

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Katedra analytické chemie

Vliv přísad karobového prášku na antioxidační
vlastnosti muffinů

Bc. Kateřina Jelínková

Diplomová práce

2018

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Department of Analytical Chemistry

The effect of carob powder on antioxidant
properties of muffins

Bc. Kateřina Jelínková

Thesis

2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že na moji práci se vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne

Bc. Kateřina Jelínková

Poděkování:

Úvodem bych velmi ráda poděkovala svému vedoucímu práce doc. Ing. Liboru Červenkovi, Ph.D. za jeho velkou trpělivost, rady a pomoc při psaní mé diplomové práce. A veliký dík patří i mé rodině, za podporu a pochopení po celou dobu mého studia.

NÁZEV

Vliv přísad karobového prášku na antioxidační vlastnosti muffinů

ANOTACE

První část této diplomové práce se zabývá sorpčními izotermami. Jejich měřením, matematickým popisem, jednotlivými typy a jejich využitím pro praxi. Experimentálně byly stanoveny sorpční izotermy prášku z lusků rohovníku (*Ceratonia siliqua*) před a po pražení.

Druhá část této diplomové práce se zabývá antioxidačními vlastnostmi rohovníku. V rámci experimentu byly připraveny muffiny s různým podílem prášku z lusků rohovníku (praženého a nepraženého) a sledován jejich vliv na vybrané antioxidační parametry.

KLÍČOVÁ SLOVA

sorpční izoterma, rohovník, muffin, antioxidační vlastnosti

TITLE

The effect of carob powder on antioxidant properties of muffins

ANOTATION

The first part of this Diploma Thesis deals with moisture adsorption isotherms, their determination, measurement, mathematical description, their types and their use in practice. SMoisture adsorption isotherms of carob powder were experimentally established.

The second part of this Diploma Thesis deals with antioxidant properties of carob powder. Then muffins were prepared with addition of various levels of carob powder (roasted and unroasted) and antioxidant properties were determined.

KEYWORDS

sorption isotherm, carob powder, muffin, antioxidant properties

OBSAH

Úvod.....	14
1 Teoretická část.....	15
1.1 Základní informace o rohovníku.....	15
1.1.1 Obsah biologicky významných látek v rohovníku	16
1.1.1.1 Inositoly	17
1.1.1.2 Polyfenolické látky	17
1.1.1.3 Aminokyseliny.....	18
1.1.1.4 Minerální látky.....	18
1.1.1.5 Lipidy.....	19
1.1.1.6 Vitamíny	19
1.1.2 Zdraví prospěšné vlastnosti rohovníku.....	19
1.1.2.1 Antiproliferativní a apoptická aktivita rohovníku.....	20
1.1.2.2 Antidiabetický efekt rohovníku	20
1.1.2.3 Protiprůjmové působení rohovníku.....	20
1.1.2.4 Antihyperlipidemické účinky rohovníku	21
1.1.3 Využití rohovníku	21
1.2 Teorie sorpčních izoterem.....	23
1.2.1 Aktivita vody	23
1.2.1.1 Vliv aktivity vody na kvalitu potravin.....	24
1.2.1.2 Metody stanovení aktivity vody.....	24
1.2.2 Obsah vlhkosti a metody stanovení	25
1.2.3 Sorpční izotermy.....	26
1.2.3.1 Typy sorpčních izoterem.....	27
1.2.3.2 Matematický popis sorpčních izoterem	28
1.2.3.3 Využití sorpčních izoterem.....	28
1.2.3.4 Metody měření sorpčních izoterem	28
1.3 Analytické a fyzikální metody	29
1.3.1 Měření produktů Maillardových reakcí	29
1.3.2 Antioxidační charakteristika	30
1.3.2.1 Stanovení celkového obsahu fenolických látek.....	30
1.3.2.2 Metoda s DPPH.....	31
1.3.2.3 Metoda s ABTS.....	31

1.3.2.4	Schopnost vychytávat peroxid vodíku	32
1.3.2.5	Stanovení redukčních vlastností	33
1.3.2.6	Stanovení celkového obsahu flavonoidů	33
1.3.2.7	Stanovení celkového obsahu katechinů	33
1.3.3	Spektrofotometrické metody	34
1.3.3.1	Infračervená spektrometrie	34
1.3.3.2	Spektrofotometrie ve viditelné oblasti	35
1.3.3.3	Fluorescenční spektrometrie	36
2	Experimentální část	37
2.1	Přístroje a pomůcky	37
2.2	Použité chemikálie	37
2.3	Vzorky rohovníku a jejich úprava	38
2.4	Metoda měření adsorpčních izoterem	38
2.5	Příprava muffinů	40
2.6	Příprava extraktů vzorků	40
2.7	Měření výšky a úbytku hmotnosti muffinů	41
2.8	Produkty Maillardových reakcí	41
2.8.1	Index hnědnutí	41
2.8.2	FAST index	41
2.9	Stanovení antioxidačních vlastností vzorků	42
2.9.1	Stanovení celkového obsahu fenolických látek	42
2.9.2	Stanovení antioxidační aktivity metodou s DPPH	42
2.9.3	Stanovení antioxidační aktivity metodou s ABTS	43
2.9.4	Stanovení celkového obsahu flavonoidů	43
2.9.5	Stanovení celkového obsahu katechinů	43
2.9.6	Stanovení redukčních vlastností	44
2.9.7	Stanovení schopnosti vychytávat peroxid vodíku	44
2.10	Zpracování dat	44
3	Výsledky a diskuze	45
3.1	Vlastnosti nepraženého a praženého karobového prášku	45
3.1.1	Adsorpční izoterma	45
3.1.2	Infračervená spektrometrie vzorků karobového prášku	46
3.1.3	Vliv pražení na obsah produktů Maillardových reakcí	47

3.1.3.1	Index hnědnutí	48
3.1.3.2	FAST index.....	48
3.1.4	Antioxidační charakteristika	48
3.1.4.1	Vliv pražení na stanovení celkových fenolických látek	48
3.1.4.2	Vliv pražení na antioxidační účinky metody s DPPH radikálem	49
3.1.4.3	Vliv pražení na antioxidační účinky metody s ABTS radikálem	49
3.1.4.4	Vliv pražení na stanovení obsahu celkových flavonoidů	49
3.1.4.5	Vliv pražení na stanovení celkových katechinů.....	50
3.1.4.6	Vliv pražení na redukční vlastnosti.....	50
3.1.4.7	Vliv pražení na schopnost vylučovat peroxid vodíku	50
3.2	Vlastnosti hotových muffinů s přidavkem karobového prášku.....	51
3.2.1	Index hnědnutí	53
3.2.2	FAST index.....	54
3.2.3	Antioxidační charakteristika	55
3.2.3.1	Stanovení obsahu celkových fenolických látek	55
3.2.3.2	Vliv pražení na antioxidační účinky metody s DPPH radikálem	56
3.2.4	Vliv pražení na antioxidační účinky metody s ABTS radikálem	57
3.2.5	Vliv pražení na stanovení celkového obsahu flavonoidů	58
3.2.6	Vliv pražení na stanovení celkových katechinů.....	59
3.2.7	Vliv pražení na stanovení redukčních schopností.....	59
3.2.8	Vliv pražení na stanovení schopnosti vylučovat peroxid vodíku.....	60
4	Závěr.....	61
5	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	62
6	PŘÍLOHY	70

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Plody rohovníku (převzato ze ⁴).....	15
Obrázek 2 Celková sorpční izoterma a její popis (převzato z ³⁷)	26
Obrázek 3 jednotlivé typy sorpčních izoterem dle Brunauera a kolektivu (převzato z ³⁸).....	27
Obrázek 4 Reakce volného radikálu DPPH na DPPH-H (převzato z ⁴⁶).....	31
Obrázek 5 Princip ABTS metody (převzato z ⁴⁷)	32
Obrázek 6 Princip vanilinové reakce (převzato z ⁵²)	34
Obrázek 7 Princip infračerveného spektrometru s Fourierovou transformací (převzato z ⁵⁴)	35
Obrázek 8 Princip UV-VIS spektrofotometru (převzato z ⁵⁵)	35
Obrázek 9 Vliv obsahu relativní vzdušné vlhkosti na čase při sušení karobového prášku (T=22 °C)	39
Obrázek 10 Rovnice sorpční izotermy pro nepražený a pražený karobový prášek (teplota měření T= 25 °C)	45
Obrázek 11 Spektra nepraženého a praženého karobového prášku získaná infračervenou spektrometrií.....	46
Tabulka 1 Biologické složky rohovníku a jejich zastoupení (převzato z ³).....	16
Tabulka 2 Hodnoty aktivity vody a_w vybraných solí při různých teplotách (převzato z ⁴⁰)...	29
Tabulka 3 Výsledky stanovovaných metod nepraženého a praženého karobového prášku (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, N = 4).....	47
Tabulka 4 Výsledky stanovovaných fyzikálních metod u muffinů s přísádky nepraženého karobového prášku (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, N=4).....	51
Tabulka 5 Výsledky stanovovaných fyzikálních metod u muffinů z praženého karobového prášku (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, N=4).....	51
Tabulka 6 Hodnoty indexu hnědnutí (A při $\lambda=420$ nm) pro muffiny s přísádkem nepraženého a praženého karobového prášku (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, N=4)	53
Tabulka 7 Hodnoty FAST indexu pro muffiny s přísádkem nepraženého a praženého karobového prášku (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, N=4)	54
Tabulka 8 Hodnoty celkových fenolických látek pro muffiny s přísádky nepraženého a praženého karobového prášku (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, N=4).....	55
Tabulka 9 Hodnoty stanovení metody s DPPH pro muffiny s přísádky nepraženého a praženého karobového prášku (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, N=4).....	56
Tabulka 10 Hodnoty stanovení metody s ABTS pro muffiny s přísádky nepraženého a praženého karobového prášku (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, N=4).....	57
Tabulka 11 Hodnoty stanovení celkových flavonoidů pro muffiny s přísádky nepraženého a praženého karobového prášku (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, N=4).....	58
Tabulka 12 Hodnoty stanovení celkových katechinů pro muffiny s přísádky nepraženého a praženého karobového prášku (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, N=4).....	59
Tabulka 13 Hodnoty stanovení redukční schopnosti pro muffiny s přísádky nepraženého a praženého karobového prášku (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, N=4).....	59

Tabulka 14 Hodnoty stanovení schopnosti vychytávat peroxid vodíku pro muffiny s přidavkem nepraženého a praženého karobového prášku (průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka, N=4)..... 60

SEZNAM ZKRATEK

A - absorbance

AgNPs – nanočástice stříbra

ABTS – 2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonátu

DPPH – metoda s použitím stabilního volného radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu

FAST - fluorescence pokročilých produktů Maillardových reakcí a rozpustného tryptofanu

Trolox – 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina

UV/VIS – ultrafialová a viditelná oblast

Úvod

Obsah vody v potravinách je důležitým faktorem. Má obrovský vliv na stabilitu potravin, a to jak z hlediska chemického, tak i mikrobiálního. Sorpční izotermie jsou tedy nepostradatelným prvkem pro určování doby spotřeby, podmínek skladování, případně i transportu.

Trendem „dnešní doby“ je zdravá strava. Diety se obohacují potravinami se zdraví prospěšnými účinky, kam bezesporu patří i rohovník, který jich má celou řadu. Jedná se o stálezelený strom rostoucí ve středomoří. Má prokazatelnou antiproliferativní a apoptickou aktivitu, tedy působí protinádorově, mimo to i protiprůjmově. Dále má i antidiabetický efekt a antihyperlipidemické účinky, tedy snižuje hladinu glukózy a lipidů.

Kromě značných pozitivních účinků na lidský organismus se využívá i v průmyslu, a to hlavně jako náhražka kakaa. V poslední době i v pekařském průmyslu, kdy je přidáván ve formě karobového prášku do pečiva v pražené i nepražené formě. V potravinářství je používán jako přídatná látka karubin, ale nachází uplatnění i ve farmaceutickém průmyslu zejména ve výrobě krémů a tělových mlék.

V této diplomové práci byly stanoveny sorpční izotermie rohovníku prášku z lusků rohovníku. Cílem této práce bylo porovnat vlastnosti praženého a nepraženého prášku z rohovníku. Pro tento pekařský experiment byl zvolen muffin, kdy vždy část pšeničné mouky byla nahrazována praženou a nepraženou rohovníkovou moukou.

1 Teoretická část

1.1 Základní informace o rohovníku

Rohovník obecný (Obrázek 1), *Ceratonia siliqua* (*Fabaceae*), u nás také známý jako svatojánský chléb, je z čeledi bobovitých. Jeho název je odvozen z řeckého *keras*, což je v překladu „roh“ a latinského *siliqua*, který znamená „tvrdý“. Jedná se o 12 – 15 m stálezelený strom, který je součástí Středomořské vegetace (Řecko, Itálie, Francie, Malta, Portugalsko, Španělsko), kde se vyskytuje se zvláště na půdách, které jsou bohaté na vápník^{1,2}.

Jeho plody mají tvar jedlých fazolí, které visí ve formě klastrů a zůstávají zelené až do úplného zrání. Lusky jsou připraveny ke sběru poté, co změní barvu na tmavě hnědou a stanou se vrásčítými, což je způsobeno snížením obsahu vlhkosti. Zralé ovoce má podlouhlý tvar (10 až 25 cm) a obsahuje několik tvrdých semen³. Tyto lusky se významně liší v morfologických charakteristikách, jako je rozměr, velikost, hmotnost, tvar, hustota, barva a poměr počtu semen k buněčné hmotě v důsledku různých klimatických podmínek⁵.



Obrázek 1: Plody rohovníku (převzato ze⁴)

Jde o rostlinu, jejíž původ sahá až do středověku v zemích jako je Turecko, Kypr, Sýrie, Libanon nebo Egypt². Používání rohovníku se datuje již od „starého Egypta“, kdy se lusky krmila hospodářská zvířata, a mimo to používali i karobovou gumu při mumifikaci. Dnes je karobová guma využívána i ve farmaceutickém průmyslu při výrobě krému a pleťových mlék⁵.

Arabové používali semeno rohovníku jako jednotku hmotnosti nazývanou *karát*. Semena obsažená uvnitř rohovníkového plodu totiž váží zhruba 0,2 g, a proto byly dříve zlatníky používány jako závaží³. Odtud byl rohovník dále rozšířen do celého světa².

Rohovník je využíván ve středomořských oblastech pro okrasné účely, hlavně v Alžírsku při opětovném zalesňování suchých a degradovaných ploch, ale hlavně pro průmyslové účely. Semena rohovníku mají některé zajímavé vlastnosti a často se proto využívají v potravinářském a farmakologickém průmyslu⁶.

Lusky rohovníku jsou charakterizovány vysokým obsahem sacharidů, v karbové buničině jsou v hojném množství zastoupeny i proteiny. Mimo jmenované se ještě využívá rohovníkový sirup⁷.

1.1.1 Obsah biologicky významných látek v rohovníku

Rohovník je známý jako zdroj vlákniny, cukrů a řady bioaktivních sloučenin (Tabulka 1), které jsou prospěšné u řady zdravotních problémů (*diabetes mellitus*, srdeční choroby, rakovina tlustého střeva), a to hlavně díky svým antidiabetickým, antioxidačním a protizánětlivým účinkům³.

Tabulka 1 Biologické složky rohovníku a jejich zastoupení (převzato z³)

Biologická složka	Zastoupení v rohovníku [%]
Celkové cukry	45–52
Sacharóza	35–45
Fruktóza	6–7
Glukóza	2–4
Proteiny	2–7
Sušina	2–3
Tuky	0,5–1
Celkové polyfenoly	1,4–2

Všechny živé buňky jsou neustále vystavovány různým dějům, které přispívají ke vzniku oxidačního stresu. Ten v organismu vzniká po zvýšené expozici oxidanty, snížením antioxidantů, nebo z obou těchto důvodů. Oxidační stres je spojen s tvorbou reaktivních forem kyslíku, včetně volných radikálů. Ty mohou mít zásadní vliv na patofyziologii nemocí, jako jsou nádorová onemocnění, revmatoidní artritida, cirhóza nebo arterioskleróza⁷.

1.1.1.1 Inositoly

V rohovníku jsou obsaženy, kromě hlavních cukrů (sacharóza, fruktóza a glukóza), také v nízkých koncentracích maltóza, rafinóza, stachyóza, verbaskóza, xylózy a další inositoly. Tyto inositoly se vyskytují i v jiných rostlinách, hlavně v sójových bobech a arašídech, ovšem v rohovníku je jich mnohem větší množství ⁸.

Ve vysokých koncentracích se v rohovníku vyskytuje pinitol (3-O-methyl-L-chiro-inositol). Bylo zjištěno, že má antidiabetické účinky. Pomáhá při regeneraci β -buněk, které jsou součástí slinivky břišní (Langerhansovy ostrůvky). Tyto buňky uvolňují hormon inzulín, který řídí hladinu glukózy v krvi ⁹. Kromě antidiabetických účinků má prokazatelné protiartritické a antioxidační účinky. Pinitol také zvyšuje tvorbu cytokinů, které hrají zásadní úlohu při zánětlivých procesech ¹⁰.

1.1.1.2 Polyfenolické látky

Polyfenolické látky jsou sekundární metabolity rostlin, z větší části ovoce, zeleniny, obilovin, které se nejčastěji účastní ochrany částí rostlin proti ultrafialovému záření, nebo v boji proti patogenům. Podle epidemiologických studií bylo jednoznačně prokázáno, že dlouhodobá konzumace rostlinné stravy bohaté na polyfenoly poskytuje ochranu proti rozvoji rakoviny, kardiovaskulárních onemocnění, diabetu, osteoporózy a neurodegenerativních onemocnění. V rohovníkovém prášku jsou hojně zastoupeny tyto látky jako je kyselina gallová, taninová a askorbová ¹¹.

Polyfenolické látky, které v potravinách přispívají k hořkosti a svíravosti jsou označovány jako taniny neboli třísloviny. Dále polyfenoly ovlivňují barvu, chuť, vůni i oxidační stabilitu. V závislosti na počtu fenolových kruhů dělíme polyfenoly na čtyři hlavní třídy: fenolové kyseliny, flavonoidy, stilbeny a ligniny ^{12,13}.

Fenolové kyseliny se vyskytují hojně v potravinách a rozdělujeme je do dvou tříd, na deriváty kyseliny benzoové a deriváty kyseliny skořicové ¹³.

Flavonoidy jsou nejstudovanější skupinou polyfenolů. Jejich základní struktura se skládá ze dvou aromatických jader, které jsou spojeny třemi atomy uhlíku do heterocyklu. Mnohé flavonoidy jsou odpovědné za zbarvení květin, plodů a listů ^{12,13}.

Stilbeny obsahují dvě fenylové skupiny spojené dvěma uhlíkomethylovými můstky. Výskyt v potravinách je poměrně nízký. Většina stilbenů v rostlinách zastává antimykotickou funkci a jsou syntetizovány pouze jako odpověď na infekci nebo zranění ^{12,13}.

Lignany jsou sloučeniny obsahující 2,3- dibenzylbutanovou strukturu, která je tvořena ze dvou zbytků kyseliny skořicové. Některé lignany jsou považovány za fytoestrogeny. Nejbohatším zdrojem lignanů jsou lněná semena ¹³.

Studiemi bylo prokázáno, že spotřeba polyfenolů omezuje výskyt koronární srdeční choroby aterosklerózy, má antidiabetický efekt, bojuje proti rakovinnému bujení, chrání nervovou soustavu, a také se jí připisuje efekt proti stárnutí a mnoho dalších prospěšných účinků ¹⁴.

1.1.1.3 Aminokyseliny

Bílkoviny rohovníku jsou složeny ze 17 aminokyselin, kde kyselina asparagová, asparagin, alanin, kyselina glutamová, leucin a valin společně tvoří zhruba 57% z celkového obsahu aminokyselin v luscích rohovníku. Zbytek jsou zastoupena serinem, glycinem, histidinem, argininem, threoninem, tyrosinem, prolinem, methioninem, isoleucincysteinem, fenylalaninem a lysinem ¹³. Obecně tedy můžeme považovat rohovník jako dobrý zdroj aminokyselin. Konkrétněji obsahuje všech sedm esenciálních aminokyselin (threonin, methionin, valin, isoleucin, leucin, fenylalanin, lysin) v koncentracích, které splňují normy Světové zdravotnické organizace (WHO) ¹⁵.

1.1.1.4 Minerální látky

Plody rohovníku jsou vynikající zásobárnou draslíku a vápníku. Obsah draslíku se pohybuje okolo 970 mg na 100 g sušiny, a koncentrace vápníku dosahuje až 300 mg na 100 g sušiny ¹³.

Kromě draslíku a vápníku tato rostlina obsahuje další minerály, jako je například fosfor a hořčík, ale již v menších koncentracích než výše jmenovaný draslík a vápník. Plody také obsahují mnoho mikroelementů jako je železo, měď, zinek, mangan, nikl, baryum, kobalt a další. Nejvíce zastoupeným mikrominerálem je železo. Semena rohovníku obvykle obsahují větší koncentrace těchto jmenovaných minerálů než rohovníkové lusky ¹³.

1.1.1.5 Lipidy

Lipidy jsou základními metabolity v buňkách, kde zastávají nejrůznější funkce nezbytné pro činnost buněk. Zahrnují složky struktury buněčné membrány, zásobárna energie, plní i funkci signální a řídí transport metabolitů přes buněčnou membránu. Bylo pozorováno, že u rostlin může docházet ke změně ve složení tuků, a to jako reakce na tepelný stres, nedostatek živin, stárnutí nebo na útok patogenů¹⁵.

V rohovníku je jen malé množství lipidů ve srovnání s ostatními složkami. Hlavními složkami lipidové povahy jsou methylestery mastných kyselin. Menší část je zastoupena nasycenými mastnými kyselinami, kde nejhojněji se vyskytující je kyselina palmitová (16:0), dále se vyskytuje i kyselina stearová (18:0). Z nenasycených mastných kyselin jednoznačně převládá kyselina olejová (18:1)¹⁵.

V rohovníku se vyskytují i triacylglyceroly (TAG). Ty mají velice rozmanitou strukturu, liší se v délce acylového řetězce, vazbou a její pozicí. Součástí jsou ale i fosfolipidy. Studií bylo zjištěno, že olej rohovníku obsahuje přibližně 60 % fosfolipidů, a to hlavně fosfatidylinositoly, a fosfatidylfosfolipidy¹⁴.

1.1.1.6 Vitamíny

V plodech rohovníku byly objeveny i vitamíny, a to jak rozpustné ve vodě, tak i vitamíny rozpustné v tucích. Ve větší míře se vyskytuje vitamín C a niacin (B₃), dále i kyselina listová, pyridoxalfosfát (B₆), kobalamin (B₁₂) a riboflavin (B₂), což jsou ve vodě rozpustné vitamíny. Co se týče vitamínů rozpustných v tucích, je to hlavně tokoferol (E), dále pak i axeroftol (A) a kalciferol (D)¹⁵.

1.1.2 Zdraví prospěšné vlastnosti rohovníku

Dle četných klinických studií byly odhaleny pozitivní vlivy konzumace rohovníku a jeho produktů pro udržování lidského zdraví, prevenci nebo pro léčbu některých chronických chorob. Produkty rohovníku jsou efektivní u onemocnění jako je rakovina, *diabetes mellitus*, průjmý a hyperlipidémie¹⁴.

1.1.2.1 Antiproliferativní a apoptická aktivita rohovníku

Rohovník je složením bohatý na fytochemické sloučeniny, u kterých byly v klinických studiích prokázány protinádorové, antiproliferativní a proapoptické schopnosti. Příkladem může být kvercetin, který podporuje apoptózu leukemických buněk se zaměřením přímo na antiapoptický protein Bcl-xL. Mimo jiné tento polyfenol vykazoval v klinických studiích na modelu xenoimpltátu schopnost inhibovat angiogenezi neboli novotvorbu cév, a to u nádoru prsu a pankreatu, což znamená, že je schopen snižovat velikost nádorů¹⁶.

Dalším příkladem je kyselina gallová - fenolová kyselina, která je taktéž obsažena v rohovníku. Klinickými studii bylo dokázáno, že má schopnost zastavovat růst osteosarkomu, tedy nádorů kostí u myši, ale hypoteticky i u nádorů tlustého střeva u lidí díky antiproliferativnímu účinku HT29 a LT97 buněčných linií. Dále je schopná vyvolat apoptické reakce a inhibovat proliferaci tím, že zvyšuje hladinu proteinu p-38, snižuje hladinu proteinu JNK (Jun-N-terminální kinázy) a aktivuje ERK1/2 inhibitor (extracelulární signálregulující kináza)¹⁶.

1.1.2.2 Antidiabetický efekt rohovníku

Rostlinné přípravky, které obsahují rohovník, mají i antidiabetický efekt. Tyto přípravky se vyznačují nízkým glykemickým indexem, a z tohoto důvodu jsou používány jako doplňky stravy pro pacienty s diabetem. Bylo pozorováno, že při přijímání diety obsahující karobovou gumu, došlo ke snížení hladiny glukózy v krvi krys¹⁷.

Přítomnost pinitolu v rohovníkových výrobcích by mohla být odpovědná za antidiabetické účinky tím, že reguluje hladinu cukru v krvi u pacientů s *diabetes mellitus* typu II, a to zvýšením citlivosti na inzulin. Karobový sirup je považován za bohatý zdroj pinitolu. Nejspíše také zvyšuje absorpci glukózy ve svalech, což svědčí o jejím vlivu v řadě metabolických cest glukózy, což je pravděpodobnější vysvětlení antidiabetického efektu rohovníku, než zvyšování produkce inzulinu nebo zlepšení jeho účinku¹⁸.

1.1.2.3 Protiprůjmové působení rohovníku

Rohovník je také doporučován k léčbě příznaků průjmu. Dřívější studie ukázaly, že rohovník je schopen zablokovat hemaglutinaci toxické látky *Escherichia coli* na izolovaných

střevních epitelových buňkách. Tento protiprůjmový efekt je nejpravděpodobněji způsoben bioaktivním složením lusků rohovníku, a to díky vysoké hladině taninů, ostatních polyfenolů a vlákniny¹⁹.

1.1.2.4 Antihyperlipidemické účinky rohovníku

Vysoké hladiny lipidů nebo lipoproteinů v krvi mohou vést k ateroskleróze a následně onemocnění srdce a cév. Většina doplňků stravy, které snižují hladiny lipidů, a cholesterolu v krvi obsahuje právě rohovník. Rohovníková vláknina v kombinaci s n-3 mastnými kyselinami jsou hlavními složkami potravin, které pozitivně ovlivňují kardiovaskulární systém¹⁹.

Tyto antihyperlipidemické účinky rohovníku byly dlouho sledovány, a to jak na *in vitro*, tak i na *in vivo* modelech. Bylo tedy prokázáno snížení hladiny cholesterolu a lipidů v játrech potkanů nakrmených potravou s vysokým obsahem cholesterolu. Ovšem v jedné novější studii, která byla prováděna na diabetických krysách, nebyl nalezen žádný významný vliv na hladiny cholesterolu a triacylglycerolů²⁰.

Studie zabývající se přímo rohovníkem nejsou již tak rozporuplné. Když byl rohovníkový prášek podáván potkanům spolu s hyperlipidemickou dietou, hodnoty cholesterolu i triacylglycerolů byly nižší. Rohovníkový prášek může být tedy potenciálně významný v dietním režimu u obézních osob²⁰.

1.1.3 Využití rohovníku

Semena se využívají jako surovina pro výrobu rohovníkového sirupu neboli karobové gumy, která se v potravinářství používá jako přídatná látka do potravin tzv. karubin, označovaná jako E410²⁰.

Jak již bylo zmíněno výše, z karobové gumy se vyrábí také žvýkačky. Její vlastnosti jsou obecně ovlivněny pH, přítomností solí nebo i tepelným zpracováním. Je také kompatibilní s jinými zahušňovacími látkami jako je agar nebo xantan, jejichž příměs přináší pružnější a silnější gel. Těchto zajímavých vlastností karobové gumy je využito v některých průmyslových odvětvích, nejvíce však v potravinářském průmyslu²¹.

Postupné vyčerpávání tradičních fosilních paliv s rostoucí spotřebou energie a emisí skleníkových plynů postupně vede k přechodu na obnovitelné a udržitelné zdroje energie. Zde se opět uplatňuje i rohovník. Autoři studie ²¹ navrhli rohovník jako úsporný zdroj pro výrobu ethanolu, zvláště v suchých oblastech, kde je rohovník pěstován ²².

Rohovníková guma má odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti podle zeměpisných oblastí, ve které se rohovník nachází, což platí i o ostatních složkách rohovníku. Použití rohovníkové gumy je víceúčelové. Používá se pro zlepšení reologických a texturních vlastností emulzí. Jelikož není toxická, lze jí používat v textilním, farmaceutickém průmyslu, biomedicině, kosmetice a v potravinářském průmyslu. Důležitou vlastností tohoto biopolymeru je jeho schopnost vytvářet velmi viskózní roztok při relativně nízkých koncentracích, čehož se využívá ke stabilizaci disperzí a emulzí a dále jako náhrada tuku v mnoha mléčných výrobcích ^{22,23}.

Karobovou gumu tvoří skupina dlouhých řetězců polymerů, které jsou charakterizovány jako ve vodě rozpustné viskózní disperze. Za skutečnost, že jsou tyto gumy rozpustné ve vodě, může velké množství hydroxylových skupin. Tyto materiály se nalézají v extraktech z mořských řas, v mouce vyrobené semletím zrn a v dalších přírodních produktech ²³.

Studiemi bylo zjištěno, že rohovník lze využít i při biosyntetických reakcích pro přípravu nanočástic. Nanočástice stříbra (AgNPs) se staly předmětem intenzivního výzkumu vzhledem k jejich širokému uplatnění v oblastech jako je optika, katalýza nebo v oblasti antimikrobiálních látek. Nanočástice stříbra mají nové nebo vylepšené vlastnosti v závislosti na jejich velikosti a morfologii ²⁴.

Rohovník má prospěšné účinky na náš organismus. Příkladem může být protektivní účinek na játra a ledviny. Znečišťující látky jako je nikl, olovo, kadmium, vanad nebo rtuť mohou vyvolat toxicitu ledvin a jater. Ledviny tyto kovy pohlcují a ukládají v proximálních tubulárních buňkách ²⁴. Jak již bylo řečeno výše, rohovník obsahuje produkty s antioxidačními vlastnostmi. Obecně bylo prokázáno, že antioxidanty snižují hepatotoxický účinek ²⁴.

Vysoký obsah cukru ve spojení s jeho nízkou cenou dělá z rohovníku výhodnou alternativu k živnému médiu pro výrobu ethanolu. Výtažek z rohovníkového prášku se ukázal jako potenciální substrát fermentační výroby. Hlavní složkou extraktu rohovníku je sacharóza.

Sacharóza je totiž nejlepší zdroj uhlíku pro výrobu kyseliny citronové. Na živnou půdu s obsahem rohovníkového extraktu byla naočkována plíseň *Aspergillus niger*. Tento druh plísně způsobil to, že se koncentrace cukrů během 24 hodin snižovala, zatímco koncentrace kyseliny citrónové rostla. Sirup z lusků rohovníku je složen hlavně z cukrů a je používán jako nízkonákladový substrát, podobně jako je tomu u rohovníkové moučky^{25,26}.

1.2 Teorie sorpčních izoterem

1.2.1 Aktivita vody

Aktivita vody vychází z Raoltova zákona pro ideální roztoky. Neberou se zde v úvahu ve vodě rozpuštěné látky a jejich interakce. Zjednodušeně se hodnota aktivity vody vypočítá jako podíl parciálního tlaku roztoku (p) a parciálního tlaku vodní páry nad čistou vodou (p_0), a to při konstantní teplotě. Výpočet lze provést i podílem počtu molů rozpouštědla (voda) a následně součtem s počtem molů roztoku (Rovnice 1),

$$a_w = \frac{p}{p_0} = \frac{n_1}{n_1 + n_2} \quad (1)$$

kde a_w je aktivita vody, p je parciální tlak vodní páry nad roztokem, p_0 je parciální tlak vodní páry nad čistou vodou při konstantní teplotě, n_1 počet molů rozpouštědla, n_2 je počet molů roztoku²⁷.

Aktivita vody je jednoduše efektivní obsah vody vyjádřený jako její molární zlomek. Z toho vyplývá, že aktivita čisté vody se rovná 1. Všechny ostatní roztoky mají hodnotu aktivity vody vždy menší než 1²⁸.

Množství vodní páry ve vzduchu se vyjadřuje jako relativní vlhkost. Relativní vlhkost je důležitým faktorem hlavně v různých průmyslových odvětvích. Vlhkost ovlivňuje odpařování, rozvoj nemocí, kvalitu potravin a chemických látek, ale i léčiv. Relativní vlhkost se udává v procentech a může být počítána i pomocí hodnoty aktivity vody a_w násobenou 100 (Rovnice 2),

$$RH = a_w \cdot 100 \quad (2)$$

kde RH je relativní vlhkost a a_w je aktivita vody²⁹.

1.2.1.1 Vliv aktivity vody na kvalitu potravin

Aktivita vody ovlivňuje kvalitu potravin v mnoha směrech. V první řadě představuje parametr, podle kterého lze předpovědět růst nežádoucích mikroorganismů. Mikroorganismy potřebují pro svůj růst a rozmnožování určitou hodnotu a_w . Většina bakterií vyžaduje pro svůj růst minimální hodnotu a_w 0,94, kvasinky rostou v prostředí s aktivitou vody do 0,87. Plísně patří mezi tolerantnější mikroorganismy, které rostou i při hodnotách 0,8 a_w . V intervalu 0,75–0,61 a_w se rozmnožují tzv. osmotolerantní druhy mikroorganismů³⁰.

Aktivita vody ovlivňuje také kinetiku chemických reakcí v potravinách, například enzymatické hydrolýzy, Maillardovy reakce nebo oxidační reakce tuků. Existují také souvislosti mezi aktivitou vody a rheologickými vlastnostmi potravin³⁰.

1.2.1.2 Metody stanovení aktivity vody

Aktivitu vody ze vzorků potravin lze změřit na základě přímého měření tlaku pomocí manometru. Vzorek o neznámé aktivitě vody se vloží do baňky a je připojen k aparatuře. Z baňky je vzorek vakuován, a poté následuje izolace vzorku zhruba po 1–2 minutách. Po izolaci zdroje podtlaku a ustavení rovnováhy po 30 až 50 minutách je zaznamenána výška rtuťového sloupce (Δh_1). Vzorek v baňce je následně ze systému vyloučen a baňka je otevřena. Vodní pára se zcela odstraní sorpcí na CaSO_4 a tlak těkavých látek a plynů z baňky po rovnováze je označen jako Δh_2 . Aktivita vody vzorku se vypočítá jako rozdíl manometrických výšek tlaků, vynásobených hustotou a tíhovým zrychlením, poděleno tenzí par čisté vody (Rovnice 3),

$$a_w = \frac{[h_1 - h_2] \cdot \rho \cdot g}{p_w^v} \quad (3)$$

kde a_w je aktivita vody, h_1 a h_2 jsou výšky sloupce Hg, ρ je hustota, g je tíhové zrychlení a p_w^v je tenze par čisté vody³¹.

Hygrometrické metody jsou nejčastěji používané metody měření relativní vlhkosti, a tedy nepřímo aktivity vody. Principem je dosažení rovnováhy mezi vzorkem a vzduchem v uzavřené nádobě, a poté se určí relativní vlhkost vlhkoměrem, což je přístroj, který je schopen měřit relativní vlhkost. Hygrometrické metody jsou založeny na měření mnoha fyzikálních veličin, jako je rosný bod, bod mrazu, roztažnost nebo elektrický odpor^{32, 33}.

Stanovení aktivity vody prostřednictvím kryoskopie, tedy stanovení bodu tuhnutí, je velmi přesné pro látky s aktivitou vody nad 0,85. Tato metoda je vhodná pouze pro látky tekuté povahy, protože se zde využívá nižších hodnot, než je pokojová teplota. Tato metoda je velmi přesná, odchylka tohoto měření se liší od skutečných hodnot pouze o $\pm 0,01 a_w$. Proto se využívá této metody pro látky s vysokou aktivitou vody také pro materiály, které jsou složeny z velkého množství těkavých látek, které by mohly způsobit chybu při stanovení pomocí měření tlaku par³⁴.

Ve dvoufázovém systému při rovnováze (led a roztok), je tlak páry vody ve formě ledu a tlak krystalů koncentrovaného roztoku totožný, a proto aktivita vody závisí pouze na teplotě a nikoli na povaze a počáteční koncentraci rozpuštěné látky. Tato skutečnost vytváří základ pro odhad aktivity vody v potravinách a lze ji vypočítat jako poměr tlaku vody ve formě ledu a tlaku vody kapalné (Rovnice 4),

$$a_w = \frac{p(\text{led})}{p(\text{kapalná voda})} \quad (4)$$

kde a_w je aktivita vody, $p(\text{led})$ je tlak ledu a $p(\text{kapalná voda})$ je tlak kapalné vody³⁴.

Stanovit aktivitu vody lze také elektrochemickou metodou. Po ustavení rovnováhy mezi obsahem vlhkosti v potravině a okolním vzduchu dochází ke změnám elektrochemických vlastností v čidle tvořené chloridem lithným. Tyto změny jsou převáděny elektronickým převodníkem na příslušnou hodnotu a_w . Nevýhodou této metody je nutnost použití standardních roztoků solí při kalibraci čidla. Toto čidlo není možné použít pro vzorky obsahující těkavé látky, které čidlo poškozují (glycerol, silice). Tohoto principu měření a_w využívají přístroje firmy NOVASINA.

1.2.2 Obsah vlhkosti a metody stanovení

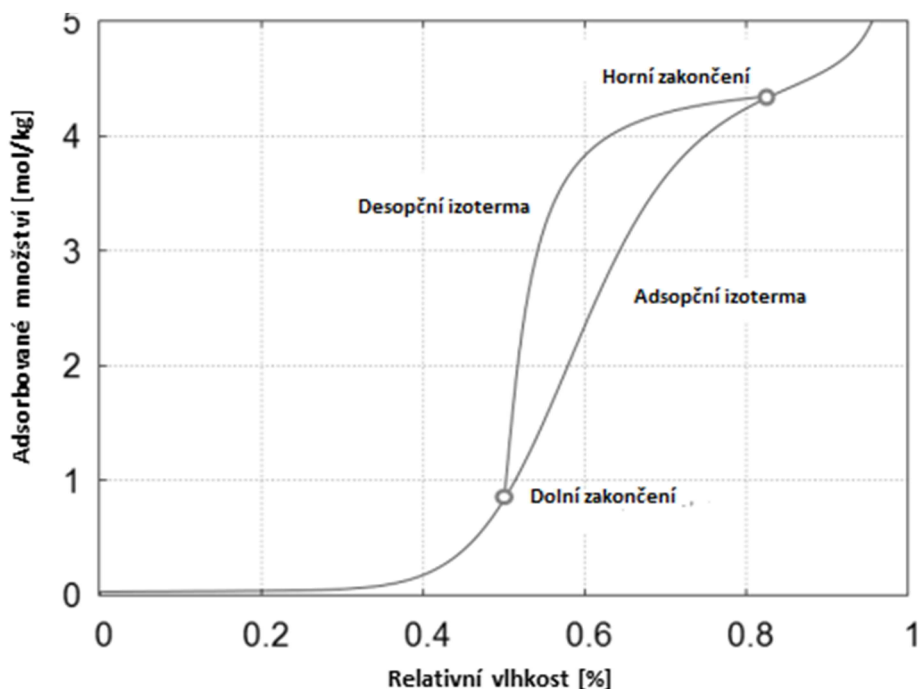
Obsahu vlhkosti patří mezi nejdůležitější parametry v potravinách ovlivňující jejich kvalitu. Obsah vlhkosti se využívá jako faktor kvality u džemů a marmelád, cukerných roztoků nebo cereálních výrobků. Je důležitý z hlediska určení stability potraviny během skladování³⁵.

Metody stanovení obsahu vlhkosti v potravinách můžeme rozdělit na fyzikální a chemické. Mezi nejčastěji používanou metodu v analýze potravin je metoda sušící.

Homogenizovaný vzorek potravin se suší při 103–105 °C do konstantní hmotnosti a obsah vlhkosti se zjišťuje diferenčně vážením. K sušení se používají sušárny s nuceným oběhem vzduchu nebo vakuové sušárny (pro vzorky tepelně nestabilní). Mezi další modifikace patří sušení mikrovlnným nebo infračerveným zářením. Mezi další fyzikální metody patří měření konduktivity, kapacitance, pyknometrické metody nebo refraktometrie. Mezi chemické metody patří titrace dle Karl–Fischera. Jedná se o reakci roztoku jódu a oxidu siřičitého v přítomnosti stopového množství vody³⁵.

1.2.3 Sorpční izotermy

Sorpční izotermy (Obrázek 2) představují vztah mezi rovnovážnou vlhkostí a aktivitou vody. Tyto izotermy rozdělujeme na adsorpční a desorpční izotermy. Pro získání adsorpční izotermy vkládáme zcela suchý materiál do prostředí s vyšší relativní vlhkostí, než kterou má daný materiál, a měří se přírůstek hmotnosti daného materiálu, který je způsoben adsorpcí vody z okolního prostředí³⁷.

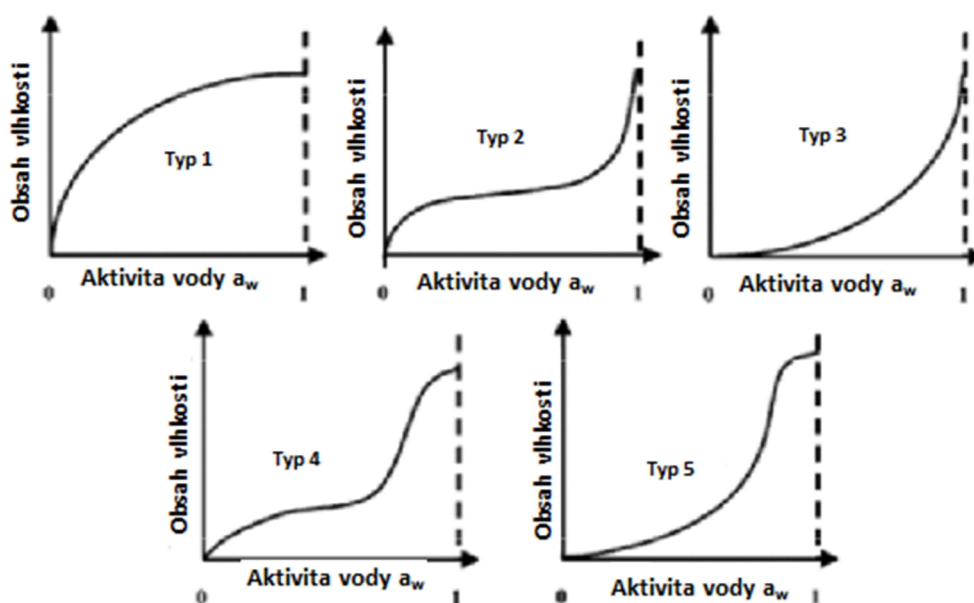


Obrázek 2 Celková sorpční izoterma a její popis (převzato z³⁷)

Co se týče desorpčních izoterem, jde o opačný případ. Získáme je vložením již vlhkého materiálu do prostředí s nižší relativní vlhkostí, než má daný materiál a měří se úbytek hmotnosti vody, který unikl z materiálu do okolního prostředí³⁷.

1.2.3.1 Typy sorpčních izoterem

Brunauer a kolektiv roku 1940 rozdělili sorpční izotermy podle jejich tvaru a probíhajících procesů na pět různých typů (Obrázek 3)³⁸.



Obrázek 3 jednotlivé typy sorpčních izoterem dle Brunauera a kolektivu (převzato z³⁸)

Typ 1 je označován jako Langmuirova izoterma, která prezentuje charakteristické zvýšení aktivity vody související s rostoucím obsahem vlhkosti³⁸.

Typ 2 je označován jako sigmoidální sorpční izoterma, v níž jsou křivky konkávní³⁸.

Typ 3 je známý jako izoterma Floryho-Hugginsova. Ta představuje rozpouštědlo nebo změkčovadlo jako je glycerol nad teplotou skelného přechodu³⁸.

Typ 4 popisuje adsorpci hydrofilních látek, dokud není dosaženo maximální hydratace³⁸.

Typ 5 je adsorpční izoterma Brunauerova-Emmettova-Tellerova. Tato izoterma byla použita pro adsorpci vodní páry na dřevěném uhlí a je spojena s izotermami typu 2 a 3. Mezi sorpční izotermy, které se nejčastěji vyskytují u potravinářských výrobků, jsou typ 2 a typ 4³⁸.

1.2.3.2 Matematický popis sorpčních izoterem

Experimentálně zjištěnou závislost obsahu vlhkosti na aktivitě vody lze popsat různými matematickými modely. Mezi nejrozšířenější model patří rovnice dle Guggenheima, Andersona a de Boera (GAB). Model je popsán rovnicí (Rovnice 5):

$$M_w = \frac{M_0 \cdot C \cdot K \cdot a_w}{(1 - K \cdot a_w) \cdot (1 - K \cdot a_w + C \cdot K \cdot a_w)} \quad (5)$$

kde M_0 je obsah vlhkosti v monomolekulární vrstvě vody, C a K jsou adsorpční konstanty, které se vztahují k jednotlivým energetickým interakcím mezi první a dalšími vrstvami vody a a_w je aktivita vody³⁹.

Tento model předpokládá, že sorpce molekul vody v monomolekulární vrstvě je homogenní, zatímco další voda je vícevrstevná. Funkce GAB je používána k popisu sorpčního chování v širokém rozsahu a_w (0 – 0,9). Bylo zjištěno, že je vhodná pro analýzu více než 50% ovoce, masa a zeleniny³⁹.

1.2.3.3 Využití sorpčních izoterem

Znalost sorpčních izoterem je cenný nástroj jak pro potravinářský průmysl, tak i pro technologii. Hlavním důvodem je skutečnost, že obsah vody je v každé potravine odlišný a hraje důležitou roli. Tyto grafické závislosti mohou být a jsou používány k odhadu možných změn ve stabilitě potravin, co se týče mikrobiální a enzymové aktivity. Dále i k určování podmínek ideálního skladování, ale také pro balení a zpracování technologickými procesy, jako je například sušení daných potravin³⁷.

Z těchto výše uvedených informací vyplývá, že každá potravina má svůj specifický obsah vody, který se od ostatních může lišit, což znamená, že každá potravina má svou specifickou sorpční izoteru³⁷.

1.2.3.4 Metody měření sorpčních izoterem

Standardní statická gravimetrická metoda patří mezi nejčastější metody měření závislosti obsahu vlhkosti na aktivitě vody (resp. relativní rovnovážné vlhkosti). Tato metoda je také známá jako metoda rovnotlaká. Při použití této metody se vzorek o známé hmotnosti uloží do hermeticky uzavřeného prostoru, kde dochází k vyrovnání s atmosférou o známé

aktivitě vody (např. roztok soli), a znovu se váží v pravidelných intervalech až do konstantní hmotnosti ⁴⁰.

Obsah vlhkosti ve vzorku je pak určen, buď přímo viz kapitola 2.4, nebo je běžně používána komora pro generování kontrolované atmosféry. Tuto komoru s danou atmosférou potom můžeme používat i několik týdnů do doby, kdy měníme sůl (Tabulka 2). Hlavní výhody této metody jsou její jednoduchost, nízké náklady, schopnost zvládnout mnoho vzorků současně a snadná provozuschopnost ⁴⁰.

Tabulka 2 Hodnoty aktivity vody a_w vybraných solí při různých teplotách (převzato z ⁴⁰)

Aktivita vody a_w							
Teplota [°C]							
Sůl	5	10	20	25	30	40	50
LiCl	0,113	0,113	0,113	0,113	0,113	0,112	0,111
CH ₃ COOK	—	0,234	0,231	0,225	0,216	—	—
MgCl ₂	0,336	0,335	0,331	0,328	0,324	0,316	0,305
K ₂ CO ₃	0,431	0,431	0,431	0,432	0,432	—	—
Mg(NO ₃) ₂	0,589	0,574	0,544	0,529	0,514	0,484	0,454
KI	0,733	0,721	0,699	0,689	0,679	0,661	0,645
NaCl	0,757	0,757	0,755	0,753	0,751	0,747	0,744
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,824	0,821	0,831	0,810	0,806	0,799	0,792
KNO ₃	0,963	0,960	0,946	0,936	0,923	0,891	0,848
K ₂ SO ₄	0,985	0,982	0,976	0,973	0,970	0,964	0,958

1.3 Analytické a fyzikální metody

V případě pekařských výrobků se kromě analytických chemických metod používají také metody, které lze použít pro kontrolu jednotnosti výrobku, jako je měření tvaru, hmotnosti a specifického objemu. V tomto experimentu bylo použito měření výšky a úbytek hmotnosti vzorků po upečení tak, jak byly použity v experimentech jiných autorů ⁴¹.

1.3.1 Měření produktů Maillardových reakcí

Maillardovou reakcí vzniká chuť a vůně během procesu tepelné úpravy, čehož se využívá v pekařském průmyslu nebo při zpracování ovoce a zeleniny (sušení). Často se také označuje jako neenzymatická reakce hnědnutí, protože probíhá bez přítomnosti enzymů. Když se potraviny zpracovávají při vysoké teplotě, dochází k chemické reakci mezi aminokyselinami a redukcujícími cukry, což vede k tvorbě produktů Maillardovy reakce (MRP). Ty tvoří látky s organoleptickými vlastnostmi a látky s tmavou barvou. V závislosti

na způsobu zpracování potravin se tvoří jak látky prospěšné, tak i toxické. Proto je třeba porozumět různým typům MRP a jejich pozitivním nebo negativním účinkům na zdraví. Měření produktů MRP je důležitým parametrem, který charakterizuje bezpečnost konkrétní technologie a přípravy nebo výroby potravinářského produktu. Kromě detekce konkrétních látek (např. akrylamid) se často používají spektrofotometrické metody, např. měření příspěvku hnědé barvy nebo úbytek vybraných aminokyselin⁴².

Mezi nenáročné metody patří měření indexu hnědnutí, kdy je měřen přírůstek hnědé barvy při vlnové délce (400–500 nm). Hnědé zbarvení souvisí s obsahem některých zdraví škodlivých látek⁴³.

Fluorescenční detekce a stanovení produktů Maillardových reakcí a rozpustného tryptofanu je metoda, která se používá k vyhodnocení poškození aminokyselin a je zároveň indikátorem tvorby produktů Maillardových reakcí⁴³.

FAST index (Fluorescence of advanced maillard products and soluble tryptophan) je založen na kvantifikaci denaturovaných proteinů, které reagují za zvýšené teploty s tryptofanem za vzniku Maillardových produktů (pyrrolové a imidazolové deriváty)⁴³.

1.3.2 Antioxidační charakteristika

K měření antioxidačních vlastností potravin se používá celá řada metod založených na dvou principech. Jedná se o měření přenosu atomu H, nebo přenosu elektronu, případně kombinace obou principů. K měření se používají syntetické a stabilní radikály nebo různé systémy, které produkují konkrétní radikály (oxidový, peroxidový)^{42,45}.

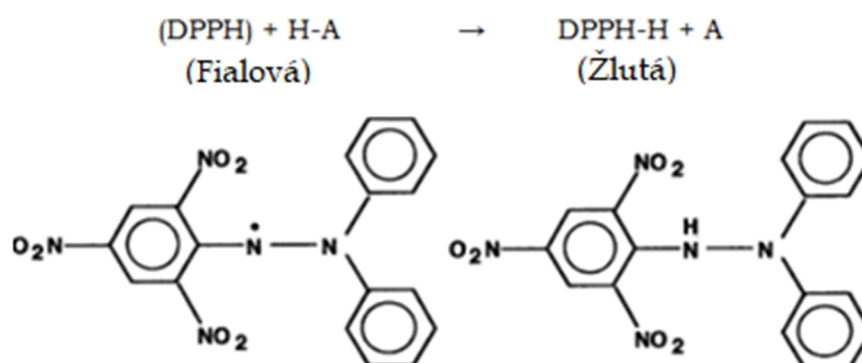
1.3.2.1 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Polyfenolické látky v rostlinných extraktech reagují se specifickými redoxními Folin-Ciocalteuovým činidlem za vzniku modrého komplexu, který lze kvantifikovat spektrofotometricky při vlnové délce 765 nm. Folin-Ciocalteuovo činidlo je směsí kyseliny fosforečnowolframové a fosforečnomolybdenové. Reakcí činidla s látkou s antioxidačním účinkem se vytváří modrý chromofor tvořený komplexem fosfowolframu a fosfomolybdenu^{44,45}.

1.3.2.2 Metoda s DPPH

Metoda DPPH je založena na redukcí stabilního volného radikálu 2,2-difenyyl-1-pikrylhydrazylu. Tento volný radikál s nepárovým elektronem poskytuje maximální absorpční při 517 nm (fialová barva). V případě přítomnosti antioxidantů dochází k reakci s tímto radikálem (Obrázek 4), kdy je stabilní volný radikál redukován na DPPH-H. Tím se snižuje jeho absorpční v porovnání s oxidovanou formou^{45,46}.

Vznik DPPH-H vede k odbarvování z fialové barvy na žlutou, což je dáno počtem zachycených elektronů. Čím je větší intenzita odbarvování do žlutého zbarvení, tím má daná látka větší redukční schopnost^{45,46}. Výsledky se obvykle vyjadřují jako ekvivalent silného antioxidantu, např. trolox, kyselina gallová aj.

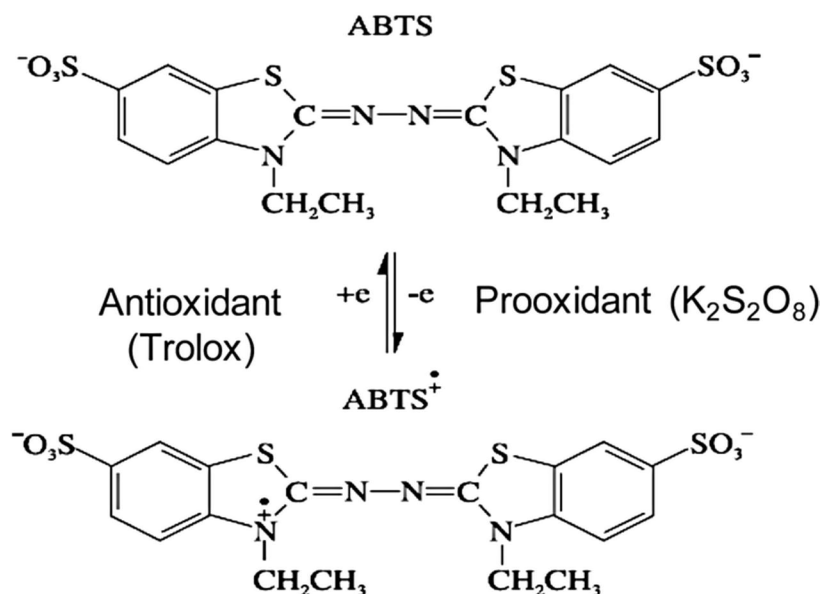


Obrázek 4 Reakce volného radikálu DPPH na DPPH-H (převzato z⁴⁶)

1.3.2.3 Metoda s ABTS

Metoda ABTS (2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonát)) umožňuje měření antioxidantní aktivity směsí látek. Test je založen na interakci mezi antioxidanty a ABTS kationt radikálem (ABTS^{•+}). Maximální hodnota absorpční je při 734 nm. ABTS test měří relativní schopnost antioxidantu zachytávat ABTS^{•+} vznikající ve vodné fázi ve srovnání se standardem troloxem⁴⁷.

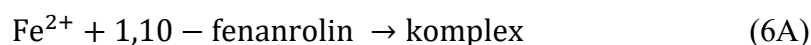
ABTS^{•+} se generuje reakcí silného oxidačního činidla (například manganistanu draselného nebo peroxodisíranu draselného) s ABTS solí. Redukcí modrozeleného ABTS^{•+} s antioxidantem, který dodává vodík, je barvený ABTS^{•+} přeměňován zpět na jeho bezbarvou neutrální formu (Obrázek 5)⁴⁷.



Obrázek 5 Princip ABTS metody (převzato z ⁴⁷)

1.3.2.4 Schopnost vychytávat peroxid vodíku

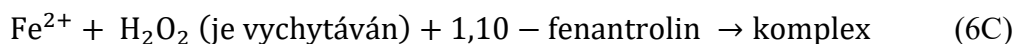
Schopnost vychytávat peroxid vodíku je test založen na reakci železného iontu Fe²⁺ s 1,10-fenantrolinem (Rovnice 6A) ⁴⁸.



Železný iont vytváří specifický červenooranžový trifenathroninový komplex, který absorbuje maximálně při 508-510 nm. Tento test byl používán po dlouhou dobu pro kvantitativní měření železa v různých vzorcích. Je známo, že pokud se do zkumavky přidá peroxid vodíku před přidáním 1,10-fenantrolinu (Rovnice 6B), potom H₂O₂ oxiduje veškerý železnatý ion na železitý, který není schopen tvořit červenohnědý komplex s 1,10-fenantrolinem ⁴⁸.



Schopnosti vychytávat peroxid vodíku je možno docílit tak, že se po přidání železnatého iontu přidá pohlcující látka a po několika minutách známé množství H₂O₂. Pokud je pohlcující látka dostatečně schopná vycytat H₂O₂ přidaný ve vzorku, nedochází ke konverzi železitého iontu na železitý, což lze detekovat přidáním 1,10-fenantrolinu, který vykazuje již zmiňovaný červenooranžový komplex (Rovnice 6C) ⁴⁸.



Naopak, jestliže tato látka není schopna vychytat H_2O_2 , potom H_2O_2 převede všechny železnaté ionty na železité, a nedochází tak k tvorbě barevného komplexu s 1,10-fenantrolinem. Z tohoto důvodu bude tvorba červenooranžového komplexu přímo úměrná vychytávací schopnosti a koncentraci absorbéru ⁴⁸.

1.3.2.5 Stanovení redukčních vlastností

Redukční látky v biochemii jsou velmi rozmanité. K dispozici jsou různé metody bioanalytické redukce, jako je například metoda redukce Fe^{3+} na železnaté ionty Fe^{2+} ⁴⁹.

Stále více stoupá zájem o výzkum úlohy antioxidantů pocházejících z rostlin v potravinách a lidském zdraví. Příznivý vliv mnoha potravin a nápojů, včetně ovoce, zeleniny, čaje, kávy a kakaa na lidské zdraví, byl nedávno uznán jako pocházející z jejich antioxidační aktivity. Za tímto účelem je nejčastěji používanou metodou stanovení redukční kapacity čistých složek potravin nebo rostlinných výtažků redukční schopnost Fe^{3+} ⁴⁹.

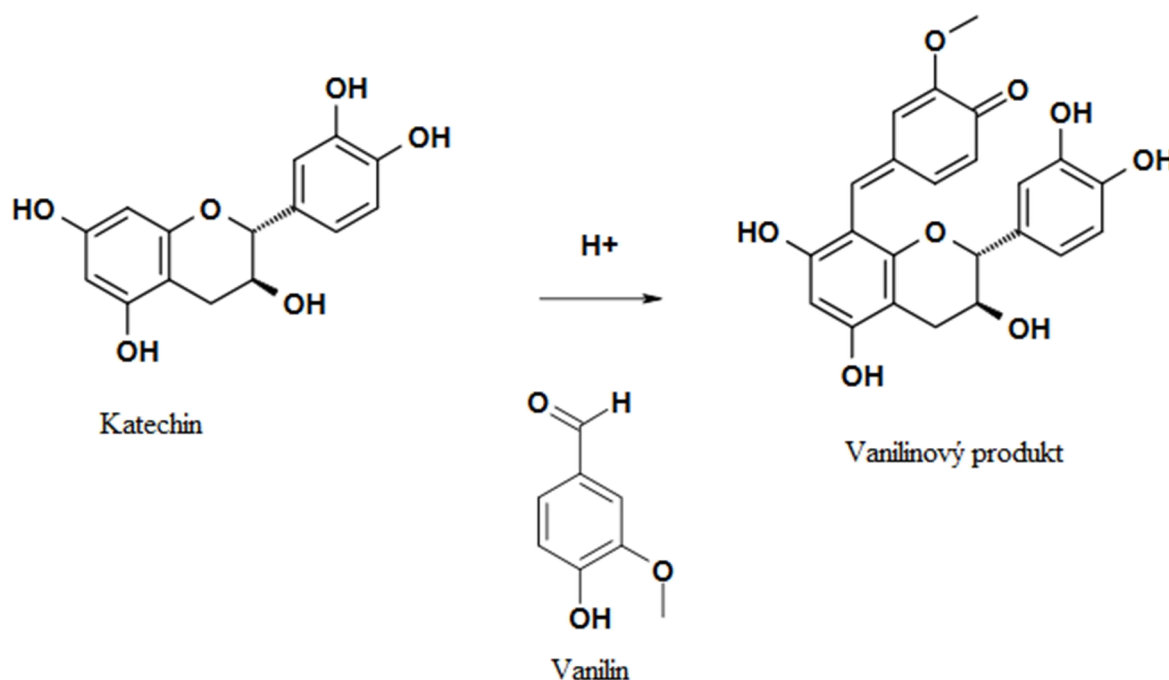
1.3.2.6 Stanovení celkového obsahu flavonoidů

Flavonoidy jsou sekundární metabolity rostlin, které hrají zásadní úlohu při produkci žlutých a jiných rostlinných pigmentů, čímž ovlivňují konečné zbarvení rostliny. Flavonoidy jsou také důležité pro lidský organismus pro své protizánětlivé, protialergické a protinádorové aktivity. Celkový obsah flavonoidů se stanovuje pomocí kolorimetrické metody s použitím chloridu hlinitého, kdy vzniká žlutý komplex a měření probíhá při vlnové délce 415 nm ⁵⁰.

1.3.2.7 Stanovení celkového obsahu katechinů

Katechiny se řadí mezi flavonoidy obsažené hojně v zeleném čaji. Mimo protinádorové aktivity mají i antiarteriosklerotické účinky. Bylo zjištěno, že působí i antivirotický. Kromě tohoto výsledky pokusů na zvířatech ukázaly, že katechiny ovlivňují metabolismus lipidů, a to snížením hladiny triglycerolů a celkového cholesterolu zvýšením jejich energetického využití ^{50,51}.

Pro změření obsahu taninů lze použít vanilinovou metodu. Tato metoda je založena na reakci vanilinu s aromatickým katechinem v silně kyselém prostředí (Obrázek 6), kdy vazbou dochází ke vzniku produktu s červeným zbarvením a jeho intenzita je měřena při vlnové délce 500 nm⁵².



Obrázek 6 Princip vanilinové reakce (převzato z⁵²)

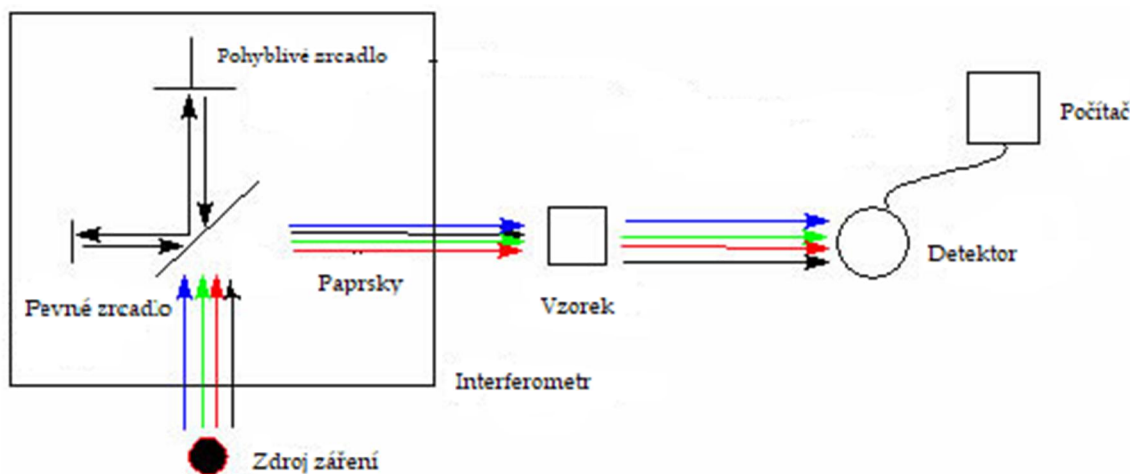
1.3.3 Spektrofotometrické metody

1.3.3.1 Infračervená spektrometrie

Infračervená spektroskopie je jistě jednou z nejdůležitějších analytických technologií, která je k dispozici dnešním vědcům. Jedna z velkých výhod infračerveného záření spektroskopie je, že prakticky jakýkoli vzorek v prakticky jakémkoli stavu může být studován. Kapaliny, roztoky, pasty, prášky, filmy, vlákna, plyny a povrchy mohou být všechny zkoumány s rozumným výběrem techniky odběru vzorků. Jako důsledek vylepšené instrumentace nyní existuje řada nových citlivých technik, které byly vyvinuty za účelem zkoumání dříve nepřekonatelných vzorků⁵³.

Infračervená spektroskopie je technika založená na vibracích atomů molekuly. Infračervené spektrum se běžně získává průchodem infračerveného záření vzorkem a stanovení podílu dopadajícího záření, které se absorbuje při určité energii⁴⁸. Nejdůležitější oblast pro infračervenou spektrometrii je 4000 – 670 cm⁻¹⁵⁴.

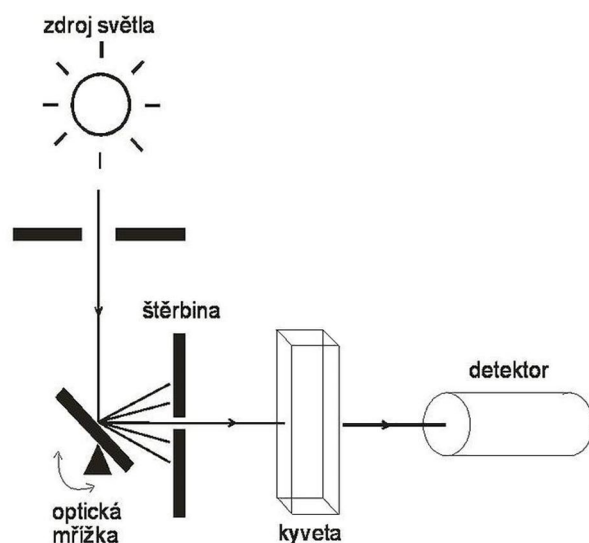
Infračervené (IR) spektrometry s Fourierovou transformací (R-FT) (Obrázek 7) byly komerčně zavedeny v roce 1970. Jejich hlavními výhodami bylo hlavně měření i stopových koncentrací látek ve vzorku (do 100 ng), měření bez destrukce vzorku a při minimální přípravě vzorku ⁵⁴.



Obrázek 7 Princip infračerveného spektrometru s Fourierovou transformací (převzato z ⁵⁴)

1.3.3.2 Spektrofotometrie ve viditelné oblasti

UV-VIS spektrofotometrie je jednou z nejčastěji používaných technik v oblasti analýzy. Zahrnuje měření množství ultrafialového nebo viditelného záření (400-700 nm) absorbovaného látkou v roztoku. Přístroj, který měří poměr nebo funkci poměru intenzity dvou paprsků světla v oblasti UV-VIS, se nazývá UV-VIS spektrofotometr (Obrázek 8).



Obrázek 8 Princip UV-VIS spektrofotometru (převzato z ⁵⁵)

Spektrofotometrická technika je jednoduchá, rychlá, středně specifická a použitelná pro malé množství sloučenin. Základní zákon, který řídí kvantitativní spektrofotometrickou analýzu je zákon Lambert-Beerův (Rovnice 7), kde se intenzita paprsku paralelního monochromatického záření exponenciálně snižuje s počtem absorbujících molekul. Jinými slovy absorbance je úměrná koncentraci ⁵⁵.

$$A = c \cdot \varepsilon \cdot d \quad (7)$$

kde A je absorbance, c je koncentrace rozpuštěné látky v roztoku, ε je molární absorpční koeficient a d je tloušťka absorbující vrstvy ⁵⁵.

1.3.3.3 Fluorescenční spektrometrie

Molekulová fluorescenční spektrofotometrie je založena na vzniku fluorescence, což je sekundární záření, které vydává látka po absorpci elektromagnetického záření. Absorpcí určitého množství záření se molekuly dostávají do excitovaného stavu, přičemž se mění i vibrační energie molekul ⁵⁶.

Každá molekula má dvě charakteristická spektra. Excitační spektrum vystihuje relativní účinnost různých vlnových délek excitujícího záření při vyvolání fluorescence, je to závislost intenzity fluorescence na vlnové délce excitujícího záření. Emisní spektrum představuje závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní vlnové délce excitujícího záření ⁵⁶.

2 Experimentální část

2.1 Přístroje a pomůcky

DATA Logger LOG 32 (DOSTMANN Electronic GmbH, Waldenbergweg, Švýcarsko)

Nožový mlýn Retsch HM 200 (Fisher Scientific, spol. s r.o., Pardubice, ČR)

Sterilizátor HS 62A (LABO-MS spol. s r. o., Praha, ČR)

Termostat TC 135 S (Lovibond® Water Testing, Německo)

Digitální analytické váhy KERN 220-4M (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)

Váhy KERN 440-33 (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)

NOVASINA AW SPRINT TH 500 (Axair s. r. o., Pffäffikon, Švýcarsko)

Spektrofotometr HELIOS γ (Thermo Fisher Scientific s. r. o., Brno, ČR)

Sušárna Heratherm AP-OMH180 (Thermo Fisher Scientific s. r. o., Brno, ČR)

Centrifuga Hettich MIKRO 220 (VERKON s.r.o., Praha, ČR)

Analyzátor vlhkosti KERN MLB50-3 (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)

Nicolet™ iS50 FTIR Spectrometr (Thermo Fisher Scientific, spol. s r.o., Waltham, Massachusetts, USA)

Posuvné měřítko (STAINLESS HARDENED s. r. o. Chicago, USA)

Exikátory

Kyvety (optická dráha 1 cm)

2.2 Použité chemikálie

Thymol, min 99,5%, chlorid hořečnatý p.a, kyselina gallová, trolox, ABTS, DPPH, methanol p. a., kvercentin, tris(hydroxymetyl)aminometan-HCl p. a. (Sigma-Aldrich, ČR)

Chlorid draselný p. a., síran draselný p. a., hydroxid sodný p. a, octan draselný p. a., dusičnan draselný p. a., HCl 35% p. a., silikagel pro exsikátory s indikátorem (Penta, Chrudim, ČR)

Chlorid sodný p. a., hexahydrát chloridu kobaltnatého p. a., hydroxid draselný p. a., kyselina boritá p. a. (Lach-ner s. r. o., Neratovice, ČR)

Bromid sodný p. a., uhličitan draselný p. a. (Erba Lachema s. r. o., Brno, ČR)

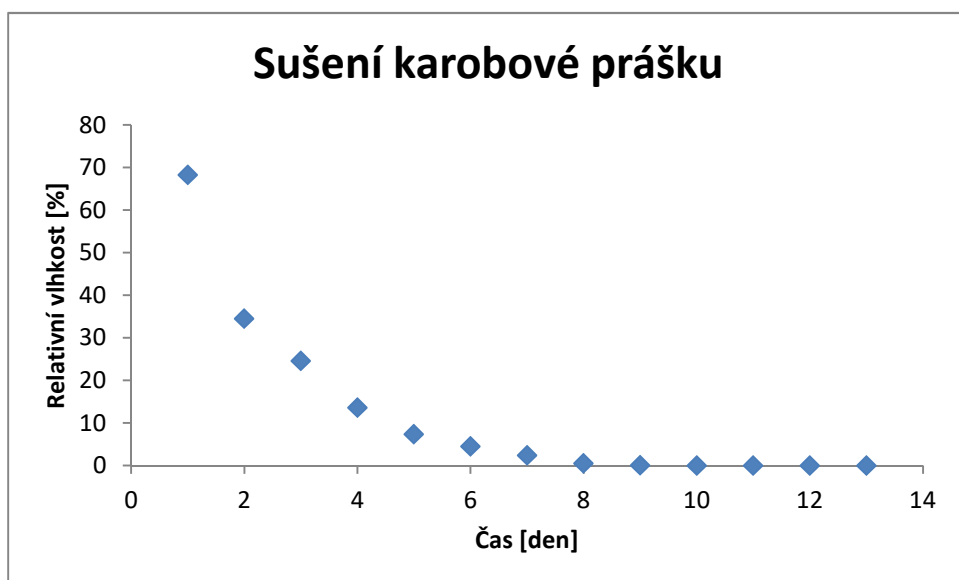
2.3 Vzorky rohovníku a jejich úprava

V této práci byly použity vzorky získané z lusků rohovníku (*Ceratonia siliqua*), které byly zakoupeny u firmy BYLINY Mikeš s. r. o.

Lusky rohovníku byly pomlety pomocí nožového mlýnku. Nejprve při 2000 rpm (3 s), 5000 rpm (3 s) a nakonec 8000 rpm (60 s). Získaný prášek byl přeset pomocí kuchyňského síta. Distribuce částic ve vzorku byla zjištěna postupným přesíváním přes analytická síta s velikostí ok 600, 20, 160 a 56 μm . Pražený vzorek byl získán pražením při teplotě 130 °C po dobu 30 min na Petriho miskách (průměr 10 cm) ve vrstvě o výšce 5,0 mm. Teplota i čas pražení byly vybrány s ohledem na získání nejvyšší antioxidační kapacity a nejnižšího obsahu produktů Maillardových reakcí. Vzorky prášku byly skladovány v polyethylenových sáčcích za laboratorní teploty v temnu.

2.4 Metoda měření adsorpčních izoterem

Pro získání adsorpčních izoterem byly vzorky karobového prášku zbaveny vlhkosti skladováním nad čerstvě vyžíhaným silikagelem při laboratorní teplotě. Vlhkost v exikátoru byla monitorována čidlem (Obrázek 9). Po 8. dni skladování byly vzorky dále zpracovány.



Obrázek 9 Vliv obsahu relativní vzdušné vlhkosti na čas při sušení karobového prášku (T=22 °C)

Adsorpční izotermy byly stanoveny pomocí statické gravimetrické metody, a to při teplotě 25 °C, kdy byl rozprostřen přibližně 1 gram vysušeného prášku do předem vysušených hliníkových misek. Soubory těchto vzorků byly poté ponechány v exikátorech nad jednotlivými roztoky solí (Tabulka 3) do konstantní hmotnosti (cca 1 měsíc).

Tabulka 3 Hodnoty aktivity vody vybraných nasycených roztoků solí při 25 °C

Sůl	a_w
KCl	0,843
K₂SO₄	0,973
NaCl	0,753
CoCl₂ · 6 H₂O	0,649
KOH	0,082
NaBr	0,576
K₂CO₃	0,432
MgCl₂	0,328
CH₃COOK	0,225

Po ustanovení rovnováhy v jednotlivých systémech byly misky se vzorky vždy zváženy a následně vysušeny v sušárně při 103°C po dobu 5 hodin. Obsah vlhkosti byl zjištěn z rozdílů hmotností před a po sušení. Výsledky byly vyjádřeny jako závislost obsahu vlhkosti na aktivitě vody.

2.5 Příprava muffinů

Muffiny byly připraveny z následujících surovin: 65 g hladké pšeničné mouky (Castello, Lidl Stiftung, Německo); 37,5 cukru krystal (Castello, Lidl Stiftung, Německo), 3 g prášku do pečiva (Dr. Oetker, Bielefeld, Německo); 0,62 g soli; 60 ml mléka (Pilos, spol. s. r.o., Louny, ČR), 20 ml řepkového oleje (Promienna, Lidl Stiftung, Německo), 1 vejce (velikost L) ⁵⁷.

Nejprve byly smíseny všechny sytké přísady a k nim následně přidány tekuté. Těsto bylo mícháno, dokud nebylo zbaveno hrudek a následně dávkováno po 30 g do papírových košíčků, které byly umístěny do formy. Z celé dávky těsta byly upečeny 4 muffiny. Sušárna byla vyhřáta na 180 °C a pečení probíhalo po dobu 20 minut. V případě karobových muffinů byla pšeničná mouka nahrazována z 5 %, 10 %, 15 % a 20 % nepraženým karobovým práškem, a následně i praženým karobovým práškem. Muffiny s vyšším přídatkem karobového prášku (25–50 %) měly neakceptovatelnou chuť (zkoušeno vedoucím práce). Po upečení vzorky muffinů chladly při laboratorní teplotě po dobu 60 minut ⁵⁷.

Následně byla u muffinů změřena výška a úbytek hmotnosti. Poté byly muffiny rozemlety na nožovém mlýnku po dobu 15 sekund při 3000 otáčkách za minutu. Z homogenizovaných vzorků muffinů byla změřena vlhkost a aktivita vody ⁵⁷.

2.6 Příprava extraktů vzorků

3-4 g karobových prášků a upečených muffinů byly naváženy do polypropylenových zkumavek a k nim bylo přidáno 20 ml roztoku metanol/voda (50:50 v/v). Zkumavky byly třepány na třepačce při laboratorní teplotě po dobu 60 minut. Poté byly zkumavky centrifugovány při 5000 rpm po dobu 10 minut. Extrakt byl odpipetován. K sedimentu bylo následně přidáno 20 ml roztoku aceton/voda (70:30 v/v) a opět bylo 60 minut třepáno, poté byl extrakt odpipetován a smíchán s metanolickým extraktem a uchován při teplotě -20 °C a použit pro stanovení chemických a analytických metod ⁵⁸.

2.7 Měření výšky a úbytku hmotnosti muffinů

Aktivita vody byla měřena na přístroji AW SPRINT TH 500 při 25 °C, kdy bylo dáno na misku pro měření aktivity vody takové množství vzorku, aby bylo zaplněno dno. Pomocí pinzety byla miska se vzorkem vložena do tohoto přístroje a po ustanovení rovnováhy (cca 45 min.) byla odečtena hodnota aktivity vody vzorku.

Obsah vlhkosti byl měřen na analyzátoru vlhkosti KERN MLB50-3. Po počáteční stabilizaci přístroje byla vložena miska se vzorkem a analyzátor byl zapnut. Sušení bylo prováděno tak dlouho, dokud během tří následujících intervalů nedošlo ke změně hmotnosti vzorku. Výsledek je uveden v % sušiny (zbytek na misce proti počáteční hmotnosti). Výška byla měřena za pomoci digitálního posuvného měřítka STAINLESS HARDENED.

2.8 Produkty Maillardových reakcí

2.8.1 Index hnědnutí

Byl připraven extrakt z cca 4 g zhomogenizovaného vzorku ve 20 ml 80 % etanolu. Extrakce probíhala 30 minut v temnu s intenzivním třepáním na třepačce. Extrakt byl poté centrifugován při 3000 rpm po dobu 10 minut (inkubační čas převzat ze studie⁵⁹). Poté byla změřena absorbance extraktu při vlnové délce 420 nm proti destilované vodě. Index hnědnutí je vyjádřen jako absorbance při vlnové délce 420 nm⁵⁹.

2.8.2 FAST index

Byl připraven extrakt z 1 g vzorku ve 40 ml 0,1 M borátového pufru (pH 8,2) v ultrazvuku po dobu 30 minut a extrakt byl následně centrifugován. Po odstranění pevných částic centrifugací po dobu 5 minut při 5000 rpm. Následně byla změřena intenzita fluorescence tryptofanu při $\lambda_{\text{ex}} = 290$ nm a $\lambda_{\text{em}} = 340$ nm, kde λ_{ex} je vlnová délka z excitačního spektra, λ_{em} je vlnová délka maximální absorbance z emisního spektra. Následně byla změřena absorbance produktů Maillardových reakcí (MPR) při $\lambda_{\text{ex}} = 353$ nm a $\lambda_{\text{em}} = 438$ nm. FAST index byl vypočítán dle Rovnice 8,

$$\text{FAST index} = \frac{A_{\text{MRP}}}{A_{\text{Trp}}} \cdot 100 \quad (8)$$

kde A_{MRP} je fluorescence produktů Maillardových reakcí a A_{TRP} je fluorescence tryptofanu ⁶⁰.

2.9 Stanovení antioxidačních vlastností vzorků

2.9.1 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Do zkumavky s víčkem byl pipetován 1 ml extraktu vzorku (viz kapitola 2.6). Dále byl přidán 1 ml 96% etanolu, 5 ml destilované vody a 0,5 ml Folin-Ciocalteuova fenolového činidla. Takto připravený roztok byl ponechán 5 minut v klidu. Po uplynutí času stání byl přidán 1 ml 5% roztoku Na_2CO_3 a zkumavky byly ponechány při laboratorní teplotě po dobu 60 minut ve tmě (po optimalizaci inkubačního času – viz příloha 1). Po této době byla změřena absorbance při 765 nm. Stejným způsobem byl proměřen i slepý pokus, kde bylo místo 1 ml extraktu přidáno 1 ml extrakčního činidla. Koncentrace fenolických látek ve vzorku byla stanovena pomocí kalibrační řady s kyselinou gallovou ⁶¹.

2.9.2 Stanovení antioxidační aktivity metodou s DPPH

Byl připraven roztok radikálu DPPH navážením 12,5 mg látky do 500 ml odměrné baňky, která byla doplněna metanolem po rysku. Do zkumavky s víčkem bylo převedeno 5 ml metanolického roztoku DPPH radikálu a bylo přidáno 500 μl extraktu vzorku (viz kapitola 2.6), nebo kalibračního roztoku troloxu o určité koncentraci. Roztok byl ponechán bez přístupu světla při laboratorní teplotě 35 minut (převzato z diplomové práce Ing. Tomáše Zapletala). Poté byl změřen úbytek absorbance (míra odbarvení roztoku) při vlnové délce 517 nm. Souběžně s každým stanovením byl proveden slepý pokus, kde místo extraktu vzorku bylo přidáno čisté extrakční činidlo. Stanovený úbytek absorbance byl přepočítán na procento inhibice roztoku (Rovnice 9) a výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalent troloxu,

$$I [\%] = \frac{A_{Sl.p.}}{A_{vzorek}} \cdot A_{Sl.p.} \cdot 100 \quad (9)$$

kde $A_{Sl.p.}$ je absorbance slepého pokusu a A_{vzorek} je absorbance vzorku ⁶².

2.9.3 Stanovení antioxidační aktivity metodou s ABTS

Byl připraven zelený roztok radikálu $ABTS^{+}$ reakcí diamoniové soli ABTS s peroxidisíranem draselným. Příprava tohoto roztoku spočívala v rozpuštění tablety ABTS (10 mg) v 5 ml destilované vody, následně bylo k roztoku přidáno 100 μ l 0,064 mol/l roztoku peroxidisíranu draselného. Tato směs reagovala při laboratorní teplotě po dobu 12-16 hodin. Po uplynutí této doby bylo odpipetováno 2,5 ml roztoku do 100 ml odměrné baňky, která byla doplněna destilovanou vodou po rysku ⁶³.

Pro stanovení byly pipetovány 3 ml roztoku $ABTS^{+}$ do zkumavky s víčkem a bylo přidáno 500 μ l extraktu vzorku (viz kapitola 2.6), nebo kalibračního roztoku troloxu o určité koncentraci. Roztok byl dále ponechán 50 minut v temnu při laboratorní teplotě (převzato z diplomové práce Bc. Tomáše Zapletala. Po uplynutí tohoto času byl sledován úbytek absorbance při vlnové délce 734 nm. Souběžně s každým stanovením byl proveden slepý pokus, kde místo extraktu bylo přidáno čistě extrakční činidlo. Stanovený úbytek absorbance byl přepočítán na procenta inhibice roztoku (viz rovnice 9 v kapitole 2.9.2) a výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalent troloxu ⁶³.

2.9.4 Stanovení celkového obsahu flavonoidů

K 0,5 ml extraktu (viz kapitola 2.6) bylo postupně pipetováno 1,5 ml 96 % etanolu, 0,1 ml 10 % $AlCl_3$, 0,1 ml 1 M octanu draselného a 2,8 ml destilované vody. Zkumavky byly ponechány 40 minut ve tmě při laboratorní teplotě (převzato z práce ⁶⁴) a po uplynutí inkubační doby byla měřena absorbance při 415 nm. Stejným způsobem byl připraven i slepý pokus. Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalent kvercetinů ⁶⁴.

2.9.5 Stanovení celkového obsahu katechinů

K 1 ml extraktu (viz kapitola 2.6) bylo přidáno 2,5 ml 4 % vanilinu v etanolu a 2,5 ml 25 % H_2SO_4 . Po 15 min. inkubaci (převzato z práce ⁶⁵) byla změřena absorbance při vlnové délce 500 nm. Současně se stanovením byl proveden i slepý pokus, kde byl nahrazen 1 ml extraktu za 1 ml extrakčního činidla. Koncentrace katechinů byla vypočítána z kalibrační řady katechinů ⁶⁵.

2.9.6 Stanovení redukčních vlastností

Reakční směs pro stanovení redukčních vlastností obsahovala 1,0 ml extraktu (viz kapitola 2.6), 2,5 ml 1% hexakyoželeznatanu draselného a 2,5 ml fosfátového pufru (0,2 M). Směs byla inkubována při 50 °C po dobu 30 minut (převzato z práce ⁶⁶). Probíhající reakce byla ukončena přidáním 2,5 ml 10 % trichloroctové kyseliny. Následovala centrifugace reakční směsi při 3000 rpm po dobu 10 minut. Z horní vrstvy bylo odebráno 2,5 ml roztoku a bylo smícháno s 2,5 ml deionizované vody a 0,5 ml 0,1% chloridu železitého. Absorbance byla měřena při vlnové délce 700 nm ⁶⁶.

2.9.7 Stanovení schopnosti vychytávat peroxid vodíku

Do zkumavky bylo pipetováno 0,25 ml 1 mM síranu železnatého amonného spolu s 62,5 ul peroxidu vodíku o koncentraci 5 mM a 500 ul extraktu (viz kapitola 2.6). Následovala inkubace při laboratorní teplotě ve tmě po dobu 5 minut. Po inkubaci bylo do zkumavky přidáno 1,5 ml 1 mM 1,10-fenantrolinu, po přidání následovala další inkubace po dobu 10 minut opět při laboratorní teplotě (převzato z práce ⁶⁸). Nakonec byla změřena absorbance při 510 nm. Slepý pokus obsahoval pouze síran železnatý amonný (0,25 ml, 1 mM), destilovanou vodu (1,562 ml) a 1,10-fenantrolin (1,5 ml, 1 mM). Výsledek se vyjadřuje jako % vychytávací schopnosti peroxidu vodíku (Rovnice 10),

$$\% \text{ vychytávací schopnosti} = \frac{A_{Sl.p.}}{A_{Vzorek}} \cdot 100 \quad (10)$$

kde $A_{Sl.p.}$ je absorbance slepého pokusu a A_{Vzorek} je absorbance vzorku ⁶⁷.

2.10 Zpracování dat

Diplomová práce byla vytvořena v textovém editoru Microsoft Office Word 2010. Naměřené hodnoty ze všech analytických metod byly zpracovány s použitím programu Microsoft Office Excel 2010. V rámci experimentu byla vždy provedena extrakce dvou navážek, každá byla měřena dvakrát (N = 4). Výsledky jsou vyjádřeny, jako aritmetický průměr ± standardní odchylka Pro zjištění statistické významnosti mezi naměřenými hodnotami bylo použito párové porovnání s využitím Tukeyho metody na hladině pravděpodobnosti $p = 0,05$ v programu OriginPro v. 8.5.0 (OriginLab Corp., MA).

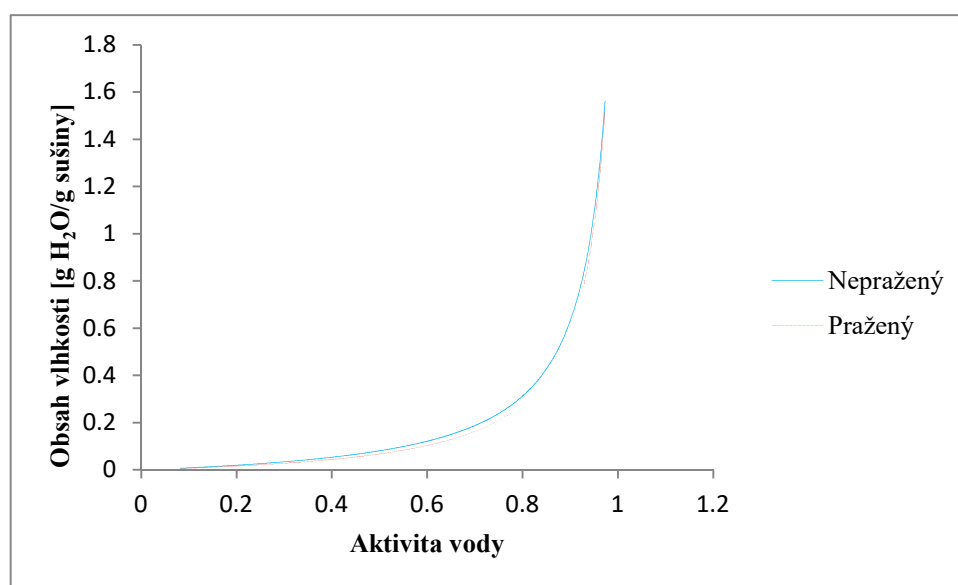
3 Výsledky a diskuze

3.1 Vlastnosti nepraženého a praženého karobového prášku

Pomletím lusků rohovníku podle postupu (viz kapitola 2.3) byl získán prášek, který byl následně separován pomocí analytických sít. Bylo zjištěno, že nejvyšší podíl 54,4 % tvořily částice o velikosti 250-600 μm , dále následovaly částice o velikosti 56-160 μm (19,5 %), 160-250 μm (10,7 %). Nejmenší podíl tvořily částice menší než 56 μm a větší než 600 μm (zastoupení 6,5 %).

3.1.1 Adsorpční izoterma

Závislost aktivity vody a g vody/g sušiny je znázorněna na obrázku 10, kdy byla použita naměřená data při teplotě 25 °C. Závislost byla sestrojena pomocí GAB rovnice (Rovnice 5) s využitím nelineární regrese.



Obrázek 10 Rovnice sorpční izotermy pro nepražený a pražený karobový prášek (teplota měření T= 25 °C)

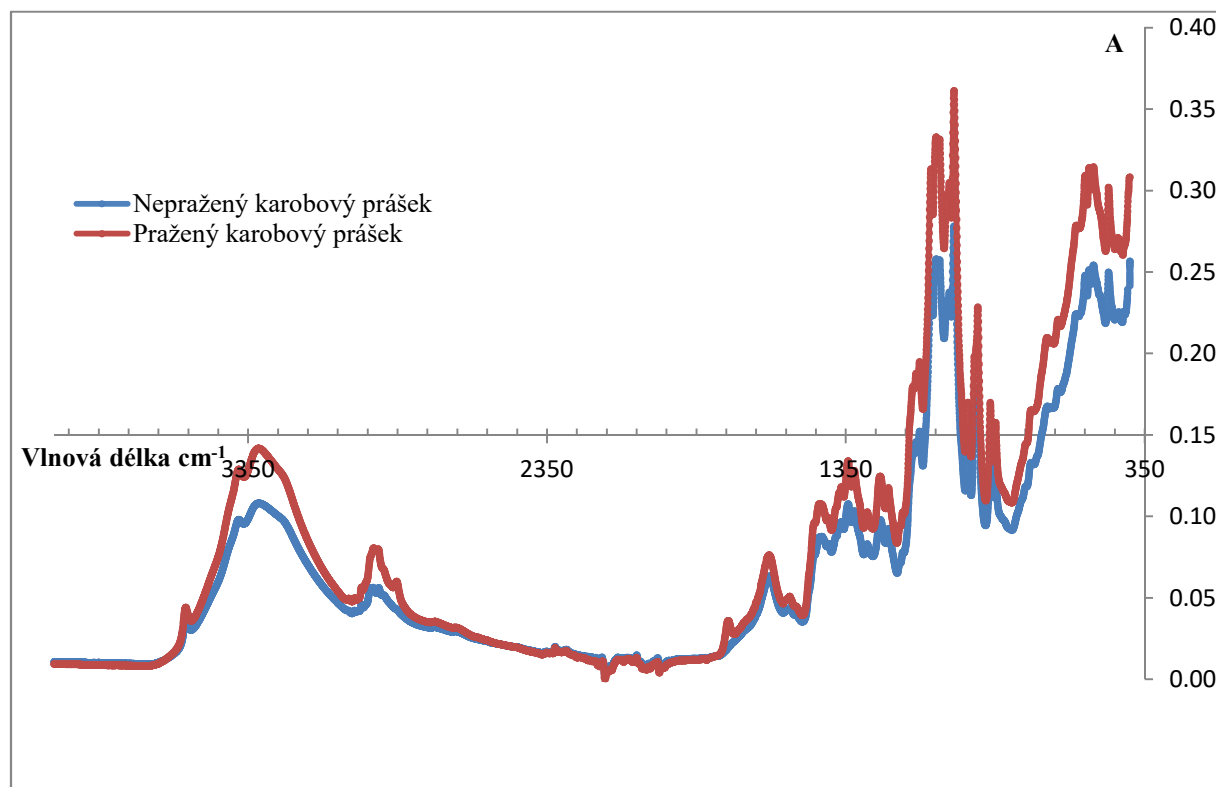
Z dané závislosti je patrné, že hodnoty obsahu vlhkosti u nepraženého a praženého karobového prášku jsou na stejné úrovni v rozmezí aktivity vody od 0 do 0,5. Od této hodnoty má již nepražený karobový prášek vyšší zastoupení obsahu vlhkosti při konkrétní hodnotě aktivity vody (v intervalu 0,5–0,97 a_w). Důvodem je právě pražení, kdy dochází ke ztrátě

funkčních skupin, a proto se voda nedokáže tolik vázat na pražený karobový prášek v porovnání s nepraženým⁶⁸.

Z této závislosti tedy pro praktické použití vyplývá, že z hlediska trvanlivosti je výhodnější pražený karobový prášek a i pečivo z něj připravené by mohlo mít menší schopnost sorpce vody.

3.1.2 Infračervená spektrometrie vzorků karobového prášku

Vzorky pro analýzu infračervenou spektrometrií byly sušeny 48 hodin, kdy vlhkost byla snímána pomocí čidla a během sušení se pohybovala v rozmezí 21-26 % a teplota byla 20 °C.



Obrázek 11 Spektra nepraženého a praženého karobového prášku získaná infračervenou spektrometrií

Dle obrázku 11 je patrné, že spektra nepraženého a praženého karobového prášku v rozmezí vlnové délky 350-1350 cm⁻¹ mají spektrum téměř totožné. Jedná se o vibrace skupin C=O, které se vyskytují v mastných kyselinách a CH skupin v esterech. Vlnová délka 1346 cm⁻¹ značí vibrace CH₃ skupin, které jsou součástí lipidů a proteinů. Rozpětí vlnových

délek 1404-1430 cm^{-1} představují vibrace CH skupin v alkenech a hodnota 1435 cm^{-1} představuje vlnovou délku, při které dochází k vibracím CH_2 skupin, které se vyskytují v lipidech a proteinech ⁶⁹.

U praženého karobového prášku je u vlnové délky 1550 cm^{-1} malý pík, který se u spektra nepraženého karobového prášku nevyskytuje. S největší pravděpodobností se jedná o NH a CN skupiny, které se pražením karobového prášku uvolňují. Vlnové délky v rozmezí od 1628-1650 cm^{-1} představují vibrace vazeb C=O a C=C v proteinech. V hodnotě vlnové délky 2850 cm^{-1} je malý pík, který je pouze pro nepražený karobový prášek a mohl by představovat vibrace CH_3 skupin. 2927–2935 cm^{-1} je rozmezí vlnových délek, které představuje vibrace CH_2 skupin, a ty nalzáme v lipidech, v menším zastoupení v proteinech a nukleových kyselinách. Vlnové délky 3336 -3386 cm^{-1} představují v karobovém prášku vibrace OH a NH skupiny vyskytující se v polysacharidech a proteinech ^{69, 70}.

3.1.3 Vliv pražení na obsah produktů Maillardových reakcí

Výsledky všech stanovovaných metod jsou zaznamenány v tabulce 3. K analýze byly použity extrakty nepraženého a praženého karobového prášku viz kapitola 2.6.

Tabulka 3 Výsledky stanovovaných metod nepraženého a praženého karobového prášku (průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka, N = 4)

Metoda	Karobový prášek nepražený	Karobový prášek pražený
Index hnědnutí [A]	^a 0,8 \pm 0,0	^b 3,0 \pm 0,0
FAST index [A]	Pod mezí detekce	Pod mezí detekce
Stanovení celkových fenolických látek [mg kyseliny gallové/ml extraktu]	^a 3,0 \pm 0,2	^b 15,0 \pm 0,2
DPPH metoda [mg troloxu/ml extraktu]	^a 0,8 \pm 0,0	^b 1,1 \pm 0,0
ABTS metoda [mg troloxu/ml extraktu]	^a 18,7 \pm 0,4	^b 12,8 \pm 0,6
Stanovení flavonoidů [mg kvercentinu/ml extraktu]	^a 1,2 \pm 0,0	^b 2,3 \pm 0,1
Stanovení katechinů [mg katechinu/ml extraktu]	^a 4,2 \pm 0,0	^b 14,2 \pm 1,5
Stanovení redukčních vlastností [A]	^a 1,0 \pm 0,0	^b 0,8 \pm 0,0
Schopnost vychytávat peroxid vodíku [%]	^a 48,6 \pm 0,14	^b 34,8 \pm 0,09

Rozdílná malá písmena v horním levém indexu indikují statisticky významný rozdíl v řádku ($p < 0,05$).

3.1.3.1 Index hnědnutí

Index hnědnutí je založen na měření absorpance vznikajících produktů Maillardových reakcí, tedy látky hnědého zbarvení. Tyto produkty vznikají zejména při vaření nebo pečení chemickou reakcí mezi aminokyselinami a redukujícími cukry.

Je patrné (tabulka 3), že vyšší index hnědnutí má jednoznačně pražený karobový prášek, což logicky vyplývá z jeho předchozí úpravy pražením (130 °C, 30 min.).

3.1.3.2 FAST index

FAST index je založen na kvantifikaci denaturace proteinů za použití fluorescence Maillardových produktů, jako jsou pyrrolové a imidazolové deriváty, při excitaci/emisi 330/420 nm; a fluorescenci tryptofanu při excitaci/emisi 290/340 nm. Měřením bylo zjištěno, že pražení nemá vliv na toto stanovení, protože hodnota změřeného FAST indexu u samotného nepraženého a praženého karobového prášku byla pod mezí detekce.

Toto zjištění je v rozporu s výsledky Michalska a kol., kde zjistili významný nárůst produktů Maillardových reakcí při pražení karobového prášku. V našem se případě se pravděpodobně jednalo o neefektivní extrakci látek do pufru. Na základě dostupné literatury a vyššího indexu hnědnutí můžeme očekávat i vyšší obsah produktů Maillardových reakcí v analyzovaných vzorcích⁷¹.

3.1.4 Antioxidační charakteristika

3.1.4.1 Vliv pražení na stanovení celkových fenolických látek

Stanovení je založeno na reakci se specifickým redoxním Folin-Ciocalteuovým činidlem za vzniku modrého komplexu, který lze kvantifikovat spektrofotometricky při vlnové délce 765 nm. Výsledné koncentrace byly vypočteny z kalibrační závislosti s kyselinou gallovou (viz příloha 2).

Pražený karobový prášek obsahuje vyšší koncentraci fenolických látek, která činí 15,0±0,2 mg kyseliny gallové/ml extraktu, zatímco koncentrace celkových fenolických látek je u nepraženého karobového prášku nižší, a to 3,0±0,2 mg kyseliny gallové/ml extraktu (viz tabulka 3). Tímto stanovením bylo zjištěno, že pražením se zvyšuje obsah fenolických látek.

3.1.4.2 Vliv pražení na antioxidační účinky metody s DPPH radikálem

Metoda s DPPH je založena na redukcí stabilního volného radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu při 517 nm. V případě přítomnosti antioxidantů dochází k reakci s tímto radikálem za vzniku DPPH-H, což vede k odbarvování z fialové barvy na žlutou. Hodnoty antioxidační kapacity DPPH metody byly zjištěny pomocí kalibrační závislosti s troloxem (viz příloha 3).

Vyšší antioxidační kapacita DPPH je patrná u praženého karobového prášku, která je $2,7 \pm 0,0$ mg troloxu/ml extraktu. U nepraženého karobového prášku je nižší, a to $2,0 \pm 0,0$ mg troloxu/ml extraktu (viz tabulka 3). Pražení tedy přispívá ke zvýšení antioxidační kapacity karobu.

3.1.4.3 Vliv pražení na antioxidační účinky metody s ABTS radikálem

Metoda s ABTS radikálem je založena na interakci mezi antioxidanty a ABTS radikálním kationtem při 734 nm, kdy je redukcí modře zbarvený ABTS radikálový kation přeměňován zpět na jeho bezbarvou neutrální formu. Hodnoty ABTS metody jsou stejně jako u metody s DPPH vyjádřeny ekvivalentem troloxem (viz příloha 4).

Vyšší antioxidační kapacitu má nepražený karobový prášek, tedy $18,7 \pm 0,4$ mg troloxu/ml extraktu. Hodnota u praženého karobového prášku je $12,8 \pm 0,6$ mg troloxu/ml extraktu (viz tabulka 3). V případě ABTS metody pražení nepodporuje růst antioxidační kapacity tak, jako tomu je u DPPH metody.

3.1.4.4 Vliv pražení na stanovení obsahu celkových flavonoidů

Celkový obsah flavonoidů se stanovuje pomocí kolorimetrické metody s použitím chloridu hlinitého, kdy vzniká žlutý komplex a měření probíhá při vlnové délce 415 nm. Hodnoty byly stanoveny na základě kalibrační přímky kvercentinu (viz příloha 5).

Ze zjištěných hodnot z tabulky 3 vyplývá, že extrakt z praženého karobového prášku má vyšší koncentraci flavonoidů ($2,3 \pm 0,1$ mg kvercentinu/ml extraktu) než nepražený karobový prášek ($1,2 \pm 0,0$ mg kvercentinu/ml extraktu), a tedy pražením tedy dochází k uvolňování flavonoidů (viz tabulka 3).

3.1.4.5 Vliv pražení na stanovení celkových katechinů

Stanovit koncentraci katechinů lze vanilinovou metodou, která je založena na reakci vanilinu s aromatickým katechinem, kdy vazbou dochází ke vzniku červeného zbarvení a jeho intenzita je měřena při vlnové délce 500 nm. Hodnoty koncentrací byly zjištěny pomocí kalibrační závislosti kvercentinu (viz příloha 6).

Dle tabulky 3 je jasně patrné, že pražením dochází k výraznému růstu koncentrace katechinů ve srovnání s nepraženým karobovým práškem. Koncentrace katechinů u praženého karobového prášku je $14,2 \pm 1,5$ mg katechinu/ml extraktu, zatímco u nepraženého karobového prášku je to pouhých $4,2 \pm 0,0$ mg katechinu/ml extraktu.

Dle autorů Ayaz a kol. byla odhalena skutečnost, že zastoupení katechinů v karobovém prášku se odvíjí od geologické oblasti růstu. Studií prokázané výsledky katechinů byly v rozmezí od 300 μg až 7 mg. Pražením dochází k uvolňování vázaných katechinů, a což má za následek zvýšení i celkového obsah katechinů ve vzorcích, stejně jako je tomu u stanovení celkových flavonoidů, kde dochází ke stejné situaci⁷².

3.1.4.6 Vliv pražení na redukční vlastnosti

Redukční vlastnosti byly měřeny pomocí hexykyanoželeznatanu draselného a chloridu železitého. Absorbance výsledného produktu byla měřena při vlnové délce 700 nm.

Redukční vlastnosti nepraženého karobového prášku, $1,0 \pm 0,0$ A je vyšší než u nepraženého karobového prášku, která je $0,8 \pm 0,0$ A (viz tabulka 3). Karobový prášek pražením tedy v tomto případě redukční vlastnosti ztrácí.

3.1.4.7 Vliv pražení na schopnost vychytávat peroxid vodíku

Stanovení schopnosti vychytávat peroxid vodíku je test založen na reakci železného iontu Fe^{2+} s 1,10-fenantrolinem. Železný iont vytváří specifický červenooranžový trifenathroninový komplex, který absorbuje maximálně při 500 nm.

U nepraženého karobového prášku je schopnost vychytávat peroxid vodíku $48,6 \pm 0,14$ %, což je vyšší hodnota, než u praženého, která je $4,8 \pm 0,09$ % (viz tabulka 3), z čehož vyplývá, že pražením dochází ke snižování schopnosti vychytávat peroxid vodíku.

3.2 Vlastnosti hotových muffinů s přidavkem karobového prášku

Hodnoty obsahu vlhkosti, aktivity vody, úbytku hmotnosti a výšky muffinů s přidavkem nepraženého a praženého karobového prášku jsou zaznamenány v tabulce 4 a 5.

Tabulka 4 Výsledky stanovovaných fyzikálních metod u muffinů s přidavky nepraženého karobového prášku (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, N=4)

Nepražený				
Přídavek karobového prášku	Úbytek m [g]	Výška muffiny [mm]	Aktivita vody [±]	Vlhkost [%]
0%	5,7±0,2 ^A	35,7±0,1 ^A	0,905 ^A	30,2±0,8 ^A
5%	5,7±0,2 ^A	33,8±0,1 ^{AB}	0,914 ^B	31,5±0,5 ^B
10%	5,0±0,2 ^B	32,3±0,2 ^{BC}	0,923 ^C	32,4±0,2 ^B
15%	5,5±0,2 ^A	32,2±0,2 ^{BC}	0,908 ^A	29,8±0,2 ^A
20%	5,6±0,2 ^A	30,4±0,2 ^C	0,912 ^B	31,3±0,4 ^{AB}

Rozdílná velká písmena v horním pravém indexu indikují statisticky významný rozdíl ve sloupci ($p < 0,05$), standardní odchylka $< 0,01 a_w$.

Tabulka 5 Výsledky stanovovaných fyzikálních metod u muffinů z praženého karobového prášku (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, N=4)

Pražený				
Přídavek karobového prášku	Úbytek m [g]	Výška muffiny [mm]	Aktivita vody [±]	Vlhkost [%]
5%	5,5±0,2 ^A	32,8±0,1 ^A	0,919 ^A	30,1±0,2 ^{AB}
10%	5,3±0,2 ^A	31,8±0,1 ^A	0,913 ^B	29,8±0,1 ^B
15%	5,4±0,2 ^A	33,0±0,2 ^A	0,910 ^C	29,8±0,1 ^{AB}
20%	5,4±0,2 ^A	31,7±0,1 ^A	0,911 ^{BC}	29,3±0,3 ^A

Rozdílná velká písmena v horním pravém indexu indikují statisticky významný rozdíl ve sloupci ($p < 0,05$), standardní odchylka $< 0,01 a_w$.

Úbytek hmotnosti byl zjištěn odečtením hmotnosti před a po pečení. Z výše vedených dat je patrné, že pražení nemá žádný vliv na úbytek hmotnosti muffinu a je srovnatelný i s muffinem pšeničným (0 %), kde byl zaznamenán úbytek hmotnosti 5,7±0,2 g.

Podobný závěr byl zaznamenán i u měření výšky muffinu posuvným měřítkem, kde taktéž nebyl patrný žádný vliv přidavku karobového prášku, nepraženého i praženého. Výška muffinů se pohybovala kolem hodnoty 32±0,1 mm, a to i u muffinu pšeničného.

Co se týče hodnot aktivity vody měřené na přístroji firmy NOVASINA, zde už byly zaznamenány drobné rozdíly. Při porovnání muffinů s 5% přídavkem nepraženého a praženého karobového prášku byla naměřena vyšší aktivita vody, 0,919, kdežto u muffinu s přídavkem nepraženého karobového byla naměřená aktivita vody 0,914. Tento malý rozdíl byl stejně tak zaznamenán u muffinů s přídavky 10% a 15% karobového prášku, ale u přídavku 10% karobového prášku byla aktivita vody vyšší u nepražené verze, zatímco aktivita vody s přídavkem 15% karobového prášku byla vyšší u verze pražené. U 20% přídavku karobového prášku byly hodnoty aktivity vody srovnatelné. U pšeničného muffinu byla zaznamenána nejnižší aktivita vody 0,905. I když byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi hodnotami aktivity vody pro muffiny se stejným přídavkem karobového prášku (praženého a nepraženého), nebyl zjištěn žádný významný trend. Adsorpční schopnosti praženého karobového prášku byly sice nižší (viz. kapitola 3.1.1), nicméně tento efekt neměl výrazný vliv na aktivitu vody muffinů. Stejně tak nebyl prokázán vliv rostoucího přídavku karobového prášku na měřené parametry.

Posledním fyzikálním parametrem, který byl měřen, je vlhkost na analyzátoru vlhkosti od společnosti KERN. Rozdíly byly patrné u přídavků 5%, 10% a 20%, kdy vyšší obsah vlhkosti byl zaznamenán u muffinů s přídavkem praženého karobového prášku. U muffinů s přídavky 15% karobových prášků byly hodnoty srovnatelné. I když byly prokázány statisticky významné rozdíly v obsahu vlhkosti u testovaných vzorků při použití párového porovnání, z praktického hlediska lze tyto rozdíly považovat za nepodstatné (rozdíl max. 2% obsahu vlhkosti).

3.2.1 Index hnědnutí

Z tabulky 6 vyplývá, že hodnoty indexu hnědnutí jsou pro muffiny s přidavky nepraženého a praženého karobového prášku rozdílné, a to téměř dvojnásobně. Dále je mezi naměřenými hodnotami patrná i vzrůstající tendence se zvyšováním podílu karobového prášku, tedy nejnižší hodnota byla zaznamenána u pšeničného muffinu (0%), $0,12 \pm 0,01$ A, kde nebyl žádný přírůstek karobového prášku.

Tabulka 6 Hodnoty indexu hnědnutí (A při $\lambda=420$ nm) pro muffiny s přidavkem nepraženého a praženého karobového prášku (průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka, N=4)

Přídavek karobového prášku	Nepražený	Pražený
0%		$0,12 \pm 0,01^A$
5%	$0,16 \pm 0,01^B$	$0,20 \pm 0,00^A$
10%	$0,16 \pm 0,00^B$	$0,28 \pm 0,00^B$
15%	nestanoveno	$0,34 \pm 0,00^C$
20%	$0,26 \pm 0,00^C$	$0,48 \pm 0,00^D$

Rozdílná velká písmena v horním pravém indexu indikují statisticky významný rozdíl ve sloupci, ($p < 0,05$).

Se vzrůstajícím zastoupením nepraženého karobového prášku je vidět i vzrůstající přírůstek indexu hnědnutí od nejnižší hodnoty muffiny s 5% přidavkem nepraženého karobového prášku, která je $0,16$ A, až po nejvyšší hodnotu u muffinu s 20% přidavkem nepraženého karobového prášku, a to $0,26$ A. U 15% přidavku nepraženého karobového prášku nebyl index hnědnutí stanoven, nebyl bohužel nalezen. U muffinů s přidavky praženého karobového prášku jsou hodnoty indexu hnědnutí ještě vyšší, od $0,20 \pm 0,0$ A pro 5% přírůstek až po 20% přírůstek s indexem hnědnutí $0,48 \pm 0,0$ A. Ze zjištěných hodnot vyplývá, že pečením muffinů z již praženého karobového prášku vzniká větší množství produktů Maillardových reakcí než pouze pečením prášku nepraženého.

Index hnědnutí byl také významně ovlivněn fermentací kukuřičné a pohankové mouky. Bylo zjištěno, že muffiny připravené z fermentovaných mouk obsahovaly po upečení více produktů Maillardových reakcí měřených jako index hnědnutí ⁷³.

3.2.2 FAST index

Nejnižší hodnota FAST indexu byla naměřena u pšeničného muffinu (0%), a to $7,8 \pm 0,3$ A. Hodnoty FAST indexu se u dalších muffinů s obsahem karobového prášku zvyšovaly, když hodnota samotného karobového prášku byla pod mezí detekce (Tabulka 7).

Tabulka 7 Hodnoty FAST indexu pro muffiny s přidavkem nepraženého a praženého karobového prášku (průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka, N=4)

Přídavek karobového prášku	Nepražený	Pražený
0%		$7,8 \pm 0,3^A$
5%	$9,3 \pm 1,3^A$	$9,5 \pm 2,1^A$
10%	$9,0 \pm 0,2^A$	$13,4 \pm 1,6^A$
15%	$10,6 \pm 1,6^A$	$23,9 \pm 3,2^B$
20%	$14,7 \pm 2,4^B$	$39,2 \pm 5,3^C$

Rozdílná velká písmena v horním pravém indexu indikují statisticky významný rozdíl ve sloupci ($p < 0,05$).

Nejnižší hodnota FAST indexu byla naměřena u pšeničného muffinu (0%), a to $7,8 \pm 0,3$ A. S dalšími přidavky nepraženého karobového prášku došlo ke zvyšování hodnoty FAST indexu, když hodnota samotného nepraženého karobového prášku byla nulová. Pro muffin s přidavkem 5% nepraženého karobového prášku byla hodnota $9,3 \pm 1,3$ A, což je hodnota srovnatelná s hodnotou změřenou i u muffinu s 5% přidavkem karobového prášku praženého. U zbylých muffinů se vzrůstajícím přidavkem nepraženého karobového prášku je hodnota úměrně zvyšována. U muffinů s přidavkem praženého karobového prášku vzrůstá více, u 20% přidavku až na hodnotu $39,2 \pm 5,3$ A.

3.2.3 Antioxidační charakteristika

3.2.3.1 Stanovení obsahu celkových fenolických látek

Jednotlivé koncentrace stanovených fenolických látek upečených muffinů jsou uspořádány v tabulce 8.

Tabulka 8 Hodnoty celkových fenolických látek pro muffiny s přísadkou nepraženého a praženého karobového prášku (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, N=4)

Přídavek karobového prášku	Nepražený	Pražený
0%		10,1±0,7 ^A
5%	17,9±0,4 ^B	70,6±0,2 ^A
10%	22,1±0,2 ^C	72,9±1,7 ^B
15%	35,3±0,1 ^D	75,8±0,3 ^C
20%	42,8±0,5 ^E	76,1±0,2 ^C

Rozdílná velká písmena v horním pravém indexu indikují statisticky významný rozdíl ve sloupci ($p < 0,05$).

Nejnižší stanovená hodnota celkových fenolických látek byla stanovena v pšeničném muffinu (0%), která byla 10,1±0,7 µg kyseliny gallové/ml extraktu. S přísadkou karobového prášku se postupně zvyšovala koncentrace celkových fenolických látek. U muffinu s 5% přísadkou nepraženého karobového prášku byla koncentrace 17,9±0,4 µg kyseliny gallové/ml extraktu. Koncentrace u přísadku 20% vystoupala na 42,8±0,5 µg kyseliny gallové/ml extraktu. Pražením dochází k uvolňování většího množství fenolických látek, a proto koncentrace u muffinu s přísadkou 5% praženého karobového prášku byla 70,6±0,2 µg kyseliny gallové/ml extraktu, a předčila tak koncentraci výše zmiňovaného muffinu s 20% přísadkou nepraženého karobového prášku. Nejvyšší koncentrace byla změřena u muffinu s 20% přísadkou praženého karobového prášku.

Dle autorů Seczyk a kol. byla pšeničná mouka v těstovinách nahrazována nepraženým karobovým práškem a následně měřen obsah celkových fenolických látek. Závěrem této práce bylo zjištění, že přísadky nepraženého karobového prášku zvyšují obsah celkových fenolických látek v těstovinách. Důvodem, proč dochází ke zvyšování obsahu celkových fenolických látek je tepelná úprava (vaření, pražení), kdy vlivem působení kyslíku, vody, a vyšší teploty dochází k uvolňování některých citlivých fenolických antioxidantů ⁷⁴.

3.2.3.2 Vliv pražení na antioxidační účinky metody s DPPH radikálem

Z tabulky 9 vyplývá, že muffin vyrobený pouze s pšeničné mouky (0%) nevykazoval žádný měřitelný obsah fenolických látek. Přídavkem karobového prášku docházelo postupně ke zvyšování obsahu celkových fenolických látek.

Tabulka 9 Hodnoty stanovení metody s DPPH pro muffiny s přídavky nepraženého a praženého karobového prášku (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, N=4)

Přídavek karobového prášku	Nepražený	Pražený
0%	Pod mezí detekce ^A	
5%	10,8±0,3 ^B	11,9±0,4 ^A
10%	18,2±0,4 ^C	16,6±4,2 ^A
15%	57,9±1,2 ^D	22,7±0,0 ^B
20%	62,8±3,4 ^E	45,1±0,2 ^C

Rozdílná velká písmena v horním pravém indexu indikují statisticky významný rozdíl ve sloupci ($p < 0,05$).

Nejnižší naměřenou koncentraci měl muffin s 5% přídavkem nepraženého karobového prášku, $10,8 \pm 0,3$ μg troloxu/ml extraktu, ale hned za ním s nemálo vyšší koncentrací 5% muffin připravený z praženého karobového prášku. Koncentrace se opět postupně navyšovala. U muffinů s přídavky nepraženého karobového prášku až k hodnotě $62,8 \pm 3,4$ μg troloxu/ml extraktu. V případě muffinu s 10% přídavkem praženého karobového prášku byla hodnota celkových fenolických látek téměř totožná i pro muffin s 10% přídavkem nepraženého karobového prášku. Ale u muffinů s 15% a 20% přídavkem praženého karobového prášku byly hodnoty antioxidační kapacity nižší než u muffinů s přídavky nepraženého karobového prášku. Pražení tedy spíše nepřispívá ke zvýšení antioxidační kapacity.

3.2.4 Vliv pražení na antioxidační účinky metody s ABTS radikálem

Hodnoty antioxidační kapacity stanovené metodou s ABTS jsou v tabulce 10. Nejnižší koncentrace byla stanovena opět u pšeničného muffinu (0%), $10,4 \pm 0,2$ μg troloxu/ml extraktu.

Tabulka 10 Hodnoty stanovení metody s ABTS pro muffiny s přidavky nepraženého a praženého karobového prášku (průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka, N=4)

Přídavek karobového prášku	Nepražený	Pražený
0%		$10,4 \pm 0,2^A$
5%	$53,9 \pm 3,0^B$	$24,1 \pm 0,8^A$
10%	$85,3 \pm 0,9^C$	$38,7 \pm 1,1^B$
15%	$165,2 \pm 0,3^D$	$156,8 \pm 6,3^C$
20%	$186,0 \pm 1,1^E$	$248,4 \pm 2,2^D$

Rozdílná velká písmena v horním pravém indexu indikují statisticky významný rozdíl ve sloupci ($p < 0,05$).

U ostatních muffinů se antioxidační kapacita zvyšovala. U 5% a 10% přidavků nepraženého karobového prášku byla antioxidační kapacita vyšší než u přidavků pražených se stejným podílem karobového prášku, naopak u 15% a 20% přidavků je již koncentrace vyšší u pražených. Ze zjištěných hodnot plyne skutečnost, že antioxidační kapacita se zvyšuje s přidáním množstvím karobového prášku.

Dle autorů Valadez-Carmona a kol. bylo zjištěno, že antioxidační kapacita stanovená metodou s ABTS se tepelnou úpravou zvyšuje, stejně jako v našem případě. Důvodem je právě tepelná úprava, kdy se zvyšující teplotou dochází k uvolňování vázaných fenolických látek a flavonoidů, což způsobuje zvýšení antioxidační kapacity⁷⁵.

3.2.5 Vliv pražení na stanovení celkového obsahu flavonoidů

Nejnižší obsah celkových flavonoidů byl stanoven u pšeničného muffinu (0%), $1,9 \pm 0,4$ μg kvercentinu/ml extraktu (tabulka 11).

Tabulka 11 Hodnoty stanovení celkových flavonoidů pro muffiny s přidavky nepraženého a praženého karobového prášku (průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka, N=4)

Přídavek karobového prášku	Nepražený	Pražený
0%		$1,9 \pm 0,4^A$
5%	$4,2 \pm 0,1^B$	$7,0 \pm 0,0^A$
10%	$3,7 \pm 0,4^{BC}$	$8,1 \pm 0,1^B$
15%	$3,1 \pm 0,9^{ABC}$	$8,7 \pm 0,1^C$
20%	$2,6 \pm 0,2^{ACD}$	$11,5 \pm 0,1^D$

Rozdílná velká písmena v horním pravém indexu indikují statisticky významný rozdíl ve sloupci ($p < 0,05$).

Překvapivě nejvyšší koncentrace byla naměřena u muffinu s 5% přidavkem nepraženého karobového prášku. Se zvyšujícími se přidavky nepraženého karobového prášku se koncentrace snižovala, až na $2,6 \pm 0,2$ μg kvercentinu/ml extraktu, která byla stanovena u muffinu s 20% přidavkem nepraženého karobového prášku. Naopak u muffinů s přidavky praženého karobového prášku byla koncentrace u muffinu s 5% přidavkem $7,0 \pm 0,0$ μg kvercentinu/ml extraktu a zvyšovala se až na $11,5 \pm 0,1$ μg kvercentinu/ml extraktu u muffinu s 20% přidavkem.

3.2.6 Vliv pražení na stanovení celkových katechinů

Z hodnot v tabulce 12 je patrné, že pšeničný muffin (0%) a všechny muffiny s přídavkem nepraženého karobového prášku neobsahují žádné katechiny.

Tabulka 12 Hodnoty stanovení celkových katechinů pro muffiny s přídavky nepraženého a praženého karobového prášku (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, N=4)

Přídavek karobového prášku	Nepražený	Pražený
0%	Pod mezí detekce ^A	
5%	Pod mezí detekce ^A	3,9±0,0 ^A
10%	Pod mezí detekce ^A	5,9±0,9 ^B
15%	Pod mezí detekce ^A	6,6±0,2 ^B
20%	Pod mezí detekce ^A	^b 9,3±0,3 ^C

Rozdílná velká písmena v horním pravém indexu indikují statisticky významný rozdíl ve sloupci ($p < 0,05$).

Pražením ale dochází k jejich uvolňování, tedy koncentrace celkových katechinů u muffinu s 5% přídavkem praženého karobového prášku je 3,9±0,0 µg katechinu/ml extraktu. Zvyšováním podílu praženého karobového prášku dochází ke zvyšování obsahu celkových katechinů. U muffinu s 10% přídavkem je to 5,9±0,9 µg katechinu/ml extraktu, u muffinu s 15% přídavkem, 6,6±0,2 µg katechinu/ml extraktu, a největší obsažené množství celkových katechinů je u muffinu s 20% přídavkem praženého karobového prášku 9,3±0,3 µg katechinu/ml extraktu.

3.2.7 Vliv pražení na stanovení redukčních schopností

Nejnižší hodnota redukčních vlastností byla naměřena u pšeničného muffinu (0%), 0,3±0,0 A.

Tabulka 13 Hodnoty stanovení redukční schopnosti pro muffiny s přídavky nepraženého a praženého karobového prášku (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, N=4)

Přídavek karobového prášku	Nepražený	Pražený
0%	0,3±0,0 ^A	
5%	0,4±0,0 ^B	3,9±0,0 ^A
10%	0,5±0,0 ^B	5,9±0,9 ^B
15%	0,8±0,0 ^C	6,6±0,2 ^C
20%	0,9±0,0 ^D	9,3±0,3 ^D

Rozdílná velká písmena v horním pravém indexu indikují statisticky významný rozdíl ve sloupci ($p < 0,05$).

S postupným přidáváním karobového prášku se hodnoty redukčních vlastností zvyšovaly. U muffinu s 5% přídavkem nepraženého karobového prášku byla hodnota redukčních vlastností $0,4 \pm 0,0$ A, u 10% přídavku $0,5 \pm 0,0$ A, u 15% přídavku $0,8 \pm 0,0$ A a u 20% přídavku $0,9 \pm 0,0$ A. Pražením ale došlo k razantnímu nárůstu redukčních vlastností, kdy byla naměřena hodnota u muffinu s 5% přídavkem $3,9 \pm 0,0$ A, a postupně se zvyšovala až na $9,3 \pm 0,3$ A u muffinu s 20% přídavkem praženého karobového prášku.

Dle autorů Rózylo a kol., kde pozorovali změny redukčních schopností pšeničného chleba po přidavcích karobového prášku zjistili, že s vyšším množstvím karobových přídavků došlo ke zvýšení redukčních vlastností vzorků chleba, což odpovídá i výsledkům naší práce ⁷⁶.

3.2.8 Vliv pražení na stanovení schopnosti vychytávat peroxid vodíku

Dle naměřených hodnot v tabulce 14 je patrné, že nejnižší schopnost vychytávat peroxid vodíku má pšeničný muffin (0%), $5,5 \pm 0,4$ A.

Tabulka 14 Hodnoty stanovení schopnosti vychytávat peroxid vodíku pro muffiny s přídavkem nepraženého a praženého karobového prášku (průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka, N=4)

Přídavky karobového prášku	Nepražený	Pražený
0%	$5,5 \pm 0,4^A$	
5%	$19,8 \pm 0,3^B$	$74,1 \pm 0,2^A$
10%	$30,6 \pm 0,2^C$	$71,0 \pm 0,6^B$
15%	$45,8 \pm 0,2^D$	$65,3 \pm 0,3^C$
20%	$74,6 \pm 0,2^E$	$43,5 \pm 0,1^D$

Rozdílná velká písmena v horním pravém indexu indikují statisticky významný rozdíl ve sloupci ($p < 0,05$).

U muffinů s přídavkem nepraženého karobového prášku se tato schopnost postupně zvyšovala, u 5% přídavku byla hodnota $19,8 \pm 0,3$ a zvýšila se až na $74,6 \pm 0,2$ u muffinu s přídavkem 20%. U muffinů s přídavkem praženého karobového prášku byla hodnota u muffinu s 5% přídavkem přibližně stejná jako u muffinu s přídavkem 20% nepraženého karobového prášku. Postupně však docházelo k poklesu, kdy muffin s přídavkem 20% praženého karobového prášku měl hodnotu schopnosti vychytávat peroxid vodíku $43,5 \pm 0,1$ A. Znamená to tedy, že malý přídavek praženého karobového prášku zvýšil schopnost pečiva vychytávat peroxid vodíku. Naopak větší přídavek praženého karobového prášku tuto schopnost snižuje, což může být úbytkem funkčních skupin pražením.

4 Závěr

V experimentální části byla stanovena adsorpční izoterma nepraženého a praženého karobového prášku. Bylo zjištěno, že pražený karobový prášek má nižší sorpční schopnosti v intervalu hodnot 0,5–0,97 a_w (viz obrázek 10). Dále byly připraveny muffiny z pšeničné mouky a postupně i muffiny s přísávkou 5%, 10%, 15% a 20% nepraženého a praženého karobového prášku. U všech připravených muffinů byly stanoveny fyzikální parametry jako výška, úbytek hmotnosti, vlhkost, aktivita vody. Porovnáním parametrů muffinů s přísávkou nepraženého a praženého karobového prášku nebyl zjištěn žádný významný statistický rozdíl. Z karobových prášků a homogenizovaných muffinů byly připraveny extrakty, které byly podrobeny analýze.

Z připravených extraktů byl stanoven index hnědnutí a FAST index, kde byl zjištěn přírůstek produktů Maillardových reakcí, které vznikly pražením karobového prášku. Dalšími metodami, které byly u vzorků stanoveny je obsah celkových fenolických látek, flavonoidů a taninů. Porovnáním zjištěných hodnot u muffinů s přísávkou nepraženého a praženého karobového prášku byl zjištěn nárůst u pražené formy, stejně jako v případě měřených indexů. Pražením tedy dochází k uvolňování těchto v rohovníku obsažených látek. Pro měření antioxidační kapacity byla použita metoda s DPPH a ABTS radikálem. U DPPH metody pražením došlo ke snížení antioxidační kapacity, zřejmě kvůli degradaci produktů vyvolané pražením, na rozdíl od metody s použitím ABTS radikálu, kde pražení přispělo ke zvýšení antioxidační kapacity. U vzorků byla také stanovena redukční schopnost, která se pražením snížila a schopnost vychytávat peroxid vodíku, která se naopak pražením zvýšila. U nepraženého a karobového prášku byla ještě provedena analýza infračervenou spektrometrií, kdy se získaná spektra obou karobových prášků téměř nelišila.

Na závěr vyvstává otázka, zda používat spíše nepražený nebo pražený karobový prášek. I přes zvýšení téměř většiny hodnot u stanovených metod se přikláním k nepražené formě. Podle mého názoru právě pražením ztrácí karobový prášek pro mě nejdůležitější vlastnost a to chuť a vůni. Chuť muffinů připravovaných z nepraženého karobového prášku byla jemně kakaová a při pečení těchto muffinů se laboratoří linula příjemná vůně pečiva, zatímco muffiny s přísávkou praženého karobového prášku již vykazovaly zemitou chuť, která s přísávkou ještě gradovala, a navíc během pečení nedošlo k uvolnění vůně tak jako u muffinů s přísávkou nepraženého karobového prášku.

5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. **DAVIDIAN, G. E., L. GÜLTEKIN a B. A KOROTYAEV.** A new subgenus of the weevil genus *otiorhynchus* germar, 1822 (Coleoptera: Curculionidae: Entiminae) for a new species from mediterranean Turkey associated with the carob tree, *Ceratonia siliqua* L. *Journal of Insect Biodiversity*. 2017, **5**(4), 1-14.
2. **AMBRUS, R., W. GROSSER a J. HRBEK.** Contribution to the knowledge of longhorn beetles from Cyprus (Coleoptera: Cerambycidae). *Humanity space International almanac*. 2014, **3**(2), 173-190.
3. **NASAR-ABBAS, S. M., Z. E-HUMA, T. H. VU, M. K. KHAN, H. ESBENSHADE a V. JAYASENA.** Carob kibble. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2016, **15**(1), 63-72.
4. **LANGER, J.** *Rohovník obecný (Karob)* [online]. [cit. 2018-04-21]. Dostupné z: <https://www.receptyonline.cz/data/pics/encyklopedie-ovoce-exoticke/rohovnik-obecny-karob.jpg>
5. **ATTOKARAN, Mathew.** *Natural food flavors and colorants*. 2011. Hoboken, N.J: Wiley, 2011.
6. **DLILALI, B., H. AHMED, B. ZOUAOUI, S. FATIMA a O. Y. KARIMA.** Kinetic of batch production of lactic acid from carob pods syrup. *Banat's Journal of Biotechnology*. 2017, **8**(15), 57-65.
7. **DAR, R. A., P. K. BRAHMAN, N. KHURANA, J. A. WAGAY, Z. A. LONE, M. A. GANAIE a K. S. PITRE.** Evaluation of antioxidant activity of crocin, podophyllotoxin and kaempferol by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017, **10**(1), 1119-1128.
8. **ATAMER, A., Y. ATAMER a A. S. CAN.** Response to: Serum paraoxonase and malondialdehyde levels in asymptomatic cholelithiasis. *The Saudi of Journal of Gastroenterology*. 2016, **22**(1), 84-85.
9. **SHARMA, N., M. K. VERMA, D. K. GUPTA, N. K. SATTI a R. K. KHAJURIA.** Isolation and quantification of pinitol in *Argyrolobium roseum* plant, by ¹H-NMR. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2016, **20**(1), 81-87.

10. **ZHENG, K., Z. ZHAO, N. LIN, Y. WU, Y. XU a W. ZHANG.** Protective effect of pinitol against inflammatory mediators of rheumatoid arthritis via Inhibition of protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 (PTPN22). *Medical Science Monitor.* 2017, **23**(1), 1923-1932.
11. **PANDEY, K. B. a S. I. RIZVI.** Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2009, **2**(5), 270-278.
12. **GOULAS, V., E. STYLOS, M. CHATZIATHANASIADOU, T. MAVROMOUSTAKOS a A. TZAKOS.** Functional components of carob fruit. *International Journal of Molecular Sciences.* 2016, **17**(11), 1875-1895
13. **KAMAL, M., E. YOUSSEF, M. M. EL-MANFALOTY a H. M. ALI.** Assessment of proximate chemical composition, nutritional status, fatty acid composition and phenolic compounds of carob (*Ceratonia Siliqua L.*). *Food and Public Health.* 2013, **3**(6), 304-308.
14. **TANGNEY, C. C. a H. E. RASMUSSEN.** Polyphenols, inflammation, and cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Reports.* 2013, **15**(5), 324-340.
15. **MAITI, S., P. DEY, A. BANIK, B. SA, S. RAY a S. KAITY.** Tailoring of locust bean gum and development of hydrogel beads for controlled oral delivery of glipizide. *Drug Delivery.* 2010, **17**(5), 288-300.
16. **DURAZZO, A., V. TURFANI, V. NARDUCCI, E. AZZINI, G. MAIANI a M. CARCEA.** Nutritional characterisation and bioactive components of commercial carobs flours. *Food Chemistry.* 2014, **153**(1), 109-113.
17. **BARAK, S. a D. MUDGIL.** Locust bean gum. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2014, **66**(1), 74-80.
18. **MIYAZAWA, R., T. TOMOMASA, H. KANEKO, H. ARAKAWA a A. MORIKAWA.** Effect of formula thickened with reduced concentration of locust bean gum on gastroesophageal reflux. *Acta Paediatrica.* 2007, **96**(6), 910-914.
19. **PANGHAL, D.** Dissolution improvement of atorvastatin calcium using modified locust bean Gum by the solid dispersion technique. *Scientia Pharmaceutica.* 2014, **82**(1), 177-192.

20. **MILANI, J.** a **G. MELEKI.** *Food Industrial Processesy: Hydrocolloids in Food Industry.* 1th ed. Rijeka, Croatia: InTech, 2012, 18-38. ISBN: 978-953-307-905-9.
21. **FIHRI, A. F., N. S. AL-WAILI, R. EL-HASKOURY, M. BAKOUR, A. AMARTI, M. J. ANSARI** a **B. LYOUSSI.** Protective effect of Morocco carob honey against lead-induced anemia and hepato-renal toxicity. *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2016, **39**(1), 115-122.
22. **SÁNCHEZ - SEGADO, S., D. DE JUAN GARCÍA, L. J. LOZANO,, C. GODÍNEZ, A. PÉREZ DE LOS RÍOS** a **F. J. HERNÁNDEZ - FERNÁND.** Fuel ethanol production from carob. *Chemical Engineering Transactions* [online]. 2010, **21**(1), 1255-1260.
23. **EL HASKOURY, R., S. ZIZI, S. TOUZANI, N. AL WAILI, A. ALGHAMDI** a **B. LYOUSSI.** Diuretic activity of carob honey. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines.* 2015, **12**(4), 128-133.
24. **AWWAD, A. M., N. M. SALEM** a **A. O. ABDEEN.** Green synthesis of silver nanoparticles using carob leaf extract and its antibacterial activity. *International Journal of Industrial Chemistry.* 2013, **4**(1), 29-35
25. **RODRIGUES, B., J. M. PEINADO, S. RAPOSO, A. CONSTANTINO, C. QUINTAS** a **M. E. LIMA-COSTA.** Kinetic and energetic parameters of carob wastes fermentation by *Saccharomyces cerevisiae.* *Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2015, **25**(6), 837-844.
26. **RAO, K. Y.** Physico-chemical and bacterial evaluation of public and packaged drinking water in Vikarabad, Telangana, India - potential public health implications. *Journal of Clinical and Diagnostic research.* 2016, **10**(5), LC01–LC07.
27. **GRANT, W. D.** Life at low water activity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 2004, **359**(1448), 1249-1267.
28. **CHEN, J.** a **C. CHEN.** Uncertainty analysis in humidity measurements by the psychrometer method. *Sensors.* 2017, **17**(2), 368-387.
29. **BLAHOVEC J, S. YANNIOTIS.** Modified classification of sorption isotherms. *J. FOOD ENG.* 2009; 91 (1): 72-77.

30. **CHRISTIAN, J.H.B.** *Water Activity: Influences on Food Quality: Specific solute effects on microbial water relations*. Osaka, Japan: Elsevier, 1981, 825-854. ISBN 978-0-12-591350-8.
31. **DALGIÇ, A. C., H. PEKMEZ a K. B. BELIBAĞLI.** Effect of drying methods on the moisture sorption isotherms and thermodynamic properties of mint leaves. *Journal of Food Science and Technology*. 2012, **49**(4), 439-449.
32. **ALIAKBARIAN, B., A. A. CASAZZA a P. PEREGO.** Kinetic and isotherm modelling of the adsorption of phenolic compounds from olive mill wastewater onto activated carbon. *Food Technology and Biotechnology*. 2015, **53**(2), 207-214.
33. **MOYO, F., R. TANDLICH, B. WILHELMI a S. BALAZ.** Sorption of hydrophobic organic compounds on natural sorbents and organoclays from aqueous and non-aqueous solutions. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2014, **11**(5), 5020-5048..
34. **TICHY, H., W. KALLINA a W. GRONENBERG.** The evaporative function of cockroach hygrosensors. *PloS One*. 2013, **8**(1), e53998-e53998.
35. **BRADLEY, R. L.** *Food analysis: Moisture and Total Solids Analysis*. 3th ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.85-104. ISBN: 0-306-47495-6
36. **ETH ZÜRICH, The group.** Capillary condensation and hysteresis in gas phase adsorption. *Separation Processes Laboratory* [online]. 2018 [cit. 2018-04-21]. Dostupné z: <http://www.spl.ethz.ch/research/fundamentals/hysteresis.html>
37. **ANDRADE, R. D., R. LEMUS a C. E. PÉREZ.** Models of sorption isotherms for food: Uses and limitations. *Vitae*. 2011, **3**, 325-334.
38. **RODRIGUEZ-SANDOVAL, E., I. PRASCA-SIERRA a V. HERNANDEZ.** Effect of modified cassava starch as a fat replacer on the texture and quality characteristics of muffins. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2017, **11**(4), 1630-1639.
39. **MULLA, M. Z., U. S. ANNAPURE, V. R. BHARADWAJ a R. S. SINGHAL.** A Study on the kinetics of acrylamide formation in banana chips. *Journal of Food Processing and Preservation* [online]. 2017, **41**(1), e12793.

40. **CABALLERO, B.** *Encyklopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2th ed. Amsterdam, Academic press, 2003. ISBN: 9780080917917
41. **BEEGUM, S., M. SHARMA, M. R. MANIKANTAN a R. K. GUPTA.** Effect of virgin coconut oil cake on physical, textural, microbial and sensory attributes of muffins. *Food Science and Technology*. 2017, **52**(2), 540-549.
42. **APAK, Reşat, M ÖZYÜREK, K GÜÇLÜ a E ÇAPANOĞLU.** Antioxidant activity/capacity measurement, hydrogen atom transfer (HAT)-based, mixed-mode (electron transfer (ET)/HAT), and lipid peroxidation assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016, **64**(5), 1028-1045.
43. **TAMANNA, N a N. MAHMOOD.** Food processing and Maillard reaction products. *International Journal of Food Science*. 2015, **2015**(1), 1-6.
44. **BLAINSKI, A., G. C. LOPES a J. C. DE MELLO.** Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*. 2013, **18**(6), 6852-6855.
45. **PRAVEEN KUMAR, P., S. KUMARAVEL a C. LALITH.** Screening of antioxidant activity, total phenolics and GC-MS study of *Vitex negundo*. *African Journal of Biochemistry Research*. 2010, **4**(7), 191-195.
46. **PYRZYNSKA, K. a A. PEKAL.** Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical Methods*. 2013, **5**(17), 4288-4295.
47. **KONAN, K. V., C. LE TIEN a M. A. MATEESCU.** Electrolysis induced fast activation of the ABTS re agent for antioxidant capacity assay. *Analytical Methods* [online]. 2016, **8**(28), 5638-5644.
48. **BOLIGON, A. A.** Technical evaluation of antioxidant activity. *Medicinal Chemistry* [online]. 2014, **4**(7), 517-522.
49. **JAYANTHI, P. a P. LALITHA.** Reducing power of the solvent extracts of *eichcornia crassipes*. *International Journal of Pharma cy and Pharmaceutical Sciences*. 2011, **3**(3), 126-128.

50. **REBAYA, A., S. I. BELGHITH, B. BAGHDIKIAN, V. M. LEDDET, F. MABROUKI, E. OLIVIER, J. K. CHERIF a M. T. AYA.** Total phenolic, total flavonoid, tannin content, and antioxidant capacity of *Halimium Halimifolium* (*Cistaceae*). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2014, **5**(1), 52-57.
51. **MAKKAR, H. P. S. a B. SINGH.** Effect of drying conditions on tannin, fibre and lignin levels in mature oak (*Quercus incana*) leaves. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2009, **54**(3), 323-328.
52. **HAGERMAN, A. E.** *Vanillin Assay* [online]. 1-4 [cit. 2018-04-20]. Dostupné z: <https://www.users.miamioh.edu/hagermae/Vanillin%20Assay.pdf>
53. **STUART, B.** *Infrared spectroscopy*. 2 th ed. Hoboken, NJ: J. Wiley, 2004.
54. **BEHERA, S.** UV-Visible spectrophotometric method development and validation of assay of paracetamol tablet formulation. *Journal of Analytical & Bioanalytical Technique*. 2012, **3**(6), 3-6.
55. **VEJRAŽKA, M.** *Spektrofotometr* [online]. [cit. 2018-04-21]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Spektrofotometrie#/media/File:Spektrofotometr.jpg>
56. **BERERA, R., R. VAN GRONDELLE a J.T. M. KENNIS.** Ultrafast transient absorption spectroscopy. *Photosynthesis Research*. 2009, **101**(2-3), 105-118.
57. **AMBIGAIPALAN, P. a F. SHAHIDI.** Date seed flour and hydrolysates affect physicochemical properties of muffin. *Food Bioscience*. 2015, **12**(1), 54-60.
58. **DURAZZO, A., V. TURFANI, E. AZZINI, G. MAIANI a M. CARCEA.** Phenols, lignans and antioxidant properties of legume and sweet chestnut flours. *Food Chemistry*. 2013, **140**(4), 666-671.
59. **KRISHNAN, J. G., G. PADMAJA, S. N. MOORTHY, G. SUJA a M. S. SAJEEV.** Effect of pre-soaking treatments on the nutritional profile and browning index of sweet potato and yam flours. *Innovative Food and Emerging Technologies*. 2010, **11**(2), 387-393.
60. **BIRLOUEZ-ARAGON, I., J. LECLERE, C. L. QUEDRAOGO, E. BIRLOUEZ a J. F. GRONGNET.** The FAST method, a rapid approach of the nutritional quality of heat-treated foods. *Nahrung*. 2001, **45**(3), 201-205.

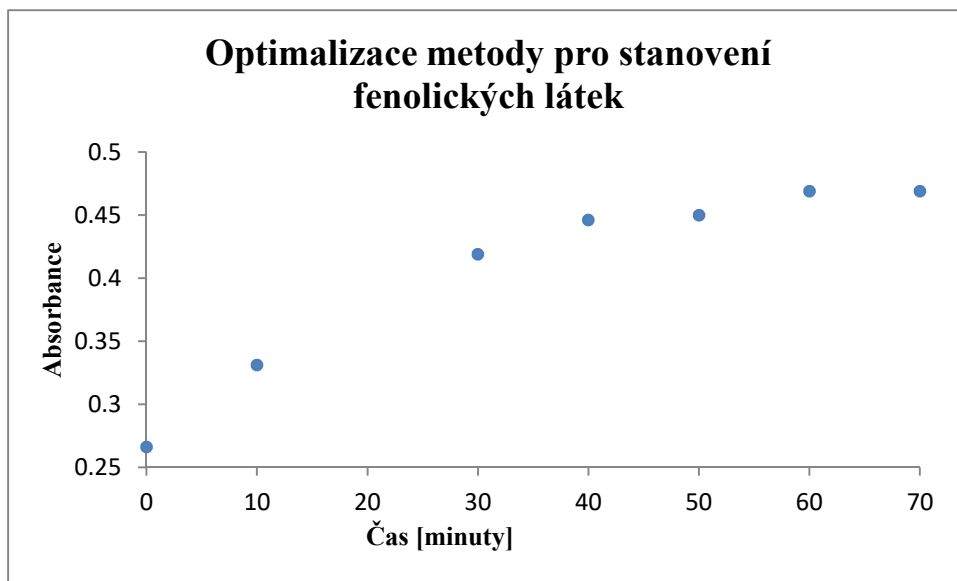
61. **FOLIN, O., CIOCALTEU, V.** On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 1927, **135**(3), 1365-1368.
62. **BLOIS, M. S.** Antioxidant determinations by the use of a stable radical. *Nature*. 1958, **181**(1), 1199-1200.
63. **RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C.** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999, **26**(1), 1231-1237.
64. **DENNI, M., MAMMEN, D.** A critical evaluation on the reliability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids. *Food Chemistry*. 2012, **135**(3), 1365-1368.
65. **SUN, B. a J. M. RICARDO-DA-SILVA.** Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998, **46**(10), 4267-4274.
66. **PAVITHRA, K. a S. VADIVUKKARASI.** Evaluation of free radical scavenging activity of various extracts of leaves from *Kedrostis foetidissima* (Jacq.) Cogn. *Food Science and Human Wellness*. 2015, **4**(1), 42-46.
67. **MUKHOPADHYAY, D., P. DASGUPTA, D. SINHA ROY, S. PALCHOU DHURI, I. CHATTERJEE, S. ALI a S. GHOSH DASTIDAR.** A Sensitive in vitro spectrophotometric hydrogen peroxide scavenging assay using 1,10-phenanthroline. *Free Radicals and Antioxidants*. 2016, **6**(1), 124-132.
68. **HMAMOU, D., R. SALGHI, A. ZARROUK, O. BENALI, F. FADEL, H. ZARROK a B. HAMMOUTI.** Carob seed oil. *International Journal of Industrial Chemistry*. 2012, **3**(1), 25-34.
69. **CHRISTOU, C., A. AGAPIOU a R. KOKKINOFTA.** Use of FTIR spectroscopy and chemometrics for the classification of carobs origin. *Journal of Advanced Research*. 2018, **10**(1), 1-8.
70. **AWWAD, A. M. a N. M. SALEM.** A Green and facile approach for synthesis of magnetite nanoparticles. *Nanoscience and Nanotechnology*. 2012, **2**(6), 208-213.

71. **MICHALSKA, A., M. AMIGO-BENAVENT, H. ZIELINSKI a M. D. DEL CASTILLO.** Effect of bread making on formation of Maillard reaction products contributing to the overall antioxidant activity of rye bread. *Journal of Cereal Science*. 2008, **48**(1), 123-132.
72. **AYAZ, F. A., H. TORUN, S. AYAZ, P. J. CORREIA, M. ALAIZ, C. SANZ, J. GRÚZ a M. STRNAD.** 1th. New Jersey: Blackwell Publishing, 2007.
73. **ZIELIŃSKI, H., Z. CIESAROVÁ, K. KUKUROVÁ, D. ZIELINSKA, D. SZAWARA-NOWAK, M. STAROWICZ a M. WRONKOWSKA.** Effect of fermented and unfermented buckwheat flour on functional properties of gluten-free muffins. *Journal of Food Science and Technology*. 2017, **54**(6), 1425-1432.
74. **SĘCZYK, Ł., M. ŚWIECA a U. GAWLIK-DZIKI.** Effect of carob (*Ceratonia siliqua L.*) flour on the antioxidant potential, nutritional quality, and sensory characteristics of fortified durum wheat pasta. *Food Chemistry*. 2016, **194**(1), 637-642.
75. **VALADEZ-CARMONA, L., PLAZOLA-JACINTO, C. P., HERNÁNDEZ-ORTEGA, M., HERNÁNDEZ-NAVARRO, M. D., VILLARREAL, F., NECOECHEA-MONDRAGÓN, H., a ORTIZ-MORENO, A.** Effect of microwaves, hot air and freeze-drying on the phenolic compounds, antioxidant capacity, enzyme activity and microstructure of cacao pod husks (*Theobroma cacao L.*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2016, **53**(9), 3495-3501.
76. **RÓŻYŁO, R., D. DZIKI, U. GAWLIK-DZIKI, B. BIERNACKA, M. WÓJCIK a A. ZIEMICHÓD.** Physical and antioxidant properties of gluten-free bread enriched with carob fibre. *International Agrophysics*. 2017, **31**(3), 411-418.

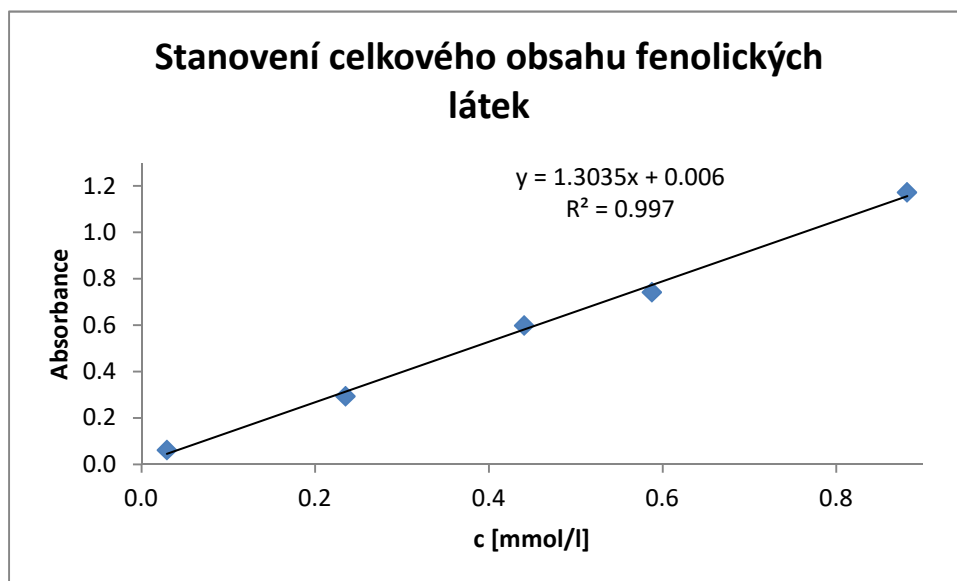
6 PŘÍLOHY

SEZNAM PŘÍLOH

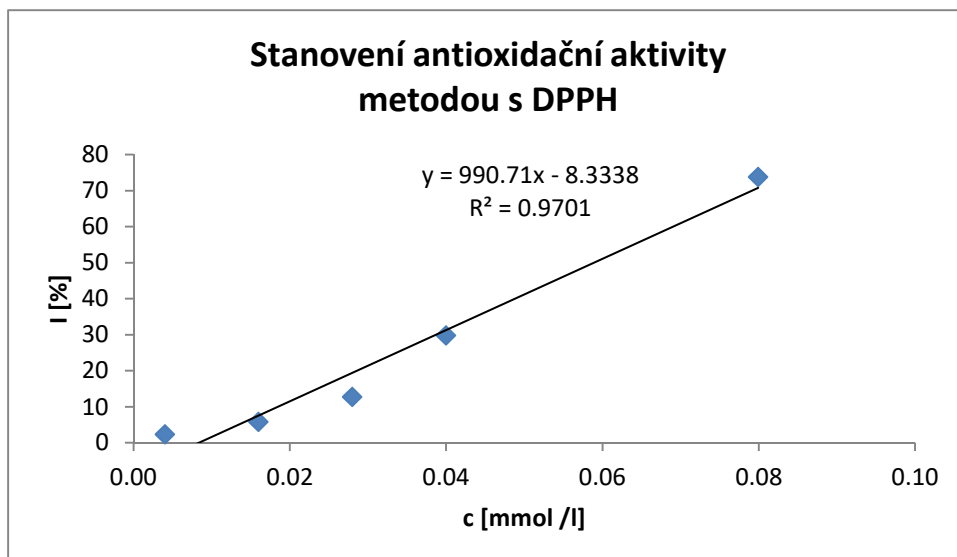
Příloha 1 Optimalizace metody pro stanovení celkových fenolických látek	71
Příloha 2 Kalibrační přímka pro stanovení obsahu celkových fenolických látek, standardem byla použita kyselina gallová ($\lambda = 765$ nm, inkubační doba = 60 min.)	71
Příloha 3 Kalibrační křivka pro stanovení antioxidační aktivity metodou s DPPH, standardem byl použit trolox ($\lambda = 517$ nm, inkubační doba = 35 min.)	71
Příloha 4 Kalibrační přímka pro stanovení antioxidační aktivity metodou s ABTS, standardem byl použit trolox ($\lambda = 734$ nm, inkubační doba = 50 min.).....	71
Příloha 5 Kalibrační přímka pro stanovení celkového obsahu flavonoidů, standardem byl použit kvercentin ($\lambda = 415$ nm, inkubační doba = 40 min)	71
Příloha 6 Kalibrační přímka pro stanovení katechinů, standardem byl použit katechin ($\lambda = 500$ nm, inkubační doba = 15 min.)	71
Příloha 7 Pšeničné muffiny a muffiny s přidavkem nepraženého a praženého karobového prášku	71



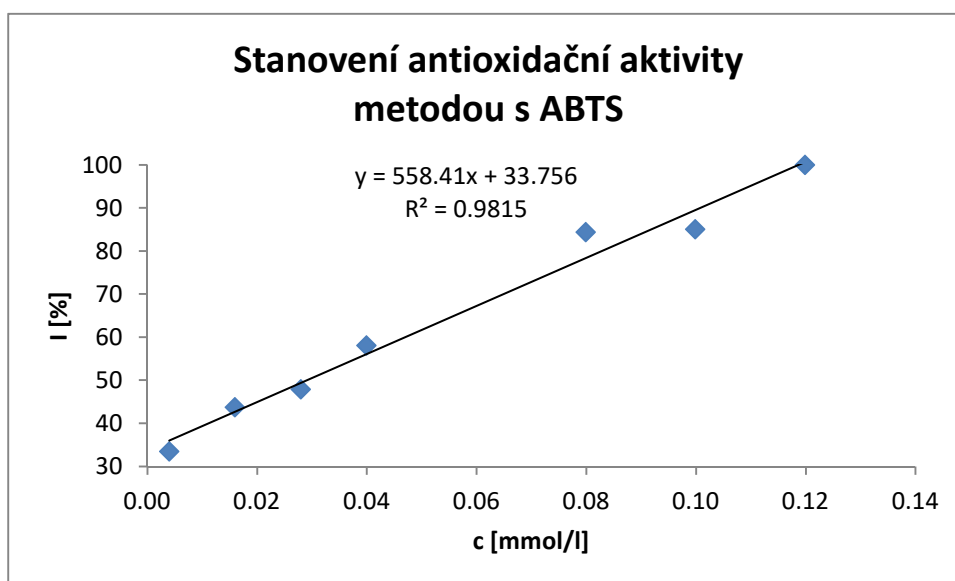
Příloha 1 Optimalizace metody pro stanovení celkových fenolických látek



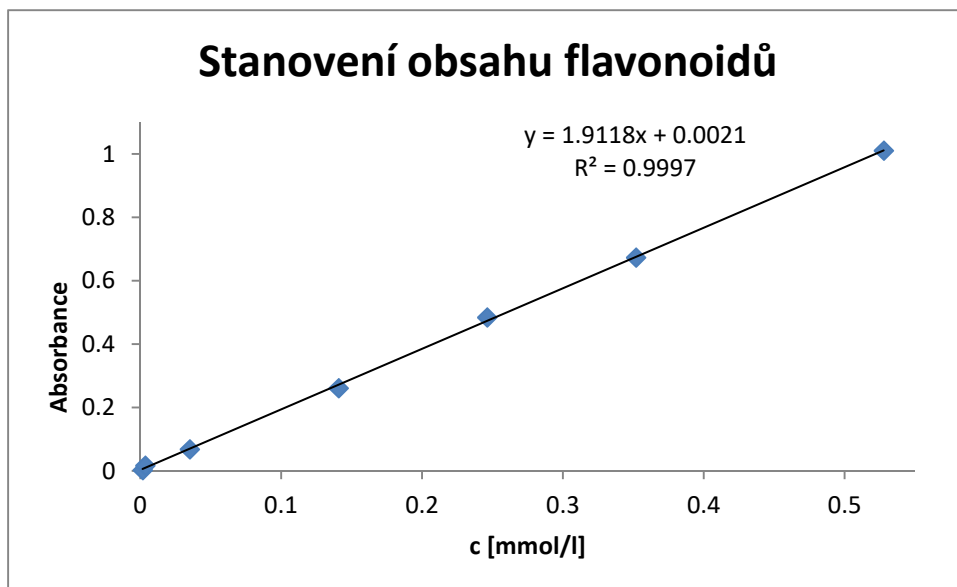
Příloha 2 Kalibrační přímka pro stanovení obsahu celkových fenolických látek, jako standard byla použita kyselina gallová ($\lambda = 765 \text{ nm}$, inkubační doba = 60 min.)



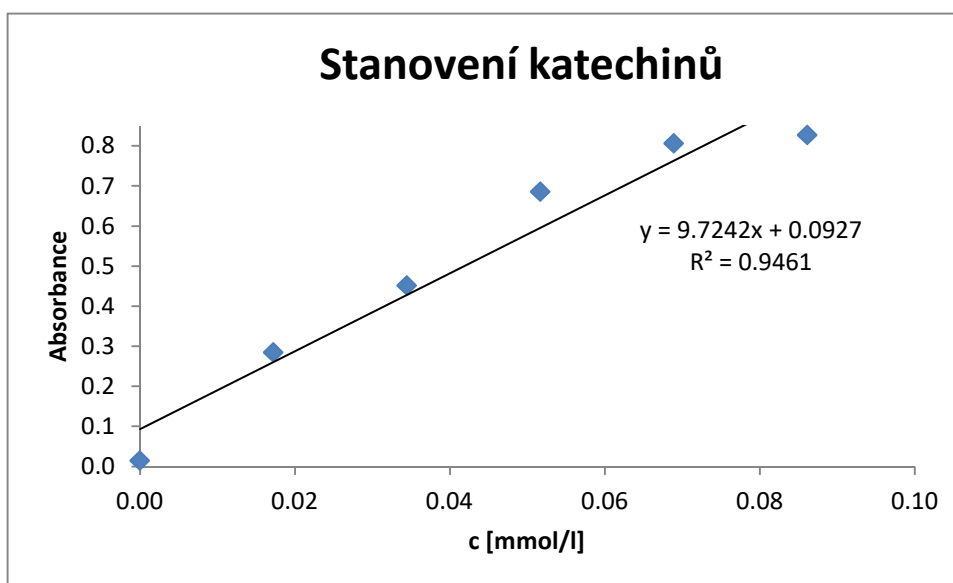
Příloha 3 Kalibrační křivka pro stanovení antioxidační aktivity metodou s DPPH, jako standard byl použit trolox ($\lambda = 517$ nm, inkubační doba = 35 min.)



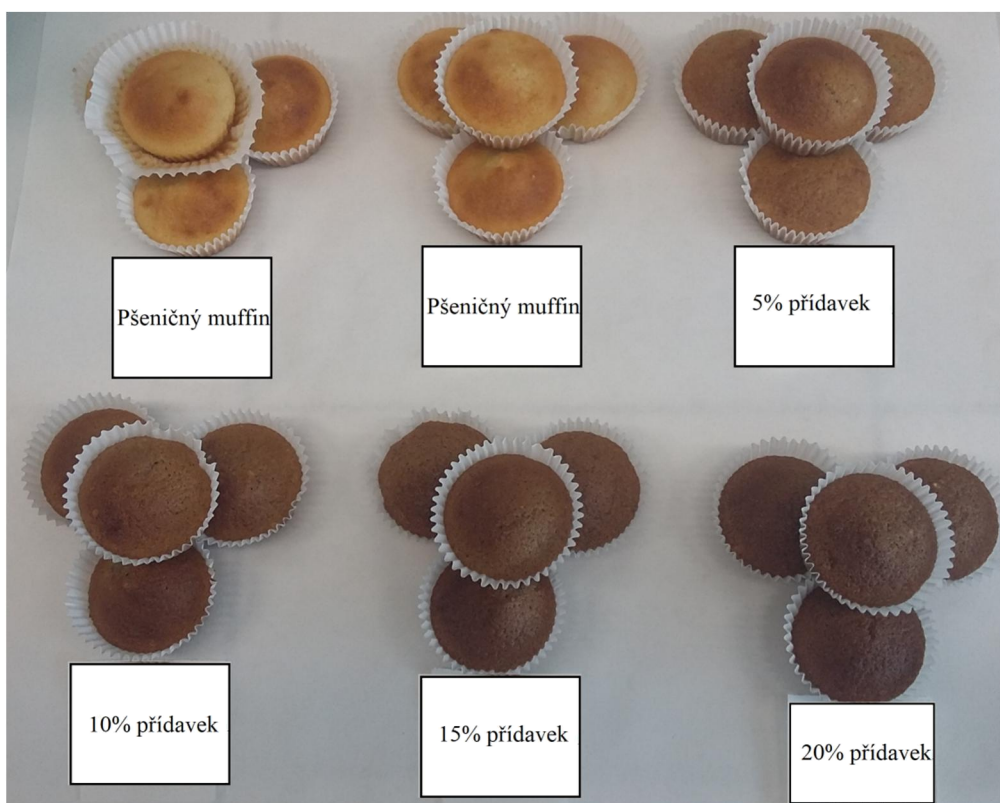
Příloha 4 Kalibrační přímka pro stanovení antioxidační aktivity metodou s ABTS, jako standard byl použit trolox ($\lambda = 734$ nm, inkubační doba = 50 min.)



Příloha 512 Kalibrační přímka pro stanovení celkového obsahu flavonoidů, standardem byl použit kvercetin ($\lambda = 415 \text{ nm}$, inkubační doba = 40 min)



Příloha 6 Kalibrační přímka pro stanovení celkového obsahu katechinů, jako standard byl použit katechin ($\lambda = 500 \text{ nm}$, inkubační doba = 15 min.)



Příloha 7 Pšeničné muffiny a muffiny s přídavkem nepraženého karobového prášku (u muffinů s přídavky praženého karobového prášku nebyl zaznamenán žádný okem viditelný rozdíl)