Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin

Inhibice oxidačních změn chlazeného kachního masa pomocí silic enkapsulovaných do nanočástic

Diplomová práce

Bc. Kateřina Zemanová

Výživa a potraviny AMD

Doc. Ing. Pavel Klouček, Ph. D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Inhibice oxidačních změn chlazeného kachního masa pomocí silic enkapsulovaných do nanočástic" 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 12. 4. 2019 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala panu doc. Ing. Pavlu Kloučkovi, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce a panu Albertu Juan Ruiz Del Valle za analýzu vzoků na NMR a sdílení jeho odborných znalostí při vyhodnocování praktické části.

Inhibice oxidačních změn chlazeného kachního masa pomocí silic enkapsulovaných do nanočástic

Souhrn

Tato diplomová práce se zabývá oxidací lipidů v kachním mase. Oxidace je jedním z hlavních příčin kažení a rychlé zkázy masa. Těmto procesům se v potravinářském průmyslu snažíme zabránit. Vzhledem k nepříznivým a mnohdy toxickým účinkům syntetických aditiv se proto zkoumají nové možnosti využití přírodních látek mezi které esenciální oleje jednoznačně patří. V této práci byl použit esenciální olej z oregana jako inhibitor oxidačních změn v kachním mase.

V rámci stanovené časové osy (24 hodin, 48 hodin, 4 den a 8 den) byly zpracovány vzorky jak ošetřené, tak neošetřené (kontrolní vzorky). Extrakce tuku byla provedena pomocí Soxhleta na automatizovaném přístroji Soxtec, Foss. Standardní způsob analýzy oxidace tuků je TBARS metoda. V této práci však bylo využito nově se rozmáhající NMR spektrometrie, která má hned několik výhod a za relativně krátký čas je schopna poskytnout širokou škálu informací.

Analýza vzorků byla tedy provedena pomocí NMR (Bruker Avance II, 500 MHz) a vyhodnocena v příslušném programu Mestrenova. Vždy bylo provedeno 32 skenů na vzorek.

Na základě statistického hodnocení můžeme říci, že účinek silice měl opravdu inhibiční účinky zejmnéna u hydroperoxidů nacházejících se v posunech 2,00 ppm, 4,22 ppm, 4,30 ppm a 5,40 ppm. Oreganová silice výskytu peroxidu zabránila úplně, oddálila jeho výskyt či výrazně zredukovala jeho množství ve vzorku na minimální hodnotu v porovnání se vzorky neošeřenými.

Klíčová slova: silice, nanoenkapsulace, kvalita masa, přírodní antioxidanty, oxidace lipidů

Inhobition of oxidative changes in chilled duck meat by essential oils encapsulated into nanoparticles

Summary

This thesis focused on lipid oxidation in duck meat. Oxidation is one of the main cause of spoilage and rapid fat deterioration in meat. We are trying to prevent these processes in the food industry. Due to the unfavorable and often toxic effects of synthetic additives, new possibilities of using natural substances, where essential oils clearly belong, are investigated. In this work, essential oil from oregano was used as an inhibitor of oxidative changes in duck meat.

Within the determined timeline (24 hours, 48 hours, 4 days and 8 days), samples both treated with oregano essential oil and untreated (control) were processed. Fat extraction was performed with automated Soxhlet extractor (Soxtec, Foss). The standard method of analyzing the oxidation is the TBARS method. In this work, however, newly used NMR spectrometry was used, which has several advantages and in a relatively short time it is able to provide a wide range of informations.

Therefore, the analysis of samples was performed by NMR (Bruker Avance II, 500 MHz) and evaluated in the Mestrenova program, 32 scans per sample were performed.

Based on statistical evaluation, it can be said that the effect of essential oil had inhibitory effect especially in hydroperoxides found in shifts 2.00 ppm, 4.22 ppm, 4.30 ppm and 5.40 ppm. Oregano essential oil has prevented peroxide oxidation completely, delayed its occurrence, or significantly reduced the amount in the sample to a minimum compared to untreated samples.

Keywords: essential oils, nanoencapsulation, quality of meat, natural antioxidants, lipid oxidation

Obsah

1 Úvod **11**

2 Cíl práce **12**

2.1 Vědecká hypotéza **12**

2.2 Cíl práce **12**

3 Literární rešerše **13**

3.1 Chemické složení masa **13**

3.2 Definice lipidů **13**

3.2.1 Klasifikace lipidů 14

3.2.2 Význam lipidů ve stravě 14

3.2.3 Mastné kyseliny 15

3.2.3.1 Nasycené mastné kyseliny 16

3.2.3.2 Nenasycené mastné kyseliny 16

3.3 Kachní maso **17**

3.3.1 Vitamíny 17

3.3.2 Minerální látky 19

3.3.3 Složení kachního tuku 19

3.4 Oxidace lipidů **21**

3.4.1 Autooxidace 22

3.4.2 Primární oxidační produkty 23

3.4.3 Sekundární oxidační produkty 26

3.5 Silice **26**

3.5.1 Využití silic 27

3.5.2 Získávání silic 28

3.5.3 Biologická aktivita silic 29

3.6 NMR spektroskopie **29**

3.6.1 Základní princip 30

4 Materiál a metody **31**

4.1 Příprava směsí pro ošetření vzorku **31**

4.2 Příprava vzorku **31**

4.3 Zpracování vzorku pro extrakci **32**

4.4 Extrakce tuku **32**

4.5 Příprava vzorku pro NMR **33**

4.6 Senzorická analýza **33**

5 Výsledky **34**

6 Diskuze **41**

7 Závěr **44**

8 Literatura 45

9 Seznam použitých zkratek a symbolů 49

1 Úvod

Tuky a oleje jsou součástí mnoha debat o zdravém životním stylu a racionálního stravování. Jejich nezbytnost v lidském jídelníčku je však známa desítky let. Kvalita ať už rostlinných či živočišných tuků ve stravě je tak pro konzumenty důležitý faktor, který při výběru potravin hraje značnou roli.

Oxidace lipidů je jedním z hlavních faktorů ovlivňující kvalitu masa, způsobuje jeho kažení a ovlivňuje jeho přijatelnost spotřebiteli. K oxidaci může dojít při manipulaci, zpracování, skladování ale i samotné kulinární úpravě masa. K zachování jakosti a vysoké kvality nejenom produktů živočišných se snažíme těmto procesům zabraňovat. Primární oxidační produkty, zejména hydroperoxidy, se mohou tvořit již po prvních 24 hodinách a vzhledem ke své vysoké reaktivitě a nízké stabilitě rychle reagují za vzniku široké škály sekundárních oxidačních produktů, které mohou být i toxické pro náš organismus.

Přírodní látky, zejména esenciální oleje, jsou nabízející se alternativou k syntetickým přídatným látkám a aditivům. Esenciální oleje byly uznány WHO (Světovou zdravotnickou organizací) a FDA jako GRAS jako bezpečné pro použití v lidské výživě a potravinářství. Jsou hojně využívané právě pro celou škálu pozitivních vlastnotí mezi něž patří právě antioxidační účinky. Prodlužují tak dobu trvanlivosti výrobků (Dutra et al. 2019).

Detekce oxidačních produktů pomocí NMR spektroskopie je nově využívanou metodou nejenom v potravinářském průmyslu. Skrývá v sobě vysoký potenciál a mnoho výhod oproti jiným analytickým metodám. Postupem času je velká pravděpodobnost, že najde své uplatnění jako standartní metoda detekce oxidačních produktů nejenom v olejích, kde je již hojně využívána, ale i v masných produktech či jiných potravinářských komodit podléhající rychlé zkáze.

2 Cíl práce

2.1 Vědecká hypotéza

Silice enkapsulované do nanočástic budou vykazovat výhodné antioxidační vlastnosti a pomohou tak zabránit oxidačním změnám kachního masa a prodloužit jeho údržnost a zachovat jeho kvalitu. Oxidační změny bude možné detekovat pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR).

2.2 Cíl práce

Cílem práce je pomocí aplikace silic enkapsulovaných do nanočástic nalézt vhodný způsob inhibice negativních oxidačních změn při skladování chlazeného kachního masa a dále vyhodnotit možnost sledování oxidačních změn pomocí NMR.

3 Literární rešerše

3.1 Chemické složení masa

Již po staletí je maso je nedílnou součástí lidského jídelníčku. Jedná se především o kosterní svalovinu živočichů, ale i jiných poživatelných částí z nich, vhodných pro výživu lidí. Mimo svaloviny se tak jedná i o tuk, šlachy, vazy, vnitřní orgány a jiné.

V lidské stravě a jídelníčku člověka tak maso hraje celkem významnou roli. Mimo vysokého obsahu vody, který je zhruba 70 až 75 %, obsahuje kvalitní, vysoce biologicky hodnotné bílkoviny s aminokyselinami nezbytnými pro náš organismus. Obsah bílkovin v mase může být až 20 %. Tuk, převážně intermuskulární, výrazně ovlivňuje chuť masa a jeho senzorickou přijatelnost spotřebiteli. Jedná se o bohatý zdroj energie a obsah tuku v mase je z velké části závislý na druhu zvířete a části, ze které pochází. Obecně se množství tuku pohybuje mezi 1 až 5 %. Mimo makro živin, obsahuje také minerální látky, a to převážně železo, selen a zinek, z vitamínů pak nejvíce vitamíny skupiny B (Britannica Academic 2018).

Jednotlivé hodnoty se mohou nepatrně lišit v závislosti na druhu zvířete, jeho věku, části těla odkud maso pochází, stravě či chovu.

3.2 Definice lipidů

Přesná a jednoznačná definice lipidů neexistuje. Liší se od autora k autoru. Záleží tak na doposud získaných znalostech a osobní interpretaci. Pro příklad, v knize Food Chemistry 1996 autoři uvádí příklady definic lipidů od různých autorů z nichž jedna definuje tuky jako "širokou škálu přírodních produktů včetně mastných kyselin a jejich derivátů, steroidů, terpenů, karotenoidů a žlučových kyselin, které mají společnou rozpustnost v organických rozpouštědlech, jako je například diethylether, hexan, chloroform nebo methanol" (Akoh & Min 2002; Christie 1982).

Jiná definice tvrdí, že lipidy jsou "látky, které (a) jsou nerozpustné ve vodě; (b) rozpustné v organických rozpouštědlech, jako je chloroform, ether nebo benzen; (c) obsahují ve svých molekulách uhlovodíkové skupiny s dlouhým řetězcem; a (d) jsou přítomny v živých organismech nebo z nich pocházejí" (Akoh & Min 2002; Kates 2010).

Všeobecně můžeme říci, že lipidy jsou látky rozpustné v organických rozpouštědlech a nemísitelné s vodou, skládající se z mnoha sloučenin (Fennema 1996).

3.2.1 Klasifikace lipidů

Lipidy jsou vydatným zdrojem energie pro naše tělo a řadí se mezi makronutrienty, látky nezbytné pro správnou funkci našeho organismu. Jeden gram tuku představuje přibližně 9 kcal = 37,7 kJ energie. Oproti sacharidům a bílkovinám, které shodně obsahují 4 kcal = 17 kJ energie, se tak jedná o nezanedbatelný zdroj energetického příjmu pro organismus. Mimo zásobní funkce, kterou v organismu bezesporu zastávají, umožňují i vstřebávání lipofilních vitamínů z potravy jako jsou vitamín A, D, E a K (Murray 2002).

Klasifikace lipidů je možná na základě mnoha jejich vlastností. Jedním z nich je stav připokojové teplotě. Oleje zůstavájí v tekutém stavu, tuky si pak zachovávají stav pevný. Dalším faktorem je polarita či jejich struktura. Neutrální lipidy mezi něž patří mastné kyseliny, alkoholy, glyceridy a steroly, zatímco polární lipidy zahrnují glycerofosfolipidy a glyceroglykolipidy. V neposlední řadě pak i význam a potřeba lipidů pro člověka, kde rozlišujeme esenciální a neesenciální mastné kyseliny. Esenciální mastné kyseliny si naše tělo nedovede samo syntetizovat, jsme tak odkázáni na jejich přísun ve stravě (Akoh & Min 2002).

Na základě struktury mohou být lipidy klasifikovány jako odvozené, jednoduché nebo složité. Odvozené lipidy zahrnují mastné kyseliny a alkoholy, které jsou základními složkami jednoduchých a komplexních lipidů. Jednoduché lipidy jsou složené z mastných kyselin a alkoholu. Patří do nich acylglyceroly a vosky. Obecně lze jednoduché lipidy hydrolyzovat na dvě různé složky, obvykle alkohol a mastnou kyselinu.

Komplexní lipidy zahrnují glycerofosfolipidy (fosfolipidy), glyceroglykolipidy (glykolipidy) a lipoproteiny. Tyto struktury poskytují při hydrolýze tři nebo více různých sloučenin (Akoh & Min 2002).

3.2.2 Význam lipidů ve stravě

Lipidy hrají v našem jídleníčku nezastoupitelnou roli a na jejich konzumaci bychom rozhodně neměli zapomínat. Denní příjem by měl činit 20-30 % energie z celkového denního příjmu. Z toho by nasycené mastné kyseliny měli tvoři maximálně 10 %.

Lipidy jsou součástí buněk a jsou nezbytné pro tvorbu hormonů. Účastní se také mnoha životně důležitých procesů v těle. Jsou složkou buněčných membrán, prekurzory aktivních molekul, regulují enzymovou aktiviru či expresi genů. Nevhodná skladba tuků v jídelníčku však může představovat rizika spojená s rozvojem aterosklerozy (resp. ischemické choroby

srdeční), kardiovaskulární onemocnění včetně infarktu myokardu a cévních mozkových příhod (Murray 2002; EFSA 2010). Právě kardiovaskuární onemocnění jsou jedna z hlavních příčin úmrtí nejenom v České Republice ale i ve světě. Jejich výskytu se však dá předcházet správnou výživou.

Nadměrný příjem lipidů je také spojován s mnoha civilizačními onemocněními jako je obezita, diabetes mellitus či tvorba žlučníkových kamenů. Právě z těchto důvodů se doporučuje hlídat příjem lididů a jejich skladba (Murray 2002).

Největší pozornost je věnována nenasyceným mastným kyselinám. Ty hrají v naší stravě nezastoupitelnou roli. Jedná se o esenciální mastné kyseliny, které si náš organismus není schopen syntetizovat. Jejich příjem ve stravě je tak nezbytný pro náš organismus a jeho správné fungování. Nenasycené mastné kyseliny mají příznivý vliv na hladinu cholesterolu, kterou pomáhají snižovat. Jsou tak vhodné v prevenci kardiovaskulárních onemocnění a předcházejí komplikacím s nimi spojenými. Při jejich nedostatku však může docházet k poruchám vývoje, růstu organismu či poruchám imunity (Trojan, 2003).

3.2.3 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny jsou primární složkou lipidů. Vyskytují se nejenom v živočišných strukturách ale i v rostlinách a mikroorganismech. Mastné kyseliny jsou obecně tvořeny uhlíkovými řetězci se sudým počtem uhlíků zakončenými z jedné strany atomem vodíku a ze strany druhé karboxylovou skupinou (-COOH), která bezesporu dělá mastnou kyselinu kyselinou (The Editors of Encyclopaedia Britannica 2019).

Délka uhlíkového řetězce a stupeň jeho nasycení je mezi jednotlivými mastnými kyselinami variabilní. Nasysená mastná kyselina ve svém řetězci neobsahuje žádnou dvojnou vazbu, mezi jednotlivými uhlíky tak najdeme pouze vazby jednoduché. Pokud je jedna nebo více vazeb mezi uhlíky dvojnásobná či trojnásobná mastná kyselina je nenasycená (Velíšek 1999).

Ve volném stavu se mastné kyseliny v přírodě nevyskytují. Obvykle je můžeme najít v kombinaci s glycerolem, což je alkohol, ve formě triglyceridů či ve formě fosfolipidů nebo esterů cholesterolu (Moss et al. 1995; Editors 2014; The Editors of Encyclopaedia Britannica 2019).

3.2.3.1 Nasycené mastné kyseliny

Nasycené mastné kyseliny jsou převážně kyseliny tvořící dlouhé uhlovodíkové řetězce. Vazby mezi uhlíky jsou jednoduché, nevyskytujese v jejich řetězci žádná dvojná vazba. Nacházejí se především v potravinách živočišného původu, kde jsou ve většině případech doprovázeny cholesterolem. Zvyšují hladinu LDL lipoproteinů a často jsou spojovány s výskytem aterosklerozy a jejich příjem v potravě by tak měl být regulován (Murray 2002; Velíšek 1999)

Nejčastější zastoupení v potravinách má pravděpodobně kyselina palmitová a kyselina stearová. Mezi nasycené mastné kyseliny pak také patří například kyselina myristová, arachidonová či kyselina laurová.

3.2.3.2 Nenasycené mastné kyseliny

3.2.3.2.1 Monoenové mastné kyseliny

Monoenové mastné kyseliny mají ve svém řetězci jednu dvojnou vazbu. Poraviny s obsahem monoenových mastných kyselin snižují LDL cholesterol, který je považován za špatný a zvyšují HDL cholesterol tzv. „dobrý cholesterol“. Patří sem kyselina olejová, která má v potravinách jak živočišného, tak rostlinného původu značné zastoupení.

3.2.3.2.2 Polyenové mastné kyseliny

Polynenasycené mastné kyseliny se vyskytují především ve skořápkových plodech, semínkách, rybách, rostlinných olejích či řasách. V menším množství se vyskytují i v mase. V jejich řetězci se mezi uhlíky nachází dvě a více dvojných vazeb. Patří mezi ně i esenciální mastné kyseliny, které si nejsme schopni sami syntetizovat a je nutno je přijímat potravou. Stejně jako monoenové mastné kyseliny snižují hladinu LDL cholesterolu a jejich příjem je nezbytný pro řadu biologických procesů z jedním z nich je tvorba prostaglandinů. Patří sem kyselina linolová, alfa-linolenová či kyselina eikosapentaenová (EPA) a kyselina dokosahexaenová (DHA) (SkipThePie 2011).

Za zmínku patří kyselina alfa-linolenová, esenciální mastná kyselina patřící do omega 3 mastných kyselin. Tato mastná kyselina není v našem těle syntetizována. V menším množství však může být v našem těle přeměněna na kyselinu eikosapentaenovou (EPA) a kyselinu dokosahexaenovou (DHA) (EFSA 2010).

3.3 Kachní maso

Pro praktickou část této diplomové bylo použito kachní maso zbavené kůže. Výživové hodnoty kachního masa a zastoupení hlavních makroživin je možno vidět v tabulce 1. Maso obecně, nejenom to kachní, se skládá převážně z vody, která může obsahovat až 75 % (Britannica Academic 2018). Jako jedna z mála komodit obsahuje kvalitní plnohodnotné bílkoviny se širokým spektrem esenciálních aminokyselin nezbytných pro náš organismus. Aminokyseliny jsou stavební jednotky pro tvorbu proteinů a obnovu svalové tkáně. Mimo jiné jsou aminokyseliny substrátem pro tvorbu mnoha látek s nízkou molekulovou hmotností jako je kreatin, karnitin, hormony štítné žlázy, serotonin či melatonin (Guoyao 2013). Význam lipidů a jejich složení je uvedeno níže.

Tabulka 1: Výživové údaje kachního masa zbaveného kůže. Zdroj: USDA Food Composition Databases 2017.

Výživové údaje na 100 g syrového kachního masa, bez kůže	
Energy kJ / kcal	566/135
Tuky	5,95 g
z toho nasycené MK	3,32 g
Sacharidy	0,94 g
z toho cukry	0,0 g
Vláknina	0,0 g
Bílkoviny	18,28 g
Sůl	0,0 g

3.3.1 Vitamíny

Obsahu vitamínů v kachním mase si můžeme všimnout v tabulce 2. Maso obsahuje vitamíny skupiny B, a to konkrétně thiamin (B1), riboflavin (B2), niacin (B3), vitamín B6 avitamín B12. Dále je zdrojem řady vitamínů rozpustných v tucích jako je vitamín A, D či E. Obsah vitamínu C je v tabulce 2 také znázorněn, nicméně je dobré si uvědomit jeho ztrátu při tepelné úpravě (Fennema 1996).

V porovnání s ostatními vitamíny skupiny B je vitamín B12 esenciání pro naše tělo, které si ho není schopno samo syntetizovat. Jeho příjem v potravě je tak pro nás nezbytný. Jeho výskyt je pouze v potravinách živočišného původu, z toho důvodu je doporučeno tento

vitamín suplementovat ve veganské a vegetariánské stravě. Jeho denní příjem by měl činit 3µg na den (Gille & Schmid 2015).

Tabulak 2: Obsah vitamínů v kachním mase. Zdroj: USDA Food Composition Databases 2017.

Vitamíny, hodnota na 100 g syrového kachního masa, bez kůže	
Vitamín C	5,8 mg
Thiamin	0,360 mg
Riboflavin	0,450 mg
Niacin	5,300 mg
Pantothenová kyselina	1,600 mg
Vitamín B-6	0,340 mg
Kyselina listová	25 µg
Cholin	53,6 mg
Betaine	6,9 mg
Vitamín B12	0,40 µg
Vitamín A (Retinol)	24 µg
Vitamín E (alfa-tokoferol)	0,70 mg
Vitamín D (D2 + D3)	0,1 µg
Vitamín K	2,8 µg

3.3.2 Minerální látky

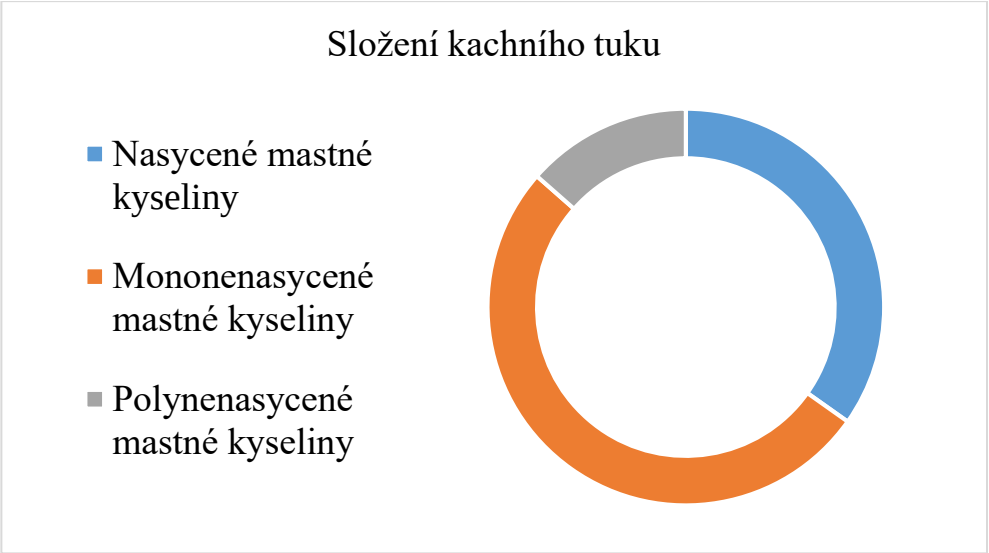
Maso je bohatým zdrojem minerálů, především železa a zinku (Arroyo 2019). V tabulce 3 pak vidíme kompletní seznam minerálních látek vyskytujících se kachním mase.

Tabulka 3: Obsah minerálních látek v kachním mase. Zdroj: USDA Food Composition Databases 2017.

Minerální látky, hodnota na 100 g syrového kachního masa, bez kůže	
Vápník, Ca	11 mg
Železo, Fe	2,40 mg
Magnesium, Mg	19 mg
Fosfor, P	203 mg
Draslík, K	271 mg
Sodík, Na	74 mg
Zinek, Zn	1,90 mg
Měď, Cu	0,253 mg
Mangan, Mn	0,019 mg
Selen, Se	13,9 mg

3.3.3 Složení kachního tuku

Podle dostupných informací 100 g kachního tuku obsahuje 49,3 g mononenasycených mastných kyselin, 12,93 % polynenasycených mastných kyselin a 33,27 % nasycených mastných kyselin z celkových 99,8 g kachního tuku. Obsah cholesterolu je 107 mg ve 100 g kachního tuku (USDA Food Composition Databases 2017). Jejich zastoupení si můžeme všimnout na obrázku 1.



Obrázek 1: Zastoupení mastných kyselin podle saturace v kachním mase.

Z mononenasycených mastných kyselin zaujímá první místo kyselina olejová, které je v kachním tuku obsaženo 44,2 g. Z polynenasycených mastných kyselin zaujímají celé jedno procento omega-3 mastné kyseliny, především kyselina alfa-linolenová (ALA). Obsah kyseliny dokosahexaenové (DHA), kyseliny dekosapentaenové (DPA) a kyselina eikosapentaenové (EPA) je pouze stopový. Omega-6 mastné kyseliny, z nich převládá kyselina linolová (LA) jsou zastoupeny ve 12 gramech. Zastoupení omega-6 nenasycených mastných kyselin je tak 12krát větší než omega-3 nenasycených mastných kyselin. Z nasycených mastných kyselin sev kachním tuku vyskytuje v největším zastoupenní kyselina palmitová (PAL; 24,7 g), dále pak kyselina stearová (SA; 7,8 g) či kyselina myristová (MA; 0,7 g) (USDA Food Composition Databases 2017; SkipThePie 2011). Podrobné zastoupení jednotlivých mastných kyselin najdeme v tabulce 4.

Tabulka 4: Zastoupení jednotlivých druhů mastných kyselin v kachním tuku. Zdroj: USDA Food Composition Databases 2017.

Mastné kyseliny & lipidy na 100 g	Množství (v gramech)
Tuky	99,8
Omega-3 mastné kyseliny	1
Omega-6 mastné kyseliny	12
Nasycené MK	33,2
Kyselina myristová	0,7
Kyselina palmitová	24,7
Kyselina stearová	7,8
Monoenové MK	49,3
Kyselina olejová	44,2
Kyselina palmitolejová	4
Polyenové MK	12
Kyselina linolová	1

3.4 Oxidace lipidů

Lipidy jsou primárně odpovědné za jak žádoucí, tak i nežádoucí příchuti a vůně masa. Vevětšině případů je oxidace lipidů odpovědna za zhoršenou kvalitu masa což následně souvisí s nežádoucí chutí. Ve většině případech dochází ke změně nejenom chuti ale i barvy či struktury masa a v neposlední řadě i k jiným nutričním hodnotám (Cheng 2016). Existují také některé další škodlivé účinky týkající se oxidace lipidů, včetně snížení doby trvanlivosti, zvýšení nepříznivé chuti, změna funkčních a senzorických vlastností a někdy i možná tvorba karcinogenních látek (Shahidi 1994).

Oxidace lipidů jinak nazýváno oxidační žluknutí, je možná dvěma způsoby, a to enzymaticky či bez přítomnosti enzymů tedy neenzymaticky (Pearson et al 1983).

3.4.1 Autooxidace

Oxidace vzdušným kyslíkem, dobře známa jako autooxidace je nejběžnější typ oxidace při skladování či zpracování produktů. Jedná se o autokatalytickou oxidaci mastných kyselin vzdušným (tripletovým 3O2) kyslíkem, který má dva nepárové elektrony a chová se jako biradikál. Dochází k oxidaci uhlíkového řetězce mastných kyselin, a to jak vázaných vtriacylglycerolu, tak volných. Autooxidace je závislá na teplotě a počtu dvojných vazeb. Při běžné pokojové teplotě se oxidují nenasycené mastné kyseliny, s vzrůstající vyšší teplotou na 100 °C oxidují nasycené mastné kyseliny. Čím více dvojných vazeb daný lipid má, tím více je mastná kyselina náchylnější k oxidaci (Doležal 2019).

Mechanismus autooxidace uhlíkového řetězce probíhá tzv. radikálovou řetězovou reakcí s volnými radikály. Ta se skládá ze tří základních mechanismů s to iniciace, propagace a terminace. Reakční mechanismus může být popsán takto (Kanner 1994).

Iniciace:

R-H → R• + •H

Propagace:

R• + O2 → R-O-O•

R-O-O• + R-H → R-O-O-H + R•

Terminace:

R-O-O• + R• → R-O-O-R

R• + R• → R-R

R-O-O• + R-O-O• → R-O-O-R + O_2

R-O• + R• → R-O-R

2R-O• + 2R-O-O• → 2R-O-O-R + O_2

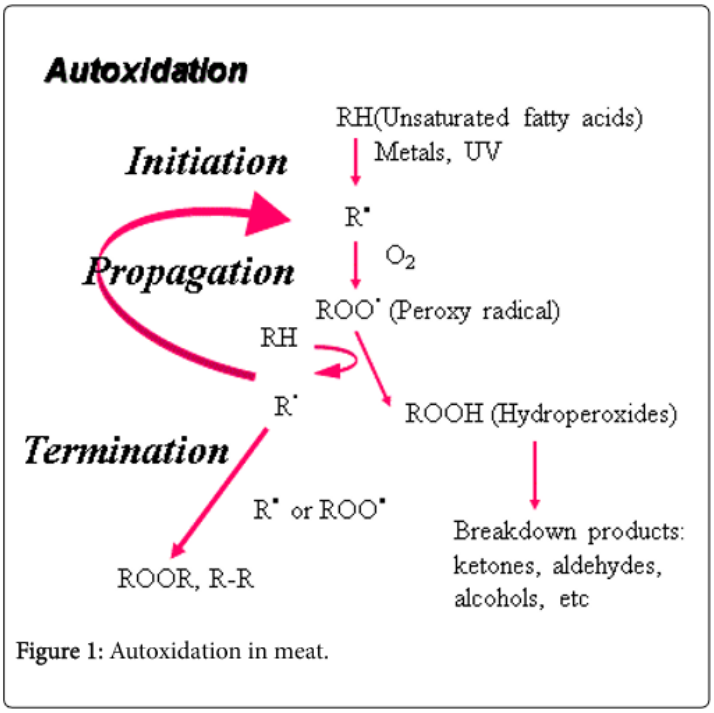


Figure 1: Autoxidation in meat.

Obrázek 2: Proces autooxidace.

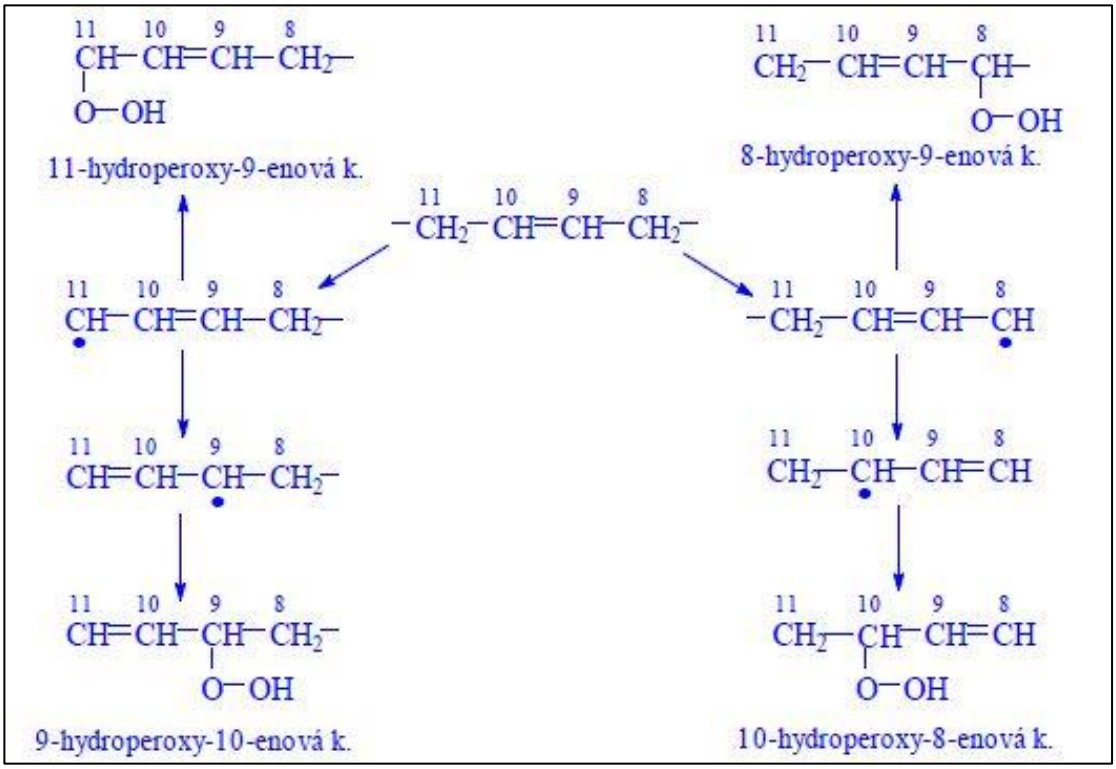
Iniciační fáze je proces kde se z lipidu (nenasycené mastné kyseliny) oddělí vodíkový atom za vzniku uhlovodíkového radikálu. Volný uhlovodíkový radikál následně reaguje s molekulou kyslíku (O_2) za vzniku peroxidového radikálu (R-O-O•), který má větší reaktivitu

než původní uhlovodíkový radikál. Tento vzniklý peroxidový radikál odštěpí atom vodíku z nově vzniklé mastné kyseliny a krok propagace se opakuje. Během propagace se tvoří molekuly hydroxyperoxidu (R-O-O-H), považované za primární oxidační produkty. Ty se nadále rozkládají na tzv. sekundární oxidační produkty mezi které patří aldehydy, ketony, alkoholy a jiné. Ve třetí a poslední fázi nazývané terminace roste pravděpodobnost reakce dvou radikálů (zvýšená koncentrace) za vzniku neradikálového stabilního produktu a řetězová reakce je ukončena. Dochází tedy ke vzniku stabilních produktů, které jsou odpovědné převážně za vznik žuklých pachutí v daném produktu. (Cheng 2016; Choe E & Min DB 2005; The Editors of Encyclopaedia Britannica 2019).

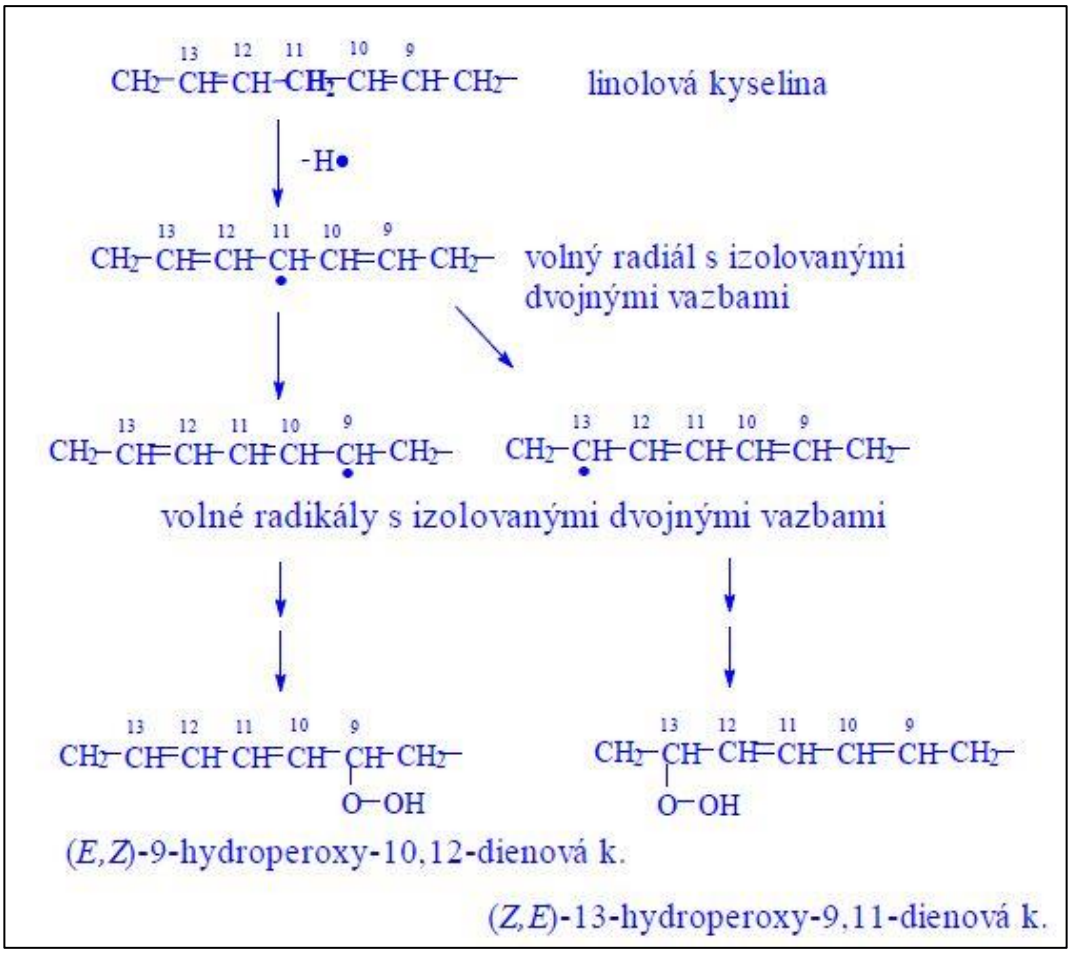
3.4.2 Primární oxidační produkty

Hydroxiperoxidy jsou primární oxidační produkty vznikající při ß-oxidaci mastných kyselin. Jedná se o velmi nestabilní produkty, které rády odštěpují vodíkový atom za vzniku radikálů (Frankel 1984).

Na obrázku 3 je znázorněna oxidace kyseliny olejové za vzniku čtyř hydroperoxidů v poměru přibližně 1:1:1:1. Obrázek 4 znázorňuje oxidaci kyseliny linolové za vzniku sedmi hydroperoxidů, kde vznikají především hydroperoxidy 9- a 13-. Při oxidaci kyseliny linolenové pak vzniká směs mnoha hydroperoxidů. Převládají 9-, 12-, 13- a 16- hydroperoxidy s 2 konjugovanými dvojnými vazbami a 1 izolovanou vazbou.



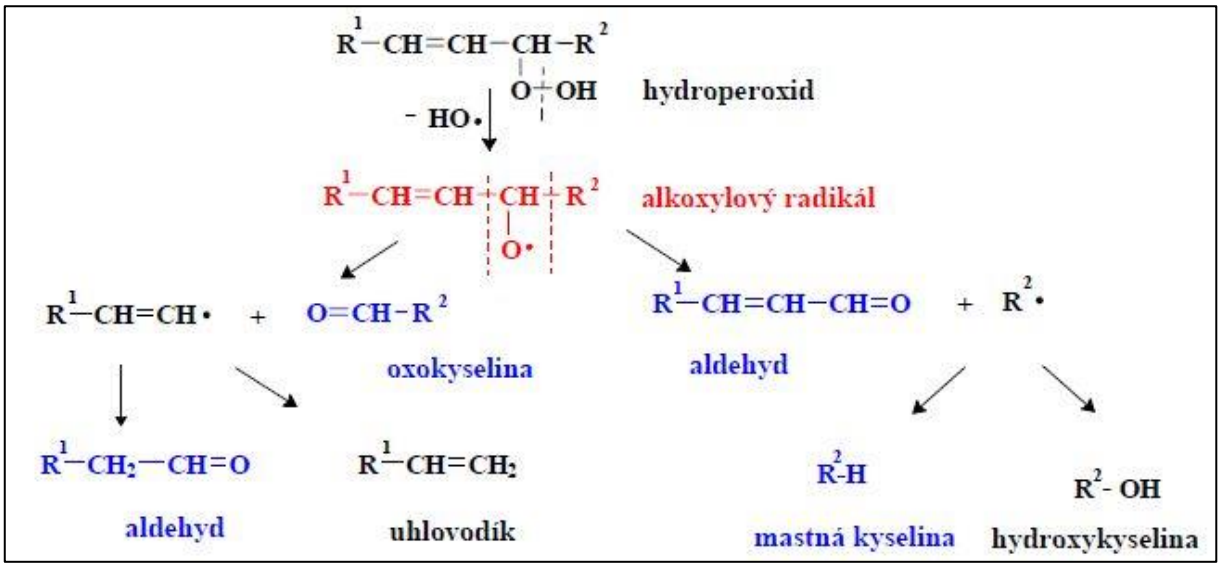
Obrázek 3: Oxidace kyseliny olejové za vzniku primárních oxidačích produktů, konkrétně hydroperoxidů. Zdroj: https://www.wikiskripta.eu/w/Autooxidace_a_dal%C5%A1%C3%AD_reakce_lipid%C5%AF_(1._LF_UK,_NT)#/media/File:Oxidace_olejov%C3%A9.jpg



Obrázek 4: Oxidace kyseliny linolové za vzniku hydroperoxidů, primárních oxidačních produktů. Zdroj: https://www.wikiskripta.eu/w/Autooxidace_a_dal%C5%A1%C3%AD_reakce_lipid%C5%AF_(1._LF_UK,_NT)#/media/File:Oxidace_linolov%C3%A9.jpg

3.4.3 Sekundární oxidační produkty

Sekudnární oxidační produkty mezi které patří aldehydy, uhlovodíky, epoxykyseliny, hydroxykyseliny či oxokyseliny vznikají rozkladem primárních oxidačních produktů. Princip mechanismu můžeme vidět na obrázku 5.



Obrázek 5: Obecný mechanismus vzniku aldehydů a uhlovodíků z hydroperoxidu. https://www.wikiskripta.eu/w/Autooxidace_a_dal%C5%A1%C3%AD_reakce_lipid%C5%AF_(1._LF_UK,_NT)#/media/File:Vznik_aldehydu_obec.jpg

3.5 Silice

Sekundární metabolity, mezi které patří i esenciální oleje jsou látky produkované rostlinami. Jejich primární funkcí v rostlinném organismu je ochrana proti predátorům a škůdcům. Esenciální oleje (též těkavé či éterické oleje) jsou aromatické látky olejovité struktury extrahované ze specifických částí rostlin, nejčastěji listů a semen ale i květů, větviček či kořenů (Adelakun et al. 2016; Dutra et al. 2019; Mastromatteo at al. 2010).

Jejich historie sahá až do starověkého Řecka a Říma, kde byly používány především za účelem jejich vůně a konzervačních vlastností. První metoda získávání esenciálních olejů byla destilace, poprvé použita v Egyptě v 9. století. První písemný záznam o destilaci je však datován až ve 13. století, kdy se poprvé dostali do Londýna. V této době se esenciální oleje začali používat i v lékařství. Do Evropy se podle dostupných informací dostali až v 16. století.

Pro své baktericidní účinky se začali používat ve 20. století, kde se zároveň uplatňují především pro své aroma (Burt 2004).

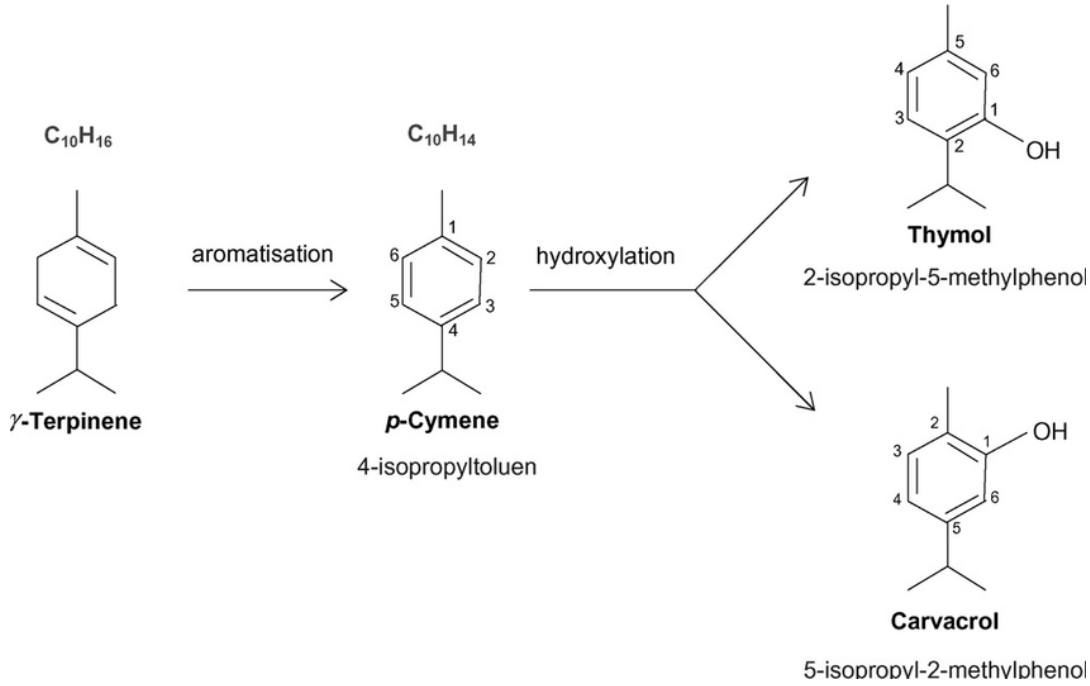
Tisíce let jsou esenciální oleje používány k aromaterapii, za jejíž zakladatele jsou považování Číňané. I z tohoto důvodu je jim v posledních pár letech věnováno více pozornosti. Pro své všestrané využití jsou dnes používány ve farmacii, kosmetickém průmyslu, zemědělství či právě potravinářském sektoru (Adelakun et al. 2016).

3.5.1 Využití silic

V potravinářství se využívají esenciální oleje především pro své biologické účinky. Disponují především antioxidačními a antimikrobiálními účinky. Díky svému vysokému potencionálu se v posledních pár letech, kdy je na bezpečnost potravin kladen vysoký důraz, využívají i jako konzervační látky.

Antioxidační přísady, mezi něž patří i esenciální oleje, se používají v potravinářském sektoru k prodloužení trvanlivosti potravin tím, že zabraňují oxidačním reakcím, které mají za následek žluknutí, změnu barvy ale mikrobiální kontaminaci. Jak je uvedeno v několika studiích, listy oregana a tymiánu jsou známé pro jejich antioxidační a antimikrobiální účinky při dlouhodobém skladování masa (Karabagias et al. 2011; Mastromatteo et al. 2010). Za antioxidační účinek esenciálního oleje vděčí s největší pravděpodobností karvakrolu a tymolu, který je schopen redukovat tvorbu peroxidu vodíku, zatímco antimikrobiální účinek je dán jeho chemickou strukturou a lipofilním vlastnostem. (İmık et al. 2018).

Karvakrol, jedna z hlavních složek oreganového esenciálního oleje, je zodpovědný především za jeho antimikrobiální aktivitu. Díky své hydrofobní povaze karvakrol interaguje s lipidovou dvojvrstvou cytoplazmatických membrán, což způsobuje ztrátu integrity a úniku buněčného materiálu, jako jsou ionty, ATP a nukleová kyselina (Taherian et al. 2009). Vznik tymolu a karvakrolu můžeme vidět na obrázku 6.



Obrázek 6: Biosyntéza Tymolu a Karvakrolu z Terpinenu a p-cymenu (Taherian et al. 2009).

Z praktického hlediska je aplikace esenciálních olejů v potravinách omezena zpravidla pro silnou chuť, kterou konečnému produktu dodávají ale také kvůli jejich interakcím s ostatními složkami potravin.

Ve většině případech se antimikrobiální látky přidávají přímo do potravin. Avšak jejich aktivita může být inhibována mnoha látkami které se v potravinách vyskytují, což má za následek snížení jejich účinnosti. V takových případech může být účinnější použití antimikrobiálních filmů či povlaků (Mastromatteo et al. 2010).

3.5.2 Získávání silic

Extrakce silic z rostlinného materiálů může být provedene hned několika způsoby. Jednoznačně nejstarší metodou extrakce silic je bezesporu destilace. Destilace vodní parou představuje extrakci vysoce kvalitních esenciálních olejů. Je šetrnější než destilace vodní, při které dochází ke kontaktu rostlinného materiálu s vařicí vodou. Tím může docházet ke ztrátě některých polárních molekul či přehřívání (Basşer & Buchbauer 2010).

Lisování za studena je další relativně neinvazivní metoda získávání silic. Drcením se uvolní obsah oleje ze žláz rostlin a následnou centrifugací se odstraní přebytečný pevný materiál (Dima & Dima 2015).

Mezi nové metody extrakce mohou patřit ultrazvuková či mikrovlná extrakce. Jejich použití se však dnes tařka nevyužívá.

S velkou oblibou je k extrakci silic používána superkritická fluidní extrakce. K extrakci pevného vzorku se používá superkritický oxid uhličitý (CO_2), který je schopen dosáhnout kritického tlaku a teploty. Vzhledem k jeho polaritě dobře rozpouští látky nepolární či velice málo polární látky.

3.5.3 Biologická aktivita silic

Je prokázáno že esenciální olej z oregana má antioxidační, antibakteriální ale i antifugální účinky. Za jeho mikrobiální a antioxidační potenciál je zodpovědný Karvakrol, jež vykazuje tuto biologickou aktivitu. Biologická aktivita esenciálního oleje a jeho vlastnosti jsou závislé na výnosu plodiny a jejímž složení které je závislé na řadě faktorů jako je genotyp, vývojová fáze, prostředí, ve kterém roste či způsobu pěstování (De Falco et al. 2013; Nakatsu et al. 2000).

Podle studie De Falco et al. 2013, čím více karvakrolu a tymolu esenciální olej obsahoval, tím větší antimikrobiální aktivitu vykazoval. Autor také zmiňuje, že obsah fenolických látek v rostlině může hrát významnou roli právě v antimikrobiálních a antioxidačních vlastnostech oleje.

Sillice se mohou skládat až z několika desítek látek mězi něž patří převážně terpeny. Terpeny jsou látky tvořené izoprenovými jednotkami, které jsou syntetizovány v rostlině. Mezi další látky, které obsahují se řadí fenolické sloučeniny, uhlovodíky a jejich deriváty. Tyto látky jsou rostlinou produkované především za účelem ochrany proti škůdcům a vnějšímu prostředí. Díky svým vlastnostem však našly uplatnění právě jako antioxidační či antibakteriální látky přírodní povahy (Başer & Buchbauer 2010).

3.6 NMR spektroskopie

Nukleární magnetická rezonance (NMR spektroskopie) je analytická chemická technika používaná při stanovení molekulární struktury látek. NMR může například kvantitativně analyzovat směsi obsahující známé sloučeniny. V případě neznámých sloučenin může být NMR použita buď ke shodě se spektrálními knihovnami, nebo k odvození základní struktury (Guillén & Ruiz 2006).

3.6.1 Základní princip

Základním principem NMR je elektricky nabité jádro s určitým spinem. Takto nabité jádro se spinem se dostane do magnetického pole a vzniká přenos energie na vyšší energetickou hladinu. Přenos energie probíhá na vlnové délce, která odpovídá rádiovým frekvencím, a když se spin vrátí na svou základní úroveň, energie je emitována na stejné frekvenci. Signál, který se shoduje s tímto přenosem, se měří mnoha způsoby a zpracovává se tak, aby se získalo NMR spektrum daného jádra (Martínez-Yusta et al. 2014).

4 Materiál a metody

4.1 Příprava směsí pro ošetření vzorku

Pro přípravu vzorků masa byly použity jílové nanočástice a oreganová silice. Vždy právě polovina vzorků byla ošetřena pouze samotnými jílovými nanočásticemi, druhá pak jílovými nanočásticemi promíchanými s oreganovou silicí.

Jílové nanočástice byly vysušeny v kádince přikryté alobalem s malými průduchy a sušeny 24 hodin při teplotě 110°C. Oreganová silice byla použita ze zdrojů Katedry kvality a bezpečnosti potravin s obsahem karvakrolu 64,5 %, 5,2 % p-cymenu a 2,9 % tymolu.

K přípravě jílových nanočástic s oreganovou silicí bylo odměřeno 237,5 mg sušených jílových nanočástic do vialek o objemu 2 ml a k tomu přidáno 12,5 mg oreganové silice. Každá vialka byla opatřena víčkem. Následně vzniklá směs se nechala třepat při 50 °C na 24 hodin nebo do té doby, dokud nebyla směs důkladně promíchána bez viditelných slepených kousků. Celková hmotnost jedné vialky činila 250 mg a výsledná koncentrace tak byla 5 %.

V případě samotných čistých jílových nanočástic bylo do vialky o objemu 2 ml naváženo 250 mg sušených jílových nanočástic. Každá vialka byla opatřena víčkem a spolu s dalšími vzorky třepána při teplotě 50 °C, 24 hodin.

4.2 Příprava vzorku

Kachní prsa byla před každým založením experimentu zakoupena čerstvá. Čerstvá kachní prsa byla následně zbavena kůže a nakrájena na kostičky o hmotnosti 5 gramů. Každý kousek masa byl samostatně vložen do petriho misky. Kladl se důraz na stejný tvar a povrch kostiček. Takto bylo připraveno celkem 36 vzorků ve dvou na sebe navazujících experimentech.

V prvním experimentu, řadě A, bylo připraveno celkem 12 vzorků. Z toho 6 bylo ošetřeno samotnými čistými jílovými nanočásticemi, dalších 6 pak jílovými nanočásticemi s oreganovou silicí. Odběry byly po 24 hodinách a 8 den.

Druhý experiment, řada B, kde bylo připraveno celkem 24 vzorků. Polovina z nich byla ošetřena samotnými jílovými nanočásticemi, druhá polovina pak jílovými nanočásticemi promíchanými s oreganovou silicí. Odběry byly učiněny po 24 hodinách, po 48 hodinách, 4 den a 7 den.

Každý kousek masa byl obalen v připravené směsi, tak že právě polovina vzorků čili 18 vzorků bylo obaleno v samotných čistých jílových nanočásticích a dalších 18 vzorků bylo obaleno v jílových nanočásticích s oreganovou silicí a ponecháno v petriho miskách opatřené parafilmem (z důvodů těkání silice). Vzorky se následně skladovali v lednici při 4 °C a odběry byly provedeny po 24 hodinách, po 48 hodinách, 4 den, 7 den a 8 den. Vždy byly odebrány a analyzovány 3 vzorky z každého ošetření.

4.3 Zpracování vzorku pro extrakci

Jednotlivé kousky byly nasekány ostrým nožem na menší konzistencí připomínající mleté maso a následně v čisté vysušené a popsané kádince bylo takto mělněné maso dobře promícháno s 5 ti gramy mořského písku plastovou lžičkou. Vzniklá směs masa a písku byla stejnou plastovou lžičkou na míchání vložena do extrakční patrony. Extrakce se prováděla v 75 ml petroletheru, který byl odměrným válcem odměřen do suché extrakční kyvety popsané číslem proti záměně při samotné extrakci na soxhletově přístroji.

4.4 Extrakce tuku

Extrakce tuku z kachního masa byla provedena podle Soxhleta, automatizovaným přístrojem (Soxtec, Foss). Tento 6 ti místný extraktor lze nastavit na 6 různých programů sestávajících se celkem ze tří fází a to extrakce, prokapávání a odpařování. V každém měření bylo analyzováno právě 6 vzorků v závislosti na čase po 24 hodinách, po 48 hodiných, 4 den, 7 den a den 8 pro zjištění míry oxidace lipidů v kachním mase. V našem případě byl přístroj nastaven na teplotu 110 °C. Extrakce byla prováděna po dobu 60 minut následována proplachem na dalších 60 minut. Odpaření petroletheru však nebylo provedeno na soxhletově extraktoru ale na rotační vakuové odparce. Bylo tak provedeno z důvodů vysoké teploty extraktoru, času odpařování a možnosti oxidace tuku při odpařování. Teplota vody v rotační vakuové odparce nepřesáhla 40 °C a každý vzorek byl odpařován samostatně v příslušné destilační baňce se zábrusem. Každý destilační baňka byla vysušena, ponechána v exikátoru vychladnout na pokojovou teplotu a zvážena před samotným vložením roztoku z extraktoru. Po extrakci byla každá destilační baňka převážena pro zjištění výtěžnosti tuku z kachního masa.

4.5 Příprava vzorku pro NMR

Ihned po odpaření petroletheru a zvážení výtěžnosti tuku byl tuk rozpuštěn celkem v 1 ml deuterovaného chloroformu a to tak, že bylo pipetováno 0,5 ml deuterovaného chloroformu do destilační baňky s vyextrahovaným tukem. Tuk byl rozpuštěn a převeden spolu s chloroformem pipetou do vialky o objemu 2 ml. Následně byl odpipetováno dalších 0,5 ml deuterovaného chloroformu do té samé destilační baňky pro vypláchnutí a rozpuštění případných zbytků tuku a následně převedeno do stejné vialky s předchozím půl mililitrem chloroformu s rozpuštěným tukem. Takto bylo postupováno při každém rozpuštění vzorku.

Všechny vzorky takto rozpuštěné v chloroformu a uložené ve vialkách byly opatřeny víčkem a skladovány v lednici až do dne analýzy. Před analýzou byl každý vzorek o objemu 0,6 ml převeden do NMR zkumavky která byla pečlivě popsána a zazátkována. Dále se přistoupilo k samotné analýze na přístroji. Měření bylo provedeno pomocí ^{1}H NMR Bruker Avance II, 500 MHz, kde bylo u každého vzorku provedeno 32 skenů. Výsledky byly následně zpracovány v prodramu Mestrenova.

4.6 Senzorická analýza

Statistické hodnocení experimentální části diplomové práce bylo zpracováno v programu Statistica 12 (StatSoft CR s. r. o). Výsledky byly vyhodnoceny za použití vícefázové ANOVY s opakováním a následně hodnoceno Tukeyho HSD testem. Testování proběhlo na základě hladiny významnosti $\alpha = 0,05$.

5 Výsledky

Všechny vzorky byly měřeny pomocí ^{1}H NMR (Bruker Avance II, 500 MHz), kde u každého vzorku bylo vždy provedeno 32 skenů, podobně jako ve většině publikací (Guillén et Ruiz, 2006; Stefanova et al. 2011). Posuny ppm pro různé oxidační produky byly vyhledány na základě dostupných informací uvedených v řadě publikací. Přehled ppm posunů je zobrazen v tabulce 5.

Tabulka 5: Chemické posuny (ppm) primárních a sekundárních oxidačních produktů ^{1}H NMR spektroskopie upravené z publikací Guillén & Ruiz 2001, 2006; Hwang 2017; Matínez-Yusta 2014.

Chemický posun (ppm)	Oxidační produkt	Funkční skupina a název produktu oxidace	
	Primární oxidační produkty		
2,44	Hydroperoxid	>C**H**-OOH	
2,65	Hydroperoxid	>C**H**-OOH	
4,22	Hydroperoxid	>C**H**-OOH	
4,30	Hydroperoxid	>C**H**-OOH	Hydroperoxy_epidioxid derivát trilinoleinu
4,35	Mono-hydroperoxid	>C**H**-OOH	
5,40	Hydroperoxid	-C**H**=C**H**-C**H**=C**H**-	(Z,E)-konjugovaná dvojná vazba spojená s hydroxidy (OH)
8,0 – 8,2	Hydroperoxid	-OOH	Hydroperoxidová skupina
	Sekundární oxidační produkty		
2,00	Epoxidy	-C**H**O**H**C-	9,10-epoxyoctadecenoát (leukotoxin) a 12,13-epoxy-9-octadecenoát (isoleukotoxin)
2,88	Epoxidy	-C**H**O**H**C-	(Z)-9,10-epoxystearát

Výsledky z NMR analýzy byly následně vyhodnoceny v programu Mestrenova. Vzhledem k tomu, že při analýze nebyl použit vnitřní standard, se plochy píků pro jednotlivé hodnoty ppm posunů porovnávali s naměřenou plochou píku chloroformu ($CHCl_3$) podle vzorce uvedeného na obrázku 7.

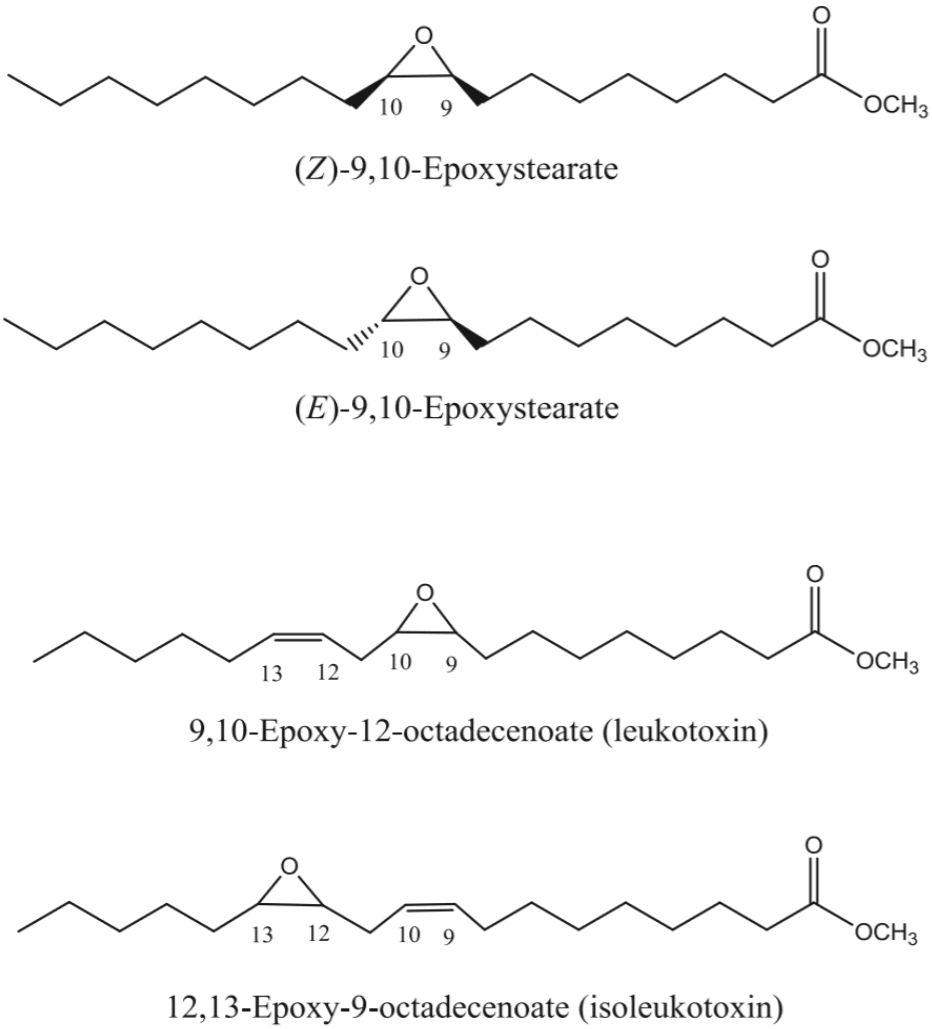
$$\frac{hodnota\ ppm\ posunu}{hodnota\ ppm\ CHCl_3} \times \frac{1}{navážka}$$

Obrázek 7: Výpočet bezrozměrné hodnoty produktu oxidace v porovnání s chloroformem ($CHCl_3$).

V tabulce 7 můžeme vidět průměrné hodnoty (průměr hodnot naměřených pro stejné ošetření v daný odběrový den) jednotlivých intenzit chemických posunů v různých dnech ošetření. Výsledná číselná je vztažení k chloroformu a hodnota je bezrozměrná.

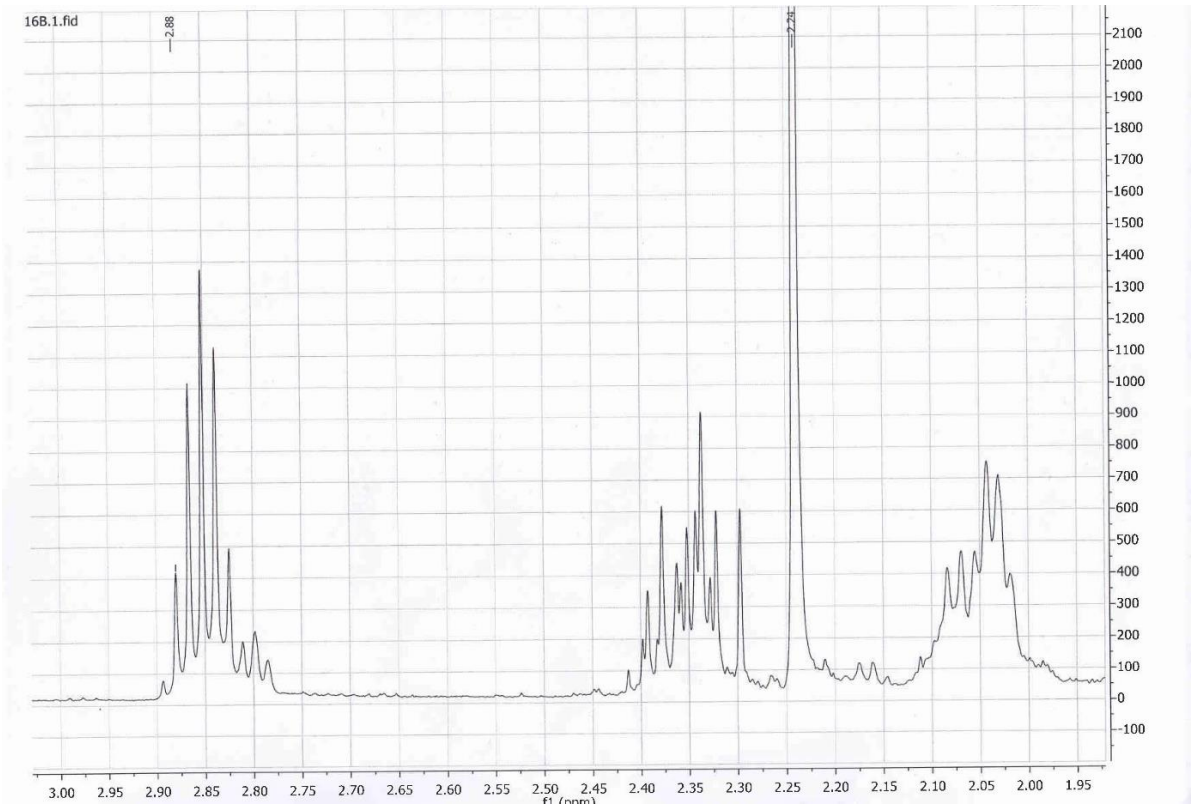
Pro lepší představu v grafu 1 a grafu 2, můžeme vidět nárůst či pokles jednotlivých hodnot v čase. Na první pohled je zřejmé, že výskyt některých hydroperoxidů je minoritní oproti jiným, jejichž zastoupení je ve vyšších hodnotách. Vznik hydroperoxidů jakožto primárních oxidačních produktů je patrný již po prvních 24 hodinách u obou ošetření kdy je detekován v určitých ppm posunech, viz dále.

Jak je vidět z tabulky a grafu, ve vzorcích byly nalezeny převážně hydroperoxidy, patřící mezi primární oxidační produkty. Ze sekundárních oxidačních produktů se ve vzorcích experimentu provedeného v této diplomové práci vyskytují pouze dva. Prvním je epoxid (Z)- 9,10-epoxystearát jehož funkční skupina -CHOHC- je detekována při 2,88 ppm. Jeho výskyt se nachází pouze ve vzorcích ošetřených nanojílem s oreganovou silicí. To vysvětluje statisticky významný rozdíl mezi ošetřenými a neošetřenými vzorky v posunu 2,88 ppm ve všech dnech odběru vzorku, kterého si můžeme všimnout v tabulce statistického hodnocení. Vzhledem k výskytu pouze v ošetření se silicí je zde předpoklad, že daná látka patří k aromatickým vlastnostem používané oreganové silice. V tomto teoretickém případě by se pak o produkt oxidace nejednalo. Druhým je epoxid 9,10-epoxyoctadecenoát (také nazýván leukotoxin) a 12,13-epoxy-9-octadecenoát (jinak isoleukotoxin) oba detekované s funkční skupinou -CHOHC- při posunu 2,00 ppm. V obou ošetřeních se leukotoxin a isoleukotoxin vyskytují s nízkou intenzitou a jehich hodnota klesá s postupujícím časem. Statisticky významný účinek silice byl konkrétně ve čtvrtý den. Oba epoxidy a jejich funkční skupiny můžeme vidět na obrázku 8.

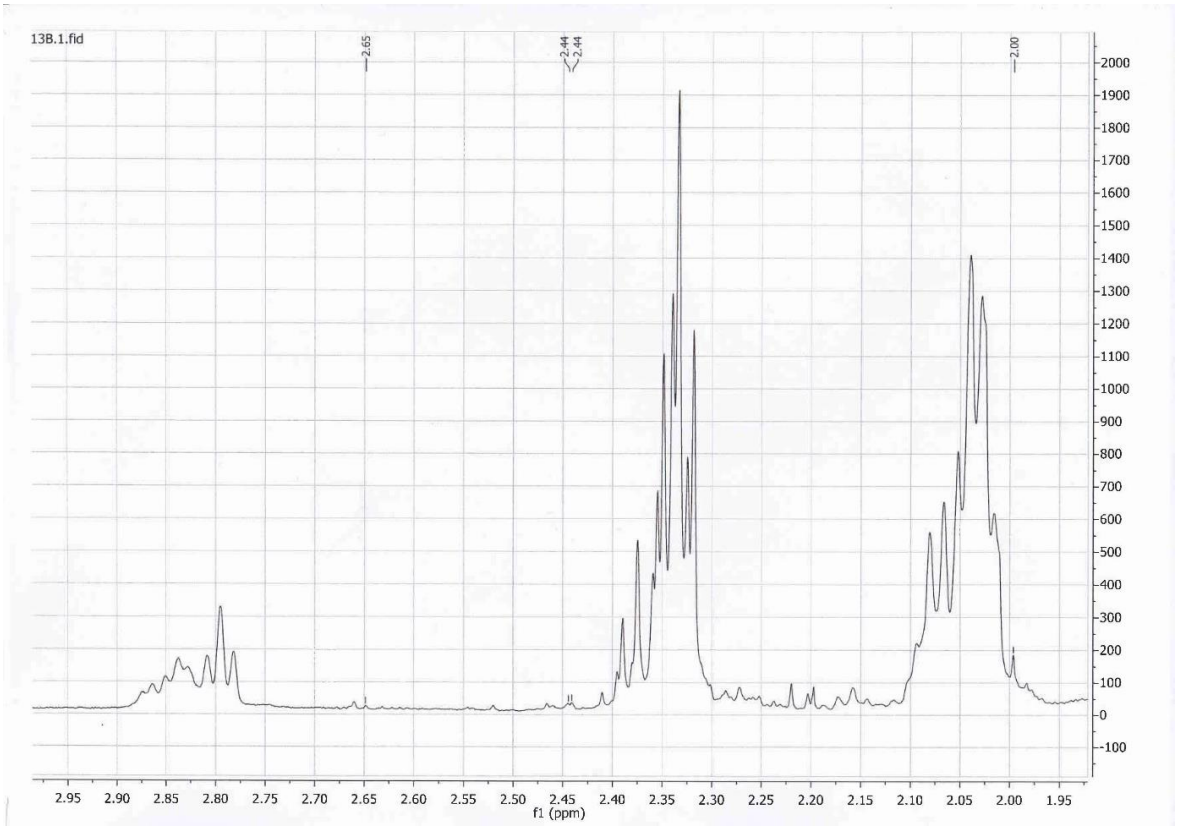


Obrázek 8: Chemická struktura epoxidů (Z)-9,10-epoxystearátu, 9,10-epoxyoctadecenoátu a 12,13-epoxy-9-octadecenoátu detekovaných v experimentální části této diplomové práce.

Mezi posuny 2-3 ppm jsou detekovány další látky konkrétně hydroperoxidy v posunech 2,44 ppm a 2,65 ppm nacházející se v obou ošetřeních. Značných rozdílů si můžeme všimnout v grafu 1 a 2 kde v ošetřeném vzorku s oregánovou silicí tak i v nanojílu je hodnota hydroperoxidu při posunu 2,44 ppm nižší a s časem klesá. U ošetření silicí si můžeme všimnout, že oddálila tvorbu tohoto hydroperoxidu a inhibovala tak jeho ranný vznik. Hydroperoxid s posunem 2,65 ppm se nachází v obou ošetření, ale detekován je až den 8. Je tedy velice pravděpodobné, že tvorba tohoto hydroperoxidu vzniká nejdříve pátý den skladování masa nehledě na ošetření. Nevíme však zdali jeho hodnota po osmém dni klesá či stoupá. Rozdílu ve spektrech mezi posuny 2-3 ppm pro ošetřené vzorky pouze nanojílem a nanojílem s oreganovou silicí je vidět na obrázku 9 a 10.



Obrázek 9: Výstup NMR spektra v rozmezí 2-3 ppm z programu mestrenova pro vzorek ošetřený jílovými nanočásticemi s oreganovou silicí.



Obrázek 10: Výstup NMR spektra v rozmezí 2-3 ppm z programu mestrenova pro vzorek ošetřený jílovými nanočásticemi s oreganovou silicí.

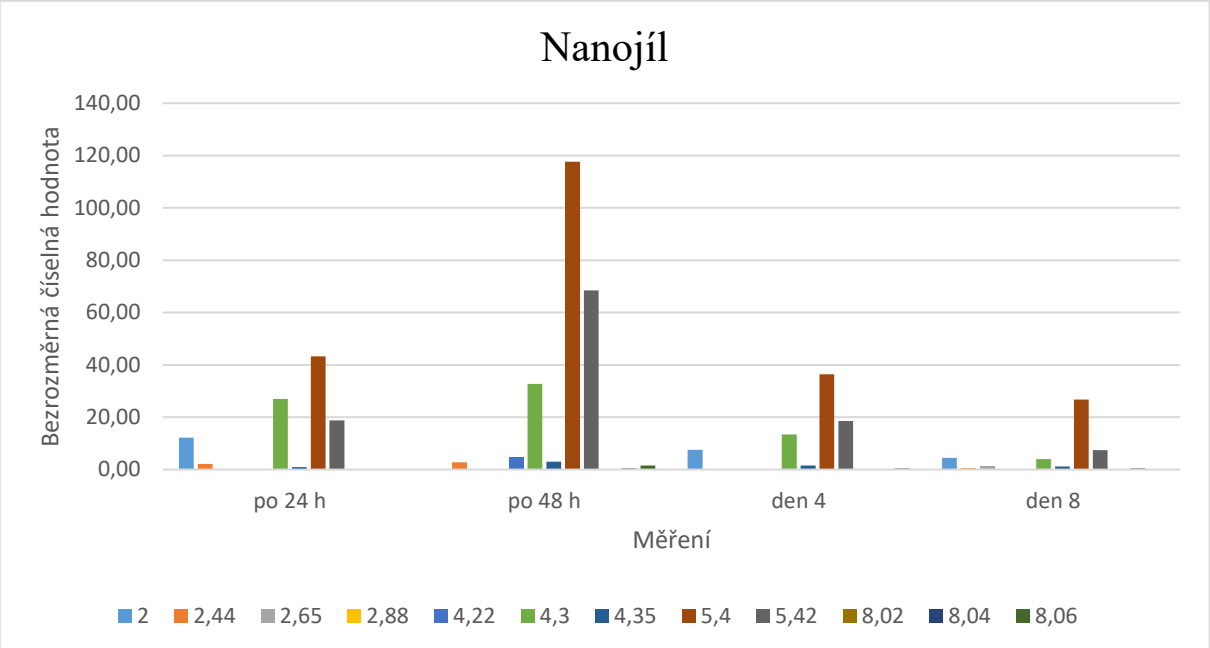
V posunu 2,44 ppm si můžeme všimnout výskytu hydroperoxidu pouze v ošetření nanojílem v čase 48 hodin. Byl tak prokázán statisticky významný rozdíl mezi ošetřeními, kdy nanojíl s oreganovou silicí tento hydroperoxid zcela inhiboval po dobu osmi dní. Další statisticky významný rozdíl mezi ošetřeními byl prokázán u hydroperoxidu v posunu 4,30 ppm, kdy je podle číselných hodnot zřejmý rozdíl v intenzitě píku mezi jednotlivými ošetřeními. Statisticky významný rozdíl byl pak konkrétně pozorován v čase 48 hodin, kdy hodnota znatelně klesla.

Monohydroperoxid s funkční skupinou -CH-OOH- byl detekován v posunu 4,35 ppm s výskytem v obou ošetřeních. Větší výskyt byl však zaznamenán u vzorku ošetřeného pouze nanojílem. Je tedy vidět značná inhibice v obsahu tohoto hydroperoxidu v ošetření nanojílu s oreganovou silicí, kde byl detenkován tento hydroperoxid v malém množství pouze ve dvou dnech měření, konkrétně po 48 hodinách a 4 dnech.

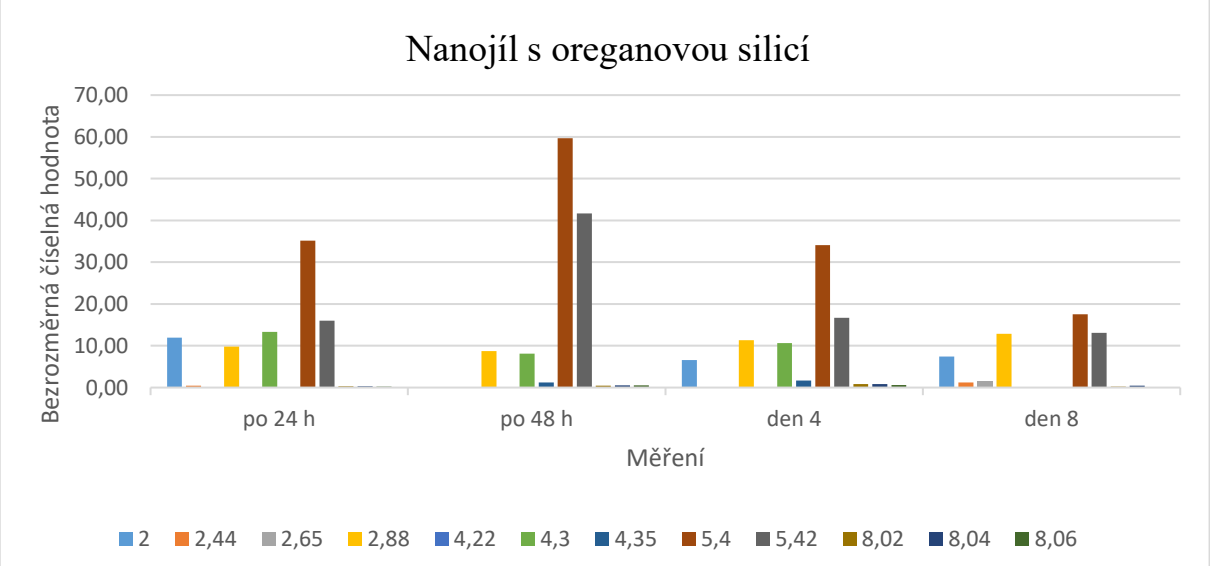
Majoritním oxidačním produktem je cis, trans konjugovaný dienový systém s funkční skupinou -CH=CH-CH=CH- v posunu 5,40 ppm detekován v obou ošetření (jak v nanojílu, tak nanojílu s oreganovou silicí). Intenzita tohoto oxidačního produktu je zřejmá na grafu 1 a 2. V obou ošetřeních obsah tohoto hydroperoxidu značně stoupá a své nejvyšší intenzity dosahuje po 48 hodinách, kde byl také prokázán statisticky významný rozdíl mezi ošetřeními. Maximální dosažená hodnota v ošetření nanojílem byla 117,62, u ošetření nanojílem s oreganovou silicí pak 59,71. Následně intenzita značně klesá na 26,79 u vzorku ošetřeným pouze nanojílem a u ošetření nanojílem s oreganovou silicí pak na hodnotu 17,55. Je tak zřejmé, že intenzita tohoto hydroperoxidu je inhibována ve vzorcích ošetřených nanojílem s oreganovou silicí což potvrzuje in statistické šetření. Můžeme se tedy domnívat, že na vznik určitých peroxidů má oreganová silice inhibiční účinky. Druhým majoritním oxidačním produktem byl detekován hydroperoxid s funkční skupinou -CH-OOH detekovanou v posunu 4,30 ppm. Průběh i hodnoty jsou relativně podobné hydroperoxidu s cis, trans konjugovaným dienovým systémem detekovaným v posunu 5,40 ppm. V ošetření vzorků nanojílem hodnota již po prvních 24 hodinách značně stoupla a s časem dosáhla maximální hodnoty a začala klesat což je patrné v poslední den měření. U ošetření s oreganovou silicí obsah hydroperoxidu 4,30 ppm pozvolna stoupá, má pomalejší nástup než v ošetření pouze nanojílem.

Ve vzorcích ošetřených nanojílem s oreganovou silicí jsou vidět signály hydroxyperoxidů mezi 8,0 a 8,2 ppm. Ty se pravidelně objevují v malém množství takřka ve všech aromatických vzorcích. To může být překvapivé, jelikož výskyt těchto primárních oxidačních produktů se v ošetření pouze nanojílem takřka nevyskytuje.

Kromě výskytu dvou epoxydů nebyly detekovány žádné jiné sekundární produkty jako cyklické peroxidy, epoxykyseliny, hydroxykyseiny, oxokyseliny či aldehydy.



Graf 1: Intenzita ppm posunů pro jednotlivé oxidační produkty v čase ve vzorku ošetřeném pouze nanojílem



Graf 2: Intenzita ppm posunů pro jednotlivé oxidační produkty v čase ve vzorku ošetřeném nanojílem s oreganovou silicí.

Tabulka 6: Naměřené hodnoty intenzity píků v jednotlivých ppm posunech a vyjádřenou směrodatnou odchylkou, v určitých dnech odběru pro vzorky ošetřené jílovými nanočásticemi a ošetřenými jílovými nanočásticemi s oreganovou silicí. Hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

	N	A	N	A	N	A	N	A
	po 24 h	po 24 h	po 48 h	po 48 h	den 4	den 4	den 8	den 8
2	12,15±1,1^{a}	11,93±1,1^{a}	-	-	7,59±6,75^{ab}	6,58±6,75^{b}	4,47±2,88^{ab}	7,46±2,88^{ab}
2,44	2,18±1,55^{a}	0,45±1,55^{a}	2,81±2,19^{a}	-	-	-	0,53±0,48^{a}	1,19±0,48^{a}
2,65	-	-	-	-	-	-	1,21±0,72^{b}	1,48±0,72^{ab}
2,88	-	9,82±5,99^{b}	-	8,73±4,97^{b}	-	11,35±6,85^{b}	-	12,88±7,39^{b}
4,22	-	-	4,64±2,61^{b}	0±^{a}	-	-	-	-
4,3	26,95±10,55^{bc}	13,31±10,55^{abc}	32,77±16,67^{c}	8,11±16,67^{ab}	13,44±6,44^{abc}	10,62±6,44^{ab}	4,03±3,04^{a}	-
4,35	0,92±0,65^{a}	-	3,03±2,18^{a}	1,20±2,18^{a}	1,58±0,83^{a}	1,68±0,83^{a}	1,22±0,82^{a}	-
5,4	43,26±10,88^{ab}	35,13±10,88^{ab}	117,62±33,48^{c}	59,71±33,48^{b}	36,39±18,11^{ab}	34,08±18,11^{ab}	26,79±10,00^{ab}	17,55±10,00^{a}
5,42	18,76±3,63^{a}	16,04±3,63^{a}	68,44±30,46^{b}	41,66±30,46^{ab}	18,60±9,53^{a}	16,71±9,53^{a}	7,41±3,89^{a}	13,11±3,89^{a}
8,02	-	0,27±0,24^{ab}	-	0,46±0,33^{ab}	-	0,81±0,50^{b}	0,14±0,12^{a}	0,25±0,12^{a}
8,04	-	0,31±0,24^{ab}	0,50±0,32^{a}	0,56±0,32^{ab}	-	0,81±0,50^{b}	0,46±0,13^{ab}	0,42±0,13^{ab}
8,06	-	0,20±1,15^{a}	1,50±0,61^{a}	0,56±0,61^{a}	0,43±0,3^{a}	0,63±0,3^{a}	0,23±0,14^{a}	-

A – vzorky ošetřené jílovými nanočásticemi s oreganovou silicí

N – vzorky ošetřené pouze jílovými nanočásticemi

Intenzita píku, která nebyla detekována je označena -

6 Diskuze

Za antioxidační a antimikrobiální účinky oreganové silice vděčí tato rostlina především Karvakrolu což uvádí i publikace Dutra et al. 2019. Antimikrobiální účinky esenciálního oleje z oregana byly potvrzeny hned několika studiemi (Burt 2004; Boskovic 2015; Dutra et al. 2019). Antimikrobiální vlastnosti proti gram potitivním a gram negativním mikroorganismům má nejenom olej z oregana ale například i olej z bazalky, tymiánu či hřebíčku a schopnost inhibice MO je detekována již při velmi malých koncentracích těchto esenciálních olejů. Látky v nich obsažených dokáží narušit buněčnou stěnu bakterie a zabránit jí v rozmnožování (Semeniuc et al. 2017).

Mimo antimikrobiálních vlastností, které nám jsou dobře známy, má olej z oregana také potvrzené antioxidační vlastnosti především díky obsahu již zmiňovaného karvakrolu a také tymolu, látkách v něm obsažených. Dutra et al. 2019 ve své studii zkoumal antioxidační aktivitu esenciálního oleje z oregana pomocí dvou různých metod DPPH a ABTS. Výsledkem byly značně rozdílné koncentrace. Obě metody však potvrdily velmi dobrou antioxidační aktivitu silice z oregana, kde rozdíl mezi koncentracemi byl přiřazen k drobným rozdílům chemické struktury v závislosti na druhu, ročním období sklizně a geografickému výskytu rostliny (Mechergui et al. 2016).

Pro studium produktů oxidace lipidů nejenom v mase ale i v jiných potravinářských komoditách je NMR spektroskopie stále novou metodou detenkce těchto látek. Guillén & Ruiz 2001 ve své studii použili NMR metodu pro detenkci nejenom majoritních ale i minoritních oxidačních produktů v různých druzích rostlinných olejů. Výběr této metody skví ve výhodách, které nabízí, jímž je jednoduchost, potřeba malého množství vzorku a minimum času. Podle nich je nukleární magnetická rezonance účinným nástrojem nejenom v detenkci jak primárních a sekundárních oxidačních produktů, tak i ve stanovení oxidační stability, stupně saturace mastných kyselin ale i degradaci acylových skupin.

V jiné studii se španělští vědci Guillén & Ruiz 2006 zabývají oxidací panenských olejů z oliv, kukuřice a lnu při vystavení mikrovlnému ohřevu s maximální dosaženou teplotou 190 °C pomocí ^{1}H NMR spektroskopie. Tvrdí, že proces tvorby oxidačních produktů je zcela odlišný při vystavení lipidů vysokým teplotám oproti teplotám skladování. Došli k závěru, že při mikrovném ohřevu velice rychle vznikají sekundární oxidační produkty, a to převážně aldehydy. Detekce aldehydů byla v jejich práci v rozmezí 9 až 10 ppm. Ve studii uvádí, že byl shledán trans-2-alkenal v posunu 9,48 a 9,506 ppm a také trans, trans-2,4-alkadienal v posunu 9,507 a 9,533 ppm které se vzájemně překrývaly. Dále tvorba 4,5-epoxy-trans-2-alkenalu byla

detekována při mikrovlném ohřevu v posunu 9,538 a 9,564 ppm. Velice častý byl překryv těchto aldehydů. Celkový čas ohřevu nepřekročil 240 minut pro všechny druhy olejů. Nejvyšší oxidační stabilitu v tomto experimentu vykazoval jednoznačně panenský olivový olej oproti oleji lněnému a kukuřičnému. To může být zapříčiněno složením jednotlivých mastných kyselin těchto olejů. Kyselina olejová (C18:1) patřící do monoenových MK se oxiduje mnohem pomaleji než kyselina linolová (C18:2) či kyselina linolenová (C18:3). Platí tedy, že čím více dvojných vazeb daná mastná kyselina má tím náchylnější je k oxidaci. Vzhledem k detenci pouze aldehydů, nikoli hydroperoxidů jakožto priárních oxidačních produktů se dospělo k závěru, že degradační mechanismus lipidů je závislý na teplotě a proces degradace se znatelně liší v závislosti času na zmíněné teplotě.

Tuto teorii potvrzují i další dostupné publikace, kde autoři došli na základě experimentů a zjištěných dat ke stejnému závěru. Shodují se na tom, že jeden z hlavních rozdílů mezi oxidačními produkty vznikajícími při vysokých teplotách (například smažení či grilování) a teplotách nižších je obecně ten, že nejsou detekovatejné meziprodukty oxidace jako jsou například hydroperoxidy, pozorovatelné při vyšších teplotách vzhledem k tomu, že tyto meziprodukty oxidace následně reagují s jinými sloučeninami či jinými látkami za vzniku sekundárních oxidačních produktů, často aldehydů (Hwang 2017). Martínez et al. 2014 zjistil, že existují významné rozdíly mezi oxidačními produkty a oxidačními mechanismy při různých teplotách. Jiné oxidační produkty tak budou vznikat v olejích a tucích namáhaných vysokou teplotou, jiné při teplotě skladování.

Většina publikací zkoumající oxidaci lipidů pomocí ^{1}H NMR spektroskopie se soustředí na rostlinné oleje zatěžované vysokými teplotami (Guillén & Ruiz 2006; Hwang 2017; Martínez et al. 2014). Tito autoři ve svých publikacích uvádí výskyt aldehydů, konkrétně n-alkanalů (9,748 ppm), (E)-2-alkenalů (9,493 ppm), (E,E)-2,4-alkadienalů (9,520 ppm), (E,Z)-2,4-alkadienalů (9,593 ppm), 4-hydroxy-(E)-2-alkenalů (9,573 ppm), 4-oxoalkanaly (9,780 ppm) v posunech ppm uvedených v závorkách za každým produktem. Z toho 2-alkenaly a alka-2,4-dienaly mají největší zastoupení ve vysokých teplotách, zejména pak při smažení za vysoké teploty.

To může být jedním z hlavních důvodů proč v experimentální části této diplomové práce nebyly aldehydy detekovány. Na rozdíl od těchto publikací byly vzorky ponechány vzdušnému kyslíku při teplotě skladování (cca 5 °C) a při analýze se našli převážně primární oxidační produkty, jak je uvedeno v kapitole 5.

Almoselhy et al. 2014 sice ve své práci analyzuje rostlinné oleje při teplotě skladování pomocí ^{1}H NMR spektroskopie, avšak nedetekoval ve svém experimentu žádné signály

pro oxidační produkty, ať už primární či sekundární. Oleje jako takové, pokud jsou dobře skladované a uchovávají se v dobrých skladovacích podmínká však neoxidují lehce a jejich trvanlivost je relativně dlouhá.

Biologická aktivita silic byla prokáza v mnoha studiích, kdy s jejich účinkem spojují i zlepšení zdravotního stavu jedinců trpících diabetem 2. typu (Van Hecke et al. 2017). Koncentrace použita v tomto experimentu byla 5 až 10krát menší než v této diplomové práci. To vede k závěru, že i malé množství esenciálního oleje má prokazatelné antioxidační vlastnosti.

Účinek nanočástic na antioxidační aktivitu nebyl v porovnání se vzorky ošetřené nanočásticemi s oreganovou silicí prokázán. V této problematice je však zapotřebí mnoho dalších experimentů nejenom standadní TBARS metodou pro detenkci oxidačních produků, ale i ^{1}H NMR spektroskopií. Právě ^{1}H NMR spektroskopie použitá k detenkci oxidačních produktů v této práci se ukázala být velice užitečná technika při studiu mnoha aspektů jedlých tuků a olejů. Má spoustu výhod, je to nedestruktivní technika, pro analýzu postačí malé množství vzorku, jehož příprava je velice jednoduchá. Analýza vzorku je hotova během pár minut a je schopna detekovat všechny přítomné protony co se ve vzorku vyskytují a poskytuje signály jejichž intenzita je zaznamenáne chemickým posunem v ppm. Tato technika umožňuje vyhodnocovat jak majoritní komponenty, tak i menší složky, pokud je jejich koncentrace dostatečká k detekci a signály se nepřekrývají. Guillén & Ruiz 2001 uvádí koncentraci vzorku potřebnou pro získání kvantitativních výsledků a detenci produktů alespoň 5 mg oleje či tuku na 100 ml.

7 Závěr

V této diplomové práci byl zkoumán vliv oregánové silice na oxidaci lipidů v kachním mase a případnému inhibičnímu účinku oreganové silice. Hypotézou bylo, že silice enkapsulované do nanočástic budou vykazovat antioxidační vlastnosti a pomohou zabránit oxidačním změnám v kachním mase a prodloužit tak jeho údržnost a kvalitu při skladování. Byly použity dva typy ošetření kachního masa, prvním byly samotné jílové nanočástice, druhým pak oreganová silice enkapsulovaná do jílových nanočástic v koncentraci 5 %.

Účinek oregánové silice v uvedené koncentraci byl potvrzen. Vzroky masa s ošetřením oreganovou silicí enkapsulovanou do nanojílu inhibovali výskyt oxidačních produktů, oddálili jeho výskyt či výrazně snížili množství daného oxidačního produktu v mase.

V budoucích experimentech detekce oxidačních produktů je vhodné použít interní standard, který by usnadnil vyhodnocení výsledků a jejich intenzitu. Pro objasnění problematiky oxidace lipidů v masných produktech a jejich inhibice enkapsulovanou oreganovou silicí či jinými esenciálními oleji je třeba ještě mnoho studií s vícečetným opakováním v časové ose maximálně 7 či 8 dnů (z důvodu údržnosti masa). Vhodné by bylo využít různé koncentrace silic a hodnocení jejich vlivu na oxidační stabilitu a tvorbu oxidačních produktů. Důležitým faktorem je také koncentrace lipidů v měřeném vzorku. V případě malé koncentrace nemusí být produkty oxidace detekovatelné.

8 Literatura

Adelakun OE, Oyelade OJ, Olanipekun BF. 2016. Essential oils in food preservation, flavor and safety: Chapter 7 - Use of Essential Oils in Food Preservation. Elsevier, Amsterdam.

Akoh CC, Min DB. 2002. Food lipids: Chemistry, nutrition, and biochemistry. 2nd edition. Marcel Dekker Inc., New York.

Almoselhy RIM, Allam MH, El-Kalyoubi MH, El-Sharkawy AA. 2014. ^{1}H NMR spectral analysis as a new aspect to evaluate the stability of some edible oils. Annals of Agricultural Science **59**:201-206. DOI: 10.1016/j.aoas.2014.11.006.

Arroyo J, Pistón M., Victoria F, Urioste M, Brambillasca S, Repetto J, Pérez-Ruchel A. 2018. Concentration of minerals in meat of lambs fattened under different feeding systems. Journal of Animal Science **96**:281.

Basşer KHC, Buchbauer G. 2010. Handbook of essential oils: science, technology, and applications. Boca Raton, USA. ISBN 978-1-4200-6315-8.

Boskovic M, Zdravkovic N, Ivanovic J, Janjic J, Djordjevic J, Starcevic M, Baltic MZ. 2015. Antimicrobial Activity of Thyme (Tymus vulgaris) and Oregano (Origanum vulgare) Essential Oils against Some Food-borne Microorganisms. Procedia Food Science **5**:18-21. DOI: 10.1016/j.profoo.2015.09.005.

Britannica Academic. 2018. Encyclopædia Britannica. "Meat". Available from academic-eb-com.ezproxy.techlib.cz/levels/collegiate/article/meat/51693 (accessed March 2019).

Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology **94**:223-253. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.

De Falco E, Mancli E, Roscigno G, Mignola E, Tagliaiatela-Scafati O, Senatore F. 2013. Chemical Composition and Biological Activity of Essential Oils of Origanum vulgare L. subsp. vulgare L. under Different Growth Conditions. Molecules **18**:14948-14960. DOI: 10.3390/molecules181214948.

Dima C, Dima S. 2015. Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. Current Opinion in Food Science **5**:29-35. DOI: 10.1016/j.cofs.2015.07.003.

Doležal M (VŠCHT). 2019. Autooxidace a další reakce lipidů. Available from https://web.vscht.cz/~dolezala/CHPS/04%20Reakce%20lipid%C5%AF.pdf (accessed January 2019).

Dutra TV, Castro JC, Menezes JL, Ramos TR, do Prado IN, Machinski M, Mikcha JMG, FILHO BAA. 2019. Bioactivity of oregano (Origanum vulgare) essential oil against Alicyclobacillus spp. Industrial Crops and Products **129**:345-349. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.12.025.

Editors. 2014. Biologydictionary: Fatty Acids. Organ. Available from https://biologydictionary.net/organ/ (accessed November 2014).

EFSA. 2010. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. EFSA Journal **8**:1-700.

Fennema OR. 1996. Food chemistry. 3rd edition. Marcel Dekker Inc., New York.

Frankel EN. 1984. Lipid oxidation: Mechanisms, products and biological significance. Journal of the American Oil Chemists' Society **61**:1908-1917. DOI: 10.1007/BF02540830.

Gille D, Schmid A. 2015. Vitamin B12 in meat and dairy products. Nutrition Reviews **73**:106-115. DOI: 10.1093/nutrit/nuu011.

Guillén MD, Ruiz A. 2001. High resolution ^{1}H nuclear magnetic resonance in the study of edible oils and fats. Trends in Food & Technology **12**:328-338.

Guillén MD, Ruiz A. 2006. Study by means of ^{1}H nuclear magnetic resonance of the oxidation process undergone by edible oils of different natures submitted to microwave action. Food Chemistry **96**:665-674. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.04.013.

Guoyao WU. 2013. Functional amino acids in nutrition and health. Amino Acids **45**:407-411. DOI: 10.1007/s00726-013-1500-6.

Hwang HS. 2017. Advances in NMR spectroscopy for lipid oxidation assessment. Springer International Publishing, New York. ISBN 978-3-319-54195-2.

Cheng JH. 2016. Lipid Oxidation in Meat. Journal of Nutrition & Food Sciences **6**:1-3. DOI: 10.4172/2155-9600.1000494.

Choe E, Min DB. 2005. Chemistry and Reactions of Reactive Oxygen Species in Foods. Journal of Food Science **70**:142-159. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb08329.x.

Christie WW. 1982. Lipid analysis: isolation, separation, identification, and structural analysis of lipids. 2nd edition. Pergamon Press, New York.

İmık H, Urcçar Gelen S, Aydemır Atasever M, Gümüş R, Özlü H. 2018. Effects of the supplementation of lamb rations with oregano essential oil on the antimicrobial and antioxidant metabolism in meat. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences **42**:581-589

Kates M. 2010. Techniques of lipidology: isolation, analysis, and identification of lipids. 3rd edition. NewportSomerville, Ottawa, Canada.

Kanner J. 1994. Oxidative processes in meat and meat products: Quality implications. Meat Science **36**:169-189.

Karabagias I, Badeka A, Kontominas MG. 2011. Shelf life extension of lamb meat using thyme or oregano essential oils and modified atmosphere packaging. Meat Science **88**: 109-116.

Martínez-Yusta A, Goicoechea E, Guillén MD. 2014. A Review of Thermo-Oxidative Degradation of Food Lipids Studied by 1 H NMR Spectroscopy: Influence of Degradative Conditions and Food Lipid Nature. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **13**:838-859. DOI: 10.1111/1541-4337.12090.

Mastromatteo M, Danza A, Conte A, Muratore G, del Nobile MA. 2010. Shelf life of ready to use peeled shrimps as affected by thymol essential oil and modified atmosphere packaging. International Journal of Food Microbiology **144**:250-256.

Mechergui K, Jaouadi W, Coelho JP, Khouja ML. 2016. Effect of harvest year on production, chemical composition and antioxidant activities of essential oil of oregano (Origanum vulgare subsp. glandulosum (Desf.) letswaart) growing in North Africa. Crops Prod **90**:32–37.

Moss GP, Smith PAS, Tavernier D, 1995. Glossary of class names of organic compounds and reactivity intermediates based on structure (IUPAC Recommendations 1995). Pure and Applied Chemistry **67**:1307-1375.

Murray RK. 2002. Harperova Biochemie. H. H. Jinočany.

Nakatsu T, Lupo AT, Chinn JW, Kang RKL. 2000. Biological activity of essential oils and their constituents. Bioactive Natural Products (Part B) **9**:571-631. 10.1016/S1572-5995(00)80014-9.

Nieto G, Bañón S, Garrido MD. 2011. Effect of supplementing ewes' diet with thyme (Thymus zygis ssp. gracilis) leaves on the lipid oxidation of cooked lamb meat. Food Chemistry **125**:1147-1152. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.09.090.

Pearson AM, Gray JI, WOLZAK AM, HORENSTEIN NA. 1983. Safety implications of oxidized lipids in muscle foods. Food Technology **37**:121-129.

Semeniuc CA, Pop CR, Rotar AM. 2017. Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Journal of Food and Drug Analysis **25**:403-408. DOI: 10.1016/j.jfda.2016.06.002.

SkipThePie. 2011. SkipThePie.org. "Fat, Duck". SkipThePie.org. Available from https://skipthepie.org/fats-and-oils/fat-duck/ (accessed March 2019).

Shahidi F. 1994. Assessment of lipid oxidation and off-flavour development in meat and meat products. Flavor of Meat and Meat Products: 247-266.

Stefanova R, Toshkov S, Vasilev NV, Vassilev NG, Marekov IN. 2011. Effect of gamma-ray irradiation on the fatty acid profile of irradiated beef meat. Food Chemistry **127**:461-466. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.12.155.

Taherian AA, Babaei M, Vafaei AA, Jarrahi M, Jadidi M, Sadeghi H. 2009. Antinociceptive effects of hydroalcoholic extract of Thymus Vulgaris. Pakistan journal of pharmaceutical sciences **22**:83-89.

Trojan S. 2003. Lékařská fyziologie. Grada. Praha.

The Editors of Encyclopaedia Britannica. 2019. Encyclopaedia Britannica: Fatty Acids. Encyclopaedia Britannica, inc. Available from www.britannica.com/science/fatty-acid (accessed March 2019).

USDA Food Composition Databases. 2017. United States Department of Agriculture: Duck Fat. Available from https://ndb.nal.usda.gov/ndb/ (accesed January 2019).

Van Hecke T, Ho PL, Goethals S, De Smet S. 2017. The potential of herbs and spices to reduce lipid oxidation during heating and gastrointestinal digestion of a beef product. Food Research International **102**:785-792. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.09.090.

Velíšek J. 1999. Chemie potravin. OSSIS. Tábor.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

MK mastná kyselina

LDL cholesterol

HDL cholesterol

EPA eikosapentaneová kyselina

DHA dokosahexaenová kyselina

DPA dokosapentaenová kyselina

ALA alfa-linolenová kyselina

LA linolová kyselina

PAL palitová kyselina

SA stearová kyselina

MA myristová kyselina

MO mikroorganismus