

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality a bezpečnosti potravin**



**Česká zemědělská  
univerzita v Praze**

**Vliv času a teploty ohřevu na chemické složení medu  
s pomocí NMR**

**Bakalářská práce**

**Kateřina Dvořáková**

**Obor studia: Kvalita produkce**

**Vedoucí práce: doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.**

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Vliv času a teploty ohřevu na chemické složení medu s pomocí NMR" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 5.4.2021 \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli, Jaroslavu Havlíkovi za věnovaný čas, ochotu a pomoc při této práci. Děkuji také Anně Mascellani, Veronice Jarošové a Kateřině Tomisové za cenné rady a pomoc při práci. Chtěla bych také poděkovat zástupcům Výzkumného ústavu včelařského VÚVč Dol za rady, poskytnutí vzorků a zejména nápad který stál u zrodu tématu mé práce.

# Vliv času a teploty ohřevu na chemické složení medu s pomocí NMR

## Souhrn

Med patří mezi potraviny, které se tradičně využívají při pečení, vaření, smažení a v neposlední řadě i k oslazení horkých čajů. Zvýšená teplota má však jisté účinky na jeho složení. Med obsahuje vysoké procento cukrů, tudíž je náchylný ke krystalizaci nebo Maillardově reakci, při níž se uvolňují vábné těkavé látky, ale mohou vznikat i látky škodlivé pro lidské zdraví.

Včelařská veřejnost vede dlouhodobé spory, zda je k ohřevu medu vhodná nižší teplota po dlouho dobu nebo vyšší teplota po dobu krátkou. Cílem práce bylo zjistit odpověď na otázku s pomocí  $^1\text{H}$  nukleární magnetické rezonance.

Bylo porovnááno chemické složení medů v čase, kdy došlo ke 95% ztekucení při daných teplotách. Čas ztekucení byl u 6 medů stanoven pro teploty 40, 50 a 60 °C. S pomocí spektrofotometrického měření při  $\lambda = 420$  a 600 nm. Vzorky medu (240 mg) byly poté zahřáty vybranými kombinacemi času a teploty, ve 2 opakováních. Výsledných 48 vzorků bylo analyzováno s pomocí  $^1\text{H}$  NMR na spektrometru Bruker Avance III 500 MHz a BBFO sondou s gradienty v ose z, s pomocí pulzní sekvence 1dnoesy. Vzorky byly pro měření upraveny na pH 4.0. Výsledné signály volné precese byly transformovány fourierovou transformací, fázovány a referencovány v programu MestereNova. Jednotlivé regiony byly srovnány na změny v integrálech píků nebo jejich posuny a zaznamenány.

Celkem bylo zjištěno 12 oblastí signálů, ve kterých byly mezi záhřevy změny, z toho 2 byly přítomny u všech medů, ostatní byly přítomny jen v některých skupinách medů. Jednalo se o změny v chemickém posunu nebo v intenzitě. Při porovnání s databází nejsme schopni zjistit o jaké látky se jedná, ale budou podrobeny dalšímu zkoumání. Nejméně změn ve srovnání s kontrolou bylo zjištěno u 40 °C v kombinaci s časem.

**Klíčová slova:** Nukleární magnetická rezonance, Maillardova reakce, med, záhřev medu

# The influence of time and temperature on chemical composition of honey using NMR

## Summary

Honey is one of the foods traditionally used in baking, cooking, frying and sometimes to sweeten hot teas. However, elevated temperature has some influence effects on the chemical composition. Honey contains a high percentage of sugars, so it's prone to crystallization or the Maillard reaction, in which volatile substances are released. This reaction can also produce substances that are harmful to health.

There is a long-standing debate about which heating of honey is better, high temperature for a short time or low temperature for a long time. The aim of the work was to find out the answer to the question with the use of  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance.

The chemical composition of the honeys was compared at a time when 95 % liquefaction occurred. The liquefaction time was determined for 6 honeys at temperatures of 40, 50 and 60 °C. The measurement was using spectrophotometry at  $\lambda = 420$  and 600 nm. Samples of honey (240 mg) were heated by selected combinations of time and temperature, in 2 replicates. The resulting 48 samples were analyzed by  $^1\text{H}$  NMR on a Bruker Avance III 500 MHz spectroscope equipped with a BBFO probe with z-axis gradients, using a 1dnoesy pulse sequence. The pH of the sample was adjusted to pH 4.0 for measurement. The resulting free induction decays were transformed by a fourier transformation, phased and referenced in the Mestrenova software program. Individual regions were compared for changes in peak integrals or their shifts and recorded.

We discovered 12 peak areas that were changing between the treatments. These were changes in chemical shift or intensity. Two of them were found in all honeys. But they will be subject to further measuring. The least changes compared to the original samples were found at the temperature 40 °C.

**Keywords:** Nuclear magnetic resonance, Maillard reaction, honey, honey heating

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>8</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíl práce .....</b>	<b>9</b>
<b>3 Literární rešerše.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Legislativa.....</b>	<b>10</b>
3.1.1 Požadavky na jakost .....	10
3.1.2 Spotřeba medu v České republice.....	11
<b>3.2 Chemické složení medu .....</b>	<b>11</b>
3.2.1 Cukry .....	11
3.2.2 Bílkoviny a aminokyseliny .....	12
3.2.3 Organické kyseliny .....	13
3.2.4 Vitamíny .....	13
3.2.5 Minerály.....	14
3.2.6 Fenolové sloučeniny .....	14
<b>3.3 Fyzikální vlastnosti .....</b>	<b>15</b>
3.3.1 Krystalizace .....	15
3.3.2 Viskozita .....	15
3.3.3 Elektrická vodivost .....	15
3.3.4 Hygroskopicitá.....	15
3.3.5 Barva.....	15
<b>3.4 Antimikrobiální aktivita.....</b>	<b>16</b>
<b>3.5 Požadavky na kvalitní med .....</b>	<b>16</b>
<b>3.6 Získání medu .....</b>	<b>17</b>
3.6.1 Zralost .....	17
3.6.2 Získávání z plástů .....	17
3.6.3 Cezení .....	17
3.6.4 Skladování medu .....	17
<b>3.7 Maillardova reakce .....</b>	<b>18</b>
3.7.1 Fáze Maillardovy reakce.....	18
3.7.2 Izomerace glykosylaminů .....	18
3.7.3 Výsledek Maillardovy reakce .....	19
3.7.4 Využití .....	19
<b>3.8 Hydroxymethylfurfural .....</b>	<b>19</b>
<b>3.9 NMR.....</b>	<b>20</b>
3.9.1 Využití NMR v medu .....	21
<b>3.10 Tepelné procesy .....</b>	<b>21</b>
<b>3.11 Omické vědy .....</b>	<b>22</b>

<b>4 Metodika .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1 Vzorky .....</b>	<b>26</b>
<b>4.2 Desing experimentu.....</b>	<b>26</b>
<b>4.3 Příprava vzorků pro stanovení bodu ztekucení .....</b>	<b>27</b>
<b>4.4 Příprava vzorků pro analýzu NMR.....</b>	<b>27</b>
<b>5 Výsledky a diskuze .....</b>	<b>29</b>
<b>5.1 NMR analýza medů .....</b>	<b>29</b>
<b>5.2 Vliv času a teploty na integrály píků spektra .....</b>	<b>30</b>
<b>5.3 Posunutí spekter .....</b>	<b>32</b>
<b>6 Závěr.....</b>	<b>35</b>
<b>7 Literatura.....</b>	<b>36</b>
<b>8 Seznam obrázků .....</b>	<b>40</b>
<b>9 Seznam tabulek .....</b>	<b>40</b>

# 1. Úvod

Med patří odjakživa mezi potraviny, které se tradičně využívají k oslazení nápojů či jídel. Běžně se tak používá při pečení, vaření nebo smažení. Většina lidí si však právě medem oslazují horké čaje. Med si však můžeme představit jako nasycený roztok cukrů, tím pádem při jeho zahřátí může dojít ke karamelizaci nebo Maillardově reakci (Nagai et al., 2018).

Medy, zejména medy květové často podléhají krystalizaci. Jelikož se jedná z pohledu spotřebitele o nežádoucí vlastnost, jsou před plněním zahřívány, tím však dochází k chemickým změnám ve složení. Mezi typické změny můžeme řadit Maillardovu reakci. Jedná se o neenzymatickou reakci mezi redukujícími sacharidy s aminokyselinami nebo bílkovinami v potravinách. Je způsobena zvýšenou teplotou při zpracování potravin. Dochází při ní ke vzniku sensoricky aktivních sloučenin, které dodávají výrobkům charakteristickou vůni, barvu a chuť. Na druhé straně má vliv i na tvorbu některých sloučenin s mutagenními a karcinogenními vlastnostmi.

Metoda nukleární magnetické rezonance (NMR) umožňuje kvantitativní i kvalitativní chemickou analýzu. Své využití nachází v mnoha oborech. Mezi hlavní využití metody patří strukturní analýza. Využívá se ale i na odhalení falšování vín, džusů, medů a na prokázání místa původu. Mezi výhody metody můžeme řadit snadnou přípravu vzorků a krátkou dobu analýzy. Tato nedestruktivní metoda se také vyznačuje vysokou reprodukovatelností. Cílem práce bylo zjistit, zda je metoda NMR schopna zachytit změny, ke kterým v průběhu zahřívání dochází, zda je lze kvantitativně či kvalitativně postihnout, a která kombinace teploty a času je pro rozechřívání nejlepší.



## **2. Vědecká hypotéza a cíl práce**

Již několik let se vedou mezi včelaři spory o tom, která teplota je ze zdravotního hlediska nejméně škodlivá při výrobě a zpracování medu, a jaká kombinace teplot a časů má nejmenší vliv na zachování jeho původních vlastností. Touto prací se pokusím odpovědět na otázku, zda je lepší med zahřívat po delší čas při nižší teplotě, nebo naopak rychlé zahřátí na vyšší teplotu.

### 3. Literární rešerše

#### 3.1 Legislativa

Medem se dle vyhlášky č.76/2003 Sb. rozumí potravina přírodního sacharidového charakteru, složená převážně z glukosy, fruktosy, organických kyselin, enzymů a pevných částic zachycených při sběru sladkých šťáv květů rostlin (nektar), výměšků hmyzu na povrchu (medovice), nebo na živých částech rostlin včelami (*Apis mellifera*), které sbírají, přetvářejí, kombinují se svými specifickými látkami, uskladňují a nechávají dehydrovat a zrát v plástech.

Podle původu dělíme med na květový a medovicový. Můžeme ho členit také podle způsobu získávání a úpravy na med vytočený, plástečkový, lisovaný, vykapaný, filtrovaný, pastový, pekařský a med s plástečky.

Tabulka 1: Smyslové požadavky na med dle vyhlášky 76/2003 Sb.

Med	Konzistence, vzhled	Chuť	Barva
Květový	Mírně až silně viskózní, tekutý, částečně až plně krystalický	Výrazně sladká až škrablavá	Vodově čistá až s nazelenalým nádechem slabě žlutě až zlatavě žlutá
Medovicový	Mírně až silně viskózní, tekutý, částečně až plně krystalický	Sladká, popřípadě kořeněná až mírně škrablavá	Tmavohnědá s nádechem do červenohněda

##### 3.1.1 Požadavky na jakost

1. Do medu nesmí být přidány žádné jiné látky včetně přídatných látek.
2. Z medu nesmí být odstraněn pyl ani jiná specifická součást medu, s výjimkou případů, kdy tomu při odstraňování cizorodých anorganických a organických látek, zejména filtrací, nelze zabránit.
3. Med, s výjimkou pekařského (průmyslového) medu, nesmí:
  - a) mít jakoukoli cizí příchut' a pach,
  - b) začít pěnít nebo kvasit,

c) být zahříván tak, že jeho přirozené enzymy budou zničeny nebo významně inaktivovány,

d) být u něj uměle změněna kyselost (vyhláška č.76/2003 Sb).

### 3.1.2 Spotřeba medu v České republice

Spotřeba medu v Česku v posledních letech roste, nyní se uvádí roční spotřeba 1 kg medu na obyvatele. Od roku 2005 spotřeba medu vzrostla o 0,4 kg na obyvatele za rok (Kružík et al., 2020).

## 3.2 Chemické složení medu

Med obsahuje více než 200 různých látek a skládá se převážně z cukrů, vody a dalších látek, jako jsou bílkoviny (enzymy), organické kyseliny, vitamíny (zejména vitamín B6, thiamin, niacin, riboflavin a kyselina pantothenová), minerály (vápník, měď, železo, hořčík, mangan, fosfor, draslík, sodík a zinek), pigmenty, fenolové sloučeniny, velké množství těkavých sloučenin a pevných částic získaných výrobou medu (Da Silva et al., 2016).

### 3.2.1 Cukry

Sacharidy jsou hlavními složkami medu, které tvoří asi 95 % sušiny. Vysoká koncentrace cukrů má za následek produkci osmotického tlaku, který slouží jako antimikrobiální faktor (Molan, 1997).

Přítomnost cukrů v medu ovlivňuje energetickou hodnotu, viskozitu, granulaci a hygroskopičnost medu. Až 75 % cukrů v medu tvoří monosacharidy, z nichž nejvíce jsou zastoupeny fruktosa s glukosou, 10–15 % disacharidy (sacharosa, maltosa, turanosa, isomaltosa, maltulosa, trehalosa, kojibiosa), trisacharidy (maltotriosa, melezitosa) a ostatními cukry. Ve většině medů je hlavním cukrem fruktosa, avšak existují výjimky, jako řepka (*Brassica napus*) a pampeliška (*Taraxacum officinale*), kde se glukosa vyskytuje ve větším množství (Escuredo et al., 2014).

Složení cukru záleží na botanickém a zeměpisném původu medu. Může však být ovlivněn i způsobem zpracování a skladováním nebo klimatem. Během skladování se díky enzymatické aktivitě snižuje obsah monosacharidů a zároveň stoupá množství oligosacharidů. Koncentrace sacharidů se používají k rozlišení medů květového od medovicového, kdy medovicové medy vykazují nižší hladinu monosacharidů a naopak vyšší hladinu trisacharidů a oligosacharidů. Pro klasifikaci některých medů jsou důležité ukazatele koncentrace fruktosy a glukosy a jejich poměr mezi nimi (Da Silva et al., 2016; Machado De-Melo et al., 2018).

### 3.2.2 Bílkoviny a aminokyseliny

Obsah bílkovin v medu zaleží na druhu včel: med od včel *Apis cerana* obsahuje od 0,1 % do 3,3 % bílkovin, zatímco od včel *Apis mellifera* med obsahuje mezi 0,2 % a 1,6 % bílkovin. Pyl je hlavním zdrojem bílkovin, vysokomolekulárních přírodních látek s vysokou molekulovou hmotností  $10^3$  až  $10^6$ , složených z aminokyselin. Nejzastoupenější aminokyselinou v medu je prolin, který má zastoupení v medu kolem 50–85 %. Dále pak kyselina glutamová a asparagová, glutamin, histidin, glycin, threonin,  $\beta$ -alanin, arginin,  $\alpha$ -alanin, kyselina  $\gamma$ -aminomáselná, tyrosin, valin, methionin, cystein, isoleucin, leucin, tryptofan, fenylalanin, lysin, serin. Prolin pochází hlavně ze slinných sekrecí včel při přeměně nektaru nebo medovice na med. Používá se jako indikátor zrání medu a v některých případech falšování cukrem, kde minimální hodnota pro čistý med nesmí být pod hodnotou 180 mg/kg medu (Da Silva et al., 2016). Prolin je nejčastěji vyskytující se volná aminokyselina v medech, nezbytná pro stanovení celkových aminokyselin (Truzzi et al., 2014).

Z hlediska technologického může být přítomnost bílkovin v medu nežádoucí. Čím vyšší je hladina bílkovin, tím nižší bude povrchové napětí medu, který má tak tendenci pění a tvořit vzduchové bubliny. Nepřítomnost obsahu bílkovin je také indikátorem pro falšované, přehřáté nebo dlouhodobě skladované medy (Machado De-Melo et al., 2018).

Velkou část bílkovin medu tvoří enzymy, které se podílejí na biologické aktivitě. Enzym  $\alpha$ -amylasa neboli diastasa patří jako jediná mezi přirozeně se vyskytující amylasy v medu. V Evropské unii má dlouhodobou tradici jako indikátor čerstvosti medu, především kvůli klesající aktivitě během skladování nebo tepelnému ošetření. Do medu se dostává z hltnových žláz včel. Diastasa se řadí mezi enzymy, které štěpí škroby. Vyznačuje se také největší odolností vůči teplotě. (Kružík et al., 2018; Machado De-Melo et al., 2018).

Dalším důležitým enzymem je invertasa neboli sacharasa, která dokáže štěpit sacharosu na jednodušší cukry jako jsou glukosa s fruktosou. Opačným procesem dokáže z jednodušších cukrů tvořit oligosacharidy (Polčák, 2013). Mezi enzymy s antimikrobiálními účinky patří především lysozym, který hydrolyzuje glykosidické vazby v peptidoglykanu a štěpí je na disacharidové jednotky (Viuda-Martos et al., 2008).

Aktivita enzymů je závislá na teplotě. Maximální aktivity dosahuje při teplotě 40 °C. Při této teplotě umožňují průběh chemických reakcí, které by jinak při takto nízkých teplotách neproběhly. Při zvýšení teploty dojde k postupné inaktivaci enzymů a tím i k poklesu jeho aktivity. Při neuváženém přehřátí dojde k nevratné destrukci enzymů (Lstibůrek, 2016).

Obsah enzymů závisí především na teplotě a botanickém původu, ale i na věku a fyziologickém stádiu včely nebo stupni přeměny nektaru (Machado De-Melo et al., 2018). Mezi medy bohaté na enzymy se řadí zejména smíšené medy z prostřední snůšky (Vašíčková, 2011).

### 3.2.3 Organické kyseliny

V každém medu se vyskytuje přibližně 0,57 % organických kyselin. Tyto kyseliny ovlivňují sensorické vlastnosti, především barvu a chuť medu společně s jeho chemickými vlastnosti, jako jsou kyselost, pH nebo elektrická vodivost. Organické kyseliny jsou získávány z cukrů díky enzymům vylučovaných včelami při přeměně nektaru na med (Da Silva et al., 2016).

Nejpočetnější kyselinou v medu je kyselina glukonová, která je tvořena z glukózové oxidázy. V medu je zastoupena v 70–90 %. Kromě kyseliny glukonové je v medu přítomno více než 30 dalších nearomatických organických kyselin. Vznikají jako meziproducty Krebsova cyklu nebo podobných enzymatických reakcí. Jsou syntetizovány včelími enzymy z glukosy, fruktosy a sacharosy. Vyznačují se antibakteriální aktivitou, antioxidační aktivitou, možností využití této kyseliny jako indikátory fermentace nebo jako markery pro charakterizaci botanického a geografického původu. Příkladem může být výskyt argininu v kaštanovém medu nebo přítomnost tryptofanu v medu z akácie. Antibakteriální vlastnosti mají ale i aromatické organické kyseliny, jako je kyselina kávová, ferulová a deriváty kyseliny benzoové. Mezi organické kyseliny, které se v medech vyskytují ve větším množství můžeme zařadit kyselinu glukonovou, citrónovou, jablečnou nebo jantarovou. (Mato et al., 2003).

Koncentrace kyselin glukonové a citrónové se používá jako spolehlivý parametr pro odlišení květového medu od medovice. Kyselost medu se pohybuje okolo pH 3,4 až 6,4. Nízké pH medu zamezuje vývoji a růstu mikroorganismů (Da Silva et al., 2016; Machado De-Melo et al., 2018).

### 3.2.4 Vitamíny

I med obsahuje malé množství vitamínů, zejména pak komplex vitamínu B. Mezi nejběžněji se vyskytující vitamíny v medu patří thiamin (B1), riboflavin (B2), kyselina nikotinová (B3), kyselina pantothenová (B5), pyridoxin (B6), biotin (B8 nebo H) a kyselina listová (B9). Nejdůležitější je však termolabilní vitamín C, který se vyskytuje téměř ve všech typech medu a je žádoucí především díky jeho antioxidačním účinkům. Jeho stanovení jsou složitá, díky nestabilitě při teplu, světlu nebo jeho citlivosti na chemické a enzymatické oxidace. První studie vitamínů v medu byla zpočátku prováděna biologickými metodami. Teprve po roce

1940 byly zavedeny chemické metody pro stanovení kyseliny askorbové. Vitamíny jsou obsažené převážně v pylu, proto filtrace medu může výrazně snížit obsah vitamínů v konečném produktu. Dalším faktorem, který má za následek ztrátu vitamínů v medu, je oxidace kyseliny askorbové peroxidem vodíku, který je produkován glukózovou oxidázou (Da Silva et al., 2016).

V malém množství můžeme najít v medu i vitamíny rozpustné v tucích, jako jsou vitamíny A, D, E a K (Machado De-Melo et al., 2018). Z pohledu výživy je množství zanedbatelné.

### **3.2.5 Minerály**

Obsah minerálů v medu se pohybuje od 0,04 % u světlých medů do 0,2 % v tmavých medech. Podíl minerálů v medu je odrazem původu pylu. Obsah stopových prvků přítomných v medu závisí tedy na typu rostliny a na typu půdy, kde rostlina rostla (Da Silva et al., 2016).

Minerální podíl je ovlivňován i půdními a klimatickými podmínkami. Lze ho ovlivnit také formou sklizně nebo použitými včelařskými technikami – extrakce. Minerály jsou absorbovány do půdního roztoku, prochází do buněčné stěny a difuzí jsou transportovány až do nektaru či pylu (Machado De-Melo et al., 2018).

Nejhojnějším prvkem, který obecně odpovídá jedné třetině celkového obsahu minerálů v medu je draslík. V menších množstvích med obsahuje také sodík, železo, měď, křemík, mangan, vápník a hořčík. Obecně platí, že tmavé medy obsahují více minerálních látek. Minerální látky nepodléhají degradaci působením tepla, světla či změnou pH (Da Silva et al., 2016).

### **3.2.6 Fenolové sloučeniny**

Tyto látky se vyznačují benzenovým jádrem s jednou nebo více navázaných hydroxylových skupin ve svých strukturách. Významné jsou především svou biologickou aktivitou, díky níž jsou jim připisovány antibakteriální, antioxidační a protizánětlivé účinky. V medu se vyskytují především flavonoidy, fenolové kyseliny a jejich deriváty (Machado De-Melo et al., 2018).

Fenolové sloučeniny přítomné v medu jsou používány jako markery botanického a zeměpisného původu. Mezi nejvýznamnější patří flavonoidy, dalšími jsou pak chrysin nebo hesperetin (Da Silva et al., 2016).

### **3.3 Fyzikální vlastnosti**

#### **3.3.1 Krystalizace**

Samovolná přirozená vlastnost neboli tuhnutí medu, je projevem zrání. Rychlost krystalizace závisí na vzájemném poměru jednoduchých cukrů. Obecně lze říct, že medovicové medy krystalizují pomaleji než medy květové. Rozhodující je v tomto případě podíl fruktosy a glukosy, přičemž medy s vyšším obsahem glukosy (květové) budou krystalizovat již po pár týdnech od vytočení. Obnovení tekuté konzistence lze dosáhnout pomocí ohřátí medu, teplota by však neměla překročit 50 °C (Vašíčková, 2011).

Největší krystaly se vytvoří při teplotách kolem 25–30 °C. Při nižších teplotách se krystalky zmenšují díky narůstající viskozitě. K rozpuštění krystalků dojde při zahřátí medu na teplotu od 35–40 °C. Ke zrychlenému růstu krystalků přispívá i přítomnost pylových a prachových zrn, tepelný šok při zpracování nebo mechanický šok při odstředování medu. (Lstibůrek, 2016).

#### **3.3.2 Viskozita**

Viskozita patří mezi základní technologický parametr, ovlivňuje tok medu v průběhu zpracování medu. Je závislá na několika faktorech. Důležitý faktor hraje obsah vody, dalšími jsou pak teplota, chemické složení medu a jeho botanický původ. Změnu viskozity docílíme šetrným tepelným ohřevem (Stará, 2019).

#### **3.3.3 Elektrická vodivost**

Medy se vyznačují velmi nízkou elektrickou vodivostí, dokonce je srovnatelná s vodivostí destilované vody. Faktor hraje i obsah minerálních látek, čím více, tím větší vodivost. Jedná se o indikátor, který se často využívá při kontrole kvality medu, dokáže rozlišit květové medy od medovicových (Da Silva et al., 2016; Dadaková, 2017).

#### **3.3.4 Hygroskopicitá**

Med je vysoce hygroskopická látka, využívaná především v pekařství a cukrářství. Přidání medu do výrobků zvyšuje jejich vláčnost a zabraňuje vysychání. Nejpoužívanější je přidávání medu do perníčků (Stará, 2019).

#### **3.3.5 Barva**

Odvozuje se od botanického původu medu, způsobu zpracování nebo délce skladování. Průhlednost závisí na obsahu pylových zrn, které způsobují i opalescenci neboli rozptyl světla,

který je způsoben malými částicemi v průhledné látce. Příkladem může být med z kaštanovníku nebo třezalky, který se vyznačuje načervenalým zbarvením. Dalšími barvami mohou být odstíny nazelenalé či načernalé. Barva patří mezi parametry, které se u medu liší nejvíce. Po krystalizaci dochází k zesvětlení barvy, je to způsobeno krystalky glukosy, které jsou bílé. Mezi rostlinná barviva, které ovlivňují barvu medu můžeme zařadit flavonoidy, antokyany, xantofyly a chlorofyly (Da Silva et al., 2016; Dadaková, 2017). Další látky, které mohou ovlivnit barvu medu jsou cukry, minerály a aminokyseliny (Machado De-Melo et al., 2018).

### **3.4 Antimikrobiální aktivita**

Antibakteriální účinky medu jsou známy již od roku 1982. Mezi bakterie, které jsou citlivé na med můžeme zařadit *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* a *Pseudomonas aeruginosa*. Účinky jsou však ovlivněné čerstvostí, zda med prošel či neprošel tepelnou úpravou a dobou působení ohřevu. Mimo to byly u medu popsány i antivirulentní účinky proti mikroorganismům, kterým tak zabraňuje získávat železo od hostitele nebo účinky antimikrobiální, které můžeme využít v boji proti kvasinkách, houbám a některým virům či parazitům. Antimikrobiální aktivita medu je závislá na botanických zdrojích, metabolismu včel, enviromentálních, sezónních a klimatických podmínkách, které mají silný vliv na fyzikální a chemické vlastnosti této potraviny. Mezi látky, které jsou za antimikrobiální aktivitu medu zodpovědné, patří peroxid vodíku, poměr katalasy k peroxidu vodíku, polyfenoly, antioxidanty, peptidy, methylglyoxal, ale i nízké pH a vysoká koncentrace cukrů (Brudzynski et al., 2012; Machado De-Melo et al., 2018).

### **3.5 Požadavky na kvalitní med**

Obsah vody musí být do 18 % (w/w), kvůli bezpečnosti dlouhodobého skladování. Obsah vody ukazuje, zda byl med vytočen až po dosažení zralosti. Přírodní enzymy medu nesmí být zničeny nebo jinak výrazně inaktivovány ohřevem. Protože med si můžeme představit jako přesycený roztok cukrů, vyznačuje se med vysokou nestabilitou. Jedná se především o krystalizaci cukrů a snahu přijímat vlhkost. Med je hygroskopický, tudíž snadno přijímá vlhkost z okolí. Prevencí je ošetření medu a jeho skladování v prostorách s vlhkostí nižší než 60 %. Jen díky šetrnému ošetření a správnému skladování a zacházení s medem můžeme oddálit jeho postupnou degradaci společně se zachováním příznivých vlastností (Lstibůrek, 2016).



## **3.6 Získání medu**

### **3.6.1 Zralost**

Doba zralosti medu se určuje pomocí obsahu vody, který by neměl překročit 20 %. Mezi ideální hodnoty patří obsah vody mezi 15–17 %, při tomto obsahu vody med již nemůže zkvasit. Samotné včely toto období rozpoznají a reagují tím, že zavíčkují buňky s medem. Znamená to, že byly v medu ukončeny všechny fyzikální a chemické procesy. Následně lze provést zkoušku zralosti pomocí trhnutí plástem, který držíme ve vodorovné poloze, pokud z něj med nevystříkne, může se přejít k vytáčení. (Polčák, 2013).

### **3.6.2 Získávání z plástů**

Prvním krokem k oddělení medu od pláství je odvíčkování. Používají se odvíčkovací vidličky či odvíčkovací nože. Z víček je možno poté získat roztavením včelí vosk (Polčák, 2013).

Nejšetrnější způsob, jak dostat med z plástů je vykapávání na suchém a teplém místě při nejméně 20 °C. Mezi další způsoby patří získání medu pomocí odstředivé síly v medometech. Při tomto způsobu by měl být med před vytáčením zahřátý na 35 °C, při níž má med malou viskozitu. Můžeme si pak dovolit snížit rychlost otáček, čímž docílíme z pohledu kvality medu šetrnější vytáčení. Další kroky by měly rychle navazovat na sebe, aby se zkrátila doba, při které je med zahřátý (Lstibůrek, 2016; Vašíčková, 2011).

### **3.6.3 Cezení**

Když jsou všechny krystalky medu rozpuštěny, může se přejít k cezení. Po vytočení med obsahuje nečistoty a zbytky vosku, nutná je proto filtrace. Používají se hrubá a jemná síta nebo uhelón. Následně se ještě čířením odstraní vzduchové bubliny, které by mohly působit jako zárodečná centra a urychlit tak začátek krystalizace. Takto ošetřený med je teprve vhodný k prodeji. Hmotnost jednoho litru medu by měla mít alespoň 1,4 kg. (Lstibůrek, 2016; Polčák, 2013).

### **3.6.4 Skladování medu**

Díky správnému skladování můžeme zásadně ovlivnit trvanlivost medu a jeho stálost. Med je citlivý na světlo, proto je vhodné skladovat med v místech bez přístupu slunečních paprsků a v suchu. K zabránění přijímání vlhkosti z ovzduší se med skladuje v uzavřených nádobách při teplotách od 10–15 °C s relativní vlhkostí do maximálně 70 %. Sklenice by měly vždy být plněny až po hrdlo. Při vhodných podmínkách vydrží med až 2 roky. Dlouhé

skladování má za následek ztrátu aroma a rozložení sacharidů na hydroxymethylfurfural. Med je pak tmavší a vyznačuje se hořkou chutí (Vašíčková, 2011).

Během skladování se mohou vyskytnout i oxidační, redukční a degradační procesy, při kterých dochází k přeměně uhlovodíků na menší molekuly, jako jsou například alkoholy. Jejich přítomnost pak umožňuje vývoj kvasinek v sacharidových potravinách (Da Silva et al., 2016).

### 3.7 Maillardova reakce

Maillardova reakce je soubor neenzymatických reakcí mezi redukujícím se sacharidem a aminokyselinami, který probíhá za zvýšené teploty (Jandlová 2016).

Maillardova reakce je považována za jednu z nejčastějších vedlejších reakcí při zahřívání potravinářských výrobků obsahujících sacharidy a bílkoviny. Jde o přírodní netoxickou metodu přeměny proteinů na stabilnější formy, díky níž se zlepší některé technologické vlastnosti, jako jsou termostabilita, emulgační kapacita nebo pěnivost. Konečnými produkty reakce jsou tzv. melanoidy, které jsou hnědě zbarvené a způsobují neenzymatické hnědnutí potravin. Zajišťují však specifické sensorické vlastnosti pro danou potravinu, nejvíce vůni, chuť, barvu a nutriční hodnotu. Reakce může vést i ke tvorbě nežádoucích produktů, a to už i při zpracování potravin nebo díky špatným podmínkám skladování (Nooshkam et al., 2020).

#### 3.7.1 Fáze Maillardovy reakce

1. Reakce karbonylové skupiny sacharidu s aminoskupinou aminokyseliny
2. Přeměna glykosylaminů na aminodeoxycukry (Amadoriho a Heynsův přesmyk)
3. Přeměna aminocukrů za vzniku deoxyglykosulos, aminodeoxyglukosulos a reduktonů
4. Reakce ulos s reduktony za vzniku heterosyklických sloučenin
5. Strackerova degradace aminokyselin s následnou reakcí Strackerových aldehydů
6. Reakce meziproductů: glykace bílkovin a vznik melanoidů (Tamanna & Mahmood, 2015; Troise, 2019).

#### 3.7.2 Izomerace glykosylaminů

Amadoriho přesmyk

Aldosyl-amin  $\rightarrow$  ketosamin (1-amino-1-deoxy-ketosa)

D-glukosylamin  $\rightarrow$  D-fruktosamin (1-amino-1-deoxy-D-fruktosa)

Heynsův přesmyk

Ketosyl-amin → aldosamin (2-amino-2-deoxy-aldosa)

D-fruktosylamin → D-glukosamin (2-amino-2-deoxy-D-glukosa) (Da Silva et al., 2016; Tamanna & Mahmood, 2015; Troise, 2019).

### 3.7.3 Výsledek Maillardovy reakce

Díky působení Maillardovy reakce dochází ke snížení obsahu živin, především ke ztrátě cukrů a aminokyselin. Dochází tak ke snížení nutriční hodnoty potraviny. Vznikají sekundární vonné látky díky derivátům furanu, pyrrolu, pyrazinu či thiofenu. Nevýhodou reakce je vznik toxických a zdraví škodlivých látek, jako jsou akrylamid nebo kondenzované dusíkaté heterocykly. Omezení reakce můžeme dosáhnout úpravou pH či kratším záhřevem na mírnější teplotu (Da Silva et al., 2016; Nooshkam et al., 2020).

### 3.7.4 Využití

K reakci dochází především při zpracování, výrobě a přípravě potravin. Mezi nejběžnější úpravy potravin patří pražení, vaření, pečení, smažení, sušení či extruze nebo mikrovlnný ohřev. Výsledkem je vznik typických sensorických vlastností, jako jsme zvyklí např. u kávy, či perníku (Nooshkam et al., 2020).

## 3.8 Hydroxymethylfurfural

Hydroxymethylfurfural (HMF) je velmi reaktivní krystalická bezbarvá látka, která na vzduchu okamžitě hnědne a zapříčiňuje hnědé až žlutohnědé zbarvení. Molekula HMF je tvořena furanovým kruhem, hydroxymethylovou skupinou a karbonylovou skupinou. HMF vzniká Maillardovou reakcí nebo dehydratací cukrů při karamelizaci. Vyskytuje se tedy především v tepelně upravených potravinách. Jeho přítomnost můžeme očekávat i v sacharidových potravinách jako jsou džemy, ovocné koncentrované šťávy nebo medy. Denní příjem HMF se odhaduje od 4 do 30 mg/osobu/den. Jeho množství v potravinách se zvyšuje poklesem pH, délkou skladování a nízkou vlhkostí (Jandlová 2016).

Obecně je HMF používán jako parametr čerstvosti medu. Jeho koncentrace v medu se zvyšuje tepelným zpracováním, ale i falšováním pomocí cukrů. Obsah HMF je rovněž ovlivněn hodnotou pH, použitím kovových nádob, ale závisí i na včelím druhu a botanickém zdroji. Jeho vznik může urychlovat vysoká kyselost, vlhkost, obsah cukrů (hlavně fruktosa), aminokyseliny (alanin) a minerály (hořčík, mangan, železo a zinek) (Machado De-Melo et al., 2018).

Jandlová (2016) ve své diplomové práci uvedla, že množství HMF se sleduje pouze v medech. Dle vyhlášky č. 76/2003 Sb. v aktuálním znění musí být množství HMF u květových a medovicových medů do 40 mg/kg. U medů z oblastí s tropickým klimatem nebo ze směsi těchto medů nesmí množství HMF překročit 80 mg/kg. Množství HMF v medu je ukazatelem stáří a záhřevu medu či špatných podmínek skladování. Požadavky na množství HMF v medu jsou zapracovány v legislativě Evropské unie.

Dle Sukové (2002) bylo prokázáno, že medy s nižším pH vytváří při zahřátí medu více HMF než medy s pH vysokým. Aktivita enzymů související s ohřevem na 80 °C: Sacharasa se ukázala jako vhodný indikátor k důkazu poškození teplotou a dobou skladování. V květových medech došlo k většímu poškození než u medů lesních. U teplot mezi 30–40 °C však více reagovala diastasa. Prolin se ukázal jako stabilní aminokyselinou v medu, proto může být použit jako kritérium zralosti.

Studie prokázaly, že HMF může vyvolat mutagenní a genotoxické účinky na bakterie a lidské buňky a podporovat rakovinu tlustého střeva a jater u potkanů a myší (Nguyen et al., 2016).

### **3.9 NMR**

Spektrometrie nukleární magnetická rezonance (NMR) je metoda, která využívá magnetických vlastností jader. Díky ní můžeme získat detailní informace o struktuře a dynamických vlastnostech organických i anorganických látek a biomolekul v kapalném, plynném či pevném stavu. Principem metody je měření absorpce elektromagnetického záření (od 4 do 900 MHz), díky spinové rezonanci jader v silném magnetickém poli. Účinná je však pouze na atomy, jejichž jádra mají lichý počet protonů a neutronů, obecně se tato platnost nazývá spinový moment (Buděšínský, 2000).

Metoda našla své využití především pro detekci původu potravin a k odhalování falšování potravin díky biomarkerům. Mezi všemi analytickými metodami, které se využívají pro zkoumání potravin, dosáhla NMR v posledních letech velkého uznání a bylo prokázáno, že v kombinaci s chemometrií tvoří slibnou metodu pro ověřování pravosti potravin. Nyní jsou vytvářeny spektrální databáze pro různé potraviny (např. med, víno...), který se následně využívají při testování (Schievano et al., 2019).

NMR se vyznačuje svou přesností a vysokou reprodukovatelností. Mezi výhody metody se řadí nedestruktivnost vzorků, rychlá a snadná příprava vzorků, schopnost měření několika vzorků bez nutnosti předešlé chromatografické separace (Schievano et al., 2017).

### 3.9.1 Využití NMR v medu

Ve studii Beretta et al. (2008) bylo testováno 44 italských medů z 20 různých botanických zdrojů. Výsledkem byly stanoveny markery pro med kaštanový a lipový. Tentýž rok byly ve studii Donarski et al. (2008) stanoveny glukosa s fruktosou ve 182 vzorcích medů z různých zemí, společně s 1. identifikací látky trigonellin.

Studie Schievano et al. (2017) představili novou metodu, jak identifikovat a kvantifikovat sacharidy ve vodných roztocích bez předchozích úprav pomocí NMR. Povedlo se jim rozlišit a určit 22 cukrů navzdory jejich strukturální podobnosti.

Schievano et al. (2019) ve studii pomocí NMR dokázali jasně rozlišit italské akátové medy od východoevropských akátových medů. Hlavní rozdíly našli v obsahu a různorodosti sekundárních metabolitů. Potvrdili tak, že spektra NMR poskytují podrobné otisky prstů jednotlivých druhů a jsou vhodné pro identifikaci botanického původu. Pro analýzu NMR jsou vzorky medů většinou rozpouštěny ve vodě nebo v dimethylsulfoxidu (DMSO).

## 3.10 Tepelné procesy

Tepelné zpracování potravin může mít nežádoucí důsledky, jako jsou ztráta živin, tvorba toxických látek (akrylamid, furan nebo akrolein) nebo sloučenin s negativními účinky na chuť, texturu nebo barvu (Wenzl et al., 2007).

Svoje využití nachází především v potravinářství při výrobě potravin. Tepelné procesy lze rozdělit podle intenzity teploty, která je použita. Jsou to pasterace (teplota od 60–70 °C), sterilace (nad 100 °C) a ošetření pomocí ultravysoké teploty (od 140–160 °C). Tyto ošetření se používají především kvůli urychlení chemických reakcí. Taktéž se zrychlují i biochemické a mikrobiální reakce, ale pouze do určité teploty, poté jsou enzymy a mikroorganismy inaktivovány. Díky pasteraci dochází k inaktivaci patogenních bakterií. Intenzivnějším tepelným ošetřením nad 100 °C jsou inaktivovány vegetativní buňky společně se sporami. Zajišťují tak prodloužení trvanlivosti. Teplotní úpravou dojde k zastavení mikrobiálních a enzymatických reakcí, chemické a fyzikální změny se v potravinách však budou dít i nadále. Příkladem chemické změny je Maillardova reakce, která vede ke změně zbarvení či vzniku aromatických látek ať už žádoucích či naopak. Tepelné zpracování má i pozitivní účinek na

stravitelnost potravin a biologickou dostupnost živin např. karotenoidy a polyfenoly. Obecně platí, že denaturované bílkoviny jsou stravitelnější. Trávicí enzymy můžou snadněji hydrolyzovat rozložené molekuly (van Boekel et al., 2010).

Tepelné zpracování může být provedeno několika způsoby. Nejznámější jsou přímý a nepřímý ohřev nebo vstřikování páry do kapalného produktu (van Boekel et al., 2010).

Nagai et al. (2018) ve své studii testoval vliv zahřívání na 6 druhů medů. Medy byly zahřáty po dobu 24 hodin na 100 °C. Byl stanoven zvýšený obsah redukujících se cukrů v produktech Maillardovy reakce a důsledkem karamelizace. Dále sledoval i index zhnědnutí při vlnových délkách 284 nm a 420 nm během zahřívání. Nebyla však zpozorována žádná významná změna se stupněm počátečního hnědnutí. Další studie zaměřené na změny složení po ohřevu jsou shrnuty v tabulce č. 2.

Studie Šarić et al. (2013) uvedla, že krátký čas ohřevu při relativně nízké teplotě nemá vliv na antioxidační aktivitu medu.

### **3.11 Omické vědy**

Omické vědy jsou nazývány nové vědní obory, které využívají velkých dat získávaných moderními přístroji. Nejčastěji se tímto pojmem rozumí genomické, proteomické, lipidomické, glykomické, transkripční a metabolomické obory či jejich kombinace. V zemědělství jsou využívány pro zlepšení kvality a bezpečnosti potravinářských plodin, dále pak pro zvýšení jejich produkce a odolnosti vůči okolnímu prostředí. Zkoumají reakce plodin na stres, interakci s meziplodinami a patogeny a zaznamenávají fyzikálně-chemické změny, ke kterým dochází například při dozrávání ovoce. Kvalitu a bezpečnost potravin lze dosáhnout již výběrem vhodné plodiny pro dané agroekologické podmínky. Omické vědy proto nabízejí nástroje k identifikaci nebo výběru nových druhů rostlin s různými genotypy, aby plodiny byly co nejodolnější (Alfieri, 2018).

Využívání omických věd v potravinářských technologiích je známo pod pojmem 'foodomics'. Foodomics patří mezi omické vědy, které studují vztah zdraví a potravin. Zajímají se o oblast potravin a výživy s cílem zlepšení zdraví, kvality a důvěry spotřebitelů. Snaží se ale i informovat o vlivu jednotlivých potravin na naše zdraví, nebo jak využívat jednotlivé potraviny při prevenci proti nemocím. Foodomika je založena na použití analytických metod, sloužící k získání informací, které by zlepšily bezpečnost a kvalitu potravin, zvýšily produkci nebo dosáhly snížení obsahu alergenů (Alfieri, 2018; Valdés et al., 2017).

Pod odvětví foodomiky spadá genomika, proteomika a metabolomika, které se společně snaží urychlit výzkumy v oblasti bezpečnosti potravin, zlepšení kvality, skladovatelnosti a v neposlední řadě pochopení bioaktivity potravin na molekulární úrovni. Jejich cílem je i objevení nových biomarkerů, které by mohly sloužit pro kontrolu kvality potravin nebo odhalení falšování (Valdés et al., 2017).

Metabolomika se zaměřuje na identifikaci a kvantifikaci malých molekul, které se vyskytují v biologických systémech. Využívá se buď metabolického profilování, nebo metabolického snímání otisků prstů. Metabolické profilování studuje příbuzné metabolity (flavonoidy, karotenoidy) a jejich metabolické dráhy. Naopak metabolické snímání otisků prstů pouze porovnává vzorce metabolitů. Metabolomické profilování nachází uplatnění v identifikaci biomarkerů, v epidemiologických studiích či screeningu složení potravin. Nejčastěji se používají analytické metody jako hmotnostní spektroskopie (MS) nebo NMR analýza. MS je využívána především na analýzu primárních metabolitů, jako jsou sacharidy, organické kyseliny nebo aminokyseliny. Nukleární magnetická rezonance je nedestruktivní metodou, která lze proto snadno kombinovat s jinými metodami. Používá se buď samostatně nebo v kombinaci s plynovou chromatografií či kapilární elektroforézou. Kombinace různých měření poskytuje doplňující analytické informace (Valdés et al., 2017).

Tabulka 2: Systematická tabulka studií zaměřených na změny složení po ohřevu

Autor a rok studie	Matrice	Zaměření	Přístroje	Analýza (cílená/necílená)	Výsledek
Goetz & Koehler, 2005	vybrané syrovátkové bílkoviny a vejce	denaturace bílkovin	LR-NMR spektrometru mq20 (20 MHz)	kombinace	Byly zaznamenány teplotní intervaly denaturace pro jednotlivé proteiny (ovalbumin, konalbumin a $\beta$ -laktoglobulin), byly rozlišeny reverzibilní a nevratné strukturální změny v důsledku tepelného zpracování
Liang et al., 2015	černý česnek	detekce změn v NMR při tepelném zpracování česneku	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz) z Agilent Unity INOVA-600s kryogenní sondou (32 skenů)	kombinace	Změna v obsahu fruktosy, glukosy, acetátu, kyseliny mravenčí, kyseliny pyroglutamové a 5-hydroxymethylfurfuralu (5-HMF)



<b>Autor a rok studie</b>	<b>Matrice</b>	<b>Zaměření</b>	<b>Přístroje</b>	<b>Analýza (cílená/necílená)</b>	<b>Výsledek</b>
Alves Filho et al., 2016	pomerančový džus	vliv plazmy a ozonu při netepelném zpracování na cukry, aminokyseliny a organické kyseliny s krátkým řetězcem v pomerančové šťávě pomocí NMR a chemometrickou analýzou	spektrometr (600 MHz) vybavený 5 mm (H-F/15N-31P) inverzní sonda se Z-gradientem	cílená	ozon ovlivňoval více aromatické signály (koncentrace sacharosy, fruktosy, kyseliny citrónové a jablečné), zpracování ACP více ovlivnilo alifatické systémy (ethanol, prolin, kyselina glutamová), celkové změny džusu nebyly zpozorovány
Sucupira et al., 2017	kokosová voda	efekt UHTa normální zahřívání a sulfodivá adice, falšování vodou, jednoduchými cukry, směsmi cukrů a HFCS	spektrometr (600 MHz) vybavený 5 mm (H-F/15N-31P) inverzní sonda se Z-gradientem	kombinace	u kokosové vody sterilizované při 136 °C byly zpozorovány významnější změny v organickém složení, naopak nižší teplota zpracování při 110 °C s přídavkem siřičitanu zachovala sacharosu, glukosu, ethanol a kyselinu jablečnou beze změn. Celkově však ani jeden ohřev nezpůsobil žádné významné změny ve složení jako celku

## 4. Metodika

Byla stanovena doba ztekucení medu v objemu 240 mg pro 4 různé teploty. Vzorky byly následně touto kombinací času a teploty rozeřhřaty a analyzovány pomocí nukleární magnetické rezonance s cílem zjistit, které sloučeniny jsou tímto ošetřením změněny.

Cílem práce je dospět k doporučení, zdali je lepší rychlý ohřev medu při vyšší teplotě či je výhodnější ohřev pomalejší při nižších teplotách.

### 4.1 Vzorky

Vzorky byly získány ze sbírky VÚVč Dol. Tři medy květové a tři medy medovicové, všechny vytáčený roku 2019. Jednalo se o vzorky z různých míst České republiky ze soutěže Český med. Vzorky byly odebrány s pomocí lžíce z několika míst sklenice. Vzorky byly v době odběru krystalické. Před přípravou vzorků byly medy důkladně promíchány.

### 4.2 Desing experimentu

Byly stanoveny křivky tání 6 medů při teplotách 20 °C, 40 °C, 50 °C a 60 °C s pomocí spektrofotometrického měření při vlnových délkách  $\lambda = 420$  nm a 600 nm. Vzorky medu byly odebrány v časech, kdy došlo k jejich 95% ztekucení při jednotlivých teplotách a byly podrobeny analýze s pomocí  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a 2D NMR. Spektra byla analyzována s využitím chemometrických metod (analýza hlavních komponent (PCA) a diskriminační analýza částečných nejmenších čtverců (PLS-DA)). Výsledné časy tání medu pro jednotlivé teploty jsou zaznamenány v tabulce č. 3.

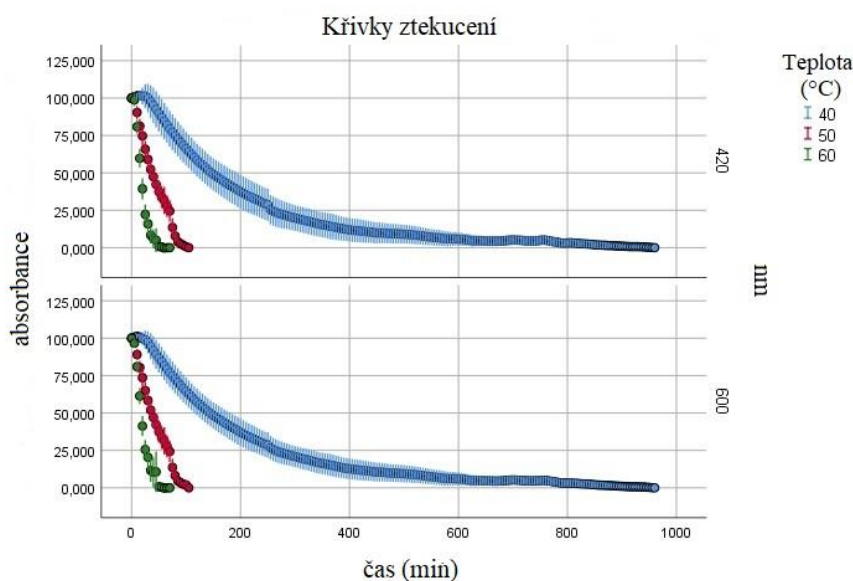
Data byla zpracována v softwarech TopSpin® 4.0, Mestrenova v. 14.2.0, Chenomx v. 8.6 a statistické zpracování bylo provedeno v programech MetaboAnalyst 5.0 a Microsoft Excel 365.

Tabulka 3: Zjištěné hodnoty ztekucování

Teplota	Čas bodu ztekucení
40 °C	560 minut
50 °C	120 minut
60 °C	55 minut

### 4.3 Příprava vzorků pro stanovení bodu ztekucení

Do třech mikrotitračních destiček bylo naváženo vždy 3x 240 mg medu s odchylkou  $\pm 2$  mg od každého vzorku. Jednotlivé destičky byly zahřívány na jinou teplotu (40 °C, 50 °C a 60 °C). Každých 5 minut byly destičky změřeny pomocí spektrofotometru Biotek (Synergy™ H<sup>1</sup>) a byla zaznamenána hodnota. Následně byly hodnoty převedeny do grafu (obrázek č.1), ze kterého byly poté stanoveny výsledné časy, kdy došlo ke ztekucení 95 % medu pro jednotlivé teploty, viz tabulka č.3.



Obrázek 1: Křivky ztekucení medů při vybraných teplotách 40, 50 a 60 °C. Vertikální úsečky zobrazují směrodatnou odchylku 3 pozorování.

Z obrázku č. 1 byly odečteny časové hodnoty, kdy došlo k 95% ztekucení medu, které byly následně použity při 2. části měření.

### 4.4 Příprava vzorků pro analýzu NMR

Od každého vzorku bylo do mikrozkušavky naváženo 240 mg medu s odchylkou  $\pm 2$  mg, navážky byly zaznamenány. Vzorky byly zahřáty vybranými kombinacemi času a teploty, ve 2 opakováních. Po ztekucení bylo ke každému vzorku napipetováno 830  $\mu$ L deionizované vody (Millipore Direct-Q® 3, Merck Millipore, USA). Výsledná koncentrace se pohybovala okolo 240 mg/ml. Roztok medu a deionizované vody byl vortexován a následně homogenizován 10 minut v ultrazvukové lázni až do doby, než byl med viditelně rozpuštěn. V případě potřeby se vortex a ultrazvuková lázeň opakovaly. Z takto připraveného roztoku bylo odpipetováno 540  $\mu$ L do čisté mikrozkušavky. Následně bylo přidáno 60  $\mu$ L NMR pufru. NMR fosfátový pur

v D<sub>2</sub>O byl připraven přidáním 1,5M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 % NaN<sub>3</sub> a 5mM kyselinou trimethylsilylpropanovou (TSP), sloužící jako vnitřní standart NMR spektra díky chemickému posunu 0,0 ppm. Chemikálie na výrobu pufru byly z firmy Lach-Ner, CZ, NaN<sub>3</sub> a TSP byly z firmy Merck, DE. Všechny zkumavky byly po dobu 10 sekund vortexovány. Výsledný objem 600 µL vzorku byl kvantitativně pomocí pipety převeden do NMR kyvet (5 mm, high throughput, Norell, USA).

Výsledných 48 vzorků bylo analyzováno s pomocí <sup>1</sup>H NMR na spektroskopu Bruker Avance III 500 MHz a BBFO sondou (Bruker, DE) s gradienty v ose z, s pomocí pulzní sekvence 1dnoesy. Výsledné signály volné precese byly transformovány Fourierovou transformací, fázovány a referencovány v programu Mestrenova v. 14 (MNOVA, ES). Jednotlivé regiony byly srovnány na změny v integrálech píků nebo jejich posuny a zaznamenány.

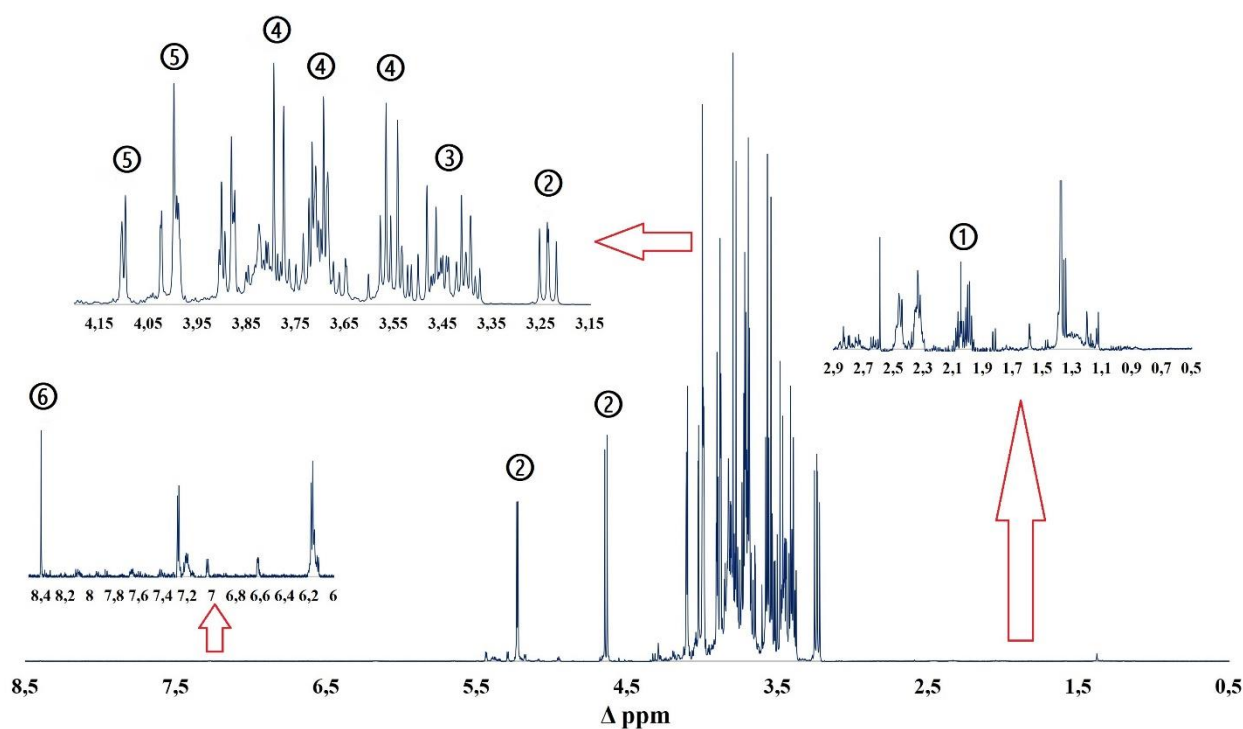
## 5. Výsledky a diskuze

### 5.1 NMR analýza medů

NMR spektra medu se vyznačují několika charakteristickými úseky. První úsek od 0,00–3,00 ppm je typický pro alifatické sloučeniny. V této části spektra můžeme pozorovat typický a významně zastoupený prolin (okolo 2,00 a 2,35 ppm) (Spiteri et al., 2015).

V oblasti sacharidů od 3,00–6,00 ppm převažují hlavně monosacharidy – glukosa a fruktosa. Aromatické sloučeniny zaujímají své místo od 6,00–10,00 ppm (Boffo et al. 2012).

Všechny medy, bez ohledu na zeměpisný nebo botanický původ, mají v aromatické oblasti dva významné markery – mravenčí kyselinu (přibližně 8,45 ppm) a HMF (9,45–9,50 ppm) (Olawode et al., 2018). Na obrázku č. 2 je viditelné pouze kyselina mravenčí.



Obrázek 2: Ukázka NMR spektra medovicového medu, 1 – prolin, 2–5 oblast sacharidů (dochází k překrývání), 2 – glukosa, 3 – převažující glukosa, 4 – glukosa s fruktosou, 5 – fruktosa, 6 – kyselina mravenčí.

Ve spektru dominuje oblast sacharidů (3–6 ppm), z nichž nejzastoupenější jsou glukosa a fruktosa. V alifatické oblasti je viditelný prolin. Peak na 8,4 ppm je signálem protonu H-C kyseliny mravenčí.

V tabulka č. 4 jsou shrnuty významné píky, jejichž intenzita nebo chemický posun se měnily s teplotou a časem. V každém z těchto vybranných píků (značeny modrou barvou) byl viditelný totožný posun jednotlivých spekter. Čím vyšší teplota zahřátí, tím více bylo spektrum posunuto od původního nezahřátého medu.

Tabulka 4: Heatmap píků, u kterých došlo k posunům ve spektru NMR u jednotlivých vzorků

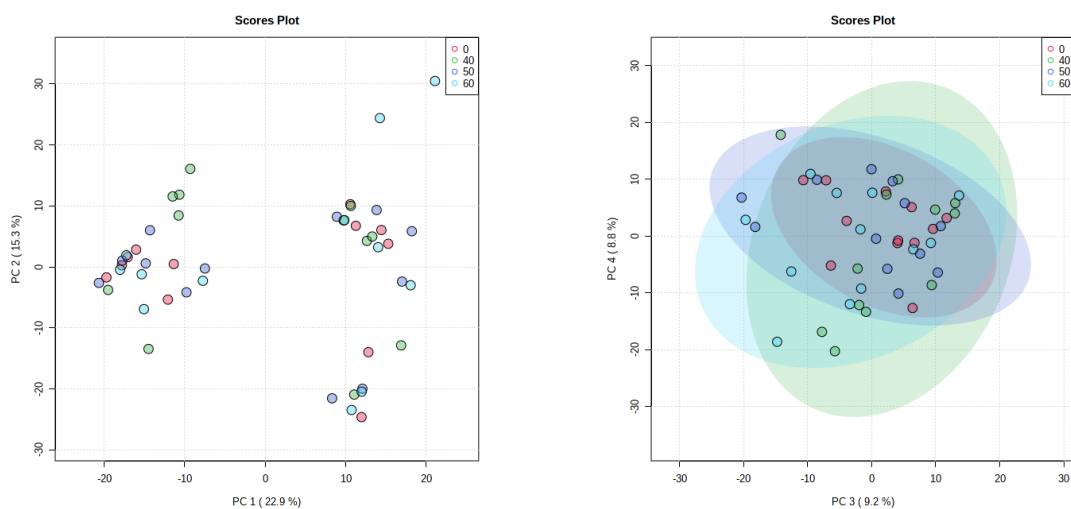
$\Delta$ ppm	medovicový med č. 1	medovicový med č. 2	medovicový med č. 5	květový med č. 3	květový med č. 4	květový med č. 6
1,35	■	■	■	■	■	■
1,96	■	■	■	■	■	■
2,05	■	■	■	■	■	■
2,59	■	■	■	■	■	■
3,28	■	■	■	■	■	■
3,3	■	■	■	■	■	■
3,33	■	■	■	■	■	■
3,34	■	■	■	■	■	■
3,35	■	■	■	■	■	■
4,02	■	■	■	■	■	■
4,19	■	■	■	■	■	■
4,2	■	■	■	■	■	■
4,21	■	■	■	■	■	■
4,43	■	■	■	■	■	■
4,57	■	■	■	■	■	■
4,58	■	■	■	■	■	■
4,61	■	■	■	■	■	■
4,71	■	■	■	■	■	■
4,72	■	■	■	■	■	■
4,79	■	■	■	■	■	■
4,18	■	■	■	■	■	■
5,21	■	■	■	■	■	■
5,24	■	■	■	■	■	■
5,26	■	■	■	■	■	■
5,42	■	■	■	■	■	■
6,64	■	■	■	■	■	■

## 5.2 Vliv času a teploty na integrály píků spektra

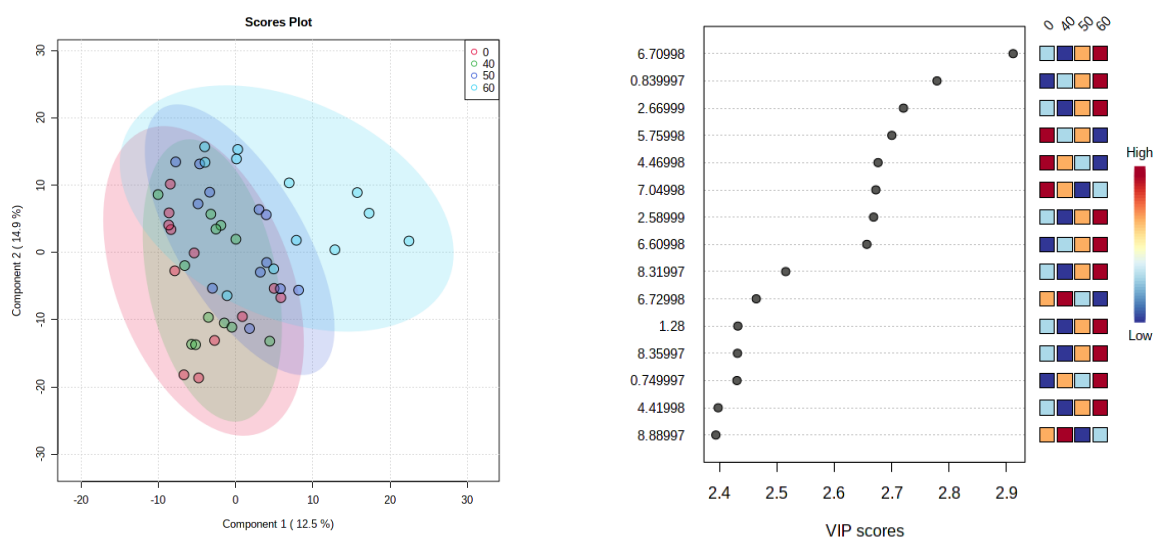
Naměřená spektra byla statisticky vyhodnocena pomocí PCA a PLS-DA analýzy. Byl zkoumán vliv teploty a času na NMR spektra květových a medovicových medů. PCA analýza

dvou hlavních komponent PC1 a PC2 (obrázek 3a) byla schopná správně rozřadit medy do klastrů podle příslušnosti na medovicový a květový (květové – medy č. 3, 4 a 6 a medovicové – medy č. 1, 2 a 5). Osa PC1 však neklastrovala vzorky podle teploty. Komponenta PC1 vysvětluje 22,9 % celkové variability.

Analýza komponent PC3 a PC4 vykazovala nepatrné rozdíly mezi jednotlivými teplotními záhřevy (obrázek 3b). Proto byla zvolena ještě PLS-DA analýza. Pomocí PLS-DA analýzy bylo identifikováno tzv. VIP skóre (variable importance in projection, obrázek 4b), které vyhodnocuje rozdíly mezi jednotlivými píky. Za nejvýznamnější biny byly označeny píky č. 6,7 a 0,839.



Obrázek 3: a) PCA analýza spekter květových a medovicových medů, PC1 22,9 % variace, PC2 15,3 % variace, b) PCA analýza spekter květových a medovicových medů, PC3 9,2 % variace, PC4 8,8 % variace.

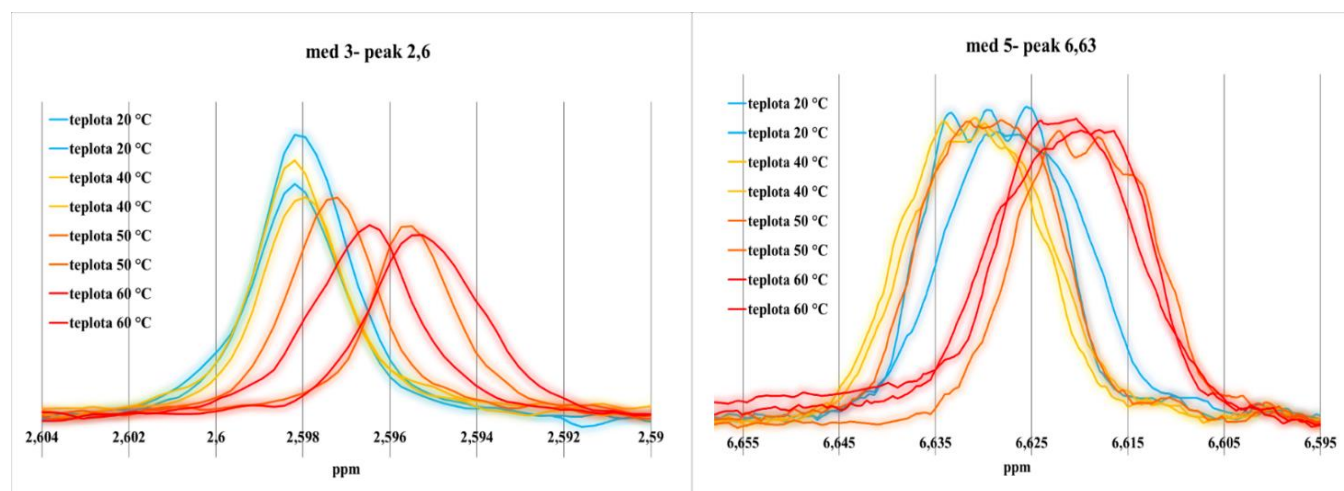


Obrázek 4: a) PLS-DA analýza spekter medovicových a květových medů, b) VIP score významných diskriminačních binů

Z obrázku č. 4 jasně vyplývá rozdíl mezi jednotlivými medy podle toho, kterému stupni záhřevu byl med vystaven. V případě PLS-DA analýzy vede vektor času a teploty zleva směrem doprava (obrázek 4a). Modře jsou označeny medy, zahříváné na teplotu 60 °C, tyto medy se nejvíce lišily od medu původního. Zeleně značené body patří medům, které byly ohřívány na teplotu 40 °C po nejdelší dobu, ty byly původnímu medu nejpodobnější.

### 5.3 Posuní spekter

Následné obrázky zobrazují posunutí spekter, které se vyskytovalo pravidelně u všech píků, které jsou zmíněné v tabulce č.4. Pro ukázkou byly vybrány 2 píky. První graf (obrázek č. 5a) popisuje pík 2,6, který se vyskytoval u všech testovaných medů. Na grafu druhém (obrázek č. 5b) je zobrazený pík 6,63, který má obdobný průběh, ale jeho výskyt byl nalezen pouze u medů medovicových.

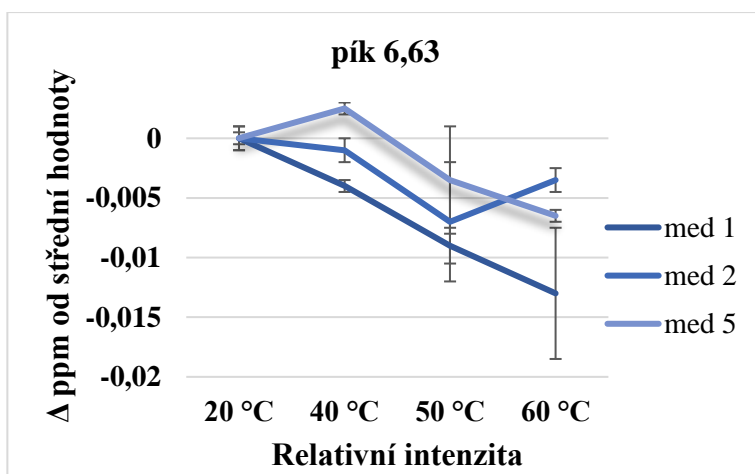


Obrázek 5: a) Ukázka posunu píku na 2,6 ppm v jednotlivých vzorcích, b) Ukázka posunu píku na 6,63 ppm.

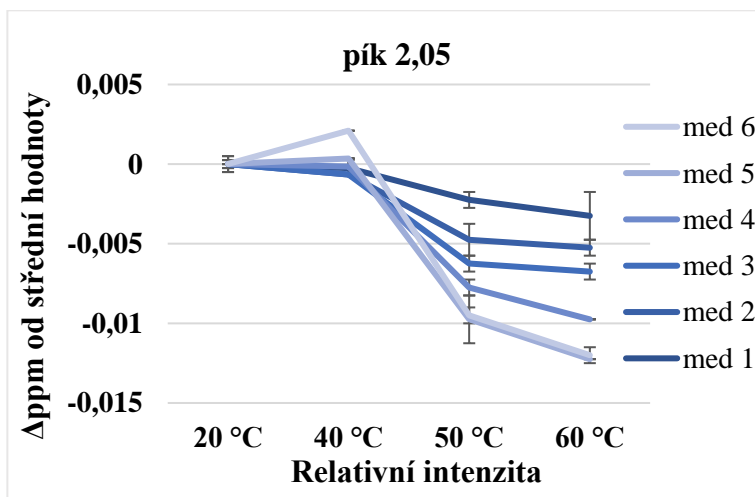
Obrázky č. 5 ukazují posuny jednotlivých píků, ke kterým docházelo při ohřevu zvýšenou teplotou. Křivky jsou barevně označeny podle velikosti stupně záhřevu. Největšího posunu si můžeme všimnout u teplot 50 °C a 60 °C (oranžová a červená linie). Naopak nejmeší posun byl pozorován u teploty 40 °C (žlutá linie) v obou případech.



Jak je možné vidět na obrázcích 6 a 7, největší odchylku od původního nezahřátého medu bylo možné pozorovat právě u medů, které byly zahřívány po dobu 55 minut na 60 °C. Z toho vyvozují, že nejšetrnější ohřev byl ze zkoušených teplot záhřev na 40 °C, protože jeho spektrum se jeví jako nejpodobnější právě medu bez tepelné úpravy. Lstibůrek (2016) ve své práci uvedl, že maximální aktivita enzymů probíhá právě při teplotě 40 °C. Při zvyšování teploty pak dochází k jejich postupné inaktivaci a tím i k poklesu jejich aktivity. Zhao et al. (2018) zahříval medy na teploty 45, 65 a 85 °C po dobu 12 hodin. Výsledek ukázal pouze úbytek aminokyselin, především prolin a fenylalanin. Studie Zarei et al. (2019) při zahřátí medu na teplotu 63 °C po dobu 30 minut ukázala zvýšení obsahu HMF a snížení celkového obsahu fenolových látek.



Obrázek 6: Posun piku 6,63 při daných teplotách s vyznačenými směrodatnými odchylkami



Obrázek 7: Posun piku 2,05 při daných teplotách s vyznačenými směrodatnými odchylkami

Tato práce zatím nedokáže charakterizovat jednotlivé látky, u kterých docházelo k posunům ve spektrech. Jednoznačná identifikace a přesná kvantifikace cukrů v přírodních

matricích je omezena jejich podobnou strukturou a podobnou polaritou, nedostatkem chromoforů a přítomností mnoha strukturálních izomerů (Schievano et al., 2017).

## 6. Závěr

Výzkumná část tvořila dvě části. První část se zaměřovala na stanovení křivek tání jednotlivých medů pro dané teploty 40 °C, 50 °C a 60 °C. V části druhé bylo měření zaměřeno na změny profilu NMR spekter při ztekucení medu. Byl zkoumán vliv kombinací teplot a času na kvalitu medu. Cílem měření bylo zjistit, která kombinace času a teploty je ke ztekucení krystalického medu nejšetrnější, co se týče chemických změn ve složení medu.

Studie zaměřující se na kombinaci vlivu teploty a času ohřevu na NMR spektra medů ukázala, že ošetření pomocí vyšší teploty (60 °C) po dobu 55 min se jeví jako nejméně šetrné, a tedy vzorky jsou nejvíce odlišné od původního krystalického medu. Naopak záhřev na 40 °C po delší dobu (560 min) se nejvíce přibližoval medu původnímu. U všech sledovaných kombinací času a teploty nedošlo k výrazným chemickým změnám. Tato studie dokázala najít několik částí spektra, ve kterém docházelo k totožným posunům. Celkem bylo zjištěno 12 oblastí signálů, ve kterých byly mezi záhřevy změny, z toho 2 byly přítomny u všech medů. Ostatní byly přítomny jen v některých skupinách medů (medovicový, květový). Jednalo se o změny v chemickém posunu nebo v intenzitě, které mohou v sobě odrážet změny v důsledku polymerizace nebo komplexace s ionty. Nejsme ale schopni říci, o jaké změny se jedná konkrétně. Nejméně změn ve srovnání s kontrolou bylo zjištěno u 40 °C v kombinaci s časem. Lze konstatovat, že snižování a navyšování intenzity vybraných píků společně s chemickými posuny byly ve sledovaných vzorcích pravidelné.

## 7. Literatura

Alfieri F. 2018. The role of omic sciences in food security and sustainability. *Encyclopedia of Food Security and Sustainability* **1**:44–49.

Alves Filho EG, Almeida FDL, Cavalcante RS, De Brito ES, Cullen PJ, Frias JM, Bourke P, Fernandes FAN, Rodrigues S. 2016.  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy and chemometrics evaluation of non-thermal processing of orange juice. *Food Chemistry* **204**: 102–107.

Beretta G, Caneva E, Regazzoni L, Bakhtyari NG, Maffei FR. 2008. A solid-phase extraction procedure coupled to  $^1\text{H}$  NMR, with chemometric analysis, to seek reliable markers of the botanical origin of honey. *Analytica Chimica Acta* **620**: 176–182.

Boffo EF, Tavares LA, Tobias ACT, Ferreira MMC, Ferreira AG. 2012. Identification of components of Brazilian honey by  $^1\text{H}$  NMR and classification of its botanical origin by chemometric methods. *LWT-Food Science and Technology* **49**:55–63.

Brudzynski K, Abubaker K, Miotto D. 2012. Unraveling a mechanism of honey antibacterial action: polyphenol/ $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced oxidative effect on bacterial cell growth and on DNA degradation. *Food Chemistry* **133**:329–336.

Buděšínský M, Pelnař J. 2000. Fyzikálně-chemické metody: Nukleární magnetická rezonance. AV ČR. Ústav organické chemie a biochemie, Praha.

Consonni R, Bernareggi F, Cagliani LR. 2019. NMR-based metabolomic approach to differentiate organic and conventional Italian honey. *Food Control* **98**:133–140.

da Silva PM, Gauche C, Gonzaga LV, Costa ACO, Fett R. 2016. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry* **196**:309–323.

Dadaková K. 2017. Fyzikálně-chemická charakteristika vybraných druhů medu [BSc. Thesis]. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín.

Donarski JA, Jones SA, Charlton AJ. 2008. Application of Cryoprobe  $^1\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Multivariate Analysis for the Verification of Corsican Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**:5451–5456.

Escuredo O, Dobre I, Fernández-González M, Seijo MC. 2014. Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chemistry* **149**:84–90.

Goetz J, Koehler P. 2005. Study of the thermal denaturation of selected proteins of whey

and egg by low resolution NMR. *LWT-Food Science and Technology* **38**:501–512.

Hermosín I, Chicón RM, Cabezudo MD. 2003. Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry* **83**:263–268.

Jandlová M. 2016. Vliv použitého sladidla, teploty a doby pečení na obsah hydroxymethylfurfuralu vyrobeného pekařského výrobku. [Diplomová práce]. Mendelova univerzita v Brně, Brno.

Kružík V, Grégrová A, Čížková H. 2018. Ověření metod stanovení přirozených a cizích amylas v medu. *Chemické listy* **112**:777–783.

Kružík V, Grégrová A, Titěra D, Pospiech M, Čížková H. 2020. Charakterizace medu vyprodukovaného v České republice. *Výživa a potraviny* **5**:132–136.

Liang T, Wei F, Lu Y, Kodani Y, Nakada M, Miyakawa T, Tanokura M. 2015. Comprehensive NMR analysis of compositional changes of black garlic during thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**:683–691.

Lstibůrek J. 2016. Cesta k lepší kvalitě medu. *Moderní včelař* **4**:30.

Machado De-Melo AA, Almeida-Muradian LBd, Sancho MT, Pascual-Maté A. 2018. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research* **57**:5–37.

Mato I, Huidobro JF, Simal-Lozano J, Sancho MT. 2003. Significance of nonaromatic organic acids in honey. *Journal of Food Protection* **66**:23712376.

Ministerstvo zemědělství. 2003. Vyhláška č. 76/2003 ze dne 6. března 2003, kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa. Pages 2470–2481 in *Sbírka zákonů České republiky, 2003, částka 32*. Česká republika.

Molan PC. 1997. Honey as an Antimicrobial Agent. Pages 27–37 in Mizrahi A, Lensky Y, editors. *Bee Products*. Springer, Boston, MA, Boston.

Nagai T, Kai N, Tanoue Y, Suzuki N. 2018. Chemical properties of commercially available honey species and the functional properties of caramelization and Maillard reaction products derived from these honey species. *Journal of Food Science and Technology* **55**:586–597.

Nguyen HT, Van der Fels-Klerx HJ, Peters RJ, Van Boekel MA. 2016. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural formation during baking of biscuits: Part I: Effects of sugar type. *Food*

Chemistry **192**:575–85.

Nooshkam M, Varidi M, Verma DK. 2020. Functional and biological properties of Maillard conjugates and their potential application in medical and food: A review. *Food Research International* **131**:109003.

Olawode EO, Tandlich R, Cambray G. 2018. <sup>1</sup>H-NMR Profiling and Chemometric Analysis of Selected Honey from South Africa, Zambia, and Slovakia. *Molecules* **23**:578.

Polčák L. 2013. Faktory ovlivňující produkci medu [Bakalářská práce]. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín.

Pusta DL, Pastiu AI, Pusta A, Tabaran A, Raducu CM, Sobolu R. 2019. Relationship between omic sciences, *Journal of Biotechnology* **305**:578.

Schievano E, Stocchero M, Zuccato V, Conti I, Piana L. 2019. NMR assessment of European acacia honey origin and composition of EU-blend based on geographical floral markers. *Food Chemistry* **288**:96–101.

Schievano E, Tonoli M, Rastrelli F. 2017. NMR quantification of carbohydrates in complex mixtures. A challenge on honey. *Analytical Chemistry* **89**:13405–13414.

Sládková B. 2019. NMR profilování a analýza medů [Diplomová práce]. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.

Spiteri M, Jamin E, Thomas F, Rebours A, Lees M, Rogers KM, Rutledge DN. 2015. Fast and global authenticity screening of honey using <sup>1</sup>H-NMR profiling. *Food Chemistry* **189**:60–66.

Stará B. 2019. Fyzikálně chemické a senzorické hodnocení vybraných medů [Diplomová práce]. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín.

Sucupira NR, Alves Filho EG, Silva LMA, de Brito ES, Wurlitzer NJ, Sousa PHM. 2017. NMR spectroscopy and chemometrics to evaluate different processing of coconut water. *Food Chemistry* **216**:217–224.

Suková I. 2002. Vliv teploty na jakost medu. *Potravinářské aktuality* **11**:7.

Šarić G, Marković K, Vukičević D, Lež E, Hruškar M, Vahčić N. 2013. Changes of antioxidant activity in honey after heat. *Czech Journal of Food Sciences* **31**: 601–606.

Tamanna N, Mahmood N. 2015. Food processing and maillard reaction products: Effect on human health and nutrition. *International Journal of Food Science* (526762) DOI:

10.1155/2015/526762.

Troise A. D. 2019. Maillard Reaction and Food Safety. *Encyclopedia of Food Security and Sustainability* **2**:364–369.

Truzzi C, Annibaldi A, Illuminati S, Finale C, Scarponi G. 2014. Determination of proline in honey: comparison between official methods, optimization and validation of the analytical methodology. *Food Chemistry* **150**:477–481.

Valdés A, Cifuentes A, León C. 2017. Foodomics evaluation of bioactive compounds in foods. *Trends in Analytical Chemistry* **96**:2–13.

van Boekel M, Fogliano V, Pellegrini N, Stanton C, Scholz G, Lalljie S, Somoza V, Knorr D, Jasti PR, Eisenbrand G. 2010. A review on the beneficial aspects of food processing. *Molecular Nutrition & Food Research* **54**:1215–1247.

Vašíčková R. 2011. Vliv skladovacích podmínek na jakostní parametry medu [Diplomová práce]. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín.

Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. 2008. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of Food Science* **73**:117–124.

Wenzl T, Lachenmeier DW, Gökmen V. 2007. Analysis of heat-induced contaminants (acrylamide, chloropropanols and furan) in carbohydrate-rich food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **389**:119–37.

Zarei M, Fazlara A, Tulabifard N. 2019. Effect of thermal treatment on physicochemical and antioxidant properties of honey. *Heliyon* (e01894) DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e01894.

Zhao H, Cheng N, Zhang Y, Sun Z, Zhou W, Wang Y, Cao W. 2018. The effects of different thermal treatments on amino acid contents and chemometric-based identification of overheated honey. *LWT-Food Science and Technology* **96**:133–139.

## 8. Seznam obrázků

Obrázek 1: Křivky ztekucení medů při vybraných teplotách 40, 50 a 60 °C .....	27
Obrázek 2: Ukázka NMR spektra medovicového medu .....	29
Obrázek 3: PCA analýza spekter květových a medovicových medů .....	31
Obrázek 4: a) PLS-DA analýza spekter medovicových a květových medů, b) VIP score významných diskriminačních binů .....	31
Obrázek 5: Ukázka posunu píku na 2,6 ppm a 6,63 ppm .....	32
Obrázek 6: Posun píku 6,63 .....	33
Obrázek 7: Posun píku 2,05 .....	33

## 9. Seznam tabulek

Tabulka 1: Smyslové požadavky na med dle vyhlášky 76/2003 Sb. ....	10
Tabulka 2: Systematická tabulka studií zaměřených na změny složení po ohřevu .....	24
Tabulka 3: Zjištěné hodnoty ztekucování .....	26
Tabulka 4: Heatmap píků, u kterých došlo k posunům ve spektru NMR .....	30