

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE

Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie

STUDIJNÍ MATERIÁLY PRO PŘEDMĚTY

**BIOCHEMIE POTRAVIN
A BIOCHEMICKÉ LABORATORNÍ METODY
(H3BLM)**

**BIOCHEMIE POTRAVIN
(H8BC, H1BP)**

Lucie Pešková

Martin Hostovský

Alena Pechová

Viola Zentrichová

BRNO 2020

Předmluva

Výuková opora pro předměty Biochemie potravin a biochemické laboratorní metody (H3BLM) a Biochemie potravin (H8BC, H1BP) jsou určeny pro studenty FVHE VFU Brno v bakalářském studijním programu Bezpečnost a kvalita potravin, Zdravotní nezávadnost a kvalita potravin v gastronomii a v magisterském Veterinární hygiena a ekologie. V tomto studijním materiálu jsou vypracovány a aktualizovány návody do praktických cvičení biochemie potravin s úvodní teoretickou částí, a dále je zpracována nová inovovaná úloha na stanovení antioxidační kapacity vybraných potravin. Studenti budou podle těchto výukových materiálů řešit zadané úkoly během praktických cvičení a dále se mohou lépe teoreticky připravovat na konkrétní úlohy a laboratorní metody v biochemii potravin. Vypracovaný text rovněž slouží k přípravě na zkoušku, a také pro další studium a návaznosti v problematice hygieny, bezpečnosti a kvality potravin. Studentům přejeme úspěšné využití výukové podpory a získání nových poznatků pro další studium znalostí a dovedností z biochemie potravin.

OBSAH

Předmluva.....	1
1 ÚVODNÍ CVIČENÍ.....	8
1.1 Práce s automatickými pipetami.....	8
1.2 Práce s centrifugou	12
1.3 Digitální váhy	13
1.4 Použití spektrofotometru WPA S800 Spectrawave.....	14
2 METABOLISMUS SACHARIDŮ	16
Úvod.....	16
2.1 Stanovení glykemie fotometricky a sestrojení glykemické křivky	19
2.1.1 Teoretická příprava	19
2.1.2 Úkol.....	19
2.1.3 Princip	19
2.1.4 Činidla	20
2.1.5 Pracovní postup	20
2.1.6 Výpočet	21
2.1.7 Vyhodnocení	21
2.2 Stanovení glykemie glukometrem	23
2.2.1 Úkol.....	23
2.2.2 Princip	23
2.2.3 Pracovní postup	23
2.2.4 Vyhodnocení	24
2.3 Opakování znalostí:	25
Protokol Cvičení č. 2: METABOLISMUS SACHARIDŮ	26
3 METABOLISMUS LIPIDŮ	30

3.1	Kvalitativní průkaz lipoperoxidace ve vzorcích lipidů.....	30
3.1.1	Úvod.....	30
3.1.2	Teoretická příprava	31
3.1.3	Úkol.....	31
3.1.4	Princip	31
3.1.5	Činidla	32
3.1.6	Pracovní postup	32
3.1.7	Vyhodnocení	32
3.2	Důkaz přítomnosti dvojných vazeb v mastných kyselinách.....	33
3.2.1	Úvod.....	33
3.2.2	Teoretická příprava	34
3.2.3	Úkol.....	36
3.2.4	Princip	36
3.2.5	Činidla	36
3.2.6	Pracovní postup	36
3.2.7	Vyhodnocení	36
3.3	Opakování znalostí:	37
	Protokol Cvičení č. 3: METABOLISMUS LIPIDŮ	38
4	METABOLISMUS AMONIAKU	40
	Úvod.....	40
4.1	Stanovení amoniaku mikrodifúzí (Conwayova metoda).....	42
4.1.1	Teoretická příprava	42
4.1.2	Úkol.....	42
4.1.3	Princip	42
4.1.4	Činidla	42
4.1.5	Pracovní postup	42
4.1.6	Výpočet	43

4.1.7	Vyhodnocení	43
4.2	Kvalitativní důkaz amoniaku Nesslerovou reakcí	44
4.2.1	Teoretická příprava	44
4.2.2	Úkol.....	44
4.2.3	Princip	44
4.2.4	Činidla	44
4.2.5	Pracovní postup	44
4.2.6	Vyhodnocení	44
4.3	Kvantitativní stanovení amoniaku pomocí přístroje PocketChem BA (PA – 4130). 45	
4.3.1	Úkol.....	45
4.3.2	Princip	45
4.3.3	Pracovní postup	45
4.3.4	Výpočet	46
4.3.5	Vyhodnocení	46
4.4	Opakování znalostí:	47
	Protokol Cvičení č. 4: METABOLISMUS AMONIAKU	48
5	IZOLACE PROTEINŮ MLÉKA A DŮKAZ JEDNOTLIVÝCH SLOŽEK MLÉKA ...	53
5.1.1	Úvod.....	53
5.1.2	Izolace proteinů mléka a důkaz jednotlivých složek mléka.....	60
5.1.3	Úkol.....	60
5.1.4	Princip	60
5.1.5	Činidla	60
5.1.6	Pracovní postup	61
5.2	Opakování znalostí:	63
	Protokol Cvičení č. 5: IZOLACE PROTEINŮ MLÉKA A DŮKAZ JEDNOTLIVÝCH SLOŽEK MLÉKA	64
6	VITAMÍN C A ANTIOXIDAČNÍ KAPACITA	65

Úvod.....	65
6.1 Kvantitativní stanovení vitamínu C v ovoci a nápojích	69
6.1.1 Úkol.....	69
6.1.1 Teoretická příprava	69
6.1.2 Princip	69
6.1.3 Činidla.....	69
6.1.4 Pracovní postup	70
6.1.5 Výpočet	70
6.1.6 Vyhodnocení	70
6.2 Stanovení antioxidační kapacity vybraných potravin.....	71
6.2.1 Úvod.....	71
6.2.2 Úkol.....	73
6.2.3 Princip	73
6.2.4 Činidla	73
6.2.5 Pracovní postup.....	73
6.2.6 Výpočet	74
6.3 Opakování znalostí:	75
Protokol Cvičení č. 6: VITAMIN C A ANTIOXIDAČNÍ KAPACITA	76
7 PODKLADY PRO ZÁPOČET	80
7.1 Okruhy pro zápočtový test z Biochemie potravin	80
7.2 Vybrané metabolické dráhy.....	81
8 Zdroje	84

Sylabus přednášek

Týden	Náplň	Počet hodin
1.	Úvod do studia Biochemie potravin. Metabolismus, enzymy, makroergní sloučeniny.	2
2.	Metabolismus sacharidů. Glykemický index. Vlákna.	2
3.	Glykémie. Regulace metabolismu sacharidů.	2
4.	Metabolismus lipidů. Mastné kyseliny, fosfolipidy, cholesterol v potravinách.	2
5.	Lipoproteiny. Polynenasycené mastné kyseliny a jejich význam.	2
6.	Lipidy v potravinách, peroxidace lipidů, žluknutí tuků.	2
7.	Metabolismus proteinů. Rostlinné a živočišné proteiny.	2
8.	Přeměny aminokyselin, biogenní aminy – hygienický význam.	2
9.	Změny proteinů v potravinách.	2
10.	Proteoglykany, glykosaminoglykany, kolagen, chrupavka. Enzymy v biochemii potravin.	2
11.	Vitaminy a minerální látky v potravinách.	2
12.	Antioxidanty v potravinách. Funkční potraviny a aditiva.	2
13.	Biochemie potravinových intolerancí, potravinové alergenů.	2

Sylabus praktických cvičení

Týden	Náplň	Počet hodin
1-2.	Úvodní cvičení – bezpečnost práce v biochemické laboratoři, organizace praktických cvičení, požadavky na udělení zápočtu. Zásady správné laboratorní praxe.	2
3-4.	Stanovení glykemie a sestrojení glykemické křivky Stanovení hladiny glykémie glukometrem	2
5-6.	Kvalitativní průkaz lipoperoxidace tuků Důkaz přítomnosti dvojných vazeb v mastných kyselinách	2
7-8.	Stanovení amoniaku v mase (Conwayova metoda a Nesslerova reakce)	2
9-10.	Izolace proteinů mléka a důkaz jednotlivých složek.	2
10-12.	Jodometrické stanovení vitamínu C ve vybraných vzorcích potravin a nápojů Stanovení antioxidační kapacity vybraných potravin.	2
13.	Závěrečná kontrola protokolů, zhodnocení průběžné kontroly znalostí studentů v průběhu zimního semestru -zápočtový test. Zápočet.	1

1 ÚVODNÍ CVIČENÍ

1.1 Práce s automatickými pipetami

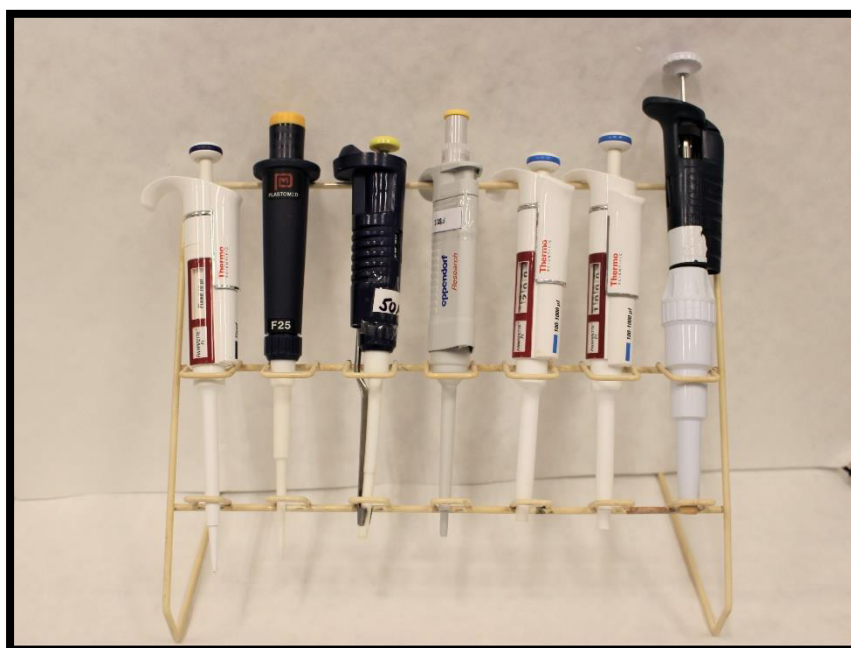
V laboratorním cvičení budete pracovat s pipetami s nastavitelným nebo fixním objemem.

Na pipety o objemu **2 μ l - 200 μ l** se používají **žluté špičky** - obvykle mají žlutý „klobouček“ na pipetě. Na pipety o objemu **200 μ l - 1 000 μ l** se používají **modré špičky** – obvykle mají modrý „klobouček“ na pipetě. Na pipety o objemu **1000 μ l - 5 000 μ l** se používají **bílé špičky**.

S dávkovací pipetou pipetujeme pomocí palce. **PIPETU DRŽTE VŽDY ŠPIČKOU DOLŮ!!!** Při pipetování stlačte píst k **první** záračce, ponořte pipetu do roztoku a **pomalým uvolňováním** stlačeného pístu nasajte kapalinu (pozor na vzduchové bubliny). **Pomalým stlačením** pístu k **druhé** záračce vypusťte obsah špičky (špička by neměla být ponořena do kapaliny).

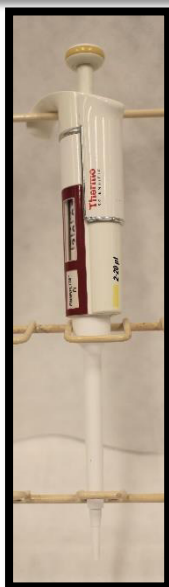
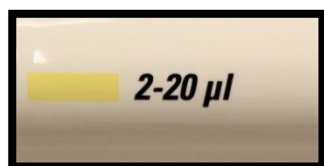
Po ukončení práce pipety odkládejte **svisle do stojánku**. Podle požadovaného objemu roztoku zvolte pipetu s vhodným rozsahem uvedeným na barevném „kloboučku“ pipety. Požadovaný objem nastavte na stupnici pipety **jemným** otáčením šroubu. **Nad deklarovaný horní objem pipetu nepřetácejte!**

Pipety používané pro cvičení Biochemie potravin:



PIPETY S NASTAVITELNÝM OBJEMEM

Rozsah objemů: 0,002 – 0,020 ml (2 – 20 μ l)



**0,002 ml
(2 μ l)**



**0,010 ml
(10 μ l)**



**0,020 ml
(20 μ l)**

Rozsah objemů: 0,020 – 0,200 ml (20 – 200 μ l)



**0,020 ml
(20 μ l)**

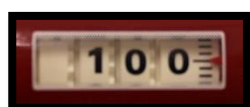
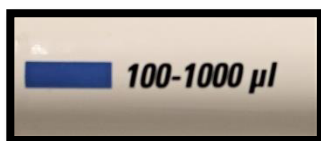


**0,100 ml
(100 μ l)**



**0,200 ml
(200 μ l)**

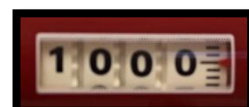
Rozsah objemů: 0,100 – 1ml (100 – 1000 µl)



**0,100 ml
(100 µl)**



**0,500 ml
(500 µl)**



**1,000 ml
(1000 µl)**

Rozsah objemů: 0,5 – 5ml (500 – 5000 µl)



**0,500 ml
(500 µl)**



**2,000 ml
(2000 µl)**



**5,000 ml
(5000 µl)**

PIPETY S FIXNÍM OBJEMEM

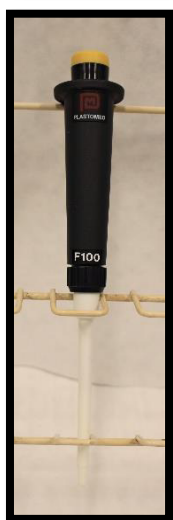
Objem: 0,010 ml (10 μ l)



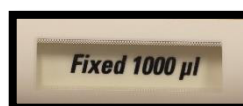
Objem: 0,025 ml (25 μ l)



Objem: 0,100 ml (100 μ l)



Objem: 1,000 ml (1000 μ l)



1.2 Práce s centrifugou

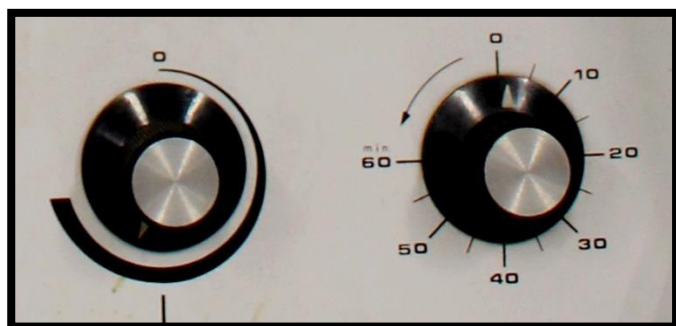
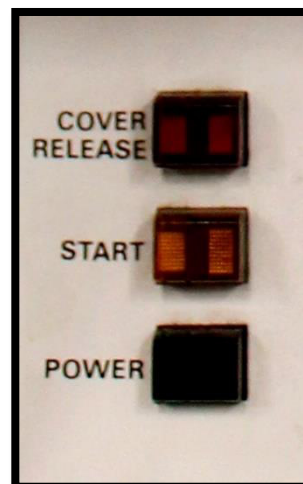
Při práci v laboratoři budete používat typ MPW-340. Před vložením vzorků do centrifugy je nutné je vyvážit v centrifugačních zkumavkách na digitálních vahách. Zkumavky umístíte do centrifugačních stojánků, přidejte do každého vždy jednu prázdnou zkumavku a postupujte dále dle návodu.

Po vyvážení vzorků na digitálních vahách je umístíte do centrifugy (obr. A) a to tak, že vzorky (respektive stojánky), které se proti sobě vyvažovaly, se umístí proti sobě do ramen rotoru centrifugy. Zmáčkněte tlačítko POWER (obr. B). Nastavte dle směru šipky (obr. C) čas na centrifugaci (nejčastěji 10 minut). Uzavřete kryt centrifugy a zmáčkněte tlačítko START (obr. B). Pomalu přidávejte otáčky až na požadovanou rychlost (nejčastěji 3000 otáček/min.). Rychlost otáčení můžete kontrolovat na displeji (obr. D). Po ukončení centrifugace **vraťte otáčky zpět** a zmáčkněte tlačítko COVER RELEASE.

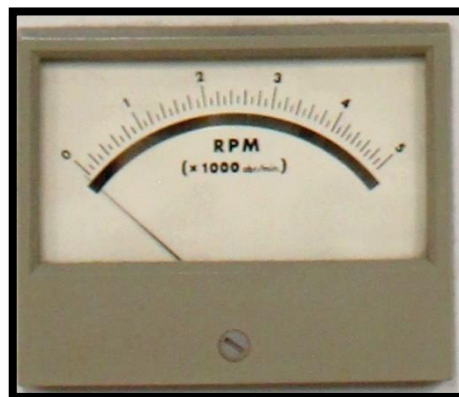
obr. A



obr. B



obr. C



obr. D



1.3 Digitální váhy

Zvažte nejprve jeden stojánek, váhu vynulujte a zvažte i druhý. Do prázdné zkumavky lehčího stojánku přidávejte deionizovanou vodu tak dlouho, dokud se hmotnost obou stojánků nebude shodovat.



1.4 Použití spektrofotometru WPA S800 Spectrawave

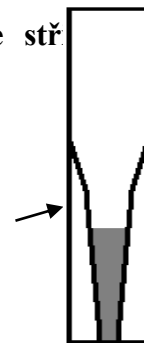
Měření absorbance:

- 1) Není-li přístroj zapnutý - **zapněte** přístroj tlačítkem 
- 2) **Nastavte vlnovou délku:** šipkami ◀ ▶ nastavte měření vlnové délky, symbol nm
šipkami ▲ ▼ nastavte vlnovou délku (rozsah 330-800 nm)
tlačítkem  potvrďte nastavení vlnové délky

- 3) **Nastavte měření absorbance:** šipkami ▲ ▼ nastavte symbol **Abs** (display: x.xxx^{Abs})

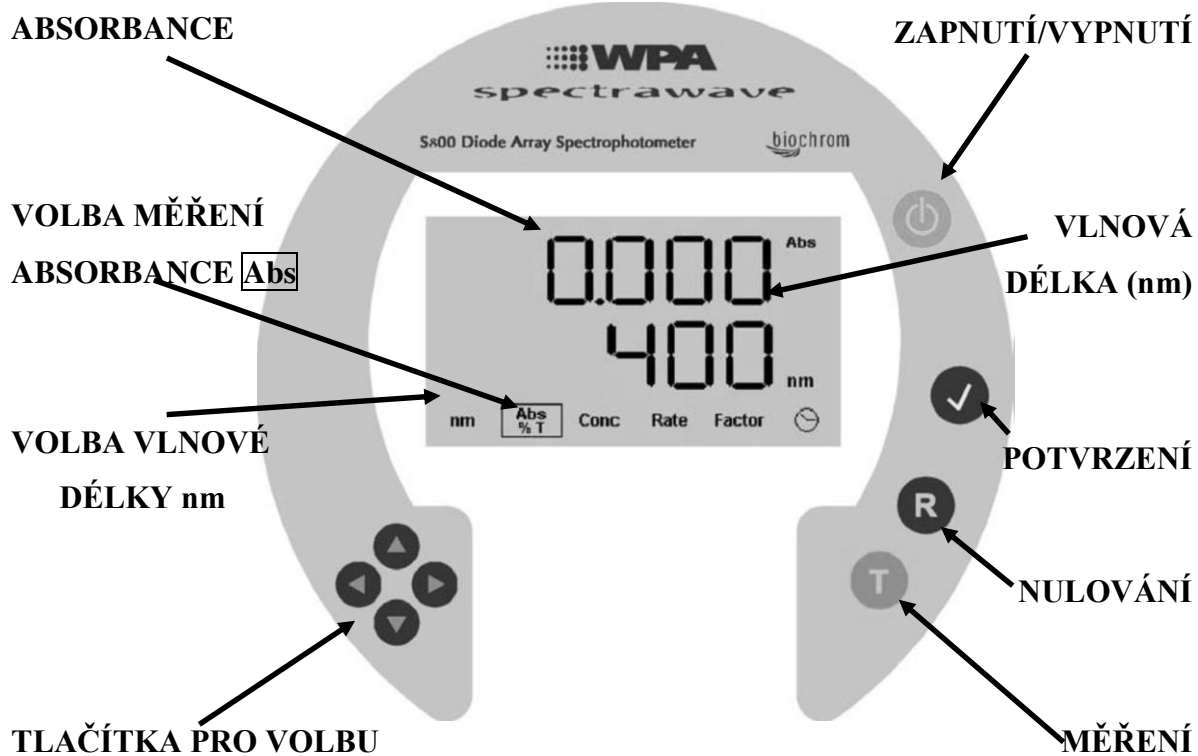
- 4) Uchopte příslušnou **semimikrokyvetu** (pro objem 500-1500µl) a nalijte **stř. destilovanou vodu**, buničitou vatou pečlivě očistěte kyvetu

semimikrokyveta
min. výška roztoku je 15 mm



- 5) kyvetu s destilovanou vodou jemným tlakem **umístěte do** kyvetového prostoru
- 6) **zmáčkněte tlačítko** R (display: bliká rrrr^{Abs} poté svítí 0.000^{Abs})
- 7) kyvetu s destilovanou vodou vyjměte, destilovanou vodu vylijte
- 8) kyvetu **řádně opláchněte** destilovanou vodou, osušte ji buničitou vatou
- 9) **do kyvety nalijte postupně: slepý vzorek, standard nebo analyzovaný vzorek** (min. výška roztoku je 15 mm) kyvetu buničitou vatou pečlivě očistěte
- 10) kyvetu přiměřeným tlakem **umístěte do** kyvetového prostoru
- 11) **zmáčkněte tlačítko** T pro **měření absorbance** (světelný paprsek svítí zepředu dozadu přes stěny kyvety)
- 12) změřená absorbance svítí na display, **absorbanci zaznamenejte**
- 13) kyvetu vyjměte, **analyzovaný slepý vzorek, standard nebo vzorek nalijte zpět do zkumavky**
- 14) kyvetu **řádně opláchněte** destilovanou vodou, osušte ji buničitou vatou,
- 15) opakujte kroky 9-14 pro měření dalších vzorků
- 16) přístroj nevypínejte

SPEKTROFOTOMETR WPA S800 SPECTRAWAVE



2 METABOLISMUS SACHARIDŮ

Úvod

Glukóza je jednoduchý sacharid představující hlavní zdroj energie pro buňky. Hladina glukózy v krvi se označuje jako glykemie. Za fyziologických podmínek je glykemie udržována v úzkém rozmezí hodnot 3,9–5,6 mmol/l (u člověka) nalačno a po jídle je glykemie nižší než 10 mmol/l. Glukóza v plazmě může pocházet z celé řady zdrojů, v závislosti na aktuálním stavu metabolismu sacharidů. V postabsorpční fázi je glukóza transportována z místa absorpce ve střevech na místa syntézy a ukládání glykogenu, hlavně v játrech a ve svalech. Nalačno je v plazmě koncentrace glukózy udržována pomocí mobilizace sacharidů z libovolného místa. Nejprve převládá glykogenolýza z jater, dále navazuje glukoneogeneze a lipolýza. Pokud hladovění pokračuje, prodlužuje se lipolýza a nakonec se aktivuje také proteolýza a glukoneogeneze ze získaných aminokyselin.

Velmi důležitá je komplexní a těsná zpětná vazba v hormonální kontrole, která zajišťuje dostatečně konstantní koncentraci glukózy v plazmě bez ohledu na to, jaký je současný stav organismu (postprandiálně či v době hladovění). Glykemii snižuje hormon insulin produkovaný slinivkou břišní. Jeho antagonistou je glukagon. Na zvyšování glykemie se také podílí růstový hormon, hormony štítné žlázy, glukokortikoidy a adrenalin.

Ke stanovení glukózy v séru, plasmě nebo plné krvi jsou používány různé enzymatické metody. Použít lze četné kvantitativní či polokvantitativní metody, nebo metody mokré a suché chemie. Lepší než stanovení glukózy z plné krve je její stanovení z plazmy či ze séra, které nejsou, na rozdíl od stanovení z plné krve, závislé na hematokritu. V případě metod suché chemie, kdy je většinou používána plná krev, jsou stanovované hodnoty nepřesné v důsledku stoupajícího hematokritu.

V krevní plazmě nebo séru je koncentrace glukózy vyšší ve srovnání s plnou krví, neboť v té je glukóza spotřebovávána krvinkami. Koncentrace glukózy se tak snižuje o cca 10 % každých 30-60 minut. Možností, jak zabránit utilizaci glukózy krevními elementy, je využití specifického činidla, např. fluoridu sodného (speciální zkumavky na stanovení glykemie). Použití fluoridu sodného však znemožňuje provedení některých dalších analýz. Druhou možností je získání krevní plazmy (odstředění krve) nejpozději do 30 minut po získání vzorku. Třetí možností je stanovení koncentrace glukózy pomocí glukometru ve vzorku plné krve bezprostředně po odběru.

Glykemický index (zkr. GI) vyjadřuje účinek požití potravin na hladinu glykemie v porovnání s účinkem standardní látky (glukosy), jejíž glykemický index je roven 100. Je ukazatelem hyperglykemizující síly určité potravin ve srovnání s potravinou standardní. Představuje tedy schopnost potravin, která obsahuje cukry, zvýšit hodnotu glukosy v krvi (glykemii). Glykemický index lze také definovat jako hodnotu, která udává do jaké míry je sacharidová potravin schopna zvýšit hladinu cukru v krvi. Glykemický index je bezrozměrné číslo, které má hodnoty od 0 do 100.

Podle hodnot glykemického indexu (GI) potravin následně dělíme na:

- potraviny s nízkým glykemickým indexem, tj. pod 60, resp. 55
- potraviny se středním glykemickým indexem, tj. 55, resp. 60 – 70
- potraviny s vysokým glykemickým indexem, tj. nad 70

Nevýhodou glykemického indexu je jeho často diskutovaná vysoká interindividuální a také intraindividuální variabilita způsobovaná řadou faktorů. Vedle glykemického indexu se hyperglykemizující síla potravin charakterizuje pomocí glykemické nálože, glykemických glukózových ekvivalentů a relativního glykemického účinku.

Faktory ovlivňující hodnotu glykemického indexu

Na hodnotu glykemického indexu mají vliv zejména následující faktory: složení potravin, její zpracování a skladování a metodika stanovení glykemického indexu.

- ✓ Obsah a typ jednoduchých sacharidů
- ✓ Obsah a typ komplexních sacharidů – škrob
- ✓ Obsah tuků
- ✓ Obsah bílkovin
- ✓ Přítomnost vlákniny
- ✓ Přítomnost organických kyselin
- ✓ Způsob zpracování potravin
- ✓ Skladování potravin

Faktory ovlivňující hodnotu glykemického indexu:

Faktor	Vliv na GI
Struktura matrix potraviny (např. mletím)	Čím menší částice, tím vyšší GI
Buněčná stěna a struktura škrobu	Čím zralejší plod, tím vyšší GI
Struktura škrobových granulů	Vyšší GI při želatinizaci škrobu (tepelné zpracování)
Obsah amylózy a amylopektinu	Čím vyšší je poměr amylózy k amylopektinu, tím nižší je GI
Viskózní vláknina	Nižší GI
Organické kyseliny	Nižší GI
Inhibitory amylázy	Nižší GI
Obsah monosacharidů - poměr fruktózy ke glukóze	Čím vyšší je poměr fruktózy ke glukóze, tím nižší je GI
Molekulární struktura sacharidů - typ glykosidické vazby	Čím více vazeb jiných než α -(1-4) a α -(1-6), např. β -(1-4)*, tím nižší GI
Obsah rezistentního škrobu	GI neovlivněn v případě zachování stejného množství stravitelných sacharidů
Obsah bílkovin	Přidání do potraviny = nižší GI
Obsah tuků	Přidání do potraviny = nižší GI

Glukometry jsou přístroje určené převážně pro orientační stanovení koncentrace glukózy v krvi. Tradičně se využívají u lidí s *diabetes mellitus* pro monitoring aktuální glykemie a následnou úpravu dávky insulínu. Také ve veterinární medicíně se glukometry používají pro sledování koncentrace glukózy u pacientů s *diabetes mellitus*. Jsou i vhodným pomocníkem pro rychlé zjišťování glykemie při akutních stavech, kdy není možné v rámci diagnostického a terapeutického postupu čekat na výsledek z laboratoře.

Výhodou glukometrů je rychlost stanovení koncentrace glukózy a potřeba malého množství vzorku. Nicméně snaha výrobců o co nejrychlejší stanovení a zmenšování objemu vzorku pro vyšetření může mít negativní dopad na přesnost vyšetření.

Glukometr:



2.1 Stanovení glykemie fotometricky a sestavení glykemické křivky

2.1.1 Teoretická příprava

- ✓ Hormony regulace glykemie (receptory, mechanismus působení). Glykolýza anaerobní, aerobní, v erythrocytech. Pentózový cyklus. Glykemický index.

2.1.2 Úkol

- Stanovte koncentraci glukózy v modelových vzorcích krevního séra

2.1.3 Princip

Stanovení glukózy je založeno na enzymové reakci. Enzym glukózooxidáza katalyzuje oxidaci glukózy kyslíkem za vzniku laktonu glukonové kyseliny a peroxidu vodíku. Vzniklý peroxid vodíku se ihned stává substrátem v navazující reakci katalyzované peroxidázou, v níž je substituovaný fenol a 4-aminoantipyrin oxidačně kopulován na červeně zbarvený produkt.

Koncentrace glukózy se stanoví fotometricky v modelových vzorcích séra, které imitují stanovení glykemie po jídle (= postprandiální glykemie). Odběr modelových vzorků séra byl proveden v čase 0, 30, 60, 90 a 120 minut po jídle obsahujícím sacharidy s různým glykemickým indexem.

2.1.4 Činidla

- standard: Solunorm GLUKÓZA (SONO) koncentrace je uvedena na ampulce
- činidlo 1: peroxidáza > 3,30 μ kat, glukózaoxidáza > 60,0 μ kat, 4-aminoantipyrin 0,245 mmol / lahvička
- činidlo 2: pufr chromogen (fosforečnanový pufr 0,14 mol/l ; 3-methyl-fenol 10 mmol/l)
- glukózové činidlo (již připraveno z činidla 1 a činidla 2)
- sady 1-4 modelových roztoků glukózy v deionizované vodě odpovídající glykemii v čase $t = 0, 15, 30, 45, 60$ a 120 min po požití potravin

2.1.5 Pracovní postup

1) Pipetujte z modelových vzorků do **krátkých zkumavek** dle tabulky:

Činidla, vzorky [ml]	Zkumavky:						
	Vzorek 1 (2x)	Vzorek 2 (2x)	Vzorek 3 (2x)	Vzorek 4 (2x)	Vzorek 5 (2x)	Standard (2x)	Slepý vzorek (2x)
Vzorek (0 min)	0,01	-	-	-	-	-	-
Vzorek (30 min)	-	0,01	-	-	-	-	-
Vzorek (60 min)	-	-	0,01	-	-	-	-
Vzorek (90 min)	-	-	-	0,01	-	-	-
Vzorek (120 min)	-	-	-	-	0,01	-	-
Standard (SONO)	-	-	-	-	-	0,01	-
Deionizovaná voda	-	-	-	-	-	-	0,01
Glukózové činidlo	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

- 2) Obsah každé zkumavky dobře promíchejte (nasycení kyslíkem). Vzniklou reakční směs je nutno chránit před světlem. Zkumavky dejte ihned po napipetování **inkubujte při 37 °C (vodní lázeň s termostatem) 15 minut.**
- 3) Po inkubaci nejpozději proveďte na spektrofotometru měření absorbance slepého vzorku (Asv), standardu (Ast) a vzorků (Avz 1-5) v kyvetě při **vlnové délce 492 nm.**

2.1.6 Výpočet

$$\text{Koncentrace glukózy (mmol.l}^{-1}\text{)} = \frac{(A_{VZ} - A_{SV})}{(A_{ST} - A_{SV})} \times c_{ST}$$

A_{VZ} = absorbance vzorku

A_{SV} = absorbance slepého vzorku

A_{ST} = absorbance standardu

c_{ST} = koncentrace standardu glukózy (uvedena na lahvičce roztoku standardu)

Sestrojení glykemické křivky:

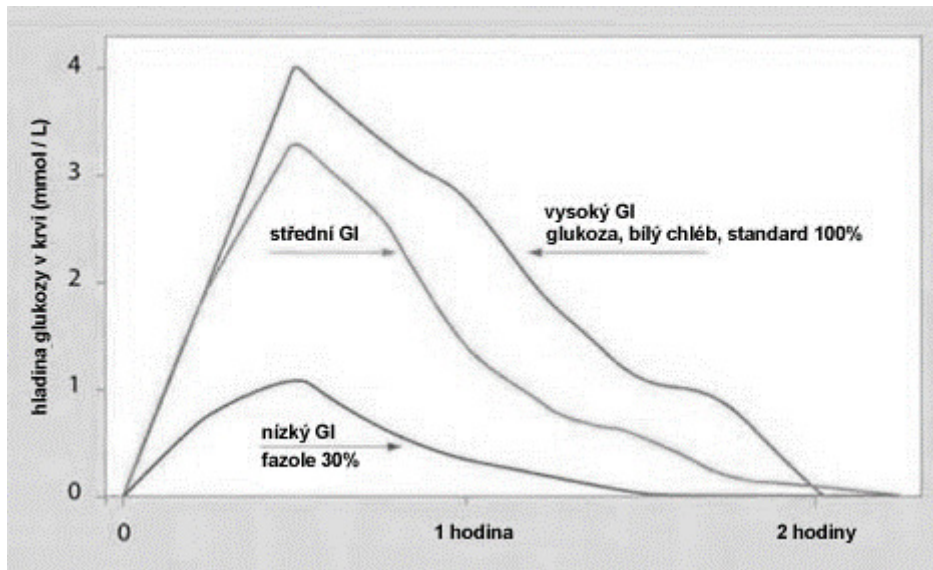
Po vypočtení koncentrace jednotlivých sad vzorků vytvořte graf glykemické křivky

U grafického sestrojení nanášejte na osu x časové intervaly v minutách dle modelových vzorků (0, 30, 60, 90 a 120 minut) a na osu y příslušné vypočtené koncentrace glukózy jednotlivých modelových vzorků (mmol.l^{-1}).

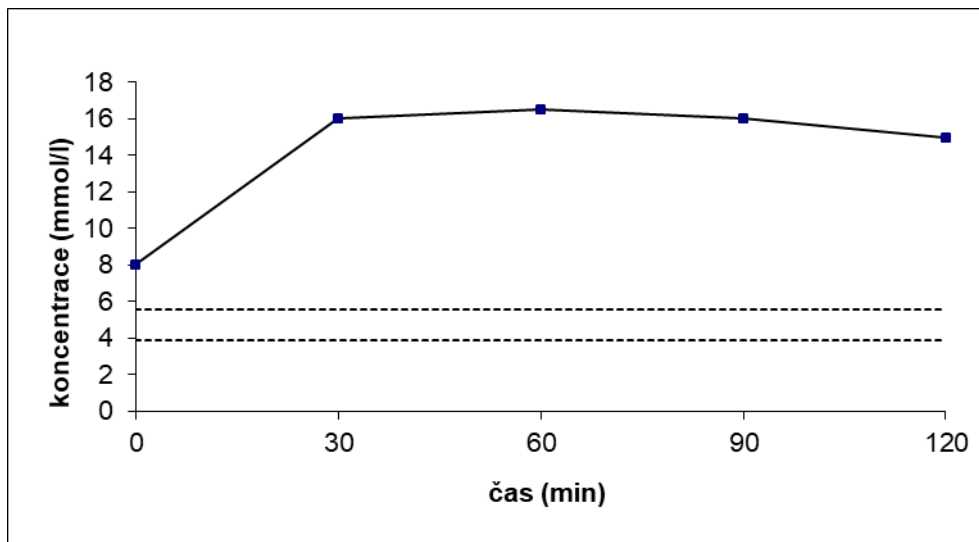
2.1.7 Vyhodnocení

Na základě průběhu křivky zjistěte, zda modelový vzorek odpovídá průběhu glykemie po požití potravin s nízkým, středním nebo vysokým glykemickým indexem nebo pacienta s *diabetes mellitus*.

Obr. 1: Glykemická křivka zvýšení glykemie po požití potravin s nízkým, středním a vysokým glykemickým indexem (GI)



Obr. 2: Glykemická křivka pacienta s *diabetes mellitus*



Glykemie je zvýšena, během prvním 30 minut ještě vzroste a zůstává zvýšena.

2.2 Stanovení glykemie glukometrem

2.2.1 Úkol

- ✓ Stanovte koncentraci glukózy pomocí glukometru v dodaných vzorcích a výsledky zapište do tabulky

2.2.2 Princip

V současnosti se nejčastěji používají elektrochemické glukometry (glukometry 2. generace). Využívá se enzymu glukózaoxidáza, který katalyzuje oxidaci glukózy kyslíkem za vzniku kyseliny glukonové a peroxidu vodíku. Peroxid vodíku je elektrochemicky redukován na vodu a vzniklý elektrický proud je úměrný koncentraci glukózy (amperometrické stanovení).

2.2.3 Pracovní postup

- 1) Na hodinové sklo přeneste pipetou kapku modelového vzorku séra
- 2) Vložte testovací proužek do glukometru. Zasuňte ho co nejdále a dávejte pozor, aby nedošlo k ohnutí.
- 3) Glukometr pozná kód testovacího proužku automaticky – na displeji se objeví číslo. Zkontrolujte, že se číslo na displeji shoduje s číslem uvedeným na tubě s testovacími proužky.
- 4) Přístroj je připravený k měření v okamžiku, kdy se na displeji objeví symbol kapky krve.
- 5) Dotkněte se okrajem testovacího proužku kapky séra na hodinovém skle. Po pípnutí začne glukometr vzorek testovat a po 5 vteřinách se ukáže na displeji výsledek.

2.2.4 Vyhodnocení

Hypoglykémie (není seřazeno dle důležitosti nebo výskytu):

- ✓ Addisonova choroba
- ✓ hyperinzulinismus, inzulinem nebo iatrogenní
- ✓ hypoglykemický syndrom u dětí
- ✓ hypothyreóza
- ✓ insuficience jater (cirhóza), bakteriální sepe
- ✓ insulinom (nádor β -buněk pankreatu)
- ✓ některé intoxikace
- ✓ protražované hladovění
- ✓ renální glykosurie
- ✓ těžké hepatopatie, jaterní cirhóza

Hyperglykémie (není seřazeno dle důležitosti nebo výskytu):

- ✓ akromegalie
- ✓ *diabetes mellitus*
- ✓ diestrus
- ✓ hypertyreóza
- ✓ iatrogenní (infuze glukózy, glukokortikoidy, ACTH, gestagen, morfin, adrenalín)
- ✓ insuficience ledvin
- ✓ křečové stavy
- ✓ onemocnění mozku
- ✓ postprandiálně (kašovitá potrava)
- ✓ postprandiální
- ✓ progestageny
- ✓ stresové situace
- ✓ terapie glukokortikoidy
- ✓ zánět pankreatu

2.3 Opakování znalostí:

1. Diabetes mellitus je onemocnění způsobené:

Vyberte jednu nebo více možností:

- a. nadprodukcí glukagonu
- b. sníženou citlivostí buněk na inzulin
- c. sníženou intenzitou glykolýzy v buňkách
- d. nedostatečnou sekrecí inzulinu

2. Potravina s vysokým glykemickým indexem je:

Vyberte jednu nebo více možností:

- a. jablko
- b. rýže
- c. med
- d. mrkev

3. Potraviny s nízkým glykemickým indexem:

Vyberte jednu nebo více možností:

- a. Glykémii zvyšují méně
- b. Uvolňují glukózu do krve pomaleji
- c. Uvolňují glukózu do krve rychleji
- d. Glykémii zvyšují výrazně

4. V případě metod stanovení glukózy v krvi pomocí suché chemie (např. glukometrem):

Vyberte jednu nebo více možností:

- a. mohou být stanovované hodnoty nepřesné v důsledku glykolýzy
- b. jsou stanovované hodnoty přesné a srovnatelné s fotometrickým stanovením
- c. mohou být stanovované hodnoty nepřesné v důsledku stoupajícího hematokritu
- d. mohou být stanovované hodnoty ovlivněné glykemickým indexem

Protokol Cvičení č. 2: METABOLISMUS SACHARIDŮ

Jméno studenta: Klikněte nebo klepněte sem a zadejte text.

Skupina: Klikněte nebo klepněte sem a zadejte text.

Datum: Klikněte nebo klepněte sem a zadejte text.

Název úlohy: 2.1 Stanovení glykemie fotometricky a sestrojení glykemické křivky

Princip: Zde popište vlastními slovy princip úlohy

Naměřené hodnoty:

Absorbance jednotlivých vzorků:

Slepý vzorek				Standard		
x	Sl ₁	Sl ₂	Průměr	St ₁	St ₂	Průměr
x						
Sada 1				Sada 2		
	Vz ₁	Vz ₂	Průměr	Vz ₁	Vz ₂	Průměr
0 min.						
30 min.						
60 min.						
90 min.						
120 min.						
Sada 3				Sada 4		
	Vz ₁	Vz ₂	Průměr	Vz ₁	Vz ₂	Průměr
0 min.						
30 min.						
60 min.						
90 min.						
120 min.						

Výpočet:

$$\text{Koncentrace glukózy (mmol/l)} = \frac{(A_{VZ} - A_{SV})}{(A_{ST} - A_{SV})} \times c_{ST}$$

A_{VZ} = absorbance vzorku

A_{SV} = absorbance slepého vzorku

A_{ST} = absorbance standardu

c_{ST} = koncentrace standardu glukózy (5 mmol/l)

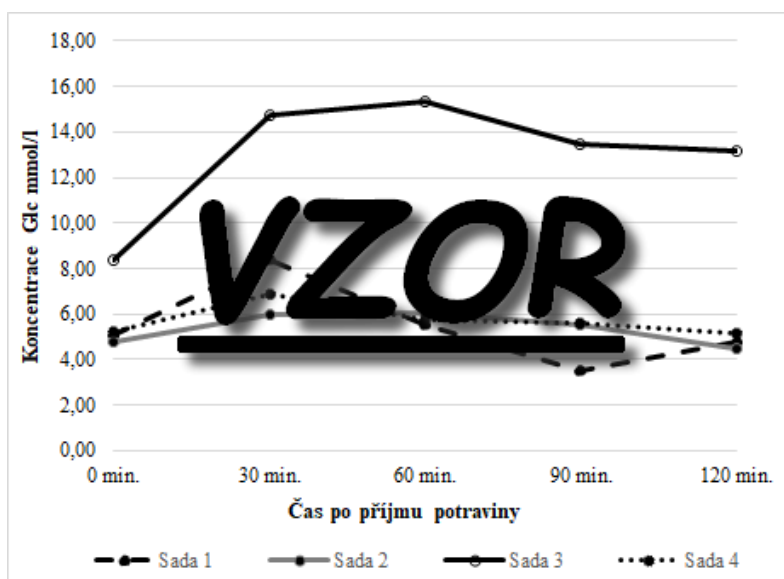
Výsledky:

Zde vypočítejte výsledky koncentrace glukózy jednotlivých vzorků:

Sada 1		Sada 2	
Označení vzorku:	Glc (mmol/l)	Označení vzorku:	Glc (mmol/l)
0 min.		0 min.	
30 min.		30 min.	
60 min.		60 min.	
90 min.		90 min.	
120 min.		120 min.	
Sada 3		Sada 4	
Označení vzorku:	Glc (mmol/l)	Označení vzorku:	Glc (mmol/l)
0 min.		0 min.	
30 min.		30 min.	
60 min.		60 min.	
90 min.		90 min.	
120 min.		120 min.	

Sestrojte glykemickou křivku:

V Programu Microsoft Excel dosaďte vypočtené hodnoty a sestrojte graf glykemické křivky jednotlivých sad (sada 1-4) modelových vzorků



Referenční hodnoty:

Za fyziologických podmínek je glykemie udržována v úzkém rozmezí hodnot 3,9–5,6 mmol/l (u člověka) nalačno a po jídle je glykemie nižší než 10 mmol/l. Po požití jídla se projeví nárůst glykemie – tzv. postprandiální hyperglykemie, která ovšem po vlivu insulinu klesá na normoglykemii.

Závěr:

Zde popište vlastními slovy výsledky úlohy. Určete, která sada vzorků odpovídá glykemii po příjmu potravin s nízkým, středním nebo vysokým glykemickým indexem nebo pacienta s diabetes mellitus.

Název úlohy: 2.2 Stanovení glykemie glukometrem

Princip: Zde popište vlastními slovy princip úlohy

Výsledky:

Zde uveďte hodnoty glykemie stanovené pomocí glukometru:

Sada 1		Sada 2	
Označení vzorku:	Glc (mmol/l)	Označení vzorku:	Glc (mmol/l)
0 min.		0 min.	
30 min.		30 min.	
60 min.		60 min.	
90 min.		90 min.	
120 min.		120 min.	
Sada 3		Sada 4	
Označení vzorku:	Glc (mmol/l)	Označení vzorku:	Glc (mmol/l)
0 min.		0 min.	
30 min.		30 min.	
60 min.		60 min.	
90 min.		90 min.	
120 min.		120 min.	

Závěr:

Zde popište vlastními slovy výsledky úlohy. Výsledky fotometrického stanovení modelových vzorků porovnejte se stanovenými hodnotami na glukometru.

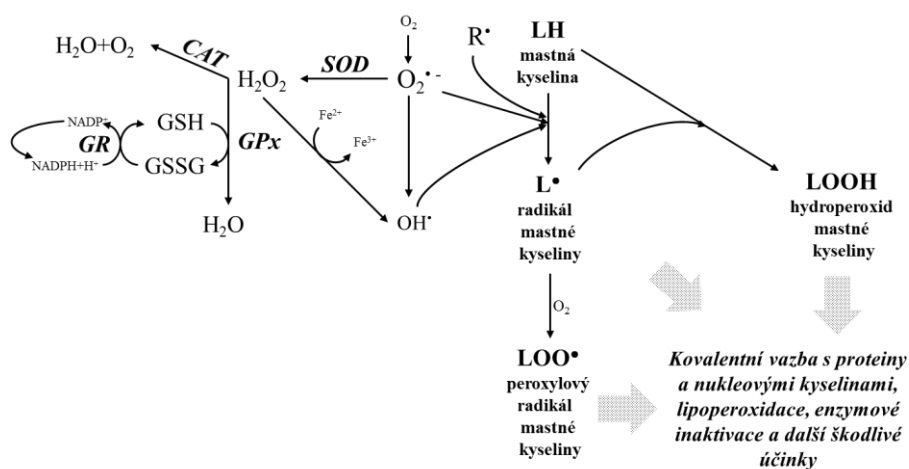
3 METABOLISMUS LIPIDŮ

3.1 Kvalitativní průkaz lipoperoxidace ve vzorcích lipidů

3.1.1 Úvod

Lipoperoxidace je destruktivní proces úzce spjatý s oxidativním stresem v biologických systémech, ale také v potravinách. Oxidativní stres je výsledkem nerovnováhy produkce a eliminace volných radikálů ve prospěch jejich produkce. Tvoří tak významnou oblast biochemie potravin, obecné a klinické biochemie. Jde o proces související s reaktivními formami kyslíku (ROS), které iniciují peroxidaci lipidů. Reaktivní formy kyslíku poškozují biomolekuly, jako jsou lipidy, proteiny, nukleové kyseliny a způsobují jejich oxidační poškození, narušují funkčnost buněčných mechanismů, poškozují buněčné membrány a mohou vyústit až v zánik buňky. Tento proces urychluje stárnutí a způsobuje poškození organismu, které může indukovat závažná onemocnění. Proces lipoperoxidace je radikálová řetězová reakce, která nejvíce zasahuje polynenasycené mastné kyseliny lipidů a sloučenin lipofilního charakteru. Z nich po útoku radikálů vznikají lipoperoxylové radikály. Primárními produkty lipoperoxidace jsou hydroperoxydy, jež podléhají dalším přeměnám za vzniku sekundárních produktů – hydroxyaldehydů (zejména malondialdehyd), které jsou velmi reaktivní a pro organismus toxické. Enzymové a neenzymové antioxidanty tvoří významné složky ochrany buněk a celého organismu proti volným radikálům a působení oxidativního stresu.

Schéma lipoperoxidace



3.1.2 Teoretická příprava

- ✓ Trávení lipidů. Směsná micela.

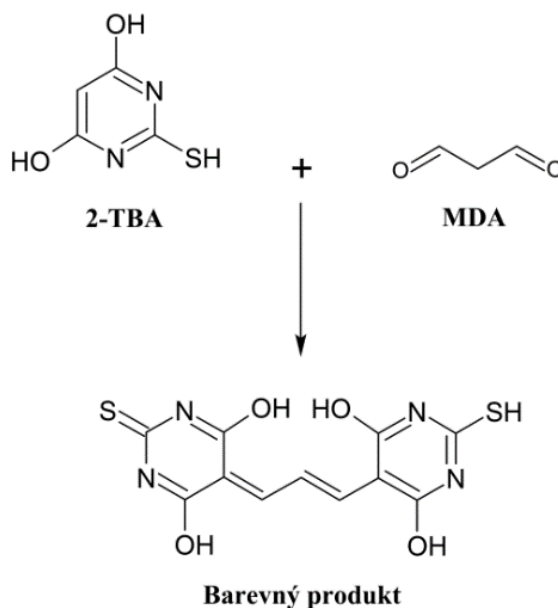
3.1.3 Úkol

- ✓ Proveďte kvalitativní průkaz lipoperoxidace ve vzorcích lipidů

3.1.4 Princip

Lipoperoxidace je stanovena pomocí TBARS testu (thiobarbituricacid reactive substances= látky reaktivní s kyselinou thiobarbiturovou). Produktem lipoperoxidace je malondialdehyd (MDA), který je sekundární oxidační produkt lipidů vznikající reakcí ROS s nenasycenými mastnými kyselinami. Metoda je založená na stanovení barevných adduktů, které vznikají reakcí produktů lipoperoxidace s kyselinou 2-thiobarbiturovou v kyselém prostředí. Pozitivním výsledkem důkazu je vznik růžového zbarvení barevného komplexu MDA s TBA.

Reakce tvorby barevného adduktu malondialdehydu s kyselinou 2-thiobarbiturovou:



3.1.5 Činidla

- činidlo TBA = kyselina 2-thiobarbiturová $c = 0,1 \text{ mol/l}$
- kyselina chlorovodíková HCl $0,6 \text{ mol/l}$
- modelové vzorky: rostlinné a živočišné tuky a oleje

3.1.6 Pracovní postup

- 1) Z každého vybraného vzorku oleje nebo tuku kapátkem nakapejte do 4 dlouhých zkumavek (A, B, C, D) cca 10 kapek.
- 2) Skupina A bude kontrolní, skupinu B vařte 10 minut, skupinu C vařte 20 minut a skupinu D vařte 30 minut ve vroucí vodní lázni.
- 3) Po zahřátí vzorků napipetujte do všech zkumavek 2 ml deionizované vody a protřepejte.
- 4) Poté do každé zkumavky napipetujte 0,2 ml kyseliny chlorovodíkové HCl a 0,8 ml činidla kyseliny 2-thiobarbiturové (TBA).
- 5) Zkumavky důkladně promíchejte a ve vroucí vodní lázni a zahřívejte zakryté alobalovou fólií po dobu 10 min.
- 6) Přibližně po 5 min se začne vyvíjet růžové zbarvení.

3.1.7 Vyhodnocení

Podle intenzity růžového zbarvení vyhodnotíme přítomnost malondialdehydu v jednotlivých vzorcích lipidů na +, ++, +++.

3.2 Důkaz přítomnosti dvojných vazeb v mastných kyselinách

3.2.1 Úvod

Mastné kyseliny jsou důležitými stavebními jednotkami lipidů. Jsou to karboxylové kyseliny s uhlovodíkovým řetězcem obsahujícím 3 až 24 atomů uhlíku. V organismu se vyskytují nejčastěji v esterifikované formě, navázané na glycerol, sfingozin nebo cholesterol. Pouze malé množství mastných kyselin je v organismu v neesterifikované formě. Vyskytují se např. v krvi, kde jsou označovány jako volné mastné kyseliny (VMK) nebo neesterifikované mastné kyseliny (NEMK).

Podle délky uhlíkového řetězce se rozlišují mastné kyseliny s krátkým řetězcem (3 - 6 C), středním řetězcem (8 – 10 C), dlouhým řetězcem (12 – 18 C) a velmi dlouhým řetězcem (20 – 24 C). Mastné kyseliny s krátkým řetězcem jsou významné především u přežvýkavců, kde vznikají v bachoru při mikrobiálním trávení. U vyšších rostlin a živočichů jsou v největší míře přítomny kys. palmitová (16 C) a kys. stearová (18 C). Přirozeně se vyskytující mastné kyseliny mívají sudý počet uhlíkových atomů, protože jsou syntetizovány z dvouhlíkatých jednotek. Mastné kyseliny se dále rozlišují podle přítomnosti dvojných vazeb v uhlíkovém řetězci na nasycené a nenasycené. Nenasycené mastné kyseliny mají v řetězci dvojnou vazbu a podle jejich počtu se dále rozlišují monoenoové (jedna dvojná vazba) a polyenoové mastné kyseliny (více dvojných vazeb). Nejčastěji se vyskytující nenasycené mastné kyseliny jsou kys. olejová (18 : 1) a kys. linolová (18 : 2). Struktura mastných kyselin ovlivňuje vlastnosti tuků (triacylglycerolů). Délka řetězce mastných kyselin a počet dvojných vazeb určují bod tání tuku. Ten je tím nižší, čím kratší jsou řetězce a čím více obsahují dvojných vazeb. Tuky, které jsou kapalné za pokojové teploty se označují jako oleje. Vyšší zastoupení nenasycených mastných kyselin zvyšuje riziko lipoperoxidace tuků.

Nenasycené mastné kyseliny vznikají desaturací. Živočichové mají ve srovnání s rostlinami omezené možnosti desaturace mastných kyselin. U většiny zvířat mohou být dvojnou vazbu zaváděny v polohách Δ^4 , Δ^5 , Δ^6 a Δ^9 (počítáno od karboxylového konce), dodatečné dvojnou vazbu pak mohou být zaváděny pouze mezi existující dvojnou vazbu (např. ω -9, ω -6, ω -3) a karboxylový uhlík. Vzhledem k tomu, že živočichové mají Δ^9 -desaturasu, jsou schopni úplné syntézy ω -9 nenasycených mastných kyselin (rodina kyseliny olejové), ale nejsou schopni syntetizovat ω -6 nenasycené mastné kyseliny a ω -3 nenasycené mastné kyseliny. Rostliny mají enzymatickou výbavu umožňující zavádění dvojnou vazbu do poloh Δ^6 , Δ^9 , Δ^{12} , Δ^{15} a mohou tak syntetizovat rovněž ω -6 a ω -3 polyenoové mastné kyseliny. Tyto mastné

kyseliny musí být proto získávány potravou primárně rostlinného původu a jsou z hlediska výživy esenciální. Z biomedicínského hlediska mají význam především nenasycené mastné kyseliny s dlouhým nebo velmi dlouhým řetězcem. Jedná se o polyenové mastné kyseliny dvou základních řad ω -6 a ω -3. První kyselinou z řady ω -6 je dienová **kyselina linolová** (18:2, all-*cis*-9, 12-oktadekadienová). První kyselinou řady ω -3 je trienová **kyselina α -linolenová** (18:3, all-*cis*-9, 12, 15-oktadekatrienová). Pro syntézu těchto dvou kyselin není u živočichů enzymatické vybavení a musí být proto dodávány potravou.

Zdroje Omega 3 a 6 mastných kyselin					
Optimální poměr Ω3: Ω6 ve stravě = <u>1:1 -1:4</u>					
Omega 3			Omega 6		
Ω3: Ω6		Ω3/100g	Ω3: Ω6		Ω6/100g
4:1	lněné semínka	23g Ω 3	0:1	slunečnicový olej	66g Ω 6
3:1	chia semínka	18g Ω 3	1:45	kukuřičný olej	54g Ω 6
1:3	konopné semínka	9g Ω 3	1:45	palmový olej	9g Ω 6
1:4	vlašské ořechy	9g Ω 3	1:12	olivový olej	10g Ω 6

3.2.2 Teoretická příprava

- ✓ Metabolismus tuků (chylomikrony, VLDL–IDL-LDL, HDL lipoproteiny)

**Obsah nasycených a nenasycených mastných kyselin v některých tucích a olejích
vyjádřených jako % veškerých mastných kyselin (Velíšek 2002):**

Druh tuku	Mastné kyseliny		
	nasycené	monoenové	polyenové
vepřové sádlo	25-70	37-68	4-18
hovězí lůj	47-86	40-60	1-5
kuřecí sádlo	27-30	42-47	20-24
máslo	53-72	26-42	2-6
tuk kapra	22-25	46-50	23-28
kokosový tuk	88-94	5-9	1-2
palmojádrový tuk	75-86	12-20	2-4
palmový tuk	44-56	36-42	9-13
kakaové máslo	58-65	33-36	2-4
olivový olej	8-26	54-87	4-22
sójový olej	14-20	18-26	55-68
margarín	23-25	27-29	43-47
ostropestřec - olej	12-14	23-25	63-65
dýňová semínka -	17-19	16-18	63-65
slunečnicový olej	9-17	13-41	42-74
řepkový olej	5-10	52-76	22-40
lněný olej	10-12	18-22	66-72

3.2.3 Úkol

- ✓ Proveďte orientační stanovení množství nenasycených mastných kyselin v různých typech tuků/olejů

3.2.4 Princip

Mastné kyseliny obsahující dvojně vazby se nazývají nenasycené mastné kyseliny. Tyto mastné kyseliny jsou velmi citlivé k oxidaci. Po přidání oxidačního činidla – manganistanu draselného v kyselém prostředí, dojde k hydroxylaci dvojně vazby a redukci manganistanu, což se projeví odbarvením roztoku.

3.2.5 Činidla

- manganistan draselný – roztok 0,001 mol/l
- koncentrovaná kyselina sírová - **POZOR ŽÍRAVINA!**

!!!VAROVÁNÍ!!!

Před začátkem práce použijte ochranné brýle a rukavice! Nebezpečí vystříknutí žíravín!

3.2.6 Pracovní postup

- 1) Připravte si podle počtu vzorků **vysoké zkumavky**, označte si je a pomocí kapátka odkapejte 0,5 ml příslušného oleje (olivový, slunečnicový, řepkový, kokosový, rybí), případně přidejte na špičku lžičky máslo a sádlo.
- 2) Do všech zkumavek přidejte 1 ml roztoku manganistanu draselného a pipetou přidejte 50 μ l koncentrované kyseliny sírové (nadbytek kyseliny způsobuje ztmavnutí organické sloučeniny, protože dochází k její mineralizaci).
- 3) Obsah zkumavek dobře, ale opatrně promíchejte. Pozorujte změnu zbarvení.
- 4) Stupeň nenasycenosti/změnu zbarvení zapište do tabulky pomocí znamének „–“ beze změny barvy, „+“ změna barvy (vznik růžového zbarvení). Intenzitu změny barvy odlište počtem znamének.

3.2.7 Vyhodnocení

Srovnajte výsledky s tabulkovými hodnotami. Sestavte pořadí vyšetřovaných olejů/tuků dle obsahu nenasycených mastných kyselin. Zhodnoťte jejich vhodnost z pohledu výživy.

3.3 Opakování znalostí:

1. Lipoperoxidace je proces:

Vyberte jednu nebo více možností:

- a. deaktivace lipoperoxidů
- b. destruktivní oxidace mastných kyselin
- c. β -oxidace mastných kyselin
- d. využívající energii mastných kyselin

2. Nejvyšší zastoupení nasycených mastných kyselin je:

Vyberte jednu nebo více možností:

- a. v řepkovém oleji
- b. v sojovém oleji
- c. ve vepřovém sádle
- d. v palmovém tuku

3. Jako pozitivní důkaz přítomnosti dvojných vazeb v mastných kyselinách:

Vyberte jednu nebo více možností:

- a. po přidání kyseliny sírové a manganistanu draselného dojde k odbarvení roztoku
- b. po přidání kyseliny 2-thiobarbiturové dojde k odbarvení roztoku
- c. po přidání kyseliny sírové a manganistanu draselného nedojde k odbarvení roztoku.
- d. po přidání kyseliny 2-thiobarbiturové stanovujeme spektrofotometricky

4. Co platí pro malondialdehyd:

Vyberte jednu nebo více možností:

- a. je antioxidantem
- b. je nebezpečným karcinogenem
- c. vzniká jako produkt lipoperoxidace
- d. vzniká jako produkt β -oxidace

Protokol Cvičení č. 3: METABOLISMUS LIPIDŮ

Jméno studenta: Klikněte nebo klepněte sem a zadejte text.

Skupina: Klikněte nebo klepněte sem a zadejte text.

Datum: Klikněte nebo klepněte sem a zadejte text.

Název úlohy: 3.1 Kvalitativní průkaz lipoperoxidace ve vzorcích lipidů

Princip: Zde popište vlastními slovy princip úlohy

Výsledky:

Podle intenzity růžového zbarvení vyhodnoťte přítomnost malondialdehydu v jednotlivých vzorcích lipidů na +, ++, +++.

Vzorky	Máslo	Slunečnicový olej	Řepk. olej	Oliv. olej	Sádlo	Máslo bez laktózy	Kokos	Lososový olej	Ostropes třec. olej	Margarín	Dýňový olej
Kontrola A	+++ / ++ / +										
Vaření B											
Vaření C											
Vaření D											

Závěr:

Zde popište vlastními slovy výsledky úlohy. Určete, který olej/tuk obsahoval nejvíce lipoperoxidace a dále který podléhal nejvíce lipoperoxidaci během vaření.

Název úlohy: 3.2 Důkaz přítomnosti dvojných vazeb v mastných kyselinách

Princip: *Zde popište vlastními slovy princip úlohy*

Výsledky:

Sestavte pořadí vyšetřovaných olejů/tuků dle obsahu nenasycených mastných kyselin.

Vzorky	Máslo	Slunečnicový olej	Řepk. olej	Oliv. olej	Sádlo	Máslo bez laktózy	Kokos	Lososový olej	Ostropest řec. olej	Margarin	Dýňový olej
Pořadí											

Závěr:

Zde popište vlastními slovy výsledky úlohy. Srovnejte výsledky s tabulkovými hodnotami. Zhodnoťte jejich vhodnost z pohledu výživy.

4 METABOLISMUS AMONIAKU

Úvod

Amoniak jako hygienický parametr v biochemii potravin

Amoniak vzniká v potravinách zejména z volných nukleotidů, jako je například adenosinmonofosfát (AMP), který se deaminuje na inosinmonofosfát (IMP) a hydrolýzou asparaginu a glutaminu (tj. amidu kyseliny asparagové a glutamové). V kyselých potravinách je amoniak přítomen ve formě amonných solí.

K hydrolýze asparaginu a glutaminu dochází v potravinách při teplotě kolem 100 °C, kdy dochází kromě uvolnění amoniaku i k desulfuraci bílkovin. Vytváří se příčná kovalentní vazba mezi asparaginem a lysinem, dále mezi glutaminem a lysinem. Člověk svými proteasami tuto vazbu není schopen štěpit, proto u něj dochází ke snížení výživové hodnoty proteinu (významné zejména u potravin, kde je lysin limitující aminokyselina).

Monosodná sůl kyseliny L-glutamové spolu s purinovými nukleotidy IMP a GMP (guanosinmonofosfát) patří do skupiny intenzifikátorů aróma. Jedná se o látky, které mají za úkol zvýraznit nebo modifikovat původní aróma některých potravin, i když samy výrazné aroma nemají. Natriumhydroglutamát, aktivní forma monosodné soli kyseliny glutamové, vykazuje vlastní chuť, která se nazývá chuť umami. Synergistický účinek této chuti mají i disodné soli IMP a GMP nukleotidů. V masu a rybách převládá IMP, který vzniká deaminací AMP (respektive ATP-adenosintrifosfátu, který je post mortem štěpen na AMP). GMP je obsaženo ve větším množství v některých houbách a kvasničných extraktech, které se používají jako polévkové přípravky. Jejich součástí může být i IMP, jako složka masového extraktu.

Obsah amoniaku je indikátorem degradace proteinů masa a současně slouží jako kritérium pro posouzení čerstvosti masa. Autolytickými a mikrobiálními procesy se obsah amoniaku zvyšuje. Amoniak je tedy významným ukazatelem čerstvosti masa. Jeho zvyšující se obsah je nežádoucí z hlediska zdravotní nezávadnosti a jakosti potravin. Volný amoniak je obsažen v čerstvém masu v množství od 120 do 170 mg/kg. Nad uvedenou hranici stoupá obsah i v čerstvém masu jatečných zvířat unavených před porážkou. Při autolýze a hnilobných procesech se obsah zvyšuje. Amoniak spolu s aminy je základní chemickou sloučeninou, která alkalizuje kazící se maso. Stoupne-li hodnota pH nad 7, amoniak se z masa uvolňuje a podílí se na jeho zápachu.

Metody stanovení amoniaku v mase

Mezi metody pro stanovení amoniaku patří metoda dle Conwaye, metoda s využitím Nesslerova činidla a dále metody instrumentální - např. cestou suché chemie a metodou s využitím iontově selektivní elektrody (ISE). Jako nepřímý ukazatel nárůstu obsahu amoniaku ve vzorku masa je pak možné využít i stanovení pH vzorku masa pomocí vpichové elektrody, případně pH měřené ve výluhu masa (změna pH vyjadřuje nárůst koncentrace amoniaku ve vzorku). Metody pro stanovení obsahu amoniaku ve vzorku masa je možné využít pro jednorázové a aktuální stanovení v daném vzorku, ale větší význam má provádět toto stanovení v rámci dynamiky změn obsahu amoniaku za určité časové období.

Stanovení amoniaku podle Conwaye

Conwayova metoda se využívá nejčastěji pro stanovení amoniaku v mase (masovém výluhu). Amoniak je z masového výluhu vytěsněn pomocí nasyceného roztoku uhličitanu draselného a je jímán do kyseliny borité, kde je po uplynutí 2-3 hodin stanoven titračně roztokem kyseliny sírové. Přednosti této tradiční kvantitativní analytické metody je snadná preanalytická příprava vzorků ve formě masového výluhu, snadné provedení s využitím kvantitativní analýzy titrační metodou a snadný rychlý výpočet k získání výsledků obsahu amoniaku.

Stanovení amoniaku pomocí Nesslerova činidla

S využitím Nesslerova činidla je možné kvalitativně stanovit obsah amoniaku ve vzorku. Je – li v analyzovaném vzorku přítomen amoniak, Nesslerovo činidlo reaguje změnou barvy (hnědá – oranžově hnědá) a tvorbou sraženiny nebo zákalu. Výsledný barevný produkt je tetrajodortuřnatan amonný. Výsledky stanovení (dle množství použitého Nesslerova činidla a intenzity vzniku sraženiny) v mase je možné využít pro zařazení masa do kategorie dle čerstvosti (čerstvé, počínající rozklad a zkažené).

Stanovení amoniaku pomocí ISE

Princip stanovení amoniaku ISE elektrodou spočívá ve vytěsnění amoniaku silnou zásadou z výluhu vzorku. Ten difunduje skrz póry membrány do vnitřního prostoru naplněného roztokem, kde dojde v závislosti na koncentraci vytěsněného amoniaku ke změně potenciálu skleněné elektrody. Z hodnot potenciálů standardních roztoků se poté metodou kalibrační přímky vyhodnotí potenciály vzorků a vypočítá koncentrace amoniaku.

4.1 Stanovení amoniaku mikrodifúzí (Conwayova metoda)

4.1.1 Teoretická příprava

- ✓ Způsoby vzniku amoniaku: deaminace, transdeaminace, cyklus purinových nukleotidů, glutamátdehydrogenasa, glutaminasa.

4.1.2 Úkol

- ✓ Proved'te stanovení amoniaku v masě mikrodifúzí (Conwayovou metodou)

4.1.3 Princip

Z masového výluhu se vytěsňuje amoniak nasyceným roztokem uhličitanu draselného a absorbuje se do roztoku kyseliny borité. Zde se stanoví titračně roztokem kyseliny sírové.

4.1.4 Činidla

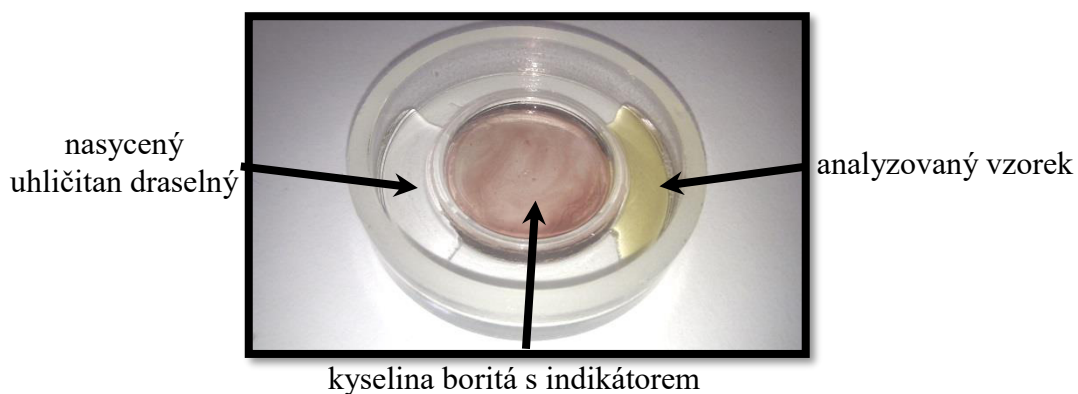
- kyselina boritá s indikátorem
- uhličitan draselný, nasycený roztok (52,8 g bezvodého uhličitanu draselného se rozpustí v 47,2 ml destilované vody)
- kyselina sírová, odměrný roztok $c = 0,05 \text{ mol/l}$

4.1.5 Pracovní postup

- 1) Zhomogenizujte 1,00 g vzorku masa s deionizovanou vodou v poměru 1 : 3.
- 2) Zhomogenizovaný vzorek odstřed'te na odstředivce 10 minut při 3000 otáčkách/min. Supernatant uchovejte jako masový výluh.
- 3) Do centrálního prostoru Conwayovy nádoby napipetujte 1 ml roztoku kyseliny borité s indikátorem.
- 4) Na jednu stranu vnějšího prostoru Conwayovy nádoby 1 ml nasyceného uhličitanu draselného.
- 5) Na protější stranu Conwayovy nádoby napipetujte 1 ml masového výluhu.
- 6) Přikryjte Conwayovu nádobku krycím sklem, natřeným na styčných plochách vazelínou, a promíchejte vzorek masového výluhu s roztokem uhličitanu draselného mírným krouživým pohybem.
- 7) Conwayovu nádobku ponechejte alespoň 1 h stát při laboratorní teplotě.

- 8) Po proběhnutí reakce Conwayovu nádobku odkryjte a titrujte centrální prostor kyselinou sírovou do **slabě růžového zbarvení**. Při titraci obsah centrálního prostoru dobře promíchejte (elektromagnetická míchačka, malé míchadélko).
- 9) Zaznamenejte spotřebu kyseliny sírové.

Schéma pipetování dle Conwaye:



4.1.6 Výpočet

$$A_{\text{amoniak}} \text{ (mg/kg)} = \frac{a \times 17,03 \times 10}{n}$$

kde:

a = spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové v ml

n = hmotnost podílu vzorku v gramech v 1 ml filtrátu

4.1.7 Vyhodnocení

Maso	Obsah amoniaku v mg/kg
• čerstvé	120 - 170
• dosud nezávadné	170 - 250
• podezřelé	260 - 300
• začínající rozklad	310 - 350
• zkažené	nad 360

4.2 Kvalitativní důkaz amoniaku Nesslerovou reakcí

4.2.1 Teoretická příprava

- ✓ Transportní formy amoniaku v organismu.

4.2.2 Úkol

- ✓ Proved'te kvalitativní důkaz amoniaku Nesslerovou reakcí v masovém výluhu.

4.2.3 Princip

Je-li v analyzovaném vzorku přítomen amoniak, Nesslerovo činidlo reaguje s amoniakem změnou barvy (hnědá až oranžově hnědá) a vzniká $[\text{Hg}(\text{NH}_2)\text{I}]$ – amido-jodortuťnatý komplex.

4.2.4 Činidla

- Nesslerovo činidlo (roztok $\text{K}_2[\text{HgI}_4]$ – tetrajodortuťnatanu draselného v KOH)

4.2.5 Pracovní postup

- 1) Do zkumavky s 1 ml výluhu z masa pomalu přikapávejte 10 kapek Nesslerova činidla
- 2) Po přidání každé kapky obsah zkumavky protřepejte a pozorujte změnu barvy a čírost výluhu. Jedná se o kvalitativní důkaz, kde v případě pozitivní reakce (přítomnosti amoniaku) vzniká hnědé zbarvení se zákalem nebo sraženinou.

4.2.6 Vyhodnocení

Maso	Nesslerova reakce:
• čerstvé	Ani po deseti kapkách Nesslerova činidla se nevytvoří zákal, barva výluhu se nezmění.
• počínající rozklad	Již po 6 kapkách se výluh zbarví žlutě a vytvoří se slabý zákal, po přidání 10 kapek se vytvoří na dně slabá žlutohnědá sraženina.
• zkažené	Výluh se zbarví žlutě již po prvních kapkách Nesslerova činidla, po přidání 10 kapkách je vzorek sytě žlutý až červenohnědý. Na dně se vytvoří sraženina.

4.3 Kvantitativní stanovení amoniaku pomocí přístroje PocketChem BA (PA – 4130)

4.3.1 Úkol

- ✓ Proveďte kvalitativní důkaz amoniaku v masovém výluhu pomocí přístroje PocketChem BA (PA – 4130).

4.3.2 Princip

Analyzátor PocketChem využívá ke stanovení amoniaku ve vzorku cestu suché chemie, jejímž principem je reakce reagentu na reakčním proužku, tzv. stripu (Ammonia Test Kit II), s biologickým materiálem, s následným měřením přístrojem PocketChem BA (PA – 4130).



4.3.3 Pracovní postup

- 1) Na reagenční proužek pomocí pipety napipetujte vzorek masového výluhu (z 1. části úlohy) o objemu 20 μ l (v případě potřeby i naředěný).

- 2) Vzorek se po dobu 180s absorbuje do stripu a reaguje s reagenčními v něm obsaženými. Tato reakce se projeví změnou barvy reakčního proužku na zelenou.
- 3) Takto připravený strip vložte (po zvukovém znamení) do přístroje, který automaticky změří hodnotu amoniaku v $\mu\text{mol/l}$. Výsledek je nutno vynásobit, v případě potřeby, ředěním vzorku.

4.3.4 Výpočet

$$\text{Amoniak (mg/kg)} = \frac{\text{hodnota amoniaku v } \mu\text{mol/l} \times 17,03}{n}$$

n = hmotnost podílu vzorku v gramech v 1 ml filtrátu

4.3.5 Vyhodnocení

Maso	Obsah amoniaku v mg/kg
• čerstvé	120 - 170
• dosud nezávadné	170 - 250
• podezřelé	260 - 300
• začínající rozklad	310 - 350
• zkažené	nad 360

4.4 Opakování znalostí:

1. Amoniak se z organismu savců vylučuje v podobě:

Vyberte jednu nebo více možností:

- a. glutaminu
- b. močoviny (urey)
- c. kyseliny močové
- d. toxického NH_3

2. Čerstvé maso se po přidání Nesslerova činidla:

Vyberte jednu nebo více možností:

- a. nezbarví žlutě ani po 10 kapkách
- b. zbarví růžově po prvních kapkách
- c. zbarví žlutě po přidání 6 kapek
- d. zbarví se ihned po prvních kapkách

3. Jaké množství amoniaku obsahuje ZKAŽENÉ maso:

Vyberte jednu nebo více možností:

- a. méně jak 360 mg.kg-1
- b. nad 200 mg.kg-1
- c. nad 360 mg.kg-1
- d. nad 500 mg.kg-1

4. Stanovit obsah amoniaku je možné:

Vyberte jednu nebo více možností:

- a. pomocí kys. chlorovodíkové
- b. pomocí TBARS testu
- c. pomocí Nesslerova činidla
- d. metodou dle Conwaye

Protokol Cvičení č. 4: METABOLISMUS AMONIAKU

Jméno studenta: Klikněte nebo klepněte sem a zadejte text.

Skupina: Klikněte nebo klepněte sem a zadejte text.

Datum: Klikněte nebo klepněte sem a zadejte text.

Název úlohy: 4.1 Stanovení amoniaku mikrodifúzí (Conwayova metoda)

Princip: Zde popište vlastními slovy princip úlohy

Naměřené hodnoty:

Vzorek masa	Spotřeba H ₂ SO ₄ (ml)
Vepřové 1	
Vepřové 2	
Kuřecí 1	
Kuřecí 2	
Hovězí 1	
Hovězí 2	

Výpočet:

$$Amoniak (mg/kg) = \frac{a \times 17,03 \times 10}{n}$$

a = spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové v ml

n = hmotnost podílu vzorku v gramech v 1 ml filtrátu

Výsledky:

Vzorek masa	Amoniak (mg/kg)	Stupeň čerstvosti/kažení:
Vepřové 1		
Vepřové 2		
Kuřecí 1		
Kuřecí 2		
Hovězí 1		
Hovězí 2		

Referenční hodnoty:

Maso	Obsah amoniaku v mg/kg
• čerstvé	120 - 170
• dosud nezávadné	170 - 250
• podezřelé	260 - 300
• začínající rozklad	310 - 350
• zkažené	nad 360

Závěr:

Zde popište vlastními slovy výsledky úlohy, určete, který vzorek masa obsahoval nejvíce amoniaku a dále který nejméně.

Název úlohy: 4.2 Kvalitativní důkaz amoniaku Nesslerovou reakcí

Princip: Zde popište vlastními slovy princip úlohy

Naměřené hodnoty:

Vzorek masa	Počet kapek Nesslerova činidla:
Vepřové 1	
Vepřové 2	
Kuřecí 1	
Kuřecí 2	
Hovězí 1	
Hovězí 2	

Výsledky:

Vzorek masa	Stupeň čerstvosti/kažení:
Vepřové 1	
Vepřové 2	
Kuřecí 1	
Kuřecí 2	
Hovězí 1	
Hovězí 2	

Referenční hodnoty:

Maso	Nesslerova reakce:
<ul style="list-style-type: none"> čerstvé 	Ani po deseti kapkách Nesslerova činidla se nevytvoří zákal, barva výluhu se nezmění.
<ul style="list-style-type: none"> počínající rozklad 	Již po 6 kapkách se výluh zbarví žlutě a vytvoří se slabý zákal, po přidání 10 kapek se vytvoří na dně slabá žlutohnědá sraženina.
<ul style="list-style-type: none"> zkažené 	Výluh se zbarví žlutě již po prvních kapkách Nesslerova činidla, po přidání 10 kapek je vzorek sytě žlutý až červenohnědý. Na dně se vytvoří sraženina.

Závěr:

Zde popište vlastními slovy výsledky úlohy, určete, který vzorek masa obsahoval nejvíce amoniaku a dále který nejméně.

Název úlohy: 4.3 Kvantitativní stanovení amoniaku pomocí přístroje PocketChem BA (PA – 4130)

Princip: Zde popište vlastními slovy princip úlohy

Naměřené hodnoty:

Vzorek masa	Amoniak ($\mu\text{mol/l}$)
Vepřové 1	
Vepřové 2	
Kuřecí 1	
Kuřecí 2	
Hovězí 1	
Hovězí 2	

Výpočet:

$$\text{Amoniak (mg/kg)} = \frac{\text{hodnota amoniaku v } \mu\text{mol/l} \times 17,03}{n}$$

n = hmotnost podílu vzorku v gramech v 1 ml filtrátu

Výsledky:

Vzorek masa	Amoniak (mg/kg):	Stupeň čerstvosti/kažení:
Vepřové 1		
Vepřové 2		
Kuřecí 1		
Kuřecí 2		
Hovězí 1		
Hovězí 2		

Referenční hodnoty:

Maso	Obsah amoniaku v mg/kg
• čerstvé	120 - 170
• dosud nezávadné	170 - 250
• podezřelé	260 - 300
• začínající rozklad	310 - 350
• zkažené	nad 360

Závěr:

Zde popište vlastními slovy výsledky úlohy. Určete, který vzorek masa obsahoval nejvíce amoniaku a dále který nejméně.

5 IZOLACE PROTEINŮ MLÉKA A DŮKAZ JEDNOTLIVÝCH SLOŽEK MLÉKA

5.1.1 Úvod

Mléko je sekret mléčné žlázy savců určené k výživě mláďat, které vzniká metabolickými přeměnami z krve a mízy a také jako potravina pro člověka. Mléko tvoří z 86-88 % voda, 12-14 % je sušina – bílkoviny, tuky, sacharidy, minerální látky, vitaminy, enzymy a hormony. Různé druhy mléka se liší především obsahem tuku a bílkovin. Podle druhů zvířat rozlišujeme různé druhy mlék s určitými specifiky: kravské mléko (hlavní zdroj našeho jídelníčku), kozí mléko (dobře stravitelné pro lidský organismus, podobné mateřskému), ovčí mléko (výživově hodnotnější než kravské a kozí), kobyčí mléko (výživově hodnotné, podobné mateřskému), oslí mléko (alternativa pro lidi alergické na kravské mléko), losí mléko (konzumuje se především ve Skandinávii, vysoký obsah tuku), sobí mléko (významná potravina pro Laponce), jačí mléko (konzumuje se v oblasti Himalájí), velbloudí mléko (bohaté na vitamín C, velice vhodné pro diabetiky), buvolí mléko (vyrábí se z něj originální mozzarella).

Složení mléka vybraných druhů zvířat:

% / druh	Kráva	Ovce	Koza	Klisna	Prasnice
Sušina	12,0-13,0	15,0-20,0	11,0-14,0	10,0-11,0	16,0-19,0
Tuk	3,5 -4,5	7,0 -8,0	3,0 -4,5	1,0 -2,0	7,0 -8,0
Bílkoviny	3,0 -3,6	5,0 -7,0	2,5 -3,5	1,5 -2,5	5,0-6,0
Laktóza	4,8 -5,0	4,6 -5,0	4,6 -5,0	6,0 -7,0	4,0-5,0
Popeloviny	±1,0	±0,9	±0,8	±0,5	±0,6

SACHARIDY V MLÉCE

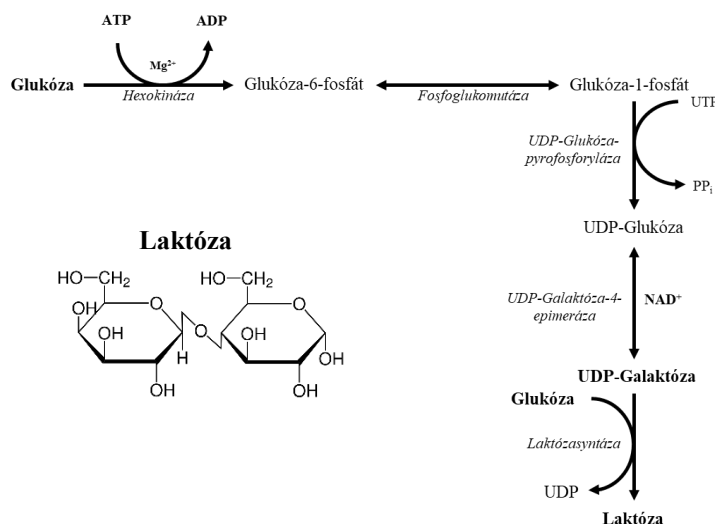
Laktóza je mléčný disacharid, který je složený z podjednotek galaktózy a glukózy (spojené β -1 \rightarrow 4 glykosidickou vazbou). Laktóza tvoří přibližně 2–8% mléka (podle druhu). Název pochází z *lac*- (latinského slova pro mléko) a přípony *-ose* (používáno k označení cukrů). Laktóza je bílá, ve vodě rozpustná, nehygroskopická pevná látka s mírně sladkou chutí. Používá se v potravinářském průmyslu.

Syntéza mléčného sacharidu - laktózy

Syntéza disacharidu laktózy probíhá v Golgiho aparátu epiteliálních buněk laktující mléčné žlázy. Samotná syntéza je jedinou chemickou reakcí volné glukózy a UDP-galaktózy za vzniku laktózy a UDP. Aby k této reakci mohlo dojít, musí být glukóza transportována z cytosolu do lumenu Golgiho aparátu interaguje s enzymem *laktózasyntázou* (dvě podjednotky *alfa-laktalbumin* a *beta-galactosyltransferáza*) za účelem modulace jeho substrátové specifity. Na 1 kg mléka je potřeba přibližně 72 g glukózy.

Laktóza je disacharid, který se skládá z glukózy a galaktózy. Vyskytuje se pouze v mléce savců. Je syntetizována v buňkách mléčné žlázy. Mléčná žláza však není schopna syntetizovat glukózu a musí ji získávat z krve. U přežvýkavců se vstřebá jen malá část glukózy přímo z potravy, jelikož většina sacharidů je v batoru fermentována na těkavé mastné kyseliny (TMK), které jsou vstřebávány do krve. 45 až 60 % glukózy je syntetizováno v játrech pomocí glukoneogeneze, a to zejména z kyseliny propionové a glukoplastických aminokyselin (alanin, serin atd.). Kyselina propionová je u přežvýkavců jediná z těkavých mastných kyselin, která může být využitelná pro glukoneogenezi.

Syntéza laktózy:



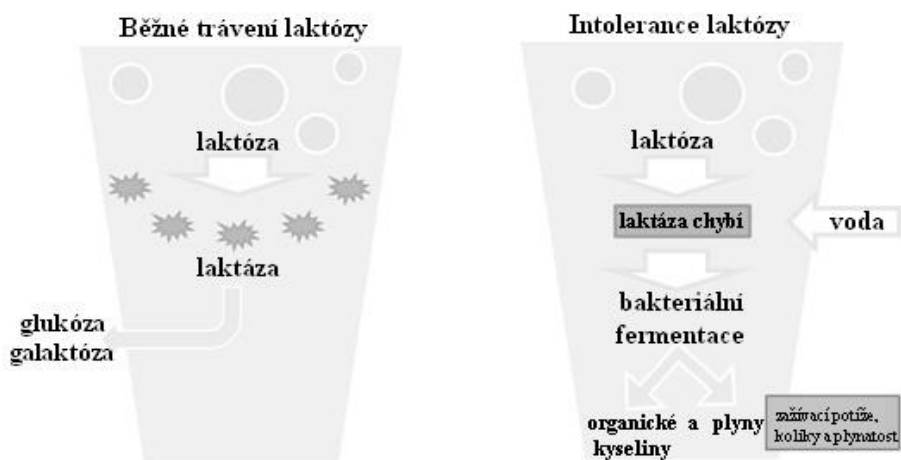
Laktózová intolerance

Nesnášenlivost mléčného cukru laktózy se označuje jako laktózová intolerance. Je způsobena deficiencí enzymu štěpící laktózu *laktázy* a vede k poruše vstřebávání laktózy (malabsorpci) a případně k dalším projevům laktózové intolerance. Laktózová intolerance je způsobena částečnou nebo úplnou neschopností organismu produkovat enzym laktáza, který laktózu (mléčný cukr) ve střevech rozkládá. Nejedná se tedy o alergii na mléčný protein.

Obecně jsou popsány tři typy laktózové tolerance: *vrozená laktózová intolerance* (alaktázie, vzácná vrozená genetická porucha), *primární typ laktózové intolerance* (nedostatečnost laktázy, souvisí s postupným a geneticky naprogramovaným úbytkem enzymu laktáza v tenkém střevě) a *sekundární typ laktózové intolerance* (vzniká v důsledku poškození sliznice tenkého střeva, nebo v důsledku zrychlení pasáže trávicím traktem u některých onemocnění zažívacího traktu).

Pro vznik zažívacích problémů spojených s konzumací laktózy je důležitá aktivita a katalytická koncentrace laktázy ve sliznici střeva a množství přijaté laktózy. Mezi projevy intolerance laktózy náleží řada gastrointestinálních příznaků po vypití určitého množství mléka nebo po požití různých mléčných produktů obsahující laktózu, jako je plynatost, kolika, zvracení a průjem. Poruchou vstřebávání laktózy trpí populace v různém procentu - méně například ve skandinávských zemích (Dánsko 4 %) více ve střední Evropě (Itálie až 56 %, Řecko až 80 %). V České republice se uvádí, že laktózovou intolerancí trpí cca 10 % obyvatel.

Mechanismus vzniku zažívacích problémů při laktózové intoleranci:



Alergie na mléčné bílkoviny (kasein)

Potravinová alergie je nepřiměřená reakce imunitního systému na specifickou složku určité potraviny. Imunitní odpověď organismu na potravinové antigeny probíhá humorální reakcí nebo buněčnou reakcí. Humorální odpověď organismu spočívá v produkci protilátek třídy IgE a nazývá se „časná přecitlivělost“. Druhý typ reakce je „pozdní přecitlivělost“, za kterou jsou zodpovědné non-IgE imunologické mechanismy. U některých jedinců dochází k výskytu smíšených typů alergické reakce IgE a non-IgE.

Kravné mléko – alergeny jsou obsaženy jak v syrovátce, tak i v mléčné sraženině, nejčastějšími alergeny jsou kasein, α -laktoalbumin a β -laktoglobulin. Při zpracování mléka na mléčné výrobky většinou nedochází k narušení hlavních alergenogenních epitopů, takže při alergiích na kravné mléko jsou často pacienti alergičtí rovněž na mléčné výrobky. Bílkoviny kravného, kozího a ovčího mléka vykazují poměrně vysokou homologii v sekvenci aminokyselin a vykazují zkřížené alergie. Z tohoto důvodu většinou nelze kravné mléko nahradit mlékem jiných živočišných druhů.

Alergie na bílkoviny kravného mléka je doprovázena imunologickou odpovědí, a to hlavně zánětům. Tato reakce je zprostředkována imunoglobulinem E – specifické protilátky a organismus začne produkovat histamin a jiné chemické látky, které se projevují alergických reakcemi.

Alergické reakce se projevují nejčastěji u dětí do věku 3 let. Byly zjištěny jak akutní alergické reakce včetně anafylaxe tak i chronické alergické reakce projevující se atopickým exémem a chronickými záněty střev.

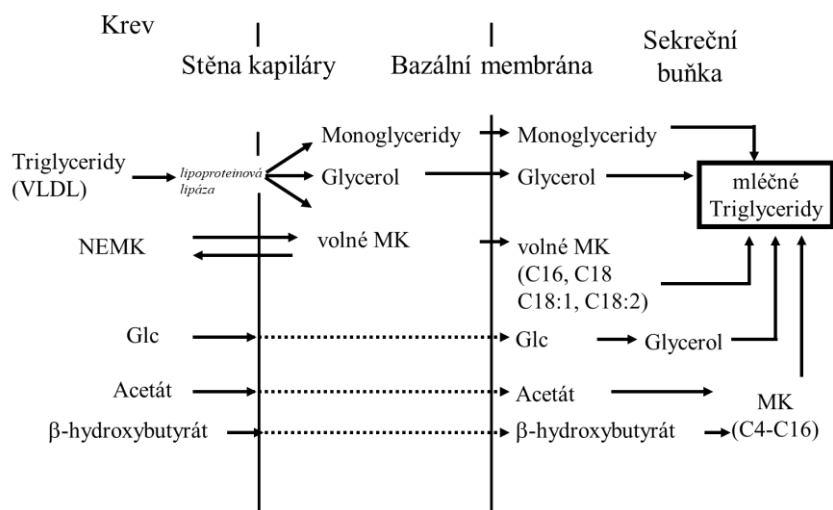
TUKY V MLÉČE

Většina lipidů v mléce (97–98%) jsou triacylglyceroly, přítomné je ale také menší množství di- a monoacylglycerolů, volného cholesterolu a esterů cholesterolu, volných mastných kyselin a fosfolipidů. Složení a zastoupení tuků v mléce se mezi různými druhy zvířat velmi liší (geneticky, fáze laktace a dietetické faktory). V kravském mléce jsou zastoupeny zejména nasycené mastné kyseliny (palmitová, stearová, kaprinová, laurová). Zastoupeny jsou také nenasycené mastné kyseliny (olejová, linolová). Obsah závisí na výživě dojnic a poměr nasycených a nenasycených mastných kyselin dává tuku konzistenci.

Syntéza lipidů v mléčné žláze

Triacylglyceroly (TAG) jsou syntetizovány v sekrečních buňkách mléčné žlázy z glycerolu a mastných kyselin. Zdrojem mastných kyselin jsou krevní lipidy (z plazmatických lipoproteinů VLDL) a de novo syntéza z malých molekul v sekrečních buňkách mléčné žlázy (MK s počtem uhlíků C4-C16). Pro de novo syntézu mastných kyselin přežvýkavci využívají kyselinu octovou a β -hydroxymáselnou. Oproti tomu monogastriční zvířata jako zdroj uhlíku využívají glukózu. Kyselina octová vzniká při bacherové fermentaci, stejně jako kyselina máselná, která se při absorpci mění na kyselinu β -hydroxymáselnou. Z těchto kyselin se vytvoří prekurzor pro syntézu mastných kyselin a několika biochemickými kroky dojde k vytvoření mastné kyseliny.

Syntéza mléčného tuku v mléčné žláze:



BÍLKOVINY V MLÉCE

Kravné mléko obecně obsahuje 30–35 g proteinu/l, který se běžně dělí do dvou tříd na základě rozpustnosti při pH 4,6. První frakcí jsou nerozpustné kaseiny, které představují asi 80% celkového mléčného proteinu, a rozpustná syrovátka (nebo sérum), která představuje asi 20% celkových mléčných bílkovin. Mléčné bílkoviny jsou předmětem studia téměř 200 let a jsou důležitou složkou extrémně široké škály potravinářských a nepotravinářských výrobků.

Zastoupení se liší podle druhů zvířat, a proto popisujeme:

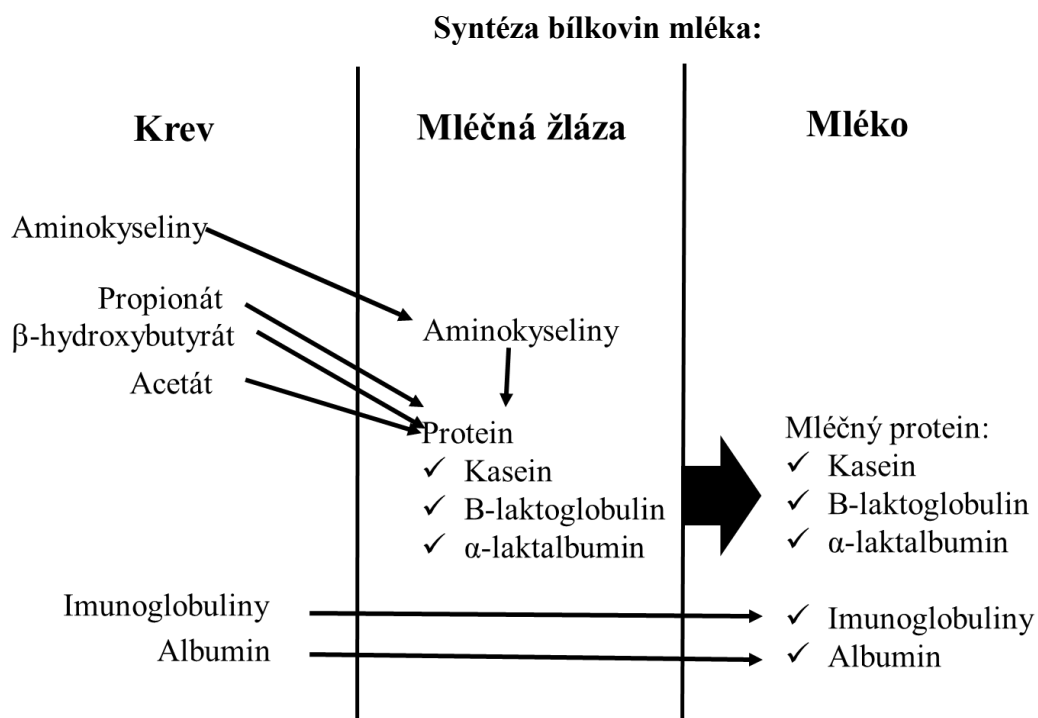
- kaseinová mléka- mléko kravné, ovčí a kozí - (nad 75 % kaseinu z bílkovin) u krávy je poměr: kasein : albumin (80 % : 20 %).
- albuminová mléka - mléko kobyli, oslí, prasnice a masožravci (norek, pes, kočka) (do 75 % kasein z bílkovin), mateřské mléko (20 30 % kaseinu z bílkovin).

Složení proteinů kravného mléka:

Proteiny	Podíl v %	Obsah v g/l
Kaseiny celkem	80	25,6
α_s -kasein	42	13,4
β -kasein	25	8,0
γ -kasein	4	1,3
κ -kasein	9	2,9
Proteiny syrovátky celkem	20	6,4
α -laktalbumin	4	1,3
sérový albumin	1	0,3
β -laktoglobulin	9	2,9
Imunoglobuliny	2	0,6
Polypeptidy (proteosy, peptony)	4	1,3

Biosyntéza bílkovin

Většina proteinů mléka je syntetizována v mléčné žláze z aminokyselin krevní plazmy, z krve však pochází ještě různé množství albuminu, globulinu, fibrinogenu a nebílkovinných dusíkatých látek. Zdrojem uhlíku pro tvorbu uhlíkaté strukturální složky bílkovin jsou u přežvýkavců těkavé mastné kyseliny, zejména propionát, β -hydroxybutyrát a acetát, ale také některé mastné kyseliny. Prekurzory pro tvorbu bílkovin se dostávají do hrubého endoplazmatického retikula buněk mléčné žlázy, kde jsou z nich syntetizovány mléčné bílkoviny, které jsou pak transportovány do Golgiho aparátu, dochází k fosforylaci kaseinu a tvorbě micel. Syntéza mléčných bílkovin je vysoce regulována inzulinem, aminokyselinami a transportéry aminokyselin transkripčními a posttranskripčními cestami.



5.1.2 Izolace proteinů mléka a důkaz jednotlivých složek mléka

5.1.3 Úkol

- ✓ Proveďte izolaci bílkovin mléka a důkaz jednotlivých složek - důkaz bílkovin, kyseliny fosforečné (vázaného fosforu), vápníku a laktózy

5.1.4 Princip

Kravske mléko obsahuje průměrně 2,9 % fosfoproteinu kaseinu. Izolace hlavního mléčného proteinu je založena na precipitaci kaseinu okyselením mléka na pH 4,7 při 20 °C. Srážení je spojeno s uvolněním části kaseinátového vápníku do vodné fáze. Mléčné albuminy a globuliny lze izolovat po odstranění kaseinu ze zbytku mléka (syrovátky) po přidavku NaCl zahřátím k teplotám varu. Vodná fáze mléka zbavená bílkovin je zdrojem látek rozpustných ve vodě, např. iontového vápníku, fosforečnanů a laktózy, jejichž přítomnost v tomto prostředí lze prokázat kvalitativními zkouškami.

5.1.5 Činidla

- kyselina octová (ledová)
- hydroxid sodný (1 mol/l, 2,5 mol/l)
- biuretové činidlo (NaOH, vinan sodno-draselný, CuSO_4)
- octan olovnatý (0,03 mol/l)
- kyselina dusičná (1,59 mol/l)
- molybdenová soulece (molybdenanu amonný, kyselina dusičná)
- chlorid sodný (pevný)
- šťavelan amonný (0,7 mol/l)
- Fehlingův roztok I ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- Fehlingův roztok II (vian sodno-draselný, NaOH)
- **Fehlingovo činidlo:** 1 díl Fehlingova roztoku I a 1 díl Fehlingova roztoku II (**roztok se připravuje těsně před použitím**, po přivedení k varu musí být stabilní bez sraženiny).

5.1.6 Pracovní postup

- 1) Do kádinky (100 ml) odměřte válcem 20 ml mléka a 20 ml deionizované vody.
- 2) **Izolace kaseinu:** Kasein ze zředěného mléka vysrážejte ledovou kyselinou octovou (až 10 kapek). Po promíchání zfiltrujte a získáte **filtrát č. 1**. Uchovejte. Sraženinu kaseinu na filtru převed'te do kádinky a rozpust'te v 2,5 mol/l NaOH (4 až 7 ml). Vzniklý roztok rozdělte do 3 zkumavek: Obsahy použijete k provedení důkazu bílkovin, fosforečnanů a organické síry, resp. výskytu aminokyselin obsahujících síru v kaseinu.
- 3) **Izolace mléčných albuminů a globulinů** se provádí ve **filtrátu č. 1**. K filtrátu přidejte NaCl (množství cca 1 až 2 malé laboratorní lžičky), promíchejte a dejte zahřívát do vroucí vodní lázně. Po vzniku zákalu kádinku z lázně vyjměte, nechte chvíli volně chladnout na stole. Připravte si filtrační aparaturu s hladkým filtrem (filtrační kruh, filtrační nálevka, kádinka). Po vychladnutí obsah kádinky převed'te tyčinkou na filtr. Vzniklý filtrát označte (filtrát č. 2) a uschovejte k důkazu přítomnosti laktózy, vápníku a anorganického fosforu ve vodné fázi mléka. Poté filtrační papír propláchněte vodou, vzniklý filtrát označte (filtrát č. 3) a použijte k důkazu bílkovin (albuminů a globulinů). Bílkoviny na filtru seškrábněte do kádinky, přidejte 1ml deionizované vody a po kapkách přikapávejte biuretové činidlo.
- 4) **Pracovní postup kvalitativních průkazů:**
 - **Průkaz bílkovin** (kaseinu, laktalbuminů a laktoglobulinů) : k 1 ml vzorku přidejte po kapkách biuretové činidlo. V přítomnosti proteinů vznikne **fialové zbarvení** (pozor ne modré ani růžové).
 - **Průkaz fosforečnanů** (fosforu anorganického): K 1 až 2 ml soluce molybdenové přidejte jen několik kapek vzorku okyseleného kyselinou dusičnou. Povařte na vodní lázni, poté ochlad'te. Po chvíli se utvoří **žlutá sraženina** fosfomolybdenanu amonného $(\text{NH}_4)_3 [\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4] \cdot x \text{H}_2\text{O}$.
 - **Průkaz vápníku:** k 1 ml vzorku přidejte asi 0,5 ml š'tavelanu amonného. V přítomnosti vápníku vzniká **bílá sraženina** š'tavelanu vápenatého $(\text{C}_00)_2\text{Ca}$.

- **Průkaz laktózy**: k 2 ml vzorku se přidá 2 ml Fehlingova činidla (1ml Feh. I a 1 ml Feh. II), povařte na vodní lázni. V přítomnosti redukujícího cukru laktózy vznikne na dně zkumavky **cihlově červená sraženina oxidu měďného (Cu₂O)**.
- ❖ **Průkaz síry** (v kaseinu – cystin a cystein): K 2-3 ml vzorku přidejte několik kapek octanu olovnatého a hydroxidu sodného (vznik olovnatanu sodného) vzniklou směs povařte. V pozitivním případě vzniká **černá** (v závislosti na množství a přítomnosti dalších látek) **také hnědošedá, hnědá nebo šedá sraženina** sulfidu olovnatého (PbS).

5.2 Opakování znalostí:

1. Hlavním cukrem obsaženým v mléce je

Vyberte jednu nebo více možností:

- a. Laktáza
- b. Glukóza
- c. Laktóza
- d. Fruktóza

2. Mezi významné minerální složky mléka patří

Vyberte jednu nebo více možností:

- a. Fosfor
- b. Zinek
- c. Vápník
- d. Selen

3. Mlezivo oproti zralému mléku:

Vyberte jednu nebo více možností:

- a. Je sladké a obsahuje méně minerálních látek
- b. Je slané a obsahuje více horčíku
- c. Má vyšší enzymatickou aktivitu
- d. Má menší enzymatickou aktivitu

4. Obsah mléčného tuku v kravském mléce je přibližně:

Vyberte jednu nebo více možností:

- a. 1,5 – 2,5%
- b. 0,5 - 3,0%
- c. 4,5 - 15,0%
- d. 2,5 – 6,0%

Protokol Cvičení č. 5: IZOLACE PROTEINŮ MLÉKA A DŮKAZ JEDNOTLIVÝCH SLOŽEK MLÉKA

Jméno studenta: Klikněte nebo klepněte sem a zadejte text.

Skupina: Klikněte nebo klepněte sem a zadejte text.

Datum: Klikněte nebo klepněte sem a zadejte text.

Název úlohy: 5.1 Izolace bílkovin mléka a důkaz jednotlivých složek

Princip: Zde popište vlastními slovy princip úlohy

Zjištěné výsledky:

	Sraženina kaseinu na filtru	Filtrát č. 2	Sraženina z filtrátu č 2 na filtru	Filtrát č. 3
Průkaz bílkovin:		X		
Průkaz fosforečnanů:			X	X
Průkaz vápníku:	X		X	X
Průkaz laktózy:	X		X	X
Průkaz síry:		X	X	X

Referenční hodnoty:

Složení kravského mléka:	%
Voda	87,0-88,0
Sušina	12,0-13,0
Tuk	3,5 -4,5
Bílkoviny	3,0 -3,6
Laktóza	4,8 -5,0
Popeloviny	±1
Vápník	0,118
Fosfor	0,093
Síra	0,032

Závěr:

Zde popište vlastními slovy výsledky úlohy.

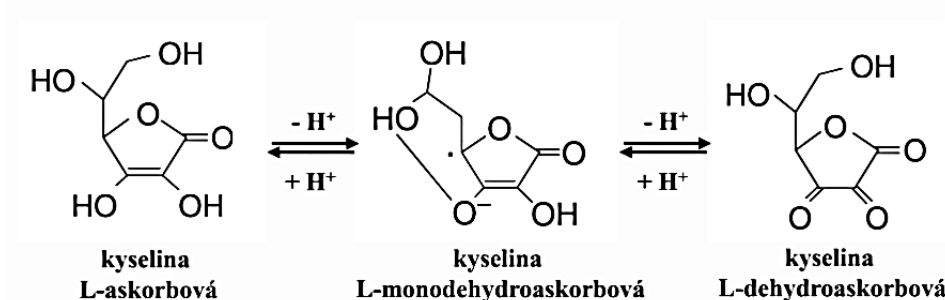
6 VITAMÍN C A ANTIOXIDAČNÍ KAPACITA

Úvod

VITAMIN C

Vitamín C (kyselina L-askorbová) je významnou biomolekulou se svými typickými účinky v biochemických dějích a ve vztahu ke zdraví organismu. Chemicky je derivátem glukózy a vykazuje redukující účinky, kdy redukuje např. molekulární kyslík, cytochrom a, cytochrom c, což jí rovněž umožňuje antioxidační účinky. Její dehydrogenací vzniká kyselina L-dehydroaskorbová. je vitamínem jen pro člověka, primáty a morče, kdežto v těle ostatních savců, jiných živočichů a pochopitelně ve všech rostlinách se syntetizuje z kyseliny D-glukuronové.

Formy kyseliny L-askorbové



Účast vitamínu C v biochemických dějích:

- 1) Účastní se syntézy kolagenu, kdy je nutná pro hydroxylaci aminokyseliny prolinu na hydroxyprolin. Při nedostatku kyseliny L-askorbové je syntetizovaný kolagen nedostatečně hydroxylován, což se projeví poruchou krevních cév, dochází ke vzniku krvácivých stavů (onemocnění skorbut)
- 2) Kyselina L- askorbová usnadňuje absorpci železa ze střeva, kdy železnaté ionty jsou lépe resorbovány ze střeva než železité.
- 3) Účastní se syntézy žlučových kyselin, steroidgeneze v kůře nadledvin, syntézy adrenalinu z tyrosinu, udržuje metalo-kofaktory v redukováném stavu, např. měďnatý iont v monooxygenázách, železnatý iont v dioxygenázách.
- 4) Antioxidační potenciál kyseliny askorbové - hraje spolu s tokoferolem a redukováným glutathionem důležitou roli v systému antioxidační ochrany organismu, hlavní ve vodě rozpustný antioxidant v plasmě a v tkáních savců

Doporučená denní dávka vitamínu C pro dospělé osoby je 80 - 100 mg. Člověk však vystačí i s nižší dávkou. Stupeň saturace obyvatelstva může být nízký zvláště v předjaří. Askorbát se nikde v těle (až na nadledviny) neukládá jako významnější zásoba. Potřeba askorbátu je relativně vyšší u dětí do jednoho roku, zvláště u nekojených. Vyšší dávka by měla být zajištěna v období růstu, těhotenství, laktace, ve stáří a při intenzivním sportovním tréninku.

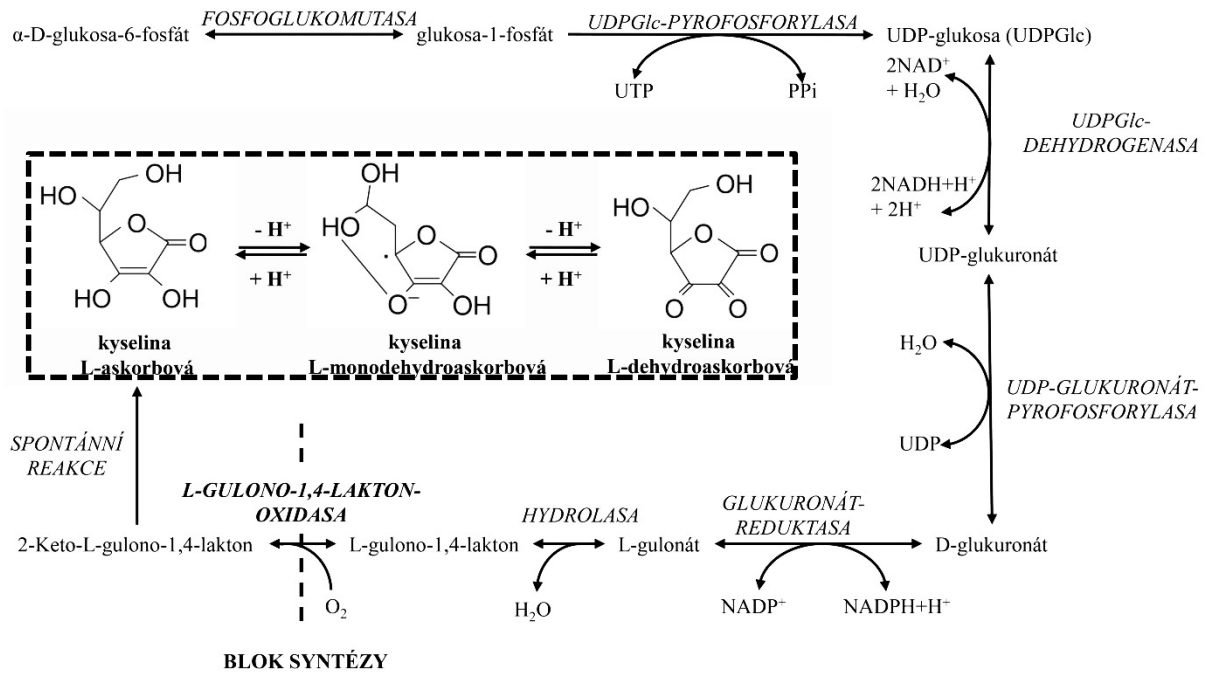
Nejlepším zdrojem kyseliny L-askorbové jsou ovoce a zelenina. Nejvyšší obsah mají například semena hlohu, černý rybíz, šípky, guava, jahody a citrusové plody. Ze zeleniny je to pak kapusta, paprika, brokolice, petržel a špenát. Z potravin živočišného původu jsou to orgány, jako játra a ledviny, naopak velmi malé množství je uváděno ve svalovině a minimální množství v mléce či vejcích.

Projevy nedostatku kyseliny L-askorbové se označují jako kurděje (*skorbut*) a primárně se projeví otokem sliznic, vypadáváním zubů, poškozením kapilár (podkožní hemoragie), které jsou důsledkem nedostatečné hydroxylace prolinu nutné pro syntézu kolagenu. Malnutrice spojená s deficiencí vitamínu C u dětí je popisována jako Möeller-Barlowova choroba se stejnými projevy, jako má skorbut u dospělých. Nespecifickými příznaky deficiencie vitamínu C jsou pak únava nebo snížená obrana proti infekčním onemocněním.

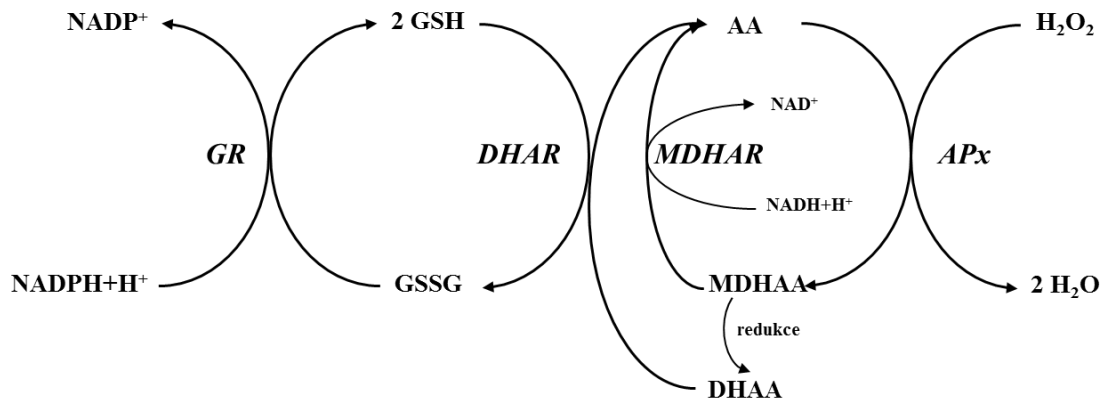
Biosyntéza kyseliny askorbové:

Enzymy pro syntézu kyseliny askorbové u studenokrevných obratlovců (ryby, obojživelníci a plazi) a některých starších řádů ptáků jsou lokalizovány v ledvinách. Pro ostatní řády ptáků a většinu savců platí, že enzymy pro syntézu jsou lokalizovány v játrech. Přesunutí lokalizace syntézy vitamínu C z ledvin do jater pravděpodobně souvisí s větší potřebou syntézy vitamínu C u teplokrevných živočichů. Některé skupiny zvířat ztratily během evolučního vývoje schopnost syntetizovat kyselinu askorbovou díky delecí některého z nukleotidů genu pro enzym L-gulonolaktonoxidáza. Druhy živočichů, které jsou schopné vlastní syntézy, absorbují kyselinu askorbovou pouze pasivně. Naopak živočichové, kteří vyžadují přísun kyseliny askorbové potravou, absorbují vitamín C jak pasivním tak aktivním způsobem. Transport plazmou je pak převážně v redukované formě.

Syntéza kyseliny L-askorbové

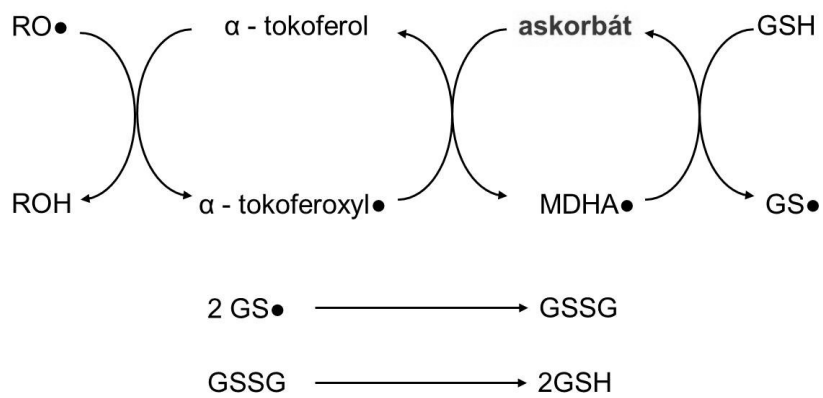


Antioxidační spolupráce kyseliny askorbové a glutathionu:



AA – kyselina askorbová; MDHAA – kyselina monodehydroaskorbová; DHAA – kyselina dehydroaskorbová; APx – askorbátperoxidáza, MDHAR – monodehydroaskorbátreduktáza, DHAR – dehydroaskorbátreduktáza, GR – glutathionreduktáza; GSH – redukovaný glutathion; GSSG – oxidovaný glutathion

Spolupráce vitamínu C s vitamínem E:



6.1 Kvantitativní stanovení vitamínu C v ovoci a nápojích

6.1.1 Úkol

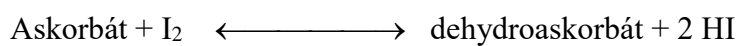
- Proveďte jodometrické stanovení koncentrace kyseliny askorbové ve vybraných potravinách

6.1.1 Teoretická příprava

- Biosyntéza kyseliny askorbové, funkce vitamínu C v organismu.

6.1.2 Princip

Kyselina L-askorbová (vitamín C, lakton 2-oxo-L-gulonové kyseliny, m.h. = 176,12) obsahuje endiolové seskupení (tj. dva hydroxyly na dvojně vazbě) a působí silně redukčně. Po oxidaci za odštěpení vodíků přechází askorbát na dehydroaskorbát. V kyselém prostředí lze stanovit koncentraci kyseliny askorbové titrací odměrným roztokem jodu dle následující rovnice.



Při indikaci bodu ekvivalence škrobovým indikátorem je výsledné zbarvení roztoku modré. Metoda stanovení je vhodná pro vodné roztoky kyseliny askorbové bez látek redukovatelných kyselinou askorbovou. U ostatních vzorků, pokud nejsou aplikovány postupy eliminující rušící látky, je stanovení pouze orientační. Mezi látky redukované kyselinou askorbovou patří například bílkoviny, redukující cukry, antibiotika a látky s disulfidickými skupinami.

6.1.3 Činidla

- roztok jodu 5 mmol/l
- 1% roztok škrobu (indikátor)
- 0,1 mol/l H₂SO₄
- standardní roztok kyseliny askorbové 50 mg/100 ml

6.1.4 Pracovní postup

- 1) Byretu doplňte odměrným roztokem jodu 5 mmol/l.
- 2) Napipetujte 5 ml vzorku do titrační baňky.
- 3) Těsně před titrací napipetujte do vzorku 0,5 ml 0,1 mol/l kyseliny sírové a 1 ml škrobového indikátoru.
- 4) Titrujte roztokem jodu za krouživého promíchávání. Titrační roztok musí neustále pomalu odkapávat, dokud se nadbytkem jodu nezbarví titrovaný roztok do stálého modrého zbarvení, které je stálé asi nejméně 30 sekund. Analýzu vzorků proveďte 3×. Další vzorek připravte těsně před titrací, jinak může dojít ke snížení spotřeby odměrného roztoku jodu vlivem vzdušné oxidace kyseliny askorbové.
- 5) Výsledky obou titrací zprůměrujte a použijte pro výpočet výsledné koncentrace kyseliny askorbové.
- 6) Obdobně zpracujte také standardní roztok kyseliny askorbové. K 5 ml standardního roztoku v titrační baňce napipetujte těsně před titrací 0,5 ml 0,1 mol/l kyseliny sírové a 1 ml škrobového indikátoru a titrujte odměrným roztokem jodu. Spotřeby odměrného roztoku jodu zapište a použijte k výpočtu. Analýzu standardu proveďte 3×.

6.1.5 Výpočet

K výpočtu koncentrace kyseliny askorbové ve vzorcích a standardu použijeme následující teoretický vztah: **1 ml roztoku jodu 5 mmol/l odpovídá 0,8807 mg kyseliny askorbové**

Výpočet pro vzorek/standard:

$$\text{Kyselina askorbová (mg/ml)} = 0,8807 \times a / 5$$

a – spotřeba odměrného roztoku jodu v ml

6.1.6 Vyhodnocení

- ✓ Výsledek koncentrace kyseliny askorbové ve vzorcích porovnejte s údajem o složení.
- ✓ Výsledek koncentrace kyseliny askorbové ve standardu porovnejte s uvedenou koncentrací roztoku kyseliny askorbové na lahvičce standardu (50 mg/100 ml). Pokud je naměřená hodnota vyšší či nižší, je možné, že jste špatně titrovali (přetitulovali, nedotitulovali).

6.2 Stanovení antioxidační kapacity vybraných potravin

6.2.1 Úvod

Problematice antioxidantů, antioxidační kapacity a metodickým přístupům k jejímu stanovení se věnuje řada studií. Celá problematika je komplexně analyzována především v jejím přímém vztahu k ochraně veřejného zdraví a prevenci celé řady civilizačních onemocnění. Vlastní antioxidanty se využívají jako podpůrné a doplňkové prostředky. Součástí řady moderních výzkumných projektů a studií je i vliv působení antioxidantů na imunostimulaci. Předmětem studia v těchto souvislostech je řada biomolekul s antioxidačním účinkem.

Vlastní antioxidanty, resp. látky s antioxidačním efektem mají značný význam z hlediska eliminace tzv. volných radikálů, zejména kyslíku a dusíku. Antioxidační působení se týká ochrany buněk a jejich struktur před nežádoucím působením těchto radikálů a podílejí se současně na eliminaci účinků tzv. oxidačního stresu v živočišných i rostlinných buňkách. Antioxidanty enzymové a neenzymové tvoří tzv. přirozený ochranný systém organismu.

Problematika látek s antioxidačním efektem má svůj význam v ochraně organismu proti negativním účinkům volných radikálů. Antioxidanty tak vytvářejí přirozený ochranný systém organismu před nežádoucími změnami, kterým nejčastěji jsou nenasycené mastné kyseliny, některé aminokyseliny, zejména esenciální aminokyseliny tryptofan a methionin, působení na integritu a následně permeabilitu membrán a řadu strukturálních dezintegračních změn s funkčními projevy.

Řada látek s antioxidačním působením je obsažena např. v různých druzích černého a zeleného čaje. Antioxidační aktivita látek je různá, např. zastoupení a podíl katechinů zeleného čaje vykazuje 3-4x větší antioxidační účinek než alfa-tokoferol.

Antioxidanty jsou definovány jako látky, jejichž molekuly omezují aktivitu kyslíkových radikálů, které převádějí do méně reaktivních nebo nereaktivních forem. Jiná definice je charakterizuje jako sloučeniny, které regulují oxidační pochody v organismu, zabraňují nežádoucím reakcím a poskytují ochranu buněčným strukturám proti volným radikálům.

Ve vztahu k problematice antioxidační kapacity se uvádí literárně výskyt antioxidantů v mase, vejcích, ovoci, zelenině, rýži, čaji, vínu a dalších komoditách. Antioxidační systémy zahrnují antioxidační enzymy, tj. superoxiddismutáza, kataláza, glutathionperoxidáza, glutathion-S-transferáza a neenzymatické substráty tripeptid glutathion, kyselinu močovou, kyselinu lipoovou, bilirubin, koenzym Q, vitamin C (kyselina L- askorbová), vitamin A, vitamin E,

flavonoidy a karotenoidy, např. astaxanthin, zeaxanthin, lykopen, fosvitin, resveratrol ze skupiny bioflavonoidů, teinové sloučeniny zeleného čaje Mezi antioxidanty se zařazují i některé biomolekuly, např. transferin, feritin, laktoferin, ceruloplazmin, hemopexin, haptoglobin, kyselina močová.

Svoji úlohu v antioxidačním působení sehrávají i přechodné prvky železo a měď. Prvky hrají svoji úlohu v donor-akceptorovém systému. Železo je vázáno na hemoglobin a jeho biochemické funkce v organismu při transportu kyslíku, uplatní se i v tzv. Fentonově reakci in vivo a plní celou řadu dalších fyziologických funkcí v organismu. Měď sehrává vedle železa svoji úlohu v řadě enzymů. Je součástí superoxiddismutázy, cytochromoxidázy a biomolekuly ceruloplazminu. V superoxiddismutáze je deponována měď jako součást Cu/ZnSOD, má strukturu dimeru s celkovou molekulovou hmotností 32 kDa. Vedle mědi, která působí jako redoxní centrum plní zinek svoji strukturní úlohu.

V komplexním pojetí se hovoří o antioxidační kapacitě, resp. celkové antioxidační kapacitě, která patří do systému biochemických stanovení, kdy je analyzována jako celková antioxidační kapacita plazmy. Jde o veličinu, která představuje souhrn všech látek s antioxidačním účinkem v této tekutině obsažených. Měření antioxidační kapacity lze i v tomto případě realizovat celou řadou metod. Výsledek se obvykle vyjadřuje ve vztahu k tzv. Troloxu nebo kyselině askorbové. Jde o poměr antioxidačního účinku vzorku k roztoku Troloxu nebo kyseliny askorbové (koncentrace 1 mmol/l).

Pro vzájemné porovnání antioxidačních účinků různých směsí byl v souvislosti s analýzou vzorků zaveden pojem antioxidační aktivita, která kvalifikuje kapacitu vzorku biologického materiálu eliminovat radikály Antioxidační aktivitu látek je možno kvantifikovat chemickými a fyzikálně-chemickými metodami. Jednou z metodických možností je stanovení pomocí tzv. chemiluminiscence, kterou využívá analytický systém Photochem.

Metodicky se při analýze kombinuje fotochemická excitace a generování radikálů s vysoce citlivou luminometrickou detekcí. Výsledky antioxidační kapacity jsou vyjádřeny jako ekvivalent Troloxu v mmol/ml. Antioxidační kapacita vzorků je kvantifikována porovnáním se standardem (tvorbou kalibrační křivky s Troloxem nebo kyselinou askorbovou) a je dána v ekvivalentních jednotkách standardu Troloxu.

6.2.2 Úkol

- ✓ Proveďte stanovení antioxidační kapacity ve vybraných vzorcích.

6.2.3 Princip

Principem ABTS testu je sledování zhášení radikálového kationu $ABTS^{+}$ vznikajícího oxidací ABTS. Míra zhášení radikálového kationu $ABTS^{+}$ je přímo úměrná antioxidační kapacitě vzorků, která je následně srovnávána s antiradikálovou aktivitou syntetické látky Troloxu (analog vitamínu E) při 734 nm.

6.2.4 Činidla

- roztok ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)],
- roztok $K_2S_2O_8$ [peroxodisíran draselný]
- standardní roztok Trolox ($c = 0,2$ mmol/l)
- vybrané nápoje a potraviny

6.2.5 Pracovní postup

- 1) Vzorky před použitím naředíte 10x.
- 2) Pipetujte do **krátkých zkumavek** podle následující tabulky:

Činidla, vzorek [ml]	Zkumavky				
	Vzorek A (3x)	Vzorek B (3x)	Vzorek C (3x)	Standard (3x)	Slepý vzorek (3x)
Citronová šťáva	0,05	-	-	-	-
Citronka	-	0,05	-	-	-
Vitaminový nápoj/ovocná šťáva	-	-	0,05	-	-
Standard Trolox	-	-	-	0,05	-
Deionizovaná voda	-	-	-	-	0,05
Pracovní roztok	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95

- 1) Obsah zkumavek **dobře promíchejte**. Zkumavky inkubujte v temnu při laboratorní teplotě **přesně 10 minut**.

- 2) Proveďte na spektrofotometru měření absorbance slepého vzorku (A_{SV}), standardu (A_{ST}) a vzorků (A_{VZA} , A_{VZB} , A_{VZC}) v kyvetě při **vlnové délce 734 nm**.

6.2.6 Výpočet

- 1) Pro vzorky:

$$AOC Trolox (mmol/l) = \frac{(A_{VZ} - A_{SV})}{(A_{ST} - A_{SV})} \times c_{ST}$$

A_{VZ} = absorbance vzorku

A_{SV} = absorbance slepého vzorku

A_{ST} = absorbance standardu

c_{ST} = koncentrace standardu (0,2 mmol/l)

Nezapomeňte zohlednit ředění vzorků!

- 2) Dosazením do rovnice kalibrace:

$$AOC Trolox (mmol.l) = \frac{A_{VZ} - 0,6777}{-1,0561}$$

A_{VZ} = absorbance vzorku

6.3 Opakování znalostí:

1. Projevem deficitu vitamínu C je:

Vyberte jednu nebo více možností:

- a. rachitis
- b. kurděje
- c. skrubot
- d. skorbut

2. Vyberte správné tvrzení:

Vyberte jednu nebo více možností:

- a. vitamin C je hlavní ve vodě rozpustné antidotum v plasmě a v tkáních savců.
- b. vitamin C je hlavní v tučných rozpustný antioxidant v plasmě a v tkáních savců.
- c. vitamin C je hlavní ve vodě rozpustný antioxidant v plasmě a v tkáních savců.
- d. vitamin C je hlavní ve vodě rozpustný antioxidant v moči savců.

3. Funkcí vitamínu C (kyseliny askorbové) v organismu NENÍ:

Vyberte jednu nebo více možností:

- a. antioxidační působení
- b. usnadnění absorpce vápníku ze střeva
- c. usnadnění absorpce železa ze střeva
- d. účast v syntéze adrenalinu

4. Nejúčinnější formou vitamínu C je:

Vyberte jednu nebo více možností:

- a. kyselina L-monodehydroaskorbová
- b. kyselina L-askorbová
- c. kyselina D-askorbová
- d. kyselina L-dehydroaskorbová

Protokol Cvičení č. 6: VITAMIN C A ANTIOXIDAČNÍ KAPACITA

Jméno studenta: Klikněte nebo klepněte sem a zadejte text.

Skupina: Klikněte nebo klepněte sem a zadejte text.

Datum: Klikněte nebo klepněte sem a zadejte text.

Název úlohy: 6.1 Kvantitativní stanovení vitamínu C v ovoci a nápojích

Princip: Zde popište vlastními slovy princip úlohy

Výsledky titrace:

	Spotřeba roztoku jodu 5 mmol/l v ml			
Vzorek	Titrace č. 1	Titrace č. 1	Titrace č. 1	Průměr
Citronka				
Džus				
Vitaminový nápoj				
Ovocná šťáva				
Standard				

Výpočet:

K výpočtu koncentrace kyseliny askorbové ve vzorcích a standardu použijeme následující teoretický vztah: 1 ml roztoku jodu 5 mmol/l odpovídá 0,8807 mg kyseliny askorbové

Výpočet pro vzorek/standard:

$$\text{Kyselina askorbová (mg.ml}^{-1}\text{)} = 0,8807 \times a / 5$$

a – spotřeba odměrného roztoku jodu v ml

Výsledky:

Obsah kyseliny askorbové = vitaminu C ve vzorcích (mg/ml):

Vzorek	(mg/ml)	Kolik je přepočet na DDD* ?
Citronka		
Džus		
Vitaminový nápoj		
Ovocná šťáva		
Standard		X

*DDD = Doporučená denní dávka vitaminu C pro dospělé osoby je 80 mg

Závěr:

Zde popište vlastními slovy výsledky úlohy, určete, který vzorek obsahoval vitaminu C dále který nejméně, kolik byste museli přijmout, abyste DDD.

Název úlohy: 6.2 Stanovení antioxidační kapacity vybraných potravin

Princip: Zde popište vlastními slovy princip úlohy

Naměřené hodnoty:

Vzorek	Abs 1:	Abs 1:	Abs 1:	Průměr
Vzorek A				
Vzorek B				
Vzorek C				
Standard				
Slepý vzorek				

Výpočet:

1) Pro vzorky:

$$AOC Trolox (mmol/l) = \frac{(A_{VZ} - A_{SV})}{(A_{ST} - A_{SV})} \times c_{ST}$$

A_{VZ} = absorbance vzorku

A_{SV} = absorbance slepého vzorku

A_{ST} = absorbance standardu

c_{ST} = koncentrace standardu (0,2 mmol/l)

Nezapomeňte zohlednit ředění vzorků!

2) Dosazením do rovnice kalibrace:

$$AOC Trolox (mmol.l) = \frac{A_{VZ} - 0,6777}{-1,0561}$$

A_{VZ} = absorbance vzorku

Výsledky:

Antioxidační kapacita jednotlivých vzorků:

Vzorek	AOC (mmol/l) přepočet standard	Trolox / přes	AOC (mmol/l) / přepočet kalibraci	Trolox přes
Citronka				
Džus				
Vitaminový nápoj				
Ovocná šťáva				
Standard				

Závěr:

Zde popište vlastními slovy výsledky úlohy, určete, který vzorek vykazoval nejvyšší antioxidační kapacitu a který nejméně, dále porovnejte s obsahem vitamínu C z předchozí úlohy.

7 PODKLADY PRO ZÁPOČET

7.1 Okruhy pro zápočtový test z Biochemie potravin

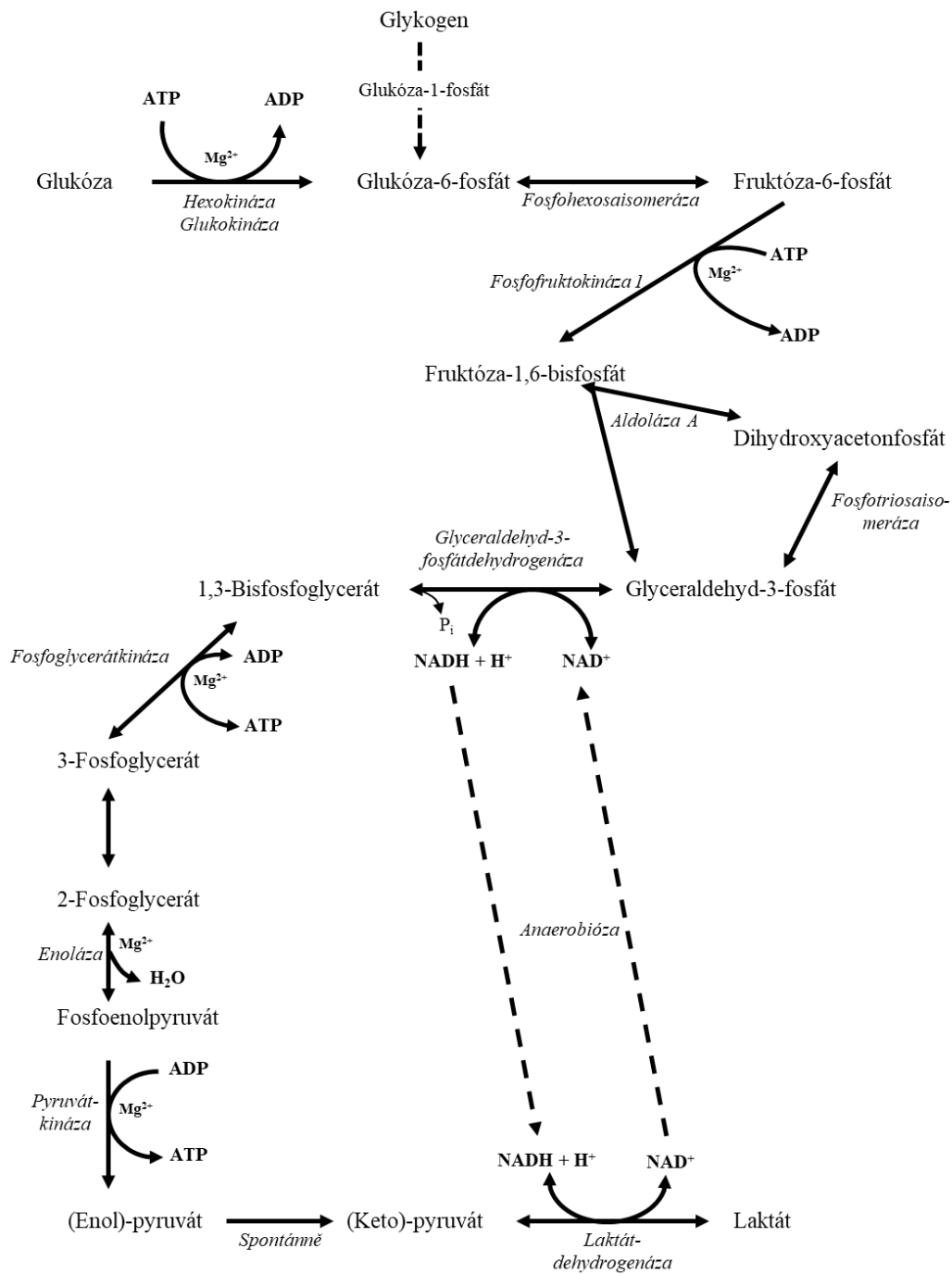
- 1) Anaerobní glykolýza včetně všech enzymů, koenzymů. Vyjádřete energetický zisk tohoto cyklu.
- 2) Cyklus kyseliny citronové včetně všech enzymů, koenzymů. Vyjádřete energetický zisk tohoto cyklu.
- 3) NADPH + H⁺ - význam, zdroje, použití.
- 4) Pentosový cyklus.
- 5) Glykémie, glykemický index, hormony regulující hladinu glukosy.
- 6) Glykogeneze, glykogenolýza včetně regulace.
- 7) Laktóza – složení, význam, laktózová intolerance.
- 8) Lipidy – význam, transport (lipoproteiny, směsná micela), oxidační změny lipidů.
- 9) Mastné kyseliny – biosyntéza, beta oxidace.
- 10) Kyselina askorbová - vznik, význam, antioxidační účinky.
- 11) Složení mléka a mleziva, rozdíly.

Principy:

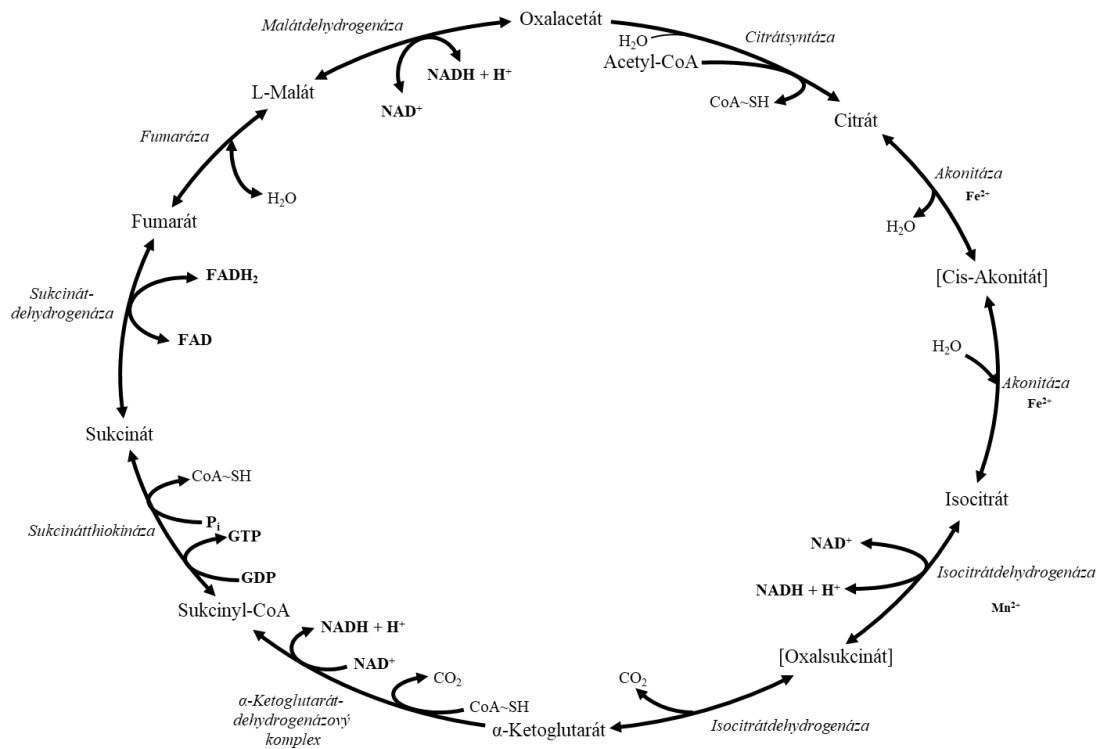
- 1) Stanovení glykémie a sestrojení glykemické křivky
- 2) Stanovení hladiny glykémie glukometrem
- 3) Kvalitativní průkaz lipoperoxidace tuků
- 4) Důkaz přítomnosti dvojných vazeb v mastných kyselinách
- 5) Stanovení amoniaku v mase (Conwayova metoda a Nesslerova reakce)
- 6) Izolace proteinů mléka a důkaz jednotlivých složek.
- 7) Jodometrické stanovení vitamínu C ve vybraných vzorcích potravin a nápojů
- 8) Stanovení antioxidační kapacity vybraných potravin.

7.2 Vybrané metabolické dráhy

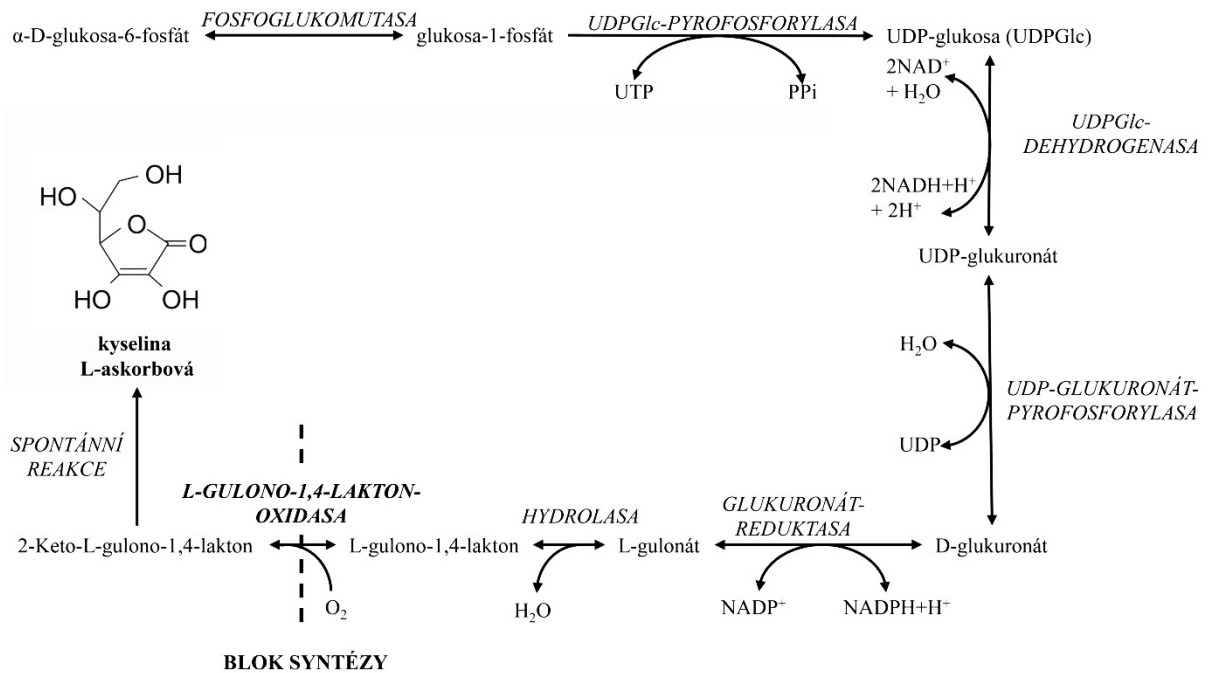
Anaerobní glykolýza:



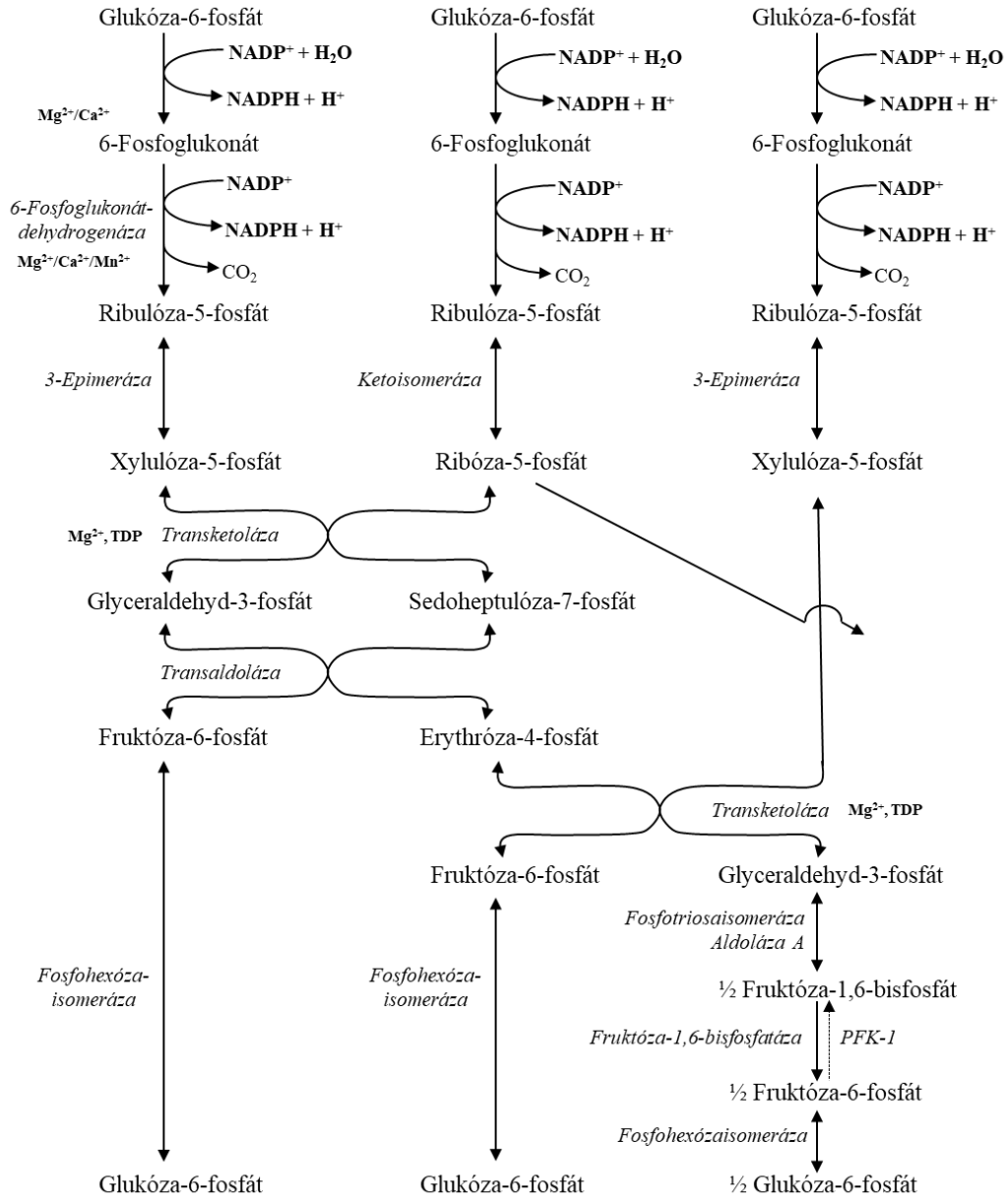
Citrátový cyklus:



Syntéza kyseliny L-askorbové:



Pentosový cyklus:



8 Zdroje

- Braunová J.: Potravinová alergie. Interní medicína pro praxi, 2001, 12:556-558.
- Combs, G. F. Jr.: The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health. 3rd Edition. Ithaca, NY: Elsevier Academic Press; 2008; 583s.
- Dlouhý P., Anděl M.: Jak se mění pohled na tuky ve výživě. Interní Med. 2009, 11(12), 549-551.
- Fernandez J., Perez-Alvarez J.A., Fernandez-Lopez J.A.: Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. Food Chemistry. 1997, 59 (3), 345-353.
- Fogliano V., Verde V., Randozzo G., Ritieni, A.: Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. Journal of Agricultural Food Chemistry. 1999, 47 (3), 1035-1040.
- Fuchs M.: Potravinová alergie. Practicus, 2008, 6:30-36.
- Garrett, R. H., Grisham, Ch. M.: Biochemistry. 4th Edition. Boston, USA: Brooks/Cole, Cengage Learning; 2010, 1184s.
- Grieger, C., Holec, J.: Hygiena mlieka a mliečnych výrobkov. Príroda Bratislava a SZN Praha, 1990, 397 s. ISBN 80-07-00253-7.
- Harvey, RA., Ferrier, DR. *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*. 5th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2011, 520 p. ISBN 978-1-60913-998-8
- Kopřiva, V. et al. Biochemie potravin a biochemické laboratorní metody. 1.vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2010. 54 s. ISBN 978-80-7305-125-9.
- Ledvina M., Stoklasová A., Cerman J.: Biochemie pro studující medicíny – I.díl. Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2005, 274 s. (ISBN 80-246-0849-9)
- Murray R. K., Bender D. A., Botham K. M., Kennelly P. J., Rodell V. W., Weil P. A.: Harper's illustrated biochemistry . Lange Medical Bbook, 29th edition, 2012, 818 pp.
- Steinhauser, L. et al. *Hygiena a technologie masa*. 1.vyd. Brno: LAST, 1995, 664 s. ISBN 80-900260-4-4
- Steinhauser, L. a kol.: Produkce masa. LAST Tišnov, 2000, 464 s. ISBN 80-900260-7-9
- Vágnerová, B. *Amoniak – dynamika změn v průběhu skladování masa*. Brno: VFU Brno, 2012. 81 s. Bakalářská práce.
- Vajbarová, M. *Stanovení antioxidační kapacity ve vybraných vzorcích vína*. Brno: VFU Brno, 2014. 77 s. Diplomová práce.

Vědecký výbor pro potraviny: Potravinová přecitlivělost: alergie a intolerance, veřejně dostupný průřezový dokument, SZÚ Brno, 2003, 38 s., <http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/vvp.htm>

Velíšek J., Hajšlová J. a kol.: Chemie potravin I. OSSIS, Tábor 2009, 3. Rozšířené a přepracované vydání, 609 s.

Velíšek, J. *Chemie potravin I.* 1.vyd. Tábor: OSSIS, 1999a, 352 s. ISBN 80-902391-3-7

Velíšek, J. *Chemie potravin II.* 1.vyd. Tábor: OSSIS, 1999b, 328 s. ISBN 80-902391-4-5

Velíšek, J., Hajšlová, J. *Chemie potravin I.* 3.vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 602 s. ISBN 978-80-86659-15-2

Yildiz, F. *Advances In Food Biochemistry.* Boca Raton, Florida, USA: CRC Press Taylor & Francis Group, 2010. 507s.