

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Vliv vibračního mletí na chemické a fyzikální vlastnosti prášku z plodů
rohovníku obecného

Diplomová práce

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

The effect of vibratory grinding on the chemical and physical properties of carob
powder

Master Thesis

2021

Bc. Veronika Ostrá

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika Ostrá**
Osobní číslo: **C19488**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Vliv vibračního mletí na chemické a fyzikální vlastnosti prášku z plodů rohovníku obecného**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Zpracovat teoretickou rešerši na téma vlastnosti a využití plodů rohovníku obecného (*Ceratonia siliqua* L.) v potravinářství. Definujte jeho chemické složení a vliv trávení na obsah biologicky aktivních látek. V rámci teoretické části práce zapracujte také informace o metodách využitých při experimentální práci. Použijte dostupné databáze odborných a recenzovaných periodik (knih).
2. Připravte prášek pomocí vibračního mlýnku (různý čas mletí) a stanovte vybrané chemické a fyzikální parametry prášku. Simulujte trávící proces (in vitro) a zjistěte obsah biologicky aktivních látek.
3. Výsledky vyhodnoťte pomocí adekvátních statistických metod a kriticky diskutujte s již publikovanými daty.

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

Konzultant diplomové práce: **Ing. Michaela Frühbauerová**
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Vliv vibračního mletí na chemické a fyzikální vlastnosti prášku z plodů rohovníku obecného jsem 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 15.7.2021

Bc. Veronika Ostrá v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Liborovi Červenkoví, PhD. a konzultantce mé diplomové práce Ing. Michaelle Frühbauerové za vynaložený čas při realizaci experimentu, vstřícnost a cenné rady při zpracování mé diplomové práce. Poděkování patří také rodině a přátelům, kteří mě podporovali při tvorbě této práce a v průběhu celého studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá vlivem vibračního mletí na chemické a fyzikální vlastnosti prášku z plodů rohovníku obecného. Teoretická část popisuje rohovník obecný, metody mletí a také antioxidační vlastnosti. Experimentální část se zabývá tím, jak různá doba mletí rohovníku obecného ovlivňuje barevnost, distribuci částic, sorpční vlastnosti, infračervené spektrum, antioxidační vlastnosti a biologickou dostupnost.

KLÍČOVÁ SLOVA

rohovník, mletí, antioxidanty, barevnost, sorpce, trávení

TITLE

The effect of vibratory grinding on the chemical and physical properties of carob powder

ANNOTATION

This master thesis deals with effect of vibratory grinding on the chemical and physical properties of carob powder. The theoretical part describes carob, grinding methods and antioxidant properties. The experimental part deals with carob and how different time of grinding carob affects color, particle distribution, sorption, infrared spectrum, antioxidant properties and bioavailability.

KEYWORDS

carob, grinding, antioxidants, color, sorption, digestion

OBSAH

Seznam obrázků	11
Seznam tabulek	13
Seznam zkratk	14
ÚVOD	16
1 TEORETICKÁ ČÁST	17
1.1 Rohovníkový lusk	17
1.2 Složení rohovníku	17
1.3 Technologie a využití.....	18
1.4 Účinky na zdraví.....	19
1.5 Velikost částic.....	20
1.5.1 Velikost částic rohovního prášku	20
1.5.2 Způsoby mletí	21
1.6 Teorie měření barevnosti	23
1.6.1 Barevnost rohovního prášku	24
1.7 Antioxidanty	25
1.7.1 Analytické metody zjištění antioxidační aktivity	26
1.7.2 Antioxidační aktivita rohovníku	27
1.8 Trávení <i>in vitro</i>	29
1.8.1 Vliv trávení <i>in vitro</i> na obsah fenolických látek a antioxidační aktivitu	29
1.9 Aktivita vody	31
1.9.1 Měření aktivity vody.....	33
1.9.2 Aktivita vody rohovního prášku	33
1.10 Sorpční izotermy	34
1.10.1 Klasifikace izoterm	34
1.10.2 Metody měření sorpčních izoterm	35
1.11 Použité analytické metody	36

1.11.1	IČ spektrometrie	36
1.11.2	UV-VIS spektrometrie	37
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
2.1	Přístroje a pomůcky	39
2.2	Chemikálie	39
2.3	Vzorky a jejich úprava	41
2.4	Příprava roztoků	41
2.4.1	Příprava standardního roztoku kyseliny gallové	41
2.4.2	Příprava standardního roztoku kvercetinu	41
2.4.3	Příprava standardního roztoku katechinu	41
2.4.4	Příprava standardního roztoku Troloxu	41
2.4.5	Příprava roztoku slin	41
2.4.6	Příprava roztoku žaludečních šťáv	42
2.4.7	Příprava roztoku střevních šťáv	42
2.5	Příprava extraktů	42
2.5.1	Metanолоvé extrakty	42
2.5.2	Extrakty po trávícím procesu <i>in vitro</i>	42
2.6	Metody chemické analýzy	42
2.6.1	Stanovení distribuce částic	42
2.6.2	Stanovení barevnosti	43
2.6.3	Stanovení sorpčních vlastností	43
2.6.4	Analýza infračerveného spektra	44
2.6.5	Spektrofotometrická analýza	44
2.7	Statistická analýza dat	46
2.8	Korelační analýza	46
3	VÝSLEDKY A DISKUSE	47
3.1	Stanovení distribuce částic	47

3.2	Stanovení barevnosti.....	49
3.3	Stanovení sorpčních vlastností.....	52
3.4	Analýza infračerveného spektra.....	55
3.5	Spektrofotometrická analýza	57
3.5.1	Metanolové extrakty	57
3.5.2	Extrakty po trávení <i>in vitro</i>	64
3.6	Korelační analýza	69
ZÁVĚR		72
POUŽITÁ LITERATURA.....		74
PŘÍLOHY.....		82

Seznam obrázků

Obrázek 1: IUPAC klasifikace adsorpčních izoterm pro rovnováhu plynných a kapalných látek [37].....	35
Obrázek 2: Vzorky rohovníkového prášku mletého po 30, 60, 90 s	47
Obrázek 3: Vzorky rohovníkového prášku mletého po 120, 180, 240 s	47
Obrázek 4: Různě namleté vzorky rohovníkového prášku	49
Obrázek 5: Sušené plody rohovníku obecného (před mletím)	51
Obrázek 6: Adsorpční izotermy pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku	55
Obrázek 7: Infračervené spektrum rohovníkového prášku namletého po dobu 30 s.....	56
Obrázek 8: Celkový obsah fenolických látek různě namletých vzorků rohovníkového prášku (metanolové extrakty)	57
Obrázek 9: Celkový obsah flavonoidů (metoda 1) pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (metanolové extrakty)	58
Obrázek 10: Celkový obsah flavonoidů (metoda 2) pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (metanolové extrakty)	59
Obrázek 11: Obsah katechinů pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (metanolové extrakty).....	60
Obrázek 12: Antioxidační aktivita s využitím DPPH radikálu pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (metanolové extrakty)	61
Obrázek 13: Antioxidační aktivita s využitím metody FRAP pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (metanolové extrakty)	62
Obrázek 14: Redukční vlastnosti pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (metanolové extrakty).....	63
Obrázek 15: Celkový obsah fenolických látek pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (extrakty po trávení <i>in vitro</i>).....	64
Obrázek 16: Antioxidační aktivita s využitím DPPH radikálu pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (extrakty po trávení <i>in vitro</i>).....	65
Obrázek 17: Antioxidační aktivita s využitím metody FRAP pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (extrakty po trávení <i>in vitro</i>).....	65

Obrázek 18: Redukční vlastnosti pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (extrakty po trávení <i>in vitro</i>)	65
Obrázek 19: Celkový obsah flavonoidů (metoda 1) pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (extrakty po trávení <i>in vitro</i>)	67
Obrázek 20: Celkový obsah flavonoidů (metoda 2) pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (extrakty po trávení <i>in vitro</i>)	67
Obrázek 21: Obsah katechinů pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (extrakty po trávení <i>in vitro</i>)	67

Seznam tabulek

Tabulka 1: Distribuce podle počtu a objemové distribuce částic [8].....	20
Tabulka 2: Stanovení objemové distribuce částic.....	48
Tabulka 3: Stanovení distribuce částic podle počtu.....	48
Tabulka 4: Stanovení barevnosti různě namletých vzorků rohovníkového prášku v režimu bez složky přímého odrazu (RSEX).....	50
Tabulka 5: Stanovení barevnosti různě namletých vzorků rohovníkového prášku v režimu bez složky přímého odrazu (RSEX) vzhledem ke standardu	51
Tabulka 6: Stanovení barevnosti sušených plodů rohovníku obecného v režimu bez i se složkou přímého odrazu (RSEX, RSIN).....	52
Tabulka 7: Stanovení aktivity vody a sušiny různě namletých vzorků rohovníkového prášku	53
Tabulka 8: Směrnice přímek (mg/min) z měření rychlosti sorpce při rozdílných hodnotách relativní vlhkosti vzduchu pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku.....	54
Tabulka 9: Biologická dostupnost	68
Tabulka 10: Výsledky korelační analýzy mezi skupinami látek (metanolové extrakty).....	70
Tabulka 11: Výsledky korelační analýzy mezi velikostí částic a biologickou dostupností látek	71

Seznam zkratek

ABTS	2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
BI	Index hnědnutí
CCD	Charge coupled device (zařízení s vázanými náboji)
CIE	International Commission on Illumination (Mezinárodní komise pro osvětlování)
DPPH	Radikál 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazil
DVS	Dynamic vapor sorption (dynamické měření sorpce)
FRAP	Ferric reducing antioxidant power (antioxidační schopnost redukovat ionty železa)
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy (infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací)
FTIR-ATR	Fourier-transform infrared spectroscopy – attenuated total reflectance (infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací – technika zeslabeného odrazu)
IČ	Infračervená spektrometrie
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii)
KATECHIN	Trans-3,3',4',5,7-pentahydroxyflavan
KVERCETIN	3,3',4',5,6-pentahydroxyflavon
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
RSEX	Reflectance specular excluded (bez složky zrcadlového odrazu)
RSIN	Reflectance specular included (se složkou zrcadlového odrazu)
RVP	Relative vapor pressure (relativní tlak par)

SCCM	Standard cubic centimeters per minute (standardní kubické centimentry za minutu)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného)
SSS	Saturated salted solution (metoda nasyceného solného roztoku)
TPTZ	2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazin
TROLOX	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina
USP	United States Pharmacopeia (Lékopis Spojených států amerických)
UV-VIS	Ultraviolet-visible (ultrafialovo-viditelná)
VANILIN	4-hydroxy-3-metoxybenzaldehyd
WU	Water uptake (absorpce vody)

ÚVOD

Strom *Ceratonia siliqua* patří do čeledi Leguminoseae. Běžně se vyskytuje ve středomořských zemích po staletí, a byl pěstován zejména pro výživu člověka, ale i zvířat. Pro zemědělský průmysl je velkou výhodou, že se využívají všechny části tohoto stromu. Nejvíce se ovšem využívá pro jeho vysoký obsah fenolických látek v potravinářském průmyslu, zejména pro jeho farmaceutické a dietetické výhody. Tyto látky vykazují antioxidační vlastnosti, nízký obsah cholesterolu a další [1].

Rohovník je široce rozšířen v suchých oblastech, na území mírného a subtropického pásu. Dokáže tolerovat velmi nepříznivé podmínky, přežije i velmi vysoké teploty, sucho a alkalické prostředí. Tento druh je obvykle dvoudomý, sklerofylní a dosahuje výšky až 10 m. Rohovníkové lusky se vyznačují vysokým obsahem cukru s asi 75 % sacharózy. Jsou také zkoumány jako materiál pro výrobu bioetanolu [2].

Kromě antioxidačních vlastností jsou lusky rohovníku zdrojem rohovníkové gumy díky přítomnosti cukru zvaného galaktomanan, který je významný také pro jeho zahušťovací vlastnosti. Dřeň lusků má čokoládovou chuť a může být používána jako náhrada kakaa s nižším obsahem kalorií. Obsahuje 40 % cukru, 35 % škrobu a 7 % bílkovin. V malé míře potom obsahuje taniny a minerály jako je vápník a hořčík [1].

Cílem této diplomové práce bylo popsat vlastnosti a využití plodů rohovníku obecného (*Ceratonia siliqua* L.) a následně připravit rohovníkový prášek pomocí vibračního mlýnu, stanovit jeho chemické a fyzikální parametry, simulovat proces *in vitro* trávení a následně zjistit antioxidační vlastnosti a obsah vybraných skupin biologicky aktivních látek. Pracovní hypotéza předpokládá, že prášek připravený pomocí vibračního mletí s různou časovou výdrží má rozdílné chemicko-fyzikální vlastnosti. Vliv času mletí se projeví na antioxidačních vlastnostech a obsahu některých skupin biologicky aktivních látek během procesu simulovaného trávení rohovníkového prášku.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Rohovníkový lusk

Lusk má světle až tmavě hnědou barvu, je pružný, rovný nebo mírně zakřivený se zesíleným krajem. Měří 10–20 cm na výšku a 1,5–2,0 cm na šířku. Lusk, který není zralý, je zelený, vlhký, a jeho chuť je svíravá na rozdíl od lusků zralého, kdy je chuť sladká [3].

Rohovníkový lusk se skládá ze 2 dvou hlavních částí, ze dřene (80–90 %) a semen (10–20 %). Dřeň je bezsemenná část lusků, která má dvě vrstvy, a to vnější kožovitou vrstvu, která se nazývá oplodí, a vnitřní vrstvu mezokarp. Semena se nalézají příčně k luskům a jsou oddělena mezokarpem. Tyto semena jsou velmi tvrdá a mají vejčité podlouhlý tvar. Dřeň má vysoký obsah cukru a relativně nízký obsah tuků a bílkovin. Bylo zjištěno, že semena mají nižší obsah cukru a více tuku ve srovnání s dřeni [4; 5].

Rohovníková dřeň se používá do krmiva pro zvířata. Semena, která jsou pokryta přiléhavou vrstvou, obsahují bílý a průsvitný endosperm (obsahující galaktomanany), nazývaný také rohovníková guma. Tato rohovníková guma se používá v potravinářském i nepotravinářském průmyslu pro svou schopnost tvořit velmi viskózní roztok při relativně nízké koncentraci. Proto je také využíván pro svou synergickou vlastnost, s karagenanem, agarem a xanthanem tvoří silnější a pružnější gely. Stejně jako ostatní semena luštěnin, rohovníková vrstva na semenech je nepropustná vůči vodě, takže semena nevyklíčí, dokud nebude obal porušen [2].

Po sklizni jsou rohovníkové lusky přivezeny do zpracovatelského závodu, kde jsou sušeny na přibližně 8 % vlhkosti, aby se zabránilo hnilobě. Lusky jsou poté šrotovány, aby se oddělila dřeň a semena v závislosti na jejich konečném použití [5].

1.2 Složení rohovníku

Rohovník obsahuje 1–5 % bílkovin v sušině. Zahrnuje 18 aminokyselin, které jsou identifikovány a kvantifikovány v kyselých hydrolyzátech. Nejvíce zastoupeny jsou kyselina asparagová (kyselina asparagová + asparagin), alanin, kyselina glutamová (kyselina glutamová + glutamin), leucin a valin. Dohromady tvoří asi 57 % celkového obsahu aminokyselin v luscích. Kyselina asparagová je zastoupena v nejvyšší koncentraci, cystein byl aminokyselina vykazující nejnižší koncentraci. Celkově rohovník obsahuje všech sedm esenciálních aminokyselin (threonin, methionin, valin, isoleucin, leucin, fenylalanin a lysin), díky čemuž jsou tyto plody dobrým zdrojem aminokyselin [3; 6].

Rohovníková dřeň obsahuje 40–50 % cukru, nejvíce zastoupenými cukry jsou sacharóza, fruktóza, a glukóza. Ovšem i další cukry jako jsou maltóza, rafinóza, stachyóza a inositoly jsou v rohovníku přítomny. Obsah inositolů v rohovníku je mnohem vyšší než v ostatních

luštěninách a je tedy považován za velmi bohatý zdroj bioaktivní protizánětlivé a antidiabetické sloučeniny d-pinitol.

Obsah tuku v rohovníku je velice nízký a pohybuje se mezi 0,4 až 1,3 %. Je složený z polynenasycených kyselin, a to kyseliny linolové a linolenové a olejové mononenasycené kyseliny. Z nasycených kyselin to jsou kyseliny palmitová a stearová. Díky tomu, že má rohovník nízký obsah tuku, může být využíván pro výrobu nízkotučných produktů, i jako náhrada za kakao.

Rohovníkový lusk obsahuje také několik minerálů. Mezi minerály, které převládají, patří vápník, draslík, fosfor a hořčík. Mezi stopové minerály, vyskytující se v rohovníku, se řadí železo, mangan, zinek a měď. Vápník a draslík se nachází ve vysokých koncentracích, fosfor a hořčík se nachází v koncentracích nižších.

Rohovník obsahuje hojně i polyfenoly, mezi které patří fenolové kyseliny, flavonoidy a taniny, které mohou být jak ve volné formě, tak i ve vázané a rozpustné konjugované formě. Nejpočetnějšími polyfenoly v rohovníku jsou fenolové kyseliny, které se dále dělí na kyseliny hydroxybenzoové a hydroxyskořicové. Z hydroxybenzoových kyselin je hlavní kyselinou kyselina gallová. Rovněž jsou přítomny deriváty kyseliny gallové. Hydroxyskořicové kyseliny jsou přítomny v relativně nízkých koncentracích. Flavonoidová frakce se skládá z flavonolů, flavan-3-olů, flavonů, flavanonů a isoflavanonů. Flavonoly jsou hlavními přítomnými flavonoidy a zahrnují kvercetin, myricetin, kaempferol, glukosidické deriváty a také katechin. Rohovník obsahuje hydrolyzovatelné i kondenzované taniny.

Koncentrace polyfenolů v rohovníku může být ovlivněna některými technologickými procesy jako je například pražení, kdy se některé fenolové sloučeniny mohou během pražení degradovat, jiné polymerní sloučeniny mohou uvolňovat polyfenoly, což je činí dostupnými a zvyšuje celkový obsah fenolů a antioxidační aktivitu praženého rohovníku.

Obsah jednotlivých komponentů se ale může značně lišit v závislosti na druhu, odrůdy, fyziologické dospělosti, období sklizně, podnebí, podmínkách skladování, zeměpisném původu, stupni zrání a zemědělských postupech [6].

1.3 Technologie a využití

Rohovníková dřev se může využívat různými způsoby v závislosti na použití. Při použití rohovníku jako krmivo pro zvířata je dřev rozemleta na různé velikosti podle toho, jaká hospodářská zvířata mají být nakrmena. V potravinářském průmyslu se dřev zpracovává na

rohovníkový sirup a rohovníkový prášek. Rohovníkový sirup se získává tak, že se rohovníková dřevina nechá ve vodě. Následně se směs vysuší a vaří, dokud se nezíská sirup.

Při výrobě rohovníkového prášku se dřevina nejprve loupe, rozemele na různé velikosti, praží, a nakonec se rozemele na jemný prášek, který se nazývá rohovníková mouka (prášek). Podle času a teploty použité k pražení lze získat střední nebo vysoce pražený rohovníkový prášek. Obecně se při běžném pražení dřeviny rohovníku používá teplotní rozsah 120–180 °C (většinou kolem 150 °C) po dobu 10–60 minut. Během procesu pražení dochází k důležitým chemickým reakcím, včetně karamelizace cukru a Maillardovy reakce, které způsobují významné změny v chemickém a senzoryckém profilu rohovníkové mouky a ovlivňují její konečnou chuť, barvu a aroma. Kakaová a karamelová vůně je důsledkem tepelné degradace vysokého obsahu cukru v rohovníku a také následnou tvorbou některých silných vůní prostřednictvím Maillardovy reakce. Pražení rohovníkové mouky nejen zlepšuje její barvu, chuť a aroma, ale vede také ke zvýšení jejího obsahu polyfenolů a antioxidační aktivity, které souvisejí se zdravotními přínosy.

Mezi další produkty, připravené z rohovníku jsou rohovníková pěna, kaše, cereálie, zmrzlina a mléčné nápoje, které by mohly být použity jako alternativa k potravinám na bázi kaka. Další potenciální aplikací rohovníku je výroba nízkotučného jogurtu s čokoládovou chutí, kdy má jogurt navíc nízký obsah laktózy s vysokým obsahem vlákniny a vysokou sladkostí. Proto je zde využití i pro lidi se zvláštními stravovacími požadavky, jako je například intolerance na laktózu [6].

1.4 Účinky na zdraví

Rohovník obsahuje fytochemické sloučeniny, které mají protinádorovou, antiproliferační a proapoptotickou aktivitu. Například kvercetin, který patří mezi polyfenoly, podporuje apoptózu v T-leukemických buňkách přímým zaměřením na antiapoptotický protein Bcl-xL, nebo například zmenšuje velikost nádoru.

Rohovník má taky antidiabetické účinky, které má díky obsahu d-pinitolu, který reguluje hladinu cukru v krvi pacientů s diabetem typu II. Rohovník se taky doporučuje k léčbě průjmů, kdy studie uvádí, že 2 % roztok rohovníku je schopen blokovat hemaglutinaci a přilnavost *E. coli* na izolované intestinální epiteliální buňky. Byl také studován účinek rohovníku, kdy snižuje hladinu lipidů a cholesterolu v těle. Rohovníkové vlákno v kombinaci s n-3 mastnými kyselinami jsou navíc hlavními složkami patentované potraviny pro pozitivní ovlivnění kardiovaskulárního systému [7].

1.5 Velikost částic

Velikost částic se dá na první pohled vyjádřit různými způsoby. Například koule se vyjádří průměrem, kvádr se popíše šířkou, výškou a hloubkou. Aby bylo možné popsat velikost částic jako je např. kvádr pouze jedním unikátním číslem (parametrem), musí se vyjádřit takovou veličinou, která se dá popsat pouze jedním číslem (parametrem). Tou veličinou může být například počet, povrch, hmotnost nebo objem. Aby bylo možné porovnávat různé techniky měření, musí se použít pouze kulový standard velikosti částic, který je vyjádřen jen jednou veličinou. Pro jednu konkrétní techniku může být i jiný standard než kulový. Tímto standardem se mohou porovnávat i různé přístroje, které měří stejnou technikou.

Velikost částic se dá popsat např. podle počtu nebo podle objemu. Názorný příklad distribuce podle počtu a objemové distribuce částic je znázorněn v Tabulce 1 [8]. Částic o velikosti 10–1000 μm je nejmenší počet, a to 0,2 %. Naopak nejmenších částic (0,1–1,0 μm) je nejvíc, a to 99,3 % z celkového počtu částic. Podle objemové distribuce je to ale rozdílné. Částice nejmenší velikosti (0,1–1,0 μm) dosahují z hlediska celkového objemu částic pouze 0,01 % a největší částice (10–1000 μm) zaujímají největší objem (99,96 %) z celkového objemu všech částic. Proto se k vyjádření velikosti částic využívají různé techniky měření velikosti [8].

Tabulka 1: Distribuce podle počtu a objemové distribuce částic [8]

Velikost (cm)	Počet částic	Počet částic (%)	Objem částic (%)
10–1000	7000	0,2	99,96
1–10	17500	0,5	0,03
0,1–1,0	3500000	99,3	0,01
Celkem	3524500	100,0	100,00

1.5.1 Velikost částic rohovníkového prášku

V článku Benkoviče et al. [9] měřili velikost částic rohovníkové mouky se semeny a bez semen. Vzorky rohovníkové mouky byly připraveny nejprve pomocí kladivového mlýna a následně za pomoci abrazivního rotoru pro jemné mletí. Velikost částic byla měřena pomocí laserové difrakce se suchou disperzní jednotkou, kdy na měření bylo použito 3–5 g mouky [9].

Pro vzorky rohovníkové mouky se semeny byly naměřeny hodnoty střední velikosti částic v rozmezí od $77,59 \pm 2,15 \mu\text{m}$ do $404,77 \pm 10,42 \mu\text{m}$, Rozdílné hodnoty velikosti částic lze připsat

různým metodám mletí. Pro rohovníkovou mouku bez semen byly naměřeny hodnoty střední velikosti částic v rozmezí od $80,35 \pm 5,08 \mu\text{m}$ do $249,70 \pm 27,23 \mu\text{m}$.

Následně byly měřeny hodnoty Sauterova průměru ($D [3,2]$), specifického povrchu a obsahu vlhkosti. Pro mouky obsahující semena byly naměřeny hodnoty Sauterova průměru v rozmezí od $31,10 \pm 0,81$ do $182,52 \pm 7,73 \mu\text{m}$ a pro mouky bez přítomnosti semen od $38,67 \pm 5,86$ do $126,21 \pm 8,66 \mu\text{m}$. Menší velikosti částic vykazovaly větší specifické povrchové plochy. Nejvyšší hodnota specifického povrchu byla detekována pro vzorky se semeny ($0,19 \pm 0,00 \text{ m}^2/\text{g}$) a bez přítomnosti semen ($0,16 \pm 0,02 \text{ m}^2/\text{g}$) [9].

1.5.2 Způsoby mletí

Válcové mlýny

Tyto stroje mají dva nebo více přesně opracovaných párů hladkých ocelových válců, které se otáčejí k sobě navzájem a táhnou částice skrz mezeru mezi válci. Aby se válce nepoškodily náhodným nárazem, jsou zde umístěny pružiny proti přetížení. První hnací silou je komprese, druhou může být smyková síla, která je vyvíjena pouze pokud se válce otáčejí při různých rychlostech, nebo pokud jsou válečky drážkované. V provozu procházejí částice mezi řadou válců, kde se mezera mezi válci stále zmenšuje. Díky gravitační síle materiál spadá do další řady válců, kde je poté rozdrcen na menší a menší částice. Celkový počet válců závisí na vlastnosti potravin a požadovaný stupeň zmenšení velikosti částic, ale většinou se počet válců pohybuje mezi třemi až osmi páry. Díky nízkému napětí se teplota produktu zvyšuje minimálně, současně i se snížením spotřeby energie. Mlýn lze nastavit vzhledem k různým velikostem prvotních částic změnou povrchové textury válců, ovládním rychlosti válce a nastavení mezery, aby se dosáhlo úzkého rozdělení velikosti částic. Velikosti produktu se pohybují od jednotek až po desetiny milimetrů [10].

Planetové mlýny

Planetové mlýny jsou vývojovým stupněm kulových mlýnů. V tomto druhu mlýna jsou válce, ve kterém se broušení provádí, upevněny na rámu a otáčeny kolem společné osy. V důsledku tření o vnější boční stěnu nebo mechanického pohonu, se každý válec otáčí kolem své osy se znaménkem opačným k rotaci rámu. Obecný typ pohybu je podobný pohybu planet kolem Slunce, a to je i důvod, proč se tyto mlýny nazývají planetové. Broušení se provádí díky odstředivé síle, Coriolisově síle a gravitaci. Většina planetových mlýnů pracuje na principu narážení. Aby bylo možné mít možnost vzájemného porovnání mlýnů, planetové mlýny se

vyznačují speciálním parametrem, a to zrychlením ovlivňující kuličky v okamžiku, kdy opustí zeď [11].

Vibrační mlýny

Vibrační mlýny se používají pro jemné a velmi jemné mletí. Rozdíl mezi kulovým mlýnem a vibračním mlýnem je takový, že válec koná pohyby nahoru a dolů místo kruhového pohybu. Amplituda vibrací je obvykle 20 mm a méně, takže trajektorie frézovacích těles je 20–30 mm. Toto zařízení je složené z malého odnímatelného válce, který je upevněn na vibrační ploše, může být ochlazen na teplotu kapalného dusíku, což dokáže získat i ultra jemné materiály, které se špatně melou. Negativní stránkou je, že vibrační mlýn musí být ukotven na speciálním podkladu [11].

Tryskové mlýny

Tyto mlýny fungují na takovém principu, že daný výrobek uvedou do vysoké rychlosti a nasměrují je k danému cíli. Akcelerace částic je dosažena v proudu plynu. Hlavní výhodou tohoto typu mlýna je nízké opotřebení vnitřního povrchu mlýna. Opotřeben je pouze cíl kolize, který však bývá vyroben z materiálu odolného proti opotřebení. U cyklónových tryskových mlýnů je mletí zařízení kolizí částic tak, že jsou trajektorie jednotlivých částic překříženy. Proto nemusí být přítomen žádný cíl kolize, a proto mohou být využívány ve zvláště důležitých oblastech. Když proud plynu vychází z výstupní trysky, ochladí se, což umožňuje mlít i surovinu citlivou na teplotu. Velikost částic získaných v tomto druhu mlýna je prakticky srovnatelná s produkcí kulových mlýnů a dosahuje několika mikrometrů.

Nevýhodou tohoto mlýnu je vysoký požadavek na velikost částic hrubého materiálu. Aby částice byly nesený proudem vzduchu bez usazování uvnitř mlýna je nutné, aby částice počáteční suroviny byly poměrně malé, obvykle menší než 1 mm. Toho se dosáhne dalším mlýnem před tryskovým mlýnem. Další nevýhodou je poměrně komplikovaná struktura trysky a potřeba přesné úpravy průtoků vzduchu. Třetí nevýhodou je obtížná kalibrace. Protože průtok vzduchu uvnitř mlýna klesá, zvětšení velikosti mlýna vyžaduje podstatné zvýšení průtoku a spotřeby vzduchu [11].

Nožový mlýn

Nožový mlýn se využívají pro homogenizaci látek s vysokým obsahem vody, olejů nebo tuků, ale také se dokonale hodí pro mletí suchých, měkkých a středně tvrdých produktů. Tím, že proces homogenizace je rychlý a bez výrazného nárůstu teploty, se zachovávají těkavé složky vzorku [12].

Princip tohoto způsobu mletí se zakládá na dvou otáčejících se ostrých robustních nožích uprostřed mlecí nádoby. V závislosti na směru otáčení se zmenšení velikosti provádí tupou stranou (předběžné zmenšení velikosti) nebo ostrou stranou (jemné broušení). Předvolitelná rychlost, která je udržována elektronicky, zajišťuje optimální přizpůsobení individuálním požadavkům aplikace a také reprodukovatelné výsledky broušení. Využívá se jak pro použití v zemědělství, tak pro oblasti biologie, potravinářství, lékařství a farmacie. Z nadávkovaného materiálu o maximální velikosti 40 mm, dokáže mlýn zmenšit částice na velikosti menší než 300 μm [12].

1.6 Teorie měření barevnosti

Rozpoznávání barev je pro lidské vidění velmi složitým procesem, kdy barva působí jako dojem při stimulaci vizuálního systému. Proto je důležité, aby byly barvy definovány přesnými hodnotami pomocí matematických modelů. Nejběžnější model je trojrozměrný, z důvodu tří receptorů v lidském oku. Aby byly určeny vhodné barevné prostory, musí být stanoveny změny ve vnímání těchto prostorů a jejich trichromatických složek X, Y, Z, které stimulují lidské vizuální receptory. Tyto prostory byly vyvinuty Mezinárodní komisí pro osvětlování (CIE, International Commission on Illumination), kdy jejich referenční podněty jsou L^* , u^* , v^* nebo L^* , a^* , b^* . Cílem bylo představit barvy na souřadnicích popisující základní atributy jako je světlost, barva a odstín, a vytvořit lineární barevný prostor, ve kterém vzdálenost mezi body, které definují jednotlivé barvy, byla úměrná vnímanému rozdílu mezi nimi (percepční barevné prostory). Vzdálenost mezi těmito body reprezentuje veličina nazývaná se změna barevnosti ΔE [13].

Mezi nejpreciznější metody se řadí měření v jednotném barevném prostoru $CIE L^*a^*b^*$, kde je každá barva popsána třemi složkami: L^* – světlost (0–100, černá–světlá), a^* – barva v zeleno-červeném poli (-128, +127), b^* – barva v modro-žlutém poli (-128, +127). V prostřední, kdy je a^* a b^* nulové, existují pouze šedé hodnoty. V tomto prostoru se nachází všechny barvy, které jsou viditelné a rozpoznatelné pro lidské oko. Prostor $CIE L^*a^*b^*$ je založen na takzvaném oponentově barevném modelu, kdy barvy ležící naproti sobě nelze vidět současně. To znamená, že je vidět buď tmavá nebo světlá barva, červená nebo zelená a žlutá nebo modrá. Pro $L^*a^*b^*$ se změna barevnosti mezi dvěma body vypočítá podle Rovnice 1 [13].

Rovnice 1: Výpočet změny barevnosti pro $L^*a^*b^*$ [13]

$$\Delta E_{LAB} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Další měření je v barevného prostoru CIEL**C***h**, kde je barva pospána složkami *L*-světlost, *C*-chroma (sytost), *h*-hue (odstín). Termín chroma slouží k rozlišení barevných dojmů (s odstíny) od bezbarvých dojmů (šedá) a k prohloubení rozdílů v barevné charakteristice při vizuálním posuzování. Termín hue vystihuje úhel odstínu pro každou barvu v rozsahu 0–360°.

Prostor CIEL**C***h** se liší od CIEL**a***b** tím, že k popisu barevných prostorů využívá polární souřadnice, oproti CIEL**a***b**, který měří v Kartezské soustavě souřadnic. Pro *L***u***v** se změna barevnosti mezi dvěma body vypočítá podle Rovnice 2 [13].

Rovnice 2: Výpočet změny barevnosti pro *L***u***v** [13]

$$\Delta E_{uv}^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta u^*)^2 + (\Delta v^*)^2}$$

Měření barevnosti může probíhat ve dvou různých módech odrazivosti, a to RSEX (reflectance specular excluded) a RSIN (reflectance specular included). Celková odrazivost se skládá ze zrcadlové a difusní odrazivosti. Zrcadlová odrazivost je taková, kdy se světlo dopadající na předmět odrazí v opačném úhlu, než dopadá světelný paprsek (zrcadlo), difusní odrazivost je odrazivost všemi směry v závislosti na struktuře měřeného povrchu. RSIN měří v módu, kdy zahrnuje jak zrcadlovou, tak difusní odrazivost. RSEX měří pouze difusní odrazivost a to tak, že je zrcadlová odrazivost vynechána přidáním světelné pasti, nebo otvoru, který umožní únik paprsku. Pro neprůhledný lesklý předmět, jsou celkové složky odrazivosti difusní i zrcadlové. Proto je vhodné měřit v režimu RSEX pro vyloučení zrcadlové odrazivosti a eliminaci lesklé složky, které nevypovídají o skutečné barvě předmětu. Ovšem pro matný rovný předmět s texturou, nevzniká zrcadlový odraz, proto je výhodné měřit v režimu RSIN [14].

1.6.1 Barevnost rohovníkového prášku

Rohovníkové lusky mají světlou až tmavě hnědou barvu. Změnu barvy rohovníkového lusu nebo prášku jsou způsobeny změnou tlaku, změnou teploty anebo pražením, kdy záleží na stupni a intenzitě pražení. Barevné změny rohovníkového prášku se vyjadřují jako hodnoty *L** [(0) tmavá- (100) světlá], *a** [(+) červená - (-) zelená] a *b** [(+) žlutá - (-) modrá], *C**: intenzita barvy, ΔE : celková změna barvy, BI: index hnědnutí.

Změna barevných charakteristik *L**, *a**, *b**, *C**, ΔE a BI může být způsobena karamelizací cukrů, tvorbou Maillardových reakčních produktů, jako jsou melanoidiny, a intenzitou hnědých pigmentů, které jsou spojeny s expanzí rohovníku. Tmavá barva praženého strukturovaného prášku rohovníku nepřímo souvisí se zvyšováním *a**, *b** [15] [16].

V článku Ali K.Yousifa a H.M.Alghzawiho [17] měřili barvu rohovníkového prášku po pražení a před pražením, kdy nepražený prášek měl světlejší barvu než pražený, pravděpodobně právě kvůli Maillardovým reakcím, kdy nepražený rohovníkový prášek měl částice o velikosti 500 μm , pražený 150 μm [17].

V článku Tounsi et al. [18] popisují stanovení barevné změny rohovníkového prášku, kdy nejdříve upravili rohovníkové lusky tak, že byly promyty vodou, sušeny na slunci, rozemlety a následně byla provedena extrakce. Extrakce proběhla horkou vodou, když voda začala vřít, byly přidány fragmenty rohovníku v poměru 1:4 (g/ml) a směs byla udržována za varu po dobu 30 minut. Po filtraci byl meziprodukt vysušen v mikrovlnné troubě při různých úrovních výkonu (100, 300 a 600 W) a následně byl rozemlet na jemný rohovníkový prášek.

U všech barevných parametrů (L^* , a^* , b^*) bylo ilustrováno významné zvýšení hodnot. Meziprodukt výroby rohovníkového prášku měl tmavě hnědou barvou, kdy L^* , a^* , b^* dosahovaly hodnot 31,71, 9,09 a 8,89, zatímco rohovníkové prášky byly charakterizovány světle hnědou barvou, kdy L^* , a^* , b^* dosahovaly hodnot 43,21, 10,32 a 15,31. Hnědá barva vedlejšího produktu rohovníku nebo prášků je způsobena hlavně charakteristickými pigmenty rohovníkového lusku.

Vysoká počáteční vlhkost bioproduktů může být výhodou pro zachování atributů kvality během mikrovlnného sušení. Mikrovlnné sušení tlačí vodu na povrch, aby se přeměnila na páru. Tento proces má za následek vysušení, aniž by došlo k jevům přehřátí povrchu, a tím k degradaci barev. Mikrovlnné sušení tedy nemusí významně přispívat k vnímání změny barvy. Mírnou změnu barvy meziproduktu od tmavě hnědé ke světle hnědé lze považovat za důsledek zvýšení specifického povrchu částic během mletí [18].

1.7 Antioxidanty

Antioxidanty jsou látky, které dokážou výrazně zpomalit nebo zabránit oxidaci. Antioxidanty zachytávají volné radikály, obsahují singletový kyslík, inaktivátory peroxidů, kovové ionty chelátory a jiné. Antioxidanty mohou působit inhibičně proti oxidaci prostřednictvím různých mechanismů a s různými činnostmi. Mohou být obecně klasifikovány na základě způsobu jejich působení jako primární antioxidanty, které narušují řetězovou reakci oxidace zachycením meziproduktů volných radikálů a sekundární antioxidanty, které zabraňují nebo zpomalují oxidaci pomocí potlačení iniciátoru a urychlovačů oxidace, nebo regenerací primárních antioxidantů [19].

1.7.1 Analytické metody zjištění antioxidační aktivity

Metoda s využitím DPPH radikálu

Tato metoda využívá stabilní volný DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazil) radikál. Reakce je založena na redukci DPPH v přítomnosti antioxidantů, kdy elektron atomu dusíku v DPPH je redukován přijetím atomu vodíku na odpovídající hydrazin. Při redukci dojde k odbarvení roztoku z fialové na žlutou, absorpční maximum DPPH radikálu je při vlnové délce 517 nm [20].

Metoda s využitím kationtu radikálu ABTS

Tato metoda je založena na oxidaci ABTS s peroxodisíranem sodným za vzniku 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny). Radikál je redukován v přítomnosti antioxidantu. Absorpční maximum tohoto modrozeleného radikálu je při 645, 734, 815 a 415 nm. Odbarvování roztoku (úbytek absorbance) se uvádí jako procenta inhibice kationtu radikálu ABTS. Využívá se pro antioxidanty rozpustné ve vodě i v tucích, pro čisté látky i extrakty potravin [21].

Stanovení celkového obsahu fenolických látek – Folin-Ciocalteuova metoda

Měření celkového obsahu fenolických látek je důležitý parametr pro měření celkové antioxidační aktivity. Používá se Folin-Ciocalteuova metoda, která je založena na redukci Folin-Ciocalteuova činidla fenolickými sloučeninami v alkalických podmínkách. Toto činidlo je složeno z kyselého roztoku fosforečnanu molybdenového a fosforečnanu wolframového a má absorpční maximum při vlnové délce 765 nm. Jako standard se využívá kyselina gallová, výsledky jsou uváděny jako ekvivalent kyseliny gallové [22].

Stanovení obsahu flavonoidů

Stanovení obsahu flavonoidů je založeno na tvorbě komplexu daného flavonoidu s hliníkem. Rozlišují se dvě metody, kde v první se měří absorbance v rozmezí od 410 do 430 nm a je selektivní pro flavonoly a luteolin. Jako standardy pro vyjádření výsledků se využívají flavonoly (kvercetin, rutin, kvercetrin, galangin) a také flavan-3-ol. Druhá metoda je prováděna v přítomnosti NaNO_2 v alkalickém prostředí a je specifická pro rutin, luteolin, katechiny a fenolové kyseliny. Metoda je založena na nitraci jakéhokoli aromatického kruhu nesoucího katecholovou skupinu, kde jeho třetí nebo čtvrtá pozice není substituovaná nebo sféricky blokována. Po přidání Al^{3+} vznikne žlutý roztok, který následně zčervená po přidání NaOH. Absorbance se měří při 510 nm [23].

Stanovení obsahu katechinů

Důvod, proč se stanovují katechiny v potravinách, je jejich biologická aktivita a také schopnost vychytávat volné radikály kyslíku. Stanovení obsahu katechinu se provádí v přítomnosti 2 % vanilinu a 20–25 % H_2SO_4 , kdy se pro všechny roztoky využívá metanol jako rozpouštědlo. Jako standard se využívá katechin nebo epikatechin. Vzniklému červenému komplexu je měřena absorbance při 500 nm [24].

Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP

Metoda FRAP (ferric reducing antioxidant power) je založena na redukci komplexů TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazin) s hexahydrátem chloridu železitého ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), které jsou téměř bezbarvé a nakonec mírně nahnědlé. Tato chemická látka tvoří po redukci modré železnaté komplexy. Metoda má svá omezení, zejména při měřeních pod pH 3,6. Kromě toho tato metoda není schopna detekovat pomalu reaktivní polyfenolové sloučeniny a thioly. Absorbance se měří mezi 570–630 nm [25].

Stanovení redukčních vlastností

Stanovení redukčních vlastností je založeno na redukci železitých iontů na železnaté, kdy jsou vzorky smíchány s hexakvanoželezitanem draselným a fosfátovým pufrem. Po inkubaci směsi při 50 °C, je reakce zastavena přidáním kyseliny. K vlastními stanovení se poté smíchá směs, destilovaná voda a chlorid železitý za vzniku modrozeleného komplexu. Absorbance je měřena při 700 nm. Zvýšení absorbance indikuje zvýšenou redukční sílu vzorku. Jako standard se využívá butylhydroxytoluen [26].

1.7.2 Antioxidační aktivita rohovníku

Antioxidační aktivita rohovníku byla v průběhu let velice zkoumána. Nejvíce zastoupenými metodami zjištění antioxidační aktivity byly metody DPPH a ABTS. Ve většině případů vykazovaly extrakty rohovníku relativně vysokou schopnost zachytávat volné radikály DPPH. Antioxidační aktivita, a tedy i obsah polyfenolů, je ovlivňována jak pohlavím rostliny, tak kultivarem rostliny. Vysoká antioxidační aktivita je vykazována i v listech rohovníku. Mezi několika rozpouštědly (např. dichlormethan, diethylether), byl ethylacetát nejúčinnější rozpouštědlo, které poskytlo nejvyšší antioxidační aktivitu [18].

Hlavní kategorie fenolických sloučenin nalezených v rohovníku jsou fenolové kyseliny, gallotaniny a flavonoidy. Polyfenoly lze nalézt v plodech rohovníku a konkrétněji ve dřeni, semenech a klíčcích. Ačkoli většina výzkumu byla dosud provedena na základě odhadu polyfenolů v plodech rohovníku, prokázaly některé studie přítomnost polyfenolů také v listech

rohovníku a kůře rohovníku. Mnoho výzkumných prací se zaměřilo na identifikaci a kvantifikaci polyfenolů v rohovníkových luscích. V zásadě bezsemenný rohovníkový lusk obsahuje vyšší množství polyfenolů ve srovnání se semeny nebo klíčky. Koncentrace celkových polyfenolů v rohovníkových luscích silně závisí na genetice, prostředí a extrakci [4].

V článku Tounsi et al. [18] popisují měření obsahu fenolických látek v rohovníkovém prášku. Postup upravení vzorku je popsána v Kapitole 1.6.1. Meziprodukt obsahoval nižší množství polyfenolu, a to 960 mg ekvivalentu kyseliny gallové na 100 g sušiny než rohovníkový prášek, a to 1300 mg ekvivalentu kyseliny gallové na 100 g sušiny.

Vyšší obsah polyfenolů v rohovníkovém prášku lze přičíst krokům zpracování, zejména mikrovlnnému sušení a mletí. Elektromagnetické záření mikrovlnné trouby a mechanické působení mlýna zvýšilo prasknutí matrice a uvolnění vázaných fenolických látek, což usnadnilo extrakci fenolických sloučenin rozpouštědlem v analytickém procesu. Na fenolické složení a tím i na antioxidační aktivitu má velký vliv i pražení [18].

V článku Kumazawa et al. [27] zjišťovali celkový obsah polyfenolů, antioxidační aktivitu metodou oxidace kyseliny linolové a antioxidační aktivitu metodou za využití DPPH radikálu v rohovníkových luscích. Příprava vzorku začala sušením a mletím, následně byly polyfenoly extrahovány studenou vodou a ponechány stát 12 h při 3 °C. Extrakt byl filtrován, aby se odstranily přítomné cukry. Tento extrakční postup byl proveden dvakrát, a poté proběhla další extrakce vodou při laboratorní teplotě a za následného míchání byl vzorek vařen po dobu 10 minut. Vzorek se nechal stát 12 hodin při 25 °C. Po filtraci se filtrát koncentroval a byl vysušen rozprašováním.

Celkový obsah polyfenolů v extraktu byl stanoven Folin-Ciocalteovou metodou za využití standardu kyseliny gallové, a to na 19,2 g/100 g extraktu.

Antioxidační aktivita extraktu rohovníkových lusků byla srovnávána s antioxidační aktivitou známých polyfenolových sloučenin, jako je katechin, epikatechin, epikatechin galát, epigalokatechin, kyselina gallová, prokyanidin B1, prokyanidin B2 a kvercetin. Extrakt byl hodnocen při konečné koncentraci 10 µg/ml a 50 µg/ml a další polyfenolové sloučeniny byly srovnávány při 10 µg/ml za stejných podmínek.

Antioxidační aktivita extraktu za využití DPPH radikálu při 5 µg/ml byla 13 % a nebyla tak silná, jako aktivita jiných polyfenolů. Aktivita extraktu při 25 µg/ml však byla silnější než aktivita katechinu a epikatechinu [27].

1.8 Trávení *in vitro*

In vitro trávení je simulace trávení v živém těle, kdy simulujeme jednotlivé anebo všechny fáze trávení. K tomu je potřeba slinný roztok, žaludeční tekutina, kyselina chlorovodíková, střevní tekutina, pankreatická tekutina, žluč a hydrogenuhličitan sodný podle toho, jaká metoda má být použita. Tyto roztoky nahradí podmínky v lidském těle. Dále musí být zajištěna teplota v lidském těle (37 °C). Podle typu metody mohou být využity různé způsoby kontroly pH žaludku a střevního pH, promíchávání v žaludku a vyprazdňování žaludku. Poslední fáze trávení zahrnuje různé druhy simulace průchodu střev, střevního vstřebávání a střevní mikroflóry. Simulace promíchávání v žaludku může být zajištěna např. rotačním mícháním, magnetickým mícháním, mechanicky hnacím zařízením nebo kontrakcemi zajištěnými tlakem vody (písty uvnitř válců). Vyprazdňování žaludku může být zaručeno simulací pylorického svěrače nebo čerpadly. Na základě typu metody vyprázdnění žaludku je následně zajištěn průchod střevy (např. peristaltické pumpy). Střevní vstřebávání je zaručeno dialýzou sloučenin rozpustných ve vodě a filtrací pro sloučeniny rozpustné v tucích [28; 29].

Simulace trávení *in vitro* může vypadat následovně. Všechny kroky trávení jsou prováděny v třepacím inkubátoru při 37 °C a 170 otáčkách za minutu. Při orální fázi je daný vzorek suspendován v amyláze a inkubován 2 minuty. Poté jsou přidány fosfolipidy a následně je přidáním pepsinu upraveno pH na 2,7, aby bylo simulováno pH žaludku. Poté je vzorek inkubován po dobu 2 hodin při 37 °C. Hydrolýza pepsinu je zastavena přidáním hydrogenuhličitanu sodného a následným zvýšením pH na 7,0. Střevní trávení probíhalo 2 hodiny při 37 °C po přidání žlučových solí, lipázy, trypsinu a pankreatické amylázy. Posledním krokem trávení je přidání enzymů, které jsou produkovány buňkami klků a mikroklků lemujících tenké střevo. Poté následuje úprava pH na 7,2 pomocí hydrogenuhličitanu sodného. Po 4 hodinách při 37 °C byly peptidázy inaktivovány ponořením do vroucí vody po dobu 5 min. Natrávené zbytky byly následně filtrovány a lyofilizovány [28].

1.8.1 Vliv trávení *in vitro* na obsah fenolických látek a antioxidační aktivitu

Abychom zjistili a porozuměli zdraví prospěšným účinkům rohovníku, musíme zkoumat obsah fenolických látek a antioxidační aktivitu rohovníku. Zdraví prospěšné účinky bioaktivních polyfenolů závisí na jejich biologické přístupnosti a na tom, jak je metabolizuje lidské tělo. Proto je důležité, aby byla vyhodnocena jejich stabilita a vstřebatelnost v zažívacím traktu. Provedením reakce *in vitro* simulujeme podmínky v lidském těle, a tím dokážeme předpovědět změnu stability a biologickou dostupnost látek v těle [30].

V článku Chait et al. [30] simulovali podmínky v lidském těle, kdy proběhly tři fáze trávení *in vitro*, a to orální fáze, gastrická fáze a fáze intestinální. Měřili obsah celkových fenolických a flavanoidních látek před trávením a po trávení, kdy měřili 3 frakce, a to rozpustné volné, rozpustné konjugované a vázané fenolové látky.

V první části porovnávali hodnoty obsahu fenolických a flavonoidních látek pro nenatrávené vzorky rohovníku. Vázané fenolické látky měly příspěvek na celkový obsah fenolických látek 46 %, volné rozpustné 24 % a konjugované rozpustné 29 %. S celkovými flavonoidními látkami to bylo obdobné, vázané volné 36 %, volné rozpustné 31 % a rozpustné konjugované 32 %. Tyto výsledky byly předvídatelné, protože v rostlinách se nejvíce vyskytují vázané fenolické látky.

V natrávených frakcích se výsledky změnily. Výsledky naměřené po orální fázi pro celkový obsah fenolických i flavonoidních látek poklesly o 12–25 %. V gastrální fázi se výsledky drasticky snížily až o 56 %. V intestinální fázi se poté výsledky snížily kromě volných rozpustných fenolů. Sečteme-li výsledky ze všech tří fází trávení, koncentrace je vždy vyšší, než pro vzorky, které nebyly natráveny. Tento jev může být výsledkem střevních trávicích enzymů a žlučových solí působících na potravinová matrice, usnadňující uvolňování vázaných fenolů do zažívacího traktu.

V další části měřili antioxidační aktivitu tří frakcí po trávení *in vitro* třemi různými metodami, a to metodou s využitím DPPH radikálu, kationtu radikálu ABTS a ORAC metodou. Pro všechny tři metody se hodnoty antioxidační aktivity většinou snižovaly v jednotlivých fázích trávení. Celková antioxidační aktivita po měření s DPPH, ABTS i ORAC byla vyšší po trávení *in vitro* než pro nenatrávené vzorky. Vyšší antioxidační aktivita po trávicím procesu lze připsat změnám pH, deprotonaci hydroxylové skupiny přítomné na aromatických kruzích fenolické sloučeniny, strukturálními změnami fenolických molekul anebo tvoření nových sloučenin s vyšší antioxidační aktivitou [30].

V článku Goulase a Hadjisolomou [31] měřili také vliv trávení *in vitro* na antioxidační aktivitu metodou s DPPH radikálem, FRAP metodou a měřením celkových fenolických látek. DPPH i FRAP prokázali snížení antioxidační aktivity po intestinálním trávení. Toto snížení se pohybovalo mezi 30 a 50 % pro DPPH a mezi 20 a 50 % pro hodnoty FRAP. Tak jako celkový fenolický obsah, antioxidační aktivita se významně zvýšila po žaludečním trávení. Snížení antioxidační aktivity pro střevní fázi lze připsat skutečnosti, že některé fenolické sloučeniny související s antioxidační aktivitou mohou být transformovány na různé strukturální formy s jinými chemickými vlastnostmi kvůli jejich citlivosti na alkalické pH. Celkově antioxidační

aktivita rohovníku klesá za podmínek trávení, protože způsobuje značné ztráty fenolických látek, které jsou hlavní antioxidanty ve dřeni rohovníku [31].

Další látky, které byly zkoumány v rohovníkové mouce ze semen po trávení *in vitro* jsou rozpustné polypeptidy pomocí SDS-PAGE za neredukujících podmínek, kdy jako referenční materiál byly použity proteinové extrakty z nezpracovaných semen. Po trávení *in vitro* byl elektroforetický profil výrazně změněn, kdy hlavní proteinové pásy zmizely po orálně-gastrické fázi trávení, kdy se tvořily polypeptidové fragmenty s nižší molekulovou hmotností. Po všech fázích trávení nebyl detekován žádný proteinový pás analýzou SDS-PAGE což dokazuje, že rohovníkový prášek je velmi dobře stravitelný. Toto se potvrdilo i následnou analýzou kapalinovou chromatografií [32].

V článku Ortega et al. [33] popisují vliv trávení *in vitro* na obsah fenolických látek, kdy je použita rohovníková mouka a rohovníková mouka, která byla promyta pro odstranění cukrů a rozpustné vlákniny. Trávení zahrnovalo orální, žaludeční a duodendální fázi.

Výsledky této studie odhalily, že *in vitro* gastrointestinální model trávení výrazně snížil obsah fenolu promyté rohovníkové mouky, pravděpodobně kvůli odstranění ve vodě rozpustných složek z potravinářské matrice. Z toho bychom mohli vyvodit, že rozpustné frakce jako cukry a rozpustná vláknina mohou mít ochrannou roli pro fenolické sloučeniny proti změnám pH a enzymatické činnosti během procesu trávení, zvyšování jejich stability a potenciální biologické přístupnosti, ale neposkytující žádnou ochranu proti kvercetinu. Proto fyzikálně-chemické transformace, jako je oxidace nebo interakce s jinými složkami (polysacharidy nebo nerozpustná vláknina), v trávící směsi mohl být v promyté rohovníkové mouce intenzivnější a být částečně zodpovědný za ztráty fenolu během trávícího traktu [33].

Metody trávení *in vitro* se hojně využívají pro simulace gastrointestinálního trávení, protože jsou rychlé a bezpečné. I když simulace trávení *in vitro* nemohou přesně předpovídat podmínky *in vivo*, pro zjišťování vlivu potravinové matrice a enzymů na biologickou dostupnost polyfenolů je model trávení *in vitro* velkou výhodou [34].

1.9 Aktivita vody

Obsah vody v potravině je důležitým faktorem, který reguluje rychlost kažení. Obsah vlhkosti potravin lze vyjádřit pomocí hmotnosti s vlhkostí nebo hmotnosti sušiny. Výpočet hmotnosti vzorku s vlhkostí je znázorněn v Rovnici 3 a 4 [10], výpočet hmotnosti sušiny vzorku je znázorněn v Rovnici 5 [10].

Rovnice 3: Výpočet hmotnosti s vlhkostí [10]

$$m = \left(\frac{m_{vody}}{m_{vody} + m_{hmotnost\ pevných\ látek}} \right) \times 100$$

Rovnice 4: Výpočet hmotnosti s vlhkostí [10]

$$m = \left(\frac{m_{vody}}{m_{vzorku}} \right) \times 100$$

Rovnice 5: Výpočet hmotnosti sušiny vzorku [10]

$$m = \frac{m_{vody}}{m_{hmotnost\ pevných\ látek}}$$

Abychom předpověděli stabilitu potravin, nestačí nám pouze vědět samotný obsah vlhkosti. Některé potraviny jsou při nízkém obsahu vlhkosti nestabilní (např. arašídý), zatímco ostatní potraviny jsou stabilní při relativně vysokém obsahu vlhkosti (např. bramborový škrob). Jde o dostupnost vody pro mikrobiální, enzymatickou nebo chemickou aktivitu, která určuje trvanlivost potravin, a to se měří aktivitou vody (a_w), také známou jako relativní tlak par (relative vapor pressure, RVP). Některé příklady, které snižují dostupnost vody v potravinách, jsou například ty, které fyzicky odstraňují vodu (odpařování, dehydratace, pečení, smažení, sušení mrazem) a ty, které imobilizují vodu potravin (např. použitím zvlhčovadel v potravinách a tvorbou ledových krystalů při zmrazování). Voda v potravinách vyvíjí určitý parciální tlak par v uzavřeném prostoru. Velikost parciálního tlaku par závisí na množství přítomné vody, teplotě a koncentraci rozpuštěných látek (zejména solí a cukrů) ve vodě.

Aktivita vody je definována jako poměr parciálního tlaku vodní páry nad potravinou ku parciálnímu tlaku vodní páry čisté vody za určité teploty. Výpočet aktivity je znázorněn v Rovnici 6 [10].

Rovnice 6: Výpočet aktivity vody [10]

$$a_w = \frac{P}{P_0}$$

1.9.1 Měření aktivity vody

Princip měření kapacitance nebo odporu

Přístroje měření kapacitance nebo odporu se skládají ze dvou nabitých desek, které jsou odděleny dielektrickou polymerní membránou. Jak membrána adsorbuje vodu, její schopnost udržet náboj se zvyšuje a měří se kapacita. Tato hodnota je zhruba úměrná aktivitě vody stanovené senzorem specifické kalibrace. Tyto přístroje nejsou ovlivněny většinou těkavých látek a mohou být mnohem menší než jiné alternativní senzory. Nevyžadují čištění, ale jsou méně přesné než detektory rosného bodu. Vyžadují pravidelnou kalibraci a mohou být ovlivněny zbytkovou vodou v polymerní membráně [35].

Využití teploty rosného bodu

Teplota, při které se na čistém povrchu tvoří rosa, přímo souvisí s tlakem par. Detektory, které využívají teplotu rosného bodu fungují na principu umístění zrcadla nad uzavřenou komorou na vzorky. Zrcadlo se ochlazuje, dokud se měří teplota rosného bodu pomocí optického senzoru. Tato teplota se poté použije k nalezení relativní vlhkosti komory za pomoci psychrometrického grafu. Tato metoda je nejpřesnější a často nejrychlejší, ale senzor vyžaduje čištění, pokud se na zrcátku hromadí nečistoty [35].

Využití laserového paprsku

Měření pomocí laserového paprsku patří mezi optické přístroje měření parciálního tlaku vzdušné vlhkosti, kdy hlavními komponenty jsou laserový zdroj záření, absorpční cela a detektor infračerveného záření. Měření funguje na principu snížení intenzity laserového záření o určité vlnové délce. Využívá se pro vyšší citlivost a specifitu, která vzniká díky spektrálně úzkému laserovému paprsku. Důvody širokého uplatnění přístrojů s využitím laserového paprsků jsou také nízké energetické nároky, výrobní technologie, velmi rychlé reakce, bezkontaktního měření, vysoká dlouhodobá stabilita a nedochází k degradaci vzorku. Nevýhody měření jsou ty, že zařízení je relativně drahé, musí být kalibrováno pomocí zkušebního plynu a měření se provádí za téměř atmosférického tlaku [36].

1.9.2 Aktivita vody rohovníkového prášku

V článku Yousifa a Alghzawihho [17] měřili aktivitu vody u tří produktů, a to u nepraženého rohovníkového prášku, praženého rohovníkového prášku a kakaového prášku. Pro nepražený rohovníkový prášek byla hodnota nejvyšší, a to $0,45 \pm 0,02$, pro pražený rohovníkový prášek $0,33 \pm 0,01$ a pro kakaový prášek $0,18 \pm 0,03$ [17].

Nižší hodnoty aktivity vody pro rohovníkový prášek by byly dosaženy, jestliže by proběhlo úspěšné mletí částic na velikost menší než 100 μm . Zde byly použity částice o velikosti 150 μm (pražený rohovníkový prášek) a 500 μm (nepražený rohovníkový prášek). Neschopnost dosáhnout menší velikosti částic rohovníkového prášku lze připsat vysokým hodnotám cukru, vlhkosti a aktivity vody [17].

1.10 Sorpční izotermy

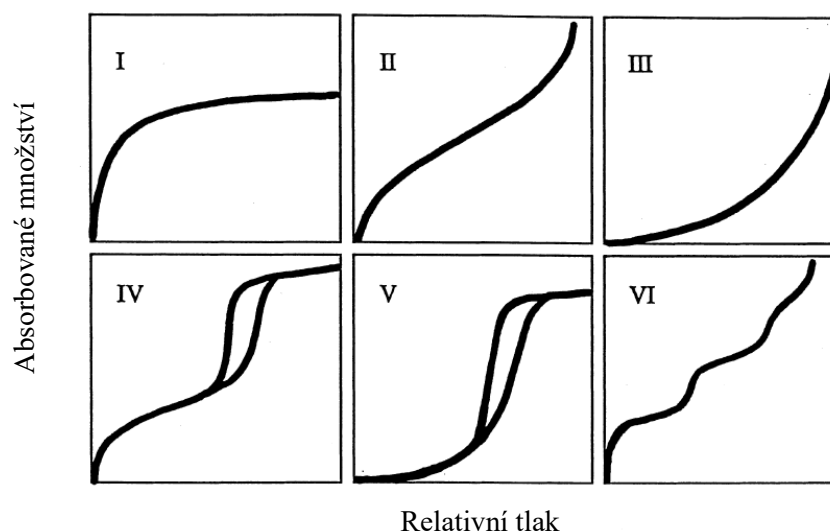
Výměna vodní páry mezi potravinou a okolním vzduchem závisí jak na potravine (míře vlhkosti a složení), tak na stavu vzduchu (teplota a vlhkost). Při konstantní teplotě se obsah vlhkosti potravin mění, dokud se nedostane do rovnováhy s vodní parou okolního vzduchu. Při těchto podmínkách pak potraviny nezvyšují, ani neztrácejí svoji hmotnost. To se nazývá rovnovážný obsah vlhkosti v potravinách. Když se zakreslí různé hodnoty relativní vlhkosti a hodnoty rovnovážného obsahu vlhkosti, získá se křivka známá jako sorpční izoterma. Na ose x se místo relativní vlhkosti dá zakreslit aktivita vody. Každá potravina má svoji sadu sorpčních izoterm při různých teplotách. Přesný tvar sorpční izotermy je způsoben rozdíly ve fyzikálních struktuře, chemickém složení a rozsahu vazby vody v potravinách, přičemž každá sorpční izoterma má charakteristický tvar. Křivka adsorpce je vytvořena zvlhčováním a desorpční křivku lze získat sušením. Rozdíl v rovnovážném obsahu vlhkosti mezi adsorpční a desorpční křivkou se nazývá hystereze. Sorpční izoterma tedy popisuje závislost obsahu vlhkosti na aktivitě vody. Využívá se k určení rychlosti a rozsahu sušení, optimální teploty mražení a požadované vlastnosti bariéry proti vlhkosti v obalových materiálech [10].

1.10.1 Klasifikace izoterm

Při analýzách je důležitým krokem klasifikace izoterm, zejména pro teoretické modelování adsorpčních jevů. Podle manuálu IUPAC existuje šest typů izoterm pro rovnováhu plynných a kapalných látek, které jsou zobrazeny na Obrázku 1 [37].

Izoterma typu I se blíží mezní hodnotě a většinou se používá k popisu adsorpce na mikroporézní adsorbenty. Typy II a III představují adsorpci na makroporovitých adsorbentech se silnými a slabými adsorbát-adsorbent interakcemi. Typy IV a V popisují mono a vícevrstvou adsorpci a kapilární kondenzaci. Typ VI popisuje to, že adsorpční izotermy mohou mít jeden nebo více kroků [37].

Obrázek 1: IUPAC klasifikace adsorpčních izoterm pro rovnováhu plyných a kapalných látek [37]



1.10.2 Metody měření sorpčních izoterm

Měření sorpčních izoterm se provádí dvěma způsoby-metodou nasyceného solného roztoku (SSS) a metodou dynamického měření sorpce par (DVS). Při využití metody SSS jsou vzorky umístěny do uzavřeného prostředí s relativní vlhkostí stabilizovanou prostřednictvím nasyceného solného roztoku. U některých potravin se může vyskytnout problém při vysoké relativní vlhkosti, a to v podobě výskytu plísní. Tomu se dá předejít přidáním aseptického činidla (např. toluen) do rovnovážného prostředí. Výsledky získané metodou SSS se mohou v různých studiích lišit kvůli různým kritériím pro posuzování rovnováhy a vysoké náhodné chybě samotné metody. Rovnováha adsorpce vlhkosti v metodě SSS je považována za dosaženou, když váhy vzorků dosáhnou konstantní hodnoty, která se obvykle posuzuje podle toho, že hmotnostní rozdíl ze dvou po sobě jdoucích měření v definovaném časovém intervalu je stejný, nebo menší než hodnota. Kritéria hodnocení se mohou v různých zprávách a pro různé vzorky velmi lišit. Kromě toho při stanovení rovnovážného obsahu vlhkosti se musí vzorek pro vážení opakovaně vyjímat z exsikátorů, což zvyšuje náhodnou chybu výsledků vážení, protože obsah vlhkosti vzorku bude ovlivněn teplotou prostředí a relativní vlhkostí. Navíc když jsou vzorky odebrány k vážení, může být narušen rovnovážný stav exsikátorů. To je zapříčiněno proniknutím vnějšího vzduchu do exsikátorů, což způsobuje kolísání relativní vlhkosti. To prodlužuje dobu experimentu mezi dvěma po sobě jdoucími měřeními hmotnosti. Proto je tato metoda velmi časově náročná, může trvat i několik měsíců [38].

Další způsob měření sorpčních izoterm je dynamické měření sorpce (DVS), což je gravimetrická metoda, která umožňuje rychlé a přesné stanovení sorpčních izoterm a difúzní kinetiky. Vzorky jsou vloženy do vážicí misky a jsou vystaveny kontrolované relativní vlhkosti vzduchu a teplotě prostředí. Aby bylo možné zkoumat vodní charakteristiku v pevných elektrolytech, je voda využívána jako sorbát a elektrolyt jako sorbent. Parciální tlak par kolem vzorku je za použití kontrolovaného ovládání hmotnostního toku řízen smícháním nasycených a suchých nosných plynných par. Konstantní teplota se udržuje uzavřením celého systému v inkubátoru.

Množství absorpce vody (WU) vzorku, který je vystaven definovanému parciálnímu tlaku může být získán pomocí Rovnice 7 [39].

Rovnice 7: Výpočet množství absorpce vody [39]

$$\text{množství absorpce vody} = \frac{\bar{m}_{a_w} - m_{suš.}}{m_{suš.}}$$

\bar{m}_{a_w} je střední hmotnost vzorku pro definovanou aktivitu vody a $m_{suš.}$ je hmotnost sušiny vzorku. Sorpční izoterma je grafická reprezentace hodnot WU, kdy popisuje vztah mezi obsahem vody elektrolytu a aktivitou vody za konstantní teploty [39].

1.11 Použité analytické metody

1.11.1 IČ spektrometrie

Infračervená spektrometrie se zabývá absorpcí infračerveného záření o vlnové délce od 800 nm do 100 μm . Rozlišují se tři infračervené oblasti, a to blízká, vzdálená a střední infračervená oblast, která se využívá nejvíce. Tato oblast se nachází v rozsahu od 4000 do 200 cm^{-1} . Infračervené záření nemá takovou energii, aby elektrony přešly do excitovaného stavu, ale dochází ke změně v rotačně-vibračního stavu molekuly. Výhodami jsou použití relativně levného vybavení, které umožňuje analýzu v terénu, téměř žádná úprava vzorku, rychlá analýza a nedochází k destrukci vzorku [40; 41].

Nejčastěji se využívá infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR), která se zaměřuje na měření ve spektru středního infračerveného spektra. Výhodami jsou rychlost analýzy, robustní kalibrace a vybavení, nízké servisní požadavky, in-line monitorování reakcí a další. Používá se k detekci specifických funkčních skupin, kdy na základě infračerveného spektra, závislosti absorpance/transmitance na vlnočtu/vlnové délce, lze nalézt specifické funkční skupiny při daných vlnových délkách/vlnočtu [42].

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací se často využívá ve spojení s technikou zeslabeného úplného odrazu (FTIR-ATR). Poskytuje informace, které se týkají přítomnosti nebo nepřítomnosti specifických funkčních skupin a také chemické struktury materiálů. Funguje na principu proniknutí infračerveného záření přes krystal (vnitřní odrazový prvek) ke vzorku, kdy dojde k následnému odražení záření na rozhraní krystal-vzorek. Pro výrobu krystalů se většinou využívá selenid zinečnatý nebo germanium. IČ záření proniká na krátkou vzdálenost (~1 μm) od povrchu krystalu do vzorků. Hlavní výhodou FTIR-ATR ve srovnání s jinými metodami FTIR je schopnost sbírat přesná spektra vzorků za přítomnosti vody, kdy voda silně absorbuje ve středním pásmu infračerveného záření [43; 44; 45].

1.11.2 UV-VIS spektrometrie

UV-VIS spektrometrie je metoda, která se využívá téměř ve všech rutinních laboratořích. Základem této metody je Lambert-Beerův zákon, který popisuje vztah mezi absorbancí, koncentrací látky a délkou dráhy světla v určité vlnové délce. Tento zákon je platný pro všechny látky, které absorbují světlo, jako jsou plyny, pevné látky, kapaliny, a molekuly. Světelné záření se pohybuje v rozmezí vlnových délek 200–800 nm. Absorbance je definována jako proces, kdy světelný paprsek vycházející ze zdroje, sníží svoji intenzitu po průchodu vzorkem tak, že molekuly vzorku přechází ze základního molekulového stavu (S_0) do excitovaného stavu (S_1 , S_2 a vyšší).

Numerické vyjádření Lambert-Beerova zákona je znázorněna v Rovnici 8 [47], kdy A je absorbance, která je bezrozměrná. T představuje transmitanci, I_0 a I je intenzita světla před a po průchodu světelného paprsku, ϵ je molární absorpční koeficient, který souvisí s vlastnostmi absorpčních materiálů a vlnovou délkou dopadajícího světla, c je koncentrace absorbujícího materiálu a d je délka absorpční dráhy [46; 47].

Rovnice 8: Lambert-Beerův zákon [47]

$$A = -\log T = -\log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot d$$

Při měření se musí dodržovat několik pravidel, které zaručí správnost metody. Mezi tyto pravidla patří průchod celého monochromatického paprsku vzorkem, homogenní distribuce molekul ve vzorku, kdy nesmí dojít k rozptylu světla, dalším fytochemickým reakcím a k fluorescenci [47].

UV-VIS spektrofotometr se skládá z lampy, monochromátoru, kyvety a detektoru. Lampa slouží jako světelný zdroj, z něhož jde světelný paprsek na monochromátor, který rozptyluje

dopadající světlo. Následuje kyveta, ve které je vzorek nebo blank. Za kyvetou se nachází detektor. Jako detektory záření se využívají fotodiody, fotonásobiče a CCD detektory [48].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje a pomůcky

Laboratorní váhy KERN 440-35N	(KERN & Sohn GmbH, Německo)
Analytické váhy KERN ABS-N_ABJ-NM	(KERN & Sohn GmbH, Německo)
Analyzátor vlhkosti KERN DLB 160-3A	(KERN & Sohn GmbH, Německo)
Vibrační mlýnek BVM-2	(Brio, ČR)
Ultrazvuková čistička RK106	(BANDELIN electronic, Německo)
Centrifuga Sorvall ST4R Plus-MD	(Fisher Scientific, ČR)
Rotační třepačka Multimix 230V	(VWR International, Mexiko)
Vodní lázeň WNB 22	(Memmert, Německo)
pH metr CG 842	(Schott, Německo)
AquaLab TDL	(Metergroup, Německo)
Morphologi 4	(Malvern Panalytical Ltd, Velká Británie)
Elektronový mikroskop Tescan Vega3 SBU	(Tescan, ČR)
DVS Intrinsic Plus	(Surface Measurement System, Velká Británie)
Spektrofotometr UltraScan VIS	(HunterLab, USA)
UV/VIS spektrofotometr UV-2600	(Shimadzu, ČR)
IČ spektrofotometr iS50 FT-IR	(Nicolet, ČR)
Lyofilizátor L4-110 PRO	(Gregor Instruments, ČR)
Termostat BSK ET618	(Liebherr, Rakousko)
Automatické pipety + běžné laboratorní vybavení	

2.2 Chemikálie

Hydroxid sodný	(PENTA s.r.o., ČR)
Kyselina sírová 96 %	(Lach-Ner s.r.o., ČR)
Kyselina octová 99 %	(Lach-Ner s.r.o., ČR)
Kyselina chlorovodíková 35 %	(Lach-Ner s.r.o., ČR)

Kyselina mravenčí 98 %	(PENTA s.r.o., ČR)
Kyselina trichloroctová	(Tokyo Chemical Industry, Čína)
Octan sodný bezvodý	(Lach-Ner s.r.o., ČR)
Chlorid draselný	(PENTA s.r.o., ČR)
Chlorid hlinitý >98 %	(Tokyo Chemical Industry, Čína)
Chlorid sodný	(Lach-Ner s.r.o., ČR)
Chlorid železitý hexahydrát	(PENTA s.r.o., ČR)
Dusitan sodný	(Lach-Ner s.r.o., ČR)
Ferrokyanid draselný	(Lachema, ČR)
Uhličitan sodný monohydrát	(Lachema, ČR)
Hydrogenuhlíčan sodný	(Lachema, ČR)
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát	(Lach-Ner s.r.o., ČR)
Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát	(PENTA s.r.o., ČR)
Metanol ≥ 99.9 %	(Honeywell, Německo)
DPPH	(Sigma-Aldrich, Německo)
Vanilin ≥ 98 %	(Sigma-Aldrich, Německo)
Folin-Ciocalteuovo činidlo	(Sigma-Aldrich, Německo)
TPTZ	(Sigma-Aldrich, Německo)
Kvercetin hydrát ≥ 95 %	(Sigma-Aldrich, Německo)
Katechin hydrát	(Sigma-Aldrich, Německo)
Trolox	(Sigma-Aldrich, Německo)
α -amyláza (≥ 10 U/mg pevného podílu)	(Sigma-Aldrich, Německo)
Pepsin (2500 U/mg pevného podílu)	(Sigma-Aldrich, Německo)
Pankreatin (4xUSP)	(Sigma-Aldrich, Německo)
Žlučový extrakt	(Sigma-Aldrich, Německo)
Destilovaná voda	(Univerzita Pardubice, ČR)

2.3 Vzorky a jejich úprava

K analýze byly použity sušené řezané plody rohovníku obecného zakoupené v obchodu Byliny Mikeš (Čičenice).

Vzorky byly upraveny tak, že bylo naváženo 42–43 g sušeného karobu. Vzorek byl vložen do vibračního mlýnu, kde byl mlet po dobu 30 s. U dalších vzorků se postupovalo stejně, pouze byla upravena doba mletí (60, 90, 120, 180, 240 s). Poté byly jednotlivé vzorky převedeny do plastových uzavíratelných zkumavek a byly skladovány v temnu při laboratorní teplotě.

2.4 Příprava roztoků

2.4.1 Příprava standardního roztoku kyseliny gallové

Byl připraven zásobní roztok kyseliny gallové navážením 0,05 g kyseliny gallové do 100 ml odměrné baňky, která byla doplněna metanolem po rysku. Z tohoto zásobního roztoku (500 mg/l) byly ředěním připraveny roztoky o koncentracích 10, 25, 50, 75 mg/l.

2.4.2 Příprava standardního roztoku kvercetinu

Byl připraven zásobní roztok kvercetinu navážením 0,05 g kvercetinu do 100 ml odměrné baňky, která byla doplněna metanolem po rysku. Z tohoto zásobního roztoku (500 mg/l) byly ředěním připraveny roztoky o koncentracích 1, 3, 5, 6, 12, 18, 30, 42, 60 a 120 mg/l.

2.4.3 Příprava standardního roztoku katechinu

Byl připraven zásobní roztok katechinu navážením 0,05 g katechinu do 100 ml odměrné baňky, která byla doplněna metanolem po rysku. Z tohoto zásobního roztoku (500 mg/l) byly ředěním připraveny roztoky o koncentracích 5, 10, 30, 50 a 80 mg/l.

2.4.4 Příprava standardního roztoku Troloxu

Byl připraven zásobní roztok Troloxu navážením 0,05 g Troloxu do 100 ml odměrné baňky, která byla doplněna metanolem po rysku. Z tohoto zásobního roztoku (500 mg/l) byly ředěním připraveny roztoky o potřebných koncentracích.

2.4.5 Příprava roztoku slin

Bylo naváženo 1,2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0,038 g KH_2PO_4 a 1,6 g NaCl do 200 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku. Následně bylo upraveno pH na 6,75 s využitím 5,0 M HCl. Poté bylo přidáno 8,0 g α -amylázy (≥ 10 U/mg pevného podílu).

2.4.6 Příprava roztoku žaludečních šťáv

Bylo naváženo 0,024 g pepsinu (2500 U/mg pevného podílu) do 200 ml odměrné baňky a doplněno po rysku 0,03 M HCl. Poté bylo upraveno pH na 1,2 s využitím 5,0 M HCl.

2.4.7 Příprava roztoku střevních šťáv

Bylo naváženo 0,2857 g pankreatinu (4xUSP) a 1,7144 g žlučového extraktu do 200 ml odměrné baňky a doplněno po rysku 0,1 M NaHCO₃.

2.5 Příprava extraktů

2.5.1 Metanolové extrakty

Extrakty byly připraveny tak, že byly naváženy 3,0 g namletého rohovníkového prášku do skleněné uzavíratelné zkumavky. Poté bylo přidáno 10 ml 90 % metanolu a 30 μ l kyseliny mravenčí. Zkumavka se směsí byla vložena na 20 minut do ultrazvukové lázně, následně byla dána do centrifugy na 20 minut při 5000 rpm. Supernatant byl rozpipetován do zkumavek Eppendorf, a ty byly skladovány při -20 °C. Pro každý vzorek byly připraveny tři extrakty (tři různé navážky vzorků).

2.5.2 Extrakty po trávícím procesu *in vitro*

Byly naváženy 3,0 g namletého rohovníkového prášku do plastové uzavíratelné zkumavky, poté bylo přidáno 7,0 ml slinného roztoku a směs se dala na 10 minut inkubovat při 37 °C ve tmě za stálého třepání. Poté se upravilo pH na 1,2 s využitím 5,0 M HCl. Následně se přidalo 5,0 ml roztoku žaludečních šťáv a nechalo se inkubovat za stálého třepání ve tmě 120 minut při 37 °C. Poté se upravilo pH na 7,0 s využitím 1,0 M NaOH a následně se přidalo 5,0 ml roztoku střevních šťáv. Roztok se nechal inkubovat po dobu 120 minut při 37 °C ve tmě za stálého třepání. Po skončení inkubace se zkumavka se směsí vložila do centrifugy na 15 minut při 5000 rpm, a poté byl supernatant rozpipetován do zkumavek Eppendorf a uchováván při -20°C. Tento postup byl zopakován pro všechny vzorky 3x a také pro slepý pokus, který byl připraven stejným způsobem jen bez vzorku rohovníkového prášku.

2.6 Metody chemické analýzy

2.6.1 Stanovení distribuce částic

Stanovení distribuce částic bylo provedeno na přístroji Morphologi 4 a na elektronovém mikroskopu, kde byla provedena analýza pro každý vzorek namletého karobového prášku (viz Kapitola 2.3). Na přístroji Morphologi 4 byl vzorek rohovníkového prášku umístěn

do integrované jednotky pro rozptyl vzorků, kdy přesné množství vzorku bylo automaticky dispergováno pomocí mechanismu disperze stlačeného vzduchu uvnitř přístroje.

Pro zjištění vzhledu částic byl použit elektronový mikroskop Tescan. Analýza proběhla při 15 kV, zvětšení 250, nízkém vakuu $5,5 \cdot 10^{-2}$ Pa, 14 Pa v komoře, pro zchlazení byl použit dusík, pracovní vzdálenosti 18,38 mm za použití detektoru zpětně odražených elektronů. Před analýzou byly vzorky (viz Kapitola 2.3) zlyofilizovány v lyofilizátoru L4-110 PRO.

2.6.2 Stanovení barevnosti

Vzorek namletého rohovníkového prášku (viz Kapitola 2.3) byl převeden do kyvety a byla změřena barevnost v režimu bez složky přímého odrazu (RSEX) na spektrofotometru UltraScan VIS (geometrie $d/8^\circ$, zdroj světla D65, 400–700 nm). Toto bylo zopakováno pro všechny namleté vzorky 5x. Dále byla změřena barevnost u nenamletých sušených plodů rohovníku obecného v režimu se složkou i bez složky přímého odrazu (RSIN i RSEX).

2.6.3 Stanovení sorpčních vlastností

Stanovení sušiny

2,0–2,5 g vzorku namletého rohovníkového prášku (viz Kapitola 2.3) bylo naváženo na hliníkovou misku pro měření sušiny vzorku a byla změřena sušina na analyzátoru vlhkosti KERN pro každý vzorek 2x.

Stanovení aktivity vody

Vzorky rohovníkového prášku (viz Kapitola 2.3) byly připraveny do plastových misek na měření aktivity vody, kde byly vzorky rozprostřeny po celém dnu a vytemperovány na teplotu 25 °C. Následně byla změřena aktivita vody pro každý namletý vzorek 3x na přístroji AquaLab TDL.

Stanovení rychlosti sorpce

Pro měření rychlosti sorpce bylo naváženo 25 mg rohovníkového prášku (viz Kapitola 2.3) do hliníkové misky pro měření sorpce a následně vloženo do přístroje DVS Instrinsic Plus. Analýza probíhala při průtoku vzduchu 200 sccm a teplotě 25 °C. Měření rychlosti sorpce probíhalo při různě nastavených hodnotách relativní vlhkosti vzduchu, a to 20, 40, 60 a 80 %. Z každé anlyzy byl sestrojen graf závislosti hmotnosti vzorku na čase. Lineární část křivky byla proložena spojnicí trendu a následně byla vygenerována rovnice přímky (směrnice k) a koeficient determinace R^2 . Postup byl zopakován pro každý namletý vzorek 2x pro různé hodnoty relativní vlhkosti vzduchu.

Stanovení sorpčních izoterm

Bylo naváženo 10–20 mg namletého vzorku (viz Kapitola 2.3) do hliníkové misky, vloženo do přístroje DVS Instrinsic Plus a byly změřeny sorpční izotermy pro každý namletý vzorek. Analýza probíhala při průtoku vzduchu 200 sccm, vlhkost byla upravena redestilovanou vodou. V programu DVS Resolution, v. 1.3.00 (Surface Measurement Systems Ltd.) byl nastaven program adsorpce tak, že samotné adsorpci předcházel sušící krok (0 % vlhkosti, 3 h). Následně bylo nastaveno stoupaní relativní vlhkosti vzduchu v rozmezí 0–90 % vždy po 5 %, aby pro každou úroveň relativní vlhkosti byla splněna podmínka změny hmotnosti v čase $dm/dt < 0,002$ %. Výsledky byly vyhodnoceny s využitím programu DVS Standard Analysis Suite, v. 7.4 (Surface Measurement Systems Ltd.).

2.6.4 Analýza infračerveného spektra

Analýza infračerveného spektra byla provedena na spektrofotometru iS50 FT-IR, kdy byl proměřen každý namletý vzorek rohovníkového prášku (viz Kapitola 2.3) 3x. Byla použita metoda iS50 ATR Lab., oblast snímání spektra $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$. Pro výsledný záznam bylo použito 64 skenů a k měření byl použit ATR modul.

2.6.5 Spektrofotometrická analýza

Spektrofotometrická analýza byla provedena na UV/VIS spektrofotometru UV-2600, kdy byla použita skleněná kyveta (1 cm). K ovládání přístroje a záznamu absorbancí byl použit program UV-Probe, v. 2.70 (Shimadzu Corporation).

Stanovení celkového obsahu fenolických látek

1,0 ml naředěného extraktu (viz Kapitola 2.5) byl napipetován do skleněné zkumavky s víčkem, poté byl přidán 1 ml 90 % metanolu ve vodě, 5,0 ml destilované vody a 0,5 ml Folin-Ciocalteuova činidla. Tento připravený roztok byl ponechán 5 minut při laboratorní teplotě v temnu. Následně byl napipetován 1,0 ml 5 % Na_2CO_3 a zkumavka byla ponechána v temnu 60 minut (převzato z práce Jelínkové [49]) při laboratorní teplotě. Absorbance byla poté změřena při 765 nm. Stejným způsobem byl připraven i slepý pokus, který obsahoval 1,0 ml extrakčního činidla místo extraktu vzorku. Koncentrace fenolických látek ve vzorku byla vypočítána z kalibrační přímky kyseliny gallové (Příloha 1) a jsou udávány jako ekvivalent kyseliny gallové v mg/g sušiny vzorku [49].

Stanovení celkového obsahu flavonoidů

Metoda 1: Do skleněných zkumavek s víčkem byly napipetovány 2,0 ml zředěného extraktu (viz Kapitola 2.5), 1,0 ml 2 % AlCl_3 , 1,0 ml destilované vody, 1,0 ml 1,0 M HCl a 1,0 ml

1,0 M CH₃COONa. Roztok byl promíchán a inkubován 10 minut při laboratorní teplotě v temnu. Poté byla změřena absorbance při 425 nm. Pro slepý pokus byla použita voda místo AlCl₃. Koncentrace flavonoidů (mg/g sušiny vzorku) byla vypočítána z kalibrační přímky kvercetinu, která je znázorněna v Příloze 2 [23].

Metoda 2: Do skleněných zkumavek s víčkem byl napipetován 1,0 ml zředěného extraktu (viz Kapitola 2.5), 0,3 ml 5 % NaNO₂ a po 5 minutách 0,5 ml 2 % AlCl₃. Roztok byl promíchán a po 6 minutách byl neutralizován 0,5 ml 1,0 M NaOH. Roztok byl inkubován 10 minut při laboratorní teplotě v temnu, a poté byla změřena absorbance při 510 nm. Pro slepý pokus byla použita voda místo AlCl₃. Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalent katechinu (mg/g sušiny vzorku). Kalibrační přímka katechinu je znázorněna v Příloze 3 [23].

Stanovení obsahu katechinů

1,0 ml naředěného extraktu (viz Kapitola 2.5) byl napipetován do skleněné zkumavky s víčkem. Následně bylo přidáno 2,5 ml 4 % vanilinu v metanolu a 2,5 ml 25 % H₂SO₄ v metanolu. Inkubace proběhla 15 minut při laboratorní teplotě v temnu a poté byla změřena absorbance při 500 nm. Pro slepý pokus byl použit 1,0 ml extrakčního činidla místo extraktu vzorku. Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalent katechinu (mg/g sušiny vzorku). Kalibrační přímka katechinu je znázorněna v Příloze 4 [24].

Stanovení antioxidační aktivity s využitím DPPH radikálu

Do skleněných zkumavek s víčkem bylo napipetováno 300 µl zředěného extraktu (viz Kapitola 2.5) a 5,0 ml roztoku DPPH radikálu. Roztok byl promíchán a inkubován 10 minut při laboratorní teplotě v temnu. Absorbance byla měřena při 517 nm. Pro slepý pokus bylo použito extrakční činidlo místo extraktu. Pro každý vzorek byla absorbance přepočítána na % inhibice podle Rovnice 9 [50]. Následně byla vypočítána koncentrace (mg/g sušiny) z kalibrační přímky Troloxu (viz Příloha 5). Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalent Troloxu (mg/g sušiny vzorku) [50].

Rovnice 9: Výpočet % inhibice [50]

$$I (\%) = \frac{A_{sp} - A_{vz}}{A_{sp}} * 100$$

A_{vz}.....absorbance vzorku

A_{sp}.....absorbance slepého pokusu

I (%).....inhibice

Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP

Nejdříve byla připravena směs, která obsahovala 20 mM FeCl₃, 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. Jednotlivé roztoky byly smíchány v poměru 1:1:10. 3,0 ml této směsi byly napipetovány do skleněné zkumavky s víčkem a dále bylo přidáno 300 µl naředěného extraktu vzorku (viz Kapitola 2.5). Inkubace proběhla 45 minut (převzato z práce Jarešové [51]) při laboratorní teplotě v temnu. Poté byla změřena absorbance při 593 nm. Slepý pokus obsahoval destilovanou vodu místo extraktu. Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalent Troloxu (mg/g sušiny vzorku). Kalibrační přímka Troloxu je znázorněna v Příloze 6 [25].

Stanovení redukčních vlastností

1,0 ml zředěného extraktu vzorku byl napipetován do skleněné zkumavky s víčkem, poté bylo přidáno 2,5 ml 1 % hexakvanoželezitanu draselného a 2,5 ml 0,2 M fosfátového pufru o pH 7,4. Inkubace této směsi proběhla ve vodní lázni při 50 °C 30 minut. Poté bylo přidáno 2,5 ml 10 % kyselina trichloroctové, aby byla reakce ukončena. Pro spektrofotometrické stanovení bylo použito 2,5 ml této směsi, dále bylo přidáno 2,5 ml destilované vody a 0,5 ml 0,1 % chloridu železitého do skleněné zkumavky s víčkem. Měření absorbance proběhlo při 700 nm. Výsledky byly vyjádřeny jako hodnoty absorbance [26].

2.7 Statistická analýza dat

Pro statistickou analýzu dat byl využit program STATISTICA 12 (StatSoft ČR s.r.o.), kdy byla provedena jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA). Zvoleným faktorem byla zvolena doba mletí. Výsledky byly udány jako aritmetický průměr hodnot ± směrodatná odchylka. Pro zjištění statistické významnosti byl proveden Duncanův test na hladině pravděpodobnosti $p=0,05$.

2.8 Korelační analýza

Pro korelační analýzu dat byl využit program STATISTICA 12 (StatSoft ČR s.r.o.) s využitím Pearsonova korelačního koeficientu r na hladině pravděpodobnosti $p=0,05$.

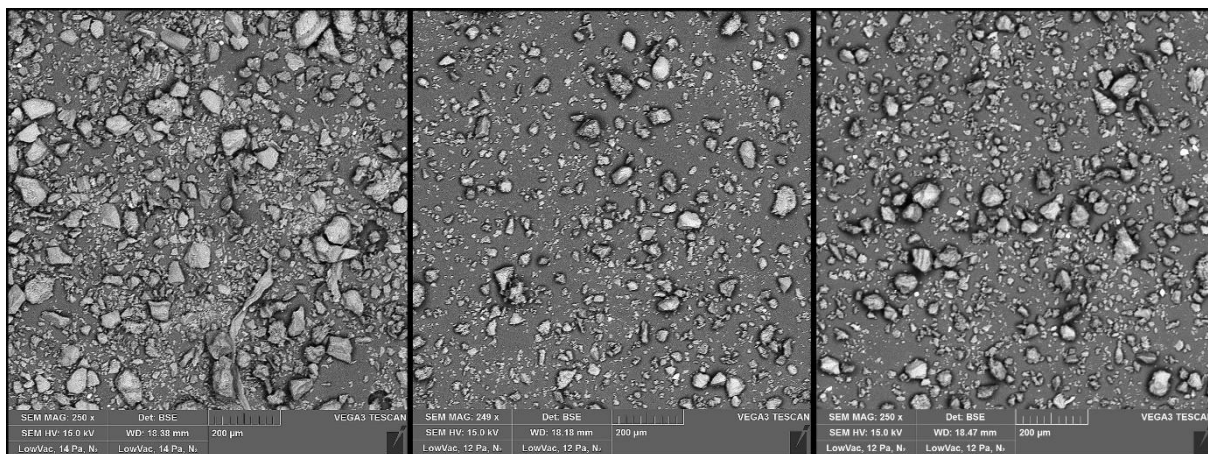
3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Stanovení distribuce částic

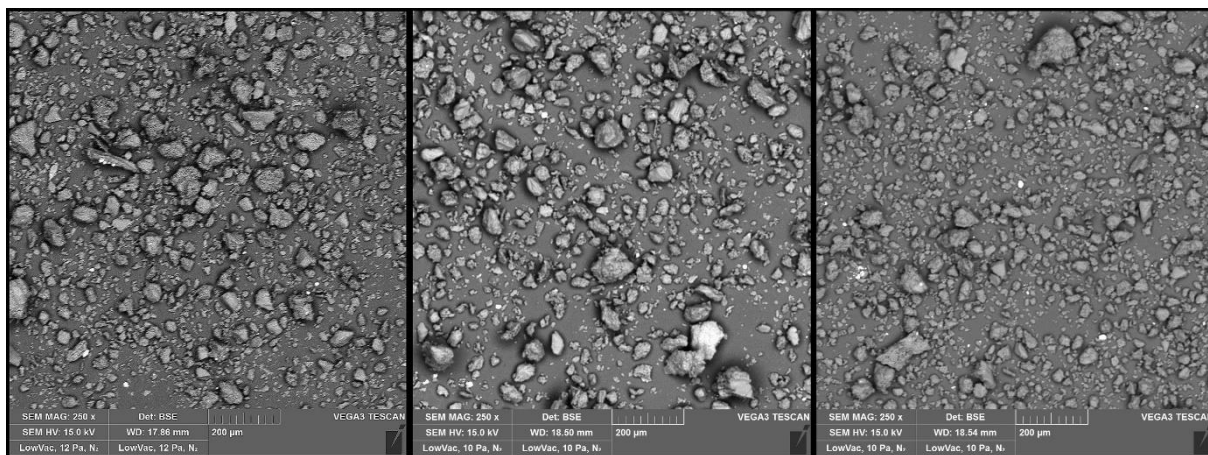
Obrázek 2 a Obrázek 3 představuje snímky z elektronového mikroskopu TESCAN. Na těchto obrázcích jsou vidět vzorky rohovníkového prášku mletého různou dobu. Snímky byly pořízeny při 15 kV, zvětšení 250, nízkém vakuu $5,5 \cdot 10^{-2}$ Pa, 14 Pa v komoře, pro zchlazení byl použit dusík, pracovní vzdálenosti 18,38 mm za použití detektoru zpětně odražených elektronů.

Jak můžeme pozorovat na Obrázku 2 a na Obrázku 3, částice jsou hranaté, výjimečně zaoblené. Pohybují se v rozmezí od jednotky do stovky μm . Porovnáním snímků nebyly zjištěny žádné významné rozdíly ve tvaru částic.

Obrázek 2: Vzorky rohovníkového prášku mletého po 30, 60, 90 s



Obrázek 3: Vzorky rohovníkového prášku mletého po 120, 180, 240 s



V Tabulce 2 jsou znázorněny hodnoty objemové distribuce částic. Pro D_{10} se naměřené hodnoty pohybovaly mezi 15,24 a 23,10 μm . Pro D_{50} , kdy 50 % částic je větší a 50 % částic je menší než hodnota znázorněná v tabulce, bylo poměrně široké rozmezí hodnot, a to od 87,91 do 135,10 μm . Pro D_{90} měl nejvyšší hodnotu vzorek mletý po dobu 120 s, a to 810 μm a nejmenší hodnotu měl vzorek namletý po dobu 240 s, a to 365,7 μm . Mezi časem mletí a mediánem velikosti částic (D_{50}) není zřejmý žádný trend.

Tabulka 2: Stanovení objemové distribuce částic

Prášek mletý po dobu	Průměr částic (μm)			
	průměr	D_{10}	D_{50}	D_{90}
30 s	6,22	17,79	141,30	427,7
60 s	6,04	15,24	87,91	572,7
90 s	6,29	16,28	110,10	494,6
120 s	7,03	21,35	129,70	810,6
180 s	8,10	23,10	135,10	429,7
240 s	7,64	19,44	98,62	365,7

D_{10}10 % částic je menší než tato hodnota

D_{50}50 % částic je menší než tato hodnota, 50 % částic je větší než tato hodnota; medián

D_{90}90 % částic je menší než tato hodnota

Tabulka 3 znázorňuje distribuci částic podle počtu, kdy se průměrné hodnoty velikosti pohybují mezi 4,70 a 5,73 μm . Největší částice měl vzorek mletý po dobu 120 s, a to 940,12 μm . Ve vzorku mletém po dobu 240 s už se nevyskytovaly částice větší než 484,08 μm .

Tabulka 3: Stanovení distribuce částic podle počtu

Prášek mletý po dobu	Průměr částic (μm)			
	průměr	D_{10}	D_{50}	D_{90}
30 s	4,87	0,69	3,10	10,63
60 s	5,00	0,75	3,18	11,09
90 s	4,84	0,50	2,89	11,13
120 s	4,70	0,64	2,22	11,31
180 s	5,94	0,28	3,71	13,18
240 s	5,73	0,66	3,48	12,96

D_{10}10 % částic je menší než tato hodnota

D_{50}50 % částic je menší než tato hodnota, 50 % částic je větší než tato hodnota; medián

D_{90}90 % částic je menší než tato hodnota

Velikost částic v závislosti na různé době mletí měřili v článku Seong-Jin Honga [52], kde se jednalo o listy japonského dubu, které byly mlety kulovými mlýny. Analýzou bylo zjištěno, že čím je doba mletí delší (0–24 hodin), tím jsou částice menší [52]. V našem experimentu se tento fakt nepotvrdil. Mezi distribucemi částic a časem mletí nebyl nalezen žádný významný trend. Pouze vzorek mletý po dobu 120 s obsahoval částice s výrazně větším objemem.

3.2 Stanovení barevnosti

Na Obrázku 4 jsou různě namleté vzorky rohovníkového prášku, jak je vidíme pouhým okem. Z obrázku je patrné, že vzorky mají hnědou barvu a mezi vzorky jsou jen minimální rozdíly. Vzorky mleté 120–240 s se mohou zdát tmavší ve srovnání se vzorky mletými po dobu 30–90 s.

Obrázek 4: Různě namleté vzorky rohovníkového prášku



Tabulka 4 představuje hodnoty barevnosti, podložené laboratorním měřením, kdy jsou zde znázorněny barevné koordináty L^* , a^* , b^* , C^* , h° pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku.

Tabulka 4: Stanovení barevnosti různě namletých vzorků rohovníkového prášku v režimu bez složky přímého odrazu (RSEX)

Prášek mletý po dobu	L^*	a^*	b^*	C^*	h°
30 s	47,14 ± 0,47 ^A	6,44 ± 0,41 ^A	19,14 ± 0,47 ^A	20,20 ± 0,54 ^A	71,41 ± 0,91 ^A
60 s	51,13 ± 0,41 ^B	5,82 ± 0,57 ^A	17,91 ± 0,40 ^B	18,84 ± 0,53 ^B	72,01 ± 1,34 ^A
90 s	49,37 ± 0,21 ^C	6,27 ± 0,29 ^A	18,66 ± 0,34 ^A	19,68 ± 0,41 ^A	71,45 ± 0,57 ^A
120 s	48,03 ± 0,25 ^D	6,88 ± 0,38 ^B	20,12 ± 0,40 ^C	21,26 ± 0,49 ^C	71,14 ± 0,66 ^A
180 s	47,03 ± 0,34 ^A	6,97 ± 0,24 ^B	19,87 ± 0,30 ^C	21,06 ± 0,35 ^C	70,67 ± 0,42 ^B
240 s	46,73 ± 0,47 ^A	6,73 ± 0,49 ^B	20,95 ± 0,18 ^D	22,01 ± 0,31 ^D	72,21 ± 1,10 ^A

Rozdílná písmena v horním pravém indexu znamenají statisticky významný rozdíl v jednotlivých sloupcích ($p < 0,05$). Průměrné hodnoty ± směrodatná odchylka, $N=5$.

Z tabulky je patrné, že existuje statisticky významný rozdíl mezi různě namletými vzorky rohovníkového prášku. Pro L^* se liší vzorky namleté po dobu 60, 90 a 120 s od ostatních vzorků. Pro parametr h se od ostatních vzorků statisticky významně liší jen vzorek mletý po dobu 180 s.

Tabulka 5 znázorňuje barevné koordináty ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔC^* , Δh° a ΔE vzhledem ke standardu, kdy jako standard byl vybrán vzorek, který byl mletý po 30 s. ΔE byla vypočítána z Rovnice 1. Vzorky mleté po dobu 60 a 90 s byly světlejší a méně syté, s rostoucím časem mletí dále tmavly a zvyšovala se sytost. Vzorky mleté po dobu 60 a 90 s byly také méně červené a méně žluté. S rostoucím mlecím časem (120–240 s) byly vzorky více červené a více žluté ve srovnání s vzorkem mletým po dobu 30 s. Vzorky mleté po dobu 120 a 180 s byly méně žluté než ostatní namleté vzorky. Hodnoty změny barevnosti ΔE byly nejvyšší pro vzorek mletý po dobu 60 s a nejnižší pro vzorek mletý po 180 s.

Tabulka 5: Stanovení barevnosti různě namletých vzorků rohovníkového prášku v režimu bez složky přímého odrazu (RSEX) vzhledem ke standardu

Prášek mletý po dobu	L^*	a^*	b^*	C^*	h°	
30 s standard	47,14	6,44	19,14	20,20	71,41	
	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔC^*	Δh°	ΔE
60 s	4,00	-0,62	-1,23	-1,36	0,60	4,23
90 s	2,24	-0,18	-0,48	-0,51	0,04	2,29
120 s	0,90	0,43	0,98	1,06	-0,27	1,40
180 s	-0,11	0,53	0,73	0,86	-0,74	0,91
240 s	-0,41	0,29	1,82	1,81	0,80	1,88

Změnu barevných koordinát v závislosti na různé době mletí měřili v článku Honga et al. [52], kde mleli listy japonské dubu s využitím kulových mlýnů. Zjistily, že různá doba mletí má efekt na barevné koordináty, kdy se zvyšující se dobou mletí (0–24 hodin) se zvyšovaly hodnoty L^* , a^* , b^* . Rozdíly naměřených hodnot pro různé koordináty se pohybovaly v rozmezí od 1,00 do 3,18 pro L^* , pro a^* od 1,63 do 2,73, pro b^* od 1,68 do 3,23 [52].

Barevné koordináty pro nepražený rohovníkový prášek zjišťovali v článku Eldeeba et al. [53], kdy naměřili hodnoty L^* ($68,71 \pm 0,231$), a^* ($8,61 \pm 0,213$), b^* ($22,33 \pm 0,009$) [53].

Na Obrázku 5 jsou zobrazeny plody rohovníku obecného před tím, než byly namlety. U těchto vzorků byla také změřena barevnost, a to jak v režimu bez i se složkou přímého odrazu.

Obrázek 5: Sušené plody rohovníku obecného (před mletím)



Všechny naměřené hodnoty barevných koordinát plodů rohovníku (před mletím) jsou znázorněny v Příloze 7 a v Příloze 8. Hodnoty jednotlivých barevných koordinát se velmi lišily, protože plody rohovníku jsou místy tmavě hnědé, ale i žluté až oranžové. Například v režimu bez složky přímého odrazu pro L^* se hodnoty pohybovaly mezi 20,94 a 52,48, pro b^* byly naměřeny hodnoty od 4,19 do 24,85. V režimu se složkou přímého odrazu byly rozdíly obdobné. Hodnoty pro barevnou koordinátu C^* se pohybovaly mezi 4,49 a 26,54, pro h° byla naměřeny hodnoty od 46,23 do 76,28.

Průměrné hodnoty jednotlivých barevných koordinát plodů rohovníku v režimu bez i se složkou přímého odrazu jsou znázorněné v Tabulce 6.

Tabulka 6: Stanovení barevnosti sušených plodů rohovníku obecného v režimu bez i se složkou přímého odrazu (RSEX, RSIN)

	L^*	a^*	b^*	C^*	h
RSEX	32,07 ± 9,80	5,35 ± 2,23	12,17 ± 7,63	13,42 ± 7,71	62,05 ± 9,33
RSIN	34,37 ± 11,23	5,23 ± 2,33	13,20 ± 8,09	14,34 ± 8,16	64,12 ± 10,38

průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, N=10

RSEX..... Reflectance specular excluded (bez složky zrcadlového odrazu)

RSIN..... Reflectance specular included (se složkou zrcadlového odrazu)

3.3 Stanovení sorpčních vlastností

Tabulka 7 představuje naměřené hodnoty aktivity vody pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku na přístroji AquaLab TDL bezprostředně po mletí. Hodnoty se pohybovaly mezi $0,371 \pm 0,001$ a $0,435 \pm 0,001$. Tabulka následně znázorňuje i naměřené hodnoty sušiny vzorku, které byly naměřeny na analyzátoru vlhkosti KERN. Hodnoty se pohybovaly od $93,9 \pm 0,0$ do $95,0 \pm 0,2$ %. Tyto hodnoty byly použity při vyjádření obsahu vybraných fenolických látek.

Tabulka 7: Stanovení aktivity vody a sušiny různě namletých vzorků rohovníkového prášku

Prášek mletý po dobu	a_w	sušina (%)
30 s	$0,375 \pm 0,002^A$	$95,0 \pm 0,2^A$
60 s	$0,371 \pm 0,001^B$	$95,0 \pm 0,0^A$
90 s	$0,404 \pm 0,001^C$	$94,4 \pm 0,1^B$
120 s	$0,419 \pm 0,001^D$	$94,1 \pm 0,0^C$
180 s	$0,435 \pm 0,001^E$	$93,9 \pm 0,0^C$
240 s	$0,397 \pm 0,001^F$	$94,1 \pm 0,1^C$

Rozdílná písmena v horním pravém indexu znamenají statisticky významný rozdíl v jednotlivých sloupcích ($p < 0,05$). Průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka, $N=3$.

Vzhledem k značné přesnosti a citlivosti přístroje pro měření aktivity vody byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi všemi naměřenými hodnotami aktivity vody pro různé vzorky. S rostoucím časem mletí (30–180 s) byl zaznamenán rostoucí trend v hodnotách a_w od 0,37 do 0,44 následované poklesem a_w pro vzorek mletý po dobu 240 s. To souvisí také s klesajícím obsahem sušiny. Nutno podotknout, že i přes statistickou významnost jsou rozdíly v obsahu sušiny v řádech desetin procent.

Aktivitu vody a vlhkost rohovníkového prášku měřili v článku Gunela [15], kdy analýzou zjistili aktivitu vody $0,67 \pm 0,03$ a vlhkost $7,50 \pm 0,50$ % nepraženého rohovníkového prášku, přičemž pražený rohovníkový prášek měl hodnoty aktivity vody od $0,20 \pm 0,00$ do $0,39 \pm 0,02$ a vlhkost od $2,90 \pm 0,10$ do $5,03 \pm 0,10$ %. Vlivem pražení (horký vzduch, mikrovlnka) byl sledován pokles aktivity vody i vlhkosti [15].

V článku Benkoviče et al. [9] měřili velikost částic rohovníkové mouky se semeny a bez semen. Hodnoty obsahu sušiny pro mouku se semeny se pohybovaly v rozmezí od $90,48 \pm 0,04$ do $92,55 \pm 0,29$ g/g, zatímco hodnoty obsahu vlhkosti pro bezsemennou mouku se pohybovaly od $89,47 \pm 0,08$ do $91,57 \pm 0,05$ g/g. Z těchto hodnot je vidět, že mouka bez semen měla nižší hodnoty obsahu vlhkosti, protože právě semena přidávají určité procento obsahu vlhkosti v rohovníku [9].

Měření rychlosti sorpce probíhalo při různě nastavených parciálních tlacích vody, a to 20, 40, 60 a 80 %. Z každé analýzy byl sestrojen graf závislosti hmotnosti vzorku na čase. Příklad této závislosti je k nalezení v Příloze 9. Lineární část křivky byla proložena spojnicí trendu a následně byla vygenerována rovnice přímky a koeficient determinace R^2 . Směrnice přímek k (mg/min) pro jednotlivé vzorky, které byly měřeny při různých relativních vlhkostech

jsou znázorněny v Tabulce 8, koeficienty determinace pro tyto přímky jsou znázorněny v Příloze 10.

Tabulka 8: Směrnice přímek (mg/min) z měření rychlosti sorpce při rozdílných hodnotách relativní vlhkosti vzduchu pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku

Prášek mletý po dobu	<i>k</i> (mg/min) při relativní vlhkosti vzduchu:			
	<i>p</i> = 20 %	<i>p</i> = 40 %	<i>p</i> = 60 %	<i>p</i> = 80 %
30 s	0,0132	0,0393	0,0588	0,1146
60 s	0,0210	0,0433	0,0623	0,1335
90 s	0,0178	0,0406	0,0583	0,1245
120 s	0,0153	0,0381	0,0558	0,1143
180 s	0,0124	0,0348	0,0525	0,1183
240 s	0,0158	0,0350	0,0514	0,1139

S rostoucí relativní vlhkostí stoupá rychlost adsorpce v rozmezí od 0,0124 (20 % relativní vlhkosti) do 0,1335 mg/min (80% relativní vlhkosti). Nejvyšší hodnoty směrnic přímek při daných hodnotách relativní vlhkosti měl vzorek mletý po dobu 60 s, a to 0,0210 mg/min při relativní vlhkosti 20 %, 0,0433 mg/min při 40 %, 0,0623 při 60 % a 0,1335 při 80 %. To by mohlo souviset s objemovou distribucí částic, kdy v Tabulce 2 jsou pro vzorek mletý po dobu 60 s nejnižší hodnoty D_{10} a D_{50} .

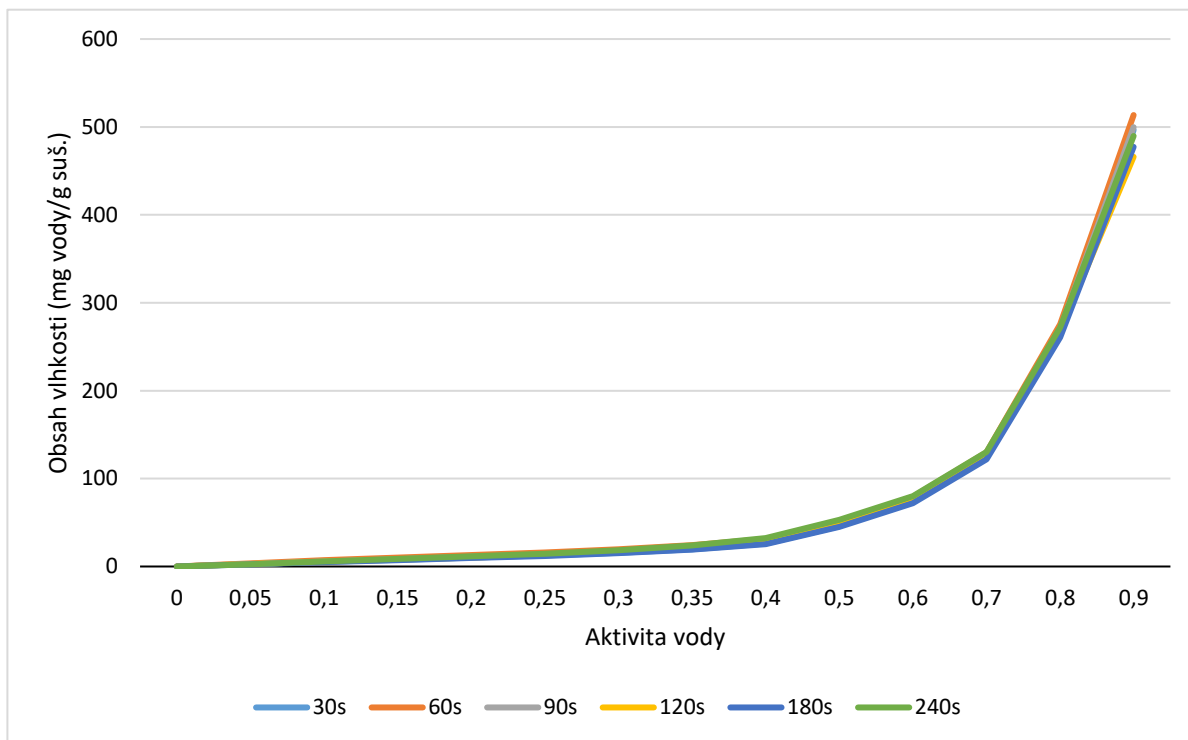
Z hodnot vyplývá, že nejvyšší rychlosti sorpce pro všechny prášky jsou při relativní vlhkosti 80 %, nejnižší rychlosti sorpce jsou při 20 %. Koeficienty determinace, tedy velikost rozptylu naměřených hodnot hmotnosti, měly nejvyšší hodnoty při relativní vlhkosti vody 80 %, tudíž nejlepší. Naopak nejnižší hodnoty koeficientů determinace byly naměřeny při relativní vlhkosti vody 20 %.

Na Obrázku 6 jsou znázorněny adsorpční izotermy pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku. Tyto adsorpční izotermy patří mezi izotermy typu III, které jsou typické pro rostlinný materiál. Mezi hodnotami aktivity vody 0–0,4 se obsah vlhkosti téměř nemění. Ovšem od hodnoty aktivity vody 0,4 do 0,9 dochází k nárustu obsahu vlhkosti až na 500 mg vody na g sušiny vzorku.

Sorpční izotermy naměřené pro vzorky, které jsou mlety různou dobu, jsou si velmi podobné, což je popsáno v článku Filipoviće et al. [54], kde jsou znázorněny sorpční izotermy

směsi MgO a TiO₂ pro vzorky namleté 0–120 minut na planetovém kulovém mlýnu, kdy různá doba mletí se neprojevila na adsorpci [54].

Obrázek 6: Adsorpční izotermy pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku

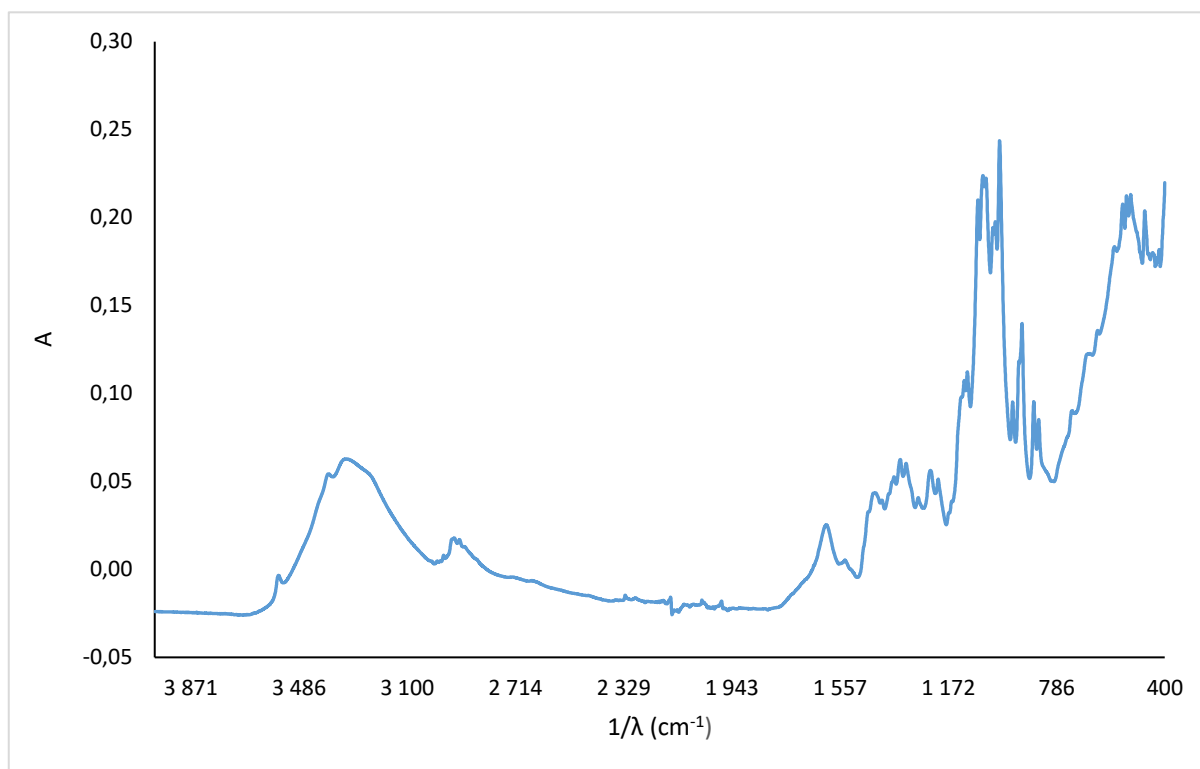


3.4 Analýza infračerveného spektra

Na Obrázku 7 je znázorněno infračervené spektrum rohovníkového prášku, který byl namlet po dobu 30 s. Dominantním znakem je široký pás 3510–3110 cm⁻¹, který vypovídá o valenčních vibracích OH a NH skupin. Absorpční pás 3030 cm⁻¹ vypovídá o valenčních vibracích CH skupin v aromátech, následně to potvrzují i valenční vibrace CC aromatických jader, a to 1620, 1580, a 1410 cm⁻¹. Absorpční pás 2970 a 2870 cm⁻¹ vypovídá o valenčních vibracích CH₃. Dokazují to i pásy deformačních vibrací CH₃, CH₂, CH a to 1340, 1370, 1480 cm⁻¹, tytéž pásy mohou zobrazovat i deformační vibrace NH v aminokyselinách. Náznakem jsou i absorpční pásy vyšších harmonických a kombinačních vibrací CH 1700–2000 cm⁻¹. Absorpční pás od 1390 do 1180 cm⁻¹ zobrazuje valenční vibrace CO a deformační OH. Výrazný absorpční pás při vlnové délce 1100 cm⁻¹ byl mohl představovat ethery a jejich valenční vibrace CO.

Infračervená spektra ostatních namletých prášků rohovníku obecného (60, 90, 120, 180, 240 s) byla totožná s infračerveným spektrem zobrazeným na Obrázku 7.

Obrázek 7: Infračervené spektrum rohovníkového prášku namletého po dobu 30 s



Fenolické sloučeniny obsahují aspoň jednu hydroxylovou skupinu, přičemž OH deformační vibrace se vyskytují mezi 1390 a 1330 cm^{-1} , a 1260 a 1180 cm^{-1} . Další vazby fenolů se vyskytují v oblastech 1380 – 1317 cm^{-1} , kdy se jedná o COH deformační vibrace. Fenolové kyseliny s metoxy skupinami, jako jsou kyseliny syringová, vanilinová, ferulová a sinapová, se projevují vibracemi okolo 1470 – 1435 cm^{-1} a 1200 – 1185 cm^{-1} , což jsou asymetrické a symetrické CH deformační vibrace. Tyto vibrace jsou taky přítomné ve spektru flavonolových sloučenin, které obsahují jednu methoxy skupinu. CO vibrace alkyl-aryl eterů se projevují při 1310 – 1230 cm^{-1} , které jsou součástí i flavonoidů. Některé flavonoidy jsou navázané na sacharidy, což se projeví v absorpčním pásu od 1200 do 950 cm^{-1} , kdy jsou tyto pásy typické pro sacharidy [55].

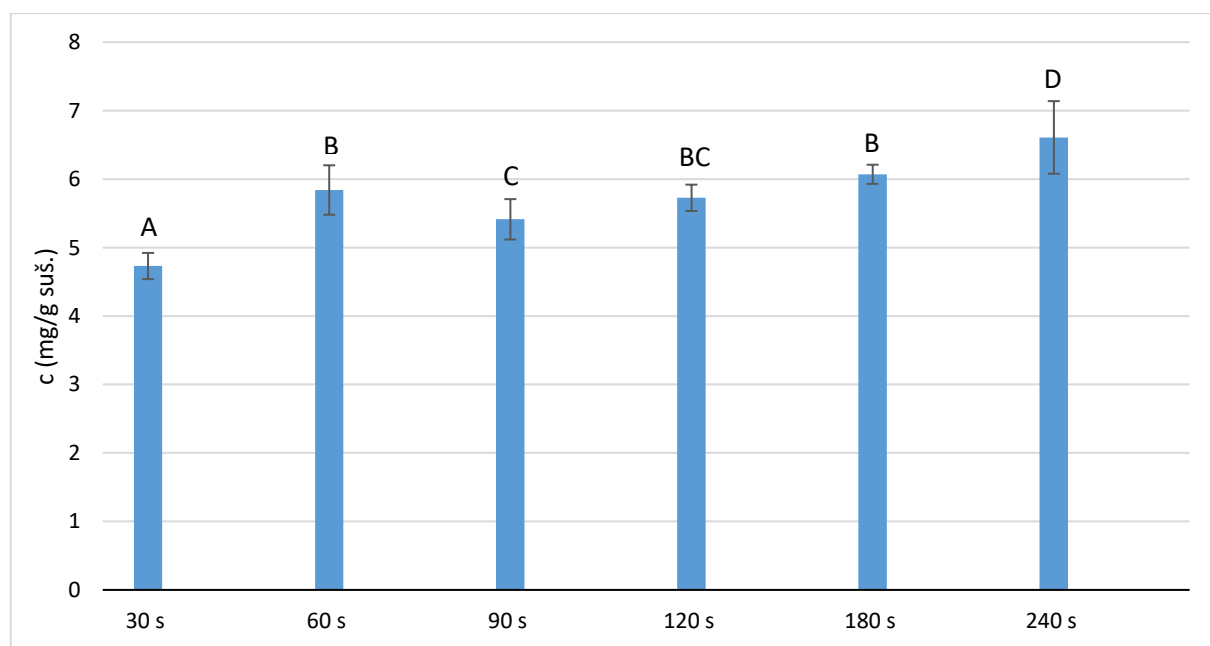
3.5 Spektrofotometrická analýza

3.5.1 Metanolové extrakty

Na Obrázku 8 jsou zobrazeny výsledky měření celkového obsahu fenolických látek různě namletých vzorků rohovníkového prášku pro metanolové extrakty. Výsledky byly vypočteny z kalibrační přímky kyseliny gallové (Příloha 1) a jsou udávány jako ekvivalent kyseliny gallové v mg/g sušiny vzorku.

Z obrázku je vidět, že mezi různě namletými vzorky je statisticky významný rozdíl v obsahu fenolických látek. Prášek namletý za 240 s se statisticky významně liší od všech ostatních vzorků s nejvyšším obsahem celkových fenolických látek (6,61 mg/g suš.) Prášek mletý po dobu 30 s měl nejnižší obsah celkových fenolických látek (4,73 mg/g suš.) Mezi prášky namleté po dobu 60, 120 a 180 s nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl, stejně jako u prášků namletých po 90 a 120 s.

Obrázek 8: Celkový obsah fenolických látek různě namletých vzorků rohovníkového prášku (metanolové extrakty)

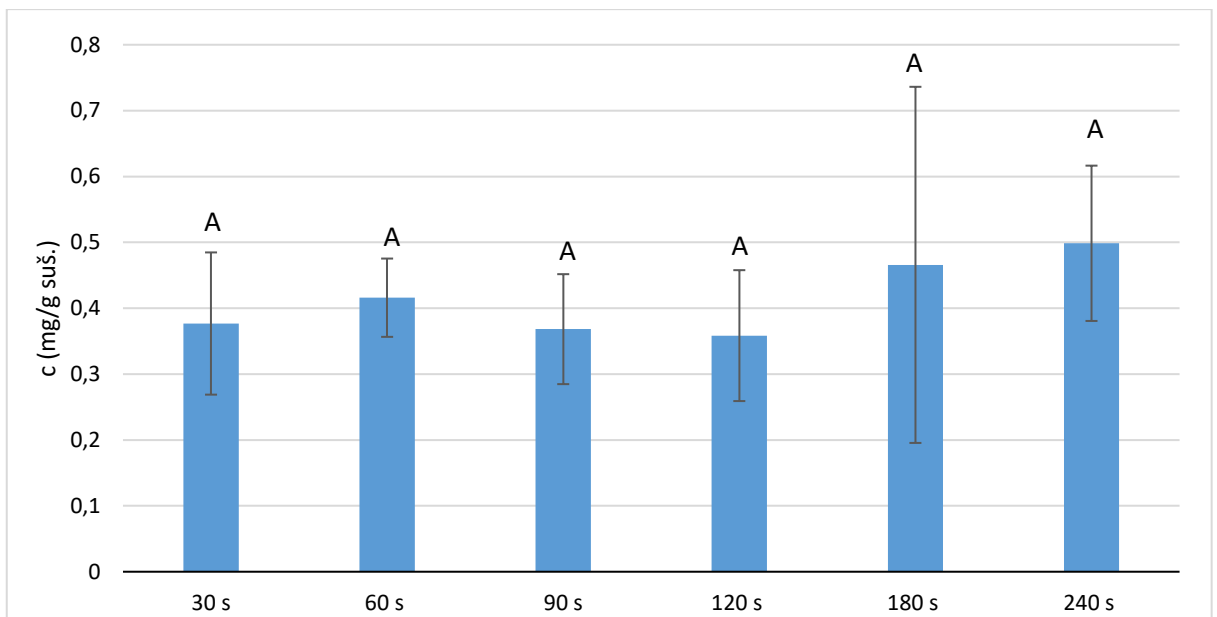


Rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$). Průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka, $N=6$.

Obrázek 9 představuje hodnoty celkového obsahu flavonoidů při použití metody 1 pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku. Výsledky byly vypočteny z kalibrační přímky kvercetinu (Příloha 2) a jsou udávány jako ekvivalent kvercetinu mg/g sušiny vzorku.

Jak je vidět na obrázku, naměřené hodnoty celkového obsahu flavonoidů (metoda 1) pro různě namleté prášky nevykazovaly žádný statisticky významný rozdíl.

Obrázek 9: Celkový obsah flavonoidů (metoda 1) pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (metanolové extrakty)

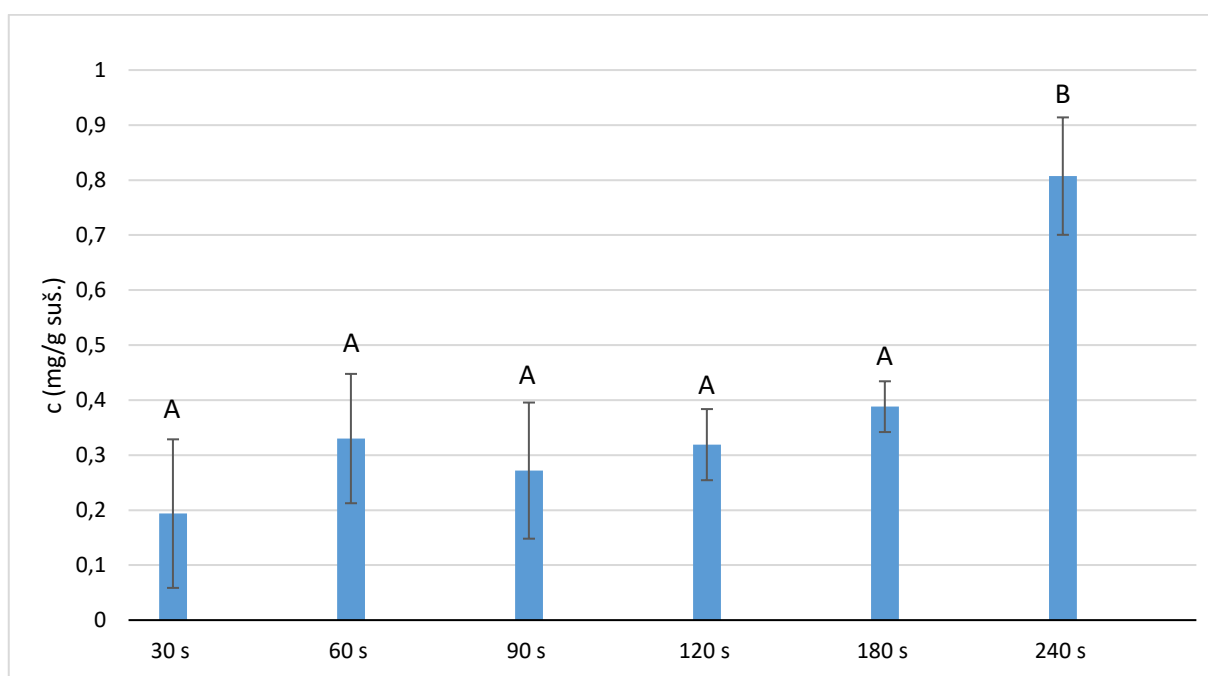


Rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$). Průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka, $N=3$.

Obrázek 10 představuje naměřené hodnoty celkového obsahu flavonoidů při využití metody 2 pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (metanolové extrakty). S využitím kalibrační přímky katechinu (Příloha 3) jsou výsledky uváděny jako ekvivalent katechinu v mg/g sušiny vzorku. Nejvyšší obsah flavonoidů podle metody 2 měl vzorek mletý po dobu 240 s ($p < 0,05$), ostatní vzorky mají tento obsah podobný.

Vyšší obsah flavonoidů pro vzorek mletý po dobu 240 s by mohl být vysvětlen tím, že metoda 2 je specifická pro fenolové kyseliny, luteolin, katechiny a rutin, zatímco metoda 1 je selektivní pro flavonoly a luteolin (flavon) [23].

Obrázek 10: Celkový obsah flavonoidů (metoda 2) pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (metanolové extrakty)

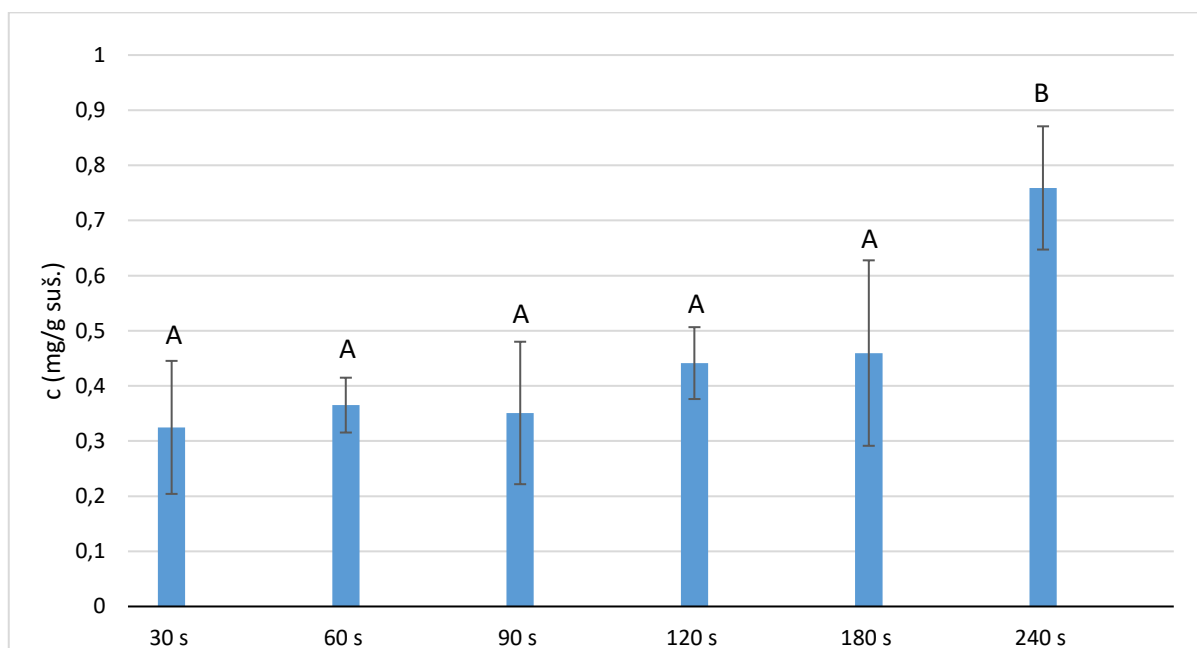


Rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$). Průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka, N=6.

Na Obrázku 11 je vyobrazen obsah katechinů různě namletých vzorků rohovníkového prášku (metanolové extrakty). Výsledky byly vypočítány s využitím kalibrační přímky katechinu (Příloha 4), kdy jsou vyjádřeny jako ekvivalent katechinu v mg/g sušiny vzorku.

Na obrázku je vidět, že statisticky významný rozdíl v obsahu katechinů představuje prášek namletý po dobu 240 s. Obsahy katechinů u ostatních vzorků nebyly navzájem statisticky rozdílné.

Obrázek 11: Obsah katechinů pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (metanolové extrakty)

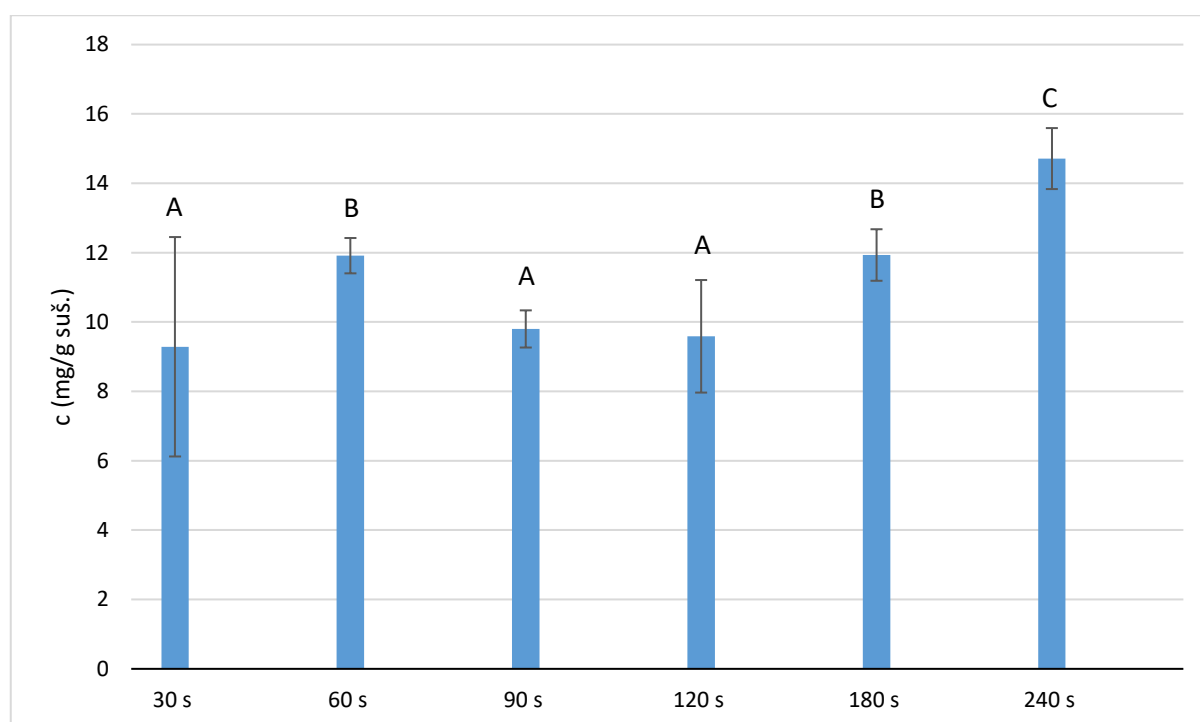


Rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$). Průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka, $N=6$.

Obrázek 12 představuje naměřené hodnoty antioxidační aktivity s využitím DPPH radikálu pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (metanolové extrakty). Výsledky jsou vypočítány z kalibrační přímky Troloxu (Příloha 5), kdy je výsledek udáván jako ekvivalent Troloxu v mg/g sušiny vzorku.

Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazoval rohovníkový prášek namletý po dobu 240 s (14,71 mg/g suš.). Přímá úměra mezi antioxidační aktivitou a dobou mletí nebyla nalezena. Antioxidační aktivita vzrostla až od vzorku mletého po dobu 180 s.

Obrázek 12: Antioxidační aktivita s využitím DPPH radikálu pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (metanolové extrakty)

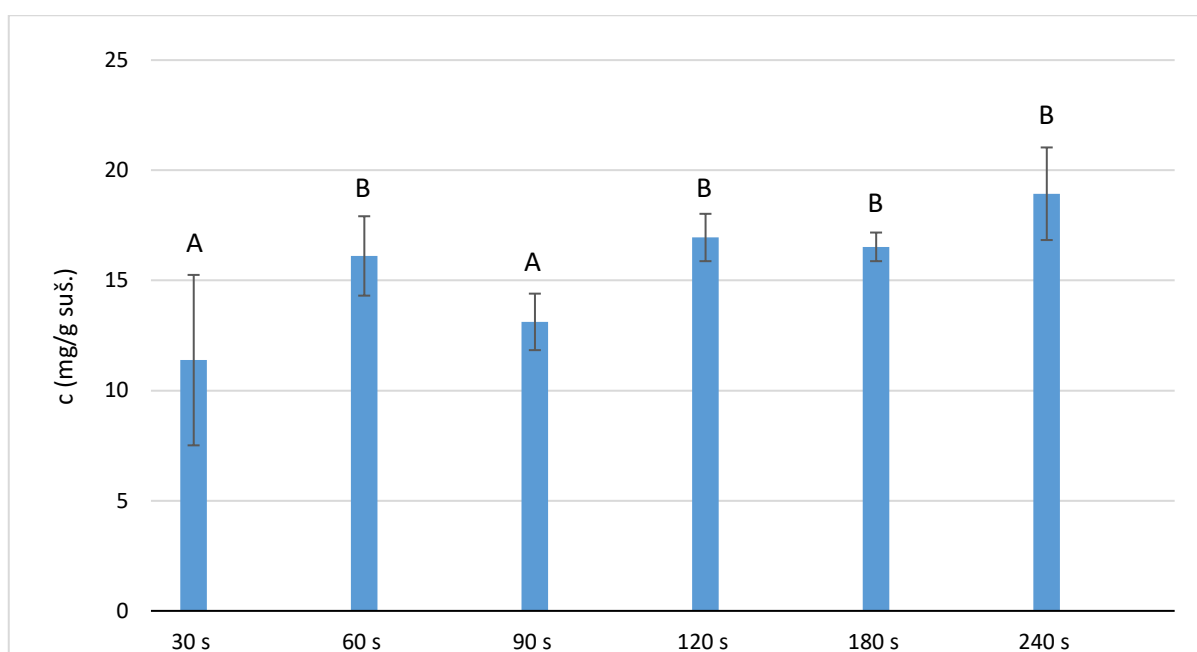


Rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$). Průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka, $N=6$.

Na Obrázku 13 jsou zobrazeny výsledky měření antioxidační aktivity s využitím metody FRAP pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (metanolové extrakty). Výsledky byly vypočítány z kalibrační přímky Troloxu (Příloha 6) a jsou vyjádřeny jako ekvivalent Troloxu v mg/g sušiny vzorku.

Na obrázku je vidět, že mezi různě namletými prášky je statisticky významný rozdíl v antioxidační aktivitě. Hodnoty antioxidační aktivity pro prášky namleté po dobu 30 s (11,38 mg/g suš.) a 90 s (13,12 mg/g suš.) se staticky liší od ostatních namletých prášků.

Obrázek 13: Antioxidační aktivita s využitím metody FRAP pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (metanolové extrakty)

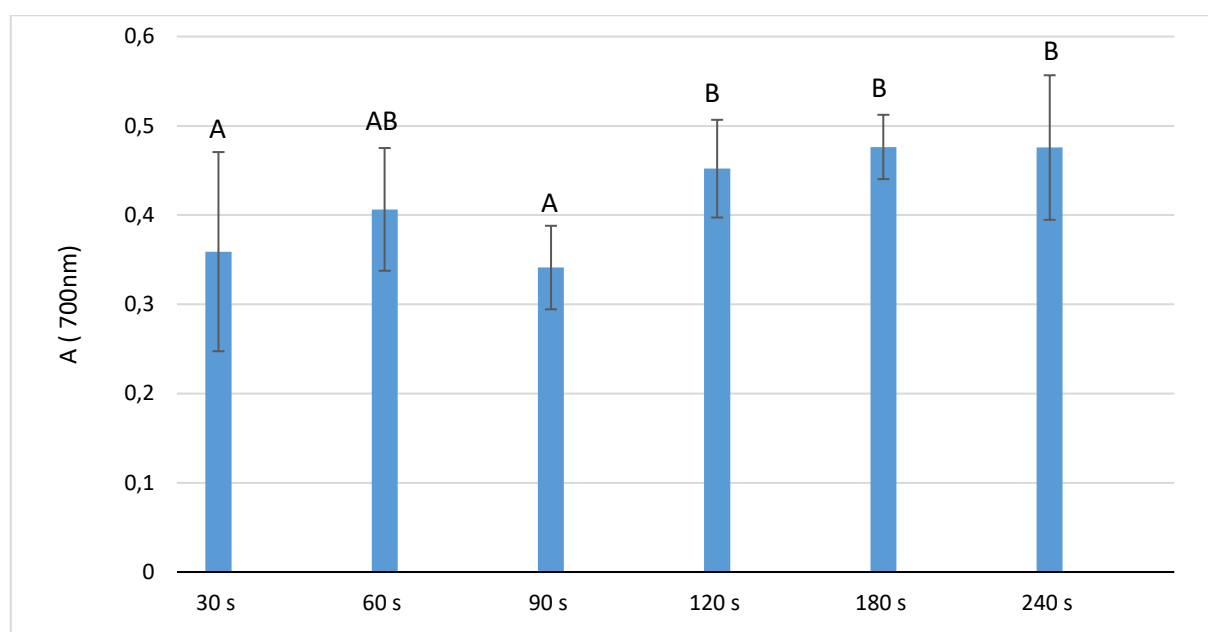


Rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$). Průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka, $N=6$.

Obrázek 14 představuje naměřené hodnoty absorbance při vlnové délce 700 nm, kdy tyto hodnoty představují redukční vlastnosti jednotlivých různě namletých vzorků rohovníkového prášku.

Statistická analýza ukázala, že mezi výsledky je statisticky významný rozdíl. Prášky namleté po dobu 30 a 90 s (0,359 a 0,341) se statisticky významně liší od vzorků namletých po 120, 180 a 240 s. Nejvyšší hodnoty absorbance měly prášky namleté po dobu 180 a 240 s, a to shodně 0,476.

Obrázek 14: Redukční vlastnosti pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (metanolové extrakty)



Rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$). Průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka, $N=6$.

Analýza rohovníkového prášku prokázala antioxidační vlastnosti, obsah fenolických látek, flavonoidů, katechinů a redukčních vlastností, přičemž to dokazují i články např. Stavroua et al. [4] nebo Benchikha et al. [56]. Analýzu vlastností prášků, které byly mlety různou dobu, porovnávali v článcích Dinga et al. [57] a Penga et al. [58]. Různá doba mletí výrazně ovlivňuje extrakční účinnost při extrakci na tuhém sorbentu. Čím delší je doba mletí, tím vyšší je extrakční účinnost. Jedním z důvodů mohou být silnější chemické a fyzikální interakce mezi činidlem a složkami vzorku [57].

Delší doba mletí má také výrazný účinek na chemicko-fyzikální vlastnosti prášku a zvyšuje výtěžek bioaktivní metabolitů. Tím se rozšiřuje a zvyšuje přínos pro lidské zdraví [52].

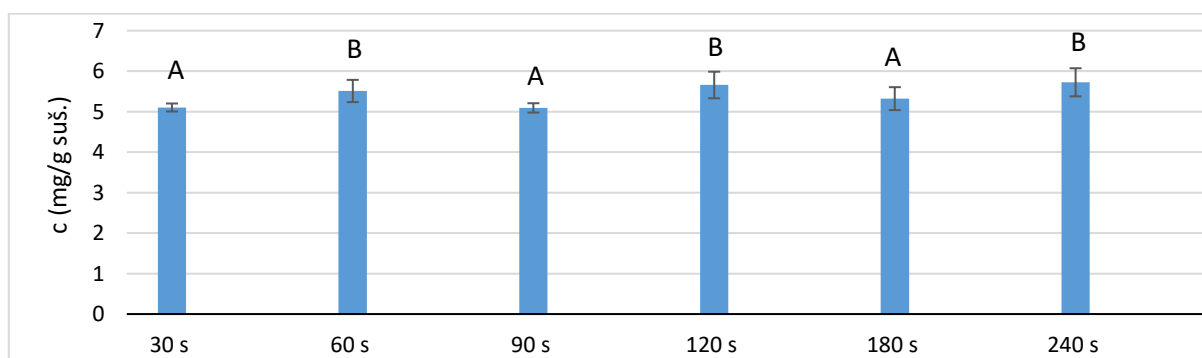
3.5.2 Extrakty po trávení *in vitro*

U různě namletých vzorků rohovníkového prášku proběhl trávicí proces *in vitro* tak, že proběhla fáze ústní, žaludeční a duodendální. Vzniklé extrakty byly použity na spektrofotometrické stanovení biologicky aktivních látek (viz Kapitola 2.6.5).

Na Obrázcích 15, 16, 17 a 18 jsou zobrazeny výsledky měření celkového obsahu fenolických látek, antioxidační aktivity s využitím DPPH radikálu, antioxidační aktivity s využitím metody FRAP a redukčních vlastností různě namletých vzorků rohovníkového prášku pro extrakty po trávení *in vitro*.

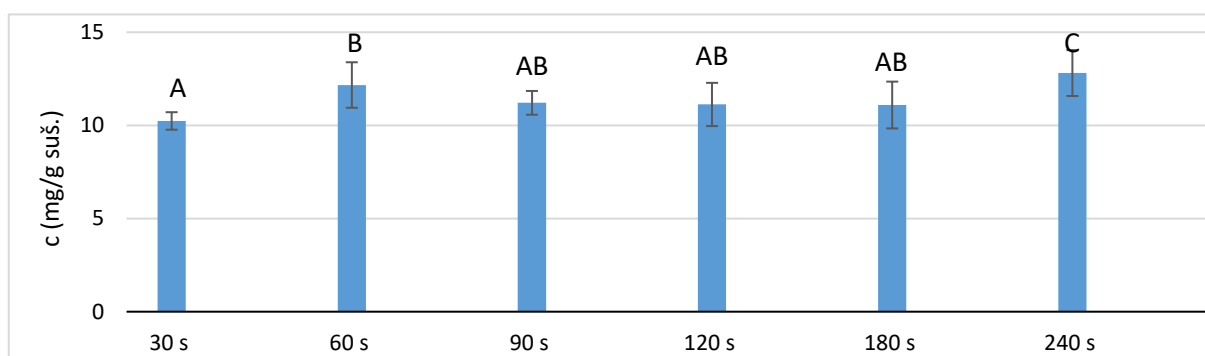
Výsledky měření celkových fenolických látek prokázaly rozdíly mezi vzorky. Mezi prášky namletými po dobu 30, 90, 180 s a prášky namletými po dobu 90, 120, 240 s je statisticky významný rozdíl, i když se hodnoty obsahů látek pohybovaly mezi 5,1 a 5,7 mg/g suš. Při měření antioxidační aktivity s využitím DPPH radikálu se projevil jako statisticky významný vzorek mletý po dobu 240 s (12,8 mg/g suš.). Hodnoty antioxidační aktivity s využitím metody FRAP se pohybovaly mezi 14,0 a 16,6 mg/g suš., přičemž nejnižší hodnotu měl prášek mletý 30 s a nejvyšší hodnotu antioxidační aktivity měl prášek mletý po dobu 240 s. Při měření redukčních vlastností se žádný vzorek neprojevil jako statisticky významný, kdy se hodnoty absorbance pohybovaly od 0,167 do 0,186.

Obrázek 15: Celkový obsah fenolických látek pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (extrakty po trávení *in vitro*)



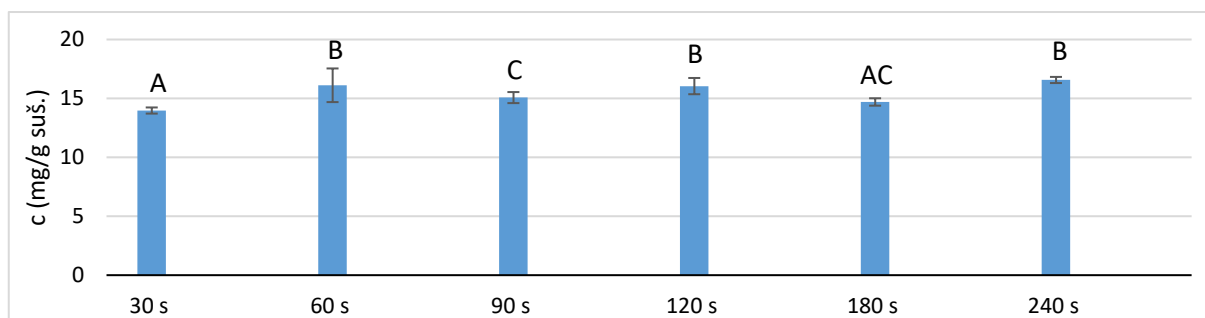
Rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$). Průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka, N=6.

Obrázek 16: Antioxidační aktivita s využitím DPPH radikálu pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (extrakty po trávení *in vitro*)



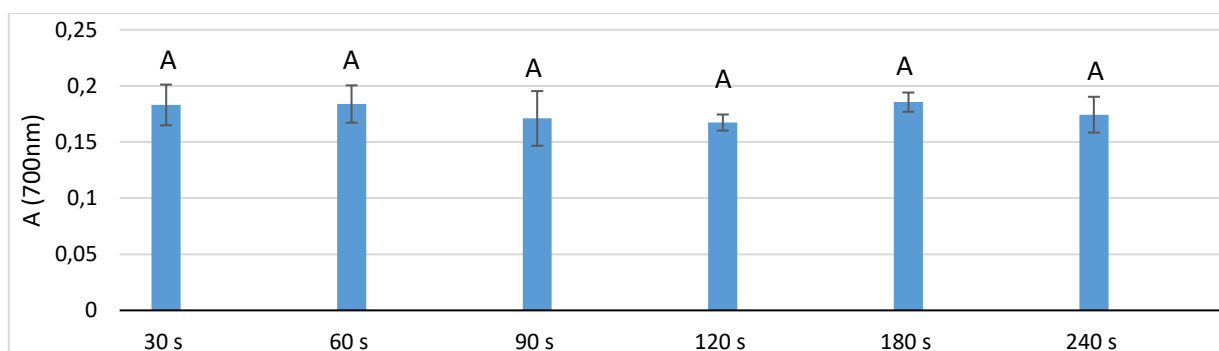
Rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$). Průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka, N=6.

Obrázek 17: Antioxidační aktivita s využitím metody FRAP pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (extrakty po trávení *in vitro*)



Rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$). Průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka, N=6.

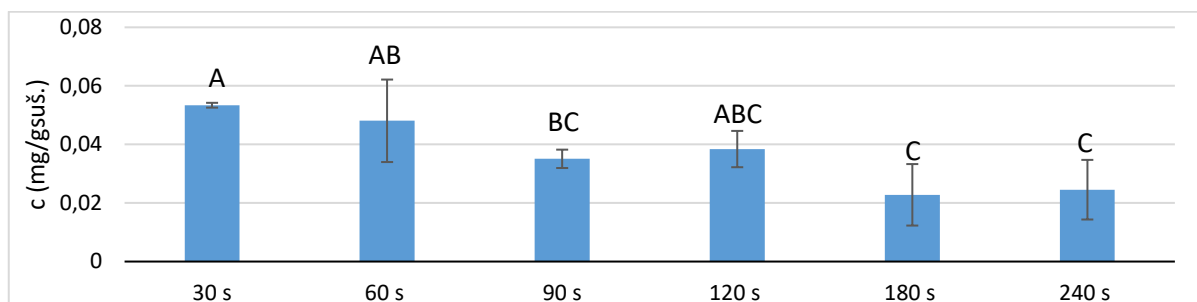
Obrázek 18: Redukční vlastnosti pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (extrakty po trávení *in vitro*)



Rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$). Průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka, N=6.

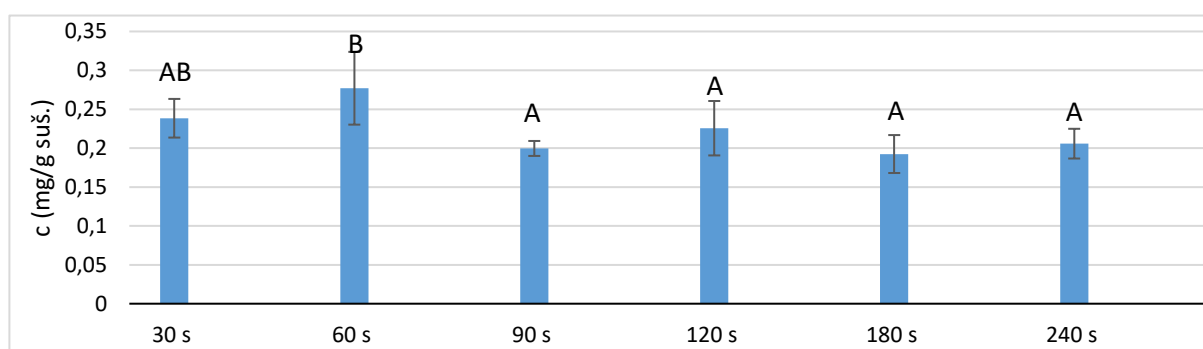
Na Obrázcích 19, 20 a 21 jsou znázorněny výsledky měření obsahu flavonoidů při využití metody 1, metody 2 a obsah katechinů. Při měření obsahu flavonoidů (metoda 1) se naměřené hodnoty statisticky významně lišily. Nejvyšší hodnotu měl vzorek mletý po dobu 30 s (0,053 mg/g suš.), naopak nejnižší hodnotu měl vzorek mletý po dobu 180 s, a to 0,023 mg/g suš. Při využití metody 2 pro stanovení obsahu flavonoidů se výsledky pohybovaly ve vyšších koncentracích než v metodě 1. Naměřené hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 0,19 do 0,28 mg/g suš. Při měření obsahu katechinů analýza neprokázala žádný statisticky významný rozdíl, ovšem vzorek mletý po dobu 240 s měl nejvyšší hodnotu obsahu katechinů (0,71 mg/g suš.).

Obrázek 19: Celkový obsah flavonoidů (metoda 1) pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (extrakty po trávení *in vitro*)



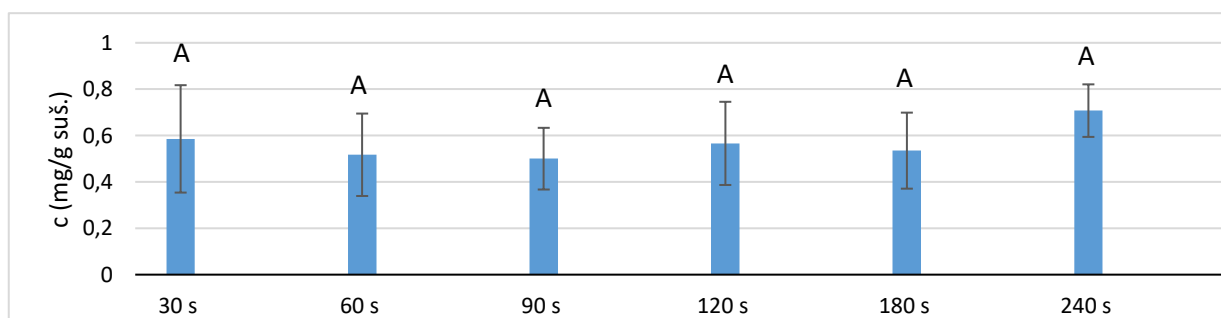
Rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$). Průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka, $N=3$.

Obrázek 20: Celkový obsah flavonoidů (metoda 2) pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (extrakty po trávení *in vitro*)



Rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$). Průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka, $N=6$.

Obrázek 21: Obsah katechinů pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku (extrakty po trávení *in vitro*)



Rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$). Průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka, $N=6$.

V Tabulce 9 jsou znázorněny výsledky biologické dostupnosti (%), které byly vypočítány z koncentrace daných látek stanovených spektrofotometrickými metodami, kdy byly použity výsledky při použití metanolových extraktů a extraktů po trávení *in vitro*. Výpočet biologické dostupnosti je zobrazený v Rovnici 10.

Rovnice 10: Výpočet biologické dostupnosti

$$\text{biologická dostupnost}(\%) = \frac{C_{\text{metanolové extrakty}}}{C_{\text{extrakty po trávení}}} \cdot 100$$

Tabulka 9: Biologická dostupnost

Prášek mletý po dobu	Biologická dostupnost (%)						
	Fenolické látky	Flavonoidy (metoda 1)	Flavonoidy (metoda 2)	Katechiny	DPPH	FRAP	Redukční vlastnosti
30 s	107,9	14,2	123,1	180,3	110,3	122,8	51,0
60 s	94,3	11,6	83,9	141,6	102,1	100,0	45,2
90 s	94,1	9,5	73,4	142,5	114,4	114,9	50,1
120 s	98,8	10,7	70,7	128,3	116	94,7	37,0
180 s	87,7	4,9	49,6	116,4	93,0	89,0	38,9
240 s	86,6	4,9	25,5	93,2	87,1	87,5	36,7

Z tabulky vyplývá, že biologická dostupnost flavonoidů (metoda 1) je nejnižší ze všech provedených metod. Nejnižší hodnotu biologické dostupnosti flavonoidů měly vzorky namleté po dobu 180 a 240 s, a to 4,9 %. Naopak katechiny mají nejvyšší biologickou dostupnost, kdy prášek namletý po 30 s má biologickou dostupnost 180,3 %. Hodnoty biologické dostupnosti téměř vždy klesaly s vyšší dobou mletí a to tak, že vzorek mletý po dobu 30 s měl nejvyšší hodnoty a vzorek mletý po dobu 240 s měl nejnižší hodnoty biologické dostupnosti.

Vyšší biologická dostupnost by mohla být způsobena změnami pH při trávicím procesu *in vitro* a deprotonaci hydroxylových skupin, které jsou na aromatických kruzích fenolových sloučenin. Další důvody pro vyšší biologickou dostupnost mohou být strukturální změny fenolových molekul nebo vznik nových sloučenin, které mají vyšší antioxidační aktivitu [30].

Nízká biologická dostupnost by mohla být způsobena degradací a špatné stabilitě sloučenin vlivem trávicích enzymů a pH, kdy jak kyselé pH žaludku, tak alkalické pH střevního traktu mohou stát za snížením antioxidační aktivity, tudíž biologické dostupnosti [59].

3.6 Korelační analýza

Korelační analýza prokázala silnou korelaci mezi hodnotou D_{50} (stanovení distribuce částic podle počtu, kdy 50 % částic je větší než tato hodnota a 50 % částic je menší) a obsahem flavonoidů s využitím metody 1, kdy korelační koeficient r má hodnotu 0,85 ($p=0,03$) a dokazuje téměř lineární závislost mezi velikostí částic a obsahem flavonoidů.

Při využití korelační analýzy pro barevné koordináty se projevila silná korelace pouze mezi barevnou koordinátou b^* a stanovením obsahu flavonoidů s využitím metody 2. Korelační koeficient r má hodnotu 0,81, hladina pravděpodobnosti p je 0,05.

Tabulka 10 představuje výsledky korelační analýzy mezi obsahy biologicky aktivních látek (obsah flavonoidů metoda 1,2 a obsah katechinů) a metodami zjištění antioxidační aktivity (celkové fenolické látky, antioxidační aktivita s využitím DPPH radikálu, antioxidační aktivita s využitím metody FRAP, redukční vlastnosti). Analýza prokázala silnou korelaci mezi obsahem katechinů a celkovými fenolickými látkami, antioxidační aktivitou s využitím DPPH radikálu a antioxidační aktivitou s využitím metody FRAP. Nejsilnější korelace se vyskytla mezi obsahem katechinů a celkovými fenolickými látkami, kdy korelační koeficient měl hodnotu 0,92, z toho vyplývá, že je lineární závislost mezi obsahem katechinů a celkovými fenolickými látkami. Silná korelace mezi výsledky se vyskytla také mezi obsahem flavonoidů a antioxidační aktivitou s využitím metody DPPH radikálu. Korelační koeficient měl hodnotu 0,85 na statisticky významné hladině pravděpodobnosti 0,03. Silné korelace se vyskytují i mezi celkovými fenolickými látkami a flavonoidy (metoda 1,2), antioxidační aktivitou s využitím DPPH a flavonoidy (metoda 1) a mezi redukčními vlastnostmi a obsahem katechinů. Tyto metody mají silné korelace, ale nejsou statisticky významné ($p>0,05$).

Tabulka 10: Výsledky korelační analýzy mezi skupinami látek (metanolové extrakty)

Metody zjištění antioxidační aktivity	Obsah biologicky aktivních látek		
	Flavonoidy (metoda 1)	Flavonoidy (metoda 2)	Katechiny
Fenolické látky	r = 0,80 p = 0,06	r = 0,77 p = 0,07	r = 0,92 p = 0,01
DPPH	r = 0,79 p = 0,06	r = 0,85 p = 0,03	r = 0,91 p = 0,01
FRAP	r = 0,50 p = 0,31	r = 0,75 p = 0,09	r = 0,83 p = 0,04
Redukční vlastnosti	r = 0,47 p = 0,34	r = 0,61 p = 0,20	r = 0,79 p = 0,06

r.....korelační koeficient,

p.....hladina pravděpodobnosti

Červeně značeny jsou statisticky významné hodnoty ($p < 0,05$)

Tabulka 11 představuje výsledky korelační analýzy mezi velikostí částic a biologickou dostupností. Velikost částic je vyjádřena mediánem D_{50} za využití objemové distribuce částic a distribuce částic podle počtu. Biologická dostupnost je vyjádřena pro jednotlivé obsahy látek a metody zjištění antioxidační aktivity.

Korelační analýza prokázala silnou korelaci mezi počtem částic (D_{50}) a biologickou dostupností stanovenou s použitím metody stanovení antioxidační aktivity s využitím DPPH radikálu. Korelační koeficient r s hodnotou -0,85 značí zápornou korelaci na statisticky významné hladině pravděpodobnosti p (0,03).

Tabulka 11: Výsledky korelační analýzy mezi velikostí částic a biologickou dostupností látek

Velikost částic	Biologická dostupnost látek						
	Fenolické látky	Flavonoidy (metoda 1)	Flavonoidy (metoda 2)	Katechiny	DPPH	FRAP	Redukční vlastnosti
Objem D₅₀	r = 0,49 p = 0,33	r = 0,17 p = 0,74	r = 0,37 p = 0,47	r = 0,38 p = 0,45	r = 0,31 p = 0,54	r = 0,27 p = 0,61	r = 0,07 p = 0,90
Počet D₅₀	r = -0,54 p = 0,27	r = -0,56 p = 0,25	r = -0,35 p = 0,50	r = -0,30 p = 0,57	r = -0,85 p = 0,03	r = -0,27 p = 0,61	r = -0,06 p = 0,92

Objem D₅₀.....velikosti částic podle objemu, 50 % částic je menší než tato hodnota, 50 % částic je větší než tato hodnota

Počet D₅₀.....velikosti částic podle počtu, 50 % částic je menší než tato hodnota, 50 % částic je větší než tato hodnota

r.....korelační koeficient,

p.....hladina pravděpodobnosti

Červeně značeny jsou statisticky významné hodnoty (p <0,05)

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jak působí různá doba mletí prášku rohovníku obecného na jeho chemické a fyzikální vlastnosti.

Plody rohovníku obecného byly mlety po dobu 30, 60, 90, 120, 180 a 240 s na vibračním mlýnku. S práškem samotným byla provedena analýza distribuce částic, barevnosti a sorpčních vlastností. Analýza distribuce částic na elektronovém mikroskopu neprokázala výrazné změny mezi různě namletými prášky. Analýza distribuce velikosti a objemu částic nepotvrdila zmenšení částic s delší dobou mletí.

Analýza barevnosti prokázala drobné rozdíly mezi různě namletými prášky, kdy barevné koordináty pro prášek namletý 60 s se nejvíce lišily od ostatních namletých prášků. Barevnost byla změřena i pro nenamleté sušené plody rohovníku. Mezi naměřenými hodnotami byly relativně velké rozdíly z důvodu vícebarevného plodu rohovníku.

Stanovení sorpčních vlastností obsahovalo analýzu aktivity vody a sušiny různě namletých prášků. Mezi naměřenými hodnotami se vyskytovaly rozdíly, ovšem nebyl nalezen předpokládaný pokles hodnot aktivity vody a nárůst hodnot sušiny pro zvyšující se dobu mletí. Dále byly analyzovány rychlosti sorpce při různých parciálních tlacích a adsorpční izotermy různě namletých prášků. Analýza ukázala, že rychlost sorpce je ovlivněna parciálními tlaky vody, kdy při parciálním tlaku vody 80 % je nejvyšší rychlost sorpce, současně i s nejvyššími hodnotami koeficientů determinace. U analýzy adsorpčních izoterm různě namletých prášků se neprokázaly téměř žádné rozdíly.

Infračervené spektrum prokázalo přítomnost alkylové skupiny, allylové skupiny, CO a OH vazby. Tyto skupiny a vazby jsou důkazem přítomnosti fenolových sloučenin, jakou jsou fenolové kyseliny, flavonoly a flavonoidy.

Antioxidační aktivita různě namletých prášků rohovníku byla analyzována pro metanolové extrakty a extrakty po procesu trávení *in vitro*. Metanolové extrakty prokázaly antioxidační aktivitu, kdy vzorek namletý po dobu 30 s prokazoval nejmenší hodnoty antioxidační aktivity, vzorek namletý po dobu 240 s naopak projevoval nejvyšší hodnoty. Extrakty po trávícím procesu *in vitro* také prokázaly antioxidační aktivitu. Analýza biologické dostupnosti látek prokázala, že nejvyšší byla biologická dostupnost katechinů, nejnižší naopak flavonoidů. Prášek namletý po dobu 30 s vykazoval nejvyšší hodnoty biologické dostupnosti ze všech namletých vzorků.

Korelační analýza prokázala silnou korelaci mezi mediánem D_{50} (stanovení podle počtu) a obsahem flavonoidů (metoda 1), mezi barevnou koordinátou b^* a obsahem flavonoidů

(metoda 2) a také mezi některými obsahy látek a metodami zjištění antioxidační aktivity. Korelační analýza mezi velikostí částic a biologickou dostupností prokázala silnou korelaci se statisticky významnou hodnotou mezi mediánem D_{50} (stanovení podle počtu) a antioxidační aktivitou s využitím DPPH radikálu.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] TAGNAMAS, Zakaria, Hamza LAMSYEHE, Haytem MOUSSAOUI, Younes BAHAMMOU, Mounir KOUHILA, Ali IDLIMAM a Abdelkader LAMHARRAR. Energy and exergy analyses of carob pulp drying system based on a solar collector. *Renewable Energy* [online]. 2021, **163**, 495-503 [cit. 2020-10-21]. ISSN 09601481. Dostupné z: doi:10.1016/j.renene.2020.09.011.
- [2] ZEMOURI, Zohra, Abderrezak DJABEUR, Noureddine FRIMEHDI, Omar KHELIL a Meriem KAID-HARCHE. The seed diversity of Carob (*Ceratonia siliqua* L.) and the relationship between seeds color and coat dormancy. *Scientia Horticulturae* [online]. 2020, **274**, 1-2 [cit. 2021-06-16]. ISSN 03044238. Dostupné z: doi:10.1016/j.scienta.2020.109679.
- [3] AYAZ, Faik, Hülya TORUN, Sema AYAZ, Pedro CORREIA, Manuel ALAIZ, Carlos SANZ, Jiri GRÚZ a Miroslav STRNAD. Determination of chemical composition of anatolian carob pod (*Ceratonia siliqua* L.): Sugars, amino and organic acids, minerals and phenolic compounds. *Journal of Food Quality* [online]. 2007, **30**(6), 1040-1055 [cit. 2021-06-16]. ISSN 01469428. Dostupné z: doi:10.1111/j.1745-4557.2007.00176.x.
- [4] STAVROU, Ioannis, Atalanti CHRISTOU a Constantina KAPNISSI-CHRISTODOULOU. Polyphenols in carobs: A review on their composition, antioxidant capacity and cytotoxic effects, and health impact. *Food Chemistry* [online]. 2018, **269**, 355-374 [cit. 2020-10-21]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2018.06.152.
- [5] BENKOVIĆ, Maja. Assessment of drying characteristics and texture in relation with micromorphological traits of carob (*Ceratonia siliqua* L.) pods and seeds. *Food Technol. Biotechnol.* [online]. 2016, **54**(4), 432-440 [cit. 2020-10-21]. ISSN 1330-9862. Dostupné z: doi:10.17113/ft b.54.04.16.4475.
- [6] LOULLIS, Andreas a Eftychia PINAKOULAKI. Carob as cocoa substitute: a review on composition, health benefits and food applications. *European Food Research and Technology* [online]. 2018, **244**(6), 959-977 [cit. 2020-11-03]. ISSN 1438-2377. Dostupné z: doi:10.1007/s00217-017-3018-8.

- [7] GOULAS, Vlasios, Evgenios STYLOS, Maria CHATZIATHANASIADOU, Thomas MAVROMOUSTAKOS a Andreas TZAKOS. Functional components of carob fruit: Linking the chemical and biological space. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2016, **17**(11), 2-12 [cit. 2021-06-17]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms17111875.
- [8] RAWLE, Alan. *Basic principles of partical size analysis* [online]. In: . Worcestershire: Malvern Instruments Limited, 2014, 1-12 [cit. 2021-06-17]. Dostupné z: <https://www.atascientific.com.au/wp-content/uploads/2017/02/AN020710-Basic-Principles-Particle-Size-Analysis.pdf>.
- [9] BENKOVIĆ, Maja, Ana BELŠČAK-CVITANOVIĆ, Ingrid BAUMAN, Draženka KOMES a Siniša SREČEC. Flow properties and chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua L.*) flours as related to particle size and seed presence. *Food Research International* [online]. 2017, **100**, 211-218 [cit. 2021-01-25]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2017.08.048.
- [10] FELLOWS, P. *Food processing technology - Principles and practice (4th Edition)* [online]. Elsevier, 2017, 129-139 [cit. 2020-11-11]. ISBN 978-0-08-100523-1.
- [11] MUSSATO, Solange. *Biomass fractionation technologies for a lignocellulosic feedstock based biorefinery* [online]. 2016. Elsevier, 36-50 [cit. 2020-11-19]. ISBN 978-0-12-802561-1.
- [12] Perfect Homogenization with High Reproducibility. In: *Retsch* [online]. Haan [cit. 2021-01-21]. Dostupné z: https://www.retsch.com/dltmp/www/5a5369a0-5de0-4b41-b0da-03678ac9dd60-271640c348ee/flyer_gm200_en.pdf.
- [13] MOKRZYCKI, Wojciech a Maciej TATOL. Color difference Delta E - A survey. *Machine Graphics & Vision* [online]. Warsaw: The Institute of Computer Science Polish Academy of Science, 2012, , 4-25 [cit. 2021-04-14]. ISSN 1230-0535.
- [14] NADAL, Maria, Dave WYBLE a Clarence ZAROBILA. Color and appearance. *Spectrophotometry - Accurate measurement of optical properties of materials* [online]. Elsevier, 2014, 367-407 [cit. 2021-06-08]. Experimental Methods in the Physical Sciences. ISBN 9780123860224. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-386022-4.00010-8.
- [15] GUNEL, Zehra, Mehmet TORUN a Hilal SAHIN-NADEEM. Sugar, d -pinitol, volatile composition, and antioxidant activity of carob powder roasted by microwave,

- hot air, and combined microwave/hot air. *Journal of Food Processing and Preservation* [online]. 2020, **44**(4), 2-9 [cit. 2021-06-17]. ISSN 0145-8892. Dostupné z: doi:10.1111/jfpp.14371.
- [16] MOUNIR, Sabah, Atef GHANDOUR, Rana MUSTAFA a Karim ALLAF. Can hydro-thermo-mechanical treatment by instant controlled pressure-drop (DIC) be used as short time roasting process? Effect of processing parameters on sensory, physical, functional, and color attributes of Egyptian carob powder. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2021, **58**(2), 451-464 [cit. 2021-06-17]. ISSN 0022-1155. Dostupné z: doi:10.1007/s13197-020-04553-9.
- [17] YOUSIF, A. Processing and characterization of carob powder. *Food Chemistry* [online]. **69**(3), 283-287 [cit. 2020-12-01]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/S0308-8146(99)00265-4.
- [18] TOUNSI, Leila, Sirine KARRA, Héla KECHAOU a Nabil KECHAOU. Processing, physico-chemical and functional properties of carob molasses and powders. *Journal of Food Measurement and Characterization* [online]. 2017, **11**(3), 1440-1448 [cit. 2020-12-01]. ISSN 2193-4126. Dostupné z: doi:10.1007/s11694-017-9523-4.
- [19] SHAHIDI, Fereidoon a Ying ZHONG. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical Society Reviews* [online]. 2010, **39**(11), 4067-4079 [cit. 2021-06-17]. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/b922183m.
- [20] KEDARE, Sagar a R. SINGH. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2011, **48**(4), 412-422 [cit. 2019-03-20]. ISSN 0022-1155. Dostupné z: doi:10.1007/s13197-011-0251-1
- [21] RE, Roberta, Nicoletta PELLEGRINI, Anna PROTEGGENTE, Ananth PANNALA, Min YANG a Catherine RICE-EVANS. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 1999, **26**(9-10), 1231-1237 [cit. 2019-03-21]. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3.
- [22] SHAHIDI, Fereidoon. *Handbook of antioxidants for food preservation*. Waltham, MA, USA: Woodhead Publishing is an imprint of Elsevier, 2015. Woodhead Publishing in food science, technology, and nutrition, no. 276. 304-305. ISBN 978-1-78242-089-7.

- [23] PeKAL, Anna a Krystyna PYRZYNSKA. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods* [online]. 2014, **7**(9), 1776-1782 [cit. 2021-05-09]. ISSN 1936-9751. Dostupné z: doi:10.1007/s12161-014-9814-x.
- [24] SUN, Baoshan, Jorge RICARDO-DA-SILVA a Isabel SPRANGER. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1998, **46**(10), 4267-4274 [cit. 2021-05-09]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf980366j.
- [25] SOCHOR, Jiri, Marketa RYVOLOVA, Olga KRYSTOFOVA et al. Fully automated spectrometric protocols for determination of antioxidant activity: Advantages and disadvantages. *Molecules* [online]. 2010, **15**(12), 8618-8640 [cit. 2021-05-09]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules15128618.
- [26] PAVITHRA, Kalaisezhiyen a Sasikumar VADIVUKKARASI. Evaluation of free radical scavenging activity of various extracts of leaves from *Kedrostis foetidissima* (Jacq.) Cogn. *Food Science and Human Wellness* [online]. 2015, **4**(1), 42-46 [cit. 2021-05-09]. ISSN 22134530. Dostupné z: doi:10.1016/j.fshw.2015.02.001.
- [27] KUMAZAWA, Shigenori, Masa TANIGUCHI, Yasuyuki SUZUKI, Masayo SHIMURA, Mi-Sun KWON a Tsutomu NAKAYAMA. Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2002, **50**(2), 373-377 [cit. 2020-12-01]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf010938r.
- [28] DI STASIO, Luigia, Gianluca PICARIELLO, Mariantonietta MONGIELLO et al. Peanut digestome: Identification of digestion resistant IgE binding peptides. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2017, **107**, 88-98 [cit. 2021-02-17]. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2017.06.029.
- [29] DUPONT, D., M. ALRIC, S. BLANQUET-DIOT et al. Can dynamic in vitro digestion systems mimic the physiological reality?. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2018, **59**(10), 1546-1562 [cit. 2021-06-18]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2017.1421900.
- [30] CHAIT, Yasmina, Aynur GUNENC, Farida BENDALI a Farah HOSSEINIAN. Simulated gastrointestinal digestion and in vitro colonic fermentation of carob

- polyphenols: Bioaccessibility and bioactivity. *LWT* [online]. 2020, **117**, 3-9 [cit. 2021-06-17]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2019.108623
- [31] GOULAS, Vlasios a Andriani HADJISOLOMOU. Dynamic changes in targeted phenolic compounds and antioxidant potency of carob fruit (*Ceratonia siliqua* L.) products during in vitro digestion. *LWT* [online]. 2019, **101**, 269-275 [cit. 2021-01-21]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2018.11.003.
- [32] MAMONE, Gianfranco, Leonardo SCIAMMARO, Salvatore DE CARO, Luigia DI STASIO, Francesco SIANO, Gianluca PICARIELLO a Maria PUPPO. Comparative analysis of protein composition and digestibility of *Ceratonia siliqua* L. and *Prosopis* spp. seed germ flour. *Food Research International* [online]. 2019, **120**, 188-195 [cit. 2021-02-17]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2019.02.035.
- [33] ORTEGA, Nàdia, Alba MACIÀ, Maria-Paz ROMERO, Jordi REGUANT a Maria-Jose MOTILVA. Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an in-vitro digestion model. *Food Chemistry* [online]. 2011, **124**(1), 65-71 [cit. 2021-02-17]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2010.05.105.
- [34] KAMILOGLU, Senem a Esra CAPANOGLU. Investigating the in vitro bioaccessibility of polyphenols in fresh and sun-dried figs (*Ficus carica* L.). *International Journal of Food Science & Technology* [online]. 2013, **48**(12), 2621-2629 [cit. 2021-06-09]. ISSN 09505423. Dostupné z: doi:10.1111/ijfs.12258.
- [35] SKIBSTED, Leif, Jens RISBO a Mogens ANDERSEN. *Chemical deterioration and physical instability of food and beverages*. Boca Raton: CRC Press, 2010. Woodhead Publishing in food science, technology, and nutrition, no. 186,147-161. ISBN 978-1-84569-495-1.
- [36] Optical Hygrometers. KOROTCENKOV, Ghenadii. *Handbook of humidity measurement methods, materials and technologies: Spectroscopic methods of humidity measurement*. Vol. 1. Boca Raton, USA: CRC press, Taylor & Francis Group, 2018, 53-58. ISBN 9781138300217.
- [37] DONOHUE, M.D a G.L ARANOVICH. Classification of Gibbs adsorption isotherms. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 1998, **76-77**, 137-152 [cit. 2021-03-26]. ISSN 00018686. Dostupné z: doi:10.1016/S0001-8686(98)00044-X.

- [38] LI, Jun, Lei DONG, Man XIAO, Dongling QIAO, Kao WU, Fatang JIANG, Saffa RIFFA a Yuehong SU. A novel and accurate method for moisture adsorption isotherm determination of sultana raisins. *Food Analytical Methods* [online]. 2019, **12**(11), 2491-2499 [cit. 2021-03-29]. ISSN 1936-9751. Dostupné z: doi:10.1007/s12161-019-01599-0.
- [39] LECLERC, Mario a Robert GAUVIN. *Functional materials for energy, sustainable development and biomedical sciences*. Boston: de Gruyter, 2014, 223-231. ISBN 978-3-11-030781-8.
- [40] CHEREMISINOFF, Nicholas. *Polymer characterization: laboratory techniques and analysis*. Westwood, N.J.: Noyes Publications, 1996, 64-73. ISBN 978-0-8155-1403-9.
- [41] STOUT, Scott a Zhendi WANG. *Standard handbook oil spill environmental forensics: fingerprinting and source identification*. Second edition. London: Academic Press, 2016, 573-574. ISBN 978-0-12-809659-8.
- [42] RAND, Salvatore a Allen VERSTUYFT. *Significance of tests for petroleum products*. Ninth edition. West Conshohocken, PA: ASTM International, 2018, 271-272. ISBN 978-0-8031-7108-4.
- [43] ANDERSON, J.M. a G. VOSKERICIAN. The challenge of biocompatibility evaluation of biocomposites. *Biomedical Composites* [online]. Elsevier, 2010, 325-353 [cit. 2021-06-07]. ISBN 9781845694364. Dostupné z: doi:10.1533/9781845697372.3.325.
- [44] MARGENOT, A.J., F.J. CALDERÓN, K.W. GOYNE, F.N.D MUKOME a S.J. PARIKH. IR Spectroscopy, soil analysis applications. *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry* [online]. Elsevier, 2017, 448-454 [cit. 2021-06-07]. ISBN 9780128032244. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.12170-5.
- [45] AGUILAR, Zoraida. Types of nanomaterials and corresponding methods of synthesis. *Nanomaterials for Medical Applications* [online]. Elsevier, 2013, 33-82 [cit. 2021-06-07]. ISBN 9780123850898. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-385089-8.00002-9.
- [46] HUANG, Gang, Junxi HE, Xia ZHANG, Manman FENG, Yan TAN, Chuncheng LV, Hao HUANG a Zhao JIN. Applications of Lambert-Beer law in the preparation and performance evaluation of graphene modified asphalt. *Construction and Building*

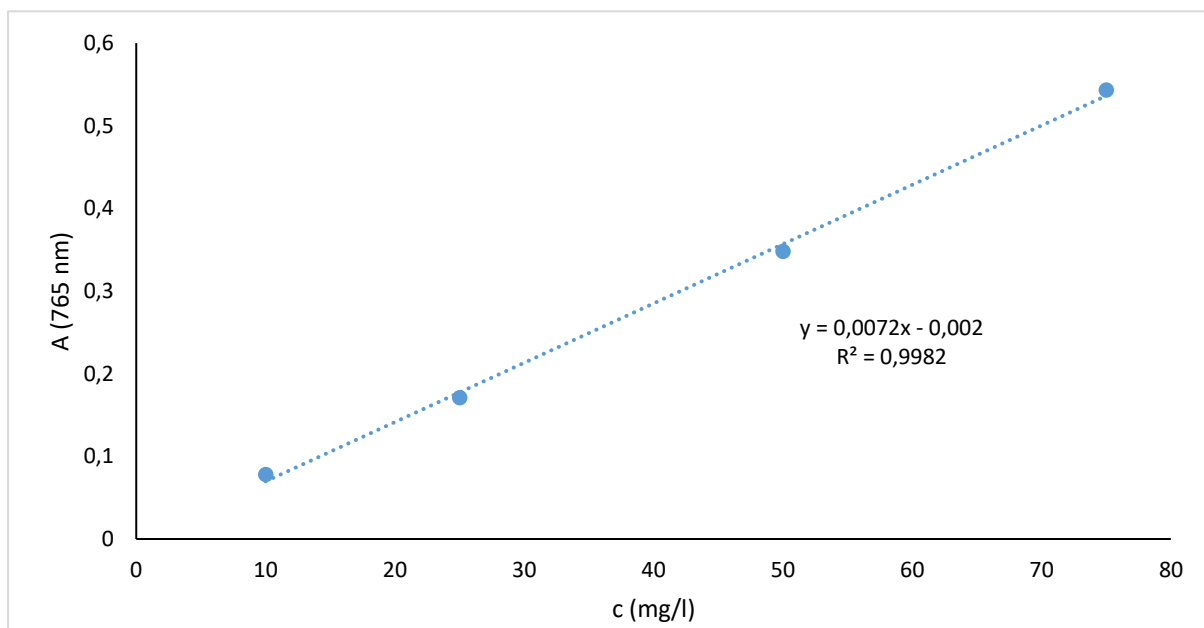
- Materials* [online]. 2021, **273**, 5-7. [cit. 2021-06-03]. ISSN 09500618. Dostupné z: doi:10.1016/j.conbuildmat.2020.121582.
- [47] MÄNTELE, Werner a Erhan DENIZ. UV–VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [online]. 2017, **173**, 965-968 [cit. 2021-06-03]. ISSN 13861425. Dostupné z: doi:10.1016/j.saa.2016.09.037.
- [48] ZHANG, Jin. *Optical properties and spectroscopy of nanomaterials*. Hackensack, N.J.: World Scientific, 2009, 11-46. ISBN 978-981-283-664-9.
- [49] JELÍNKOVÁ, Kateřina. *Vliv přísad karobového prášku na antioxidační vlastnosti muffinů*. Pardubice, 2018. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Libor Červenka.
- [50] BABA, Shoib a Shahid MALIK. Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. *Journal of Taibah University for Science* [online]. 2018, **9**(4), 449-454 [cit. 2021-05-18]. ISSN 1658-3655. Dostupné z: doi:10.1016/j.jtusci.2014.11.001.
- [51] JAREŠOVÁ, Lada. *Náhrada pestré stravy a antioxidační vlastnosti*. Pardubice, 2018. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Libor Červenka.
- [52] HONG, Seong-Jin, Protiva DAS a Jong-Bang EUN. Effects of superfine grinding using ball-milling on the physical properties, chemical composition, and antioxidant properties of *Quercus salicina* (Blume) leaf powders. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2021, **101**(8), 3123-3131 [cit. 2021-06-09]. ISSN 0022-5142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.10941.
- [53] ELDEEB, Gahad a Sameh MOSILHEY. Roasting temperature impact on bioactive compounds and PAHs in Carob powder (*Ceratonia siliqua* L.). *Journal of Food Science and Technology* [online]. 1-9. [cit. 2021-06-09]. ISSN 0022-1155. Dostupné z: doi:10.1007/s13197-021-04989-7.
- [54] FILIPOVIĆ, S., N. OBRADOVIĆ, J. KRSTIĆ, M. ŠĆEPANOVIĆ, V. PAVLOVIĆ, V. PAUNOVIĆ a M.M. RISTIĆ. Structural characterization and electrical properties of sintered magnesium–titanate ceramics. *Journal of Alloys and Compounds* [online].

- 2013, **555**, 39-44 [cit. 2021-06-09]. ISSN 09258388. Dostupné z: doi:10.1016/j.jallcom.2012.12.040.
- [55] ABBAS, Ouissam, Géraldine COMPÈRE, Yvan LARONDELLE, Darly POMPEU, Hervé ROGEZ a Vincent BAETEN. Phenolic compound explorer: A mid-infrared spectroscopy database. *Vibrational Spectroscopy* [online]. 2017, **92**, 111-118 [cit. 2021-06-09]. ISSN 09242031. Dostupné z: doi:10.1016/j.vibspec.2017.05.008.
- [56] BENCHIKH, Yassine, Hayette LOUAILECHE, Béatrice GEORGE a André MERLIN. Changes in bioactive phytochemical content and in vitro antioxidant activity of carob (*Ceratonia siliqua* L.) as influenced by fruit ripening. *Industrial Crops and Products* [online]. 2014, **60**, 298-303 [cit. 2021-06-09]. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2014.05.048.
- [57] DING, Mingya, Yun BAI, Jin LI, Xuejing YANG, Hui WANG, Xiumei GAO a Yan-xu CHANG. A diol-based-matrix solid-phase dispersion method for the simultaneous extraction and determination of 13 compounds from angelicae pubescentis radix by ultra high-performance liquid chromatography. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2019, **10**, 3-4 [cit. 2021-06-09]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2019.00227.
- [58] PENG, Li-Qing, Qin LI, Yan-xu CHANG et al. Determination of natural phenols in olive fruits by chitosan assisted matrix solid-phase dispersion microextraction and ultrahigh performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2016, **1456**, 68-76 [cit. 2021-06-09]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2016.06.011.
- [59] BURGOS-EDWARDS, Alberto, Felipe JIMÉNEZ-ASPEE, Samanta THOMAS-VALDÉS, Guillermo SCHMEDA-HIRSCHMANN a Cristina THEODULOZ. Qualitative and quantitative changes in polyphenol composition and bioactivity of *Ribes magellanicum* and *R. punctatum* after in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry* [online]. 2017, **237**, 1073-1082 [cit. 2021-06-09]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2017.06.060.

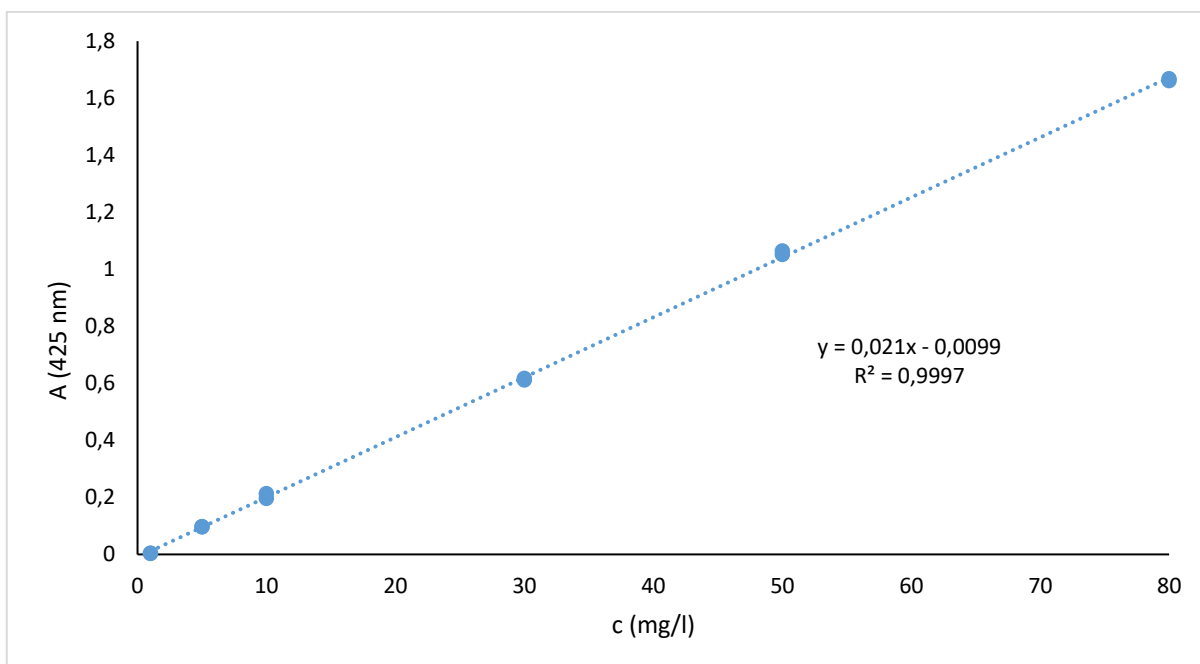
PŘÍLOHY

Příloha 1: Kalibrační přímka kyseliny gallové pro stanovení celkového obsahu fenolických látek.....	83
Příloha 2: Kalibrační přímka kvercetinu pro stanovení flavonoidů (metoda 1)	83
Příloha 3: Kalibrační přímka kvercetinu pro stanovení flavonoidů (metoda 2)	84
Příloha 4: Kalibrační přímka katechinu pro stanovení katechinů.....	84
Příloha 5: Kalibrační přímka Troloxu pro stanovení antioxidační aktivity s využitím DPPH.....	85
Příloha 6: Kalibrační přímka Troloxu pro stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP	85
Příloha 7: Stanovení barevnosti sušených plodů rohovníku v režimu bez složky přímého odrazu (RSEX).....	86
Příloha 8: Stanovení barevnosti sušených plodů rohovníku v režimu se složkou přímého odrazu (RSIN).....	87
Příloha 9: Stanovení rychlosti sorpce pro vzorek mletý po dobu 180 s, měřený při relativní vlhkosti vzduchu 80 %.....	88
Příloha 10: Koeficienty determinace z měření rychlosti sorpce při rozdílných relativních vlhkostech vzduchu pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku.....	88

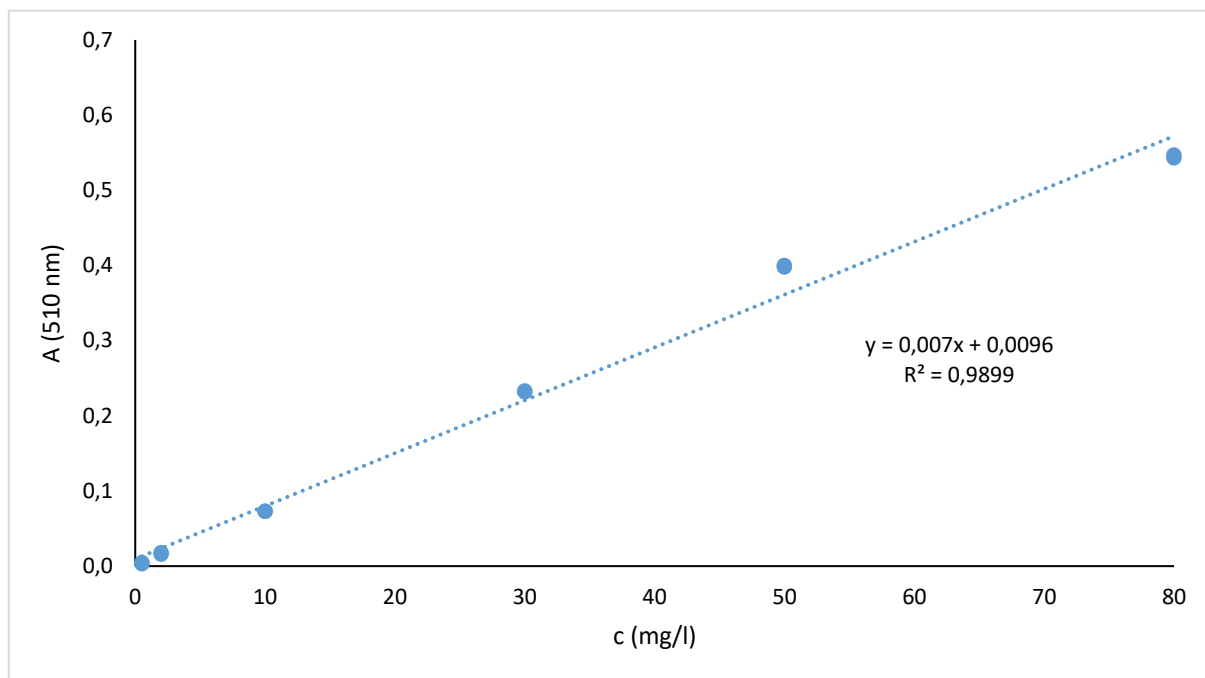
Příloha 1: Kalibrační přímka kyseliny gallové pro stanovení celkového obsahu fenolických látek



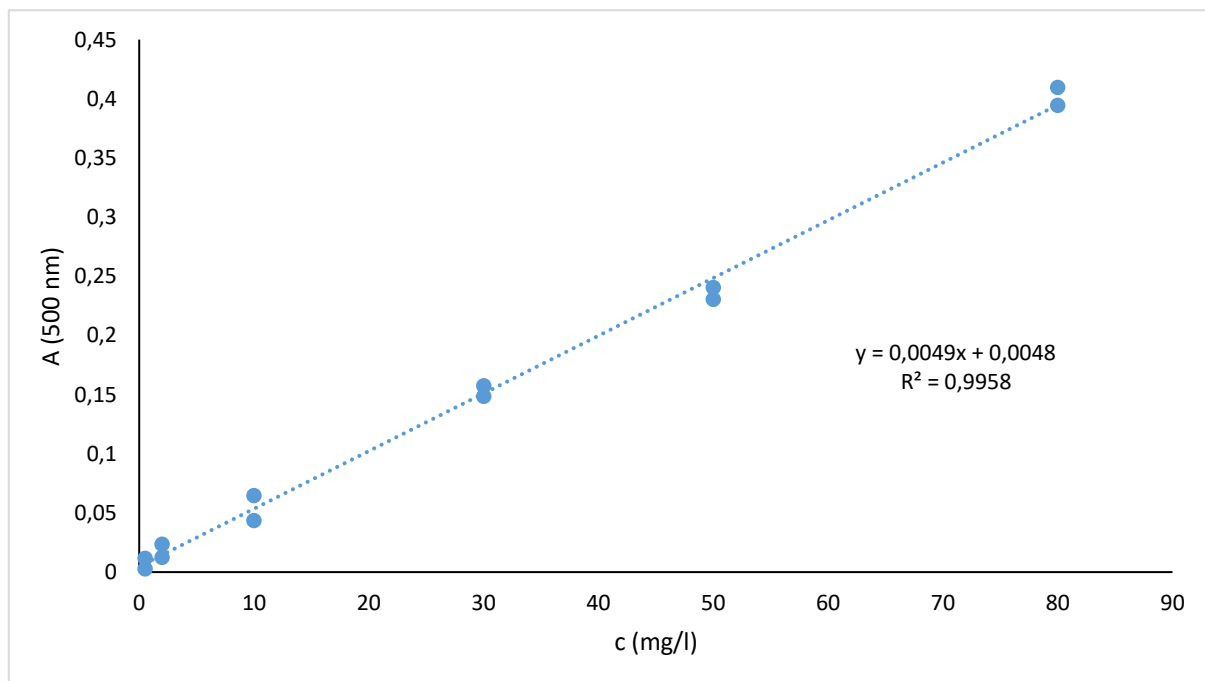
Příloha 2: Kalibrační přímka kvercetinu pro stanovení flavonoidů (metoda 1)



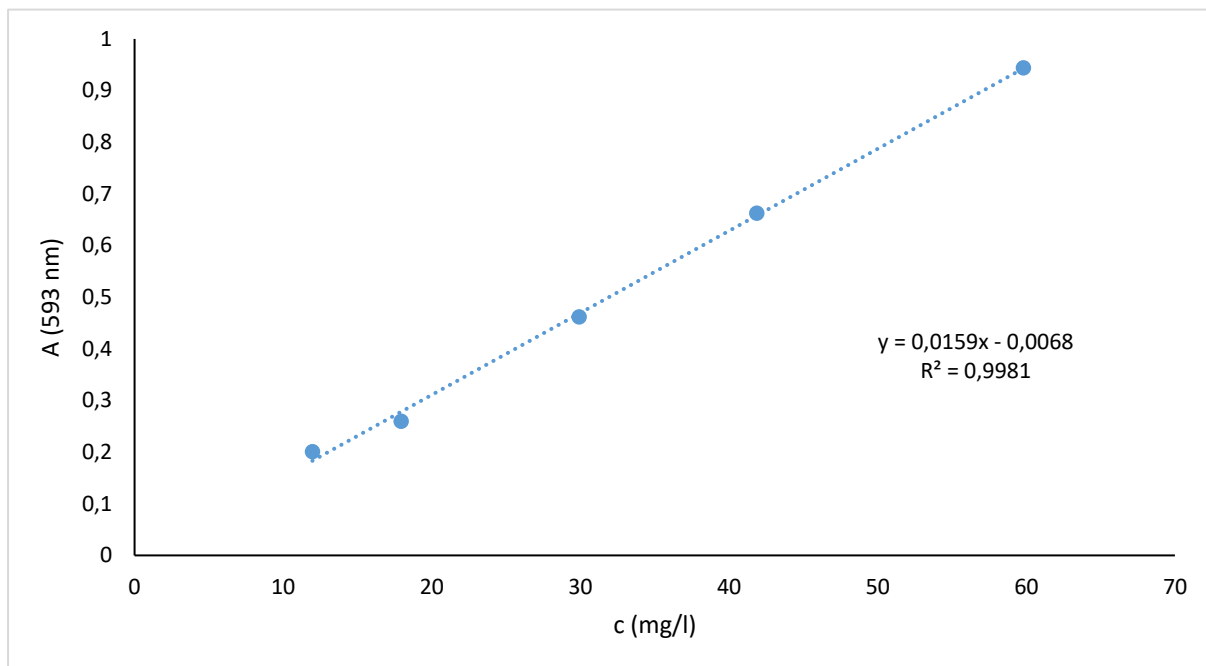
Příloha 3: Kalibrační přímka kvercetinu pro stanovení flavonoidů (metoda 2)



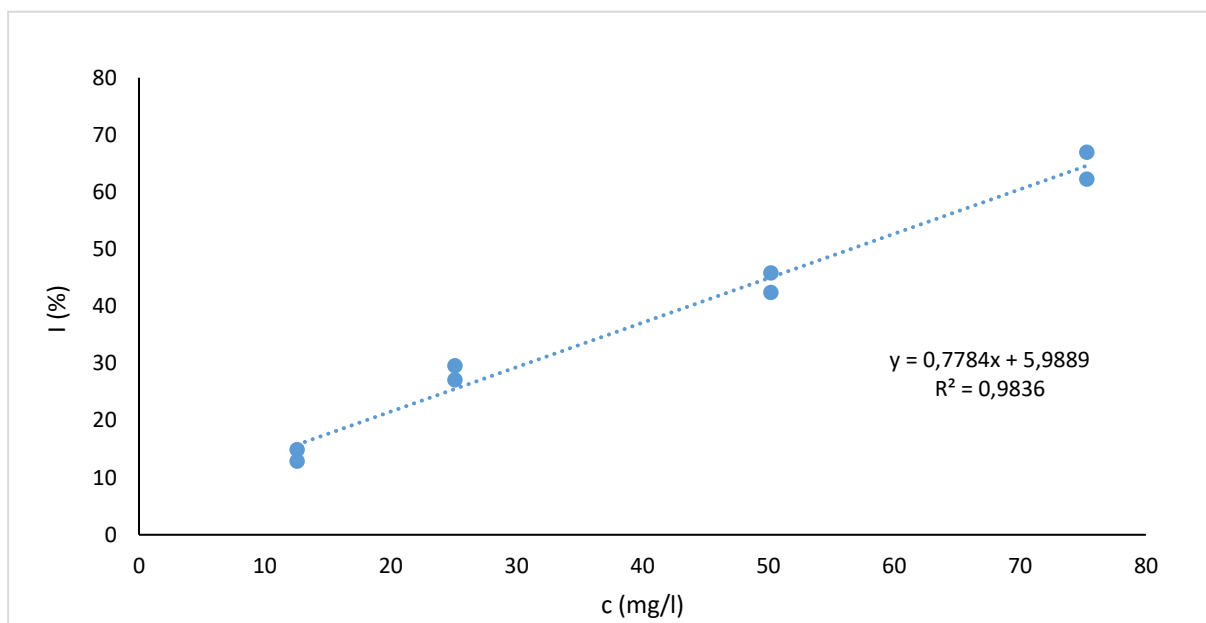
Příloha 4: Kalibrační přímka katechinu pro stanovení katechinů



Příloha 5: Kalibrační přímka Troloxu pro stanovení antioxidační aktivity s využitím DPPH



Příloha 6: Kalibrační přímka Troloxu pro stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP



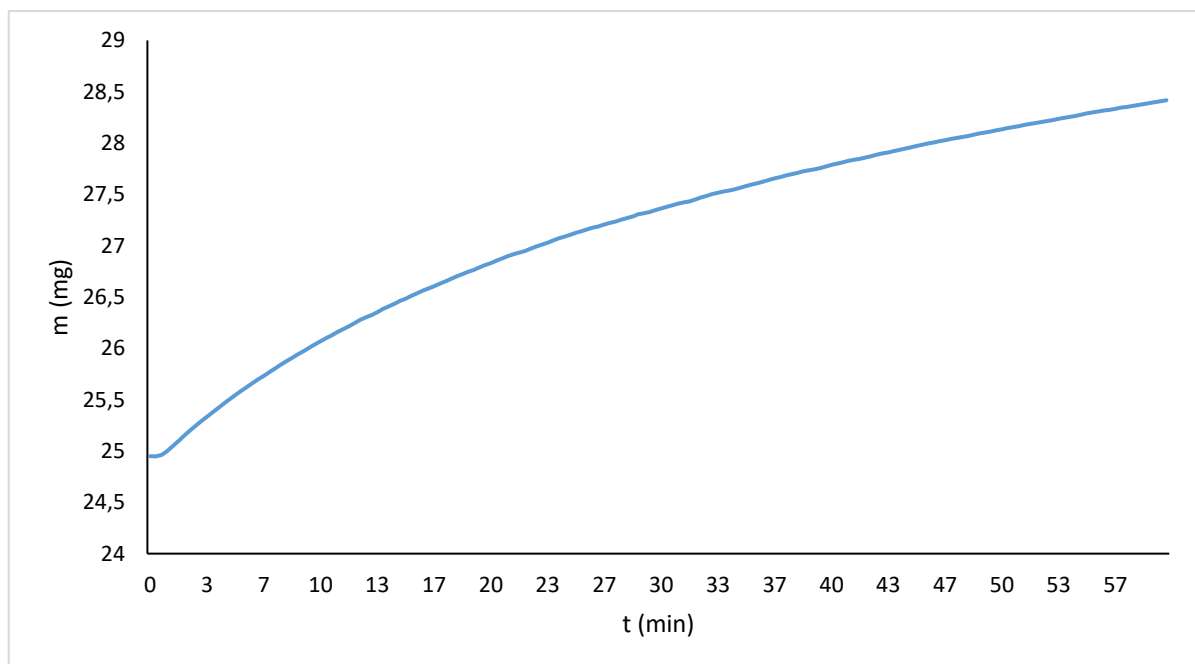
Příloha 7: Stanovení barevnosti sušených plodů rohovníku v režimu bez složky přímého odrazu (RSEX)

L*	a*	b*	C*	h°
20,94	3,41	5,97	6,88	60,32
25,12	3,44	5,66	6,63	58,74
24,85	3,49	3,45	4,91	44,7
29,60	3,97	4,62	6,09	49,34
26,84	4,13	6,62	7,80	58,06
22,82	3,73	5,46	6,61	55,62
22,93	3,85	5,64	6,83	55,65
22,95	3,04	4,37	5,32	55,19
21,72	4,50	6,01	7,51	53,17
24,67	3,13	4,19	5,23	53,26
39,87	7,38	21,46	22,69	71,01
39,07	5,85	17,98	18,91	71,97
45,61	6,35	19,80	20,79	72,22
52,48	9,71	24,85	26,68	68,65
49,73	10,31	23,56	25,71	66,36
27,43	5,55	16,57	17,47	71,49
37,72	5,94	21,49	22,29	74,54
36,69	5,18	15,65	16,49	71,68
30,97	9,13	12,99	15,88	54,89
39,36	4,85	16,97	17,64	74,05

Příloha 8: Stanovení barevnosti sušených plodů rohovníku v režimu se složkou přímého odrazu
(RSIN)

L*	a*	b*	C*	h°
49,73	10,31	23,56	25,71	66,36
23,21	3,17	4,78	5,73	56,49
25,58	3,00	3,34	4,49	48,06
20,70	3,89	4,97	6,31	51,99
22,75	3,88	5,43	6,68	54,43
22,35	2,06	6,72	7,02	72,96
22,74	3,22	4,66	5,66	55,38
24,80	3,91	4,11	5,67	46,43
27,64	4,03	6,58	7,71	58,51
24,12	2,16	3,85	4,42	60,69
27,82	4,97	5,19	7,19	46,23
54,60	6,61	24,01	24,90	74,61
38,88	5,34	19,00	19,74	74,29
43,68	5,03	19,61	20,25	75,61
42,87	7,06	18,22	19,54	68,82
47,50	4,93	18,15	18,81	74,82
40,34	9,07	24,67	26,29	69,81
54,40	9,40	24,82	26,54	69,26
42,04	8,50	16,41	18,48	62,61

Příloha 9: Stanovení rychlosti sorpce pro vzorek mletý po dobu 180 s, měřený při relativní vlhkosti vzduchu 80 %



Příloha 10: Koeficienty determinace z měření rychlosti sorpce při rozdílných relativních vlhkostech vzduchu pro různě namleté vzorky rohovníkového prášku

Prášek mletý po dobu	R^2 při relativní vlhkosti vzduchu:			
	p = 20 %	p = 40 %	p = 60 %	p = 80 %
30 s	0,9692	0,9755	0,9808	0,9952
60 s	0,9738	0,9834	0,9824	0,9941
90 s	0,9513	0,9791	0,9862	0,9947
120 s	0,9599	0,9780	0,9841	0,9950
180 s	0,9502	0,9803	0,9776	0,9962
240 s	0,9681	0,9787	0,9909	0,9980