelatase (Owens a Falkowski, 1982).

3.5.2 Pozdní fáze

Pozdní fáze zahrnuje štěpení tetrapyrrolového makrocyklu oxygenasou a následné reakce, jako je redukce, čímž se získávají bezbarvé fluorescenční a nefluorescenční katabolity. Druhá fáze je nezbytná pro odbarvení molekuly chlorofylu, tudíž určuje degradaci chlorofylu při stárnutí listů nebo zrání ovoce. Ve většině případů se při stárnutí listů nebo zrání plodů rozkladné meziproducty do značné míry nehromadí, což naznačuje, že existuje řada degradačních reakcí (Vicentini et al., 1995).

3.6 Produkty degradace chlorofylu

Vzhledem k tomu, že deriváty chlorofylu pokrývají širokou škálu polaritů z lipofilních přírodních chlorofylů i ve vodě vysoce rozpustného chlorofylinu sodíku a mědi, mají variabilní citlivost na pH, individuální rozdíly v chování během zažívání a různé způsoby absorpce (Ferruzzi a Blakeslee, 2007). Jednotlivé produkty rozkladu chlorofylu jsou znázorněny na Obrázku 3.

3.6.1 Chlorofylidy

Fytyl esterová skupina chlorofylu může snadno hydrolyzovat a podpořit tak vznik chlorofylidu a fytolu. Hydrolýza může probíhat za mírně kyselých či zásaditých podmínek. Obecně jsou však chlorofylidy připravovány enzymaticky. Hydrolýza je katalyzována enzymem chlorofylasou, který se zdá být přítomný ve všech zelených rostlinných pletivech, převážně v listech a méně v kořenech a semenech. Činnost tohoto enzymu se mění podle druhu rostliny. Cukrová řepa (*Beta vulgaris*) je příkladem druhu rostlin, jejichž listy jsou obzvláště bohaté na chlorofylasu (Holden, 1961). Chlorofylasa se nachází ve vnitřní membráně glykoproteinu v thylakoidní membráně (Terpstra, 1981). Samotný enzym není běžně ovlivňován chlorofylovým substrátem, ačkoliv chlorofyl se nachází ve stejné membráně. V neporušeném rostlinném pletivu je chlorofylasa udržována v neaktivní a stabilní formě a přilehlá k lipidům thylakoidní membrány (Lambers a Terpstra, 1985). Musí dojít

k narušení thylakoidní membrány, aby bylo možné chlorofylasu aktivovat. Pokud nedojde k aktivaci enzymu pomocí tepla, mechanickým poškozením nebo jiným druhem narušení, tak v čerstvém rostlinném pletivu nemohou vzniknout 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, 2002).

3.6.2 Feofytiny

Feofytiny jsou deriváty chlorofylu, které ve své molekule neobsahují hořčík. Většina běžných mechanismů chlorofylu A a B degradují acidokatalitickou přeměnou na feofytin A a B, kterou zajišťují buněčné kyseliny. V tomto procesu se vytěsňují hořčičnaté ionty z chlorofylů dvěma vodíky, které jsou zodpovědné za vznik feofytinů. Odstranění centrálního hořčičnatého iontu v chlorofylech může být také zapříčiněno enzymem magnesium dechelatasou. Rostlinný materiál pozmění barvu z modrozelené až na matně olivově zelenou v důsledku přeměny chlorofylu A a B na jejich příslušné feofytiny. Tuto změnu lze hojně pozorovat při tepelném zpracování, zmrazení či skladování zelené zeleniny (Jones et al., 1961).

3.6.3 Feofobitiny

Feofobitiny jsou hydrolyzované chlorofyly bez fytolu, které ztratily hořčičnaté ionty. Feofobitiny mohou být vytvořeny enzymatickou hydrolýzou z feofytinů, což je proces, který je katalyzován chlorofylasou. Druhou možností jejich vzniku je odstranění centrálních hořčičnatých iontů z chlorofylidů, které je provedeno, např. buněčnými kyselinami či enzymem magnesium dechelatasou.

3.6.4 Feoforbidy

Ukázalo se, že tyto pigmenty převládají v nálevu okurek, což naznačuje, že ve slaném laku je podpořena činnost chlorofylasy a pH slané média dále podporuje výměnu hořčíku za vodík v chlorofylech a chlorofylidech (Jones et al., 1961). Pyrochlorofylové, pyrochlorofylidové, pyrofeofytinové a pyrofeoforbiditynové pyroderiváty chlorofylů jsou sloučeniny, které ztratili karbomethoxy skupinu z desátého uhlíku isocyklického kruhu a 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).

3.6.5 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 probíhá přes mechanismus volných radikálů a autooxidace je inhibována karotenoidy (Hynninen, 1981). Hydroxychlorofyly mohou vznikat během vaření zelených rostlinných produktů a dále byly objeveny v dehydratovaném špenátu spolu s hydroxyfeofytinem (Gauthier et al., 2001).

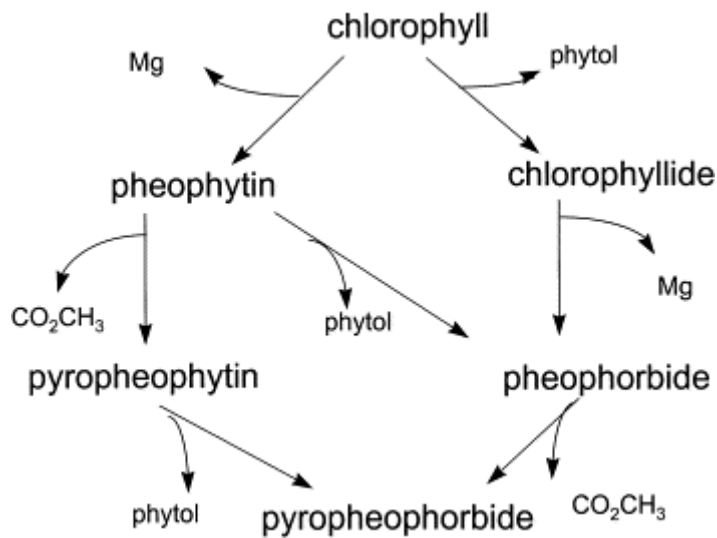
3.6.6 Kovové komplexy

Kovové komplexy chlorofylových derivátů jsou slibnou metodou pro zachování zelené barvy konzervované zeleniny během tepelného zpracování. 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).

3.6.7 Fytol

Enzymatické odstranění esterifikovaného fytolu pomocí chlorofylasy vede k vytvoření chlorofylových derivátů rozpustných ve vodě (Schwartz a Lorenzo, 1990). Pokud je chlorofyl degradován, značný podíl fytolu zůstává esterifikován nebo s mastnými kyselinami či 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).

Obrázek 3 - Schematické znázornění degradačních produktů dle Heaton a Marangoni (1996)



3.7 Vliv kulinářských úprav na stabilitu chlorofylu v potravinách

Zpracování potravin slouží k přeměně nebo zachování surovin z farmy do různých potravinových forem pro vlastní spotřebu člověka. Čerstvé zemědělské produkty (rostlinného a živočišného původu) podléhají, kvůli jejich vysokému obsahu vlhkosti, snadno zkáze a mohou být uchovávány pouze po krátkou dobu. Zejména na vrcholu sklizňové sezóny, kde je velké množství těchto výrobků, může dojít k znehodnocení a vysokým ekonomickým ztrátám, pokud nejsou přijata příslušná opatření. Kromě toho by měly být na trhu k dispozici potraviny po celý rok a uspokojit tak poptávku spotřebitelů ve všech ročních obdobích. Je tedy nutné minimalizovat posklizňové ztráty a zachovat zemědělské produkty bezpečným způsobem s žádnou nebo minimální ztrátou kvality. Převážná pozornost je u zpracovaných potravin kladna na prodloužení doby použitelnosti tím, že se předchází nežádoucím změnám u hygienické nezávadnosti, nutriční hodnotě a sensorických vlastností (Ramaswamy a Marcotte 2006). Existují různé způsoby, kterými lze docílit potravin přitažlivějších, uspokojivějších, bezpečnějších a snadnějších ke konzumaci. Mezi běžné potravinářské techniky patří pasterizace, sterilizace, vaření, sušení, chlazení, zmrazování, kvašení, přidávání konzervačních látek a snižování aktivity vody. Použití dvou nebo více z výše uvedených technik vede k inhibici nebo zastavení chemické, biochemické a mikrobiologické činnosti (Teixeira a Tucker 1997).

3.7.1 Mražení

V dnešní době se mražení potravin stalo jedním z nejdůležitějších kroků při zpracování a uchování potravin. Téměř všechny potraviny, ať už syrové, částečně zpracované nebo upravené, mohou být uchovány zmrazením (Muthukumarappan a Marella, 2007). Většina zeleniny je před zmrazením blanširována. Nicméně, některé druhy zeleniny, například, pórek a mrkev, mohou být zmrazeny syrové (Jeremiah, 1996). V odvětví zpracovaných potravin dává spotřebitel přednost mraženým potravinám, než sušeným či konzervárenským výrobkům. Evidentní je to převážně u masa, ovoce a zeleniny. Zmrazení poskytuje přidanou hodnotu a pocit svěžesti produktů. Tepelným zpracováním jsou potraviny vystaveny vysokým teplotám, které vedou k tepelnému šoku potravin, ztrátě živin, změně chuti a textury. U chemické konzervace a fermentace jsou počáteční vlastnosti výrobku změněny ve větší míře. Nicméně mražení jídla zahrnuje odstranění tepla z produktu. To má za následek přeměnu vody na led a následné snížení aktivity vody. Nedostupnost vody vede ke sníženému růstu mikroorganismů a enzymatické aktivitě. Úspěch zmrazování potravin je přisuzován zejména tomu, že potraviny si ponechávají svou původní kvalitu, tedy nutriční hodnoty, organoleptické vlastnosti atd. (Muthukumarappan a Marella, 2007).

Van Buggenhout et al. (2006) naopak vnímá proces zmrazení a mrazírenské skladování, jako negativní dopad na kvalitu potravin. Hlavními fyzikálními změnami, ke kterým dochází v průběhu mrazírenského skladování, jsou migrace vlhkosti a rekrystalizace ledu. Oba jevy se týkají stability zmrzlé vody výrobků, což má vliv na strukturu a ztrátu živin a hmotnosti zeleniny, pokud ke ztrátě odkapáváním při rozmrazování dochází.

Lisiewska et al. (2009) uvádí, že chemické změny u zmražené zelenině způsobují vývoj vůně a chuti a dále pak degradaci barvy a pigmentu, oxidační poškození a ztráty vitamínů. Kvalita mražených potravin je velmi závislá na teplotě skladování. Přesná znalost vlivu teploty skladování mražené zeleniny může pomoci určit adekvátní podmínky pro zachování vysoké kvality a stanovení trvanlivosti. Trvanlivost mražené zeleniny je obvykle založena na senzoričtém hodnocení. Jedná se o analytické měření barvy, textury a obsahu nutričních látek, např. vitamínů (Taoukis a Labuza, 2003). Ztráta barvy v průběhu mrazírenského skladování je přičítán vyblednutí jasné zelené barvy chlorofylu na olivového hnědé zbarvení, které je charakteristické pro feofytin. Tento jev je znám jako feofytinace, kdy dochází k nahrazení centrálního hořčíku vodíkem. Dalším běžným typem zhoršení, je odstranění fytolového řetězce, což vede ke vzniku chlorofylidu (odstranění z chlorofylu), nebo feoforbidu (odstranění z feofytinu). Dále probíhají reakce spojené s funkčními bočními

skupinami chlorofylu. Vznikají bezbarvé formy konečných rozkladných produktů, které také ovlivňují barvu v průběhu mrazírenského skladování. Vzhledem k tomu, že reakční rychlosti feofytinace jsou obecně vyšší než u jiných degradačních drah chlorofylu, je považován za nejvýznamnější mechanismus ztráty chlorofylu při zpracování potravin (Clydesdale a Francis, 1976).

Martins a Silva (2002) sledovali změnu barvy mražených zelených fazolek v průběhu 250 dnů při skladovacích teplotách -7 °C, -15 °C a -30 °C. Při nižších teplotách skladování došlo ke stabilizaci barvy pravděpodobně tvorbou kovových sloučenin chlorofylu. Barva může být stabilizována v důsledku zvýšení koncentrace kovových iontů, jako je měď, v nezmrzlé fázi. Tyto ionty soutěží s vodíkem o nahrazení centrálního hořčíku. Tvorba sloučeniny, jako je měďnatý chlorofyl nebo měďnatý chlorofylid vede k stabilizaci barvy. Stejného efektu lze dosáhnout s komplexy zinku.

3.7.2 Tepelné zpracování

Tepelné zpracování konzervovaných potravin je jedním z nejčastěji používaných metod pro konzervování potravin a významně přispívá k nutričnímu blahobytu velké části světové populace. (Teixeira a Tucker 1997). Dvě zcela běžné průmyslové konvenční technologie tepelného zpracování potravin ve výrobě konzervovaných výrobků jsou pasterizace a sterilizace. Pasterizace je proces ohřívání tekutých nebo pevných potravin za účelem zničení hlavní patogenů schopných růstu za aerobních podmínek a snížení úrovně kažení vegetativními bakteriemi, prvoky a houbami vysoce kyselých potravin (pH < 4,5). Potravin o pH > 4,5 vytvořené tímto způsobem by měly být skladovány při nízké teplotě, aby se zabránilo dalšímu růstu sporotvorných mikroorganismů. Nicméně komerční sterilizace se týká intenzivního tepelného zpracování, které účinně zabije nebo odstraní všechny choroboplodné zárodky a vegetativní mikroorganismy, stejně jako většinu sporotvorných bakterií z méně kyselých potravin (pH ≥ 4,5). Produkty vyrobené touto metodou se mohou skladovat až po dobu dvou let. Za účelem snížení závažnosti procesu se doporučuje konzervářské produkty skladovat při teplotách pod 30 °C, aby se zabránilo růstu teplomilných bakterií, ačkoliv tvorba spór není zcela odstraněna (Ramaswamy a Marcotte 2006).

Chlorofyl A je více citlivý na teplo než chlorofyl B. U brokolicevé šťávy byla degradace chlorofylu dvakrát tak rychlejší než u chlorofylu B (Weemaes et al., 1999). U zahřívání brokolicevé šťávy na 90 °C a 100 °C, byla degradace a změna zelené barvy

pozorována ve dvou krocích. Prvním krokem rozkladu byla feofytinizace a druhým stupněm byl rozklad feofytinu na pyrofeofytin (MacDougall, 2002). Haisman a Clark (1975) prokázali, že 55 % chlorofylu je převedeno na feofytin během 20 minut ohřívání růžičkové kapusty na 80 °C. Naproti tomu pouze 39 % chlorofylu se přemění u tabákových listů. U růžičkové kapusta a tabákových listů bylo pH po zahřátí 6,2 a 6,0. Dále zkoumali rychlost vytváření feofytinu při teplotě 60 °C u 25 rostlinných pletiv s pH v rozmezí 4,1 až 7,2. Pozorovali obecný nárůst feofytinu s klesající hodnotou pH, ale celkový vztah mezi feofytinem a pH byla slabý. U zelených fazolí ponořených ve vodě při teplotě 60 °C byl přechod na feofytin dvanáctkrát rychlejší než v listech stejné rostliny, ačkoliv obě rostlinná pletiva měla prakticky stejné pH. Závěrem bylo, že stabilita chlorofylu u poškozených buněk závisí na koncentraci a povaze buněčných kyselin a druzení mezi chlorofylem a lipoproteiny v chloroplastu.

3.7.3 Blanšírování

Účelem blanšírování je inaktivace enzymů přítomných například v zelenině. Ohřev na minimální teplotu před zpracováním nebo skladování inaktivuje enzymy odpovědné za změny ve struktuře, barvě, chuti a nutriční kvality produktů. Některé enzymy jsou zodpovědné za ztrátu kvality zeleniny. Proteasy a chlorofylasy přispívají k destrukci chloroplastu a chlorofylu. K změnám ve struktuře dochází v důsledku činnosti pektických enzymů a celuláz. Poškození barvy je způsobeno činností polyfenol oxidas, chlorofylas a peroxidas (Robinson 1991).

Pro vyhodnocení účinnosti blanšírování se tradičně používají indikátory, jako jsou enzymy katalasa a peroxidasa. Důvodem je to, že pomocí indikátorů není proces blanšírování zcela nahodilým ohřevem, což znamená, že příliš krátký ohřev je neefektivní, zatímco na druhé straně má příliš dlouhý ohřev negativní dopad na čerstvost některé zeleniny. Volba indikátoru závisí na rostlinném zpracovávání. Například, lipoxygenasa může být ideálním ukazatelem pro hrách a fazole. Předehřívání před zmrazením má výhody stabilizace barvy, textury, chuti a nutriční kvality a přispívá k ničení mikroorganismů. Existují tři způsoby blanšírování produktů zahrnující blanšírování s použitím vody, páry, nebo mikrovlnné trouby. Podstatou je rovnoměrné rozložení tepla a času, aby byla zachována kvalita produktu, zničení enzymů a snížení počtu mikroorganismů. Blanšírování za použití vody se provádí při 70 – 100 °C v určitém časovém úseku, což představuje účinnost přenosu tepelné energie kolem 60 % oproti 5 % pro parní blanšírování. Kombinace času a teploty je velmi důležitá za účelem inaktivace enzymů a zachování kvality zeleniny. Mikrovlnné blanšírování poskytuje podobný

výsledek jako vodní blanšírování, ale ztráta vitamínů je vyšší ve srovnání s metodami parními a vodními (Simpson, 2012).

Drake et al. (1981) uvádí, že blanšírování v horké vodě, páře či mikrovlnné troubě nevykazuje žádný konzistentní rozdíl v barvě mezi jednotlivými úpravami. Ponne et al. (1994) studovali vliv blanšírování v horké vodě, páře a mikrovlnné troubě na kvalitu barvy čekanky a špenátu a došli k jinému závěru. Produkty byly blanšírovány, dokud nebyla pozorována žádná peroxidasová aktivita. Blanšírování zeleniny v mikrovlnné troubě a páře dosáhlo nejlepších výsledků, ačkoliv blanšírování ve vodě ponechalo čekance a špenátu nejvíc čerstvou podobu.

3.7.4 Vysokotlaké zpracování

Vysokotlaké zpracování (při nízké a střední teplotě), má jen omezený vliv na pigmenty odpovědné za barvu ovoce a zeleniny. Barevné sloučeniny ovoce a zeleniny se však mohou vlivem vysokotlakového zpracování změnit během skladování v důsledku neúplné inaktivace enzymů a mikroorganismů, které mohou mít za následek nežádoucí chemické reakce (jak enzymatické a nenzymatické) v potravinové matici (Oey et al., 2008). Chlorofyly A a B mají různou stabilitou vůči tlaku a teplotě. Při pokojové teplotě chlorofyly A a B vykazují extrémní tlakovou stabilitu, ale při teplotách vyšších než 50 °C vysokotlaké zpracování ovlivňuje jejich stabilitu a dochází tak k významnému snížení obsahu chlorofylu. Závislost teploty na rychlostní konstantě degradace chlorofylu A je vyšší, než u chlorofylu B. Na úrovni konstantního tlaku, se hodnoty rychlostních konstant degradace chlorofylu zvyšují se zvyšující se teplotou, zatímco při konstantní zvýšené teplotě, zvýšení tlaku urychluje degradaci chlorofylu A a B. Závislost tlaku na rychlostní konstantě degradace chlorofylu B při teplotě 70 °C je vyšší než u chlorofylu A. Například, zvednutí tlaku z 200 na 800 MPa urychluje degradaci chlorofylu A a chlorofylu B v brokolici o 19,4 % a 68,4 %, v uvedeném pořadí (Van Loey et al., 1998).

Matser et al. (2004), také označili degradaci chlorofylu zelených fazolek a špenátu v důsledku vysokotlakého zpracování při zvýšených teplotách, a to i při krátké expoziční době. Vysokotlaké zpracování při teplotě prostředí a střední teplotě, má za následek omezenou barevnou změnu zeleniny. V mnoha případech se zelená barva zeleniny stává ještě intenzivnější, například zelené fazolky při vysokotlakém zpracování 500 MPa / teplota prostředí / 1 min. To může nastat během vysokotlakého zpracování, které vedlo k danému úniku chlorofylu do mezibuněčného prostoru, čímž byla získána intenzivnější jasně zelená

barva na rostlinném povrchu rozrušených buněk. Nicméně, při zvýšené teplotě se zřetelně zelená barva přesunula viditelně na olivově zelenou. Během skladování zeleniny se zelená barva vysokotlakým zpracováním při pokojové teplotě změnila na světle žlutou barvu, pravděpodobně v důsledku chemických reakcí, jako je oxidace. Pro srovnání, zelenina zpracovaná pod tlakem při zvýšené teplotě, nevykazovala žádnou další barevnou změnu v průběhu skladování, což má za následek inaktivace některých enzymů. Barva takto zpracovaných zelených fazolí a bazalky, byla ještě po dobu měsíce až dvou měsíců skladování přijatelná (Krebbbers et al., 2002)

3.8 Využití chlorofylu

3.8.1 Zdravotní benefity

Chlorofyly mají také několik zdravotních výhod pro lidi. Ukázalo se, že mohou být schopné obnovy krevního řečiště, a jako netoxické a bez škodlivých vedlejších účinků, i pokud jsou podávány ve vysokých dávkách různými způsoby (intravenózně, intramuskulárně či orálně) (Offenkrantz, 1950). Vzhledem k velmi nápadité podobě s hemoglobinem se chlorofyl uplatňuje při krvetvorbě, zvyšuje počet červených krvinek a zlepšuje přenos kyslíku. Již v první polovině 20. století byl prokázán pozitivní vliv působení chlorofylu na chudokrevnost lidí.

Využití chlorofylu má také zásadní význam při hojení ran. Otevřená zranění se po aplikaci chlorofylu rychleji hojí, dochází ke zmírnění krvácení, snižuje se bolestivost ran a minimalizuje se tvorba jizev. Přiložením chlorofylu na ránu dochází k dezinfekci, jelikož současně působí antibakteriálně (Dallen, 2010). Účinným přípravkem na trhu je Dermochlorophyl. Vyrábí ve formě spreje či gelu a podporuje epitelizaci rán a brání růstu bakterií (Stryja et al., 2011). Přidanou hodnotou používání chlorofylu je to, že opakovanou aplikací jeho příznivé účinky neklesají, ale naopak narůstají. Nevyužívá se pouze při hojení ran, ale také popálenin. Za přispění chlorofylu se rychleji hojí popáleniny způsobené ohněm, kyselinami i radiací. Chlorofyl má příznivý vliv na onemocnění kůže. Úspěchy byly zaznamenány u různých typů kožních onemocnění, například při 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 jak při vnitřním užívání, tak i při vnějším použití (Dallen, 2010). Vysoký obsah hořčičku v chlorofylu podporuje plodnost a zvyšuje koncentraci a činnost

enzymů, které regulují pohlavní hormony. Chlorofyly jsou schopny deaktivovat toxiny v těle, čistí játra a snižují problémy spojené s cukrem v krvi. Používají se také v deodorantech, k inhibici ústní bakteriální infekce, podporují hojení ran konečníku a snižují tyfovou horečku (Offenkrantz, 1950). Chlorofylin sodíku a mědi a přírodní chlorofylové deriváty prokázaly značnou biologickou aktivitu in vitro a in vivo v souladu s prevencí rakoviny, včetně antioxidační aktivity, antimutagenních činnosti, modulaci cizorodých metabolizujících enzymů a vyvolání apoptózy vlivem nádorových linií. Tyto povzbudivé výsledky vedly k vyšetřování chemopreventivních účinků u člověka (Egner et al., 2003).

3.8.2 Potravinářství

Chlorofyly se používají jako potravinářské barvivo a mohou být přidávány do některých potravin buď v čisté formě, nebo v komplexu s mědí (Simpson, 2012). Avšak není snadné připravit komerčně barvivo obsahující samotný čistý chlorofyl, vzhledem k jeho nestabilní molekule. Ke stabilizaci chlorofylového potravinářského barviva dochází výměnou hořčičných iontů (Francis, 1999). Na trhu se setkáme s označením E 140, což je označení pro přírodní chlorofyly a chlorofyliny a s označením E 141, což jsou měďnaté komplexy chlorofylů a chlorofylinů. Tyto komplexy se získávají z přírodních zelených pigmentů chlorofylů a chlorofylinů, nahrazením hořčičného iontu měďnatým iontem. Takto upravená barviva jsou stabilnější, nepodléhají degradaci vlivem působení kyselin a světla, tak jako přírodní. U obou těchto skupin nejsou známy žádné nežádoucí účinky a barviva se považují za bezpečná. Největší část používaných chlorofylových barviv jsou ve formách rozpustných ve vodě (Simpson, 2012). Ve vodě rozpustným barvivem jsou tzv. chlorofyliny, které nalezneme pod číselným kódem E 140 spolu s chlorofyly. Jsou přidávány převážně do mléčných výrobků, polévek, olejů, cukrovinek, nápojů a kosmetiky (Francis, 1999). Některé země mají omezení týkající se používání měďnatých chlorofylových komplexů v potravinách a léčivech kvůli toxicitě mědi. (Simpson, 2012). Chlorofyly jsou jako potravinářská barviva akceptována téměř ve všech zemích (Velíšek, 1999). Výbor JECFA klasifikoval chlorofyl v rámci Listu 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). Používání chlorofylinů je v Evropě a Asii schváleno, ale v USA pouze v prostředcích sloužících k čištění zubů. Vzhledem k tomu, že nejsou dostupná žádná jiná komerční přírodní zelená barviva, mohou vzbuzovat zájem (MacDougall, 2002).

3.8.3 Potravinové doplňky

Mezi komerční zdroje chlorofylu patří zelená řasa *Chlorella sp.*, modrozelená řasa *Spirulina sp.*, zelená řasa *Enteromorfa sp.* a tzv. mořský salát (*Ulva sp.*). Řasa *Chlorella pyrenoidosa* je jedním z nejbohatších zdrojů chlorofylu ze všech známých rostlin (Dallen, 2010). *Chlorella pyrenoidosa* se pěstuje ve velkých sladkovodních nádržích na Tchaj-wanu. Tato oblast je velmi vhodná, v daném klimatickém pásmu jsou kvalitní podmínky pro její pěstování zejména díky rovnoměrnému slunečnímu záření. V nádržích se buňky řasy množí osm dní a poté jsou sklizeny. Řasa se sklízí ve večerních hodinách, protože přes den buňky akumulují energii, se kterou v noci hospodaří. Pomocí mikroskopických filtrů a odstředivek jsou buňky řasy odděleny od nečistot. Zpracování probíhá pomocí speciální metody „Steam“. Jedná se o takzvané „sprejové sušení“. Princip této metody spočívá v teplotním výkyvu, který při určitém tlaku rozpne buněčné tekutiny a poté je následně vysuší. Proces vysušení trvá pět až deset sekund. Buněčné stěny jsou mikroskopicky narušeny, ale obsah buňky je uchován uvnitř. Buňky řasy *Chlorella pyrenoidosa* se následně vysuší teplým vzduchem a zformují do podoby tablet. Při slisování se nepoužívají žádná plniva, pojiva ani konzervační látky. Nejsou potřeba, protože buňky při zpracování získají dostatečnou přilnavost (Rathouský, 2008).

4 Metodika

4.1 Rostlinný materiál

Zkoumané zelené barvivo pro daný pokus bylo získáno z rostlin špenátu. Špenát setý (*Spinacia oleracea*) byl vypěstován na Demonstračním a pokusném pozemku FAPPZ na ČZU v Praze. Výsev byl proveden dne 1. 4. 2014 a sklizeň o osm týdnů později.

4.2 Použité chemikálie

- Aceton (p.a.)
- Uhličitan hořečnatý (p.a.)
- Mořský písek

4.3 Laboratorní pomůcky

- Odměrné baňky (100 ml)
- Filtrační baňky
- Kádinky
- Stříčka
- Vakuová filtrační fritra
- Filtrační aparatura
- Nálevka
- Třecí miska s tloučkem
- Laboratorní váhy
- Mixér
- Mraznička
- Spektrometr Helis GAMA UV (Unicam, Velká Británie)
- Laboratorní sušárna (Venticell)
- Formy na led
- Hrnc, vařič

4.4 Vlastní analýza

Špenát byl sklizen dne 29. 5. 2014 a téhož data i analyzován. Rostliny byly očištěny, umyty, osušeny a připraveny k další manipulaci. Na Obrázku 4 jsou rostliny špenátu v první fázi příprav.

Obrázek 4 - Rostlinný materiál Špenátu setého určen ke studiu chlorofylu



Špenát byl dále mixován, blanširován a mražen za různých podmínek, které jsou níže rozvedeny. Byly využity metody extrakční, spektrofotometrické a v neposlední řadě stanovení sušiny rostlinného materiálu.

4.4.1 Mixování špenátu

Rostliny špenátu byly rozmixovány v mixéru na co nejjemnější konzistenci. Pro sledování míry degradace chlorofylu při procesu mixování, byla část rostlin mixovaná s uhličitanem hořečnatým a část bez něj. Z naměřených koncentrací chlorofylu ve vzorcích bylo následně posuzováno možné ovlivnění chlorofylové stability.

Mixování špenátu s $MgCO_3$

První část rostlin špenátu byla rozmixována s přidavkem $MgCO_3$ za účelem stabilizace barviva. Z rozmixovaného špenátu bylo odváženo 20 g do každé ze dvou váženek (viz. Obrázek 5) a sušeno v sušárně do konstantní hmotnosti při teplotě 105 °C.

Obrázek 5 - Odvážení vzorku rozmixovaného špenátu k následnému sušení



Po zahřátí a odpaření byla získána sušina vzorku, na kterou byl dále vztažen podíl analyzovaného zeleného barviva. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 1 - Stanovení procentuálního zastoupení sušiny ve vzorcích špenátu mixovaného s $MgCO_3$

Sušina špenátu mixovaného s $MgCO_3$			
Váženka (g)	Navážka (g)	Usušený vzorek(g)	Sušina (%)
20,387	9,274	0,701	7,559
23,809	9,832	0,750	7,628
22,098	9,553	0,726	7,593
Průměrné hodnoty			\bar{x}

Dále byly z rozmixovaného materiálu zhotoveny čtyři vzorky o navážce 2 g. K jednotlivým vzorkům byl přidán mořský písek a uhličitán hořečnatý. V zápětí byl obsah třecí misky rozetřen na homogenní kaši. Postupným přidáváním acetonu byl z rostlinného materiálu extrahován chlorofyl, což je vidno z Obrázku 6.

Obrázek 6 - Izolace chlorofylu třením rostlinného materiálu a extrakcí v acetonu



Po vyextrahování barviv do acetonu byly extrakty kvantitativně převedeny do skleněných frit. Za občasného propláchnutí frit acetonem, byly extrakty přefiltrovány za sníženého tlaku pomocí vodní vývěvy do filtračních baněk (Obrázek 7). Filtráty byly poté kvantitativně převedeny do 100 ml odměrných baněk a doplněny acetonem po rysku.

Obrázek 7 - Oddělení pevných částic od zkoumaného extraktu za sníženého tlaku



S použitím spektrofotometrické metody je možné stanovit obsah chlorofylu A a B v acetonovém extraktu, a přepočtem i na rostlinný materiál. Pro jejich stanovení je možné použít přímo acetonový extrakt, který obsahuje mimo ně také xantofyly a karoteny. Chlorofyly se totiž měří v červené oblasti spektra, kde xantofyly a karoteny neabsorbují. Absorbance se měří při dvou různých vlnových délkách. Spektrofotometr Helis GAMA UV byl před vlastním měřením nastaven na vlnové délky 663 nm a 644 nm. Z odměrných baněk bylo přibližně 2 ml extraktu převedeno do skleněné kyvety a vzorky byly proměřeny vůči čistému acetonu. Již hotové extrakty byly proměřeny následující den a po týdnu od jeho přípravy. Byl tak kontrolován degradační proces v průběhu déle uchovávaného extraktu. Výsledné hodnoty absorbance ukazují průběžné kolísání v intenzitě zbarvení chlorofylového extraktu.

Výpočet

Naměřené hodnoty absorbancí jednoho vzorku ve čtyřech měření byly vždy zprůměrovány a zakomponovány do výpočtu koncentrace chlorofylu A a chlorofylu B, vycházející ze vztahu:

$$C_A = 9,784 A_{663} - 0,990 A_{644} \text{ (mg/l)}$$

$$C_B = 21,426 A_{644} - 4,650 A_{663} \text{ (mg/l)}$$

Takto vypočítané koncentrace chlorofylových extraktů (mg/l) byly vzápětí převedeny na navážku čerstvé hmoty vzorku (mg/g/č.h). V posledním kroku byla koncentrace chlorofylu

v čerstvé hmotě vztažena na sušinu vzorku (mg/g/suš). Zvýrazněná data této části experimentu (viz. Tabulka 2) budou sloužit k celkovému vyhodnocení.

Tabulka 2 - Přehled zjištěných hodnot analyzovaných vzorků mixovaného špenátu s MgCO₃

Navážka (g)	A ₆₆₃	A ₆₄₄	C _A (mg/l)	C _B (mg/l)	C _A (mg/g/č.h.)	C _B (mg/g/č.h.)	C _A (mg/g/suš.)	C _B (mg/g/suš.)	Datum
2,09	0,567	0,241	5,31	2,53	0,25	0,12	3,35	1,59	29.5.2014
2,00	0,790	0,336	7,40	3,53	0,37	0,18	4,87	2,32	
2,24	0,664	0,243	6,26	2,12	0,28	0,09	3,68	1,25	
2,08	0,664	0,267	6,23	2,63	0,30	0,13	3,95	1,67	
2,10	0,671	0,272	6,30	2,70	0,30	0,13	3,96	1,71	\bar{x}
2,09	0,541	0,218	5,08	2,16	0,24	0,10	3,20	1,36	30.5.2014
2,00	0,734	0,281	6,90	2,61	0,35	0,13	4,55	1,72	
2,24	0,671	0,250	6,32	2,24	0,28	0,10	3,71	1,31	
2,08	0,637	0,247	5,99	2,33	0,29	0,11	3,79	1,48	
2,10	0,646	0,249	6,07	2,33	0,29	0,11	3,81	1,47	\bar{x}
2,09	0,507	0,187	4,78	1,65	0,23	0,08	3,01	1,04	5.6.2014
2,00	0,746	0,303	7,00	3,02	0,35	0,15	4,61	1,99	
2,24	0,663	0,250	6,24	2,27	0,28	0,10	3,67	1,34	
2,08	0,611	0,229	5,75	2,07	0,28	0,10	3,64	1,31	
2,10	0,632	0,242	5,94	2,25	0,28	0,11	3,73	1,42	\bar{x}

Mixování špenátu bez MgCO₃

Po umytí použitého nádobí a pomůcek byl experiment opakován za mírně odlišných podmínek. Důležité bylo především propláchnutí filtračních frit rozpouštědlem, které rozpouští ulpělý filtrovaný produkt. V tomto případě byla k proplachu použita sírová kyselina. Následující pracovní postup byl oproti předešlému pozměněn v tom, že mixování rostlin špenátu probíhalo bez přidání uhličitanu hořečnatého. Účelem bylo sledovat, do jaké míry dojde u vzorků k narušení chlorofylové struktury během mechanického zásahu bez stabilizace uhličitanem hořečnatým. Část rostlinného materiálu mixovaného bez MgCO₃ bylo zmrazeno a uchováno při teplotě -18 °C k dlouhodobějšímu sledování. Dále už byl postup obdobný. Z rozmixovaného špenátu byly odebrány dva vzorky pro stanovení sušiny. Procentuální zastoupení sušiny ve vzorcích je uvedeno zde.

Tabulka 3 - Stanovení sušiny ve vzorcích špenátu mixovaného bez přidavku MgCO₃

Sušina špenátu mixovaného bez MgCO ₃			
Váženka (g)	Navážka (g)	Usušený vzorek(g)	Sušina (%)
21,057	8,095	0,717	8,857
23,667	8,338	0,737	8,839
22,362	8,217	0,727	8,848
Průměrné hodnoty			\bar{x}

Opět byly naváženy 2 g rostlinného materiálu do každé ze čtyř třecích misek a za přidání mořského písku a $MgCO_3$ byly jednotlivé komponenty utřeny. Extrakce v acetonu, filtrace, doplnění acetonem na objem 100 ml a měření absorbance na spektrofotometru. Tímto způsobem byly zhotoveny také další vzorky v intervalech po 30 a 120 minutách od rozmixování špenátu. Bylo tím sledováno, do jaké míry bude degradovat chlorofyl při delším odležení rozmixovaného špenátu, který nebyl stabilizován při mechanické námaze $MgCO_3$. Získané extrakty byly dále uchovány po dobu jednoho týdne. Jejich koncentrace byly dále měřeny, za účelem pozorování degradace chlorofylu již už v připravených extraktech. Záměrem bylo zjistit rychlost rozkladu chlorofylu při delší přípravě vzorků či delší době státní extraktů před samotným měřením. Vše je uvedeno v Tabulce 4.

Tabulka 4 - Přehled změn průměrných koncentrací ChlA a ChlB ve vzorcích a extraktech mixovaného špenátu bez $MgCO_3$ v časové intervalu.

Měření vzorků mixovaného špenátu bez $MgCO_3$ v různých intervalech a následné proměření jejich extraktů v průběhu jednoho týdne						
c Chl A (mg/g/suš.)				c Chl B (mg/g/suš.)		
Datum	Měření ihned	Měření po 0,5 hod.	Měření po 2 hod.	Měření ihned	Měření po 0,5 hod.	Měření po 2 hod.
29.5.2014	3,20	3,77	4,44	1,42	1,94	3,39
30.5.2014	3,27	3,62	3,74	1,36	1,53	1,96
5.6.2014	3,18	3,58	3,69	1,31	1,54	1,21

4.4.2 Blanšírování špenátu

V další etapě experimentu byl špenát před mixováním blanšírován. Účelem bylo zjistit, jaký bude mít blanšírování vliv na rozkladné procesy chlorofylu. Po přivedení vody do varu byly rostliny špenátu ponořeny na 1 minutu do hrnce s vodou a poté zchlazeny a osušeny. Následně byl špenát mixován oběma předešlými postupy.

Nejprve byl blanšírovaný špenát mixován s přidavkem $MgCO_3$. Klasickým způsobem byla zhotovena sušina obou vzorků tohoto materiálu. Zaznamenané výsledky podílu sušiny v jednotlivých blanšírovaných vzorcích jsou shrnuty v Tabulce 5.

Tabulka 5 - Stanovení sušiny ve vzorcích blanšírovaného špenátu mixovaného s $MgCO_3$

Sušina špenátu blanšírovaného, mixovaného s $MgCO_3$			
Váženka (g)	Navážka (g)	Usušený vzorek(g)	Sušina (%)
22,226	10,595	0,751	7,088
21,240	11,453	0,817	7,134
21,733	11,024	0,784	7,111
Průměrná hodnota			\bar{x}

Zhotovené chlorofylové extrakty byly proměřeny při daných vlnových délkách ve spektrofotometru. Pro kontrolu degradačních pochodů byly ty samé extrakty změřeny o týden později. Tuto změnu koncentrací chlorofylových extraktů lze vidět následující tabulce.

Tabulka 6 - Obsah chlorofylu blanširovaného špenátu mixovaného s MgCO₃.

Blanširování špenátu mixovaného s MgCO ₃		
Datum měření	c(ChlA) (mg/g/suš.)	c(ChlB) (mg/g/suš.)
30.5.2014	4,44	1,65
5.6.2014	4,31	1,59

Další vzorky blanširovaného špenátu byly mixovány bez MgCO₃. Tento materiál byl rozdělen na pomyslné třetiny. Jedna byla zmrazena na teplotu -18 °C a použita k dalším rozborům, stejně, jako tomu bylo u neblanširovaných rostlin bez MgCO₃. Z druhé třetiny rostlinného materiálu bylo do dvou váženek pokaždé odebráno 20 g pro stanovení sušiny. Zaznamenané výsledky podílu sušiny u blanširovaných vzorků jsou shrnuty v Tabulce 7.

Tabulka 7 - Stanovení sušiny ve vzorcích blanširovaného špenátu mixovaného bez MgCO₃

Sušina špenátu blanširovaného , mixovaného bez MgCO ₃			
Váženka (g)	Navážka (g)	Usušený vzorek(g)	Sušina (%)
20,857	8,622	0,621	7,203
23,057	9,222	0,677	7,341
21,957	8,922	0,649	7,272
Průměrná hodnota			\bar{x}

Třetí část blanširovaného špenátu mixovaného bez přídavku MgCO₃ byla opět použita k extrakci a měření absorbancí vzorků. U blanširovaných vzorků mixovaného špenátu bez MgCO₃ byl také sledován pohyb koncentrací chlorofylů s časovým odstupem 30 až 120 minut od rozmixování špenátu. Tímto způsobem byly zhotoveny také další vzorky v intervalech po 30 a 120 minutách od rozmixování špenátu. Extrakty těchto vzorků byly dále uchovány po dobu jednoho týdne. Byla sledována změna koncentrace chlorofylu, jak v rozmixovaných vzorcích v různém časovém rozestupu, tak i v déle uchovávaných extraktech. Souhrn zjištěných hodnot koncentrací chlorofylu u blanširovaného špenátu mixovaného bez MgCO₃ je zaznamenan v Tabulce 8.

Tabulka 8 - Přehled změn průměrných koncentrací ChlA a ChlB ve vzorcích a extraktech blanširovaného špenátu mixovaného bez MgCO₃ v čase

Měření vzorků blanširovaného špenátu mixovaného bez MgCO ₃ a jejich extraktů v časových intervalech						
c Chl A (mg/g/suš.)			c Chl B (mg/g/suš.)			
Datum	Měření ihned	Měření po 0,5 hod.	Měření po 2 hod.	Měření ihned	Měření po 0,5 hod.	Měření po 2 hod.
30.5.2014	3,88	3,74	3,98	1,40	1,4	1,55
5.6.2014	3,78	3,58	3,84	1,32	1,28	1,42

4.4.3 Rozmražení špenátu

V poslední řadě byl měřen obsah chlorofylu u dlouhodobě zmraženého špenátu. Byly srovnávány vzorky neblanširovaného rozmraženého špenátu a naopak blanširovaného rozmraženého špenátu. Po rozmrazení na pokojovou teplotu byly z každého materiálu odváženy čtyři vzorky po dvou gramech. Následovalo tření materiálu s mořským pískem a MgCO₃, extrakce v acetonu, filtrace, doplnění acetonem na objem 100 ml a měření absorbancí. Vzorky takto byly proměřeny po týdnu, dále po 18. týdnu, 21. týdnu, 35. týdnu a po 40. týdnu až od data zmražení. Měření bylo provedeno za stejných podmínek, jako u předešlých vzorků. Výsledné absorbance rozmražených vzorků jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 9 - Rozdíl koncentrací chlorofylu u blanširovaného a neblanširovaného rozmraženého špenátu

Rozmražené neblanširované vzorky			Rozmražené blanširované vzorky	
Datum měření	c(ChlA) (mg/g/suš.)	c(ChlB) (mg/g/suš.)	c(ChlA) (mg/g/suš.)	c(ChlB) (mg/g/suš.)
29.5.2014	3,20	1,42	3,78	1,32
5.6.2014	3,91	2,28	4,37	1,94
3.10.2014	3,93	2,58	3,68	1,63
30.1.2015	3,40	1,98	3,85	1,52
7.3.2015	3,27	1,84	3,81	1,49

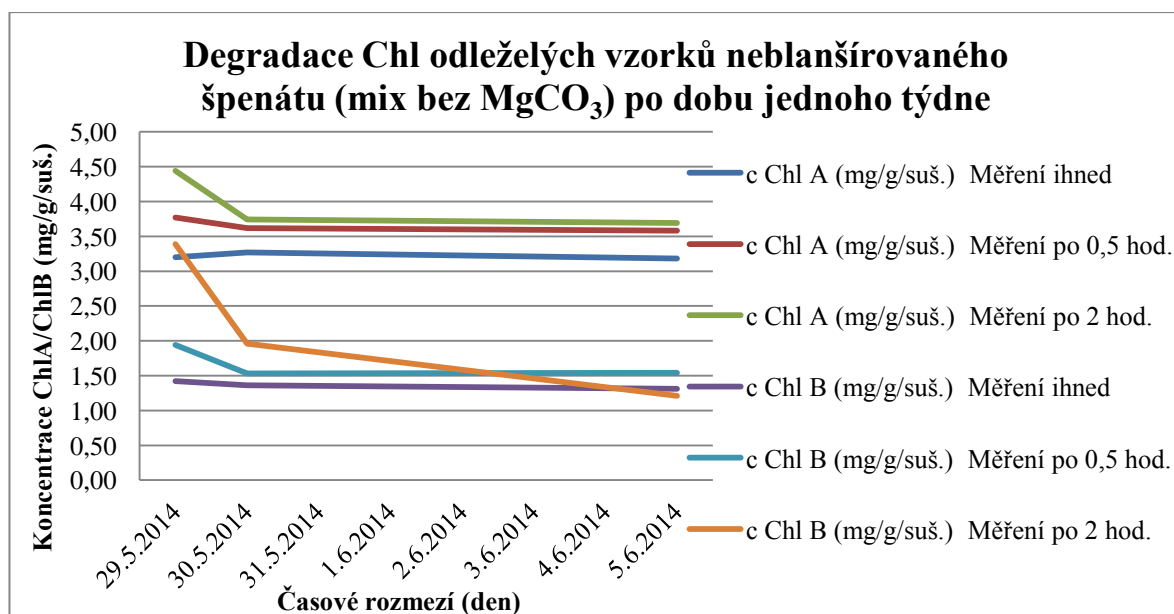
5 Výsledky

Naměřená data byla zpracována a porovnána mezi sebou. Analýza byla provedena časovou řadou. Byl sledován průběh koncentrací jednotlivých vzorků v čase a znázorněn jejich grafický vývoj. Dále byla odhadnuta lineární trendové funkce a z kolika procent zvolený model vysvětlí vývoj změn v časové řadě. Dané výstupy byly vyhodnoceny z programu Statistica.

Vliv delší doby odležení vzorků rozmixovaného špenátu na degradaci chlorofylu

Na otázku jaký dopad má delší doba stání vzorků neblanširovaného špenátu mixovaného bez přidání $MgCO_3$ na degradaci chlorofylu v průběhu jednoho týdne, lze odpovědět z následujícího grafu.

Graf 1 - Degradace Chl odleželých vzorků neblanširovaného špenátu (bez $MgCO_3$) v čase



Vzorky neblanširovaného špenátu mixovaného bez $MgCO_3$ byly z naměřených koncentrací ChlA a ChlB (ihned po rozmixování či 30 min. a 120 min. od rozmixování) a závislosti na čase, shledány jako statisticky významné. Z výstupů statistického programu bylo zjištěno, z kolika procent je možné vysvětlit lineárním trendem změnu vývoje koncentrací v časovém rozmezí jednoho týdne. Díky výsledným hodnotám lineární regrese, byl zjištěn u všech vzorků její klesající průběh. Pomocí výpočtu tzv. 1. absolutní diference,

byl zaznamenán největší pokles koncentrace v dané časové řadě. Veškeré údaje byly shrnuty v následující tabulce.

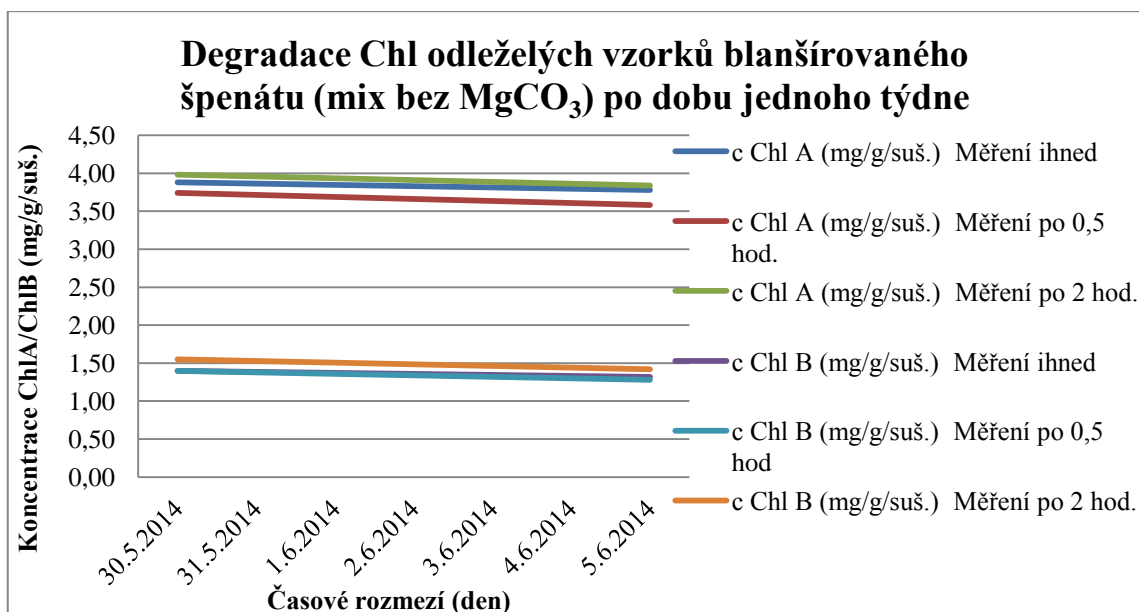
Tabulka 10 - Sjednocení dat ze statistických výstupů časové řady neblanširovaných vzorků

Časová řada vzorků neblanširovaných a mixovaných bez přidání MgCO ₃			
Interval měření	Výsledná regrese	Lineární trend c/t (%)	Absolutní pokles v časové řadě
c (ChIA)	Ihned	$y' = 3,236667 - 0,010000t$	4,74
	Po 0,5 hod.	$y' = 3,846667 - 0,095000t$	89,95
	Po 2 hod.	$y' = 4,706667 - 0,375000t$	79,97
c (ChIB)	Ihned	$y' = 1,473333 - 0,055000t$	99,73
	Po 0,5 hod.	$y' = 2,070000 - 0,200000t$	85,51
	Po 2 hod.	$y' = 4,366667 - 1,090000t$	96,86

Obecně lze říct, že vzorky, které byly měřené ihned po rozmixování špenátu, dosahovaly nižší koncentrace chlorofylu, než vzorky měřené v časovém odstupu. Avšak okamžitým zpracováním vzorků, již při následujícím skladování jejich extraktů, k dalším ztrátám nedocházelo. Počáteční obsah chlorofylu ve vzorkách, které byly zpracovávány až po 30 a 120 minutách od mixování, byl daleko vyšší. Ovšem k velkým poklesům v koncentraci chlorofylu došlo již následující den proměření chlorofylových extraktů. Čím déle byly vzorky odloženy před zpracováním, tím byly ztráty chlorofylu vyšší. Vzorky, které byly odstáté 120 minut po mixování, ztratily až 65 % z původního obsahu chlorofylu. Naproti tomu vzorky zpracované ihned zaznamenali pokles koncentrace chlorofylu do 8 %. Na degradaci se v tomto případě značně podílí průnik světla skrz vzorky při pokojové teplotě.

Pro dlouhodobější analýzu degradace chlorofylu je vhodnější zpracovat již rozmixovaný rostlinný materiál co nejdříve, aby nedocházelo ke vzniku znehodnocujících degradačních výkyvů v koncentraci chlorofylu. V případě, že jsou jednotlivé kroky zpracování vzorků časově náročné, je vhodné analyzovaný rostlinný materiál předem blanširovat. Koncentrace chlorofylu blanširovaných vzorků špenátu byly v průměru o 7 % vyšší než u vzorků špenátu čerstvého. Jak je vidno v Grafu 2, bude obsah chlorofylu vzorků vyšší a výhledově ustálenější. Pak už nehraje příliš velkou roli, zda se vzorky zpracují ihned po rozmixování špenátu či s určitou prodlevou. K stejnému závěru došlo i u blanširovaných vzorků mixovaných s MgCO₃.

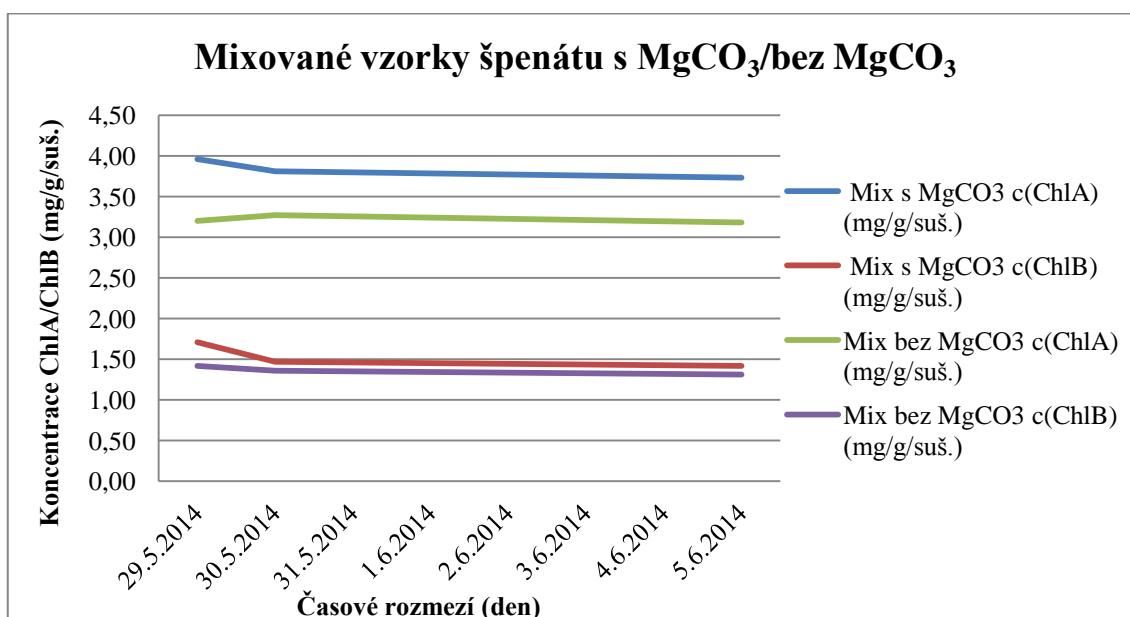
Graf 2 - Degradace Chl odleželých vzorků blanšírovaného špenátu (bez MgCO₃) v čase



Ovlivnění degradace chlorofylu přidavkem MgCO₃ k špenátu během mixování

Dalším hodnoceným aspektem byl vliv přítomnosti MgCO₃ při mixování rostlinného materiálu. Bylo zkoumáno, do jaké míry se uplatní, jako stabilizátor barvy při mechanickém poškození rostlinných pletiv a struktury chlorofylu. Rozdíly jsou evidentní z Grafu 3.

Graf 3 - Koncentrace Chl ve vzorcích mixovaných s MgCO₃ či bez MgCO₃



Bylo prokázáno, že koncentrace jednotlivých vzorků mixovaného špenátu s MgCO₃ a mixovaného bez MgCO₃, byly v závislosti na čase statisticky významné. Z výstupů

statistického programu bylo zjištěno, z kolika procent je možné vysvětlit lineárním trendem změnu vývoje koncentrací v časovém rozmezí jednoho týdne (viz. Tabulka 11) Pomocí výsledných hodnot lineární regrese, byl zaznamenán u všech vzorků její klesající průběh. Výpočtem tzv. 1. absolutní diference, byl zaznamenán největší pokles koncentrace v dané časové řadě.

Tabulka 11 - Vyhodnocená data ze statistických výstupů časové řady vzorků s či bez MgCO₃

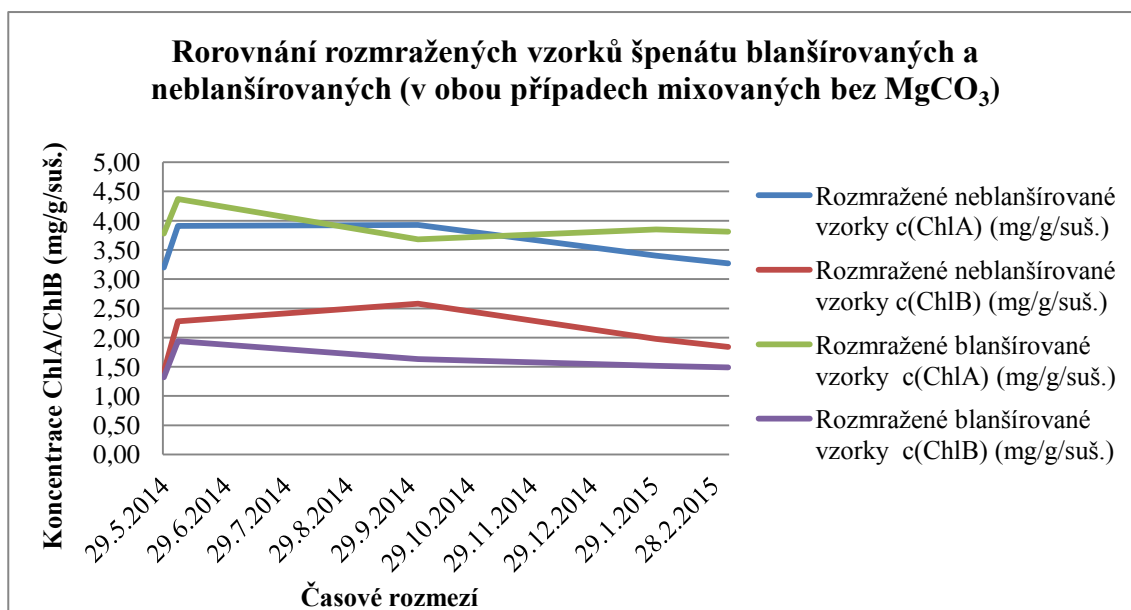
Časová řada vzorků neblanširovaných a mixovaných s přidání MgCO ₃			
Měření	Výsledná regrese	Lineární trend c/t (%)	Absolutní pokles v časové řadě
c(ChlA)	$y' = 4,06333333 - 0,115000t$	97,00	30.5.14 (-0,15)
c(ChlB)	$y' = 1,82333333 - 0,145000t$	87,48	30.5.14 (-0,24)
Časová řada vzorků neblanširovaných a mixovaných bez přidání MgCO ₃			
Měření	Výsledná regrese	Lineární trend c/t (%)	Absolutní pokles v časové řadě
c(ChlA)	$y' = 3,236667 - 0,010000t$	4,74	5.6.14 (-0,09)
c(ChlB)	$y' = 1,473333 - 0,055000t$	99,73	30.5.14 (-0,06)

Z těchto statistických údajů bylo zjištěno, že vzorky, u kterých nebyl při mixování přidán MgCO₃, měly nižší poklesy koncentrací ChlA a ChlB v čase (do 8 %), než vzorky, kde MgCO₃ přidán byl (17 %), ale za to podstatně nižší obsah chlorofylů. Vyšší koncentrace ChlA a ChlB byly zaznamenány u vzorků mixovaných s MgCO₃. Nejvyšší úbytek koncentrace nastal následující den a poté byly naměřené koncentrace v průběhu času ustálené. Lze tedy prokázat pozitivní efekt MgCO₃ na stabilizaci zeleného rostlinného barviva.

Degradace chlorofylu ve špenátu mraženém a dlouhodobě skladovaném

Posledním hodnotícím atributem byla stabilita chlorofylu u dlouhodobě skladovaného mraženého špenátu. Srovnávány byly vzorky blanširované a neblanširované, přičemž mixování špenátu bylo provedeno bez přidání MgCO₃. Vývoj změn koncentrace chlorofylu od změření čerstvých vzorků a vzorků mraženého špenátu skladovaného po dobu 40 týdnů, byl zaznamenán v následujícím grafu.

Graf 4 - Průběh naměřených koncentrací ChlA a ChlB rozmražených vzorků blanširovaného a neblanširovaného špenátu po dobu 40 týdnů



Koncentrace jednotlivých vzorků blanširovaného a neblanširovaného špenátu mixovaného bez MgCO₃, byla v závislosti na čase shledána, jako statisticky významná. Výstupem ze statistického programu bylo zjištěno, z kolika procent je možné vysvětlit lineárním trendem změnu vývoje koncentrací v časovém rozpětí 40 týdnů (viz. Tabulka 12) Průběh lineární regrese byl u všech vzorků zaznamenán klesajícím trendem. Výpočtem tzv. 1. absolutní diference, byl zaznamenán největší pokles koncentrace v dané časové řadě.

Tabulka 12 - Vyhodnocená data ze statistických výstupů časové řady rozmražených vzorků blanširovaných a neblanširovaných

Časová řada rozmražených neblanširovaných vzorků, mix bez MgCO ₃			
Měření	Výsledná regrese	Lineární trend c/t (%)	Absolutní pokles v časové řadě
c(ChlA)	$y' = 3,653000 - 0,037000t$	27,54	30.1.15 (-0,53)
c(ChlB)	$y' = 1,858000 - 0,054000t$	37,62	30.1.15 (-0,60)
Časová řada rozmražených blanširovaných vzorků, mix bez MgCO ₃			
Měření	Výsledná regrese	Lineární trend c/t (%)	Absolutní pokles v časové řadě
c(ChlA)	$y' = 4,036000 - -0,046000t$	7,19	3.10.14 (-0,69)
c(ChlB)	$y' = 1,604000 - -0,008t$	0,30	3.10.14 (-0,31)

Naměřené hodnoty koncentrace chlorofylů ve vzorcích čerstvého špenátu byly podstatně nižší než ve vzorcích špenátu mraženého. Po rozmražení byl u všech typů vzorků pozorován nárůst koncentrace chlorofylů až o 60 %. Zmražením tak pravděpodobně došlo k eliminaci rozkladných procesů chlorofylové struktury. Největší úbytek chlorofylu u skladovaného, mraženého, blanširovaného špenátu byl sledován do 18. týdnu skladování.

V dalších týdnech už byla koncentrace chlorofylu téměř neměnná. U vzorků, které před mražením blanširované nebyly, tomu bylo přesně naopak. Pokles obsahu chlorofylu ve zmraženém neblanširovaném špenátu byl znatelný po 18. týdnu skladování, do té doby se obsah chlorofylu příliš neměnil. Na základě těchto výsledků bylo odvozeno, že proces blanširování bude mít význam při dlouhodobém skladování mraženého špenátu.

6 Diskuse

Výsledky této práce ukazují, že proces blanšírování je z hlediska stabilizace barvy rostlinného materiálu prospěšný. Vzhledem k tomu, že je toto tepelné zpracování krátké a šetrné, nedochází k velkým barevným změnám chlorofylu a naopak zabraní jeho degradačním procesům v průběhu delšího skladování rostlinného materiálu. Jinak je tomu u tepelných úprav za vyšších teplot a delší doby působení.

Ahmed et al., (2002) též studovali tepelnou úpravou listů špenátu. Pro stabilizaci zelené barvy přidávali uhličitan hořečnatý již ve fázi zahřívání. Testovali působení odlišných teplot a délek působení. Došli k závěru, že čím delší doba působení tepla na špenát byla, tím byly ztráty zeleného barviva vyšší.

Turkmen et al. (2006) se zabývali obsahem chlorofylu v blanšírované a vařené listové zelenině. Blanšírování prováděli v nerezové nádobě ve vodě za teploty 95-98 °C po dobu 30 sekund a zeleninu vařili po dobu 4-15 min ve vroucí vodě. Chlorofyly byly extrahovány čistým acetonem. Měření absorbance bylo provedeno na spektrofotometru Shimadzu UV-160A při vlnových délkách 661,6 a 644,8 nm. Ve srovnání s čerstvým materiálem se blanšírováním podstatně snížil obsah chlorofylu u všech druhů zkoumané zeleniny. Delším tepelným zpracování, tedy vařením, došlo k vyšším ztrátám celkového obsahu chlorofylů o 4-10 % ve srovnání s blanšírovaným materiálem.

Očekávaný pokles obsahu chlorofylu vlivem blanšírování v této práci v prvním momentě nenastal. Bezprostředně po blanšírování špenátu se naopak obsah chlorofylu zvýšit o 7 % než před ním. K degradaci rostlinného barviva docházelo až při dlouhodobém skladování. Pokles koncentrace chlorofylu byl minimální a dále byl již jeho obsah stabilizován a udržován v konstantním množství po delší dobu uskladnění. Jen pár autorů zmiňuje počáteční nárůst zelené barvy při zahřívání.

Herrmann (1993) uvádí, že blanšírování po dobu 30 sekund má za následek vyšší obsah zelené barvy u blanšírovaných zelených fazolek. Lau a kol. (2000) zaznamenali také počáteční nárůst zelené barvy zeleného chřestu vlivem tepelných úprav při 70 a 98 °C. Tijssens et al. (2001) se zabývali změnou barvy u blanšírovaných fazolek a brokolice při teplotním rozmezí 40-96 °C a došli k závěru, že čím vyšší je teplota blanšírování, tím vyšší je nárůst barvy, ale současně se barva začíná rozkládat.

Důvod tohoto barevného nárůstu způsobené krátkým blanšírováním není přesně znám. Mohlo by to být důsledkem fyzikálních změn rostlinné matrice v důsledku snížení nepropustnosti, nahrazením mezibuněčného vzduchu blanšírovanou vodou nebo uvolnění

buněčného obsahu vlivem poškození buněčné membrány. Dalším možným vysvětlením by mohlo být to, že tepelné zpracování postupně ničí buněčné membrány, což má za následek možný kontakt mezi enzymy a prekurzory sloučenin chlorofylu přítomných v různých organelách. V každém případě, celkový efekt je, že zelená barva se zvyšuje v průběhu počátečního krátkého blanšírování. Pozdější pokles barvy během blanšírování lze připisat chemickému rozkladu zelených složek spolu se ztrátou uvolněných barevných sloučenin přestupem do blanšírované vody (Weemaes et al., 1999).

López-Ayerra et al. (1998) ve své studii uvádí, že ze všech čerstvých vzorků špenátu se extrahuje více chlorofylu A než chlorofylu B. Zároveň je chlorofyl A labilnější než chlorofyl B vzhledem k jeho větší citlivosti na feofytinizaci během ohřevu, jak se také uvádí v dřívější studii.

Stejně tomu bylo i v této diplomové práci. Výtěžnost chlorofylu A z analyzovaného špenátu byla sice za všech podmínek vždy vyšší, v průměru až o 60 %, než u chlorofylu B, ovšem v průběhu degradace byly zaznamenány také větší úbytky chlorofylu A.

Teng a Chen (1999) zaznamenali obsah chlorofylu A a B v čerstvém špenátu byl 14,10 a 6,23 mg/g vztažen na sušinu materiálu, což představuje daleko vyšší hodnoty, než ty, které byly naměřeny zde. Rychlostní konstanta degradace chlorofylu byla vyšší u chlorofylu A, než chlorofylu B u vařeného listového špenátu. Snížení obsahu chlorofylu A a B lze připisat degradaci obou chlorofylů na jejich hlavní deriváty feofytin A a B. Feofytin A a B byly nalezeny v nejvyšším množství za varu, následně v páře a v mikrovlnné troubě. Kromě toho množství feofytinu A bylo větší než feofytinu B u vařeného špenátu bez ohledu na způsob tepelného zpracování (López-Ayerra et al., 1998).

V diplomové práci se ukázalo, že blanšírování před zmražením špenátu má vliv na stabilizaci barvy při delší době uchování. Špenát, který nebyl blanšírován, měl sice vyšší obsah chlorofylu, ale docházelo k silnější degradaci po 4. měsíci skladování. Blanšírovaný špenát si po 4. měsíci uchovával téměř neměnnou koncentraci chlorofylu až do 10. měsíce skladování.

Oruña-Concha et al. (1997) pozorovali jiný průběh degradace zeleného barviva. Studovali obsah chlorofylu A a chlorofylu B u mražených blanšírovaných a neblanšírovaných fazolek a paprik po dobu 12 měsíců při teplotě -22 °C. Zaznamenali pokles obsahu chlorofylu u neblanšírovaných fazolek již v prvních měsících a v následujícím období došlo ke stabilizaci. Podobné výsledky byly získány u blanšírovaných fazolí, ale zde byl pokles ihned

zpočátku způsoben blanšírováním. Labib et al. (1997) naopak uvádějí, že tři měsíce skladování blanšírovaného špenátu při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ nemá vliv na obsah chlorofylu. Lisiewska et al. (2007) ve svém experimentu prokázali 0-12% ztráty celkového chlorofylu po 4 měsících, 4-19% po 8 měsících a 7-28% po 12 měsících skladování neblanšírovaného mraženého špenátu. Zmražený špenát uskladněný při nižší teplotě obsahoval pouze o 5 % více chlorofylu ve srovnání s vyššími teplotami skladování. Analyzovaný blanšírovaný špenát dosáhl v tomto experimentu až 16% ztrát chlorofylu v prvních čtyřech měsících skladování, po 8. měsíci byl zaznamenán úbytek chlorofylu do 18 % a po 10. měsíci uskladnění došlo až k 20 % ztrátám chlorofylu.

7 Závěr

Souhrnně lze konstatovat, že struktura chlorofylu je velmi náchylná k rozkladným procesům, především vlivem fyzikálních a chemických změn během zpracování potravin. Existuje však mnoho způsobů, jak těmto nežádoucím vlivům předcházet. Z výsledků experimentální části diplomové práce je prokázáno:

- Metoda blanšírování je díky nižší teplotě a krátké doby působení vhodnou tepelnou úpravou. Inaktivací enzymů dochází k zamezení poklesu barevné intenzity zeleniny.
- Blanšírování je výhodným krokem před zmražením zeleniny a jejím dlouhodobým skladování v mrazničce. Rozkladné procesy chlorofylu nejsou tak markantní, jako v případě mražené zeleniny, která není takto předem ošetřena.
- Potvrdil se příznivý vliv uhličitanu hořečnatého na stabilizaci zeleného barviva. Přídavkem MgCO_3 se předchází narušení struktury chlorofylu a tvorbě degradačních produktů chlorofylu.
- Rychlým zpracováním chlorofylových extraktů za temnějších podmínek se sníží degradační procesy.

8 Seznam použité literatury

Agócs, A., Deli, J. 2011. Pigments in your food. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24 (6). 757-759.

Ahmed, J., Kaur, A., Shivhare, U. 2002. Color degradation kinetics of spinach, mustard leaves, and mixed puree. *Journal of Food Science*. 67 (3). 1088-1091

Bener, M., Özyürek, M., Güçlü, K., Apak, R. 2010. Polyphenolic contents of natural dyes produced from industrial plants assayed by HPLC and novel spectrophotometric methods. *Industrial Crops and Products*. 32 (3). 499-506.

Burdulis, D., Sarkinas, A., Jasutiene, I., Stackevicene, E., Nikolajevs, L., Janulis, V. 2008. Comparative study of anthocyanin composition, antimicrobial and antioxidant activity in bilberry (*Vaccinium myrtillus L.*) and blueberry (*Vaccinium corymbosum L.*) fruits. *Acta poloniae pharmaceutica*. 66 (4). 399-408.

Clydesdale, F. M., Francis, F. J. 1976. Pigments. *Food chemistry*. 385-426.

Dailey, 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

Drake, S. R., Spayd, S. E., Thompson, J. B. 1981. The influence of blanch and freezing methods on the quality of selected vegetables. *Journal of Food Quality*. 4 (4). 271-278.

Drazkiewicz, M. 1994. Chlorophyllase: occurrence, functions, mechanism of action, effects of external and internal factors. *Photosynthetica*. 30. 321- 331.

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.

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.

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

Gandía-Herrero, F., Escribano, J., García-Carmona, F. 2010. Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. *Planta*. 232 (2). 449-460.

- 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
- Gross, J. 1991. *Pigments in vegetables, chlorophyll and carotenoids*. Van Nostrand-Reinhold. New York. p. 351. ISBN: 04-420-06578
- Haisman, D. R., Clarke, M. W. 1975. 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.
- 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.
- Humphrey, A. M. 2004. Chlorophyll as a color and functional ingredient. *Journal of food science*. 69 (5). 422-425.
- 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.
- 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.
- Jeremiah, L. E. 1996. *Freezing effects of food quality*. Marcel Dekker Inc. p. 520. ISBN:0824793501.
- Jones, I. D., White, R. C., Gibbs E. 1961. The formation of pheophorbides during brine preservation of cucumbers. *Food Technology*. 15. 172.
- Krebbers, B., Matser, A. M., Koets, M., Van den Berg, R. W. 2002. Quality and storage-stability of high-pressure preserved green beans. *Journal of Food Engineering*. 54 (1). 27-33.
- Labib, A. A., El-Latife, S. A. A., Omran, H. 1997. Quality indices of Jew's mallow and spinach during frozen storage. *Plant foods for human nutrition*. 50 (4). 333-347.
- 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.
- Lazze, M. C., Savio, M., Pizzala, R., Cazzalini, O., Perucca, P., Scovassi, A. I., Bianchi, L. 2004. Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines. *Carcinogenesis*. 25 (8). 1427-1433.

- 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.
- Lisiewska, Z., Gębczyński, P., Kmiecik, W. 2007. Effects of the methods of pre-treatment before freezing on the retention of chlorophylls in frozen leaf vegetables prepared for consumption. *European food research and technology*. 226 (1-2). 25-31.
- Lisiewska, Z., Gębczyński, P., Bernaś, E., Kmiecik, W. 2009. Retention of mineral constituents in frozen leafy vegetables prepared for consumption. *Journal of Food composition and Analysis*. 22 (3). 218-223.
- López-Ayerra, B., Murcia, M. A., Garcia-Carmona, F. 1998. Lipid peroxidation and chlorophyll levels in spinach during refrigerated storage and after industrial processing. *Food chemistry*. 61 (1). 113-118.
- MacDougall, D. B. 2002. *Colour in Food – Improving Quality*. CRC Press. USA. p. 378. ISBN: 0849315425.
- Martins, R. C., Silva, C. L. M. 2002. Modelling colour and chlorophyll losses of frozen green beans (*Phaseolus vulgaris, L.*). *International Journal of Refrigeration*. 25 (7). 966-974.
- Matile, P., Hörtensteiner, S., Thomas, H. 1999. Chlorophyll degradation. *Annual review of plant biology*. 50 (1). 67-95.
- Matser, A. M., Krebbers, B., van den Berg, R. W., Bartels, P. V. 2004. Advantages of high pressure sterilisation on quality of food products. *Trends in Food Science & Technology*. 15 (2). 79-85.
- Muthukumarappan, K., Marella, C. 2007. 12 Food Freezing Technology. In: Kutz, M. (ed.). *Handbook of Farm, Dairy, and Food Machinery*. p. 341-365. ISBN: 978-0-8155-1538-8.
- Oey, I., Lille, M., Van Loey, A., Hendrickx, M. 2008. Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit-and vegetable-based food products: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 19 (6). 320-328.
- Offenkrantz, W. G. 1950. Water-soluble chlorophyll in the treatment of peptic ulcers of long duration. *The Review of gastroenterology*. 17 (5). 359.
- 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.
- Owens, T. G., Falkowskit, P. G. 1982. Enzymatic degradation of chlorophyll a by marine phytoplankton in vitro. *Phytochemistry*. 21 (5). 979-984.
- Ponne, C. T., Baysal, T., Yuksel, D. 1994. Blanching leafy vegetables with electromagnetic energy. *Journal of Food Science*. 59(5). 1037-1041.

- Rathouský V. 2008. Učebnice zelených potravin – *Chlorella pyrenoidosa*. Green Ways s.r.o., Staré Město. 103 s.
- Ramaswamy, H., Marcotte, M. 2006. Thermal processing. In. Ramaswamy, H., Marcotte M. (eds.). Food processing: principles and applications. CRC Press. New York. 67-168. ISBN: 1-58716-008-0
- Reinbothe, S., Reinbothe, C. 1996. Regulation of chlorophyll biosynthesis in angiosperms. Plant physiology. 111 (1). 1-7.
- Robinson, D. S. 1991. Peroxidases and their significance in fruits and vegetables. Food enzymology. 1. 399-426.
- Senge, M. O., Ryan, A. A., Letchford, K. A., MacGowan, S. A., Mielke, T. 2014. Chlorophylls, Symmetry, Chirality, and Photosynthesis. Symmetry. 6 (3). 781-843.
- Schwartz, S. J., Lorenzo, T. V. 1990. Chlorophyll in food. Critical Review in Food Science and Nutrition. 29 (1). 1-17
- Simpson, B. K. 2012. Food Biochemistry and Food Processing (2nd Edition). Wiley-Blackwell. USA. p. 910. ISBN: 9781118308042.
- 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
- Taoukis, P. S., Labuza, T. P. 2003. Time-temperature indicators (TTIs). Novel food packaging techniques. 103-126.
- Tijsskens, L. M. M., Schijvens, E. P. H. M., Biekman, E. S. A. 2001. Modelling the change in colour of broccoli and green beans during blanching. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2 (4). 303-313.
- Teixeira A. A., Tucker G. S. 1997. On-line retort control in thermal sterilization of canned foods. Food Control. 8 (1). 13-20.
- Teng, S. S., Chen, B. H. 1999. Formation of pyrochlorophylls and their derivatives in spinach leaves during heating. Food chemistry. 65 (3). 367-373.
- Terpstra, W. 1981. Identification of chlorophyllase as a glycoprotein. FEBS Letters, 126 (2). 231-235.
- Turkmen, N., Poyrazoglu, E. S., Sari, F., Sedat Velioglu, Y. 2006. Effects of cooking methods on chlorophylls, pheophytins and colour of selected green vegetables. International journal of food science & technology. 41 (3). 281-288.
- Tsuchiya, T., Ohta, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Shimada, H., Masuda, T., Takamiya, K. I. 1999. Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate. Proceedings of the National Academy of Sciences. 96 (26). 15362-15367.

- Van Boekel, M. A. J. S. 1999. Testing of kinetic models: usefulness of the multiresponse approach as applied to chlorophyll degradation in foods. *Food Research International*. 32 (4). 261-269.
- Van Buggenhout, S., Lille, M., Messagie, I., Van Loey, A., Autio, K., Hendrickx, M. 2006. Impact of pretreatment and freezing conditions on the microstructure of frozen carrots: Quantification and relation to texture loss. *European Food Research and Technology*. 222 (5-6). 543-553.
- Van Loey, A., Ooms, V., Weemaes, C., Van den Broeck, I., Ludikhuyze, L., Indrawati, Hendrickx, M. 1998. Thermal and pressure-temperature degradation of chlorophyll in broccoli (*Brassica oleracea L. italica*) juice: a kinetic study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46 (12). 5289-5294.
- Vicentini, F., Hörtensteiner, 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 (2). 247-252.
- Von Wettstein, D., Gough, S., Kannangara, C. G. 1995. Chlorophyll biosynthesis. *The Plant Cell*. 7 (7). 1039-1057.
- 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.
- Wrolstad, R. E., Acree, T. E., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, CH. F., Smith, D. M., Sporns, P. 2004. *Handbook of food analytical chemistry pigments, colorants, flavours, texture and bioactive food components*. Wiley-Interscience. USA. p. 624. ISBN: 0471721875.
- Yaronskaya, E. Grimm, B. 2006. The pathway from 5-aminolevulinic acid to protochlorophyllide and protoheme. In: Grimm, B., Porra, R. J., Rüdiger, W., Scheer, H. (eds.). *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications*. Springer: Dordrecht. The Netherlands. 25, p. 173–188.

9 Seznam zkratek

ALA	δ -aminolevulová kyselina
ATP	Adenosintrifosfát
cChl	Koncentrace chlorofylu
ChlA	Chlorofyl A
ChlB	Chlorofyl B
JECFA	The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
MgCO ₃	Uhličitan hořečnatý