

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Antioxidační vlastnosti produktů Maillardovy reakce

Bc. Adéla Velechová

Diplomová práce

2020

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Adéla Velechová**
Osobní číslo: **C18444**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Antioxidační vlastnosti produktů Maillardovy reakce**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. S využitím databází dostupných v knihovně UPa vyhledejte a zpracujte informace o příčinách vzniku Maillardovy reakce, reakčních podmínkách a konečných produktech. Uvedte pozitivní i negativní aspekty Maillardovy reakce v potravinách (včetně jejich antioxidačních vlastnostech).
2. Popište analytické metody využité v experimentu.
3. Experimentálně zjistěte dostupnými metodami antioxidační vlastnosti produktů Maillardovy reakce, výsledky vyhodnoťte a diskutujte s poznatky publikovanými v zahraničních odborných periodikách.

prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
katedra analytické chemie

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
katedra analytické chemie

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce:

5. února 2020

Termín odevzdání diplomové práce:

7. května 2020

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci 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, že 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubic.

V Pardubicích dne: 20. 9. 2020

Bc. Adéla Velechová

.....

PODĚKOVÁNÍ:

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování doc. Ing. Liboru Červenkovi, Ph.D. za své cenné rady, trpělivost a inspiraci při vedení této diplomové práce.

ANOTACE

Diplomová práce je zaměřená na antioxidační vlastnosti produktů Maillardovy reakce. Je zde uvedena Maillardova reakce (historie, popis, mechanismus...). Popsané také negativní a pozitivní účinky na zdraví. V experimentální části se zabývá reakcí mezi glukózou a danými aminokyselinami (lysin, serin, glycin a glutamin). U těchto vzorků byly stanoveny pomocí antioxidačních metod antioxidační vlastnosti. Byly použité antioxidační metody: ABTS, DPPH, stanovení redukčních vlastností, schopnost vychytávat peroxid vodíku, FRAP, index hnědnutí, stanovení fenolických látek podle Folin-Ciocalteua a chelatace železnatých iontů. Vše bylo spektrofotometricky změřeno.

KLÍČOVÁ SLOVA

antioxidační aktivita, Maillardova reakce, UV/VIS spektrometrie, IČ spektrometrie, aminokyseliny, antioxidanty, sacharidy

TITTLE

Antioxidant properties of Maillard reaction products

ANNOTATION

The diploma thesis is focused on the antioxidant properties of Maillard reaction products. The Maillard reaction (history, description, mechanism...). Negative and positive effects on health they have on human health were described. The experimental part deals with the reaction between glucose and given amino acids (lysine, serine, glycine and glutamine). Antioxidant properties of these samples were determined using antioxidant methods. Antioxidant methods were used: ABTS, DPPH, reducing power method, hydrogen peroxide scavenging (H_2O_2) assay, FRAP, browning index, determination of phenolic substances according to Folin-Ciocalteu and metal chelating activity. Everything was measured spectrophotometers.

KEYWORDS

Antioxidant activity, Maillard reaction, UV/VIS spectrophotometers, IČ spectrophotometers, amino acids, antioxidants, carbohydrates

OBSAH

ÚVOD	14
1. TEORETICKÁ ČÁST	15
1.1 Maillardova reakce	15
1.1.1 Historie, popis	15
1.1.2 Mechanismus	15
1.1.3 Faktory, které ovlivňují Maillardovu reakci	17
1.1.4 Žádoucí a nežádoucí změny v důsledku Maillardovy reakce	18
1.1.5 Role Maillardových reakčních produktů v potravinách	20
1.1.6 Pozitivní a negativní účinky na zdraví	22
1.1.7 Analýza jednotlivých MRP	23
1.1.8 Výhody a nevýhody Maillardovy reakce	27
1.2 Sacharidy	28
1.2.1 Monosacharidy	28
1.3 Aminokyseliny	30
1.4 Antioxidanty	36
1.5 Antioxidační metody	39
1.5.1 ABTS	39
1.5.2 DPPH	39
1.5.3 Stanovení redukčních vlastností	40
1.5.4 Schopnost vychytávat H ₂ O ₂	41
1.5.5 FRAP	42
1.5.6 Přístroje, které se používají k měření barevnosti	42
1.5.7 Stanovení obsahu fenolických látek podle Folin-Ciocalteua	45
1.5.8 Chelatace železnatých iontů	45
1.6 Spektrální metody	46
1.6.1 UV/VIS spektrofotometrie	46
1.6.2 IČ ATR/FTIR spektrometrie	49
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	51
2.1 CHEMIKÁLIE	51
2.2 Přístroje a zařízení	52

2.3 Pracovní postupy	53
2.3.1 Příprava vzorku směsi	53
2.3.2 Příprava extraktu směsi	53
2.3.3 Příprava roztoků a standardů	53
2.4 Antioxidační metody	57
2.4.1 Metoda ABTS	57
2.4.2 Metoda DPPH	57
2.4.3 Stanovení redukčních vlastností	58
2.4.4 Schopnost vychytávat peroxid vodíku	58
2.4.5 Metoda FRAP	58
2.4.6 Index hnědnutí	59
2.4.7 Stanovení obsahu fenolických látek podle Folin-Ciocalteua	59
2.4.8 Chelatace železnatých iontů	59
2.4.9 Sledování absorpance na čase u 5-hydroxymethylfurfuralu proti DPPH	60
2.4.10 Sledování absorpance na čase pro furfural proti ABTS a DPPH	60
3. VÝSLEDKY A DISKUZE	61
3.1 Antioxidační vlastnosti produktů Maillardovy reakce s využitím metody ABTS	70
3.2 Antioxidační vlastnosti produktů Maillardovy reakce s využitím metody DPPH	71
3.3 Stanovení redukčních vlastností	72
3.4 Schopnost vychytávat peroxid vodíku	73
3.5 Antioxidační vlastnosti produktů Maillardovy reakce s využitím metody FRAP	74
3.6 Index hnědnutí	75
3.7 Stanovení obsahu fenolických látek podle Folin-Ciocalteua	76
3.8 Chelatace železnatých iontů	77
3.9 5-hydroxymethylfurfural proti antioxidační metodě DPPH	78
4. ZÁVĚR	86
5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	88
6. PŘÍLOHY	107

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schéma Maillardovy reakce (Nursten, 2005)	16
Obrázek 2: Biologické účinky MRP (Somoza, 2005)	22
Obrázek 3: Strukturní vzorec HMF	23
Obrázek 4: Strukturní vzorec furanu	24
Obrázek 5: Strukturní vzorec akrylamidu	25
Obrázek 6: Strukturní vzorec furosinu	26
Obrázek 7: Strukturní vzorec CML	27
Obrázek 8: Chirální atom uhlíku se 4 různými atomy nebo funkčními skupinami (Biliaderis a Izydorczyk, 2007; Embuscado, 2014)	28
Obrázek 9: D-glukóza (otevřený, acyklický řetězec) (Biliaderis a Izydorczyk, 2007; Embuscado, 2014)	29
Obrázek 10: D-fruktóza (otevřený nebo acyklický řetězec)	30
Obrázek 11: Strukturní vzorec aminokyseliny (Damodaran a kolektiv, 2017)	30
Obrázek 12: D a L forma aminokyselin (Damodaran a kolektiv, 2017)	31
Obrázek 13: Strukturní vzorec glycinu	32
Obrázek 14: Strukturní vzorec L-Serinu	33
Obrázek 15: Strukturní vzorec L-Lysinu	34
Obrázek 16: Strukturní vzorec L-Glutaminu	35
Obrázek 17: Strukturní vzorec α tokoferolu	37
Obrázek 18: Strukturní vzorec β -karotenu	37
Obrázek 19: Strukturní vzorec vitamínu C (kyseliny L-askorbové)	38
Obrázek 20: Schéma přeměny volného radikálu DPPH na molekulu DPPH-H za přítomnosti antioxidantu	40
Obrázek 21: Schéma reakce	40
Obrázek 22: Klasifikace přístrojů pro měření vzhledu (Choudhury, 2014)	43
Obrázek 23: Schéma Duboscq kolorimetru (Choudhury, 2014)	44
Obrázek 24: Obecný energetický diagram elektronických stavů	47
Obrázek 25: Schéma dvoupráskového spektrofotometru (Higson, 2004)	48
Obrázek 26: Schéma používaných ATR s jedním nebo více násobným odrazem (Babu a Suryadevara, 2016)	50
Obrázek 27: Infračervení spektrum směsi glukózy a lysinu	61

Obrázek 28: Infračervené spektrum směsi glukózy a glycinu.....	62
Obrázek 29: Infračervené spektrum glukózy a serinu.....	63
Obrázek 30: Infračervené spektrum směsi glukózy a glutaminu.....	64
Obrázek 31: Absorpční spektrum extraktu glukózy s jednotlivými aminokyselinami, 100x znázorňuje ředění	65
Obrázek 32: Absorpční spektrum extraktu glukózy s jednotlivými aminokyselinami a destilovanou vodou, 1000x znázorňuje celkové ředění.....	66
Obrázek 33: Porovnání čistého spektra DPPH se směsí glukózy a aminokyselinami s metanolickým roztokem DPPH.....	67
Obrázek 34: Porovnání čistého spektra ABTS se směsí glukózy a aminokyselinami s ABTS	68
Obrázek 35: Porovnání sledování absorbance na čase pro furfural o koncentraci 1964 µg/l proti ABTS a DPPH	69
Obrázek 36: Závislost absorbance na čase, HMF proti DPPH (Zhang a kolektiv, 2013)	78
Obrázek 37: Závislost absorbance na čase, HMF o koncentraci 100 mg/ml proti DPPH	79

SEZNAM ROVNIC

Rovnice 1: Vzorec pro výpočet inhibice s látkou Trolox.....	40
Rovnice 2: Rovnice pro výpočet schopnosti vychytávat peroxid vodíku.....	41
Rovnice 3: Lambert-Beerův zákon	46
Rovnice 4: Stanovení indexu hnědnutí při 420 nm, bez korekce (Iwe a kolektiv, 2004) s mírnou modifikací.....	59

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Výsledky vyjádřené jako ekvivalent Troloxu v [mg/ml] u antioxidační metody ABTS.....	70
Graf 2: Výsledky vyjádřené jako ekvivalent Troloxu v [mg/ml] u antioxidační metody DPPH.....	71
Graf 3: Výsledky stanovení redukčních vlastností při 700 nm.....	72
Graf 4: Výsledky stanovení schopnosti vychytání peroxidu vodíku, 100 x ředěné vzorky	73
Graf 5: Výsledky vyjádřené jako ekvivalent Troloxu v [mg/l] u chemické metody FRAP	74
Graf 6: Výsledky vyjádřené jako absorbance (420 nm) u 100x ředěného vzorku.....	75
Graf 7: Výsledky vyjádřené jako ekvivalent kyseliny galové v [mg/l] u metody Folin-Ciocalteu	76
Graf 8: Výsledky u chelatace železnatých iontů vyjádřené jako absorbance (562 nm) u 100x ředěných vzorků směsi glukóza-aminokyselina	77

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Kalibrační řada Troloxu pro antioxidační metodu ABTS.....	107
Příloha 2: Závislost absorbance (734 nm) radikálu ABTS na čase pro extrakt MRP vzniklých ze směsi cukru a aminokyseliny (2,5 mol/l; 1:1; 100x). Hodnoty znázorňují aritmetický průměr (N=3). MRP-Maillardovy reakční produkty	107
Příloha 3: Kalibrační řada Troloxu pro antioxidační metodu DPPH	108
Příloha 4: Závislost absorbance (517 nm) radikálu DPPH na čase pro extrakt MRP vzniklých ze směsi cukru-aminokyseliny (2,5 mol/l; 1:1; 100x). Hodnoty znázorňují aritmetický průměr (N=3). MRP-Maillardovy reakční produkty	108
Příloha 5: Kalibrační řada Troloxu pro antioxidační metodu FRAP.....	109
Příloha 6: Závislost absorbance (593 nm) pro metodu FRAP na čase pro extrakt MRP vzniklých ze směsi glukózy-lysinu (2,5 mol/l ; 1:1; 10x, 50x a 100x).....	109
Příloha 7: Závislost absorbance (593 nm) pro metodu FRAP na čase pro extrakt MRP vzniklých ze směsi glukózy-glycinu (2,5 mol/l; 1:1; 10x, 50x a 100x).....	110
Příloha 8: Závislost absorbance (593 nm) pro metodu FRAP na čase pro extrakt MRP vzniklých ze směsi glukózy-serinu (2,5 mol/l; 1:1; 10x, 50x a 100x)	110
Příloha 9: Závislost absorbance (593 nm) pro metodu FRAP na čase pro extrakt MRP vzniklých ze směsi glukózy-glutaminu (2,5 mol/l; 1:1; 10x, 50x a 100x).....	111
Příloha 10: Kalibrační řada kyseliny galové pro antioxidační metodu Folin-Ciocalteu	111
Příloha 11: Závislost absorbance (765 nm) pro metodu Folin-Ciocalteu na čase pro extrakt MRP vzniklých ze směsi glukózy-lysinu (2,5 mol/l; 1:1; 10x, 50x a 100x)	112
Příloha 12: Závislost absorbance (765 nm) pro metodu Folin-Ciocalteu na čase pro extrakt MRP vzniklých ze směsi glukózy-glycinu (2,5 mol/l; 1:1; 10x, 50x a 100x)	112
Příloha 13: Závislost absorbance (765 nm) pro metodu Folin-Ciocalteu na čase pro extrakt MRP vzniklých ze směsi glukózy-serinu (2,5 mol/l; 1:1; 10x, 50x a 100x).....	113
Příloha 14: Závislost absorbance (765 nm) pro metodu Folin-Ciocalteu na čase pro extrakt MRP vzniklých ze směsi glukózy-glutaminu (2,5 mol/l; 1:1; 10x, 50x a 100x) ..	113
Příloha 15: Porovnání spekter DPPH + HMF (10 mg/l) s čistým DPPH.....	114
Příloha 16: Spektrum 5-hydroxymetylfurfuralu o různých koncentrací	114

SEZNAM ZKRATEK

ABTS	(2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)
AGE	Konečné produkty pokročilé glykace
ATP	adenosintrifosfát
BHA	Butylhydroxyanisol
BHT	Butylhydroxytoluen
CA	kyselina citrónová
CML	N-(carboxymethyl)lysin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl nebo 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
ET	přenos elektronu
HAT	Přenos atomu vodíku
HMF	Hydroxymethylfurfural
HMW	Vysoká molekulová hmotnost
LMW	Nízká molekulová hmotnost
MR	Maillardova reakce
MRP	Maillardovy reakční produkty
MTOR	mechanický cíl rapamycinu
ODC	ornithin dekarboxyláza
PG	propylgallát
PPO	Polyfenol oxidáza
PUFA	Polynenasycené mastné kyseliny
RNA	ribonukleová kyselina
TBHQ	terc-butylhydrochinon

ÚVOD

V současnosti se setkáváme s Maillardovou reakcí čím dál více. Je to neenzymatická reakce mezi cukrem a aminokyselinou, přičemž vznikají Maillardovy reakční produkty. Jako Maillardovy reakční produkty můžeme označit např. 5-hydroxymethylfurfural nebo furfural, furan a melanoidiny.

Maillardova reakce je využívána při pražení kávy, pečení chleba. Záleží na způsobu tepelné úpravy - vaření, smažení či pečení.

V první teoretické části je popsána Maillardova reakce (historie, popis, mechanismus, faktory, které ji ovlivňují). Dále je popsána antioxidační aktivita v jednotlivých výrobcích (masové, pekařské, kávové, výrobky z brambor), jakou roli mají Maillardovy reakční produkty v potravinách (barva, textura, chuť a vůně a nutriční aspekty), popsány také jsou negativní a pozitivní účinky na zdraví člověka, analýza jednotlivých Maillardových reakčních produktů a nakonec jsou uvedeny výhody a nevýhody Maillardovy reakce. V dalších teoretických částech jsou uvedeny monosacharidy, aminokyseliny, antioxidanty a antioxidační metody, spektrální metody.

V experimentální části jsem studovala neenzymatickou Maillardovu reakci a to konkrétně mezi glukózou a jednotlivými aminokyselinami (Glycin, Serin, Glutamin, Lysin). Jsou zde uvedeny chemikálie, přístroje a zařízení, pracovní postupy při přípravě roztoků a kalibračních řad, antioxidační metody (ABTS, DPPH, stanovení redukčních vlastností, schopnost vychytávat peroxid vodíku, FRAP, Index hnědnutí, stanovení obsahu fenolických látek podle Folin-Ciocalteu a Chelatace železnatých iontů). Vše bylo měřeno spektrofotometricky.

Cílem této práce je zhodnotit pomocí antioxidačních metod, které jsou vypsány v teoretické části, jaké má můj daný vzorek antioxidační vlastnosti, a dále výsledky porovnat se zahraničními publikacemi.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Maillardova reakce

1.1.1 Historie, popis

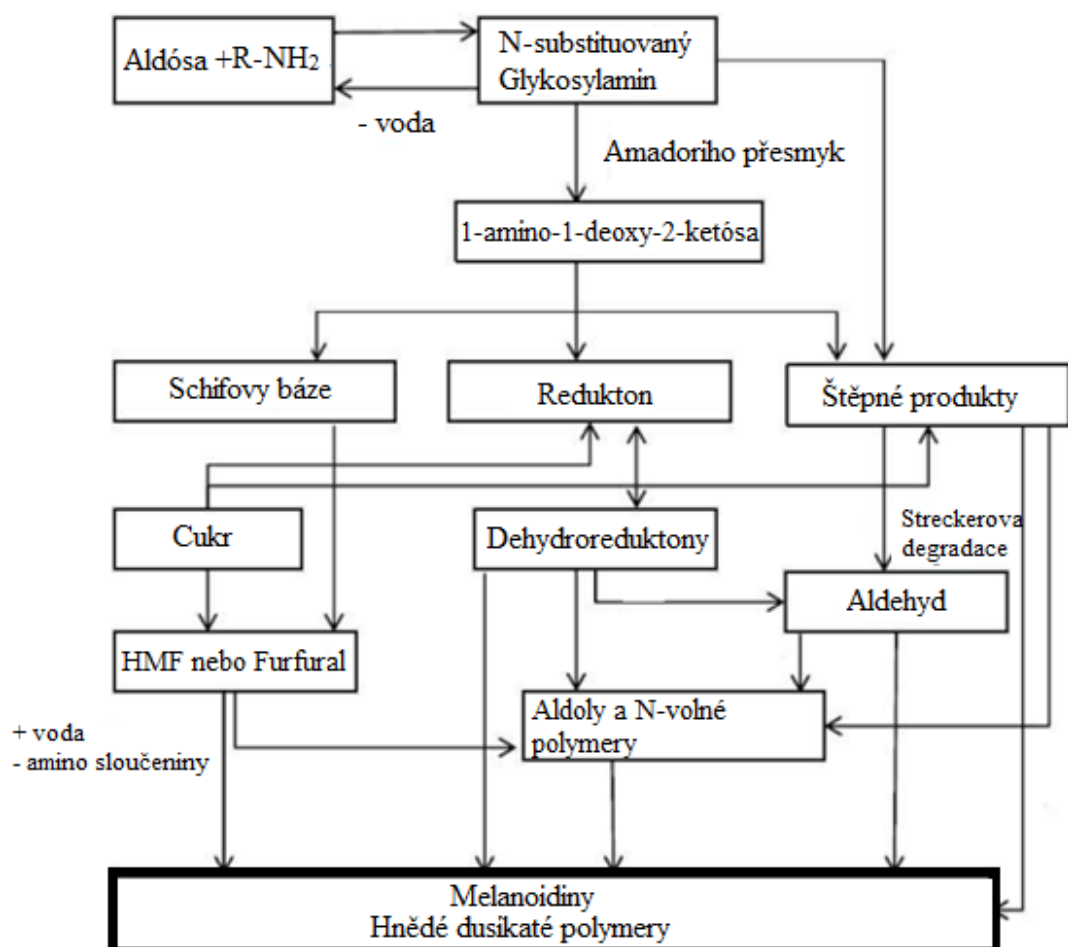
Objevitelem Maillardovy reakce byl v roce 1912 Louis Camille Maillard. Maillardova reakce (MR), také nazývaná chemická neenzymatická reakce hnědnutí, je zahájena konjugací sloučenin, které mají volnou amino a karbonylovou skupinu během tepelného zpracování, vaření a skladování potravin, což vede k vytvoření Maillardových reakčních produktů (MRP). Byla MR hodně popisovaná, protože se vyskytuje v potravinách pro výživu lidí (Gerrard, 2006; Wang a kolektiv, 2011; Kwak a Lim, 2004).

1.1.2 Mechanismus

MR je série neenzymatických reakcí, jejich mechanismy nejsou doposud úplně objasněny (Purlis, 2010). MR je rozdělena do 3 následujících kroků. První krok můžeme nazvat jako počáteční fázi, která začíná kondenzací cukru a aminu, po ní následuje Amadoriho přesmyk. U prvního kroku jsou výsledné produkty bezbarvé, bez absorpce v ultrafialovém světle (280 nm) (Hodge, 1953; Nursten, 2005). Druhý krok, tzv. mezistupeň, zahrnuje dehydrataci a fragmentaci cukru a degradaci aminokyselin (Streckerova degradace). Amadoriho produkty se rozkládají na různé sloučeniny, které jsou závislé na pH systému (Purlis, 2010). U vyššího pH dojde k 2,3-enolizaci, což vede ke tvorbě reduktonů (Furanonu). U nízkého pH dojde k 1,2-enolizaci, tady to vede ke tvorbě sloučenin jako furfuralu nebo HMF (5-hydroxymethylfurfural) (Lertittikul a kolektiv, 2007; Nursten, 2005). Při dehydrataci cukru dochází ke tvorbě furfuralů nebo reduktonů a to ztrátou 3 nebo 2 molekul vody (Nursten, 2005). K fragmentaci cukru dochází mechanismem retroaldolizace. Produkty, které jsou získané štěpením, mohou být těkavé látky (2,3-butandion, 2,3-pentandion). Dehydroreduktony, které jsou získány dehydratací cukru a produkty štěpení získané fragmentací cukru, vedou k tvorbě aldehydů prostřednictvím Streckerovy degradace. Zahrnuje oxidační deaminaci a dekarboxylaci α -aminokyselin, které jsou v přítomnosti dikarbonylové sloučeniny (Whitfield, 1992). Aldehydy jsou získávány jako produkty, které mají o jeden uhlík méně než původní aminokyselina (Whitfield, 1992). Důležitou roli mají potraviny, které jsou aromatické (Whitfield, 1992; Zehentbauer a Grosch, 1998; Van Boekel, 2006). Produkty jsou bezbarvé nebo žluté se silnou absorbcí v ultrafialovém světle (Nursten, 2005).

Třetím krokem je závěrečná část, zahrnuje kondenzaci aldolu, aldehydu-aminu. Tvoří heterocyklické dusíkaté sloučeniny (Hodge, 1953; Nursten, 2005). Sloučeniny, které vznikly ve druhém kroku, jsou vysoce reaktivní a podléhají polymerizačním reakcím za vzniku barevných produktů s vysokou molekulovou hmotností, které se nazývají melanoidiny. Melanoidiny jsou zodpovědné za barvu, které se vytvoří během tepelných procesů na potravině (sušenky, maso a chleba) (Machiels a Istasse, 2002). Schéma hlavních kroků Maillardovy reakce jsou uvedeny na obrázku č. 1.

Obrázek 1: Schéma Maillardovy reakce (Nursten, 2005)



1.1.3 Faktory, které ovlivňují Maillardovu reakci

Faktory, které ovlivňují MR, závisí na typu použitého procesu. Je zřejmé, že hlavními faktory, které ovlivňují MR jsou čas a teplota. Pro MR jsou výhodnější: delší čas a vyšší teplota (Bordas a kolektiv, 2004; Jaeger a kolektiv, 2010; Martins a Van Boekel, 2005a). MR však může nastat i při nízké teplotě, například při skladování produktů. MR také hodně ovlivňuje povaha a množství cukrů, aminoskupin a lipidů, protože mají odlišnou reaktivitu. Pentózy mají vyšší reaktivitu než hexózy, aldózy mají vyšší reaktivitu než ketózy, které samy mají vyšší reaktivitu než disacharidy (Lamberts a kolektiv, 2008; Laroque a kolektiv, 2008). Kyselé aminokyseliny mají nižší reaktivitu než základní nebo nepolární (Kwak a Lim, 2004). Obecně platí, že rychlost neenzymatické reakce je pomalá při 35°C a zvyšuje se až při teplotách nad 55°C. Většina studií zabývajících se Maillardovou reakcí byla obvykle prováděna při teplotách mezi 55°C a 120°C. Rozsah reakční doby se může lišit od 30 minut, 24 hodin až do několika dní (Lee a kolektiv, 2017).

Záleží na počáteční hodnotě pH vodného roztoku, který obsahuje redukující cukry a amino sloučeniny, tím se ovlivňuje rychlost a směr Maillardovy reakce. Většinou byla MR prováděna za alkalických podmínek ($\text{pH} > 7,0$), protože rozpustnost proteinů je vyšší při základních hodnotách pH, a proto je k dispozici více rozpustného proteinu pro reakci s redukujícími cukry během neenzymatické glykační reakce (Lee a kolektiv, 2017). Intenzita barvy (hnědnutí) roste s hodnotami pH. Do pH 8,0 roste mírně, dramaticky po pH 8,0 (Ajandouz a kolektiv, 2001; Ames, 1998; Benjakul a kolektiv, 2005; Lertittikul a kolektiv, 2007; Martins a Van Boekel, 2005b). Kyselé pH poskytuje nízkou reakční rychlost v důsledku protonace skupin $-\text{NH}_3$ a poté se pozoruje rostoucí trend v rychlosti se stoupající hodnotou pH až ~ 10 . Další zvýšení pH vede ke snížení rychlosti zhnědnutí, pravděpodobně kvůli nedostatku iontů H^+ ke katalýze Amadoriho přesmyku a Heynse (O'Brien a kolektiv, 1989).

Obsah vlhkosti nebo aktivita vody jsou důležité faktory pro MR, protože ovlivňují rozpouštění reaktantů, mobilitu a koncentraci. Obsah vlhkosti přímo ovlivňuje fyzický stav systému (kapalný nebo pevný), který ovlivňuje podmínky MR (Robert a kolektiv, 2005). U aktivity vody je maximální intenzita MR v rozmezí 0,5-0,8 v závislosti na reakčním systému (Nursten, 2005). V kapalných systémech s vysokou aktivitou vody je molekulární mobilita vysoká a chemická reaktivita reaktantů je převládajícím faktorem, který ovlivňuje MR. (Robert a kolektiv, 2004). V systémech, kde je nízká vlhkost, je fyzikální stav (pevný nebo kapalný) reakčního systému nejdůležitějším faktorem, který ovlivňuje MR, protože přímo ovlivňuje molekulární mobilitu (Robert a kolektiv, 2004).

1.1.4 Žádoucí a nežádoucí změny v důsledku Maillardovy reakce

Tyto nejžádanější 4 skupiny výrobků potravin byly vybrány, protože u nich dochází při tepelném zpracování k nejvýraznější Maillardově reakci.

Pekařské výrobky

Maillardova reakce probíhá při vysokých teplotách, které jsou používány při pečení. MR vede ke tvorbě MRP, což zlepšuje texturu, barvu a chuť finálního výrobku (Michalska a kolektiv, 2008). Michalska a kolektiv (2008) hodnotili vliv procesu výroby chleba na tvorbu MRP, které přispívají k celkové antioxidační aktivitě žitného chleba. Zjistili, že pečení vede ke tvorbě MRP, a to hlavně melanoidinů v žitném chlebu, který zachytil radikály peroxyly a ABTS a také redukoval Folin-Ciocolteuovo činidlo. Také zjistili, že obsah vody na povrchu těsta rychle klesal, což vedlo k příznivým podmínkám pro tvorbu MRP a tedy k vytvoření žádoucí barvy kůrky. U lipidů je hlavním problémem jejich oxidace, což vede ke žluknutí tuků, tím snižuje jejich skladovatelnost a také to snižuje stabilitu produktu při skladování například sušenek (Lingnert, 1980; Bressa a kolektiv, 1996). Antioxidační vlastnosti MRP byly popsány v máslových sušenkách (Bressa a kolektiv, 1996). Maillardovy reakční produkty, které jsou v prvních 20-30 minutách pečení, vykazují vysokou antioxidační aktivitu, a to až 5g Troloxu ve 100g sušených vodných extraktů sušenek, což ukazuje na účinek MRP a skladovatelnost zpracované potraviny. González-Mateo a kolektiv (2009) izolovali LMW (nízká molekulová hmotnost) <3 kDa a HMW (vysoká molekulová hmotnost) > 3 kDa MRP z muffinů a zjistili, že HMW (> 3 kDa) mají vyšší antioxidační aktivitu. Nahlášeny byly také silné antioxidační vlastnosti MRP izolované ze sušenek (Martín a kolektiv, 2009; Patrignani a kolektiv, 2016) a u sušenek s kousky čokolády (Sun a kolektiv, 2008). Toto naznačuje, že MRP u pekárenských výrobků mají výrazné antioxidační účinky, působí v nich jako konzervační látky.

Výrobky z brambor

Smažené bramborové výrobky, jako např. jsou hranolky a lupínky, téměř po celém světě. Maillardova reakce hraje velice důležitou roli při vytváření barvy a chuti. Serpen a Gökmen (2009) hodnotili antioxidační kapacitu bramborových lupínek v důsledku Maillardovy reakce. Bramborové lupínky měly vysokou antioxidační schopnost, to hlavně kvůli tvorbě melanoidinů, které se tvořily během smažení, což může vést ke zvýšení skladovatelnosti díky zpomalení oxidačního procesu. Uvedli, že bramborové lupínky mají kromě antioxidační aktivity odvozené od melanoidinů také negativní dopady na zdraví v

důsledku tvorby akrylamidu během smažení.

Masové a rybí výrobky a obsah histidinu

Rybí produkty jsou vzhledem k vysokému obsahu polynenasycených mastných kyselin náchylné k autooxidaci, což vede k vývoji žluklé chuti a snížení jejich životnosti. Tanaka a kolektiv (1988) zahřivali pod zpětným chladičem směs L-histidinu a D-glukózy při pH 5,0, 7,0 a 9,0 po dobu až 24 hodin a tím získali MRP. Antioxidační aktivita MRP se zvýšila v závislosti na reakční době a to především v pozdějším čase.

L-histidin je esenciální bazická aminokyselina obsahující 27 % dusíku. Používá se jako prekurzor histaminu a pro syntézu proteinů. Histidin představuje významnou složku masa. Všechny potravinové proteiny z různých zdrojů obsahují histidin. Ve vepřovém a hovězím masu je vyšší obsah bílkovin (3–4% celkového proteinu) než v kuřecím masu či vejčích (2–3% celkového proteinu). Vepřové maso obsahuje 38 mg/g, hovězí maso 34 mg/g a ostatní maso obsahuje více histidinu než luštěniny - kolem 27 mg/g. Dlouhodobý nedostatek histidinu jako všech esenciálních aminokyselin nebo nedostatek proteinu způsobuje selhání růstu, ztrátu svalové hmoty a poškození orgánů (Kohlmeier, 2003).

Kávévé výrobky

Fenolické sloučeniny se účastní Maillardovy reakce během pražení kávy a vytvářejí ve vodě rozpustné kávévé melanoidiny (Borrelli a kolektiv, 2002). Obsah fenolů (kyselina chlorogenová, kyselina ferulová, kyselina kávová, kyselina p-kumarová) se díky zahřívání během pražení kávy snížil (Delgado-Andrade a kolektiv, 2005) a vznikly fenolyticky vázané melanoidiny. Bylo zjištěno, že kávévé nápoje obsahují asi 25% melanoidinů (vztaženo na sušinu), které jsou odpovědné za vynikající antioxidační kapacitu (Borrelli a kolektiv, 2002). Delgado-Andrade a kolektiv (2005) zjistili, že když se vaří káva, melanoidiny a vázané melanoidinové sloučeniny, které byly získané ultrafiltrací a diafiltrací kávévých melanoidinů, vykazovaly vysokou antioxidační kapacitu ve vodném prostředí. Větší antioxidační kapacitu měla frakce LMW (nízká molekulová hmotnost) než HMW (vysoká molekulová hmotnost).

1.1.5 Role Maillardových reakčních produktů v potravinách

Maillardova reakce je jedna z nejdůležitějších reakcí při zpracování potravin. Její produkty značně ovlivňují základní atributy kvality potravin, jako je chuť, aroma, barva a textura (Ames, 1990; Yu a Zhang, 2010).

Barva

Pro MR je tvorba barev primární charakteristikou. Hnědá barva během zpracování a skladování je žádoucí u mnoha produktů, jako jsou pečená jídla, káva, sušenky. V některých druzích potravin jako je např. pomerančový džus, bílá čokoláda, mléko a sušené vejce je nežádoucí. Kontrola vývoje potravinářských barev je pro výrobce obzvláště důležitá, aby uspokojili preference spotřebitelů. Spektrum melanoidinů produkovaných Maillardovou reakcí silně závisí na složení potravinářské matrice a na technologických podmínkách reakce (Wang a kolektiv, 2011). Melanoidin může být také tvořen karamelizací cukru bez účasti aminoskupin.

Chuť a vůně

Závisí v důsledku MR na reakční teplotě, času, pH, obsahu vody a na typu použitých cukrů a aminokyselin (Yu a Zhang, 2010; Van Boekel, 2006). Reakční teplota ovlivňuje kinetické parametry, zatímco čas určuje typ vzniklých aromatických sloučenin. Meziprodukty a konečná fáze MR jsou pro vývoj chutě nejdůležitější, obzvláště Streckerův degradační krok, ve kterém jsou aminokyseliny degradovány dikarboxyly vytvořenými dříve v reakci, což vede k deaminaci a dekarboxylaci aminokyselin (Ames, 1990; Rizzi, 2008). Těkavé produkty Maillardovy reakce lze klasifikovat podle produktů dehydratace/fragmentace cukru a to jako furany, pyrony, cyklopenteny, karboxyly a kyseliny; produkty degradace aminokyselin jako aldehydy a sloučeniny síry. Těkavé látky produkované dalšími interakcemi lze klasifikovat jako pyroly, pyridiny, imidazoly, pyraziny, oxazoly, thiazoly a další. Pyraziny a alkylypyraziny jsou spojeny s příchutí a aroma vařeného (pečeného) a ořechového. Sloučeniny, které jsou nezbytné pro charakteristickou chuť a vůni potravinářských výrobků, jsou obvykle přítomny ve stopových množstvích. Aromatické sloučeniny, které obsahují kyslík jako např. 2,3-butandion, 2,3-pentandion, 3-methylbutanal, methylpropanal, fenylacetaldehyd, 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2 (3H) furanon a 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3 (2H) furanon se vyskytují v koncentraci v rozmezí od 1 µg / kg do 100 mg / kg. Aromatické sloučeniny obsahující dusík např. 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazin, 2,3-diethyl-5-methylpyrazin a 2-acetyl-1-pyrrolin je přítomen v potravinách v řádu 0,001–10 mg/kg. Nejvýraznějšími vonnými látkami, které hrají

důležitou roli v chuti ve vařeném masu, jsou aromatické sloučeniny obsahující síru, i když je obsažena ve stopovém množství. Tělavé sloučeniny, viz výše uvedené, hrají důležitou roli v chuti a vůni hovězí šťávy, hranolků, chlebové kůrce, pečeného kuře, kakaového prášku, arašídů, popcornu a kávy (Cerny, 2008).

Textura

Strukturu potravin prostřednictvím síťování proteinů ovlivňuje MR. Doposud není známo, jak zesíťování bílkovin ovlivňuje strukturu potravin ve zpracovaných potravinách, a jak se tento parametr dá kontrolovat, aby se maximalizovala kvalita potravin (Gerrard, 2002).

Nutriční aspekty

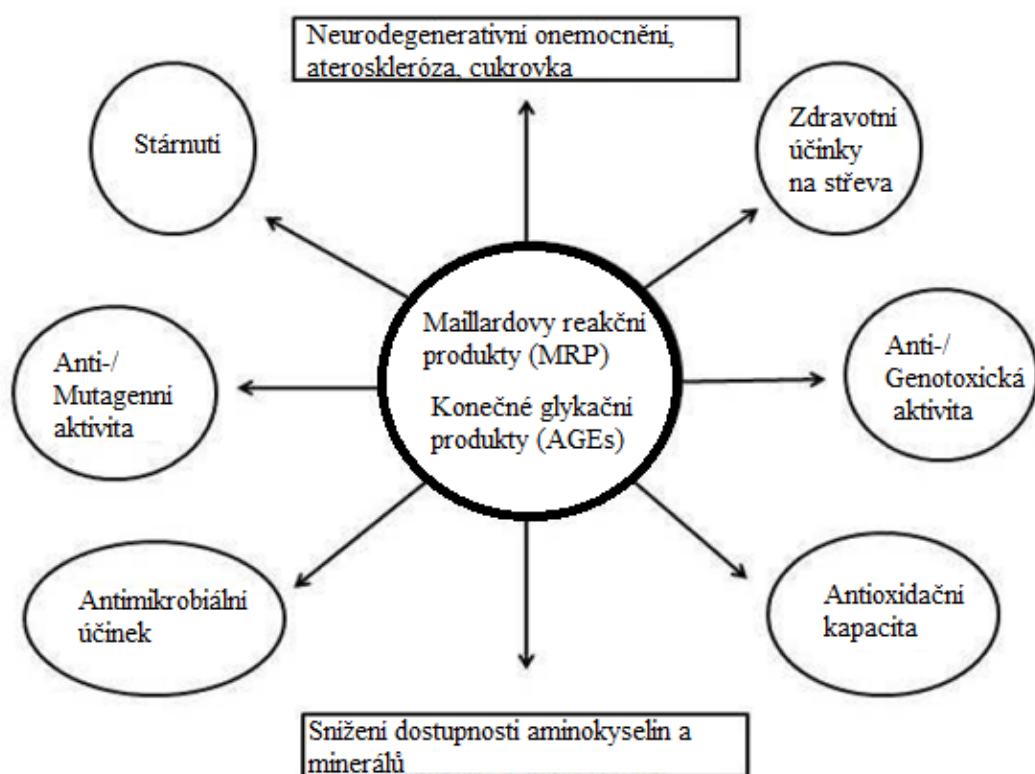
Maillardova reakce snižuje stravitelnost bílkovin a biologickou dostupnost základních esenciálních aminokyselin (Friedman, 1996; Malec a kolektiv, 2002). Lysin je díky svým dvěma dostupným α - a ϵ - aminoskupinám jedna z nereaktivnějších aminokyselin pro MR (Kwak a Lim, 2004; Malec a kolektiv, 2002). Bylo uvedeno mnoho prací ke stanovení ztráty lysinu během tepelného zpracování potravin, jak je uvedeno v následujících pracích u různých typů potravin: u mléka (Malec a kolektiv, 2002; Naranjo a kolektiv, 1998), u sušeného mléka pro kojence (Contreras-Calderón a kolektiv, 2009; Guerra-Hernández a kolektiv, 2002; Schmitz a kolektiv, 2011), obilovin pro kojence (Ramírez-Jiménez a kolektiv, 2004), obohacených obilovin (Delgado-Andrade a kolektiv, 2007) a pekařských výrobků (Purlis, 2010). Vitamín C je považován za důležitý indikátor nutriční kvality, který je hojně přítomen v ovoci a zelenině (Laguerre a kolektiv, 2011; Leong a Oey, 2012). Kyselina askorbová se podílí na MR, což vede ke snížení nutriční hodnoty a ke zhnědnutí (Pischetsrieder a Severin, 1994; Smuda a Glomb, 2013; Damasceno a kolektiv, 2008). Minerály jsou důležité pro dobré zdraví, protože vykonávají mnoho biologických funkcí. Ionty, jako je vápník, hořčík, železo, zinek a měď však mohou tvořit komplexy s MRP a být zapojeny do mnoha MR (Delgado-Andrade a kolektiv, 2008; Nursten, 2005; Ramonaitytė a kolektiv, 2009). Je třeba si uvědomit, že každý den konzumujeme nějaké malé množství MRP ve stravě, což vede k různým biologickým a výživovým účinkům (Delgado-Andrade a kolektiv, 2010a). Některé tyto MRP mají pozitivní antioxidační vlastnosti, antimikrobiální a chemopreventivní účinky, jako jsou melanoidini. Naopak některé způsobují (jsou zapojeny) do mnoha degenerativních onemocnění jako např. diabetes, onemocnění srdce či osteoporóza (Delgado-Andrade a kolektiv, 2010a). Hlavními zdroji melanoidinů jsou: kůrka chleba, černé pivo, pekárenské výrobky, kakao (Morales a kolektiv, 2012).

1.1.6 Pozitivní a negativní účinky na zdraví

Reakční produkty z Maillardovy reakce mohou ovlivňovat nutriční hodnotu potravin tím, že se snižuje stravitelnost bílkovin, vytváří se mutagenní a toxické sloučeniny. Také mohou vytvářet antioxidantní produkty. Některé MRP, které se vytvořily během MR, konkrétně melanoidiny, mají protizánětlivý a antioxidantní účinek. Studovány byly melanoidiny z kávy a chleba. Melanoidiny z kávy mají obzvlášť prospěšný účinek na zdraví. (Martins a kolektiv, 2000; Delgado-Andrade, 2014; Morales a kolektiv, 2012).

Maillardova reakce ale také vytváří MRP, které mají negativní účinky na zdraví. Studované sloučeniny jsou hlavně akrylamid, furan, HMF a heterocyklické aminy, protože jsou detekovány jako škodlivé sloučeniny. V produktech z brambor a obilovin se vyskytují akrylamid a furan, v masných výrobcích heterocyklické aminy (Gerrard, 2006). Biologické účinky Maillardových reakčních produktů jsou znázorněné na obrázku č. 2.

Obrázek 2: Biologické účinky MRP (Somoza, 2005)



1.1.7 Analýza jednotlivých MRP

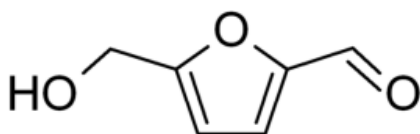
Fluorescenční sloučeniny

Monitorování Maillardovy reakce při zpracování potravin bylo tradičně založeno na spektrofotometrickém vyhodnocení vývoje barev při 420 nm. V poslední době hodnocení fluorescenčních sloučenin generovaných produktem Amadoriho přesmyku je dehydratace a štěpení. Kromě jeho použití v potravinových systémech se měření fluorescence používá také k vyhodnocení Maillardovy reakce za fyziologických podmínek (Delgado-Andrade a kolektiv, 2006). Fluorescenční sloučeniny (FC) jsou nazývané jako prekurzory hnědých pigmentů vytvořených v Maillardově reakci, které v současnosti odlišují různé chemické struktury. Hodnocení změn intenzity fluorescence pomáhá vyhodnotit rozsah Maillardovy reakce v potravinářských výrobcích (Morales a Van Boekel, 1998; Rufián-Henares a Delgado-Andrade, 2009) a biologických systémech. Fluorescence byla použita k vyhodnocení tvorby MRP poprvé v mléce, v dnešní době se sleduje v obilovinách, sušenkách a pekařských výrobcích.

Furan a HMF

Pro chuťový průmysl má furan a HMF velký význam (Anese a Suman, 2013). Hydroxymethylfurfural (HMF) je meziprodukt, který se vytvoří během Maillardovy reakce a degradací hexózu při vysokých teplotách za kyselých podmínek, (obrázek č. 3) (Arribas-Lorenzo a Morales, 2010).

Obrázek 3: Strukturální vzorec HMF

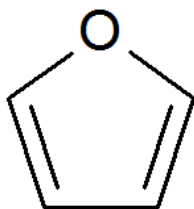


Hydroxymethylfurfural se vyskytuje v mnoha potravinách, jako jsou snídaně cereálie, toasty, džem, med, jablečná šťáva, pomerančová šťáva, káva, čokoláda a sušenky (Teixidó a kolektiv, 2011). Tvoří se dvěma způsoby: První cesta je MR a dehydratace cukru (karamelizace), což vysvětluje široký výskyt v potravinách (Gökmen a Morales, 2014). K tvorbě HMF prostřednictvím Maillardovy reakce dochází, když se redukující hexózy zahřívají v přítomnosti aminokyselin nebo proteinů (Gökmen a Morales, 2014). HMF se

vytváří degradační Amadoriho produkty, pokud jsou podmínky pro zahřívání vhodné (Gökmen a Morales, 2014). Druhou cestou, která vede k produkci HMF, je dehydratace cukru za kyselých podmínek. Tato reakce vyžaduje vyšší teploty než MR, aby se vytvořil HMF (Gökmen a Morales, 2014). Ketózy produkují více HMF než aldózy. Výtěžek reakce se zvyšuje s rostoucí teplotou a koncentrací kyselého katalyzátoru. Na tvorbu HMF z cukrů má vliv mnoho faktorů, jako je např. čas, aktivita vody, teplota, množství a typ použitého katalyzátoru a cukrů (Perez Locas a Yaylayan, 2008). HMF se stanovuje spektrofotometrickými (kolorimetrickými) metodami, které jsou nejběžnější pro stanovení v potravinách. Mají omezenou přesnost, protože jiné chromofory mohou v potravinách absorbovat záření ve stejné oblasti vlnové délky, což může způsobit chyby při vyhodnocení výsledků. Kolorimetrické metody mají nízkou citlivost. Nejpřesnější pro tento účel jsou chromatografické metody (plynová a kapalinová chromatografie s vysokým rozlišením) a jsou tedy citlivější. Jejich největší výhodou je individuální stanovení HMF a furfuralu, což spektrofotometrické metody nedokáží (Erbersdobler a Somoza, 2007; Morales a kolektiv, 1997; Rufián-Henares a kolektiv, 2001).

Furan je přítomen v konzervovaných potravinách ve skleněných dózách (Kim a kolektiv, 2010), pro kojeneckou výživu (Jestoi a kolektiv, 2009). Furan je klasifikovaný jako potenciálně karcinogenní pro člověka (IARC, 1995). Hlavní cestou tvorby furanu je tepelně oxidační degradace kyseliny askorbové a polynenasycených mastných kyselin (Gül a kolektiv, 2015). Ke tvorbě furanu dochází během zpracování potravin prostřednictvím tepelné degradace a uspořádání cukrů během Maillardovy reakce (Crews a Castle, 2007). V Evropě byla definována některá doporučení týkající se hladiny furanů v potravinách (The European Commission, 2014). Strukturální vzorec furanu je uvedený na obrázku č. 4.

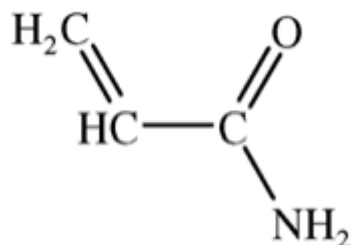
Obrázek 4: Strukturální vzorec furanu



Akrylamid

Akrylamid (strukturní vzorec na obrázku č. 5) byl klasifikován jako pravděpodobně karcinogenní pro člověka (IARC, 1994). Akrylamid byl nalezen v různých potravinách: v kávě (Banchero a kolektiv, 2013; Summa a kolektiv, 2007), sušenkách (Graf a kolektiv, 2006), chlebu (Keramat a kolektiv, 2011), bramborových lupínkách (Mestdagh a kolektiv, 2008; Ou a kolektiv, 2008), zralých olivách (Casado a kolektiv, 2010), a u kojenecké výživy (Guerra-Hernández a kolektiv, 1999; Mojska a kolektiv, 2012). Při tvorbě akrylamidu byly nalezeny různé cesty a meziproducty (Stadler a Studer, 2015). Akrylamid se vytváří degradací asparaginu v přítomnosti redukujících cukrů v mezistupni MR (Mottram a kolektiv, 2002; Gökmen, 2015; Stadler a kolektiv, 2002; Yaylayan a kolektiv, 2003; Stadler a kolektiv, 2004). Akrylamid se tvoří během tepelného zpracování u smažení nebo pečení. Vysoké množství akrylamidu se nachází v potravinách, které mají vysoký obsah cukru (Gökmen, 2015). V současnosti nejsou nastavené žádné limity pro akrylamid v potravinách, ale Evropský úřad pro bezpečnost potravin vydal doporučení (EFSA) (The European commission, 2013). Pro hranolky k přímé spotřebě 600 µg/kg, bramborové lupínky z čerstvých brambor a z bramborového těsta 1000 µg/kg, měkký pšeničný chléb 80 µg/kg, měkký chléb jiný než pšeničný chléb 150 µg/kg, sušenky a oplatky 500 µg/kg, krekrý s výjimkou bramborových krekrů 500 µg/kg, křupavý chléb 450 µg/kg, perník 1 000 µg/kg, výrobky podobné ostatním výrobkům této kategorie 500 µg/kg, pražená káva 450 µg/kg, instantní (rozpustná) káva 900 µg/kg, převážně obilné náhražky kávy 2 000 µg/kg, jiné náhražky kávy 4 000 µg/kg, sušenky a suchary pro kojence a malé děti 200 µg/kg (The European commission, 2013).

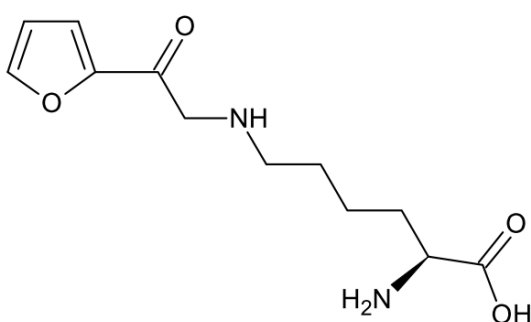
Obrázek 5: Strukturní vzorec akrylamidu



Furosin

Furosin neboli (ϵ -N-2-furoylmethyl-L-lysine) patří mezi Amadoriho sloučeniny a jeho strukturní vzorec je zobrazen na obrázku č. 6. Prekurzorem je lysin. Obsah furosinu, který je přítomný v potravinách, je ovlivněn druhem tepelného zpracování a dobou skladování. Po dlouhodobějším skladování jeho koncentrace klesá za vzniku dalších sloučenin, jako je např. CML (N-(carboxymethyl)lysin) (Delgado-Andrade a kolektiv, 2005b; Friedman, 1996; Rufián-Henares a kolektiv, 2009).

Obrázek 6: Strukturní vzorec furosinu

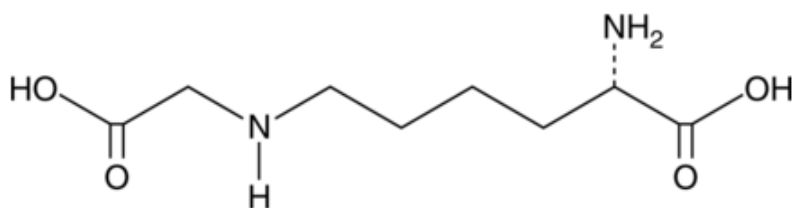


Furosin je nejdůležitějším a nejkonkrétnějším indikátorem počáteční fáze Maillardovy reakce. Jeho detekce je široce používaná při stanovení dostupnosti lysinu. Přítomnost furosinu je důležitým ukazatelem ztráty biologické hodnoty proteinu. Monitorování tvorby a obsahu furosinu pomáhá přizpůsobit podmínky zpracování, aby bylo zaručeno zachování nutriční hodnoty potravinářských výrobků (Rufián-Henares a kolektiv, 2004, 2006; Resmini a kolektiv, 1990).

N ϵ -(carboxymethyl)lysin

N ϵ - (karboxymethyl) lysin (CML) je stabilní Maillardův produkt s nízkou reaktivitou, na obrázku č. 7. CML je jedním z nejdůležitějších ukazatelů bioaktivních produktů MRP a jeho obsah obvykle souvisí se zdravotním rizikem po požití tepelně ošetřených potravin (Charissou a kolektiv, 2007).

Obrázek 7: Strukturální vzorec CML



Obsah Nε-(carboxymethyl)lysin (CML) se stanovuje v potravinách s využitím: a) Vysokoúčinné kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi (RP-HPLC), b) Plynové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) po methylaci karboxylové skupiny a acylaci aminoskupiny (Charissou a kolektiv, 2007).

1.1.8 Výhody a nevýhody Maillardovy reakce

Maillardovu reakci výrobci potravin často používají k tomu, aby vyvinuli atraktivní barvu, křupavou texturu, zlepšili chuť a vůni. Také zlepšuje organoleptické vlastnosti potravin (chléb, pečené produkty, koláče, maso, ryby, kakao, pražená káva, ořechy, pizza, pivo). Zlepšuje také antioxidační aktivitu potravinářských výrobků. V průměrné lidské stravě se vyskytuje významné množství Maillardových produktů (O'Brien a kolektiv, 1989; Rufián-Henares a De la Cueva, 2008; Pastoriza a Rufián-Henares, 2014; Markowicz a kolektiv, 2012; Losso, 2016). Potraviny, které obsahují velké množství lipidů, mohou během různých způsobů tepelných úprav podléhat oxidační reakci, kdy vznikají oxidační produkty, jako jsou aldehydy a ketony (Domínguez a kolektiv, 2014), které mohou přispívat k Maillardově reakci jako zdroje karbonylu. U potravin, které jsou bohaté na sacharidy, jako je zelenina, ovoce, nízkotučné mléko, jsou AGE relativně nízká i po tepelné úpravě. Důvodem je vysoký obsah vody, vitamínů, antioxidantů a neredukujících polysacharidů v těchto potravinách, které mohou snížit AGE (Uribarri a kolektiv, 2010). Vysoce glykované proteiny prostřednictvím Maillardovy reakce vykazují nižší bezpečnostní problémy ve srovnání s chemicky modifikovanými proteiny, a proto je lze použít jako funkční složky potravin ke zlepšení nutričních, texturních a senzorických vlastností potravinářských produktů (de Oliveira a kolektiv, 2016).

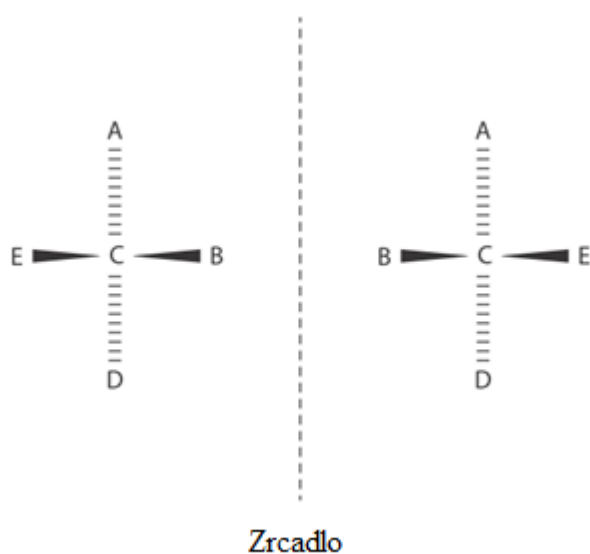
1.2 Sacharidy

Sacharidy tvoří více než 90% sušiny rostlin. Proto jsou široce dostupné a levné. Sacharidy se běžně vyskytují jako složky potravin, a přirozeně se vyskytující i jako přídatné látky. V různých produktech se nachází v různých množstvích. Mají různé chemické a fyzikální vlastnosti a odlišné fyziologické účinky na lidské tělo. Jsou dostupné při chemických, biochemických a v některých případech fyzikálních úpravách, které se používají ke zlepšení jejich vlastností a rozšíření jejich použití. Škrob, laktóza a sacharóza jsou spolu s D-glukózou, D-fruktózou s 70-80 % zdrojem energie v lidské stravě (Damodaran a kolektiv, 2017).

1.2.1 Monosacharidy

Sacharidy obsahují chirální atomy uhlíku, z nichž každý má čtyři různé, chemicky odlišné atomy nebo chemické skupiny, které jsou k němu připojeny, což vede ke vzniku dvou různých prostorových uspořádání atomů kolem daného chirálního centra. Jeden je odrazem druhého, který by člověk viděl v zrcadle, s atomy znázorněnými napravo od molekuly v jedné konfiguraci zobrazenými vlevo v druhém a naopak (viz obrázek č. 8) (Biliaderis a Izydorczyk, 2007; Embuscado, 2014).

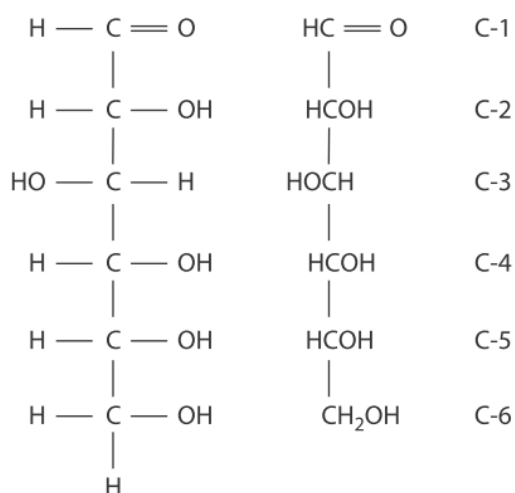
Obrázek 8: Chirální atom uhlíku se 4 různými atomy nebo funkčními skupinami (Biliaderis a Izydorczyk, 2007; Embuscado, 2014).



D-Glukóza

Nejčastěji se vyskytující organická sloučenina v přírodě (vyskytuje se ve všech kombinovaných formách cukrů), patří do monosacharidů. Monosacharidy jsou nejzákladnějšími uhlovodíkovými molekulami, které nelze hydrolýzou rozložit na jednodušší uhlovodíkové molekuly a jsou označovány jako tzv. jednoduché cukry. D-glukóza je klasifikována jako aldóza, protože obsahuje aldehydickou skupinu. Přípona „-osa“ označuje cukr; předpona „ald-“ označuje aldehydickou skupinu. D-glukóza je psána otevřeným nebo svislým přímočarým způsobem (obrázek č. 9). Přirozeně se vyskytující glukóza je reprezentována jako forma d, konkrétně D-glukóza, zatímco její obraz molekulárního zrcadla se nazývá L-glukóza. D-Glukóza a všechny ostatní aldózové cukry obsahující šest atomů uhlíku se nazývají hexózy, které představují skupinu aldóz, která jsou v přírodě nejčastější (Biliaderis a Izydorczyk, 2007; Embuscado, 2014).

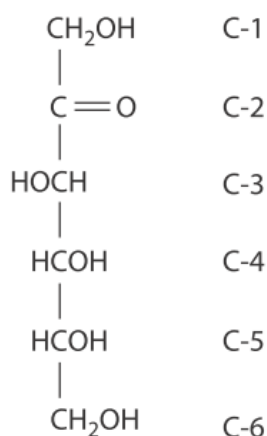
Obrázek 9: D-glukóza (otevřený, acyklický řetězec) (Biliaderis a Izydorczyk, 2007; Embuscado, 2014).



D-Fruktóza

Je to jedna ze dvou monosacharidových jednotek obsahujících disacharid sacharózy a tvoří ~ 55% běžného sirupu s vysokým obsahem fruktózy a asi 40% medu. D-fruktóza má pouze tři chirální atomy uhlíku (C-3, C-4 a C-5). Struktura D-Fruktózy na obrázku č. 10 (Biliaderis a Izydorczyk, 2007; Embuscado, 2014).

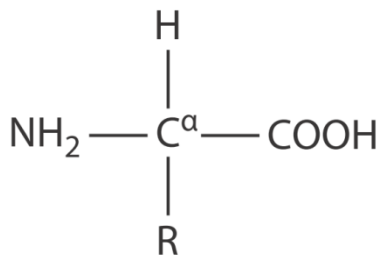
Obrázek 10: D-fruktóza (otevřený nebo acyklický řetězec)



1.3 Aminokyseliny

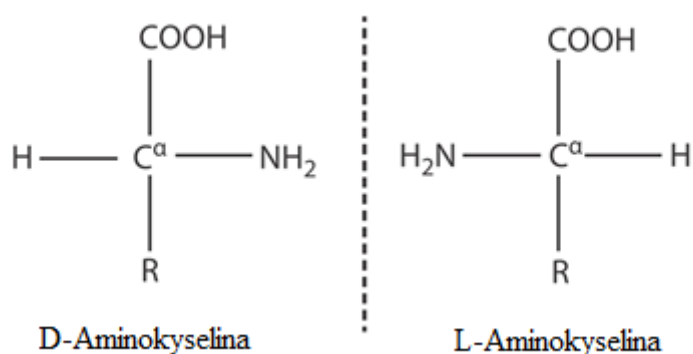
α -aminokyseliny jsou základní strukturní jednotky bílkovin. Tyto aminokyseliny se skládají z α -uhlíku připojeného kovalentně k atomu vodíku, aminoskupiny, karboxylové skupiny a R skupiny, která se běžně označuje jako postranní řetězec. Struktura aminokyseliny je na obrázku č. 11 (Damodaran a kolektiv, 2017).

Obrázek 11: Strukturní vzorec aminokyseliny (Damodaran a kolektiv, 2017)



Fyzikálně-chemické vlastnosti, jako je např. rozpustnost, chemická reaktivita a vodíkový vazebný potenciál aminokyselin, jsou závislé na chemické povaze skupiny R. Většina přírodních proteinů obsahuje až 20 různých aminokyselin spojených prostřednictvím amidových vazeb. Z nich 19 aminokyselin obsahuje primární aminovou skupinu a 1 (prolin) obsahuje sekundární iminovou skupinu (Böck a kolektiv, 1991). Většina aminokyselin kromě Glycinu jsou chirální, protože mají 4 různé substituenty na jednom atomu uhlíku. 19 z 21 aminokyselin vykazuje optickou aktivitu, tj. otáčejí rovinou polarizovaného světla. Všechny bílkoviny, které se vyskytují v přírodě, obsahují pouze L-aminokyseliny. Většina L-aminokyselin je pravotočivá. Na obrázku č. 12 je znázorněna L a D forma aminokyselin (Damodaran a kolektiv, 2017).

Obrázek 12: D a L forma aminokyselin (Damodaran a kolektiv, 2017)



Aminokyseliny obsahují karboxylovou skupinu (kyselou) a aminoskupinu (bazickou), chovají se jako kyseliny i jako zásady; to znamená, že jsou to amfolyty. Aminokyseliny lze rozdělit do několika kategorií na základě povahy interakce postranních řetězců s vodou. Aminokyseliny s alifatickými (alanin, isoleucin, leucin, methionin, prolin a valin) a aromatickými postranními řetězci (fenylalanin, tryptofan a tyrosin) jsou hydrofobní, a proto mají omezenou rozpustnost ve vodě. Polární (hydrofilní) aminokyseliny jsou rozpustné ve vodě a jsou buď nabitě (arginin, kyselina asparagová, kyselina glutamová, histidin a lysin) nebo nenabitě (serin, threonin, asparagin, glutamin a cystein) (Damodaran a kolektiv, 2017).

Hlavní faktor, který ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti bílkovin a peptidů jako je struktura, rozpustnost a vazebné vlastnosti tuků, je hydrofobicita (Pace a kolektiv, 2011).

Glycin

Glycin neboli (kyselina aminoocetová, kyselina aminoetanová) je neesenciální, neutrální a nejjednodušší aminokyselina obsahující 18,7% dusíku. Vzniká jako produkt rozkladu téměř všech proteinů. Jeho strukturní vzorec je uveden na obrázku č. 13. Dlouhodobý nedostatek bílkovin způsobuje selhání růstu, ztrátu svalové hmoty a poškození orgánů. (Beyer a Walter, 1997; Kohlmeier, 2003).

Všechny potraviny s výskytem proteinů obsahují glycin. Bílkoviny s relativně vysokým procentem glycinu jsou v hovězím (55 mg/g proteinu) a vepřovém (57 mg/g). Mléko obsahuje pouze 21 mg/g (Kohlmeier, 2003).

Glycin má zásadní roli ve výživě a metabolismu. Glycin představuje 11,5% z celkových aminokyselin (20% dusíkatých aminokyselin) v těle. Syntéza bílkovin představuje u kojenců 80% glycinů. Za zmínku stojí, že existuje mnoho cest pro využití glycinu k tvorbě glutathionu, kreatinu, purinů (RNA a DNA), hemoglobinů a serinu, z nichž všechny mají zásadní fyziologické funkce. Například proteiny obsahující krevní barvivo jsou zásadní pro transport kyslíku a mitochondriální biogenezi. Glycin, jako taurin, je hlavní aminokyselinou pro konjugaci žlučových kyselin u zvířat, které hrají klíčovou roli při trávení a absorpci lipidů a vitaminů rozpustných v tucích (Wu, 2013).

Obrázek 13: Strukturní vzorec glycinu



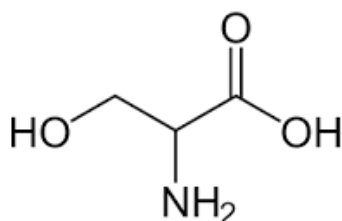
L-Serin

L-serin neboli kyselina 2-amino-3-hydroxypropanová je neesenciální aminokyselina obsahující 13,3% dusíku. Je potřebný pro syntézu proteinů, selenocysteinu a 3-dehydro-D-sfinganinu a je potenciálním prekurzorem glycinu, L-cysteinu a L-alaninu. Středně obohacenými zdroji jsou vejce (7,4%), fazole (5,5%), mléko (5,4%) a rýže (5,3%), kuřecí maso obsahuje menší procento (3,4%) (Kohlmeier, 2003; Wu, 2013).

L-serin byl v roce 1865 izolován E. Cramerem z hydrolyzátu hedvábného proteinu (nazvaného sericin). E. Cramer také správně určil složení L-serinu a zjistil, že se podobá alaninu. V roce 1901 E. Fischer a A. Skita získali serin z kyselých hydrolyzátů hedvábí. V roce 1902 E. Fischerem a E. Leuchsem byla stanovena struktura serinu chemickou syntézou z glykolového aldehydu a kyanohydrinu. V roce 1910 E. Embdenem a H. Tachauem

byl serin identifikován v lidském potu a v roce 1925 byl H. B. Vickeryem izolován extrakt ze zelených listů vojtěšky. V roce 1931 F. S. Daft a R. D. Coghill uvedli, že serin byl vysoce nestabilní, když byl zahříván v silném alkalickém roztoku. Toto zjištění připravilo cestu k optimalizaci aminokyselin analýzy proteinů. Výskyt serinu jako fosfátového esteru v kyselých hydrolyzátech proteinů (např. kaseinu) byl popsán F. A. Lipmannem a P. A. Levenem v roce 1932. F. A. Lipmannem a P.A. Levenem byl položen základ pro budoucí objev proteinové fosforylace v buňkách (Wu, 2013). Strukturální vzorec na obrázku je na obrázku č. 14.

Obrázek 14: Strukturální vzorec L-Serinu

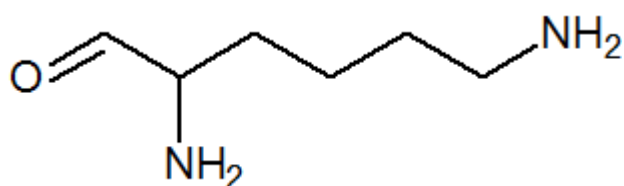


L-Lysin

L-Lysin neboli (2,6-diaminohexanová kyselina) je esenciální aminokyselina obsahující 19,2% dusíku. Je uvedena na obrázku č. 15. Je potřebná pro syntézu peptidů a proteinů a jako prekurzor karnitinu. Dlouhodobý nedostatek lysinu jako všech esenciálních aminokyselin nebo nedostatek proteinu způsobuje selhání růstu, ztrátu svalové hmoty a poškození orgánů. Potraviny obsahující lysin (jako procento z celkového proteinu) zahrnují vepřové maso (9,0%), hovězí maso (8,3%), kuřecí maso (8,0%), kravské mléko (7,9%), vejce (7,2%) a sója (6,5%). Zrna obsahují mnohem menší procento: u rýže (3,6%), pšenice (2,7%) a kukuřice (2,8%). Tepelné zpracování (pečení, grilování, opékání) může chemicky změnit lysin a vyvolat tvorbu tzv. Maillardových produktů, konjugátů lysinu a cukrů. Nachází se ve většině bílkovin (Beyer a Walter, 1997; Dworschak, 1980; Kohlmeier, 2003).

V roce 1889 E. Drechsel objevil L-lysin jako alkalickou látku v kaseinových hydrolyzátech. V roce 1891 M. Siegfried, jako člen Drechselovy laboratoře, identifikoval lysin jako složku v hydrolyzátech jiných proteinů, včetně konglutinu, glutenfibrinu a vaječného albuminu. Ve stejném roce bylo složení lysinu stanoveno E. Drechselem. V roce 1899 byla navržena A. Ellingerem struktura lysinu a v roce 1902 byla E. Fischerem a F. Weigertem stanovena chemickou syntézou z γ -kyanopropylmalonesteru. V roce 1928 byl krystalický lysin připraven americkými chemiky H. B. Vickeryem a C. S. Leavenworthem (Wu, 2013).

Obrázek 15: Strukturální vzorec L-Lysinu



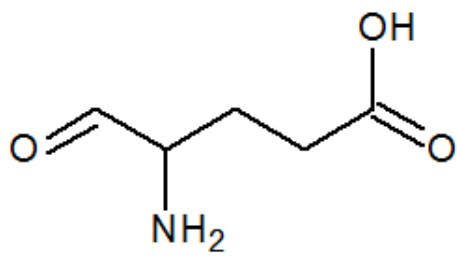
L-Glutamin

L-glutamin je neesenciální neutrální alifatická kyselina obsahující 15,7% dusíku. Vyskytují se v klíčících semenech. Hraje důležitou roli ve svalových bílkovinách. Také se vyskytuje v obilí, kde je přítomen lepek, může se nalézat v inzulinu. Na obrázku č. 16 je uveden jeho strukturální vzorec (Beyer a Walter, 1997; Kohlmeier, 2003).

Glutamin je ve vodných roztocích nestabilní, zejména při zahřívání (sterilizace), protože vytváří cyklický deaminační produkt (Kohlmeier, 2003).

Fyziologické funkce glutaminu: hraje důležitou roli v modulační sekreci hormonů (např. zvýšené uvolňování inzulínu a růstového hormonu, ale sníženou produkci glukokortikoidů), a účastní se více metabolických drah (např. syntézy nukleotidů a argininu). Je hlavním energetickým substrátem pro rychle se dělící buňky, včetně enterocytů a imunologicky stimulovaných lymfocytů, a dalších typů buněk (např. ledviny, během nedostatku potravy, retikulocytů a aktivovaných makrofágů). Glutamin je nezbytný pro tvorbu N-acetylglukosamin-6-fosfátu a je to běžný substrát pro syntézu glykoproteinů, které jsou zvláště bohaté na slizniční buňky a plasmatické membrány. Jako prekurzor glutamátu hraje glutamin roli v syntéze glutathionu, nejhojnějšího nízkomolekulárního antioxidantu v buňkách. Klíčovým enzymem je ODC pro přeměnu ornitinu na polyaminy, které stimulují syntézu DNA a proteinů. Glutamin zvyšuje střevní expresi genů, které jsou nezbytné pro růst buněk a odstranění oxidantů, zatímco snižuje expresi genů, které podporují oxidační stres a imunitní aktivaci. Buněčné signální dráhy jsou také regulovány glutaminem. Například v přítomnosti fyziologických koncentrací glukózy aktivuje glutamin MTOR v různých typech buněk, včetně kosterního svalu, tenkého střeva a placentárních buněk, fosforylací, čímž stimuluje syntézu proteinu a inhibuje intracelulární proteolýzu (Wu, 2013).

Obrázek 16: Strukturální vzorec L-Glutaminu



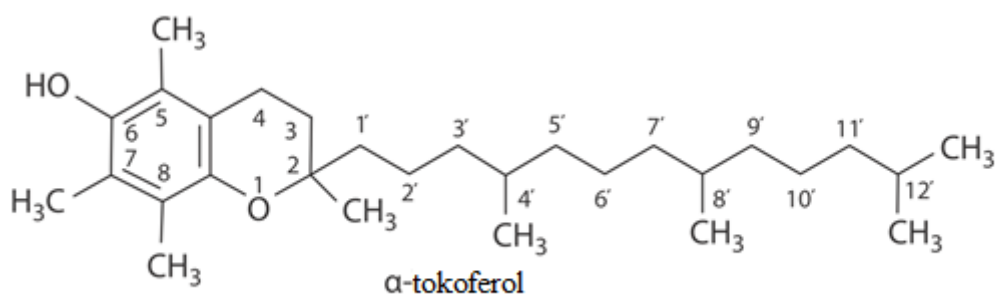
1.4 Antioxidanty

Používání antioxidantů v potravinách bylo neúmyslně praktikováno už od starověku, kdy populace, které žijí v horkém podnebí v zemích jako Indie, Thajsko a některých částech Číny (například provincie Sichuan), byly poučené zkušenostmi. Bylo to nejen kvůli působení koření jako antioxidantů, ale i kvůli jeho antimikrobiálním účinkům. S postupem času se stalo koření běžným antioxidantem. Antioxidanty jsou formulovány jako látky, které při jejich výskytu regulují, zpomalují nebo inhibují oxidaci, ale tím i zhoršují kvalitu potravin (Shahidi, 2015). Antioxidanty v těle snižují riziko degenerativních onemocnění, které jsou způsobené oxidačním stresem. Tato definice rozšiřuje definici, kterou původně vytvořil (Halliwell, 1999). Antioxidanty, které jsou přítomné v potravinách, mohou být buď primární nebo sekundární povahy. Primární antioxidanty neutralizují volné radikály buď to darováním atomu vodíku (přenos atomu vodíku nebo HAT), nebo mechanismem přenosu jediného elektronu (ET). Mezi neutralizační prooxidační katalyzátory patří chelátory prooxidačních kovových iontů (Cu a Fe), jejichž příklady jsou kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) a kyselina citronová (CA) nebo deaktivují reaktivní druhy, jako je betakaroten (Shahidi, 2015). Primární syntetické antioxidanty byly použity k zastavení volných radikálů, ke kontrole oxidace a vývoje chuti patří mezi ně butylovaný hydroxyanisol (BHA), butylovaný hydroxytoluen (BHT), propylgalát (PG) a terc-buthylhydrochinon (TBHQ) (Shahidi a Wanasundara, 1992).

Vitamín E

Vitamín E je antioxidant, který se rozpouští v tucích. Byl izolován z oleje z pšeničných klíčků. Získáván je hlavně z ořechů, olejů ze semen a obilovin. Jako vitamín E se označují: α -, β -, γ - a δ - tokoferoly a α -, β -, γ - a δ - tokotrienoly, ale nejvíce z těchto forem vitamínu E se z 90% vyskytuje α -tokoferol. Všechny tokoferoly a tokotrienoly obsahují aromatickou kruhovou strukturu, která obsahuje hydroxylovou skupinu, která jim umožňuje darovat vodík volným radikálům a působí jako biologické antioxidanty. Jsou stabilní a nereaktivní díky nepárovému elektronu, který je výsledkem dárcovství vodíku, je přemístěn do prstencové struktury tokoferolu. Nedostatek vitamínu E je pozorován u předčasně narozených dětí a u pacientů se vzácným dědičným onemocněním galaktózové intolerance (Pokorný a kolektiv, 2001). Na obrázku č. 17 je znázorněn strukturní vzorec α -tokoferolu (Damodaran a kolektiv, 2017).

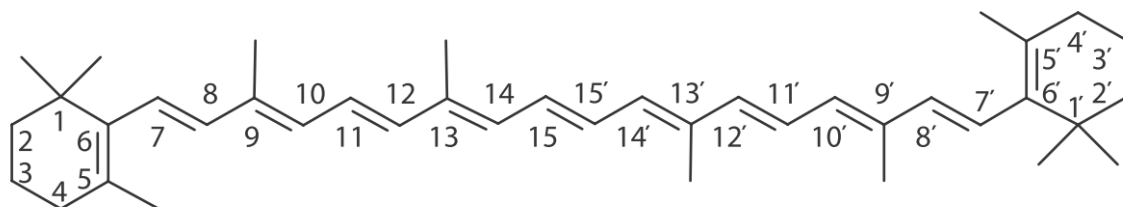
Obrázek 17: Strukturální vzorec α tokoferolu



Karoteny

V zelenině a ovoci bylo identifikováno 500 karotenoidů, které se vyskytují v lidské stravě. Většina těchto sloučenin se ale vyskytuje v nízkých koncentracích a velmi pravděpodobně mají malý nutriční význam. Nejznámějším karotenem je β -karoten (Wang, 1994), který je provitaminem vitamínu A, ale protože se v posledních letech zvýšil zájem o dietetické antioxidanty, zaměřil se na další karoteny jako lutein a lykopen, které se hodně vyskytují v rajčatech (Khachik a kolektiv, 1995; Giovannucci, 1999). Strukturální vzorec betakarotenu je na obrázku č. 18 (Damodaran a kolektiv, 2017).

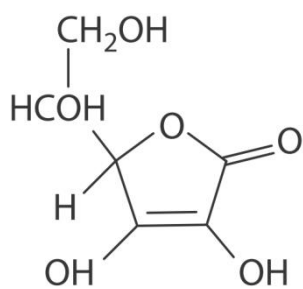
Obrázek 18: Strukturální vzorec β -karotenu



Vitamín C

Vyskytuje se jako kyselina L-askorbová a kyselina dehydroaskorbová v ovoci, zelenině a bramborách, ale i ve zpracovaných potravinách, do kterých byl přidán jako antioxidant. Má jednu nezpochybnitelnou funkci a to prevenci před kurdějemi. Vitamín C může poskytnout i jiné ochranné účinky proti rakovině a jiným onemocněním. Kurděje se vyskytují u dospělých, když obvyklý příjem vitamínu C poklesne pod 1 mg na den, k prevenci a zmírnění příznaků je dostatečné 10 mg na den (Bartley a kolektiv, 1953). Vitamín C má ochranný účinek proti rakovině žaludku, hltanu a jícnu (Block, 1991), ale důkazy o příčině jsou neprůkazné, protože složení ovoce a zeleniny, kde se vyskytuje nejvíce vitamínu, je složité. Na obrázku č. 19 je uvedený strukturální vzorec vitamínu C (Damodaran a kolektiv, 2017).

Obrázek 19: Strukturní vzorec vitamínu C (kyseliny L-askorbové)



1.5 Antioxidační metody

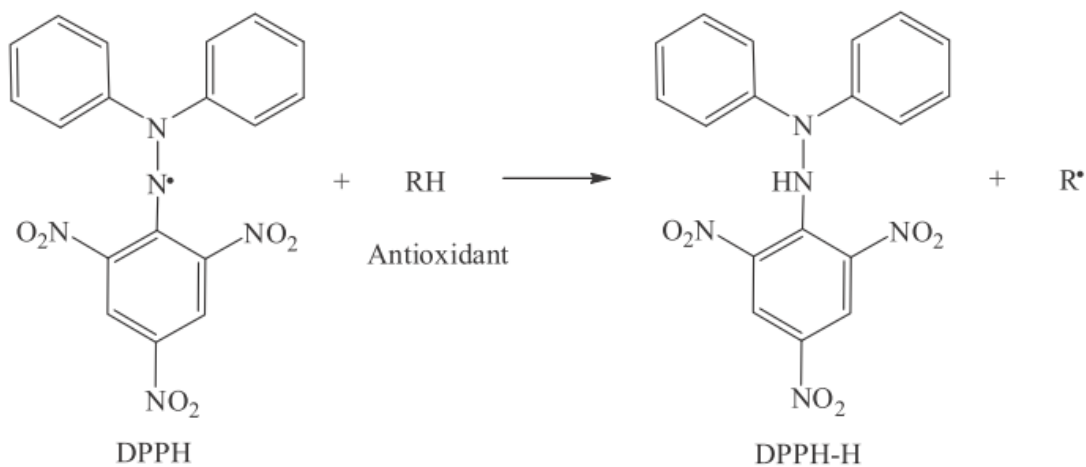
1.5.1 ABTS

Tato metoda je založena na přímé oxidaci diamoniové soli ABTS (2,2'-azinobis (kyselina 3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová)) s peroxosíranem draselným ($K_2S_2O_8$) za vzniku stabilního volného radikálu kationtu ($ABTS\bullet^+$). Modrozelená barva roztoku $ABTS\bullet^+$ je odbarvena v přítomnosti antioxidantů a toto odbarvení (redukce) je hodnoceno spektrofotometricky při 734 nm (Kim a Lee, 2009a; Sun a kolektiv, 2006a). Tyto redukce prostřednictvím přenosu elektronů a potlačení radikálů pomocí přenosu atomů vodíku (HAT) jsou dokumentovány mechanismy antioxidačních sloučenin, které jsou schopny zachytit radikály ABTS (Kim a Lee, 2009a). Antioxidační aktivita Maillardových reakčních produktů je vyjádřena jako $\mu\text{mol Trolox}$ (ve vodě rozpustný analog vitamínu E) na vzorek. Procenta inhibice Troloxu jsou porovnávána s procenty inhibice vzorku (Sun a kolektiv, 2006b).

1.5.2 DPPH

Metoda DPPH (Sharma a Bhat, 2009) se používá pro hodnocení volných radikálů, které vychytávají potenciál molekuly antioxidantu. Je jedna ze standardních a kolorimetrických metod pro hodnocení antioxidačních vlastností čistých sloučenin. Molekula DPPH má stabilní volný radikál, který se široce používá k vyhodnocení schopnosti sloučenin působit jako vychytávače volných radikálů nebo donory radikálových vodíků a tím měřit antioxidační aktivitu (Sharma a Bhat, 2009; Karioti a kolektiv, 2004; Kordali a kolektiv, 2005; Alma a kolektiv, 2003; Jabbari a Gharib, 2012; Jabbari a kolektiv, 2014; Jabbari a Moallem, 2015). V přítomnosti antioxidantů se DPPH mění z fialové na světle žlutou barvu, která odpovídá redukované formě DPPH, tj. 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazinu (DPPH-H) (Ionita, 2005) (obrázek č. 20). DPPH může také přispívat k homolytickým adicím s jinými radikály druhu $R\bullet$, což poskytuje deriváty substituované R-DPPH-H (Ionita, 2005).

Obrázek 20: Schéma přeměny volného radikálu DPPH na molekulu DPPH-H za přítomnosti antioxidantu



DPPH absorbuje v oblasti 520 nm (Ionita, 2005) v UV-VIS spektrech. Vypočítá se jako % inhibice s látkou Trolox (rovnice č. 1).

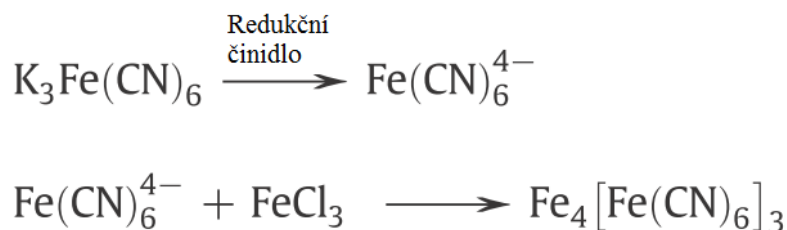
Rovnice 1: Vzorec pro výpočet inhibice s látkou Trolox

$$\text{DPPH (\% inhibice)} = \frac{A_{\text{s vodou}} - A_{\text{určitého kalibračního roztoku}}}{A_{\text{s vodou}}} \cdot 100$$

1.5.3 Stanovení redukčních vlastností

Redukční kapacita bioaktivní sloučeniny může být měřena přímou redukcí $\text{Fe}[(\text{CN})_6]_3$ na $\text{Fe}[(\text{CN})_6]_2$. Přidání FeCl_3 do redukováného produktu vede k vytvoření intenzivního komplexu Pruské modři Perl a vzniku $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$, který se měří při absorpenci 700 nm. Reakční schéma je znázorněno na obrázku č. 21 (Bursal a Gülçin 2011).

Obrázek 21: Schéma reakce



Při stanovení redukčních vlastností se mění barva zkoušeného roztoku ze žluté na odstíny zelené až modré v závislosti na redukční síle vzorků antioxidantů. Redukční vlastnosti sloučeniny mohou sloužit jako významný ukazatel jeho potenciální antioxidantní aktivity

(Gülçin a kolektiv, 2010c). Antioxidační sloučeniny redukují železité komplexy na železnou formu. Barevný komplex Pruské modři Perl byl vytvořen přidáním FeCl_3 do železnaté formy. Vyšší absorbance naznačují vyšší redukční sílu železité formy (Gülçin a kolektiv, 2002a).

1.5.4 Schopnost vychytávat H_2O_2

Tato metoda je založena na reakci železnatých iontů s 1,10-fenantrolinem. Železnatý iont tvoří červenooranžový komplex tri-fenantrolinu, který absorbuje v rozmezí 508-510 nm. Tato metoda byla dlouho používána pro kvantitativní měření železa ve vzorcích (Kolthoff a kolektiv, 1950). Pokud se do zkumavky přidá peroxid vodíku před přidáním 1,10-fenanthrolinu, H_2O_2 oxiduje železnatý na železitý iont, který není schopen tvořit červenooranžový komplex s 1,10-fenanthrolinem a při 510 nm můžeme vidět prudký pokles absorbance (Afsar a kolektiv, 1990; Bailey a Boltz, 1959). Po přidání železnatého iontu se přidá vychytávač a známé množství H_2O_2 na několik minut. Pokud je vychytávač dostatečně schopný zachytit H_2O_2 přidaný do vzorku, nedochází k žádné přeměně železnatého na železitý iont a tri-fenantrolinu se detekuje přidáním 1,10-fenantrolinu, což vede k červenooranžovému komplexu. Pokud vychytávač není schopen zachytit H_2O_2 , pak H_2O_2 převede veškerý železnatý iont na železitý, který není schopen tvořit barevný komplex s 1,10-fenanthrolinem. Schopnost vychytávat peroxid vodíku je stanovena podle rovnice č. 2.

Rovnice 2: Rovnice pro výpočet schopnosti vychytávat peroxid vodíku

$$\% \text{H}_2\text{O}_2 = \frac{A_{\text{vzorek}}}{A_{\text{s vodou}}} \cdot 100$$

A_{blank} absorbance roztoku obsahujícího pouze síran železnato-amonný a 1,10-fenantrolin

A_{vzorek} absorbance roztoku obsahujícího síran železnato-amonný, peroxid vodíku spolu s testovanou sloučeninou a 1,10-fenantrolin

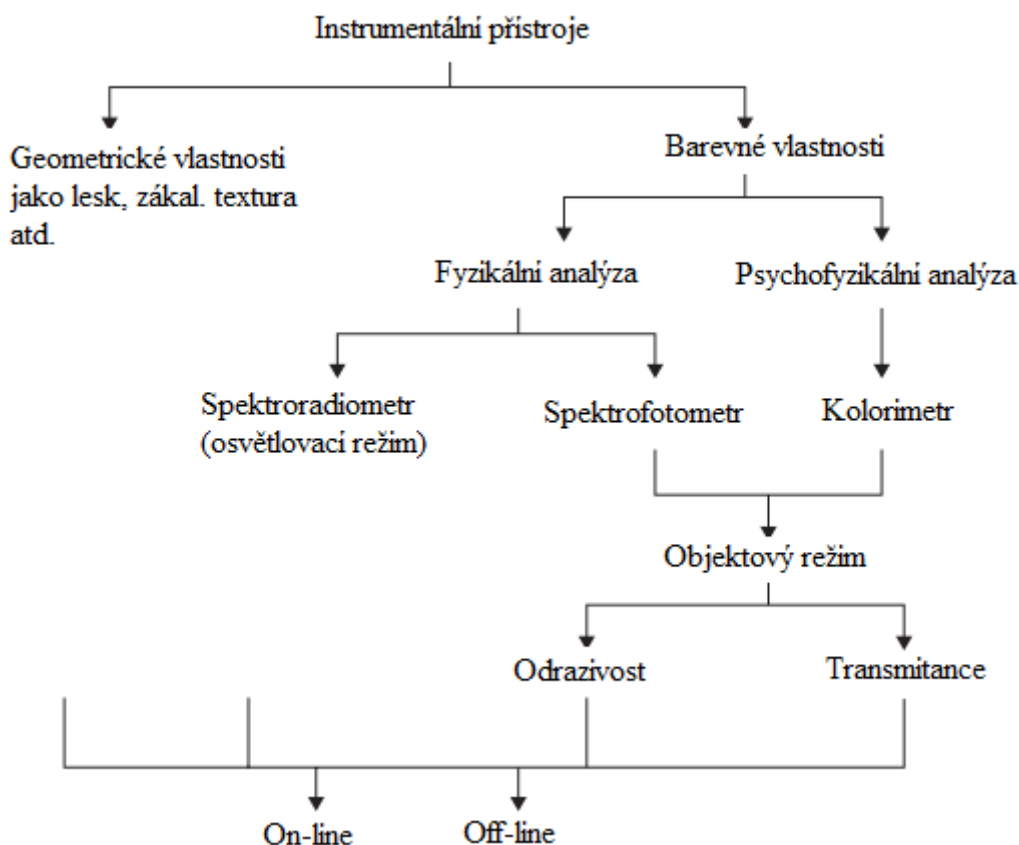
1.5.5 FRAP

Metoda je založena na redukci komplexu chloridu železitého s 2,4,6-tripyridyl-s-triazinu (TPTZ) na železnatou formu (Fe^{2+}) při nízkém pH. Tato redukce je sledována měřením změny absorpce za vzniku modré barvy. Koncentrace železnatých iontů se měří spektrofotometricky, které jsou produkované při 593 nm (Alam a kolektiv, 2013; Vhangani a Van Wyk, 2013; Khadidja a kolektiv, 2017). Redukční kapacita MRP je vyjadřovaná jako jednotky absorpance. Metoda se používá k hodnocení antioxidační aktivity (Lertittikul a kolektiv, 2007; Wang a kolektiv, 2013). FRAP je rutinní metoda, která se používá pro hodnocení antioxidační aktivity jednotlivých antioxidantů a celkové antioxidační aktivity na základě redukce železitého železa (Fe^{3+}) na železnatou formu železa (Fe^{2+}). Antioxidační kapacita byla stanovena pomocí kalibrační řady s látkou Trolox (Kim a Lee, 2009a).

1.5.6 Přístroje, které se používají k měření barevnosti

Přístroje pro měření barevnosti mohou měřit dva fyzické atributy (intenzita světelných zdrojů nebo odrazivost/propustnost objektů) nebo přímo psychofyzických (vizuální vnímání). Vizualní vnímání může poskytovat pouze omezené informace. Proto se kolorimetry, i když jsou ekonomicky výhodné, postupně nahrazují všestrannějšími, ale nákladnějšími spektrofotometry. Používají se tři typy přístrojů na měření barevnosti: kolorimetry, spektrofotometry a spektroradiometry. Tyto tři typy přístrojů jsou dostupné na trhu s různými požadavky náročnosti a specializace. Spektroradiometr měří v režimu osvětlovacího zařízení. Nedávný trend v řízení instrumentálních procesů vyústil v používání online nástrojů. Většina kolorimetrických nástrojů je však dosud offline a používají se většinou v laboratořích. Laboratorní přístroje by měly být vysoce přesné a standardizované, zatímco on-line nástroje by měly být robustní v různých prostředích a měly by mít dobrou přesnost. Klasifikace přístrojů pro měření vzhledu je znázorněna na obr. č. 22 (Choudhury, 2014).

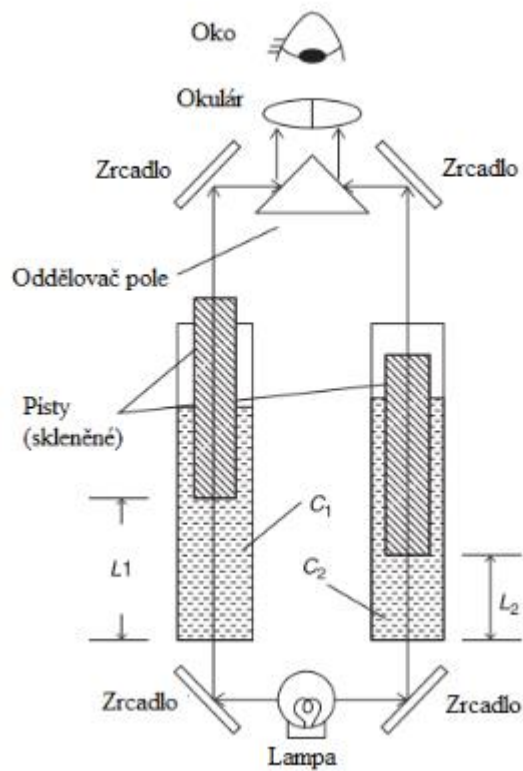
Obrázek 22: Klasifikace přístrojů pro měření vzhledu (Choudhury, 2014)



Kolorimetr je přístroj, který porovnává množství světla procházejícího roztokem s množstvím, které může projít vzorkem čistého rozpouštědla. Kolorimetr obsahuje fotobuňku, která je schopna detekovat množství světla procházejícího zkoumaným roztokem. Čím vyšší je koncentrace barviva v roztoku, tím vyšší je absorpce světla.

Kolorimetry se rozdělují do dvou skupin: vizuální a fotoelektrické. Vizuální kolorimetry se dělí na dva typy: vizuální měřič absorpce a skutečný vizuální kolorimetr. Vizuální měřič absorpce porovnává barvu zkoušeného, obvykle kapalného, vzorku se standardem a hledá mezi nimi shodu. Takový přístroj se používá na základě barvy pro chemickou analýzu a ke stanovení koncentrace. Skutečný vizuální kolorimetr klade důraz na vizuální rovnocennost nebo vizuální odhad. Schéma Duboscq kolorimetru je zobrazen na obr. č. 23 (Choudhury, 2014).

Obrázek 23: Schéma Duboscq kolorimetru (Choudhury, 2014)



kde: L_1 a L_2 jsou délky dráhy absorbujících roztoků

c_1 a c_2 jsou koncentrace, c_2 je známá koncentrace

Tento typ kolorimetru může porovnávat pouze optické vlastnosti roztoků konkrétní barvicí látky, ale to je vše, co je vyžadováno v mnoha testech pro hodnocení barev.

1.5.7 Stanovení obsahu fenolických látek podle Folin-Ciocalteua

Metoda Folin-Ciocalteu je kolorimetrická metoda pro stanovení celkových fenolických látek a jejich produktů (Waterhouse, 2002). Slinkard a Singleton (1977) uvedli, že tato metoda je nejlepší pro stanovení celkového obsahu fenolů v suchých vínech. Derkyi (2011) uvedl, že různé typy polyfenolů reagují s činidlem Folin-Ciocalteu podobně, což je snáze kvantifikovatelné (Chapuis-Lardy a kolektiv, 2002). Chapuis-Lardy a kolektiv (2002) použili metodu ke stanovení rozpustných fenolů ve vodě z listu eukalyptu. Zjistili, že metoda je rychlá, poskytuje velký počet vzorků a umožňuje charakterizovat fenolické látky. Metoda je založena na chemické redukci reakční směsi oxidů wolframu a molybdenu. Produkty redukce oxidu kovu mají modrou barvu, která má maximum absorpce při 765 nm (Waterhouse, 2002). Izopolyfosforečné wolframany jsou v oxidovaném stavu (6+) kovu bezbarvé, sloučeniny molybdenu jsou žluté. Koncentrace fenolických látek podle Folin-Ciocalteua ve vzorku byla stanovena pomocí kalibrační řady s kyselinou galovou (Colowick a kolektiv, 1999).

1.5.8 Chelatace železnatých iontů

Přechodné kovy, zejména železo a měď, jsou nezbytné pro produkci volných radikálů pomocí Fentonových reakcí. Také mohou iniciovat a propagovat peroxidaci lipidů. Železnatý iont má nejvyšší peroxidační účinek, proto sloučeniny s chelatační aktivitou kovů hrají při koncentraci klíčovou roli při snižování koncentrace přechodných kovů, které se podílejí na peroxidaci lipidů (Bai a kolektiv, 2017). Iontově chelatační afinita MRP a hydroxylové nebo pyrrolové skupiny jsou připisovány jejich antioxidačním aktivitám (Morales a kolektiv, 2005; Gu a kolektiv, 2010). HMW Maillardových reakčních produktů (> 50 kDa) získané v konečné fázi MR vykazovaly vyšší aktivitu chelatující kovy než u LMW (Gu a kolektiv, 2010). Chelatační aktivita kovů Maillardových reakčních produktů je částečně způsobena aniontovou povahou melanoidinů, což z nich dělá chelátory přechodných kovů. Atom dusíku ve své struktuře může chelatovat ionty mědi (Morales a kolektiv, 2005; Wang a kolektiv, 2011). Chelatační vlastnosti thiolových skupin v MRP odvozených od thiolu a hydroxylových skupin Amadori produktů byly popsány (Sproston a Akoh, 2016).

1.6 Spektrální metody

1.6.1 UV/VIS spektrofotometrie

UV/VIS spektroskopie je technika, která se nejčastěji používá pro kvantitativní měření roztoků, konkrétně pro stanovení koncentrací známých rozpuštěných látek. Aplikace UV/VIS spektrometrie na vzorky v pevném stavu však může také poskytnout cenné poznatky. Fyzikální principy, z nichž tato metoda vychází, jsou jednoduché, což usnadňuje složení spektrofotometru. Světlo o známé vlnové délce a intenzitě je směřováno na vzorek a jeho konečná intenzita je po průchodu měřena detektorem. Porovnáním dopadajícího záření (I_0) a propouštěného záření (I) lze snadno vypočítat množství světla absorbovaného vzorkem při dané konkrétní vlnové délce. Podle Lambert-Beerova zákona lze tuto absorpci použít k měření koncentrací známých rozpuštěných látek (Dyamenahalli a kolektiv, 2015). Lambert-Beerův zákon je zobrazen na rovnici č. 3.

Spektrální rozsah u UV/VIS oblasti je od 100 nm do 800 nm, ale běžnější je užší interval od 190 nm do 750 nm. UV oblast je v rozmezí 190-380 nm a viditelná oblast od 380-750 nm (Patience, 2013).

Rovnice 3: Lambert-Beerův zákon

$$A = \log_{10} \cdot \left(\frac{I_0}{I} \right) = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

A ... absorbance []

ε ... molární absorpční koeficient [$\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$]

c ... molární koncentrace [mol/l]

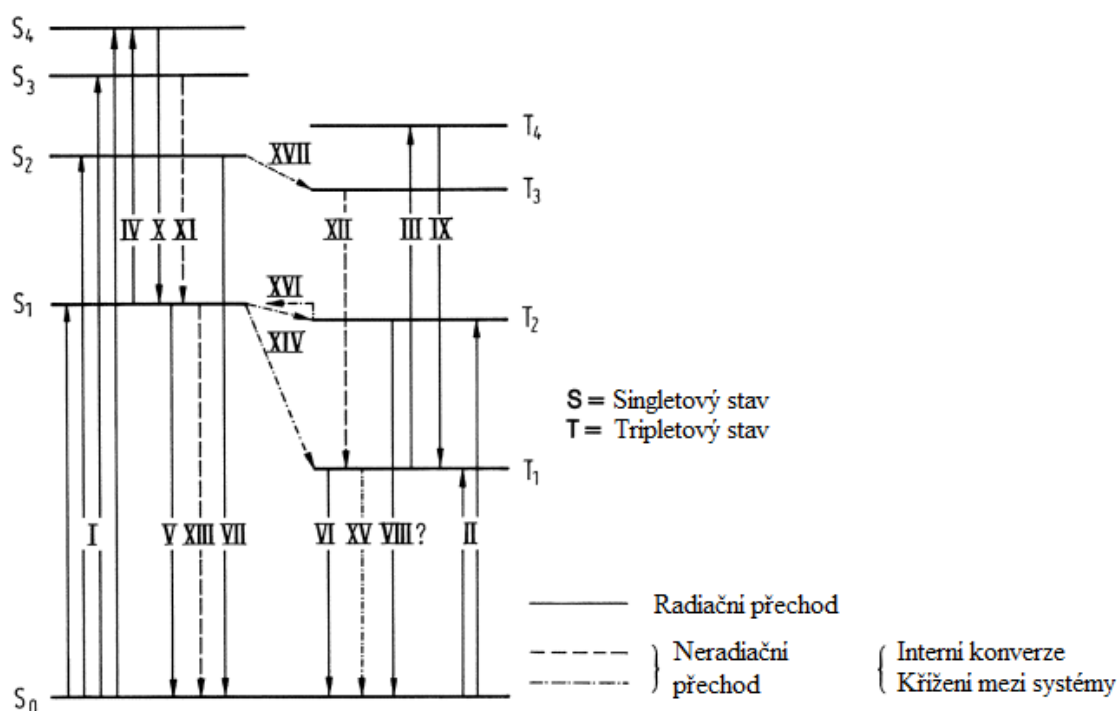
l ... délka kyvety [cm]

UV/VIS spektroskopie není vhodná v identifikaci sloučenin; je mnohem užitečnější při kvantitativním hodnocení (Dyamenahalli a kolektiv, 2015).

Hlavní fotofyzikální proces

Energetické stavy molekuly jsou shrnuty v diagramu. Obecný energetický diagram elektronických stavů používaný k vysvětlení primárních fotofyzikálních procesů je zobrazen na obr. č. 24, aniž by byly brány v úvahu vibrační stavy. Jednotlivé úrovně odpovídají různým energiím elektronů v singletových a tripletových stavech. Ze všech zobrazených přechodů zahrnuje standardní absorpční spektroskopie pouze přechod I. Z přechodů V a VI vzniká fluorescence a fosforescence. Přechody XI, XII a XIII jsou neradiační přechody, které jsou známé jako interní konverze. Přechody XIV a XVII jsou přechody mezi systémy. Přechod II ($T_1 \leftarrow S_0$) představuje absorpci singlet-triplet, je to interkombinační přechod, který je zakázán. Vyskytuje se tak s velmi nízkou intenzitou a pro pozorování tohoto přechodu jsou nutné speciální metody měření (Jaffeé a Orchin, 1962). Přechody III a IV jsou dvoufotonové přechody, kde T_1 nebo S_1 musí být excitovány primárně prvním fotonem. Rezonanční fluorescence je proces reprezentován VII a v praxi může být pozorován pouze v plynech za sníženého tlaku. Birks popsal hlavní fotofyzikální procesy (Klessinger, 1982).

Obrázek 24: Obecný energetický diagram elektronických stavů



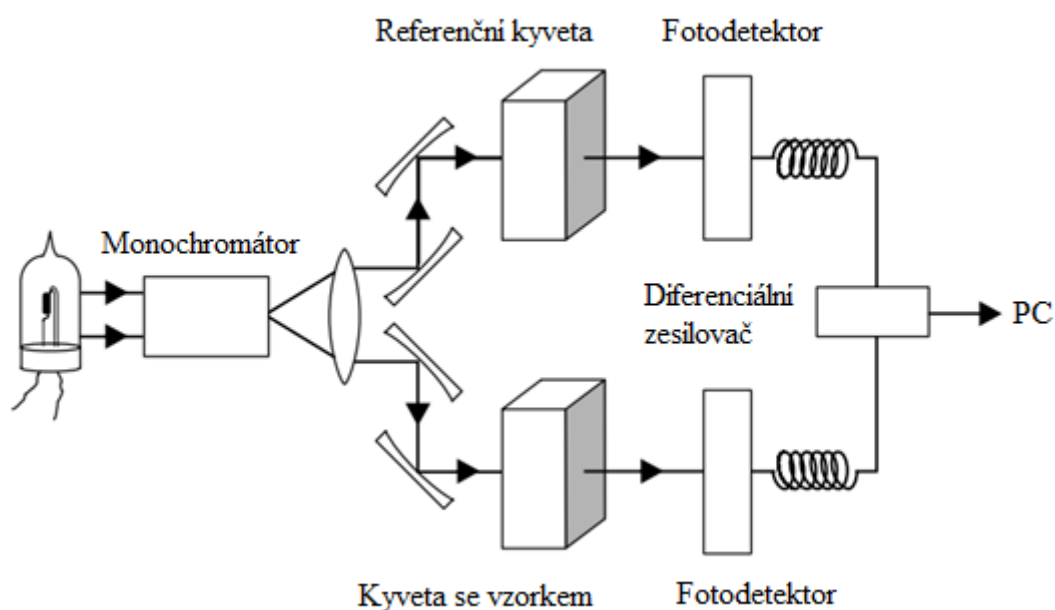
Dvoupaprskový spektrofotometr

Dvoupaprskový spektrofotometr používá k záznamu a odečtení základních linií od spektra dva světelné paprsky stejné intenzity spolu se dvěma fotonásobiči. Jeden světelný paprsek ozařuje kyvetu, která obsahuje analyt. Druhý ozařuje kyvetu, která obsahuje pouze vhodné rozpouštědlo. V podstatě jsou dvě spektra zaznamenávána současně, když je vlnová délka světla skenována v požadovaném rozsahu vlnových délek. Základní spektrum se potom odečte od spektra odpovídajícího vzorku analytu a získá se normalizované UV viditelné spektrum. Při použití tohoto přístroje musí platit tyto tři předpoklady:

- oba světelné paprsky musí mít stejnou intenzitu
- tyto dvě kyvety musí mít stejnou absorpční schopnost, měly by být stejné značky a typu
- je třeba předpokládat, že fotodetektory mají stejnou citlivost (Higson a Séamus, 2004).

Na obrázku č. 25 je schéma dvoupaprskového spektrofotometru.

Obrázek 25: Schéma dvoupaprskového spektrofotometru (Higson, 2004)



UV/VIS spektrometrie má svoje výhody (Brar a kolektiv, 2015) a nevýhody.

Výhody:

Instrumentální nastavení a aplikace UV-VIS je relativně přímočará a jednoduchá. Malá nebo skoro žádná příprava vzorku. Analýza probíhá velmi rychle. Spektrální skenování trvá do 1 minuty. Účinky odezvy, rozptylu a absorpce rozpouštědlem lze minimalizovat použitím slepého pokusu (s vodou).

Nevýhody:

Elektronický drift, změny napětí a účinků teploty mohou vyvolat elektronickou polarizaci nábojů. Chyby metody mohou často vyplývat z nelineárního chování materiálu vzorku (Thomas, 1996). Zdroj deuteria měří pouze pod 320 nm a zdroj wolframu nad 320 nm. Frakční množství absorbovaného světla a světla zbývajících pro přenos, vztahující se k tloušťce a koncentraci vzorku, může způsobit chyby (Swinehart, 1962).

1.6.2 IČ ATR/FTIR spektrometrie

Je to snadná nedestruktivní, použitelná a povrchově citlivá IČ vzorkovací technika pro in situ výzkum CMP procesů (Hind a kolektiv, 2001).

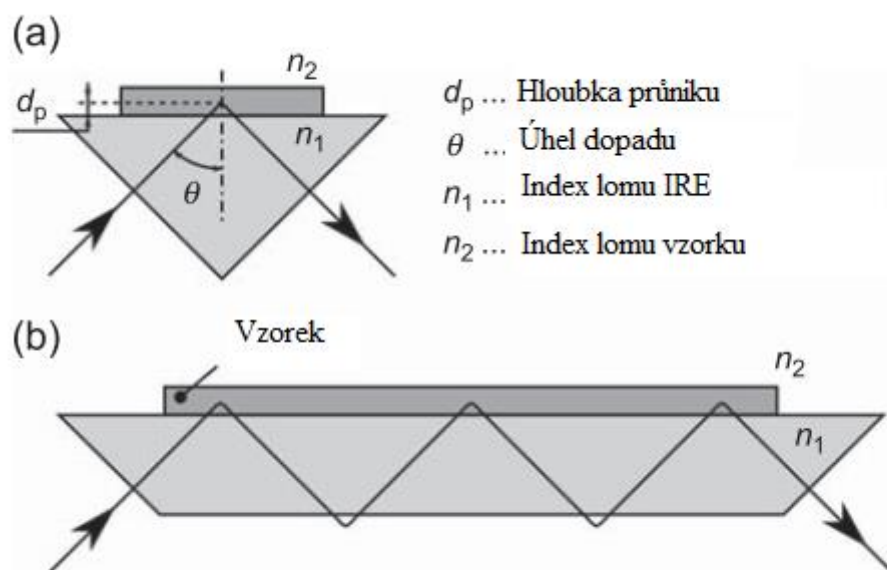
Princip:

ATR je založena na ztrátě intenzity infračerveného záření po úplném odrazu na jedné nebo více stěnách tzv. vnitřního odrazového prvku (IRE), který je vyrobený z vysoce refrakčního materiálu. Během úplného odrazu se v IRE na odrazové straně vytvoří vlna, která je kolmá k povrchu. Tato vlna proniká opticky „řidším“ médiem a existuje i za hranicí rozhraní exponenciálním signálem rozpadu. Energie této vlny se zcela odráží bez látky, která absorbuje infračervené záření v obálce evanescentní vlny. K útlumu dochází pouze díky sloučeninám, které absorbují infračervené záření, mřížkám, adsorbátům atd., uvnitř opticky tenčího média. Evanescentní vlna, pokud je s vysokým indexem dříve zachycena materiálem, než je její amplituda nulová, část vlny v tomto materiálu pokračuje. Toto se nazývá jako celkový vnitřní odraz (Babu a Suryadevara, 2016).

Záleží, z jakého infračerveno-transparentního materiálu s vysokým indexem lomu se vnitřní odrazový prvek (IRE) skládá: např. ze selenidu zinečnatého (ZnSe), bromidu thalnatého a jodidu (KRS-5), teluridu kadmennatého (CdTe) nebo z germania (Ge) (Hind a kolektiv, 2001). Tvar IRE je určen aspekty: musí být definován počet celkových odrazů, provedení je určeno příslušným měřicím příslušenstvím, infračervený paprsek musí zajišťovat úplný odraz na straně vzorku tím, že vstoupí a opustí vzorek pod stejným úhlem (Babu a Suryadevara, 2016).

Je hodně IRE s různými tvary (Harrick, 1967). Jednoduchý IRE pro jednotlivé odrazy jsou např. pravidelné trojúhelníkové hranoly, které jsou znázorněny na obrázku č. 25. (a). Pokud jde o vícenásobný odraz, IRE se skládá z rovnoběžných ploch, které jsou buď nakloněnými nebo kolmými plochami, odkud infračervený paprsek vstupuje či odchází 26. (b) (Babu a Suryadevara, 2016)

Obrázek 26: Schéma používaných ATR s jedním nebo více násobným odrazem (Babu a Suryadevara, 2016)



2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Metody, které jsou používány pro měření UV/VIS spekter jsou: spektrofotometrie, kolorimetrie a fotometrie. U této diplomové práce byla použita spektrofotometrická metoda. Příprava vzorku směsi a extraktu byly uvedeny v kapitole (2.3.1 a 2.3.2). Extrakty směsí glukózy s danou aminokyselinou byly proměřeny v oblasti od 200 do 800 nm. Vlnová délka do 200 nm je označována jako ultrafialová oblast. Látky, které absorbují záření do 380 nm jsou bezbarvé. V rozmezí vlnových délek 380 do 770 nm (viditelná oblast) se projevují jako barevné, absorbují sluneční záření. Absorpční spektra jsou vyjadřována jako závislosti absorbance na vlnové délce.

Pro měření infračervených spekter byl použit infračervený spektrometr s Fourierovou transformací (FTIR spektrometr) s technikou zeslabeného úplného odrazu (ATR). Na rozdíl od UV/VIS spekter, byly u infračervené spektrometrie měřeny přímo pevné vzorky směsí glukózy s danými aminokyselinami, postup byl uveden v kapitole 2.3.1. Suché vzorky směsí byly uchovávány v exikátoru na silikagelu a byly proměřeny v oblasti od 400 do 3900 cm^{-1} (střední IČ oblast). V této oblasti organické sloučeniny vykazují největší počet pásů. Infračervená spektra jsou vyjadřována jako závislosti absorbance (transmitance) na vlnočtu.

2.1 Chemikálie

ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)), 10 mg tab., Sigma-Aldrich

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, 98 %, Penta

DPPH (2,2-difenyl-1-(2,4,6-trinitrofenyl)-hydrazyl, 100 %, Sigma-Aldrich

Glycin, min. 99 %, Sigma-Aldrich

Hexakvano-železnatan trihydrát tetradraselný, 99,8 %, Lach-ner

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, 99,2 %, Lach-ner

5-hydroxymethylfurfural, 99%, Fluka

Chlorid železitý, 97 %, Sigma-Aldrich

L-glutamin, min. 99%, Sigma-Aldrich

L-lysin-monohydrát, >99 %, Merck

L-serin, min. 99 %, Sigma-Aldrich

Methanol, 99,9 %, Honeywell

o-fenantrolin, p.a., Lachema

Peroxid vodíku, >30 %, Fluka

Peroxodisíran draselný, >99 %, Sigma-Aldrich

Síran železnato-amonný, >99 %, Sigma-Aldrich
Trolox (\pm 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), >98 %, Fluka
D-Glukóza monohydrát, p.a. , Penta
Kyselina galová, >98 %, Fluka
Uhličitan sodný, >99,5 %, J. T. Baker
Folin & Ciocalteu's phenol reagent, Sigma-Aldrich
HCl, 35 %, Penta
NaOH, p.a., Penta
Kyselina octová, 99 %, Penta
TPTZ (2, 4, 6- tris(2-pyridyl)-s-triazin), \geq 98 %, Sigma-Aldrich
tetrahydrát FeCl₂, \geq 99 %, Sigma-Aldrich
Ferozin (3-(2-Pyridyl)-5,6-difenyl-1,2,4-triazine-p,p'- hydrát monosodné soli disulfonové kyseliny, 97 %, Sigma-Aldrich

2.2 Přístroje a zařízení

Analytické váhy, Kern ABT 220-4NM, Německo
UV-2600 UV-Vis Spektrofotometr, Shimadzu, Japonsko
Infračervený FTIR spektrometr s ATR technikou
Mikrocentrifuga, MiniStar silverline, VWR International, 6000/min., Korea
Skříňový termostat, Lovibond, Dortmund, Německo
Třepačka rotační, VWR International, 20/min., Mexiko
Ultrazvuková lázeň (Bandelin-sonorex RK31): Bandelin Electronic, Berlín, Německo
Vodní lázeň
Odměrné a laboratorní sklo
Plastová kapátka
Kyvety
Exsikátor
Keramická miska
Petriho misky

2.3 Pracovní postupy

2.3.1 Příprava vzorku směsi

Ve 20 ml destilované vody bylo rozpuštěno 0,05 molu glukózy a 0,05 molu příslušné aminokyseliny (glutaminu, glycinu, lysinu, a serinu). Po rozpuštění bylo dáno 10 ml této směsi na petriho misku o průměru 10 cm a směs byla zahřívána v sušárně s nuceným oběhem vzduchu při 100 °C po dobu 60 minut. Petriho misky byly v sušárně otevřené. Vzniklý hnědý prášek byl seškrábán, homogenizován v keramické třecí misce na jemný prach a vysušen v exsikátoru nad čerstvě vyžihaným silikagelem. Po ca 3 týdnech byly vzorky převedeny do suché a čisté plastové zkumavky. Plastové zkumavky byly uchovávány v exsikátoru se silikagelem.

2.3.2 Příprava extraktu směsi

S přesností na čtyři desetinná místa bylo naváženo 0,1 g práškové směsi glukóza + příslušné aminokyseliny (glutaminu, glycinu, lysinu, a serinu) a rozpuštěno přesně v 10 ml destilované vody v plastové zkumavce. Plastové zkumavky s danou směsí byly dány do rotační třepačky umístěné v termostatu při 25 °C po dobu 30 minut. Příprava 100 x zředěného vzorku: Z plastových zkumavek bylo odebráno 1,5 ml suspenze do ependorfeč, které byly dány na 5 minut do mikrocetrifugy při otáčkách 6000/min. Ze supernatantu byl odebrán 1 ml do 100 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku. Stejným postupem byly připraveny roztoky 50x a 10x ředěné. S takto připravenými vzorky byly prováděny všechny následující antioxidační metody.

2.3.3 Příprava roztoků a standardů

Příprava zásobního roztoku Troloxu o koncentraci 500 mg/l v metanolu

Byl připraven navážením 0,05 g do 100 ml odměrné baňky a doplněno metanolem po rysku.

Příprava 2-hydroxymethylfurfuralu o koncentraci 1500 mg/l

Byl připraven navážením 0,15 g do 100 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku.

Příprava 0,064 M peroxidisíranu draselného

Byl připraven navážením 0,1743 g do 10 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku.

Příprava 1 % hexakynoželeznatenu draselného

Byl připraven navážením 0,5 g do 50 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku.

Příprava 0,2 M fosfátového pufru o pH 7,4

Příprava 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ do 100 ml odměrné baňky:

Byl připraven rozpuštěním 7,164 g do 100 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku.

Příprava 0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ do 100 ml odměrné baňky:

Byl připraven rozpuštěním 3,121 g do 100 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku.

Bylo smícháno 40,5 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ a 9,5 ml $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ do 100 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku.

Příprava 0,1 % chloridu železitého

Byl připraven rozpuštěním 0,01 g do 10 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku.

Příprava 1 mM síranu železnato-amonného

Byl připraven rozpuštěním 0,040 g do 100 ml odměrné baňky a doplněno redestilovanou vodou po rysku.

Příprava 1 mM o-fenantrolinu

Byl připraven rozpuštěním 0,0198 g do 100 ml odměrné baňky a doplněno redestilovanou vodou po rysku.

Příprava 0,005 M peroxidu vodíku

Byl připraven pipetáží 28,3 μl 30 % H_2O_2 do 50 ml odměrné baňky a doplněno redestilovanou vodou po rysku. Vždy je důležité připravovat ho čerstvý a uchovávat ve tmě.

Příprava 5 % uhličitanu sodného

Byl připraven rozpuštěním 1,25 g do 25 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku.

Příprava 20 mM chloridu železitého

Byl připraven rozpuštěním 0,0811 g do 25 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku.

Příprava 10 mM roztoku TPTZ ve 40 mM HCl

Byl připraven rozpuštěním 0,1562 g do 50 ml odměrné baňky a doplněno 40 mM HCl po rysku.

Příprava 40 mM HCl

Byla připravena pipetáží 0,177 ml 35 % HCl do 50 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku.

Příprava 0,3 M octanového pufru o pH 3,6

Byl připraven ze dvou zásobních roztoků: 0,3 M NaOH a 2 M kyseliny octové. Bylo smícháno do 100 ml odměrné baňky 14,95 ml 2 M kyseliny octové a 6,3 ml 0,3 M NaOH a doplněno destilovanou vodou po rysku.

Příprava 0,3 M NaOH

Byl připraven rozpuštěním 0,3 g do 25 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku.

Příprava 2 M kyseliny octové

Byla připravena pipetáží 5,77 ml 99 % kyseliny octové do 50 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku.

Příprava 2 mM chloridu železnatého

Byl připraven rozpuštěním 0,0198 g do 50 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku.

Příprava 5 mM ferozinu

Byl připraven rozpuštěním 0,2462 g do 100 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku.

2.4 Antioxidační metody

2.4.1 Metoda ABTS

Tato metoda byla převzata z diplomové práce (Jarešová L., 2018) s mírnou modifikací. Radikál ABTS byl připraven rozpuštěním tablety (10 mg) v 5 ml destilované vody a bylo přidáno 100 μ l roztoku peroxidisíranu draselného, který měl koncentraci 0,064 mol/l. Tato směs byla ponechána při laboratorní teplotě ve tmě po dobu 16 hodin. Z tohoto roztoku bylo odebráno 2,5 ml do 100 ml odměrné baňky, která byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Do skleněné zkumavky s víčkem bylo pipetováno 3 ml roztoku radikálu a 300 μ l 100 x zředěného vzorku. Poté byly zkumavky nechány při laboratorní teplotě 40 minut ve tmě a následně byl změřen úbytek absorbance při vlnové délce 734 nm. Stejným způsobem byl také připraven slepý pokus, pouze místo 100 x zředěného vzorku byla přidána destilovaná voda. Antioxidační kapacita byla stanovena pomocí kalibrační řady s látkou Trolox, podle rovnice 1 (str. 40). Kalibrační řada Troloxu byla připravena ze zásobního roztoku o koncentraci 500 mg/l. Postupným ředěním byly připraveny kalibrační roztoky o koncentracích 300, 200, 100, 80, 60, 30, 20 a 10 mg/l. Všechny kalibrační roztoky byly doplněné metanolem po rysku.

2.4.2 Metoda DPPH

Tato metoda byla převzata z diplomové práce (Jarešová L., 2018) s mírnou modifikací. Do skleněných zkumavek s víčkem bylo pipetováno 3 ml metanolickeho roztoku DPPH radikálu o koncentraci 25 μ g/ml ($6,34 \cdot 10^{-5}$ mol) a 300 μ l 100 x zředěného vzorku. Zkumavky byly ponechány při laboratorní teplotě po dobu 40 minut ve tmě a poté byl změřen úbytek absorbance při 517 nm. Stejným způsobem byl také připraven slepý pokus, pouze místo 100 x zředěného vzorku byla přidána destilovaná voda. Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalent Troloxu, podle rovnice č. 1 (str. 40). Kalibrační řada Troloxu byla připravena ze zásobního roztoku o koncentraci 500 mg/l. Postupným ředěním byly připraveny kalibrační roztoky o koncentracích 300, 200, 100, 80, 60, 30, 20 a 10 mg/l. Všechny kalibrační roztoky byly doplněné metanolem po rysku.

2.4.3 Stanovení redukčních vlastností

Do skleněných zkumavek s víčkem bylo pipetováno 1 ml 100 x zředěného vzorku, 2,5 ml 1 % hexakvanoželeznatánu draselného a 2,5 ml 0,2 M fosfátového pufru o pH 7,4. Tato směs byla inkubována na vodní lázni při 50 °C po dobu 30 minut. Reakce byla ukončena přidáním 2,5 ml 10 % trichloroctové kyseliny. Ke spektrofotometrickému stanovení bylo odebráno do skleněných zkumavek s víčkem 2,5 ml roztoku, 2,5 ml destilované vody a 0,5 ml 0,1 % chloridu železitého. Absorbance byla měřena při 700 nm. Zvýšení absorbance reakční směsi vzorků indikovalo redukční vlastnosti (Jayaprakash a kolektiv, 2001).

2.4.4 Schopnost vychytávat peroxid vodíku

Tato metoda byla převzata z diplomové práce (Jarešová L., 2018) s mírnou modifikací. Do skleněných zkumavek s víčkem bylo pipetováno 0,25 ml 1mM síranu železnato-amonného s 62,5 µl peroxidu vodíku o koncentraci 5 mM a 500 µl 100 x zředěného vzorku. Směs byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Po inkubaci byl do skleněných zkumavek přidán 1,5 ml 1 mM o-fenantrolin, následovala další inkubace po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Byla změřena absorbance při 510 nm. Slepý pokus obsahoval 0,25 ml 1 mM síranu železnato-amonného, 1,562 ml destilované vody a 1,5 ml 1mM a o-fenantrolinu. Výsledek se vyjadřuje jako % vychytávající schopnosti peroxidu vodíku, podle rovnice č. 2 (str. 41).

2.4.5 Metoda FRAP

Tato metoda byla převzata z diplomové práce (Jarešová L., 2018) s mírnou modifikací. Ke stanovení byla použita směs, která obsahovala chlorid železitý o koncentraci 20 mmol/l, 10 mM roztok TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazin) ve 40 mM HCl a 0,3 M octanový pufr o pH 3,6 (bylo smícháno v poměru 1:1:10). Do skleněných zkumavek s víčkem bylo pipetováno 3 ml připraveného roztoku a 300 µl zředěného vzorku. Zkumavky byly ponechány na 45 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Po této době byla změřena absorbance při 593 nm. Stejným způsobem byl změřen i slepý pokus. Slepý pokus místo zředěného vzorku obsahoval destilovanou vodu. Antioxidační kapacita byla stanovena pomocí kalibrační řady Trolox. Kalibrační řada Troloxu byla připravena ze zásobního roztoku o koncentraci 500 mg/l. Postupným ředěním byly připraveny kalibrační roztoky o koncentracích 300, 200, 100, 80, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 4 a 2 mg/l. Všechny kalibrační roztoky byly doplněné metanolem po rysku.

2.4.6 Index hnědnutí

Intenzita zhnědnutí roztoků glukózy obsahujících aminokyseliny byla měřena proti destilované vodě při 420 nm bez korekce pomocí dvoupráskového spektrofotometru Shimadzu model UV-2600 UV-VIS. V případě potřeby může být provedeno vhodné ředění, aby byla optická hustota menší než 1,5 (Ajandouz a Puigserver, 1999) s mírnou modifikací. Stanovení indexu hnědnutí, viz. rovnice č. 4.

Rovnice 4: Stanovení indexu hnědnutí při 420 nm, bez korekce (Iwe a kolektiv, 2004) s mírnou modifikací

$$BI = A_{420}$$

2.4.7 Stanovení obsahu fenolických látek podle Folin-Ciocalteua

Tato metoda byla převzata z diplomové práce (Jarešová L., 2018) s mírnou modifikací. Do skleněných zkumavek s víčkem byl pipetován 1 ml vzorku (u vzorku glukózy + lysinu 50 x ředěného, u ostatních 10x zředěného), 6 ml destilované vody a 0,5 ml činidla Folin-Ciocalteua. Po 5 minutách stání byl pipetován 1 ml 5 % Na_2CO_3 . Zkumavky byly ponechány na 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Poté byla změřena absorbance při 765 nm. Současně byl také proměřen slepý pokus (kde místo vzorku byla použita destilovaná voda). Slepý pokus obsahoval 7 ml destilované vody, 0,5 ml činidla Folin-Ciocalteua a po 5 minutách byl přidán 1 ml 5 % Na_2CO_3 . Kalibrační řada kyseliny galové byla připravena ze zásobního roztoku o koncentraci 500 mg/l. Postupným ředěním byly připraveny kalibrační roztoky o koncentracích 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 a 10 mg/l. Všechny kalibrační roztoky byly doplněné metanolem po rysku.

2.4.8 Chelatace železnatých iontů

Tato metoda byla převzata z diplomové práce (Jarešová L., 2018) s mírnou modifikací. Do skleněných zkumavek s víčkem bylo pipetováno 3 ml 100x ředěného vzorku, 150 μl 2 mM FeCl_2 . Poté byla reakce zahájena přidáním 0,6 ml 5 mM ferozinu. Zkumavky byly promíchány a nechané na 10 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Poté byla změřena absorbance při 562 nm. Stejným způsobem byl také proměřen slepý pokus. Slepý pokus obsahoval 3 ml destilované vody a 150 μl 2 mM FeCl_2 . Vzorek s nižší absorbancí vykazuje vyšší chelatační schopnost železa.

2.4.9 Sledování absorbance u směsi 5-hydroxymethylfurfuralu a DPPH

Ke spektrofotometrickému měření bylo smícháno 3 ml radikálu DPPH o koncentraci 25 µg/ml a 300 µl 5-hydroxymethylfurfuralu o koncentraci 100 mg/ml. Absorbance byla měřena každých 18 sekund při 515 nm až do 8. minuty. Experiment byl prováděn při laboratorní teplotě a ve tmě. Tento experiment byl porovnán s prací Zhao a kolektiv (2013).

2.4.10 Sledování absorbance u směsi furfuralu s ABTS nebo DPPH

Ke spektrofotometrickému měření bylo smícháno: 3 ml radikálu ABTS a 300 µl furfuralu o koncentraci 1694 µg/l. Stejným způsobem bylo provedeno i druhé měření s DPPH. Absorbance byla zaznamenána každých 5 minut až do 20. minuty. U antioxidační metody ABTS bylo měření provedeno při 734 nm, u DPPH 515 nm. Poté bylo měření vyhodnoceno.

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

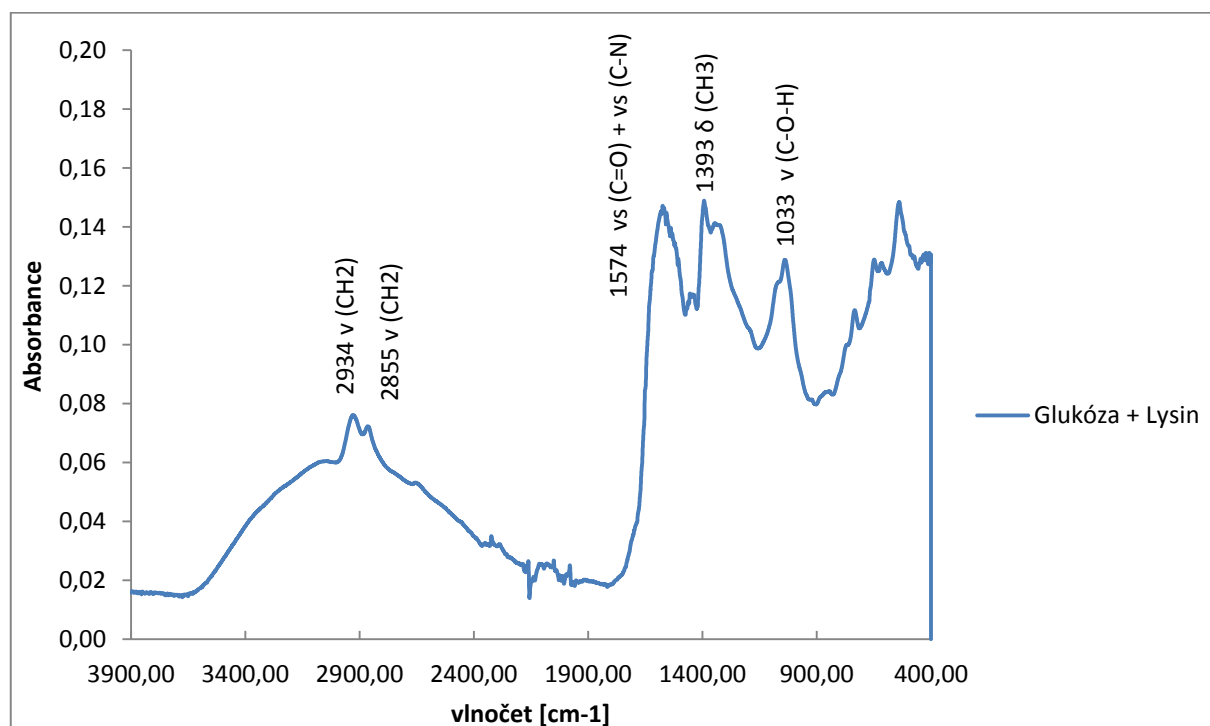
VÝSLEDKY

Před samotným spektrofotometrickým měřením některé antioxidační metody (ABTS, DPPH, FRAP) a stanovení fenolických látek podle Folin-Ciocalteua vyžadovaly optimalizaci inkubačního času. Optimalizace byla provedena spektrofotometrickým proměřením zkumavek s požadovanými chemickými sloučeninami po dobu 28 minut u antioxidačních metod: ABTS, DPPH, FRAP, 40 minut u stanovení fenolických látek podle Folin-Ciocalteua. Optimální čas byl zvolen tak, aby se hodnoty absorbance téměř neměnily.

Charakteristika a interpretace IČ spekter směsi glukózy s aminokyselinou (lysinu, glycinu, serinu a glutaminu)

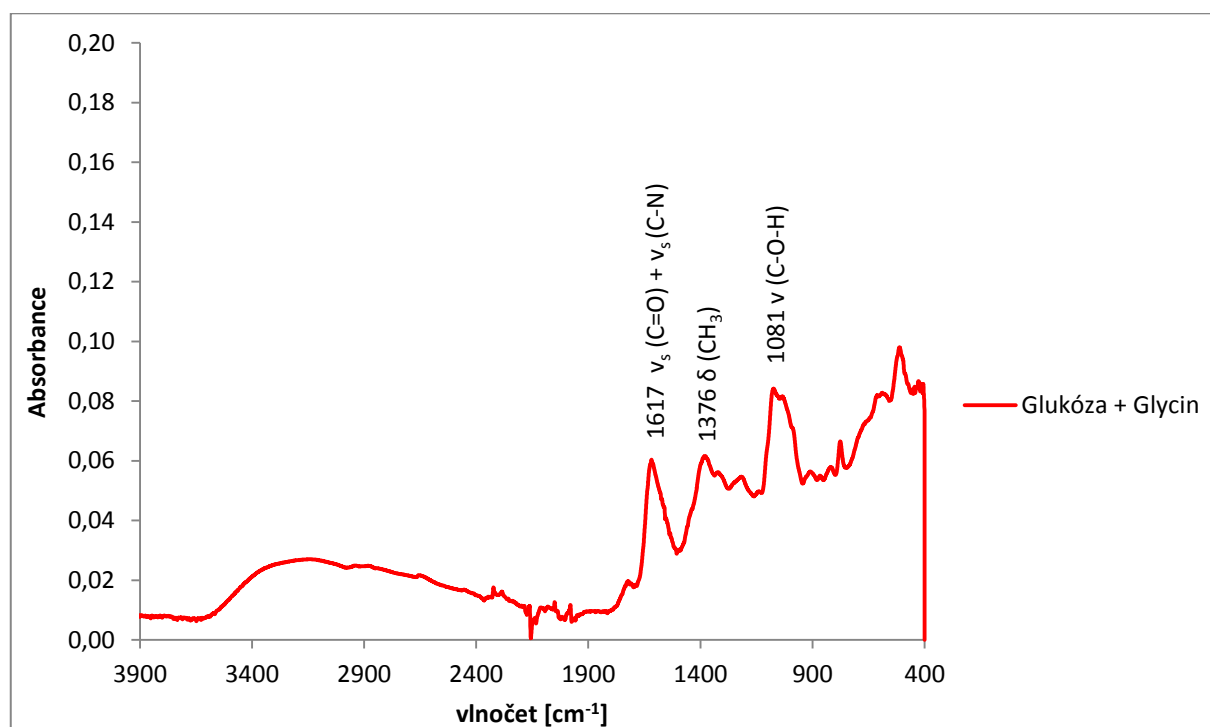
Suché hnědé dvousložkové směsi vzorků byly připraveny podle postupu, který byl uveden v bodě 2.3.1. Poté byly analyzovány 4 infračervené spektra směsi glukózy s danými aminokyselinami, které jsou zobrazeny na obrázcích 27, 28, 29 a 30. Na obrázku č. 27 je znázorněno infračervené spektrum směsi glukózy a lysinu.

Obrázek 27: Infračervení spektrum směsi glukózy a lysinu



Pásky nad 1000 cm^{-1} jsou přiřazovány ke skupinám C-O-C, C-CH a C-OH. Ve všech spektrech v rozmezí $1019\text{-}1081\text{ cm}^{-1}$ se vyskytuje skupina C-OH. Ve třech spektrech se vyskytuje deformační CH_3 v rozmezí od $1364\text{-}1393\text{ cm}^{-1}$. U infračerveného spektra směsi glukózy s lysinem se vyskytují valenční (CH_2) vibrace při 2855 a 2934 cm^{-1} . Také se u této směsi nachází amidová skupina $\nu_s(\text{C=O}) + \nu_s(\text{C-N})$ v oblasti 1574 cm^{-1} . Na obrázku č. 28 je znázorněno infračervené spektrum směsi glukózy a glycinu.

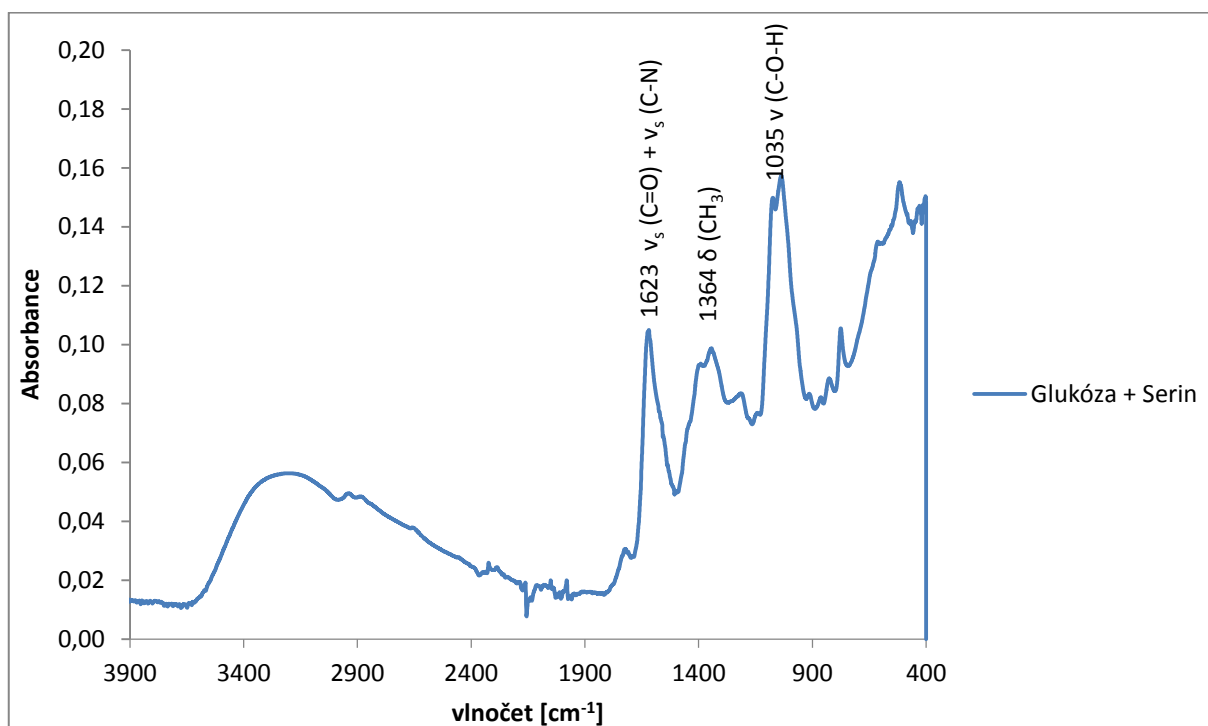
Obrázek 28: Infračervené spektrum směsi glukózy a glycinu



V infračerveném spektru směsi glukózy a glycinu se v oblasti 1617 cm^{-1} vyskytuje amidová skupina $\nu_s(\text{C=O}) + \nu_s(\text{C-N})$.

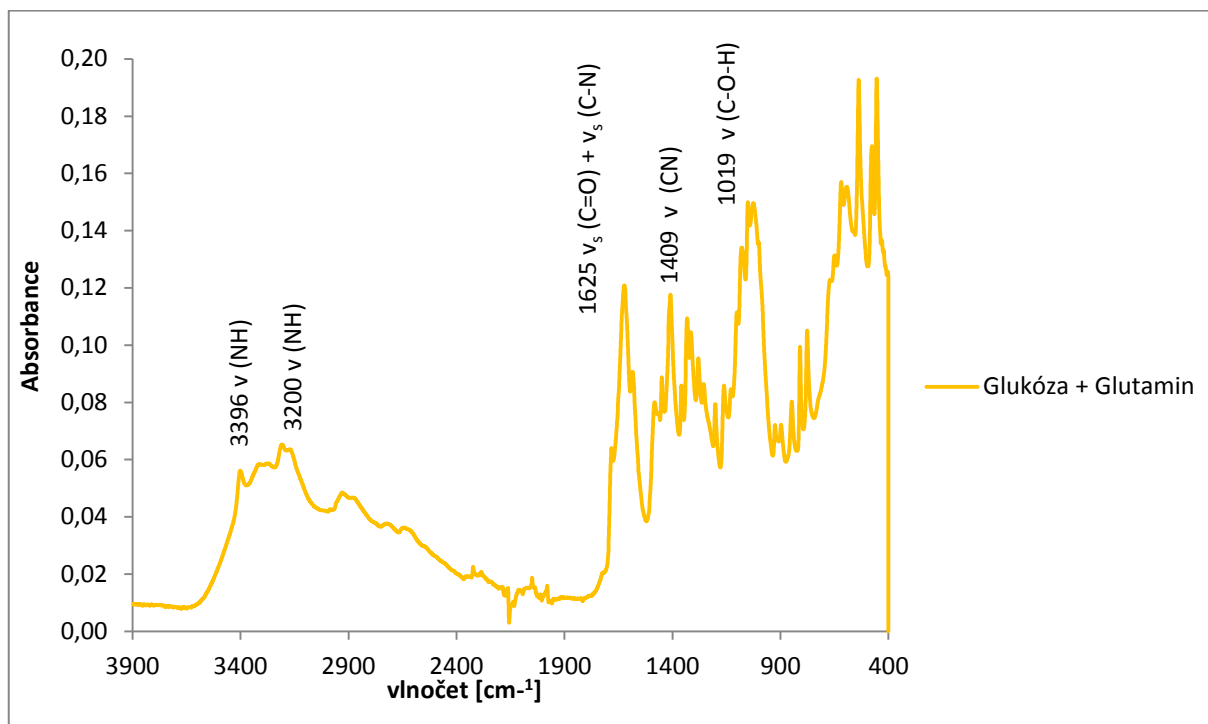
V infračerveném spektru směsi glukózy a serinu se v oblasti 1623 cm^{-1} nachází amidová skupina $\nu_s(\text{C=O}) + \nu_s(\text{C-N})$. Na obrázku č. 29 je znázorněno infračervené spektrum glukózy a serinu.

Obrázek 29: Infračervené spektrum glukózy a serinu



Poslední infračervené spektrum směsi je glukóza s glutaminem, infračervené spektrum je zobrazeno na obrázku č. 30. V oblasti 1409 cm⁻¹ se vyskytuje valenční vibrace (CN). Amidová skupina v_s (C=O) + v_s (C-N) se nachází v oblasti 1625 cm⁻¹. Valenční vibrace v (NH) se nachází v oblastech 3200 a 3396 cm⁻¹.

Obrázek 30: Infračervené spektrum směsi glukózy a glutaminu

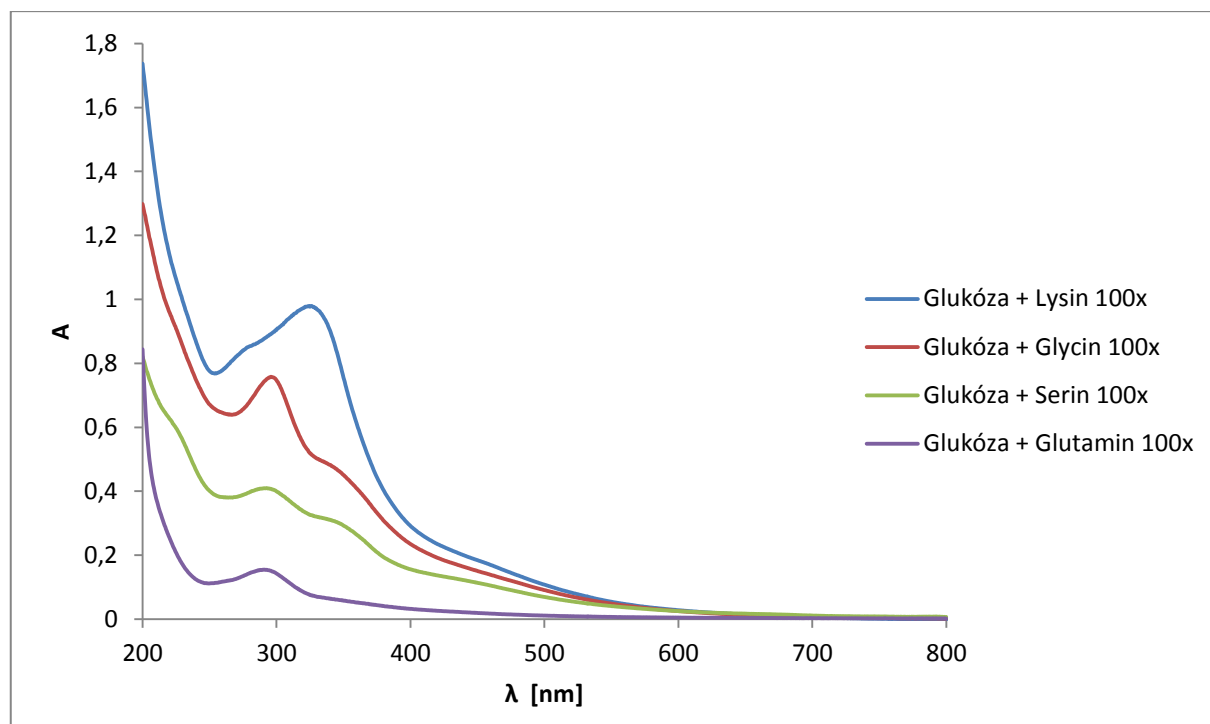


Charakteristika a interpretace UV/VIS spekter směsi glukózy s aminokyselinou (lysinu, glycinu, serinu a glutaminu)

Každá chemická sloučenina má svoje typické UV/VIS spektrum. Na prvním přiloženém obrázku č. 31 je zobrazeno spektrum směsi glukózy s jednotlivými aminokyselinami. Spektra jsou posunuta směrem doprava. Odlišují se od sebe v absorpčních maximech.

Největší absorpční maximum vykazovala směs glukózy s lysinem 0,98. Směs glukózy s glycinem vykazovala absorpční maximum 0,76. Směs glukózy se serinem vykazovala absorpční maximum 0,41. Nejmenší absorpční maximum měla směs glukózy s glutaminem 0,14.

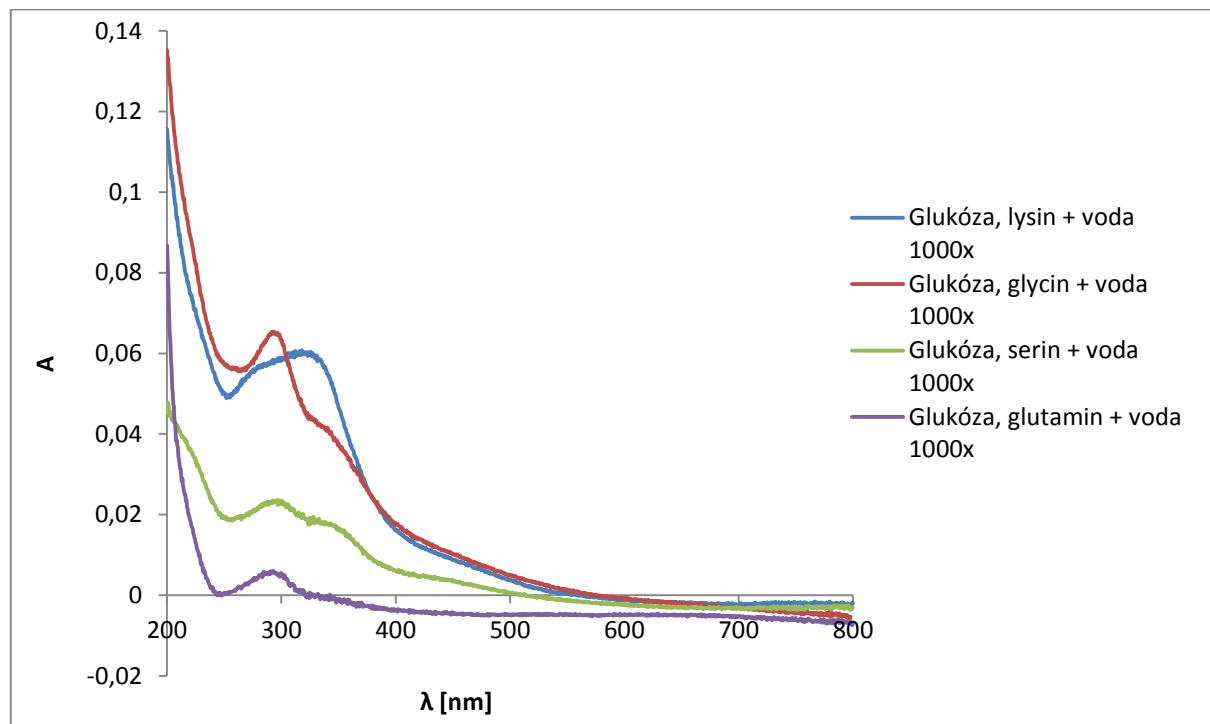
Obrázek 31: Absorpční spektrum extraktu směsi glukózy s jednotlivými aminokyselinami, 100x znázorňuje ředění



3 ml extraktu směsi glukózy s jednotlivými aminokyselinami (100x ředěno) byly smíchány s 300 μ l destilované vody. Celkové ředění směsí tedy bylo 1000x, jejich spektra jsou uvedena (Obrázek č. 32). Tato spektra byla vzájemně porovnávána. U spekter na obrázku č. 31 byly intenzivnější absorbance než u obrázku č. 32. Tady byly absorbance menší, protože vzorky byly navíc zředěny destilovanou vodou. Jinak se od sebe spektra neodlišují. Největší absorpční maxima vykazovala směs glukózy s glycinem a vodou 0,07. Směs glukózy s lysinem a vodou vykazovala absorpční maximum 0,06. Směs glykózy se

serinem a vodou 0,02. Nejmenší absorpční maximum vykazovala směs glykózy s glutaminem a vodou 0,01.

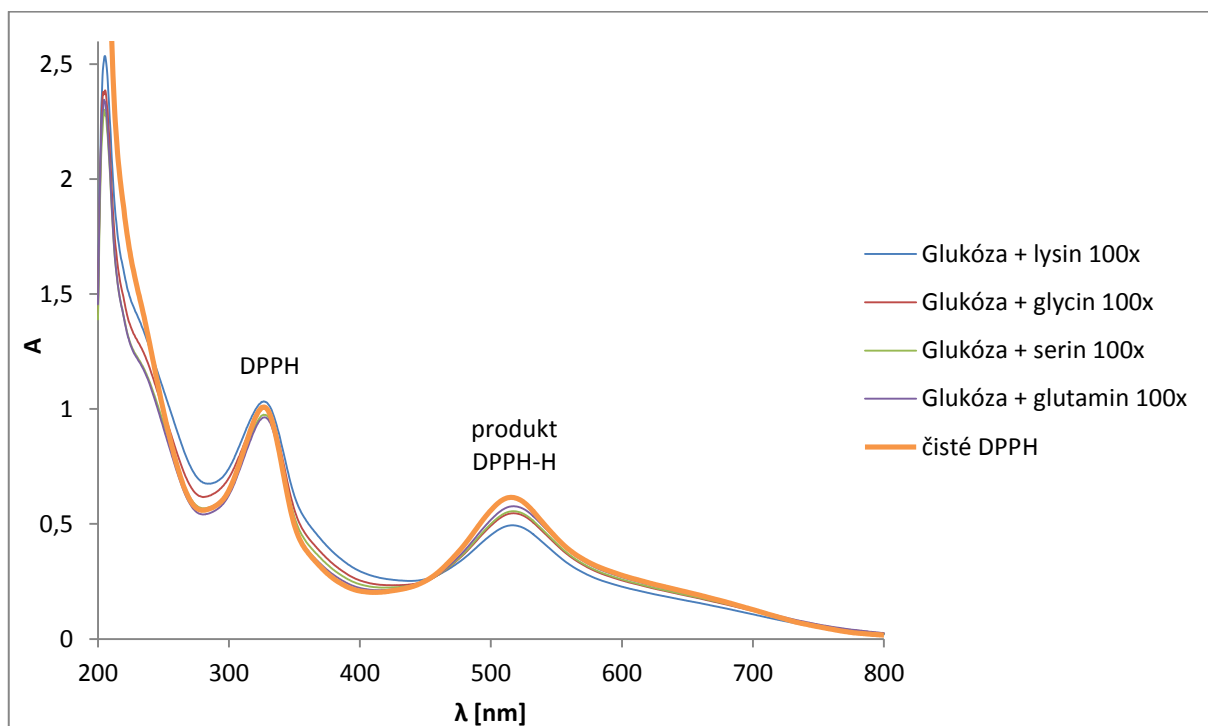
Obrázek 32: Absorpční spektrum extraktu směsi glukózy s jednotlivými aminokyselinami a destilovanou vodou, 1000x znázorňuje celkové ředění



Charakteristika a interpretace UV/VIS spekter směsi glukózy s aminokyselinou (lysinu, glycinu, serinu a glutaminu) s antioxidačními metodami ABTS a DPPH

Byla porovnávána spektra čistého DPPH se směsí glukózy a aminokyselin s metanolickým roztokem DPPH. Pro čisté spektrum bylo dáno do kyvety 3 ml radikálu DPPH. Následně bylo spektrum proměřeno. U směsi glukózy a aminokyselin s metanolickým roztokem DPPH bylo do kyvety dáno: 3 ml radikálu DPPH a 300 μ l dané směsi cukru a aminokyseliny. Poté bylo také spektrum proměřeno a je uvedeno na obrázku č. 33. Absorpční pás kolem 330 nm, který znázorňuje radikál DPPH, se vyskytuje v absorpčních maximech cca 1. U produktu DPPH-H je absorpční pás kolem 520 nm a vyskytuje se v absorpčních maximech cca 0,6.

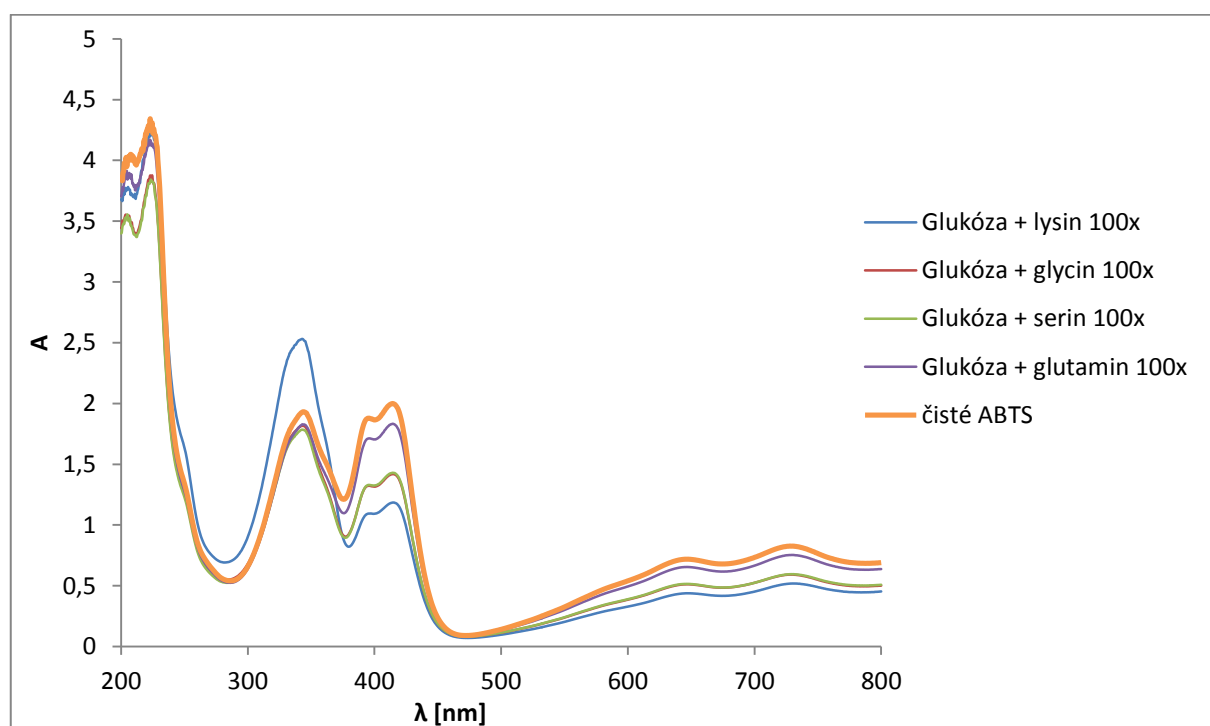
Obrázek 33: Porovnání čistého spektra DPPH se směsí glukózy a aminokyselinami s metanolickým roztokem DPPH



Byla porovnávána spektra čistého ABTS se směsí glukózy a aminokyselin s ABTS. Pro čisté spektrum bylo dáno do kyvety 3 ml radikálu ABTS. Následně bylo spektrum proměřeno. U směsi glukózy a aminokyselin s ABTS bylo do kyvety dáno: 3 ml radikálu ABTS a 300 μ l dané směsi cukru a aminokyseliny. Následně bylo také spektrum proměřeno a je uvedeno na

obrázku č. 34. Větší rozdíly v absorpčních maximech jsou u antioxidační metody ABTS. Výrazné absorpční pásy u antioxidační metody ABTS jsou u 339 nm a 406 nm. U prvního absorpčního pásu se nejvíce odlišuje od ostatních směs glukózy s lysinem s absorpčním maximumem 2,5. Ostatní směsi glukózy s glycinem, serinem a glutaminem mají přibližně stejné absorpční maxima kolem 1,9. Více odchylek se nachází u druhého absorpčního pásu (391 nm a 418 nm). Nejvyšší absorpční maximum má čisté ABTS 1,88 a 1,99. Potom následují směsi glukózy s glutaminem (1,7 a 1,8) a serinem (1,33 a 1,48). Nejmenší absorpční maxima měla směs glukózy s lysinem (1,09 a 1,19).

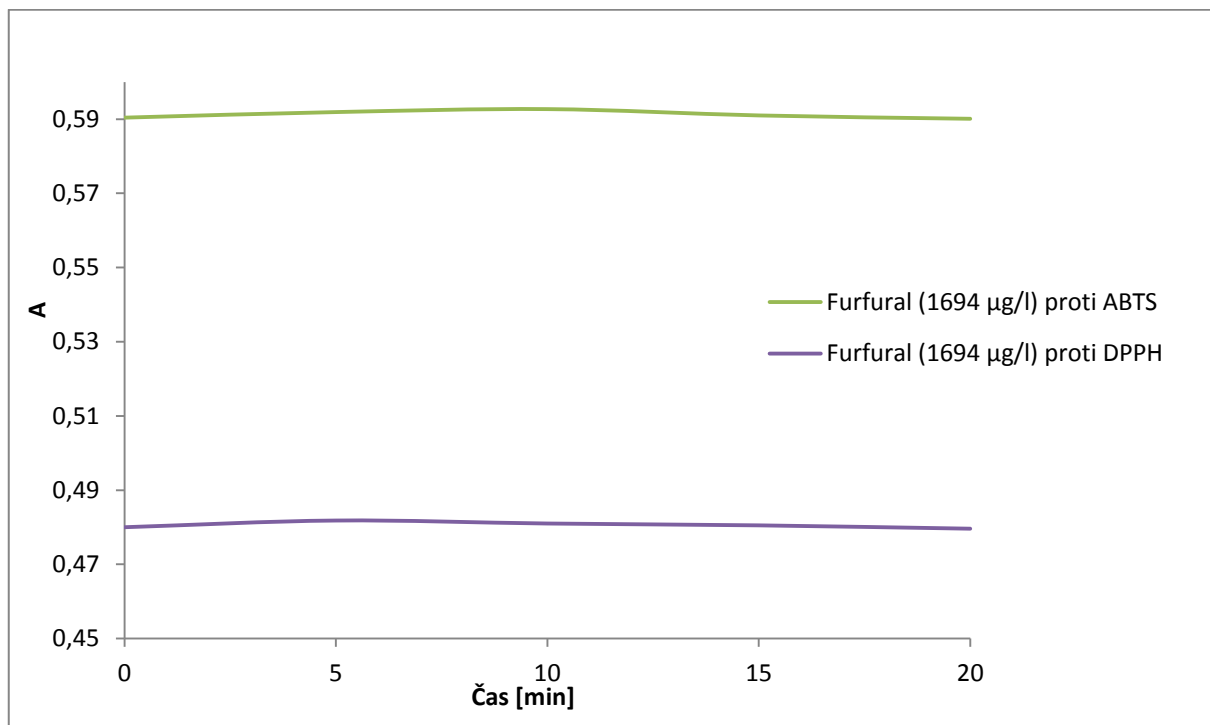
Obrázek 34: Porovnání čistého spektra ABTS se směsí glukózy a aminokyselinami s ABTS



Reakce furfuralu s ABTS, DPPH

Bylo provedeno sledování absorbance na čase pro furfural o koncentraci 1694 $\mu\text{g/l}$ proti ABTS a DPPH. Bylo do kyvety dáno: 3 ml radikálu ABTS a 300 μl furfuralu o koncentraci 1694 $\mu\text{g/l}$. Stejným způsobem bylo provedeno i druhé měření s DPPH. Poté byly oba roztoky proměřeny. Jejich sledování absorbance na čase je uvedeno na obrázku č. 35. Na obrázku bylo vyhodnoceno, že furfural o koncentraci 1694 $\mu\text{g/l}$ nereaguje s ABTS a DPPH.

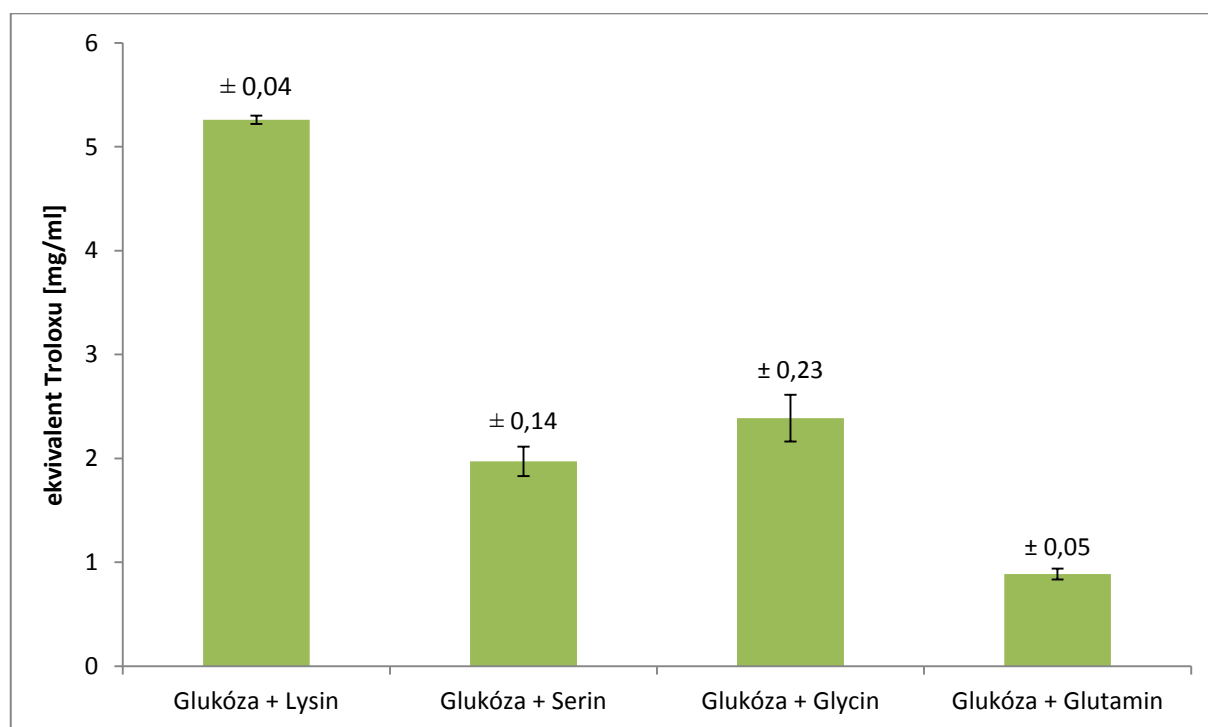
Obrázek 35: Sledování abrobance na čase pro furfural o koncentraci 1964 $\mu\text{g/l}$ proti ABTS a DPPH



3.1 Antioxidační vlastnosti produktů Maillardovy reakce s využitím metody ABTS

Pracovní postup antioxidační metody ABTS byl popsán v kapitole 2.4.1. Kalibrační řada Troloxu byla sestavena ze 4 kalibračních bodů v rozsahu od 10-60 $\mu\text{g/ml}$ (Příloha č. 1). Podle ní byla vypočítána koncentrace vzorku jako ekvivalent Troloxu v mg/ml extraktu vzorku (Graf č. 1). Z naměřených absorbancí bylo možné spočítat průměrné hodnoty absorbancí a směrodatnou odchylku. Optimalizace byla stanovena na 28 minut, protože se hodnoty absorbance v tomto čase již výrazně neměnily (Příloha č. 2).

Graf 1: Výsledky vyjádřené jako ekvivalent Troloxu v [mg/ml] u antioxidační metody ABTS u 100x ředěných vzorků, N=4



Podle grafu č. 1 lze vyhodnotit, že největší antioxidační aktivita byla zaznamenána u směsi vzorku glukózy s lysinem. Koncentrace směsi tohoto vzorku byla $5,2 \text{ mg/ml} \pm 0,04$. Podobné antioxidační aktivity vykazovaly směsi glukózy s glycinem a serinem. Koncentrace směsi glukózy s glycinem byla $2,4 \text{ mg/ml} \pm 0,23$ a glukózy se serinem $2 \text{ mg/ml} \pm 0,14$. Nejmenší antioxidační aktivitu vykazovala směs glukózy s glutaminem. Koncentrace byla $0,9 \text{ mg/ml} \pm 0,05$.

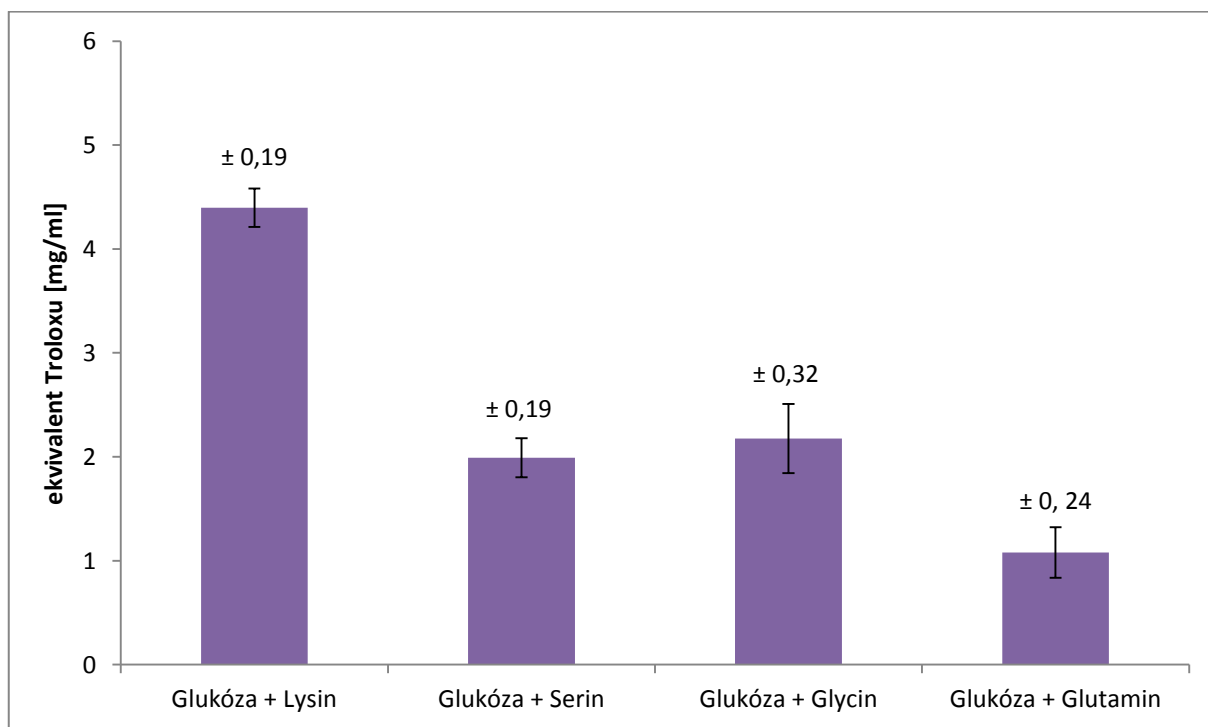
Usuzuji, že rozdílné výsledky jednotlivých extraktů mohou být způsobené rozpustností jednotlivých směsí. Jedná se o tři směsi: glukózu s lysinem, glycinem a serinem. Po

rozpuštění v destilované vodě měly sytě hnědý odstín. Naopak směs glukózy s glutaminem se od nich vizuálně lišila. Barva byla na rozdíl od třech směsí světlě hnědá, spíše do oranžova.

3.2 Antioxidační vlastnosti produktů Maillardovy reakce s využitím metody DPPH

Pracovní postup antioxidační metody byl popsán v kapitole 2.4.2. Kalibrační řada byla sestavena ze 6 kalibračních bodů v rozsahu od 10-100 $\mu\text{g/ml}$ (Příloha č. 3). Podle ní byla vypočítána koncentrace vzorku jako ekvivalent Troloxu v mg/ml extraktu vzorku (Graf č. 2). Z naměřených absorbancí bylo možné spočítat průměrné hodnoty absorbancí a směrodatnou odchylku. Optimalizace byla stanovena na 28 minut, protože se hodnoty absorbance v tomto čase již výrazně neměnily (Příloha č. 4).

Graf 2: Výsledky vyjádřené jako ekvivalent Troloxu v [mg/ml] u antioxidační metody DPPH u 100x ředěných vzorků, N=4



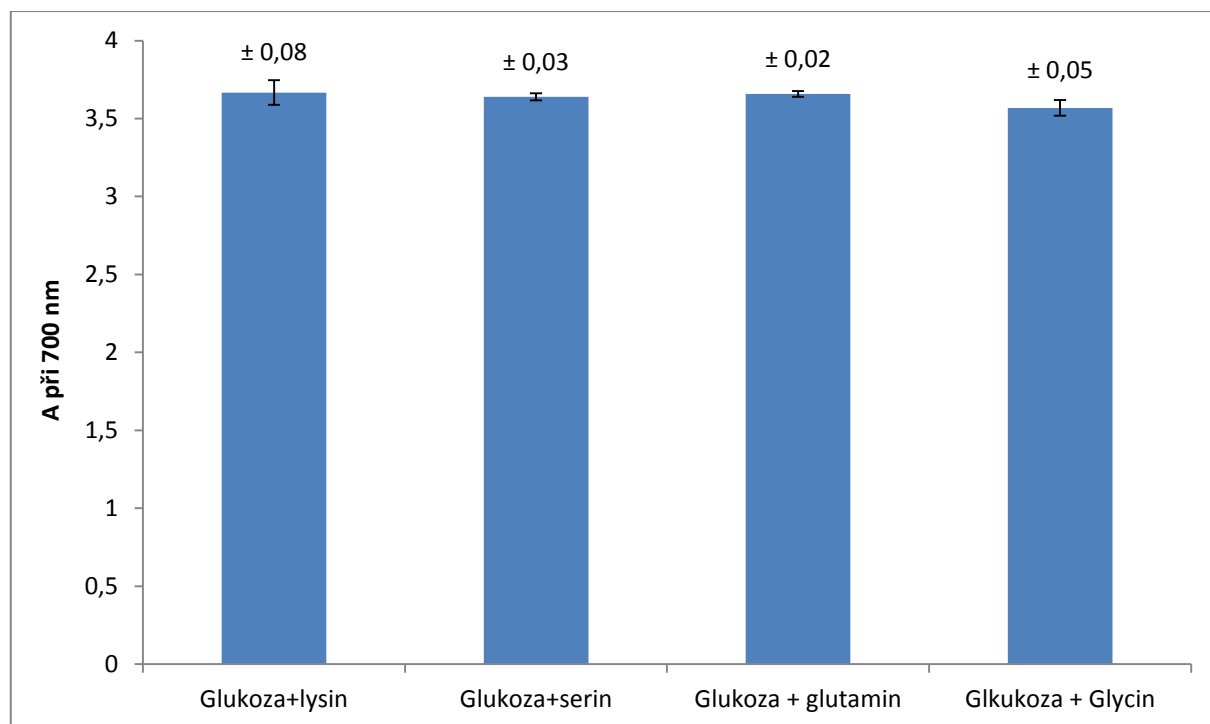
Podle grafu č. 2 lze vyhodnotit, že největší antioxidační aktivita byla zaznamenána u směsi vzorku glukózy s lysinem. Koncentrace směsi tohoto vzorku byla $4,4 \text{ mg/ml} \pm 0,19$. Podobné antioxidační aktivity vykazovaly směsi glukózy s glycinem a serinem. Koncentrace směsi glukózy s glycinem byla $2,2 \text{ mg/ml} \pm 0,32$ a glukózy se serinem $2 \text{ mg/ml} \pm 0,19$.

Nejmenší antioxidační aktivitu vykazovala směs glukózy s glutaminem. Koncentrace byla 1 mg/ml \pm 0,24.

3.3 Stanovení redukčních vlastností

Postup byl popsán v kapitole 2.4.3. Z naměřených absorbancí bylo možné spočítat průměrné hodnoty absorbancí a směrodatnou odchylku. Výsledky stanovení redukčních vlastností měřených při 700 nm jsou znázorněny v grafu č. 3.

Graf 3: Výsledky stanovení redukčních vlastností při 700 nm u 100x ředěných vzorků, N=2



U všech směsí glukózy s jednotlivými aminokyselinami vyšly absorbance podobně, včetně slepého pokusu. Absorbance se pohybovaly mezi 3,57-3,7.

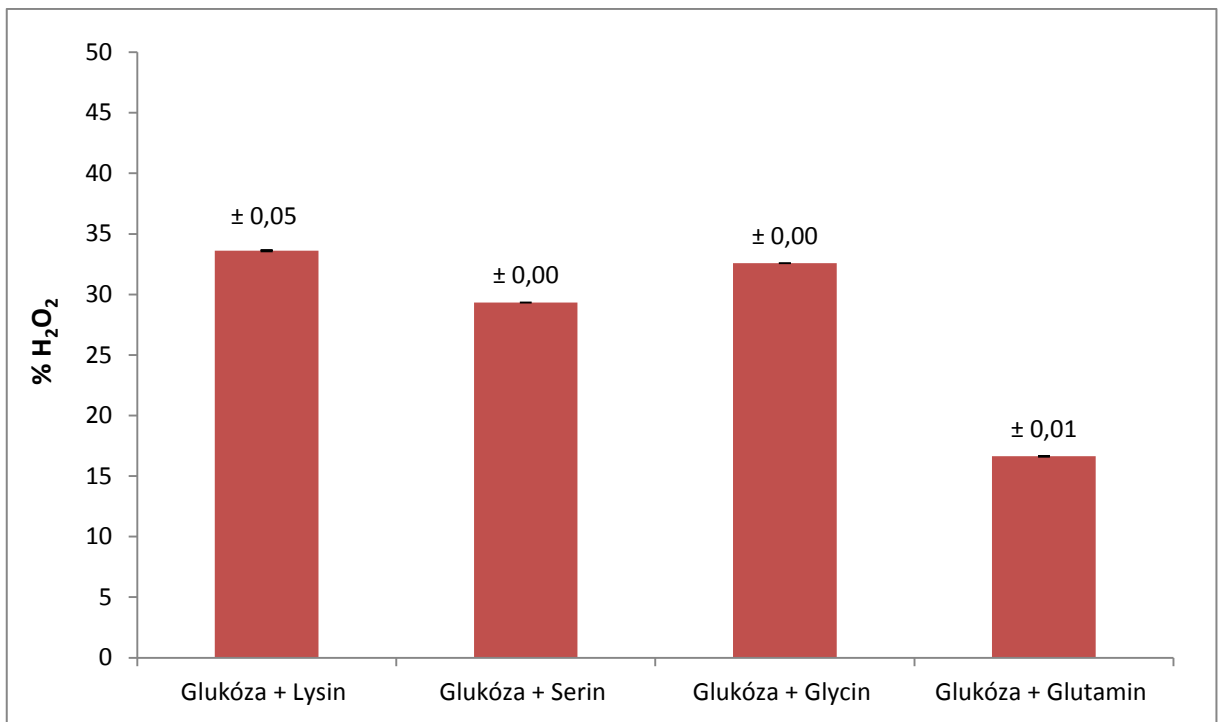
Při stanovení redukčních vlastností bylo zjištěno, že směsi glukózy s aminokyselinami (serin, glycin, glutamin, lysin) nemají redukční vlastnosti, protože absorbance 100 x zředěného vzorku přibližně odpovídala slepému pokusu (Graf č. 3).

3.4 Schopnost vycytávat peroxid vodíku

Pracovní postup byl popsán v kapitole 2.4.4. Z naměřených absorbancí bylo možné spočítat průměrné hodnoty absorbancí, vycytávací schopnost peroxidu vodíku a poté směrodatnou odchylku.

U schopnosti vycytávat peroxid vodíku vykazovaly tři směsi jednotlivých vzorků při stanovení jen mírné rozdíly. Konkrétně směsi glukózy s lysinem, serinem a glycinem. Procenta vycyteného peroxidu vodíku se u těchto tří směsí pohybovaly od 29,33-33,61 % (Graf č. 4).

Graf 4: Výsledky stanovení schopnosti vycytání peroxidu vodíku při 510 nm u 100 x ředěných vzorků, N=2

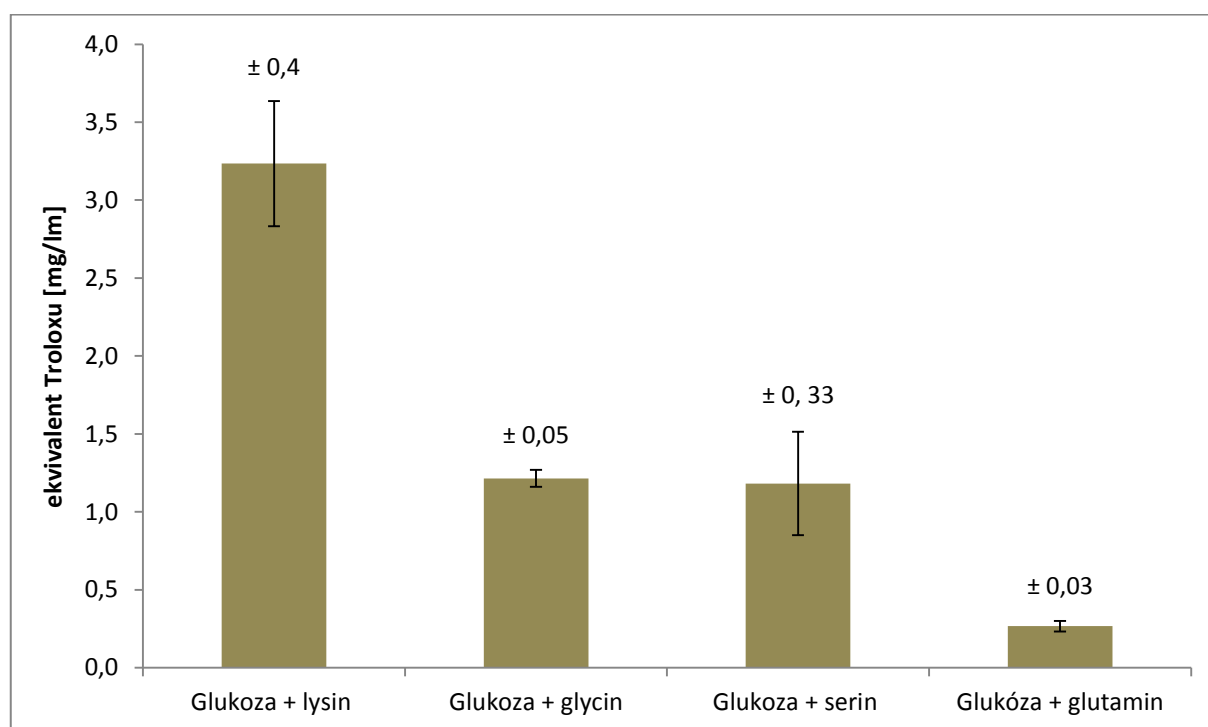


Vzorek směsi glukózy s glutaminem se od ostatních směsí lišil. Schopnost vycytávat peroxid vodíku u tohoto vzorku byla 16,63 % ± 0,01.

3.5 Antioxidační vlastnosti produktů Maillardovy reakce s využitím metody FRAP

Pracovní postup antioxidační metody byl popsán v kapitole 2.4.5. Kalibrační řada Troloxu byla sestavena ze 7 kalibračních bodů v rozsahu od 2-40 $\mu\text{g/ml}$ (Příloha č. 5). Podle ní byla vypočítána koncentrace vzorku jako ekvivalent Troloxu v mg/ml extraktu vzorku (Graf č. 5). Z naměřených absorbancí bylo možné spočítat průměrné hodnoty absorbancí a směrodatnou odchylku. Optimalizace byla stanovena na 28 minut, protože se hodnoty absorpance v tomto čase již výrazně neměnily (Příloha č. 6, 7, 8 a 9).

Graf 5: Výsledky vyjádřené jako ekvivalent Troloxu v $[\text{mg/l}]$ u chemické metody FRAP u 100x ředěných vzorků, $N=4$

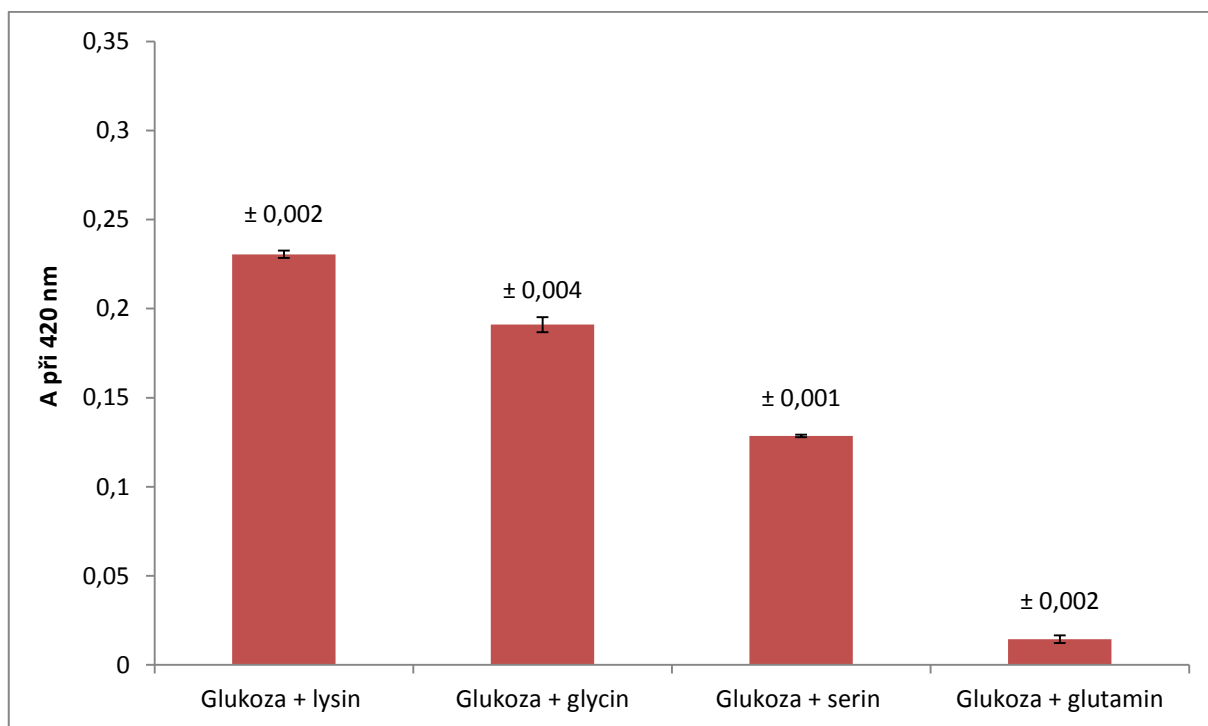


Podle grafu č. 5 lze vyhodnotit, že největší antioxidační aktivita byla zaznamenána u směsi vzorku glukózy s lysinem. Koncentrace směsi tohoto vzorku byla $3,2 \text{ mg/ml} \pm 0,4$. Podobné antioxidační aktivity vykazovaly směsi glukózy s glycinem a serinem. Koncentrace směsi glukózy s glycinem byla $1,2 \text{ mg/ml} \pm 0,05$ a glukózy se serinem $1,2 \text{ mg/ml} \pm 0,33$. Nejmenší antioxidační aktivitu vykazovala směs glukózy s glutaminem. Koncentrace byla $0,3 \text{ mg/ml} \pm 0,03$.

3.6 Index hnědnutí

Pracovní postup byl popsán v kapitole 2.4.6. Byly spektrofotometricky změřeny absorbance u 100 x zředěných vzorků proti destilované vodě při vlnové délce 420 nm (Graf č. 6).

Graf 6: Výsledky vyjádřené jako absorbance (420 nm) u 100x ředěných vzorků, N=2



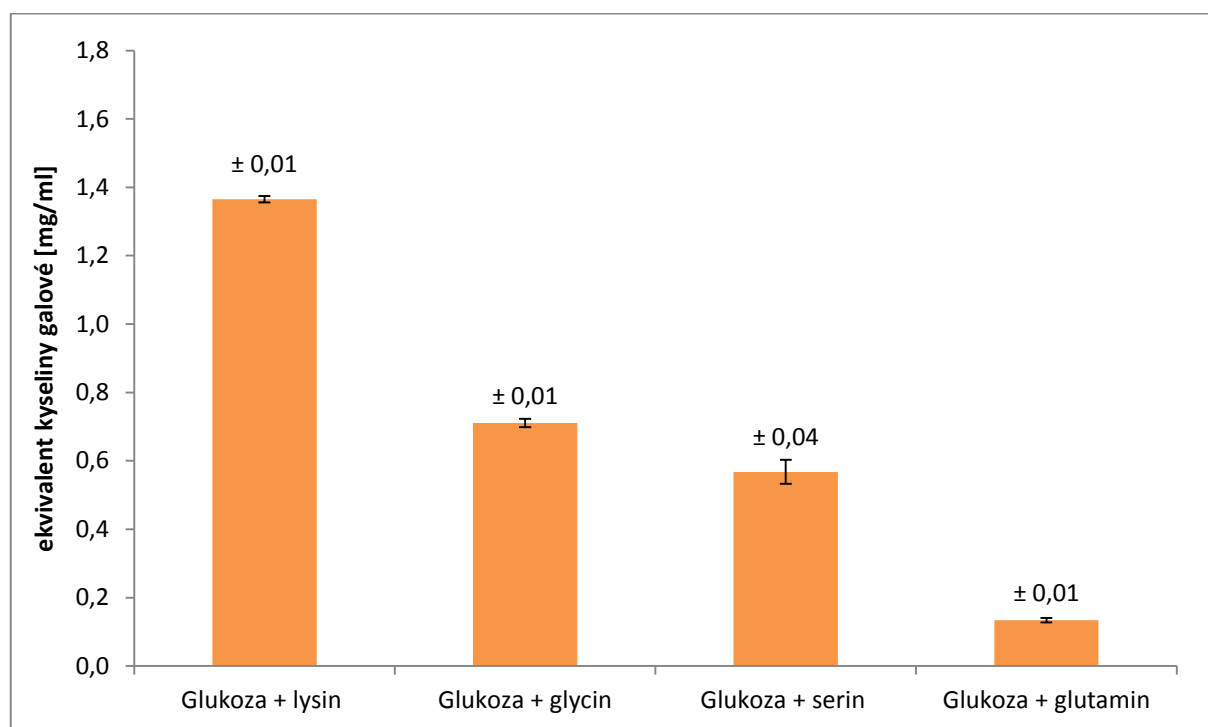
U měření intenzity hnědnutí je důležitá rozpustnost jednotlivých směsí. 3 jednotlivé směsi (glukóza s lysinem, glycinem a serinem) se dobře rozpouštěly ve vodě. Měly tmavě hnědou barvu a vizuálně se od sebe nedaly odlišit. Naopak směs glukózy s glutaminem se špatně rozpouštěla ve vodě. Zahraniční publikace od (Kohlmeier, 2003) uvádí, že glutamin je nestabilní ve vodných roztocích. Tato směs byla lehce nažloutlá a dala se od ostatních směsí vizuálně odlišit.

Podle grafu č. 6 lze vyhodnotit, že největší intenzitu hnědnutí má směs glukózy s lysinem. Naměřena byla hodnota absorbance $0,23 \pm 0,002$. Potom následovaly směsi glukózy s glycinem $0,19 \pm 0,004$ a glukózy se serinem $0,13 \pm 0,001$. Nejmenší naměřené hodnoty absorbance měla směs glukózy s glutaminem $0,01 \pm 0,002$.

3.7 Stanovení obsahu fenolických látek podle Folin-Ciocalteua

Pracovní postup antioxidační metody byl popsán v kapitole 2.4.7. Kalibrační řada kyseliny galové byla sestavena z 10 kalibračních bodů v rozsahu od 10-100 $\mu\text{g/ml}$ (Příloha č. 10). Podle ní byla vypočítána koncentrace vzorku jako ekvivalent kyseliny galové v mg/ml extraktu vzorku (Graf č. 7). Z naměřených absorbancí bylo možné spočítat průměrné hodnoty absorbancí a směrodatnou odchylku. Optimalizace byla stanovena na 40 minut, protože se hodnoty absorbance v tomto čase již výrazně neměnily (Příloha č. 11, 12, 13 a 14).

Graf 7: Výsledky vyjádřené jako ekvivalent kyseliny galové v $[\text{mg/l}]$ u metody Folin-Ciocalteu, $N=4$

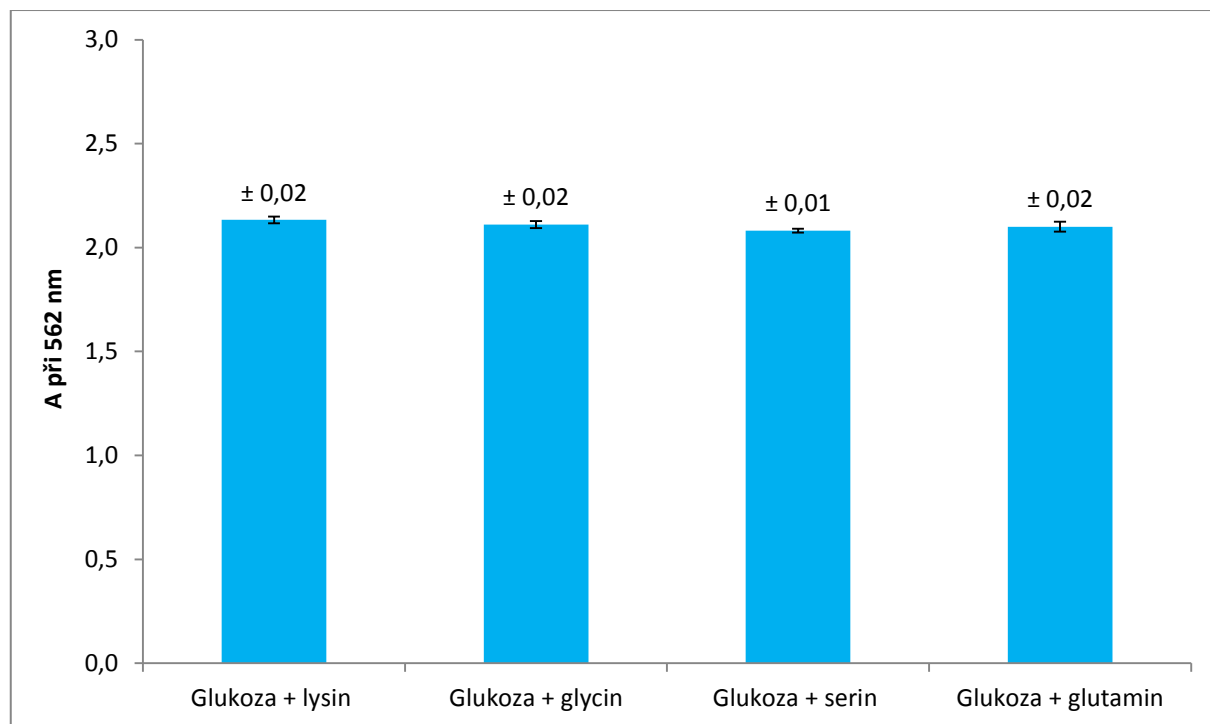


Největší obsah fenolických látek je podle grafu č. 7 u směsi glukózy s lysinem. U této směsi byla zaznamenána koncentrace $1,4 \text{ mg/ml} \pm 0,01$. Následovaly jednotlivé směsi glukózy s glycinem a serinem, které měly podobný obsah fenolických látek. Koncentrace směsi glukózy s glycinem byla $0,7 \text{ mg/ml} \pm 0,01$ a glukózy se serinem $0,6 \text{ mg/ml} \pm 0,04$. Nejnižší obsah fenolických látek byl u směsi glukózy s glutaminem $0,1 \text{ mg/ml} \pm 0,01$.

3.8 Chelatace železnatých iontů

Pracovní postup byl popsán v kapitole 2.4.8. Spektrofotometricky byly změřeny absorbance u 100 x zředěných vzorků s danými reagensii při vlnové délce 562 nm (Graf č. 8).

Graf 8: Výsledky u chelatace železnatých iontů vyjádřené jako absorbance (562 nm) u 100x ředěných vzorků směsi glukóza-aminokyselina, N=4

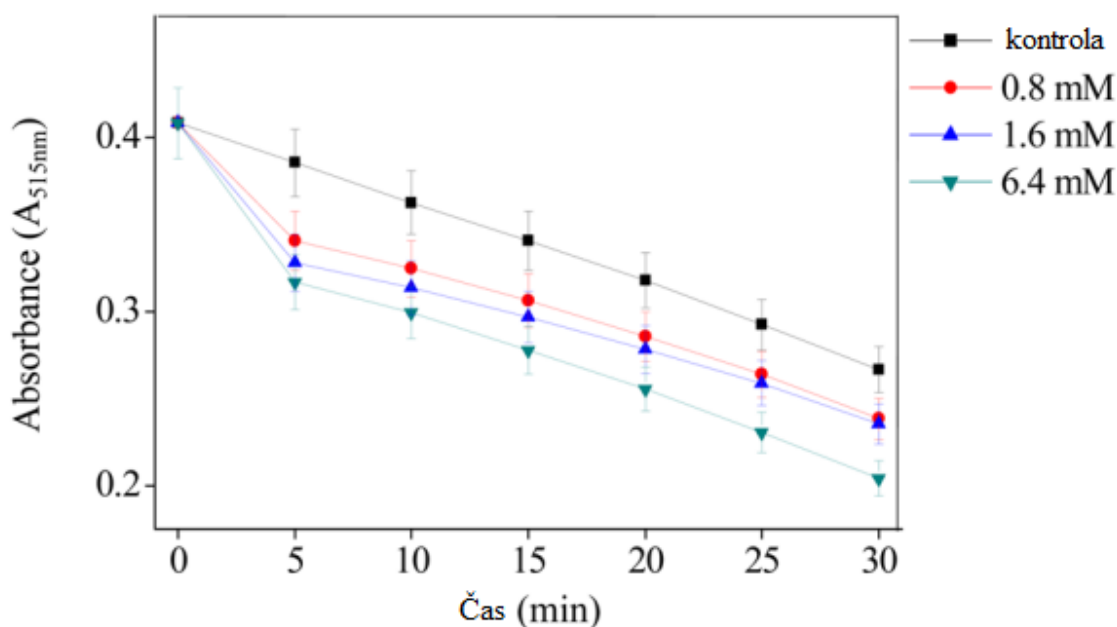


Vyšší hodnoty absorbance měly extrakty jednotlivých směsí cukru s aminokyselinami (2,79 - 2,111) než slepý vzorek (1,989). Předpokládalo se, že absorbance extraktů směsí glukózy s aminokyselinami budou nižší než absorbance u slepého pokusu. Nižší absorbance znamenají vyšší schopnost chelatace železnatých iontů. Tato hypotéza nebyla potvrzena.

3.9 5-hydroxymethylfurfural proti antioxidační metodě DPPH

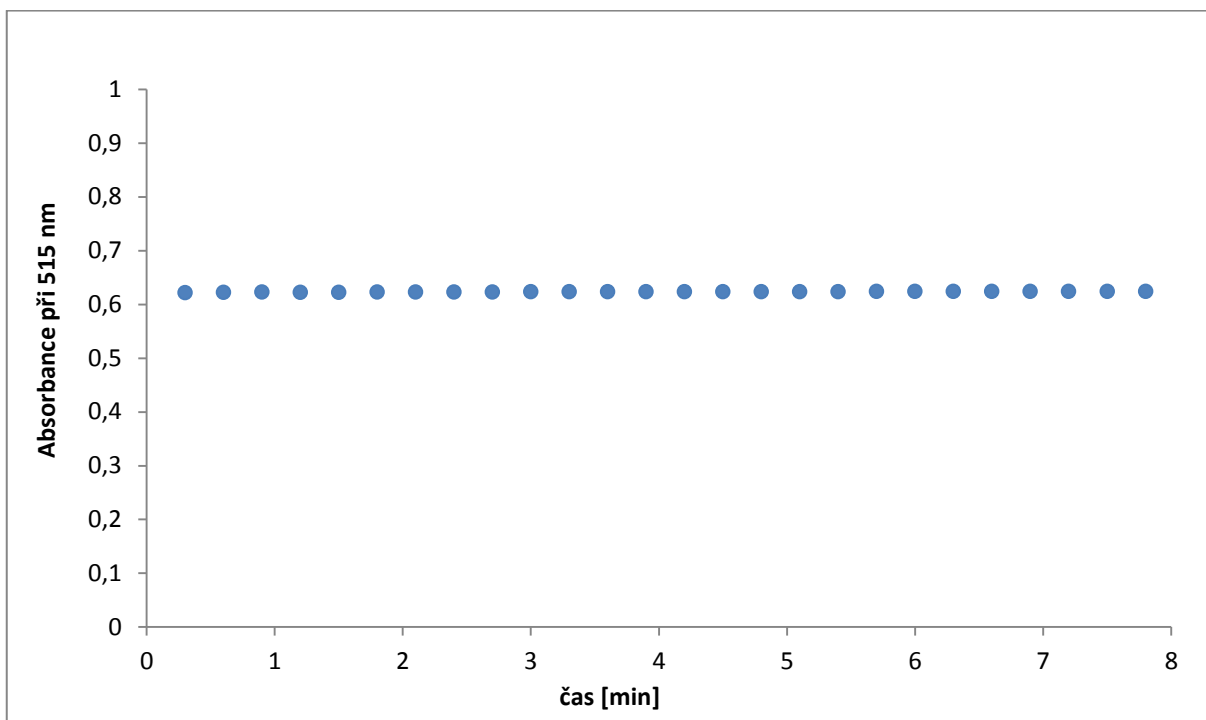
Zhao a kolektiv (2013) se zabývali reakcí v mikrotitrační destičce, která obsahovala 96 jamek. Do mikrotitrační destičky bylo přidáno 180 μl DPPH činidla a 20 μl HMF, které byly promíchány a protřepány. Absorbance byla zaznamenávána každou minutu při 515 nm po dobu 30 minut, dokud nebyl odečet stabilní. Tento experiment byl prováděn při pokojové teplotě ve tmě. V reakčním systému se charakteristický absorpční pík při 515 nm významně snížil za 5 minut v koncentračním rozmezí od 0,8 - 6,4 mM. Absorbance stále klesala se zvyšujícím se časem (Obrázek č. 36).

Obrázek 36: Závislost absorbance na čase, HMF proti DPPH (Zhang a kolektiv, 2013)



Zabývala jsem se touto reakcí ve zkumavkách ve větším objemu. Ke spektrofotometrickému měření byly smíchány 3 ml radikálu DPPH o koncentraci 25 $\mu\text{g/ml}$ a 300 μl 5-hydroxymethylfurfuralu o koncentraci 100 mg/ml . Absorbance byla měřena každých 18 sekund při 515 nm až do 8. minuty. Experiment byl prováděn při laboratorní teplotě a ve tmě. Došlo se k závěru, že absorbance je po celou dobu stabilní a 5-hydroxymethylfurfural s radikálem DPPH nereaguje (absorbance se zvyšujícím časem neklesá) (Obrázek č. 37, Příloha č. 15). Spektrum 5-hydroxymethylfurfuralu o různých koncentracích (Příloha č. 16).

Obrázek 37: Závislost absorpance na čase, HMF o koncentraci 100 mg/ml proti DPPH



DISKUZE

Při porovnání výsledků jednotlivých antioxidačních metod (ABTS, DPPH a FRAP), podle kterých se stanovuje antioxidační aktivita, se došlo k závěru, že nejvyšší hodnoty byly naměřeny u antioxidační metody ABTS. Následovala metoda DPPH. Nejmennší hodnoty byly naměřeny u antioxidační metody FRAP. Obecně lze říci, že největší antioxidační aktivitu má ze všech 4 experimentálních směsí glukóza s lysinem. Má nejvyšší naměřené hodnoty u všech tří antioxidačních metod. Nejmennší naměřené hodnoty má směs glukózy s glutaminem.

Jako důvody, proč vznikaly mezi jednotlivými směsmi a antioxidačními metodami rozdíly, lze uvést: reakční mechanismus jednotlivých antioxidačních metod; různé chemické sloučeniny, které se podílely na reakci; pH; teplota chemických reagentů; prostředí (tma, světlo); doba reakce a koncentrace vzorku. Např. 10x zředěné roztoky se nedaly proměřit, protože zreagovaly rychleji (do jednotek vteřin) než proběhlo měření. To je důvod, proč se používal 100 x ředěný vzorek. U směsi glukózy s glutaminem hrála důležitou roli rozpustnost, protože glutamin je nestabilní ve vodných roztocích, obzvláště po zahřátí. Jako jediná se tato směs od ostatních vizuálně lišila, kdy měla žlutě-oranžovou barvu a ostatní směsi byly dohněda.

Všechny směsi glukózy s jednotlivými aminokyselinami byly podrobeny chelatační metodě. Vyšší hodnoty absorbance měly extrakty jednotlivých směsí cukru s aminokyselinami (2,79 - 2,111) než slepý vzorek (1,989). Předpokládalo se, že absorbance extraktů směsí glukózy s aminokyselinami budou nižší než absorbance u slepého pokusu. Nižší absorbance znamenají vyšší schopnost chelatace železnatých iontů. Tato hypotéza nebyla potvrzena.

Byl ověřen experiment Zhao a kolektiv (2013), kteří se zabývali 5-hydroxymethylfurfurem proti antioxidační metodě DPPH. Tento experiment byl prováděn při pokojové teplotě ve tmě. V reakčním systému se charakteristický absorpční pík při 515 nm významně snížil za 5 minut v koncentračním rozmezí od 0,8 - 6,4 mM. Absorbance stále klesala se zvyšujícím se časem. Tato hypotéza nebyla potvrzena. Absorbance byla po celou dobu stabilní a 5-hydroxymethylfurfural s radikálem DPPH nereagoval (absorbance se zvyšujícím časem neklesala).

3 ZAHRANIČNÍ STUDIE

Hwang a kolektiv (2011) se zabývali reakcí směsi D-glukózy nebo D-fruktózy s 20 aminokyselinami (glycin, serin, asparagin, lysin, glutamin, threonin, cystein, tyrosine, histidin, kyselina asparagová, kyselina glutamová, arginin, leucin, prolin, alanin, valin, methionin, tryptofan, fenylalanin, izoleucin). Směsi MRP byly připraveny v destilované vodě. Koncentrace D-glukózy, D-fruktózy a aminokyselin byla 0,1 M. Každá aminokyselina s výjimkou: tryptofanu, tyrosinu, kyseliny asparagové a kyseliny glutamové, byla individuálně smíchána v 10 ml zkumavkách s víčkem s roztokem D-glukózy nebo D-fruktózy v poměru (2 ml: 2 ml). Zkumavky byly pevně uzavřeny a zahřívány v teplotně řízeném autoklávu při 130 °C po dobu 30 minut, která byla stanovena v předchozích studiích jako optimální doba. Po zahřátí byla každá reakční směs filtrována přes membránu o velikosti 0,45 µm. Některé části vodných MRP byly přímo použity pro stanovení intenzity zhnědnutí, zatímco zbytky byly lyofilizovány ve vakuu a jejich biologická aktivita byla stanovena pomocí *in vitro* testů. Pro antioxidační metodu bylo smícháno 0,2 ml vzorku s 0,8 ml 0,2 mM methanolového roztoku DPPH. Směs byla zamíchána a nechala se reagovat při pokojové teplotě ve tmě po dobu 30 minut. Poté byla změřena absorbance při 520 nm. U metody ABTS bylo ke vzorku 50 ul přidáno 1 ml zředěného roztoku radikálu ABTS. Absorbance při 735 nm byla stanovena spektrofotometricky po 60 minutách.

Aktivita vychytávání radikálů DPPH u směsi fruktózy s nepolárními aminokyselinami (valin, leucin, izoleucin, fenylalanin, tyrosin, methionin, prolin, glycin, alanin a tryptofan) byla zjištěna 12,79–27,40%, u polárních aminokyselin (serin, threonin, cystein, asparagin a glutamin) byla zjištěna 13,31–47,81%, u polárních kyselých (kyseliny asparogéné a glutamové) byla zjištěna 8,95–17,56% a u polárních bázičských aminokyselin (lysin, arginin, histidin) byla zjištěna 7,29–18,70%. Aktivita vychytávání radikálů DPPH u směsi glukózy s nepolárními aminokyselinami (valin, leucin, izoleucin, fenylalanin, tyrosin, methionin, prolin, glycin, alanin a tryptofan) byla zjištěna 6,64–17,58%, u polárních aminokyselin (serin, threonin, cystein, asparagin a glutamin) byla zjištěna 5,31–63,38%, u polárních kyselých (kyseliny asparagové a glutamové) byla zjištěna 3,29–7,20% a u polárních bázičských aminokyselin (lysin, arginin, histidin) byla zjištěna 4,72–11,16%.

Aktivita radikálu ABTS u směsi fruktózy s nepolárními aminokyselinami (valin, leucin, izoleucin, fenylalanin, tyrosin, methionin, prolin, glycin, alanin a tryptofan) byla zjištěna 5,77–21,32%, u polárních aminokyselin (serin, threonin, cystein, asparagin a glutamin) byla zjištěna 6,41–58,56%, u polárních kyselých (kyseliny asparogéné a glutamové) byla zjištěna 3,71–7,44% a u polárních bázičských aminokyselin (lysin, arginin, histidin) byla zjištěna

4,97–8,58%. Aktivita radikálu ABTS u směsi glukózy s nepolárními aminokyselinami (valin, leucin, izoleucin, fenylalanin, tyrosin, methionin, prolin, glycin, alanin a tryptofan) byla zjištěna 2,55–15,50%, u polárních aminokyselin (serin, threonin, cystein, asparagin a glutamin) byla zjištěna 1,76–68,16%, u polárních kyselých (kyseliny asparogéné a glutamové) byla zjištěna 2,37–2,58% a u polárních bázičkých aminokyselin (lysin, arginin, histidin) byla zjištěna 1,34–4,63%.

Hwang a kolektiv (2011) došli k závěru, že směsi fruktózy s aminokyselinami vykazovaly vyšší hodnoty u antioxidačnich metod ABTS a DPPH a také intenzitu zhnědnutí než směs glukózy s aminokyselinami. Zjistili, že Maillardova reakce je významně ovlivněna typem redukujícího cukru podílející se na reakci.

Kim (2013) se zabýval reakcí směsi D-glukózy (0,2 M) s glycinem (0,2 M), diglycinem (0,2 M) a triglycinem (0,2 M). Jednotlivé směsi byly rozpuštěny v 90 ml destilované vody a 50 % etanolovém roztoku. Roztok byl upraven na konečný objem 100 ml destilovanou vodou a 50% etanolovým roztokem. pH bylo upraveno na 7,8 po přidání 6 M NaOH. Přesně 10 ml roztoků bylo převedeno do 25 ml uzavíratelných zkumavek. Zkumavky byly pevně uzavřeny a zahřívány v termostatické olejové lázni při 100 °C po dobu 36 hodin. Takto byl získán vodný roztok MRP. Ethanolový roztok MRP byl získán podobným postupem, ale doba zahřívání byla 18 hodin. Po zahřívání byly zkumavky hned ochlazeny v ledové vodě.

Všechny vzorky Maillardových reakčních produktů vykazovaly chelatační účinek měďnatých iontů pod 40%, u železitých iontů byl chelatační účinek nad 40%. Chelatační aktivita železitých iontů všech vzorků MRP byla ve vodných i etanolových roztocích mnohem vyšší než chelatační schopnost měďnatých iontů. Chelatační aktivita železitých iontů u MRP odvozených od glukózy-diglycinu byla nejvyšší, následovaná aktivitou MRP odvozených od směsi glukózy-triglycinu a glukóza-glycinu.

Antioxidační aktivita u radikálu DPPH v etanolových roztocích byla vyšší než ve vodných MRP roztocích.

U antioxidační metody FRAP u směsi glukózy s diglycinem byla zjištěna nejvyšší aktivita, následovaly směsi glukóza s triglycinem a glukóza s glycinem ve vodných i ethanolických roztocích MRP. Antioxidační aktivita u této metody byla vyšší v ethanolu než ve vodných roztocích MRP, což je stejné jako u antioxidační metody DPPH.

Antioxidační aktivita radikálu ABTS byla vyšší v etanolovém než ve vodných roztocích MRP. Antioxidační aktivita ABTS byla nejvyšší ve vodném i etanolovém roztoku u směsi glukóza-diglycin, což je stejné jako u předešlých antioxidačních metod (DPPH a FRAP). U antioxidační metody ABTS však byly celkově vyšší hodnoty než u DPPH a FRAP, což mohlo být způsobeno zapojením různých reakčních mechanismů.

Kim a Lee (2009b) se zabývali reakcí směsi cukru s aminokyselinou. Konkrétně 8 reakčními směsi: glukózy s L-asparaginem, glukózy s D-asparaginem, glukózy s L-lysinem, glukózy s D-lysinem, fruktózy s L-asparaginem, fruktózy s D-asparaginem, fruktózy s L-lysinem a fruktózy s D-lysinem. Ve 100 ml dvakrát destilované vody bylo rozpuštěno 2 mM cukru, 2mM aminokyseliny a 0,2 mM NaHCO₃. Směs byla zahřívána na olejové lázni při 145 °C po dobu 2 hodin, pH nebylo regulováno. 10 ml směsi bylo přidáno do celulózové dialyzační zkumavky. Vsádková dialýza byla prováděna proti 1500 ml dvakrát destilované vody po dobu 168 hodin při 4 ° C. Voda byla měněna každé 3 hodiny po dobu dalších 12 hodin a poté každých 10, 12 hodin po zbytek dialyzačního času. Po vsádkové dialýze byly vzorky lyofilizovány a uloženy v exsikatorech na silikagelu.

V glukózových systémech byly chelatační aktivity železitých iontů melanoidinů vytvořených ze směsi glukózy s D-lysinem významně vyšší než u melanoidinů vytvořených ze směsi glukózy s L-lysinem. Směs glukózy s L-asparaginem měla vyšší chelatační aktivitu než směs glukózy s D-asparaginem; rozdíl mezi těmito dvěma směsmi nebyl tak výrazný. Ve fruktózových systémech byly chelatační aktivity železitých iontů melanoidinů vytvořených z D-isomerů významně vyšší než u L-isomerů. Nejvyšší chelatační aktivita železných iontů melanoidinů byla u směsi fruktózy s D-asparaginem. Nejnižší chelatační aktivitu vykazovala směs fruktózy s L-lysinem.

V glukózových systémech byly rozdíly u antioxidační metody DPPH na základě typu aminokyselinových enantiomerů statisticky odlišné pouze v případě lysinových enantiomerů. Nejvyšší byla u směsi glukózy s L-asparaginem a nejnižší u směsi glukózy a L-lysinu. Nejvyšší antioxidační aktivita u fruktózových směsí byla u fruktózy s L-asparaginem. Ve fruktózovém systému se vytvořilo následující pořadí: L-asparagin > L-lysin > D-lysin > D-asparagin.

Ve fruktózových systémech byly u antioxidační metody FRAP na základě typu enantiomerů aminokyselin statisticky významné rozdíly u směsi fruktózy s L-asparaginem a fruktózy s D-asparaginem, statisticky nevýznamné u směsi fruktózy s L-lysinem nebo fruktózy s D-lysinem. V glukózovém i fruktózovém systému byla u antioxidační metody FRAP u směsi fruktózy s L-asparaginem nejvyšší, zatímco u směsi fruktózy s D-asparaginem byla nejnižší. Tento výsledek je potvrzen ve všech antioxidačních metodách, za použití systému cukr/aminokyselina. U antioxidační metody FRAP bylo ve fruktózových systémech vytvořeno následující pořadí: L-asparagin > D-lysin > L-lysin > D-asparagin.

V glukózových systémech nebyla antioxidační aktivita ABTS na základě typu enantiomerů aminokyselin významná. Antioxidační aktivita u směsi glukózy s D-lysinem byla nejvyšší.

Ve fruktózových systémech byly významné rozdíly na základě typu aminokyselin a enantiomerů s výjimkou směsí fruktózy s L-lysinem a fruktózy s D-lysinem. Nejvyšší antioxidační aktivita byla u směsi fruktózy s L-lysinem, nejnižší byla u fruktózy s D-asparaginem. Antioxidační aktivita byla u L-isomerů vyšší než D-isomerů. Ve fruktózových systémech bylo vytvořeno pořadí: L-lysin D-lysin > L-asparagin > D-sparagin. Výsledky se lišily od antioxidační metody DPPH. Předpokládá se, že rozdíl v antioxidační aktivitě je způsoben různými reakčními reagensy (Rufián-Henares and Morales, 2007).

4. ZÁVĚR

Cílem bylo zjistit antioxidační aktivitu u směsi glukózy s aminokyselinou (lysin, serin, glutamin a glycin). Tyto směsi byly spektrometricky měřeny při různých vlnových délkách následujícími antioxidačními metodami: ABTS, DPPH, FRAP. Dále bylo zjistit, jestli směs vykazuje redukční vlastnosti, stanovit obsah fenolických látek podle metody Folin-Ciocalteu, změřit barevnost vzorků, schopnost vychytávat peroxid vodíku a schopnost chelatovat ionty železa.

Směs glukóza-lysin vykazovala nejvyšší hodnoty ve všech antioxidačních metodách (ABTS: 5,2 mg/ml \pm 0,04; DPPH: 4,4 mg/ml \pm 0,19; FRAP: 3,2 mg/ml \pm 0,40) oproti jiným směsím cukru-aminokyseliny. Směs glukóza-glycin (ABTS: 2,4 mg/ml \pm 0,23; DPPH: 2,2 mg/ml \pm 0,32; FRAP: 1,2 mg/ml \pm 0,05). Směs glukóza-serin (ABTS: 2 mg/ml \pm 0,14; DPPH: 2 mg/ml \pm 0,19; FRAP: 1,2 mg/ml \pm 0,33). Nejmenší hodnoty vykazovala směs glukóza-glutamin (ABTS: 0,9 mg/ml \pm 0,05; DPPH: 1,0 mg/ml \pm 0,24; FRAP: 0,3 \pm 0,03).

Při stanovení redukčních vlastností bylo zjištěno, že směsi glukózy s aminokyselinou (serin, glycin, glutamin, lysin) nemají redukční vlastnosti, protože absorbance 100 x zředěného vzorku přibližně odpovídala slepému pokusu ($3,7 \pm 0,02$). Naměřené absorbance jednotlivých směsí: směs glukóza-lysin $3,7 \pm 0,08$; glukóza-glycin $3,6 \pm 0,05$; glukóza-serin $3,6 \pm 0,02$; glukóza-glutamin $3,7 \pm 0,02$.

U schopností vychytávání peroxidu vodíku bylo zjištěno, že výsledky směsí glukóza-lysin, glycin a serin byly přibližně stejné. Směs glukóza-lysin 33,6 % \pm 0,05; glukóza-glycin 32,6 % \pm 0,003; glukóza-serin 29,3 % \pm 0,001. Nižší hodnoty měla směs glukóza-glutamin 16,6 % \pm 0,01.

U indexu hnědnutí byla změřena intenzita zbarvení, největší průměrnou absorbanci vykazovala směs glukóza-lysin ($0,23 \pm 0,002$). U ostatních směsí byly hodnoty absorbance nižší: glukóza-glycin ($0,19 \pm 0,004$), glukóza-serin ($0,13 \pm 0,001$). Nejnižší průměrné absorbance byly naměřené pro směs glukóza-glutamin ($0,01 \pm 0,002$).

Nejvyšší hodnoty u stanovení obsahu fenolických látek podle Folin-Ciocalteu vykazovala směs glukózy-lysinu 1,4 mg/l \pm 0,01. U ostatních směsí vyšly hodnoty nižší: glukóza-glycin 0,7 mg/l \pm 0,01, glukóza-serin 0,6 mg/l \pm 0,04. Nejnižší hodnoty byly u směsi glukóza-glutamin 0,1 mg/l \pm 0,01.

U chelatace železnatých iontů všech směsí glukóza-lysin, glycin, serin a glutamin vyšly hodně podobně a příliš se nelišily. Byly naměřeny průměrné absorbance při 562 nm u směsí

glukózy-lysinu $2,1 \pm 0,015853$, glukózy-glycinu $2,1 \pm 0,016317$, glukózy-serinu $2,1 \pm 0,009179$ a u glukózy-glutaminu $2,1 \pm 0,024406$.

5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Afsar H, R. Apak a I. Tor. Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide using Tris(1,10-phenanthroline)iron(II). *Analyst*, 1990, 115, 1, 99-103.

Ajandouz E. H. a A. Puigserver. Nonenzymatic Browning Reaction of Essential Amino Acids: Effect of pH on Caramelization and Maillard Reaction Kinetics. *Food Chemistry*, 1999, 47, 5, 1786 – 1793.

Ajandouz E. H., L. S. Tchiakpe, F. Dalle Ore a A. Benajiba a A. Puigserver. Effects of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics in fructose-lysine model systems. *Journal of Food Science*, 2001, 66, 7, 926–930.

Alam M. N., N. J. Bristi a M. Rafiquzzaman. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2013, 21, 2, 143–152.

Alma M. H., A. Mavi, A. Yildirim, M. Digrak a T. Hirata. Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey, *Biological and Pharmaceutical. Bulletin*, 2003, 26, 12, 1725–1729.

Ames J. M. Applications of the Maillard reaction in the food industry. *Food Chemistry*, 1998, 62, 4, 431–439.

Ames J. M. Control of the Maillard reaction in food systems. *Trends in Food Science and Technology*, 1990, 1, 1, 150–154.

Anese M. a M. Suman. Mitigation strategies of furan and 5-hydroxymethylfurfural in food. *Food Research International*, 2013, 51, 1, 257–264.

Arribas-Lorenzo G. a F. J. Morales. Estimation of dietary intake of 5-hydroxymethylfurfural and related substances from coffee to Spanish population. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48, 2, 644-649.

Babu a Suryadevara. *Advances in Chemical Mechanical Planarization (CMP)*. Elsevier, 2016, ISBN 978-0-08-100165-3.

Bailey R. a DF Boltz. Differential Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide using 1,10-phenanthroline and bathophenanthroline. *Analytical Chemistry*, January, 1959, 31, 1, 117–119.

Bai W., Q. Wang, X. Zeng, J. Fu, Y. Liu a H. Dong. Antioxidant Activities of Chicken Peptide - Maillard Reaction Products (CP - MRPS) Derived from Chicken Peptides and d - Glucose System. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2017, 41, 2, e13041.

Bartley W, H. A. Krebs a J. P. O'Brien. *Vitamin C Requirements of Human Adults*, London, HMSO, 1953.

Banchero M., G. Pellegrino a L. Manna. Supercritical fluid extraction as a potential mitigation strategy for the reduction of acrylamide level in coffee. *Journal of Food Engineering*, 2013, 115, 3, 292–297.

Benjakul S., W. Lertittikul a F. Bauer. Antioxidant activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-sugar model system. *Food Chemistry*, 2005, 93, 2, 189–196.

Beyer H. a W. Walter. *Organic Chemistry: A Comprehensive Degree Text and Source Book*. Albion Publishing, 1997, ISBN: 9781898563372.

Biliaderis C. G. a M. S. Izydorczyk. *Functional Food Carbohydrates*, CRC Press, Boca Raton, FL, 2007.

Block G. 'Vitamin C and cancer prevention: the epidemiologic evidence', *American Journal of Clinical Nutrition*, 1991, 53, 1, 270–282.

Böck A., K. Forchhammer, J. Heider a C. Baron. Selenoprotein synthesis: An expansion of the genetic code. *Trends in Biochemical Sciences*, 1991, 16, 12, 463–467.

Bordas M., E. Moyano, L. Puignou a M. T. Galceran. Formation and stability of heterocyclic amines in a meat flavour model system: Effect of temperature, time and precursors. *Journal of Chromatography B*, 2004, 802, 1, 11–17.

Borrelli R. C., A. Visconti, C. Mennella, M. Anese a V. Fogliano. Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50, 22, 6527-6533.

Brar S. K., T. C. Zhang, M. Verma, R. Y. Surampalli a D. R. Tyagi. *Nanomaterials in the Environment*. American Society of Civil Engineers (ASCE), 2015, str. 531, ISBN 978-0-7844-1408-8.

Bressa F., N. Tesson, M. Dalla Rosa, A. Sensidoni a F. Tubaro. Antioxidant effect of Maillard reaction products: application to a butter cookie of a competition kinetics analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44, 3, 692-695.

Bursal E a İ Gülçin. Polyphenol contents and in vitro antioxidant activities of lyophilised aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Food Res Int*, 2011, 44, 5, 1482–1489.

Casado F. J., A. H. Sánchez a A. Montaña. Reduction of acrylamide content of ripe olives by selected additives. *Food Chemistry*, 2010, 119, 1, 161–166.

Cerny C. The aroma side of the Maillard reaction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1126, 1, 66–71.

Chapuis-Lardy L., D. Contour-Ansel, Bernhard-Reversat. *Frontiers in Plant Science*, 2002, 163-217.

Charissou A., L. Ait-Ameur a I. Birlouez-Aragon. Evaluation of gas chromatography/mass spectrometry method for the quantification of carboxymethyllysine in food samples. *Journal of Chromatography*, 2007, 1140, 1, 189-194.

Choudhury A. K. R. Principles of Colour Appearance and Measurement, Volume 1 - Object Appearance, Colour Perception and Instrumental Measurement. Elsevier. 2014, ISBN: 978-0-85709-229-8.

Colowick S. P., N. O. Kaplan, J. N. Abelson, M. I. Simon, L. Packer (Eds.). Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, 1999.

Contreras-Calderón J., E. Guerra-Hernández a B. Garcia-Villanova. Utility of some indicators related to the Maillard browning reaction during processing of infant formulas. Food Chemistry, 2009, 114, 4, 1265–1270.

Crews C. a L. Castle. A review of the occurrence, formation and analysis of furan in heat-processed foods. Trends in Food Science and Technology, 2007, 18, 7, 365–372.

Damasceno L. F., F. A. N. Fernandes, M. M. A. Magalhaes a E. S. Brito. Nonenzymatic browning in clarified cashew apple juice during thermal treatment: Kinetics and process control. Food Chemistry, 2008, 106, 1, 172–179.

Damodaran S. a K. L. Parkin. Fennema's Food Chemistry (5th Edition). CRC Press, 2017, ISBN 978-1-4822-4361-1.

Delgado-Andrade C., J. A. Rufián-Henares a F. J. Morales. Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53, 20, 7832-7836.

Delgado-Andrade C., J. Rufián-Henares a F. Morales. Fast method to determine furosine in breakfast cereals by capillary zone electrophoresis. European. Food Research and Technology, 2005b, 221, 5, 707-711.

Delgado-Andrade C., J. Rufián-Henares a F. J. Morales. Study on fluorescence of Maillard reaction compounds in breakfast cereals. Molecular Nutrition & Food Research, 2006, 50, 9, 799-804.

Delgado-Andrade C., J. Rufián-Henares a F. J. Morales. Lysine availability is diminished in commercial fibre-enriched breakfast cereals. *Food Chemistry*, 2007, 100, 2, 725–731.

Delgado-Andrade C., I. Seiquer a M. P. Navarro. Maillard reaction products consumption: Magnesium bioavailability and bone mineralization in rats. *Food Chemistry*, 2008, 107, 2, 631–639.

Delgado-Andrade C., F. J. Morales, I. Seiquer a M. P. Navarro. Maillard reaction products profile and intake from Spanish typical dishes. *Food Research International*, 2010a, 43, 1304–1311.

Delgado-Andrade C. Maillard reaction products: Some considerations on their health effects. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2014, 52, 1, 53–60.

de Oliveira F. C., J. S. D. R. Coimbra, E. B. de Oliveira, A. D. G. Zuñiga a E. E. G. Rojas. Food protein-polysaccharide conjugates obtained via the maillard reaction: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2016, 56, 7, 1108-1125.

Derkyi N. S. A. *International Journal of Applied Sciences* 2, 1, 2011.

Domínguez R., M. Gómez, S. Fonseca a J. M. Lorenzo. Effect of different cooking methods on lipid oxidation and formation of volatile compounds in foal meat. *Meat Science*, 2014, 97, 2, 223-230.

Dworschak E. Nonenzyme browning and its effect on protein nutrition. *Critical Review in Food Science Nutrition*. 1980, 13, 1, 1-40.

Dyamenahalli K., A. Famili a R. Shandas. Characterization of shape-memory polymers for biomedical applications. *Shape Memory Polymers for Biomedical Applications*, 2015, 35–63.

Embuscado M. E. *Functionalizing Carbohydrates for Food Applications*, DEStech Publications, Lancaster, Pennsylvania, 2014, ISBN: 978-1-60595-038-9.

Erbersdobler H. a V. Somoza. Forty years of using Maillard reaction products as indicator the nutritional quality of foods. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2007, 51, 4, 423-430.

Friedman M. Food browning and its prevention: An overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44, 3, 631–653.

Gerrard J. A. Protein-protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. *Trends Food Science and Technology*, 2002, 13, 12, 391–399.

Gerrard J. A. The Maillard reaction in food: Progress made, challenges ahead-Conference report from the eighth international symposium on the Maillard reaction. *Trends in Food Science and Technology*, 2006, 17, 6, 324–330.

Giovannucci E. ‘Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature’, *Journal of the National Cancer Institute*, 1999, 91, 4, 317–331.

Gökmen V. a F. J. Morales. Processing Contaminants: Hydroxymethylfurfural. *Encyclopedia of food safety*, 2014, 2, 404–408.

Gökmen V. Acrylamide in food: Analysis, content and potential health effects (1st edition). New York: Academic press, 2015, ISBN: 978-0128028322.

González-Mateo S., M. L. González-SanJosé a P. Muñiz. Presence of Maillard products in Spanish muffins and evaluation of colour and antioxidant potential. *Food and Chemical Toxicology*, 2009, 47, 11, 2798-2805.

Graf M., T. M. Amrein, S. Graf, R. Szalay, F. Escher a R. Amadó. Reducing the acrylamide content of a semi-finished biscuit on industrial scale. *LWT - Food Science and Technology*, 2006, 39, 7, 724–728.

Guerra-Hernández E., N. Corzo a B. Garcia-Villanova. Maillard reaction evaluation by furosine determination during infant cereal processing. *Journal of Cereal Science*, 1999, 29, 2, 171–176.

- Guerra-Hernández E., C. L. Gomez, B. Garcia-Villanova, N. C. Sanchez a J. M. R. Gomez. Effect of storage on non-enzymatic browning of liquid infant milk formulae. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2002, 82, 5, 587–592.
- Gu F. L., J. M. Kim, S. Abbas, X. M. Zhang, S. Q. Xia a Z. X. Chen. Structure and antioxidant activity of high molecular weight Maillard reaction products from casein–glucose. *Food Chemistry*, 2010, 120, 2, 505-511.
- Gül Akıllıoğlu H., K. Savaş Bahçeci a V. Gökmen. Investigation and kinetic evaluation of furan formation in tomato paste and pulp during heating. *Food Research International*, 2015, 78, 224–230.
- Gulcin I., ME Büyükokuroğlu, M. Oktay a Öİ Küfrevioğlu. On the in vitro antioxidant properties of melatonin. *J Pineal Res*, 2002a, 33, 3, 167–171.
- Gulcin I, Z. Huyut, M. Elmastaş a HY Aboul-Enein. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal Chemistry*, 2010c, 3, 1, 43–53.
- Halliwel B. Food-derived antioxidants. Evaluating their importance in food and in vivo. *Food Science and Agricultural Chemistry*, 1999, 18, 1–29.
- Harrick N. Internal Reflection Spectroscopy. Interscience Publishers, John Wiley & Sons Inc, New York, 1967.
- Higson S. Analytical Chemistry. Oxford University Press, 2004, ISBN 978-0-19-850289-0.
- Hind A. R., S. K. Bhargava a A. McKinnon. At the solid/liquid interface: FTIR/ATR - the tool of choice. *Advances in Colloid Interface Science*, 2001, 93, 1-3, 91-114.
- Hodge J. E. Chemistry of browning reactions in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1953, 1, 15, 928–943.

Hwang I. G., H. Y. Kim, K. S. Woo, J. Lee a H. S. Jeong. Biological activities of Maillard reaction products (MRPs) in a sugar–amino acid model. *Food Chemistry*, 2011, 126, 1, 221–227.

IARC (International Agency for Research on Cancer) Acrylamide. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some industrial chemicals, 60. (pp. 389–434). France: Lyon, 1994.

IARC (International Agency for Research on Cancer) Furan. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Dry cleaning, some chlorinated solvents and other industrial chemicals, 63. (pp. 393–408). France: Lyon, 1995.

Ionita P. Is DPPH stable free radical a good scavenger for oxygen active species, *Chemical Papers.*, 2005, 59, 1, 11–16.

Iwe M. O., D. J. van Zuilichem, W. Stolp a P. O. Ngoddy. Effect of extrusion cooking of soy–sweet potato mixtures on available lysine content and browning index of extrudates. *Journal of Food Engineering*, 2004, 62, 2, 143–150.

Jabbari M. a F. Gharib. Solvent dependence on antioxidant activity of some water-insoluble flavonoids and their cerium (IV) complexes, *Journal of Moecular Liquids*, 2012, 168, 36–41.

Jabbari M., H. Mir, A. Kanaani a D. Ajloo. Kinetic solvent effects on the reaction between flavonoid naringenin and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical in different aqueous solutions of ethanol: an experimental and theoretical study, *Journal of Moecular Liquids*, 2014, 196, 381–391.

Jabbari M. a H. R. Moallem. Effect of solute–solvent interactions on DPPH radical scavenging efficiency of some flavonoid antioxidants in various binary water–methanol mixtures, *Canadian Journal Chemistry*, 2015, 93, 5, 558–563.

Jaeger H., A. Janositz a D. Knorr. The Maillard reaction and its control during food processing. The potential of emerging technologies. *Pathologie Biologie*, 2010, 58, 3, 207–213.

Jaffeé HJ a M. Orchin. Theory and Application of Ultraviolet Spectroscopy, Kap 6. Wiley, London New York, 1962.

Jarešová L., Náhrada pestré stravy a antioxidační vlastnosti, Pardubice, 2018. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D.

Jayaprakash G. K., R. P. Singh a K. K. Sakariah. Antioxidant activity of grape seed extracts on peroxidation models in-vitro. J. Agric. Food Chemistry, 2001, 55, 1018–1022.

Jestoi M., T. Järvinen, E. Järvenpää, H. Tapanainen, S. Virtanen a K. Peltonen. Furan in the baby-food samples purchased from the Finnish markets - Determination with SPME-GC–MS. Food Chemistry, 2009, 117, 3, 522–528.

Karioti A., D. Hadjipavlou-Litina, M. L. Mensah, T. C. Fleischer a H. Skaltsa. Composition and antioxidant activity of the essential oils of *Xylopiya aethiopica* (Dun) A. Rich. (Annonaceae) leaves, stem bark, root bark, and fresh and dried fruits, growing in Ghana, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52, 26, 8094–8098.

Keramat J., A. Le Bail, C. Prost a M. Jafari. Acrylamide in baking products: A review article. Food and Bioprocess Technology, 2011, 4, 4, 530–543.

Khachik F, G. R. Beecher a J. C. Jr. Smith, 'Lutein, lycopene, and their oxidative metabolites in chemoprevention of cancer', Journal of Cellular Biochemistry Supplement, 1995, 59, 22, 236–246.

Khadidja L., C. Asma, B. Mahmoud a E. Meriem. Alginate/gelatin crosslinked system through Maillard reaction: preparation, characterization and biological properties. Polymer Bulletin, 2017, 74, 12, 4899-4919.

Kim J. S. Antioxidant activity of Maillard reaction products derived from aqueous and ethanolic glucose-glycine and its oligomer solutions. Food Science and Biotechnology, 2013, 22, 1, 39–46.

Kim J. S. a Y. S. Lee. Antioxidant activity of Maillard reaction products derived from aqueous glucose/glycine, diglycine, and triglycine model systems as a function of heating time. *Food Chemistry*, 2009a, 116, 1, 227-232.

Kim J. S. a Y. S. Lee. Antioxidant Activity of Melanoidins from Different Sugar/Amino Acid Model Systems: Influence of the Enantiomer Type. *Food Science Technology International*. 2009b, 15, 3, 291-297.

Kim T. K., S. Kim a K. G. Lee. Analysis of furan in heat-processed foods consumed in Korea using solid phase microextraction-gas chromatography/mass spectrometry (SPME-GC/MS). *Food Chemistry*, 2010, 123, 4, 1328–1333.

Kolthoff IM, DL Leussing a TS Lee. Reaction of ferrous and ferric iron with 1,10-phenanthroline. III. The ferrous monophenanthroline complex and the colorimetric determination of phenanthroline. *Journal of the American Chemical Society*, 1950, 72, 5, 2173–2177.

Klessinger M. *Farbensymposium in Baden-Baden; und priv Mitteilung*, 1982.

Kohlmeier M. *Nutrient Metabolism: Structures, Functions, and Genetics*. Elsevier Science & Technology. 830 s., 2003, ISBN: 978-0-12-417762-8.

Kordali S., A. Cakir, A. Mavi, H. Kilic a A. Yildirim. Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish *Artemisia* species, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 5, 1408–1416.

Kwak E. J. a S. I. Lim. The effect of sugar, amino acid, metal ion, and NaCl on model Maillard reaction under pH control. *Amino Acids*, 2004, 27, 1, 85–90.

Laguerre J. C., G. W. Pascale, M. David, O. Evelyne, A. A. Lamia a B. A. Inès. The impact of microwave heating of infant formula model on neo-formed contaminant formation, nutrient degradation and spore destruction. *Journal of Food Engineering*, 2011, 107, 2, 208–213.

- Lamberts L., I. Rombouts a J. A. Delcour. Study of nonenzymic browning in α -amino acid and γ -aminobutyric acid/sugar model systems. *Food Chemistry*, 2008, 111, 3, 738–744.
- Laroque D., C. Inisan, C. Berger, E. Vouland, L. Dufossé a F. Guérard. Kinetic study on the Maillard reaction. Consideration of sugar reactivity. *Food Chemistry*, 2008, 111, 4, 1032-1042.
- Lee Y. Y., T. K. Tang, E. T. Phuah, N. B. M. Alitheen, C. P. Tan a O. M. Lai. New Functionalities of Maillard Reaction Products as Emulsifier and Encapsulating Agent and Its Processing Parameters: A Brief Review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, 97, 5, 1379–1385.
- Leong S. Y. a I. Oey. Effect of endogenous ascorbic acid oxidase activity and stability on vitamin C in carrots (*Daucus carota* subsp. *sativus*) during thermal treatment. *Food Chemistry*, 2012, 134, 4, 2075–2085.
- Lertittikul W., S. Benjakul a M. Tanaka. Characteristics and antioxidative activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-glucose model system as influenced by pH. *Food Chemistry*, 2007, 100, 2, 669–677.
- Lingnert H. Antioxidative Maillard reaction products III. Application in cookies. *Journal of Food Processing and Preservation*, 1980, 4, 4, 219-233.
- Losso J. N. *The Maillard Reaction Reconsidered: Cooking and Eating for Health*. CRC Press., 2016, ISBN: 978-1482248210.
- Machiels D. a L. Istasse. La réaction de Maillard: Importance et applications en chimie des aliments. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 2002, 146, 6, 347–352.
- Malec L. S., A. S. Pereyra Gonzales, G. B. Naranjo a M. S. Vigo. Influence of water activity and storage temperature on lysine availability of a milk like system. *Food Research International*, 2002, 35, 9, 849–853.

Markowicz D., E. Monaro, E. Siguemoto a M. Séfora. Maillard reaction products in processed food: Pros and cons. In B. Valdez (Ed.), *Food industrial processes -Methods and equipment* (pp. 281–300). Rijeka: InTech , 2012.

Martins S. I., W. M. Jongen a M. A. J. S. Van Boekel. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science & Technology*, 2000, 11, 9, 364-373.

Martins S. I. F. S. a M. A. J. S. Van Boekel. A kinetic model for the glucose/glycine Maillard reaction pathways. *Food Chemistry*, 2005a, 90, 1-2, 257–269.

Martins S. I. F. S. a M. A. J. S. Van Boekel. Kinetics of the glucose/glycine Maillard reaction pathways: Influences of pH and reactant initial concentrations. *Food Chemistry*, 2005b, 92, 3, 437–448.

Martín M. A., S. Ramos, R. Mateos, J. A. Rufián -Henares, F. J. Morales, L. Bravo a L. Goya. Biscuit melanoidins of different molecular masses protect human HepG2 cells against oxidative stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57, 16, 7250-7258.

Mestdagh F., J. Maertens, T. Cucu, K. Delporte, C. Van Peteghem a B. De Meulenaer. Impact of additives to lower the formation of acrylamide in a potato model system through pH reduction and other mechanisms. *Food Chemistry*, 2008, 107, 1, 26–31.

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.

Mojska H., I. Gielecińska a K. Stoś. Determination of acrylamide level in commercial baby foods and an assessment of infant dietary exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50, 8, 2722–2728.

Morales F. J., C. Fernández-Fraguas a S. Jiménez-Pérez. Iron-binding ability of melanoidins from food and model systems. *Food Chemistry*, 2005, 90, 4, 821-827.

Morales F, C. Romero a S. Jimenez-Perez. Chromatographic determination of bound hydroxymethylfurfural as an index of milk protein glycosylation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45, 5, 1570-1573.

Morales F. a M. Van Boekel. A study on advanced Maillard reaction in heated casein/sugar solutions: colour formation. *International Dairy Journal*, 1998, 8, 10, 907-915.

Morales F. J., V. Somoza a V. Fogliano. Physiological relevance of dietary melanoidins. *Amino Acids*, 2012, 42, 4, 1097–1109.

Mottram D. S., B. L. Wedzicha a A. T. Dodson. Food chemistry: Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 2002, 419, 448–449.

Naranjo G. B., L. S. Malec a M. S. Vigo. Reducing sugars effect on available lysine loss of casein by moderate heat treatment. *Food Chemistry*, 1998, 62, 3, 309–313.

Nursten H. *The Maillard reaction: Chemistry, biochemistry and implications*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 2005, ISBN: 978-0-85404-964-6.

O'Brien J., P. A. Morrissey a J. M. Ames. Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 1989, 28, 3, 211-248.

Ou S., Q. Lin, Y. Zhang, C. Huang, X. Sun a L. Fu. Reduction of acrylamide formation by selected agents in fried potato crisps on industrial scale. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2008, 9, 1, 116–121.

Pace C. N., H. Fu, K. L. Fryar, J. Landua, S. R. Trevino, B. A. Sirley, M. M. Hendricks, S. Iimura, K. Gajiwala, J. M. Scholtz, GR. Grimsley. Contribution of hydrophobic interactions to protein stability. *Journal of Molecular Biology*, 2011, 408, 3, 514–528.

Pastoriza S. a J. A. Rufián-Henares. Contribution of melanoidins to the antioxidant capacity of the Spanish diet. *Food Chemistry*, 2014, 164, 438-445.

Patience G. S. Gas and Liquid Concentration. *Experimental Methods and Instrumentation for Chemical Engineers*, 2013, 265–306, ISBN: 9780444538048.

Patrignani M., G. J. Rinaldi a C. E. Lupano. In vivo effects of Maillard reaction products derived from biscuits. *Food Chemistry*, 2016, 196, 204-210.

Perez Locas C. a V. A. Yaylayan. Isotope labeling studies on the formation of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde (HMF) from sucrose by pyrolysis-GC/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56, 15, 6717–6723.

Pischetsrieder M. a T. Severin. The Maillard reaction of disaccharides. In T. Labuza, G. A. Reineccius, V. Monnier, J. O'Brien, & J. Baynes (Eds.), *Maillard reactions in chemistry, food, and health*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1994.

Pokorny J., N. Yanishlieva a M. Gordon. *Antioxidants in Food - Practical Applications*. Woodhead Publishing, 2001, ISBN 978-1-85573-463-0.

Purlis E. Browning development in bakery products — A review. *Journal of Food Engineering*, 2010, 99, 3, 239–249.

Ramírez-Jiménez A., B. García-Villanova a E. Guerra-Hernández. Effect of storage conditions and inclusion of milk on available lysine in infant cereals. *Food Chemistry*, 2004, 85, 2, 239–244.

Ramonaitytė D. T., M. Keršienė, A. Adams, K. A. Tehrani a N. De Kimpe. The interaction of metal ions with Maillard reaction products in a lactose-glycine model system. *Food Research International*, 2009, 42, 3, 331–336.

Resmini P., L. Pellegrino a G. Battelli. Accurate quantification of furosine in milk and dairy products by a direct HPLC method. *Italian Journal of Food Science*, 1990, 2, 3, 173-183.

Rizzi G. The strecker degradation of amino acids: newer avenues for flavor formation. *Food Reviews International*, 2008, 24, 4, 416–435.

Robert F., G. Vuataz, P. Pollien, F. Saucy, M. I. Alonso, I. Bauwens a I. Blank. Acrylamide formation from asparagine under low-moisture Maillard reaction conditions. 1. Physical and chemical aspects in crystalline model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, 22, 6837–6842.

Robert F., G. Vuataz, P. Pollien, F. Saucy, M. I. Alonso, I. Bauwens a I. Blank. Acrylamide formation from asparagine under low-moisture Maillard reaction conditions. 2. Crystalline vs amorphous model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 11, 4628–4632.

Rufián-Henares J., B. Garcia-Villanova a E. Guerra-Hernandez. Determination of furosine in enteral formula. *Journal of Liquid Chromatography*, 2001, 24, 19, 3049-3061.

Rufián-Henares J., B. Garcia-Villanova a E. Guerra-Hernandez. Generation of furosine and color in infant/enteral formula-resembling systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, 17, 5354-5358.

Rufián-Henares J., C. Delgado-Andrade a F. Morales. Application of a fast high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of furanic compounds and glucosylisomaltol in breakfast cereals. *Journal of AOAC International*, 2006, 89, 1, 161-165.

Rufián-Henares J. A. a F. J. Morales. Functional properties of melanoidins: In vitro antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities. *Food Research International*, 2007, 40, 8, 995-1002.

Rufián-Henares J. A. a S. P. De la Cueva. Assessment of hydroxymethylfurfural intake in the Spanish diet. *Food Additives and Contaminants*, 2008, 25, 11, 1306-1312.

Rufián-Henares J. a C. Delgado-Andrade. Effect of digestive process on Maillard reaction indexes and antioxidante properties of breakfast cereals. *Food Research International*, 2009, 42, 3, 394-400.

Schmitz I., A. Gianfrancesco, U. Kulozik a P. Foerst. Influence of temperature and the physical state on available lysine in powdered infant formula. *Procedia Food Science* 1, 2011, 1, 1031–1038.

Serpen A. a V. Gökmen. Evaluation of the Maillard reaction in potato crisps by acrylamide, antioxidant capacity and color. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2009, 22, 6, 589-595.

Shahidi F. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. Elsevier. 2015, ISBN 978-1-78242-089-7.

Shahidi F. a P. K. J. P. D. Wanasundara. Phenolic antioxidants. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1992, 32, 1, 67–103.

Sharma O. P. a T. K. Bhat. DPPH antioxidant assay revisited, *Food Chemistry*, 2009, 113, 4, 1202-1205.

Slinkard K. a V. L. Singleton. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods, *American Journal of Enology and Viticulture*, 1977, 28, 1, 49-55.

Smuda M. a M. A. Glomb. Maillard degradation pathways of vitamin C. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52, 18, 4887–4891.

Somoza V. Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: An update. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2005, 49, 7, 663 – 672.

Sproston M. J. a C. C. Akoh. Antioxidative Effects of a Glucose - Cysteine Maillard Reaction Product on the Oxidative Stability of a Structured Lipid in a Complex Food Emulsion. *Journal of Food Science*, 2016, 81, 12, 2923-2931.

Stadler R. H., I. Blank, N. Varga, F. Robert, J. Hau, P. A. Guy a S. Riediker. Food chemistry: Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, 2002, 419, 449–450.

Stadler R. H., F. Robert, S. Riedeker, N. Varga, T. Davidek, S. Devaud a I. Blank. In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the Maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, 17, 5550–5558.

Stadler R. H. a A. Studer. Acrylamide formation mechanisms. In V. Gökmen (Ed.), *Acrylamide in food. Analysis, content and potential health effects* (pp. 1–17). New York: Academic press, 2015.

Summa C. A., B. de la Calle, M. Brohee, R. H. Stadler a E. Anklam. Impact of the roasting degree of coffee on the in vitro radical scavenging capacity and content of acrylamide. *LWT - Food Research International*, 2007, 40, 10, 1849–1854.

Sun Y., S. Hayakawa, M. Chuamanochan, M. Fujimoto, A. Innun a K. Izumori. Antioxidant effects of Maillard reaction products obtained from ovalbumin and different D-aldoheoses. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2006a, 70, 3, 598-605.

Sun Y., S. Hayakawa, M. Ogawa, K. Fukada a K. Izumori. Influence of a rare sugar, D-psicose, on the physicochemical and functional properties of an aerated food system containing egg albumen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56, 12, 4789-4796.

Sun Y., S. Hayakawa, S. Puangmanee a K. Izumori. Chemical properties and antioxidative activity of glycated α -lactalbumin with a rare sugar, D-allose, by Maillard reaction. *Food Chemistry*, 2006b, 95, 3, 509-517.

Swinehart, D. F. “The beer-lambert law.” *Journal Chemical Education*, 1962, 39, 7, 333–335.

Tanaka M., C. W. Kuei, Y. Nagashima a T. Taguchi. Application of antioxidative Maillard reaction products from histidine and glucose to sardine products. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1988, 54, 8, 1409-1414.

Teixidó E., O. Núñez, F. J. Santos a M. T. Galceran. 5-Hydroxymethylfurfural content in foodstuffs determined by micellar electrokinetic chromatography. *Food Chemistry*, 2011, 126, 4, 1902–1908.

The European Commission (2013). Commission recommendation 2013/647/EU on investigations into the levels of acrylamide in food. Official Journal of the European Union <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32013H0647> (accessed November 2015)

The European Commission (2014). Commission recommendation 2014/663/EU of 11 September 2014 amending the Annex to recommendation 2013/711/EU on the reduction of the presence of dioxins, furans and PCBs in feed and food. Official Journal of the European Union <http://eurlex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014H0663&from=FR> (accessed November 2015)

Thomas M. J. K. *Analytical chemistry by open learning - Ultraviolet and visible spectroscopy*, 2nd Edition, Wiley, England, 1996, ISBN: 978-0471967439.

Uribarri J., S. Woodruff, S. Goodman, W. Cai, X. Chen, R. Pyzik, A. Yong, G. E. Striker a H. Vlassara. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *Journal of the American Dietetic Association*, 2010, 110, 6, 911-916.

Van Boekel M. A. Formation of flavor compounds in the Maillard reaction. *Biotechnology Advances*, 2006, 24, 2, 230–233.

Vhangani L. N. a J. Van Wyk. Antioxidant activity of Maillard reaction products (MRPs) derived from fructose–lysine and ribose–lysine model systems. *Food Chemistry*, 2013, 137, 1, 92-98.

Wang H. Y., H. Qian a W. R. Yao. Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food Chemistry*, 2011, 128, 3, 573-584.

Wang W. Q., Y. H. Bao a Y. Chen. Characteristics and antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products from interactions in a whey protein isolate and sugars system. *Food Chemistry*, 2013, 139, 1, 355-361.

Wang X. D. 'Review: absorption and metabolism of beta-carotene', *Journal of the American College of Nutrition*, 1994, 13, 4, 314–325.

Waterhouse A. L. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Inc., 2002.

Whitfield F. B. Volatiles from interactions of Maillard reactions and lipids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1992, 31, 1-2, 1–58.

Wu G. *Amino Acids : Biochemistry and Nutrition*, CRC Press LLC, 2013, ISBN: 9781439861899.

Yaylayan V. A., A. Wnorowski a C. Perez Locas. Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51, 6, 1753–1757.

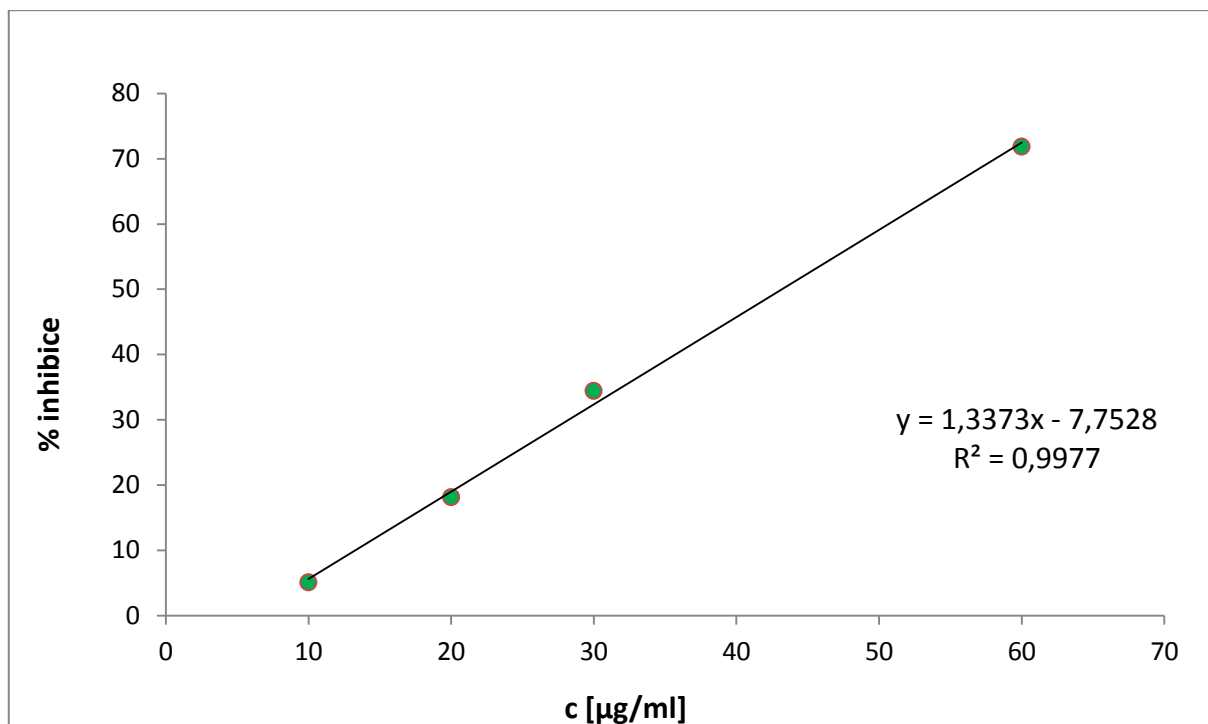
Yu Ai-Nong a Ai-Dong Zhang. The effect of pH on the formation of aroma compounds produced by heating a model system containing L-ascorbic acid with L-threonine/L-serine. *Food Chemistry*, 2010, 119, 1, 214–219.

Zehentbauer G. a W. Grosch. Crust aroma of baguettes. 1. Key odorants of baguettes prepared in two different ways. *Journal of Cereal Science*, 1998, 28, 1, 81–92.

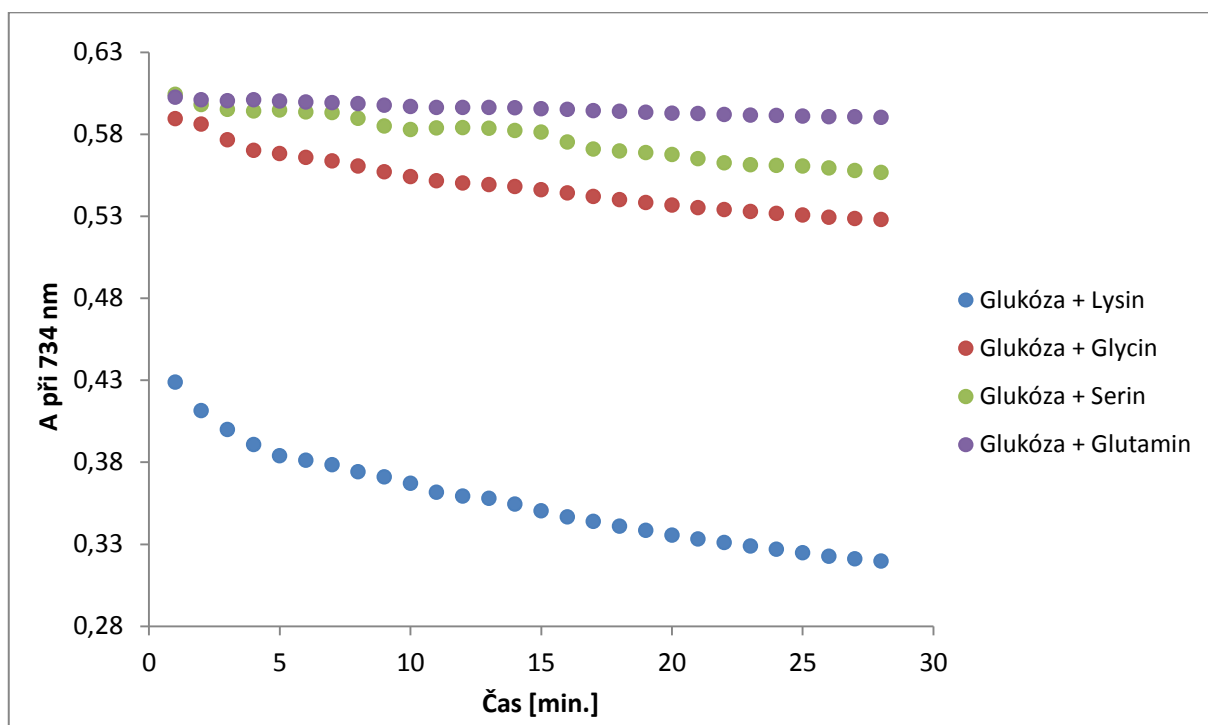
Zhao L., J. Chen, J. Su, L. Li, S. Hu, B. Li, X. Zhang, Z. Xu a T. Chen. *In Vitro* Antioxidant and Antiproliferative Activities of 5-Hydroxymethylfurfural. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61, 44, 10604-10611.

6. PŘÍLOHY

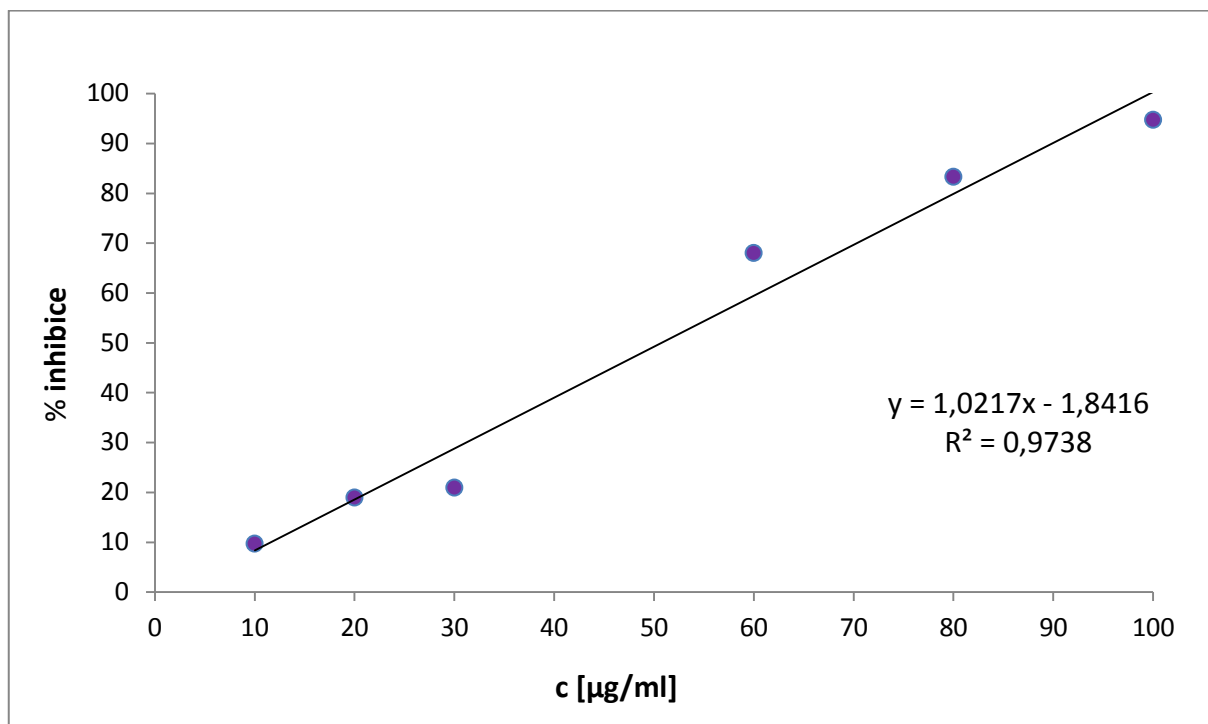
Příloha 1: Kalibrační řada Troloxu pro antioxidační metodu ABTS



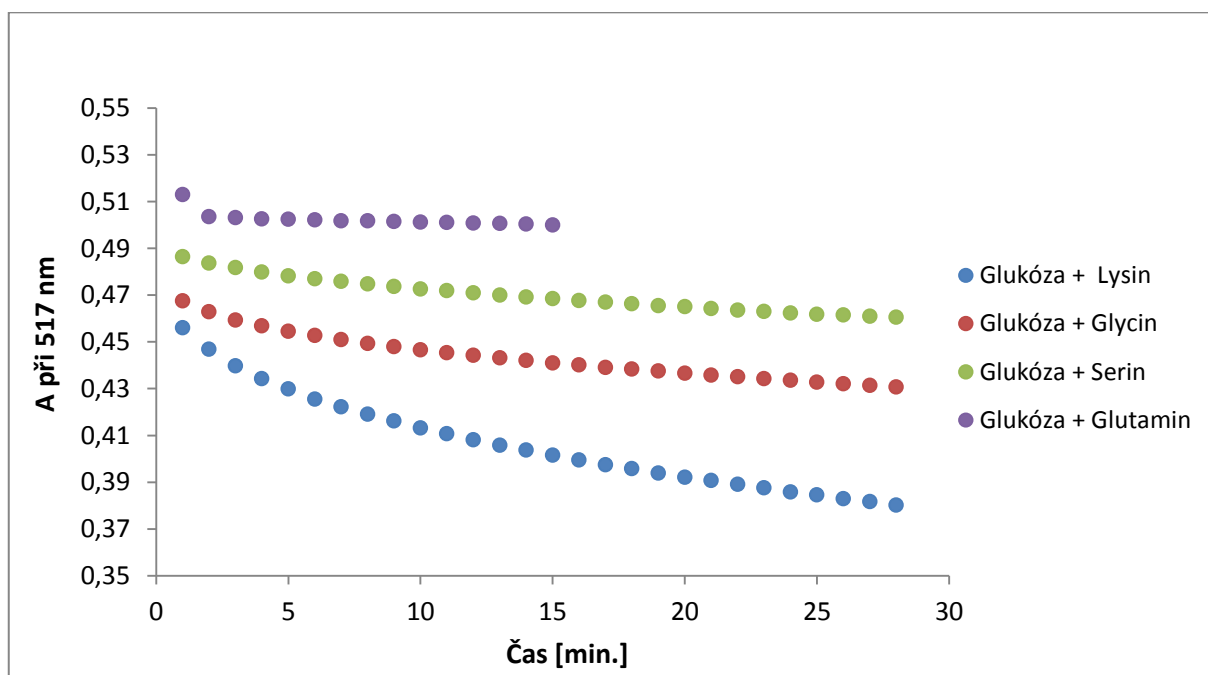
Příloha 2: Závislost absorbance (734 nm) radikálu ABTS na čase pro extrakt MRP vzniklých ze směsi cukru a aminokyseliny (2,5 mol/l; 1:1; 100x). Hodnoty znázorňují aritmetický průměr (N=3). MRP- Maillardovy reakční produkty



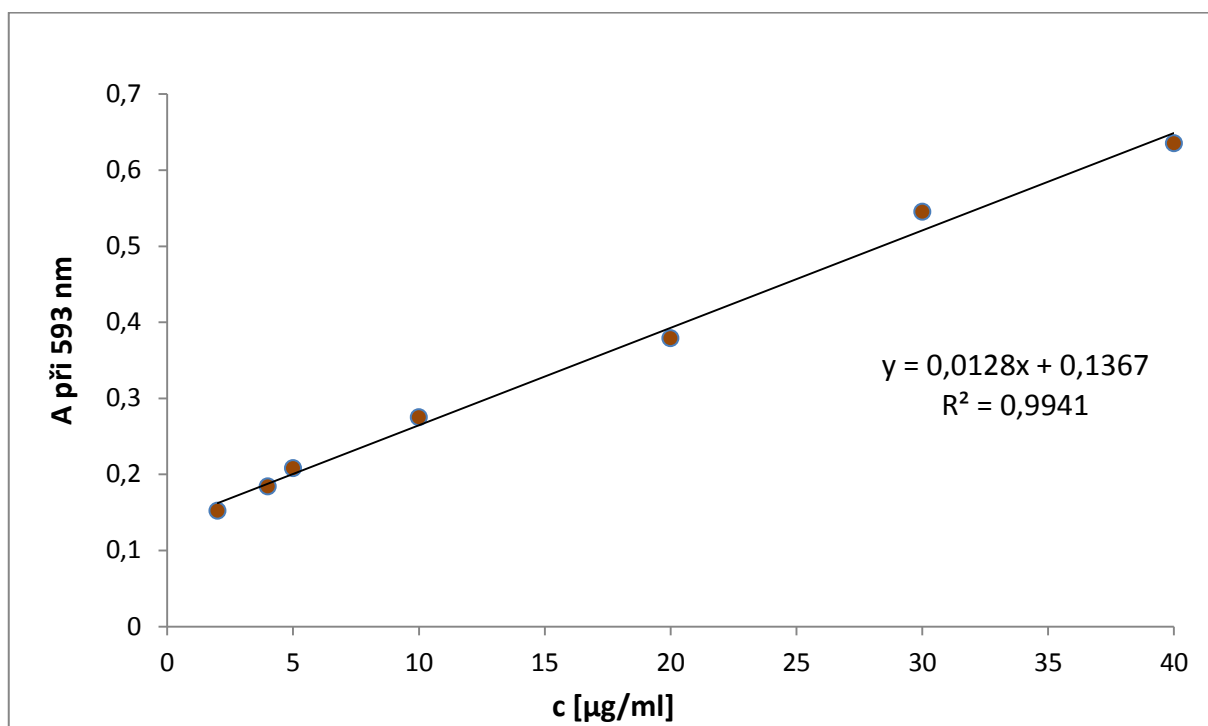
Příloha 3: Kalibrační řada Troloxu pro antioxidační metodu DPPH



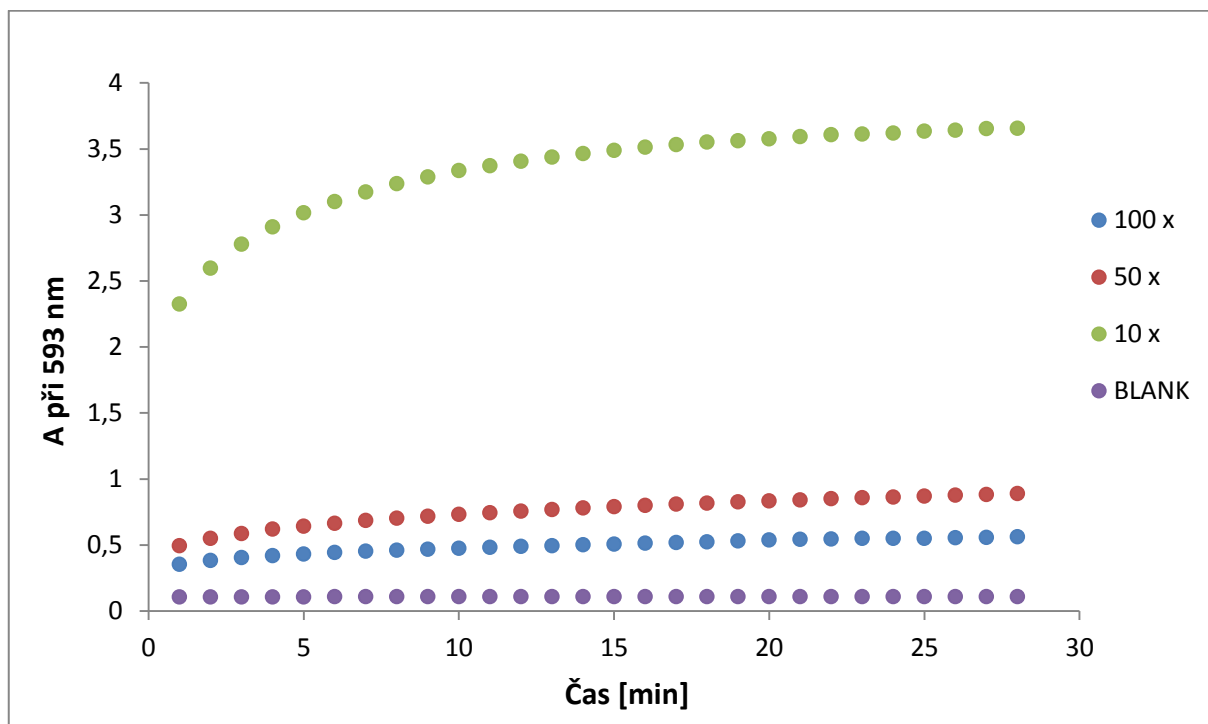
Příloha 4: Závislost absorbance (517 nm) radikálu DPPH na čase pro extrakt MRP vzniklých ze směsi cukru-aminokyseliny (2,5 mol/l; 1:1; 100x). Hodnoty znázorňují aritmetický průměr (N=3). MRP- Maillardovy reakční produkty



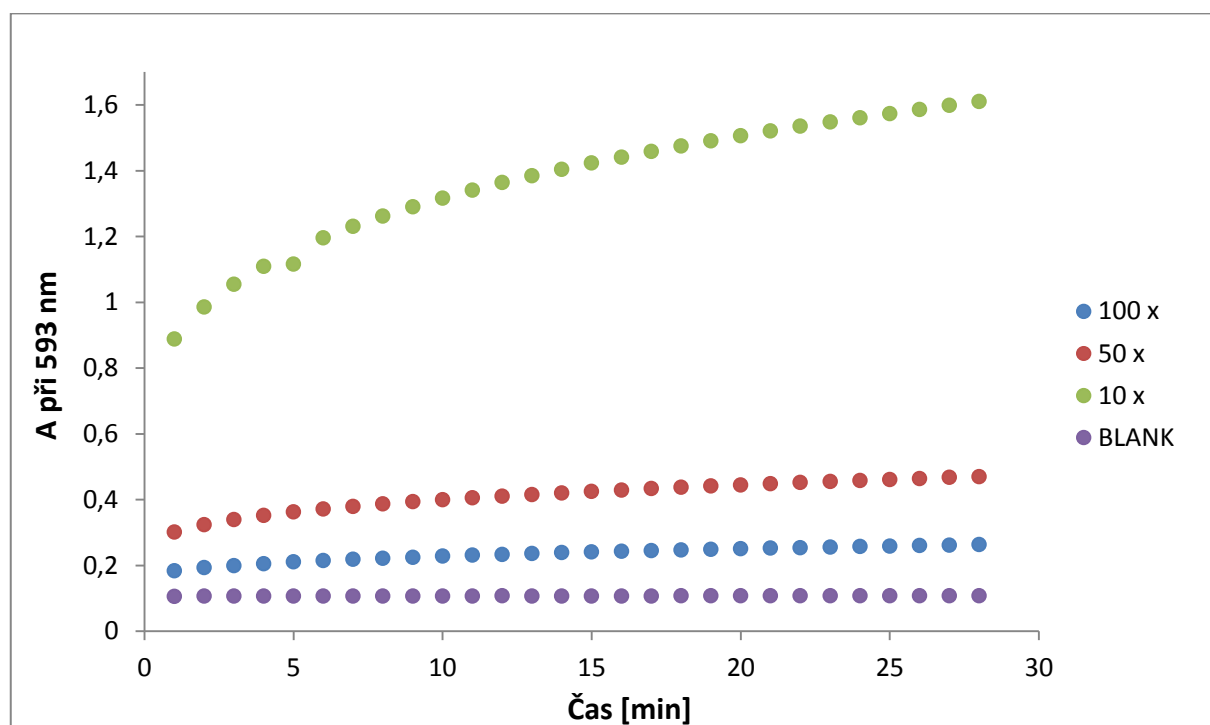
Příloha 5: Kalibrační řada Troloxu pro antioxidační metodu FRAP



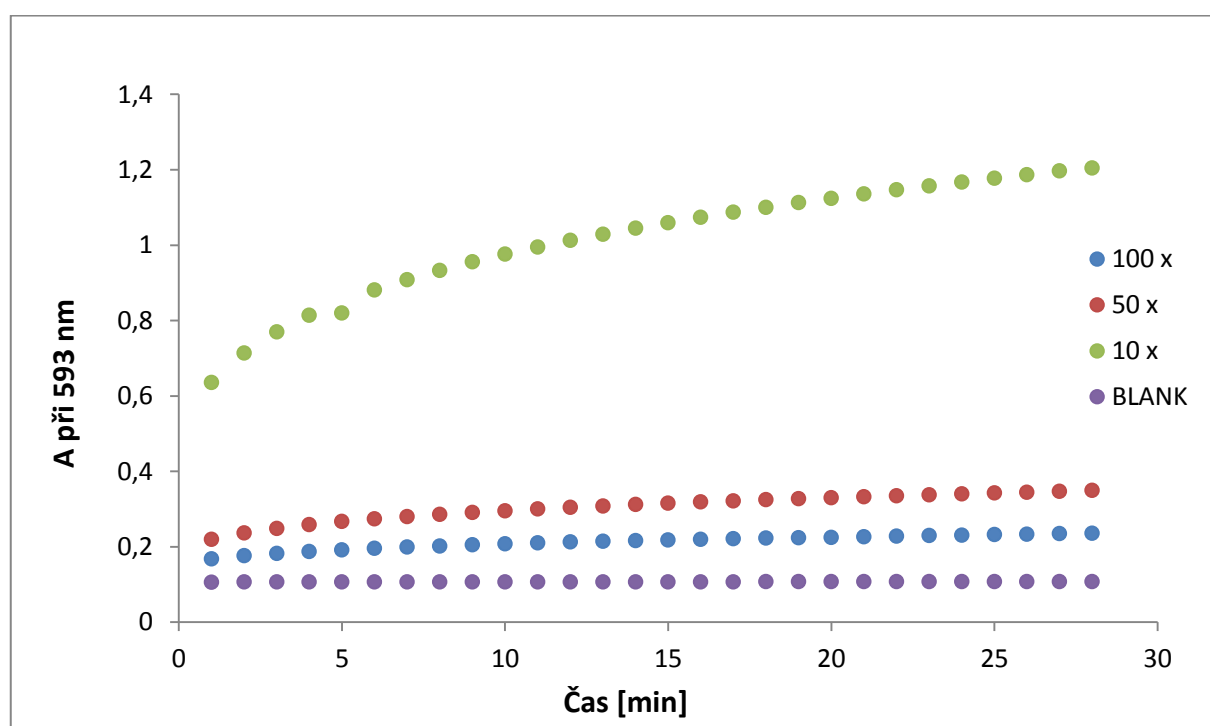
Příloha 6: Závislost absorbance (593 nm) pro metodu FRAP na čase pro extrakt MRP vzniklých ze směsi glukózy-lysinu (2,5 mol/l ; 1:1; 10x, 50x a 100x)



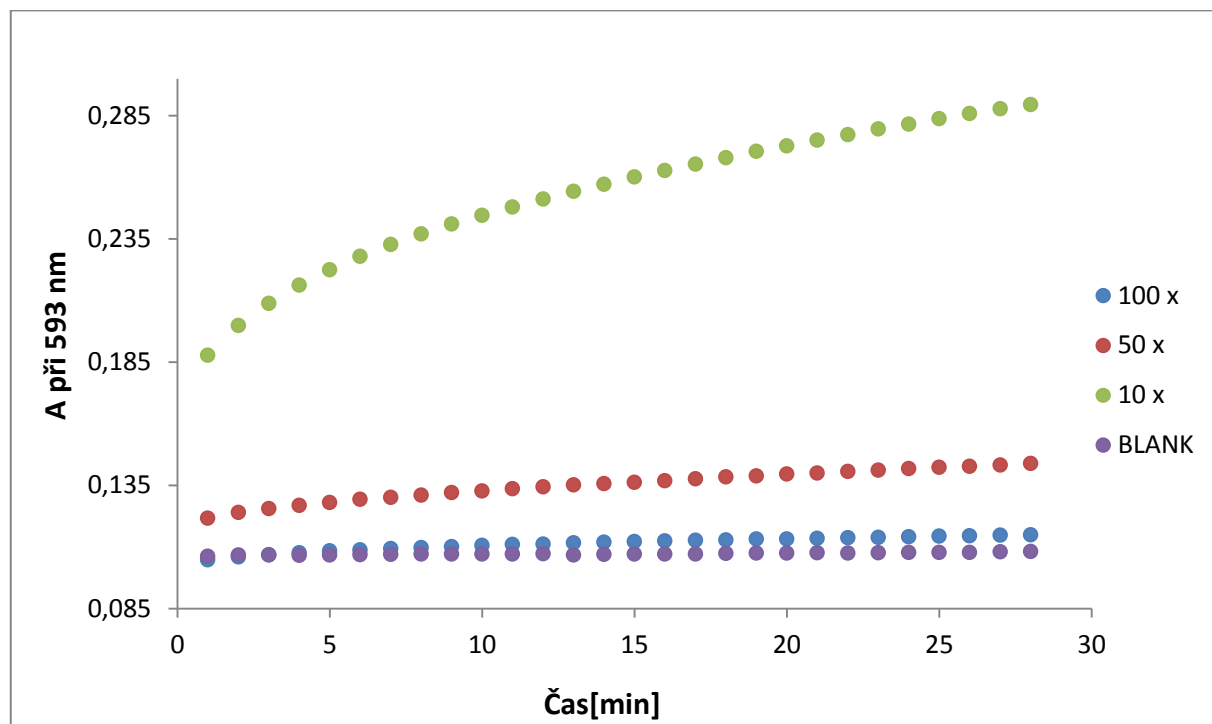
Příloha 7: Závislost absorpance (593 nm) pro metodu FRAP na čase pro extrakt MRP vzniklých ze směsi glukózy-glycinu (2,5 mol/l; 1:1; 10x, 50x a 100x)



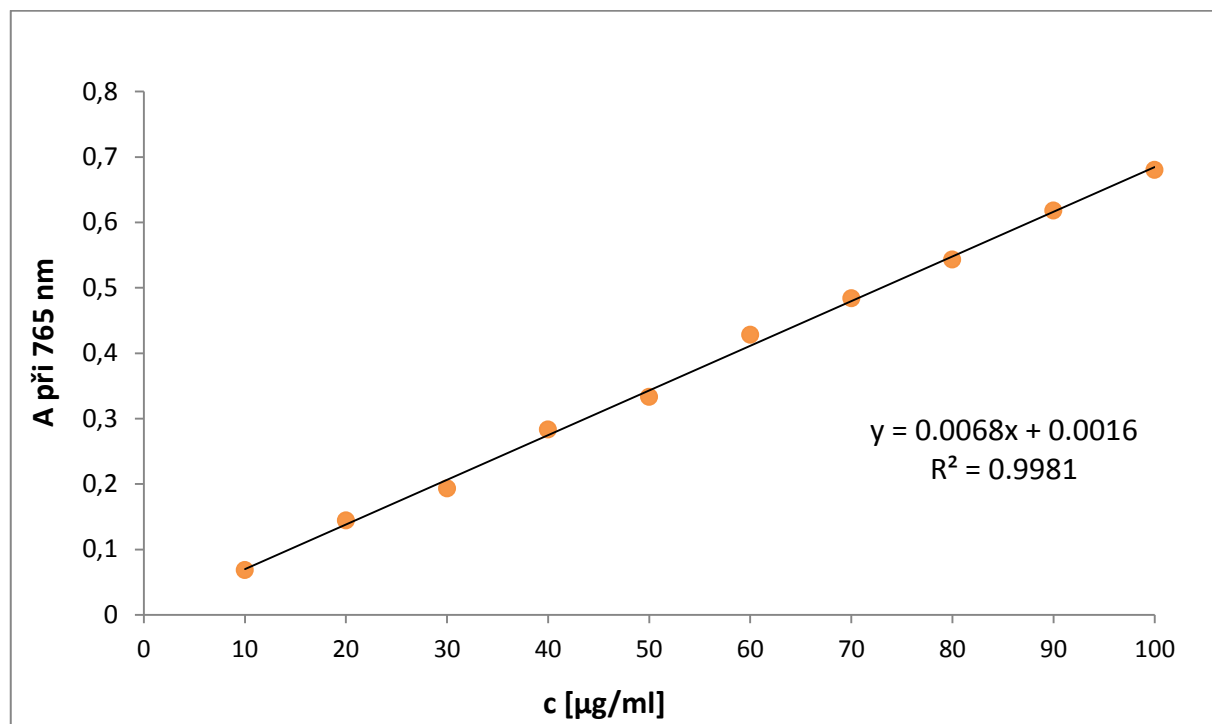
Příloha 8: Závislost absorpance (593 nm) pro metodu FRAP na čase pro extrakt MRP vzniklých ze směsi glukózy-serinu (2,5 mol/l; 1:1; 10x, 50x a 100x)



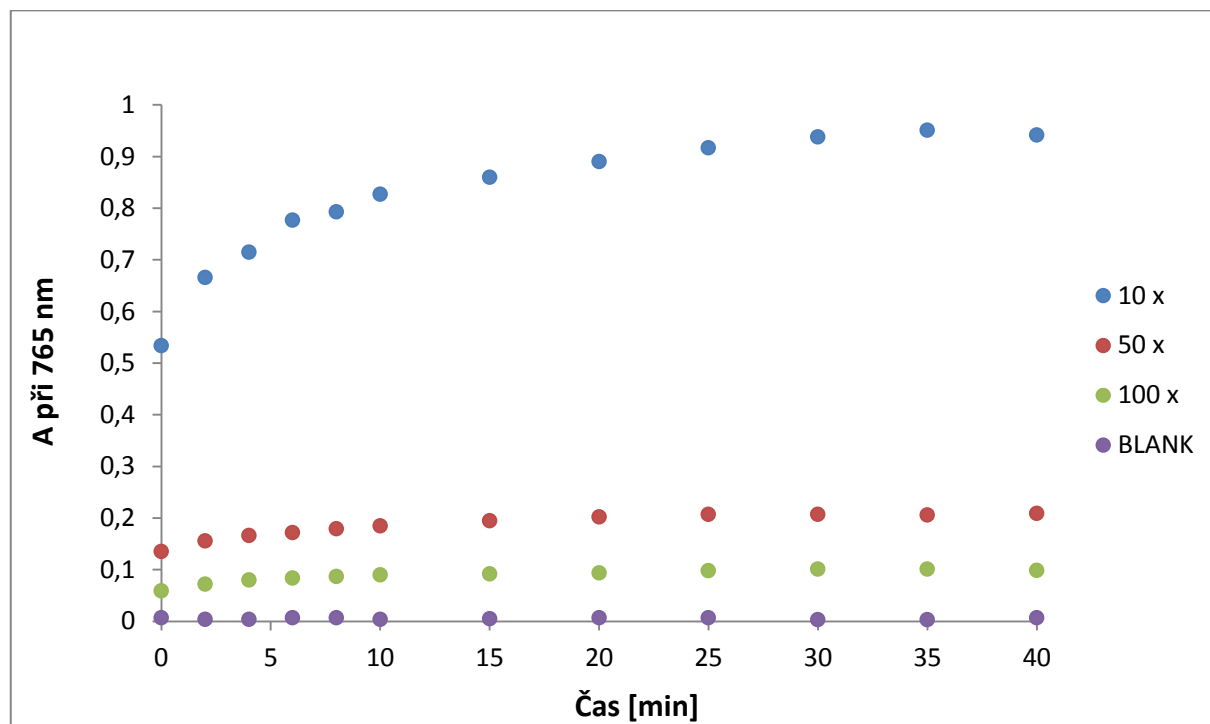
Příloha 9: Závislost absorbance (593 nm) pro metodu FRAP na čase pro extrakt MRP vzniklých ze směsi glukózy-glutaminu (2,5 mol/l; 1:1; 10x, 50x a 100x)



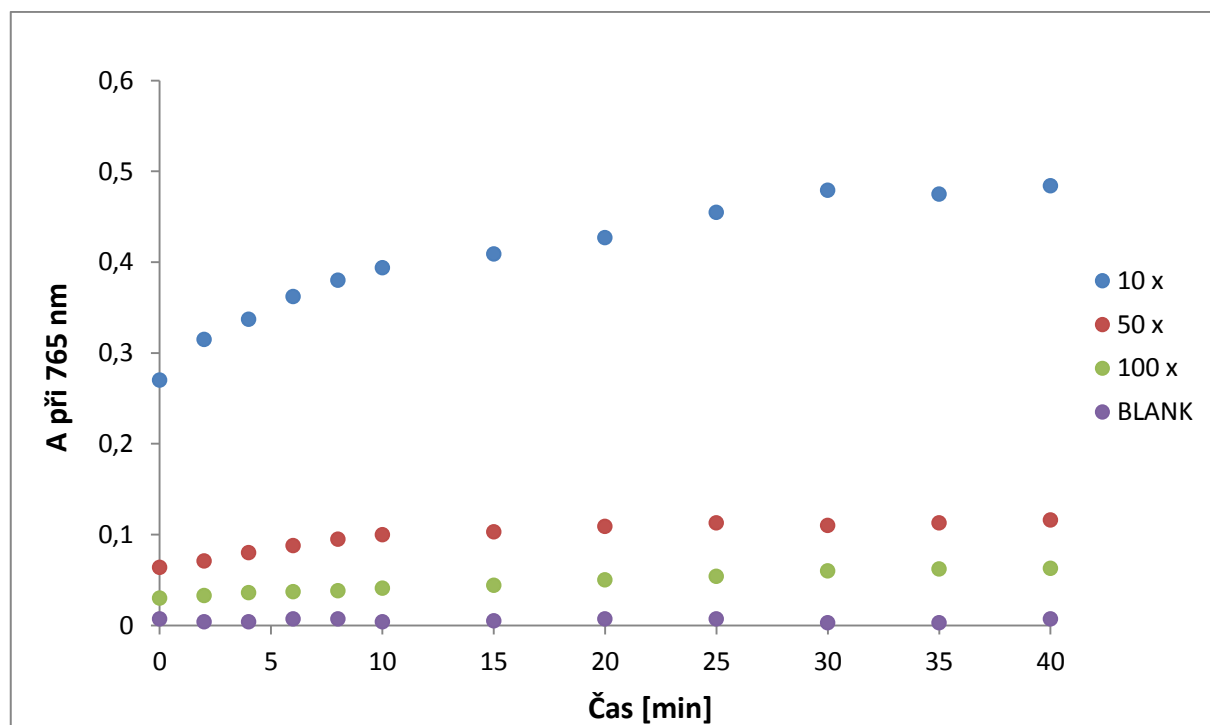
Příloha 10: Kalibrační řada kyseliny galové pro antioxidační metodu Folin-Ciocalteu



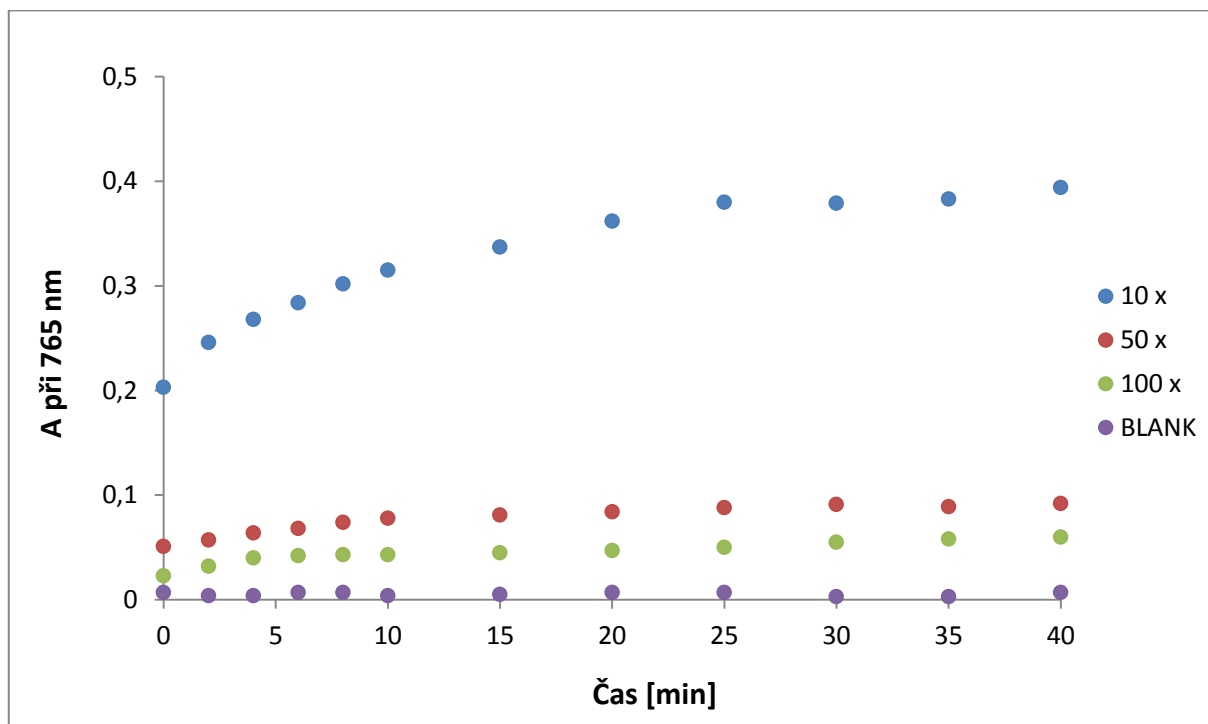
Příloha 11: Závislost absorbance (765 nm) pro metodu Folin-Ciocalteu na čase pro extrakt MRP vzniklých ze směsi glukózy-lysinu (2,5 mol/l; 1:1; 10x, 50x a 100x)



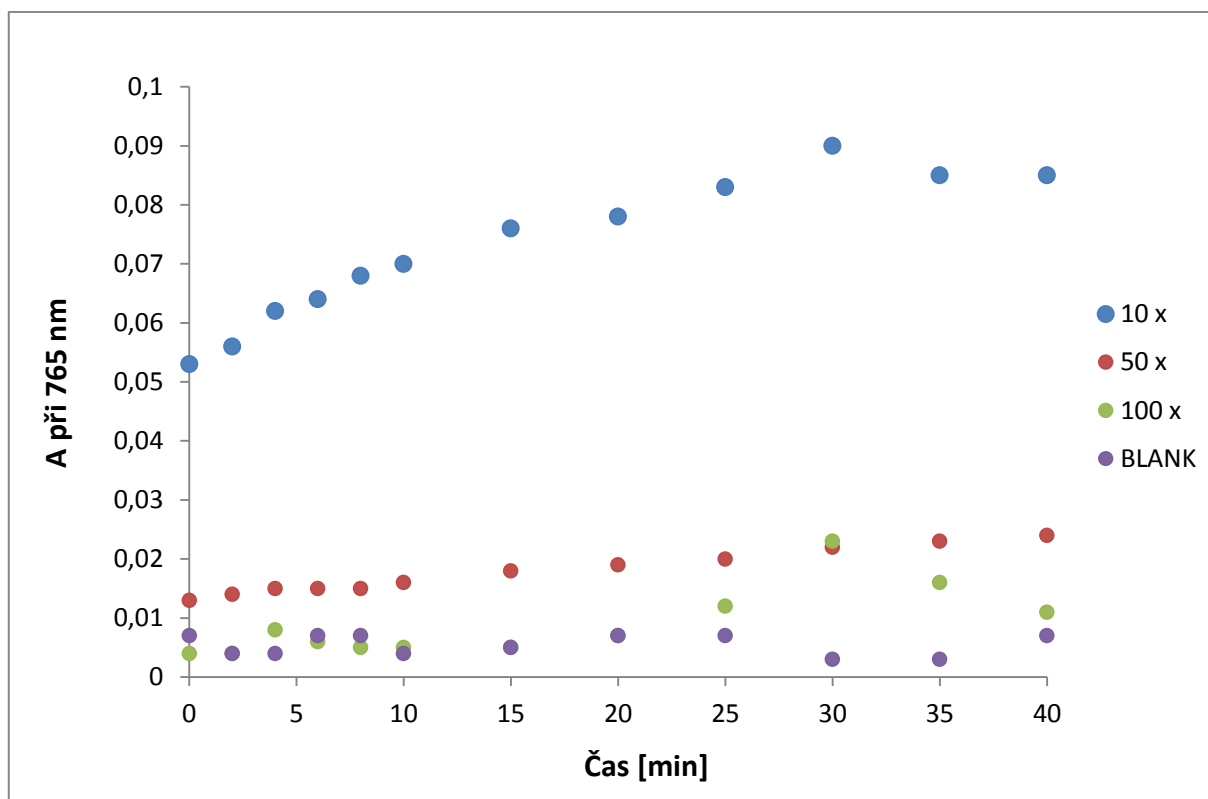
Příloha 12: Závislost absorbance (765 nm) pro metodu Folin-Ciocalteu na čase pro extrakt MRP vzniklých ze směsi glukózy-glycinu (2,5 mol/l; 1:1; 10x, 50x a 100x)



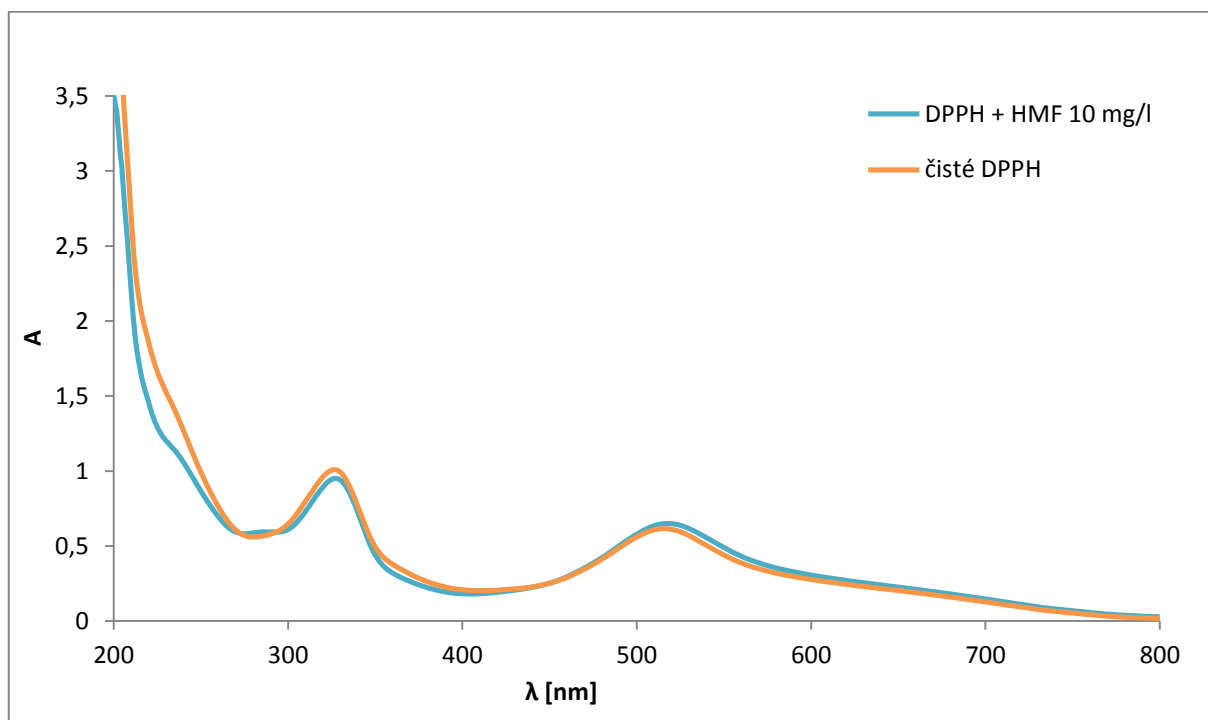
Příloha 13: Závislost absorbance (765 nm) pro metodu Folin-Ciocalteu na čase pro extrakt MRP vzniklých ze směsi glukózy-serinu (2,5 mol/l; 1:1; 10x, 50x a 100x)



Příloha 14: Závislost absorbance (765 nm) pro metodu Folin-Ciocalteu na čase pro extrakt MRP vzniklých ze směsi glukózy-glutaminu (2,5 mol/l; 1:1; 10x, 50x a 100x)



Příloha 15: Porovnání spekter DPPH + HMF (10 mg/l) s čistým DPPH



Příloha 16: Spektrum 5-hydroxymetylfurfuralu o různých koncentracích

