1.4 Zavadání jako příprava oxidačního systému

Zavadání nespočívá pouze ve fyzikálním odstraňování vody. V živém, avšak od mateřské rostliny odděleném výhonu pokračuje metabolismus a současně se rozvíjí odpověď na vodní deficit, poranění a další stresové podněty.

Pokles obsahu vody vede ke ztrátě turgoru[6] a ke změně mechanických vlastností pletiv. List se stává měkčím a poddajnějším, takže jej lze při rolování tvarovat bez nadměrného lámání.

Současně dochází k biochemickým změnám zahrnujícím metabolismus aminokyselin, lipidů, sacharidů a aromatických prekurzorů. Zavadání tedy nejen upravuje mechanické vlastnosti listu, ale také připravuje jeho chemický systém na další přeměny při rolování a oxidaci.

1.5 Rolování a aktivace oxidace

Při rolování působí na zavadlý list tlak, tření, smykové síly a opakovaná deformace. Poškozují se buněčné stěny, plazmatické membrány, tonoplast[7] a další struktury.

Tím se ruší původní prostorové oddělení katechinů a oxidačních enzymů. Za současného přístupu atmosférického kyslíku vzniká reakční prostředí umožňující rychlou oxidaci polyfenolů.

Zjednodušeně:

mechanické narušení buněk
⇓
porušení membrán
⇓
kontakt katechinů, enzymů a kyslíku
⇓
rychlá tvorba chinonů

1.6 Oxidační enzymy

1.6.1 Polyfenoloxidáza

Polyfenoloxidáza (PPO) je obecné označení pro oxidoreduktázy obsahující měď schopné katalyzovat oxidaci vhodných fenolických substrátů molekulárním kyslíkem. V rostlinných pletivech souvisí její aktivita mimo jiné s enzymatickým hnědnutím po poranění. Představuje jeden z hlavních enzymových systémů spouštějících oxidaci čajových katechinů.

[6] Turgor označuje tlak, kterým obsah rostlinné buňky působí na její buněčnou stěnu. Je závislý především na množství vody v buňce. Při ztrátě vody během zavadání turgor klesá, čímž se snižuje mechanická pevnost pletiv a čajový list se stává měkčím a poddajnějším.

[7] Tonoplast je membrána obklopující vakuolu rostlinné buňky. Jeho mechanické porušení umožňuje únik vakuolárně uložených metabolitů, včetně značné části čajových polyfenolů, do okolního buněčného prostředí.

Pro o-difenolový substrát lze celkovou reakci schematicky vyjádřit:

$$2\,\mathrm{Ar(OH)_2} + \mathrm{O_2} \xrightarrow{\mathrm{PPO}} 2\,\mathrm{Ar{=}O} + 2\,\mathrm{H_2O}$$

kde $\mathrm{Ar(OH)_2}$ představuje oxidovatelnou fenolickou strukturu a $\mathrm{Ar{=}O}$ příslušný o-chinon.

Přesnější chemický význam reakce spočívá v oxidaci dvou fenolických hydroxylových skupin na karbonylové skupiny chinonu:

$$\text{catechol} \xrightarrow{\mathrm{PPO},\ \mathrm{O_2}} \text{o-chinon}$$

Při reakci jsou z fenolického substrátu odstraněny elektrony a protony a molekulární kyslík je konečným akceptorem elektronů.

1.6.2 Peroxidáza

Vedle PPO se oxidačních přeměn účastní peroxidáza (POD). Peroxidázy jsou oxidoreduktázy využívající peroxidy, nejčastěji peroxid vodíku, jako oxidační činidlo. Rostlinné peroxidázy mohou oxidovat široké spektrum fenolických substrátů a mohou se podílet zejména na pozdějších oxidačních reakcích během výroby červeného čaje.

Obecné reakční schéma lze zapsat:

$$\mathrm{H_2O_2} + 2\,\mathrm{AH_2} \xrightarrow{\mathrm{POD}} 2\,\mathrm{H_2O} + 2\,\mathrm{AH^{\bullet}}$$

kde $\mathrm{AH_2}$ představuje redukovaný donor elektronů.

PPO a POD proto využívají rozdílné oxidanty:

$$\begin{aligned} \mathrm{PPO}: &\quad \mathrm{O_2} && \text{molekulární kyslík,} \\ \mathrm{POD}: &\quad \mathrm{H_2O_2} && \text{peroxid vodíku.} \end{aligned}$$

Jejich úlohy nejsou vzájemně zaměnitelné a jejich relativní význam se může měnit podle kultivaru, stáří listu a průběhu zpracování.

1.7 Primární oxidace katechinů

První chemicky zásadní krok představuje enzymatická oxidace fenolických B-kruhů katechinů na odpovídající chinony.

Schematicky:

$$\text{katechin} + \frac{1}{2}\,\mathrm{O_2} \xrightarrow{\mathrm{PPO}} \text{katechin-chinon} + \mathrm{H_2O}$$

Tento zápis představuje pouze stechiometrické zjednodušení. Ve skutečnosti vznikají konkrétní o-chinonové[8] struktury podle hydroxylace příslušného katechinu.

Oxidace katecholu může být schematicky vyjádřena:

$$C_6H_4(OH)_2 \underset{\text{redukce}}{\overset{\text{oxidace}}{\rightleftharpoons}} C_6H_4O_2 + 2\,H^+ + 2\,e^-$$

a redukce kyslíku:

$$\frac{1}{2}\,O_2 + 2\,H^+ + 2\,e^- \longrightarrow H_2O$$

Součtem vzniká:

$$C_6H_4(OH)_2 + \frac{1}{2}\,O_2 \longrightarrow C_6H_4O_2 + H_2O$$

1.8 Chinony jako centrální reakční uzel

Vznikem chinonů přechází relativně stabilní katechinový systém čerstvého listu do vysoce dynamické reakční sítě. Chinony jsou elektrofilní[9].

Mohou proto reagovat:

- s dalšími katechiny
- s jinými chinony
- s již vzniklými polyfenolickými produkty
- s aminokyselinami
- s peptidy a bílkovinami
- s dalšími nukleofilními metabolity

Od tohoto okamžiku již nelze chemii červeného čaje popsat jedinou lineární reakční posloupností.

1.9 Vznik theaflavinů

1.9.1 Princip oxidačního párování

Theaflaviny jsou charakteristické dimerní polyfenoly červeného čaje obsahující benzotropolonové jádro. Jejich vznik vyžaduje vhodné oxidační párování katechinových prekurzorů s rozdílným stupněm hydroxylace B-kruhu. Představují jednu z nejlépe popsaných skupin produktů enzymatické oxidace čajových katechinů.

[8] Chinony jsou oxidované deriváty aromatických fenolů, v nichž byly dvě hydroxylové skupiny přeměněny na karbonylové skupiny. Jsou elektronově deficitní a často velmi reaktivní. Proto obvykle nepředstavují stabilní konečné produkty, ale meziprodukty rychle vstupující do dalších reakcí.

[9] Elektrofil je chemická částice nebo reakční centrum s nízkou elektronovou hustotou, které může přijmout elektronový pár od nukleofilu. Chinonové struktury vznikající oxidací polyfenolů obsahují elektronově deficitní centra, a proto snadno reagují s nukleofilními místy jiných molekul.

Základní reakční princip lze zjednodušeně zapsat:

katecholový katechin + pyrogallolový katechin
⇓ enzymatická oxidace PPO/POD
reaktivní chinonové meziprodukty
⇓ oxidační párování a přeskupení
theaflavinový derivát

Přesněji nejprve vznikají chinonové formy:

$$\mathrm{EC} \xrightarrow[\mathrm{O_2}]{\mathrm{PPO}} \mathrm{EC-chinon}$$
$$\mathrm{EGC} \xrightarrow[\mathrm{O_2}]{\mathrm{PPO}} \mathrm{EGC-chinon}$$

Následuje oxidační párování, tvorba vazeb mezi původními B-kruhy, přeskupení, otevření části kruhového systému a vznik sedmičlenného benzotropolonového jádra.

1.9.2 Benzotropolonové jádro

Charakteristickým strukturním znakem theaflavinů je benzotropolonové jádro. Benzotropolonový systém obsahuje sedmičlenný tropolonový kruh kondenzovaný nebo strukturně propojený s aromatickou částí. Konjugovaný systém π-elektronů umožňuje absorpci světla v oblasti viditelného spektra a je zásadní pro charakteristické žlutooranžové až oranžovočervené zbarvení theaflavinů.

Zjednodušené strukturní schéma:

flavanová jednotka − benzotropolon − flavanová jednotka

Benzotropolonové jádro je chromoforem[10] theaflavinové molekuly.

1.10 Čtyři hlavní theaflaviny

Hlavními theaflaviny červeného čaje jsou:

Produkt	Zkratka	Hlavní prekurzory	Sumární vzorec
theaflavin	TF	EC + EGC	$C_{29}H_{24}O_{12}$
theaflavin-3-gallát	TF3G	EC + EGCG	$C_{36}H_{28}O_{16}$
theaflavin-3′-gallát	TF3′G	ECG + EGC	$C_{36}H_{28}O_{16}$
theaflavin-3,3′-digallát	TFDG	ECG + EGCG	$C_{43}H_{32}O_{20}$

[10] Chromofor je část molekuly, jejíž elektronová struktura umožňuje absorpci elektromagnetického záření v určité oblasti spektra. Pokud absorpce zasahuje do viditelné oblasti, přispívá chromofor k pozorované barvě látky.

Tato tabulka zároveň ukazuje, že galloylové skupiny původních katechinů mohou být během vzniku theaflavinů zachovány.

Schematicky:

$$\begin{aligned} \mathrm{EC} + \mathrm{EGC} &\longrightarrow \mathrm{TF}, \\ \mathrm{EC} + \mathrm{EGCG} &\longrightarrow \mathrm{TF3G}, \\ \mathrm{ECG} + \mathrm{EGC} &\longrightarrow \mathrm{TF3'G}, \\ \mathrm{ECG} + \mathrm{EGCG} &\longrightarrow \mathrm{TFDG}. \end{aligned}$$

1.11 Význam theaflavinů pro senzorickou kvalitu čaje

Theaflaviny představují relativně malou část celkového polyfenolického systému červeného čaje, jejich senzorický význam je však vzhledem k tomuto podílu mimořádně velký. Podílejí se zejména na:

- jasném oranžovém až oranžovočerveném zbarvení nálevu
- svěžesti a živosti chuti
- svíravosti
- struktuře a pocitu v ústech
- interakcích s kofeinem a dalšími složkami nálevu

Svíravost[11] souvisí mimo jiné s interakcemi polyfenolů s bílkovinami slin.

1.12 Thearubiginy – problém definice

Po desetiletí byla chemie červeného čaje popisována jednoduchým schématem

$$\text{katechiny} \longrightarrow \text{theaflaviny} \longrightarrow \text{thearubiginy}.$$

Takové schéma lze dnes chápat pouze jako velmi zjednodušující a přibližné. Thearubiginy nejsou jednou chemickou látkou ani homogenní třídou molekul se společnou přesně definovanou strukturou[12]. Jde o historicky ustálené označení mimořádně složité skupiny polyfenolických produktů červeného čaje.

Moderní hmotnostní spektrometrie ukázala, že tato skupina látek obsahuje velké množství struktur lišících se:

- molekulovou hmotností
- stupněm hydroxylace
- stupněm oxidace
- počtem katechinových jednotek

[11] Svíravost není základní chutí v užším fyziologickém smyslu, ale komplexním hmatovým vjemem. Polyfenoly mohou interagovat s proteiny a glykoproteiny slin, čímž mění lubrikační vlastnosti prostředí ústní dutiny a vyvolávají pocit suchosti, zdrsnění a stažení.

[12] Termín thearubiginy vznikl dříve, než byly k dispozici moderní chromatografické a hmotnostně spektrometrické metody schopné podrobně charakterizovat složité směsi polyfenolů. Proto označuje spíše analyticky a historicky vymezenou skupinu látek než jednu jednoznačnou chemickou třídu.

- přítomností galloylových skupin
- charakterem vazeb mezi jednotlivými jednotkami
- zastoupením chinonových a redukovaných forem

Byly například identifikovány homologické řady polyhydroxylovaných theaflavinů, gallátových theaflavinů, theacitrinů a jejich chinonových forem.

1.13 Theacitriny a další charakterizované produkty

Vedle theaflavinů vzniká řada dalších strukturálně definovaných produktů. Patří mezi ně mimo jiné theacitriny, theasinensiny, theaflavové kyseliny a další dimerní a oligomerní produkty.

Jejich existence zásadním způsobem dokládá, že polyfenolickou chemii červeného čaje nelze omezit na pouhé tři kategorie „katechiny – theaflaviny – thearubiginy“. Přesnější model je rozvětvený:

$$\text{katechiny} \xrightarrow[\text{O}_2]{\text{PPO/POD}} \text{chinonové meziprodukty}$$

$$\begin{cases} \longrightarrow \text{theaflaviny} \\ \longrightarrow \text{theacitriny} \\ \longrightarrow \text{theasinensiny a příbuzné dimery} \\ \longrightarrow \text{další dimerní produkty} \\ \longrightarrow \text{oligomerní produkty} \\ \longrightarrow \text{produkty zahrnované do skupiny thearubiginů} \end{cases}$$

1.14 Sekundární oxidace theaflavinů

Theaflaviny nejsou konečnými inertními produkty. Po svém vzniku mohou dále oxidovat.

Schematicky:

$$\text{TF} \xrightarrow[\text{O}_2]{\text{další oxidace}} \text{TF}_{\text{ox}} \longrightarrow \text{další produkty}$$

Koncentrace theaflavinů během fajiao proto zpravidla neroste neomezeně. Jejich okamžitý obsah je určen rozdílem mezi rychlostí vzniku a rychlostí úbytku při následných reakcích.

Lze tedy psát:

$$\frac{d[\text{TF}]}{dt} = v_{\text{vznik}} - v_{\text{úbytek}},$$

kde [TF] představuje koncentraci theaflavinů, $v_{\text{formation}}$ rychlost jejich tvorby a $v_{\text{consumption}}$ rychlost jejich následné přeměny.