

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2019

Eliška Štumrová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Inhibice Maillardových reakcí
Eliška Štumrová

Bakalářská práce
2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Eliška Štumrová**
Osobní číslo: **C16050**
Studijní program: **B2802 Chemie a technická chemie**
Studijní obor: **Chemie a technická chemie**
Název tématu: **Inhibice Maillardových reakcí**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Uveďte princip Maillardovy reakce, jeho využití v potravinářství (negativní i pozitivní) a vliv na zdraví člověka. Znázorněte obecnými chemickými reakcemi nebo na konkrétním příkladu.
2. S využitím bibliografických databází UPa zpracujte obecný přehled o možnostech inhibice Maillardových reakcí. Detailněji zpracujte možnosti inhibice s využitím chemických látek nebo extraktů.
3. Experimentálně zjistěte možnosti inhibice Maillardovy reakce v modelovém systému. Výsledky zpracujte a kriticky vyhodnoťte.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Konzultant bakalářské práce:

Ing. Michaela Frühbauerová

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce:

5. února 2019

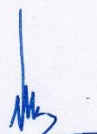
Termín odevzdání bakalářské práce:

4. července 2019



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prohlašuji:

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

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

V Pardubicích dne 1. 7. 2019

Eliška Štumrová

Poděkování

Ráda bych poděkovala doc. Ing. Liboru Červenkoví, Ph.D. za pomoc, trpělivost a připomínky v průběhu vypracování této bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala rodině za podporu a trpělivost.

Anotace

Bakalářská práce se věnuje problematice Maillardových reakcí a způsobů, jak je inhibovat. V experimentální části se zabývá inhibicí pomocí polyfenolických látek obsažených v petrželi. Jako měřicí metoda byla vybrána UV-Vis spektrofotometrie. Touto metodou byl změřen průběh reakce i celkové množství polyfenolických látek.

Klíčová slova: maillardovy reakce, polyfenoly, inhibice, UV-Vis spektrofotometrie

Title: Inhibition of Maillard reactions

Annotation

Bachelor thesis deals with the issue of Maillard reaction and their inhibition. In the experimental part, parsley extracts were used to inhibit non-enzymatic browning. UV-Vis spectrophotometry was chosen to monitor Maillard reaction and the quantity of total polyphenolic substances.

Key words: maillard reaction, polyphenols, inhibition, UV-Vis spectrophotometry

Obsah

0 ÚVOD	10
1 MAILLARDOVY REAKCE	11
1.1 MECHANISMUS MAILLARDOVÝCH REAKCÍ	12
1.1.1 Kondenzace cukru s aminem	13
1.1.2 Amadoriho přesmyl.....	13
1.1.3 Dehydratace cukrů.....	14
1.1.4 Streckerova degradace.....	15
1.1.5 Kondenzace a vznik melanoidinů.....	15
1.2 MELANOIDINY	16
2 OVLIVNĚNÍ MAILLARDOVÝCH REAKCÍ	17
2.1 VLIV TEPLoty	17
2.2 VLIV PH	17
2.3 VLIV TLAKU	18
2.4 VLIV AKTIVITY VODY	18
2.5 VLIV ČASU	18
2.6 REAKTANTY	18
2.7 PŘÍDAVEK INHIBITORŮ	19
2.7.1 Oxid siřičitý a hydrogensířičitany.....	19
2.7.2 Sirné aminokyseliny.....	19
2.7.3 Polyfenoly	19
3 ZMĚNY VLASTNOSTÍ POTRAVIN PŘI MAILLARDOVÝCH REAKCÍCH	21
3.1 ZMĚNA BARVY	21
3.2 VLIV NA AROMA.....	21
4 VÝZNAM MAILLARDOVÝCH REAKCÍ	22
4.1 PRAŽENÍ	22
4.2 VAŘENÍ, PEČENÍ A SMAŽENÍ	22
4.3 SUŠENÍ	22
5 DALŠÍ MOŽNOSTI HNĚDNUTÍ	23
5.1 KARMELIZACE	23
6 REAKTANTY VSTUPUJÍCÍ DO MAILLARDOVY REAKCE	24
6.1 LYSIN	24
6.2 GLUKOSA	24
7 UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIE	25
7.1 LAMBERTŮV-BEERŮV ZÁKON	25
7.2 MĚŘENÍ.....	26
7.3 KVANTITATIVNÍ ANALÝZA	26
7.4 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ.....	27
7.5 VYUŽITÍ	28
8 PETRŽEL	29
9 ANTIOXIDANTY	30

10 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
10.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE.....	31
10.2 POUŽITÝ SOFTWARE.....	31
10.3 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	31
10.4 PŘÍPRAVA EXTRAKTŮ.....	32
10.5 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ GLUKOSY, LYSINU A KYSELINY GALOVÉ	32
10.6 POSTUPY METOD ANALÝZ.....	33
10.6.1 Stanovení polyfenolických látek.....	33
10.6.2 Průběh Maillardových reakcí.....	34
11 VÝSLEDKY MĚŘENÍ.....	35
11.1 STANOVENÍ POLYFENOLICKÝCH LÁTEK.....	35
11.2 PRŮBĚH MAILLARDOVY REAKCE.....	36
11.2.1 Vizuelní porovnání	39
ZÁVĚR	40
POUŽITÁ LITERATURA	41

Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma neenzymatického hnědnutí podle Hodge (2).....	12
Obrázek 2: Kondenzace cukru a aminu (3).....	13
Obrázek 3: Amadotihio přesmyk (3).....	13
Obrázek 4: Enolizace ketosaminů (3).....	14
Obrázek 5: Tvorba chinonů z produktů fragmentace cukru (3).....	15
Obrázek 6: Vzorec lysinu (4).....	24
Obrázek 7: Vzorec glukopyranosy (2).....	24
Obrázek 8 Reakce bez přítomnosti extraktu v prostředí fosfátového pufru pH 7	39
Obrázek 9 Reakce s přítomností extraktu sušené petržele v prostředí fosfátového pufru pH 7	39
Obrázek 10 Reakce bez přítomnosti extraktu v prostředí 60 % roztoku ethanolu	39
Obrázek 11 Reakce s přítomností extraktu sušené petržele v prostředí 60 % roztoku ethanolu	39

Seznam tabulek

Tabulka 1 Hodnoty pro kalibrační křivku.....	35
Tabulka 2 Hodnoty pro jednotlivé extrakty.....	36
Tabulka 3 Naměřené a vypočítané hodnoty pro prostředí fosfátového pufru pH 7.....	37
Tabulka 4 Naměřené a vypočítané hodnoty pro prostředí 60 % roztoku ethanolu.....	38

Seznam grafů

Graf 1 Časová optimalizace	33
Graf 2 Kalibrační křivka na kyselinu galovou	35
Graf 3 Grafické porovnání hodnot v prostředí fosfátového pufru pH 7	37
Graf 4 Grafické porovnání hodnot v prostředí 60 % roztoku ethanolu	38

0 Úvod

S Maillardovými reakcemi se v běžném životě setkáváme neustále, ať už při pečení chleba, při vaření piva nebo při grilování masa, jejich chemický průběh je ale velmi složitý. Při Maillardových reakcích vznikají produkty zvané melanoidiny, které způsobují hnědé zbarvení. Produkty Maillardových reakcí ale nedávají potravinám jenom jejich typickou barvu, ale také chuť a vůni. Při těchto reakcích však nevznikají jenom žádané produkty, ale i nežádoucí, ba i přímo karcinogenní a mutagenní. Kvůli těmto produktům se hledají možnosti inhibice těchto reakcí, čímž se zabývá i tato bakalářská práce.

V mé bakalářské práci se dočtete, jak zhruba probíhají Maillardovy reakce, jak lze ovlivnit jejich průběh, včetně přídavku inhibujících látek, jaké látky vznikají a co tyto látky způsobují. Dále se dozvíte něco jiných způsobech hnědnutí, o UV-VIS spektrofotometrii jako použité měřící metodě, co je to petržel, co je principem antioxidačních účinků a u jakých látek je můžeme nalézt.

Jako inhibitory jsou v experimentální části této práce použity polyfenolické látky extrahované z petržele.

1 Maillardovy reakce

Hnědnutí potravin má dva hlavní mechanismy a to enzymatické a neenzymatické hnědnutí, kde neenzymatické hnědnutí dělíme na Maillardovy reakce, karamelizaci a oxidaci kyseliny askorbové (1; 2).

Maillardovy reakce jsou reakce mezi aminoskupinou, často aminokyselinou, peptidem nebo proteinem, a karbonylovou skupinou, obvykle redukujícím sacharidem jako je glukosa, fruktosa nebo laktosa. Reakce dostaly své jméno na počest Louise-Camilla Maillarda, který je poprvé popsal a to v roce 1912 (1; 2).

Maillardovy reakce jsou velmi složité, například reakce glukózy s glycinem za použití jednoduchých metod poskytuje důkaz o tvorbě více než 24 sloučenin. Pro lepší pochopení těchto reakcí vzniklo mnoho zjednodušených schémat, kde jedno z nejúspěšnějších sestavil Hodge. Hodge dělí Maillardovy reakce na 3 fáze – výchozí stav, mezistupeň a konečný stupeň (1; 2).

Konečné produkty Maillardových reakcí jsou melanoidiny, zatímco u enzymatického hnědnutí se jedná o melaniny. V praxi je však složité tyto produkty rozeznat (1).

Maillardovy reakce se vyskytují převážně v potravinách, zejména při zpracování za zvýšené teploty, jako je například pražení, pečení nebo vytlačování, či při dlouhodobém skladování. S Maillardovými reakcemi se můžeme také setkat například v textilním průmyslu (1; 2).

Maillardovy reakce probíhají také v lidském organismu, kde mohou mít negativní zdravotní důsledky, jako je například stárnutí, diabetes nebo šedý zákal (1).

1.1 Mechanismus Maillardových reakcí

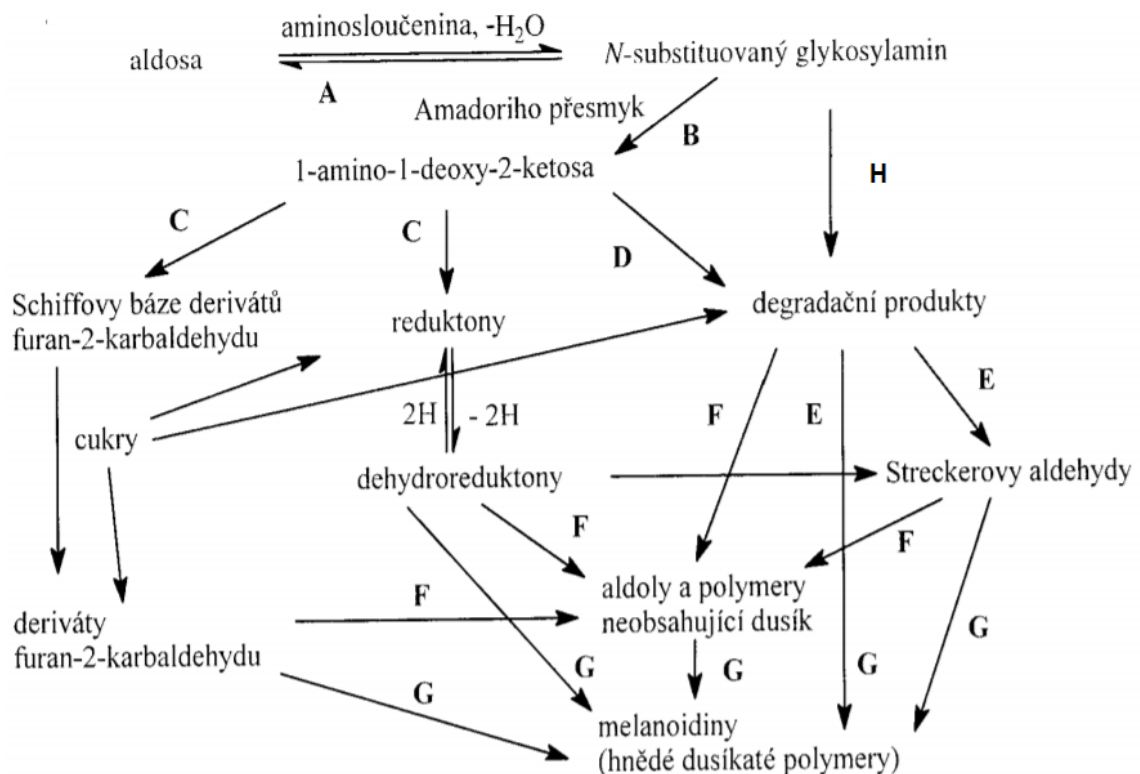
Jak již bylo zmíněno, Maillardova reakce je velmi složitá. Její mechanismus si vysvětlíme na Hodgeho schématu.

U výchozího stavu jsou produkty bezbarvé a bez absorpce UV záření. Reakce probíhající v tomto stupni jsou kondenzace cukru a aminu [A] a následné Amadoriho přeuspořádání [B] (1; 2).

V mezistupni jsou produkty bezbarvé nebo žluté se silnou absorpcí UV záření. V mezistupni probíhá dehydratace cukru [C], fragmentace cukru [D] a degradace aminokyselin (Strecker) [E] (1; 2).

Konečný stupeň se vyznačuje vysoce zbarvenými produkty, vzniklými aldolovou kondenzační reakcí [F], kondenzací aldehydu a aminu a tvorbou heterocyklických sloučenin dusíku [G] (1; 2).

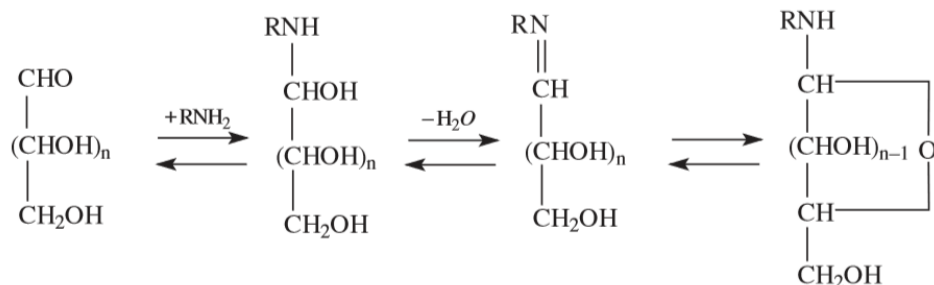
Ve schématu jsou jednotlivé reakce naznačeny písmeny, které jsou v textu uvedeny v hranatých závorkách (Obrázek 1).



Obrázek 1: Schéma neenzymatického hnědnutí podle Hodge (2)

1.1.1 Kondenzace cukru s aminem

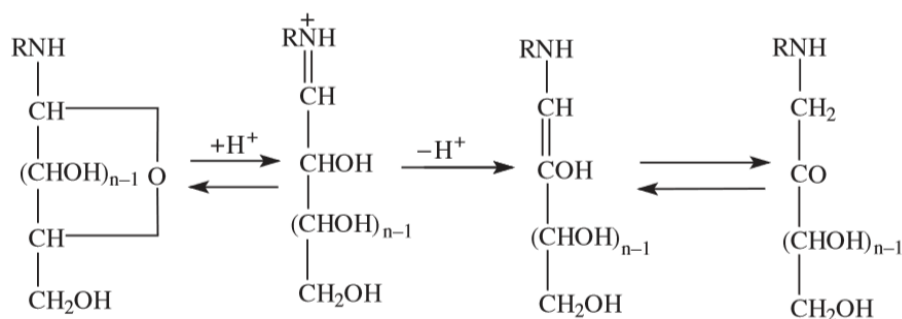
Reakce kondenzace cukru a aminu je ve všech krocích reverzibilní. Reakcí aldosa v aldehydové formě s aminem vzniká karbinolamin, jehož dehydratací získáme Schiffovu bázi (imin), ze které vznikne N-substituovaný glykosylamin nebo popřípadě diglykosylamin. Reakce je zobrazena na obrázku 2 (2; 3).



Obrázek 2: Kondenzace cukru a aminu (3)

1.1.2 Amadoriho přesmyk

Amadoriho přesmyk (obrázek 3), neboli isomerace glykosylaminů na aminocukry. Celkový děj není reverzibilní a reakce probíhá spontánně i při 25°C. Glykosylaminy odvozené od aromatických aminů jsou stále, na rozdíl od odvozených od alifatických aminů, které podléhají dalším reakcím. U Amadoriho přesmyku z glykosylaminu za kyselé katalýzy vzniká Schiffova báze (kation), ze které po odtržení protonu vzniká enol forma a z ní ketosamin (1-amino-1-deoxy-ketosa). Jako katalyzátor působí reagující aminokyselina, která poskytuje potřebný proton ze své karboxylové skupiny. Amadoriho přesmyk je typický pro aldosa, pro ketosa je to velmi podobný Heynsův přesmyk, jehož produktem je 2-amino-2-deoxyaldosa (2; 3).



Obrázek 3: Amadoriho přesmyk (3)

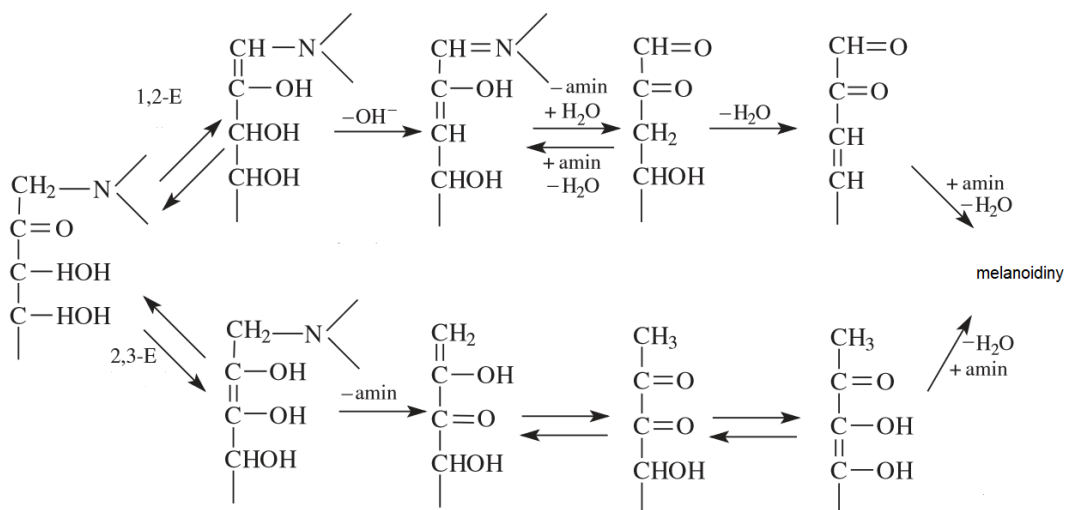
1.1.3 Dehydratace cukrů

Dehydratace cukru může probíhat dvěma způsoby (obrázek 4), a to buď 1,2-enolizací pomocí 3-deoxy-1,2-dikarbonylů (horní část schématu) nebo 2,3-enolizací pomocí 1-deoxy-2,3-dikarbonylů (spodní část schématu) (2; 3).

Za kyselých podmínek probíhá 1,2-enolizace a vznikají tak furfuraly. Produkt Amadoriho přesmyku dehydratuje rychleji než původní aldosa. Tvorba furfuralu je často používána jako relativně jednoduchý způsob sledování poškození potravin během skladování. Při této reakci nejdříve z ketosaminu vzniká enaminol, ze kterého se na C₃ eliminuje hydroxylová skupina. Vázaná aminoskupina podléhá hydrolyze. Následně vznikají další produkty (2; 3).

V alkalických a neutrálních podmínkách poté probíhá 2,3-enolizace, jejíž produkt jsou reduktony. Na rozdíl od tvorby furfuralů nepřichází cukr o tři molekuly vody, ale pouze o dvě. Pro reduktony je typické, že mají endiolovou skupinu v sousedství karbonylové sloučeniny. Při 2,3-enolizaci vzniká nejdříve endiol a poté další produkty (2; 3).

Další probíhající reakcí je fragmentace cukru. Ta je v zásadě akceptována jako retroaldolizace, i když s předpokladem, že hraje roli také oxidační štěpení (3).



Obrázek 4: Enolizace ketosaminů (3)

1.1.4 Streckerova degradace

Streckerova degradace α -aminokyselin (obrázek 1, reakce E) je oxidace aminokyselin pomocí oxidačních činidel. Při této reakce vzniká karbonylová sloučenina o jeden atom C kratší než výchozí aminokyselina, amoniak a oxid uhličitý. Studie ukázaly, že více než 80 % oxidu uhličitého uvolněno v Maillardově reakci pochází z aminokyselin. Mechanismus je různý pro různá oxidační činidla a různé aminokyseliny (3; 4).

Aktivními látkami mohou být například nenasycené aldehydy a ketony, hydroperoxydy mastných kyselin, aldosy a ketosy, kyselina pyrohroznová, benzochinony nebo vitamín K (4).

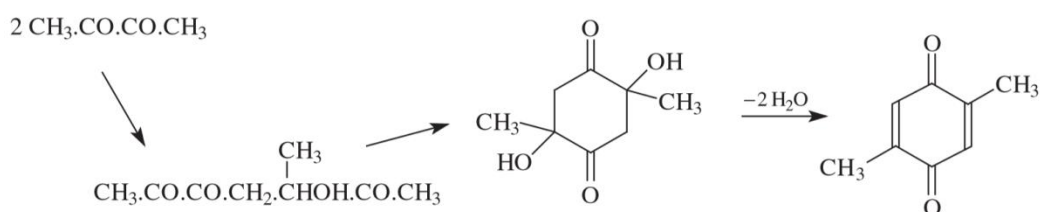
Jako oxidační činidla se v potravinářství používají spíše organické sloučeniny obsahující elektronegativní funkční skupiny (4).

Aldehyd vytvořený ze Steckerovy degradace se poté může podílet na aldolové kondenzaci vedoucí k polymerům neobsahujícím dusík. Na druhé straně může tento aldehyd reagovat s aminosloučeninami za vzniku melanoidinů prostřednictvím aldiminů (3).

Vzniklé aldehydy jsou často těkavé a jsou také důležité vonné látky řady potravin. Mohou také reagovat s meziprodukty Maillardových reakcí odvozenými od cukru (3; 4).

1.1.5 Kondenzace a vznik melanoidinů

Aldehydy mohou vznikat reakcemi C, D a E, které pak mohou spolu reagovat aldolovou kondenzací. Na kondenzaci se mohou podílet i další karbonylové sloučeniny odvozené od oxidací lipidů. Jako příklad je zde uvedena reakce tvorby chinonů z produktů fragmentace cukru (obrázek 5) (3).



Obrázek 5: Tvorba chinonů z produktů fragmentace cukru (3)

Poslední probíhající reakcí vznikají melanoidiny. Melanoidiny vznikají reakcí aldehydů, zejména α , β -nenasycených, s aminy, a to při nízkých teplotách (2; 3).

1.2 Melanoidiny

Melanoidiny jsou polymerní látky s vysokou molekulovou hmotností. Jejich struktura není známá, ale ukázalo se, že jsou přítomny heterocyklické kruhové systémy, jako jsou pyridiny, pyraziny, pyrroly a imidazoly. Konstituce melanoidinů se poněkud liší v závislosti na tom, jak byly vyrobeny (2; 3).

V melanoidinech jsou přítomny stabilní volné radikály, které vznikly v první fázi Maillardovy reakce. Tyto radikály jsou detekovány před Amadoriho sloučeninou, a to vede k závěru, že je objevena nová cesta pro fragmentaci cukru a tím i pro zhnědnutí. Radikální tvorba roste s časem a teplotou, probíhající paralelně s intenzitou barev (2; 3).

Některé melanoidiny mají antioxidační vlastnosti, například produkty vzniklé z amoniaku a D-xylozy zvyšují antioxidační účinky některých tokoferolů. Značnou antioxidační aktivitu vykazují například produkty reakcí hexos a pentos, nejvíce však produkty reakcí degradačních produktů cukrů či dehydroaskorbové kyseliny. Velkou roli v antioxidačních účincích hrají reakční podmínky. S rostoucím pH prostředí a hmotnostním poměrem aminosloučenina/cukr roste také antioxidační aktivita (2).

2 Ovlivnění Maillardových reakcí

Maillardovy reakce se dají ovlivnit mnoha aspekty, například pH, teplotou, tlakem a dalšími. Při ovlivňování je snaha především o potlačení nežádoucích a zvýraznění žádoucích projevů. Optimalizace Maillardových reakcí je velmi složitá, a to nejen proto, že jsou dané reakce velmi složité, ale i proto, že se jednotlivé faktory ovlivňující reakci navzájem také ovlivňují. Volba způsobů inhibice závisí na konkrétní potravíně a technologii jejího zpracování (2).

2.1 Vliv teploty

S rostoucí teplotou roste podíl vysokomolekulárního materiálu. Ztráta materiálu (pravděpodobně oxidu uhličitého a vody) je s rostoucí teplotou vyšší (3).

Vliv teploty se vyjadřuje jako aktivační energie reakce. Čím vyšší je aktivační energie, tím více je reakční rychlost na teplotě závislá. Teplota má vliv i na reakční mechanismus reakce, tedy na výsledný produkt, a to především u aromatických látek (2).

Nejdůležitější teplota je 10 °C, pod kterou většina potravin při běžném skladování nezhnědne (5).

2.2 Vliv pH

Reaktivitu karbonylové skupiny zvyšuje její protonizace, zatímco u aminokyseliny protonizace reaktivitu snižuje (2).

Aktivační energie je závislá na hodnotě pH. S klesající hodnotou pH roste aktivační energie tvorby pigmentů v systému lysin/glukosa (2).

Jako důsledek vzniku karboxylových kyselin provází reakci pokles hodnoty pH. Rychlost Maillardovy reakce však roste s rostoucí hodnotou pH. Tvorba hnědého zbarvení dosahuje maxima při pH 9-10 (2; 6).

Hodnota pH ovlivňuje také jak kvalitativní, tak kvantitativní složení produktů. Například při rozkladu ketosaminů, kde pH ovlivňuje, jestli proběhne 1,2- nebo 2,3-enolizace. Jak již bylo uvedeno výše, nízké pH podporuje 1,2-enolizaci a vysoké pH naopak 2,3-enolizaci (2; 7).

2.3 Vliv tlaku

Vysoký tlak zvýší rychlost reakce tam, kde je počet molekul snížen. Vysoký tlak tedy podporuje adici, ale odrazuje od tvorby malých molekul. Dochází k urychlení tvorby iminu, ale zpomalení Amadoriho přesmyku a rozkladu aminoketos. Reakci glycerinaldehydu s aminokyselinami vysoký tlak slabě potlačuje. Dochází také k významnému potlačení hnědnutí. Význam vysokého tlaku pro inhibice Maillardových reakcí závisí na výchozích látkách (7).

2.4 Vliv aktivity vody

Aktivační energie je závislá také na aktivitě vody. Aktivační energie Amadoriho sloučenin v oblasti nízkých aktivit vody prudce roste, ale pro vyšší hodnoty aktivit vody je aktivační energie téměř nezávislá (2).

Tvorba hnědého zbarvení je závislá na aktivitě vody. Při vysokých hodnotách aktivity vody je reakční rychlost velmi nízká v důsledku zředění reaktantů. Reakční rychlost je největší v oblasti středních hodnot aktivity vody, což je zhruba 0,3-0,7. Při hodnotách menších než 0,3 a vyšších než 0,7 a_w dochází k poklesu rychlosti reakce a může dojít až k zastavení reakce (2; 5).

2.5 Vliv času

S rostoucím časem jsou produkty Maillardových reakcí tmavší. S časem melanoidiny získávají více nenasycené uhlíky a více celkového karbonylu a uhlíku. Dále také zvyšují pyrrolové skupiny a pravděpodobně neobsahují N-H vazby (3).

2.6 Reaktanty

Reaktivita karbonylových sloučenin klesá aldosity > ketosy, případně triosy > tetrosy > pentosy > hexosy > disacharidy. Dále reaktivita klesá α -dikarbonylové sloučeniny > aldehydy > ketony > sacharidy > oxokyseliny (2; 7).

Reaktivita aminokyselin souvisí s jejich bazicitou, klesá tedy amoniak > aminy > aminokyseliny, u kterých je reaktivita 6-aminokyseliny > 3-aminokyseliny > 2-aminokyseliny (2; 7).

U reaktantů závisí i na dispozici k vytváření barevných nebo aromatických látek. Velmi intenzivní zbarvení poskytuje například lysin společně s glycinem s cukry, malý příspěvek k hnědnutí poskytují kyselé a sirmé aminokyseliny či hydroxyaminokyseliny (2).

2.7 Příkladavek inhibitorů

2.7.1 Oxid siřičitý a hydrogensiřičitany

K inhibici zde dochází v důsledku adice hydrogensiřičitanu na karbonylovou skupinu sacharidu a tím se daná skupina zablokuje. Účinnost inhibice hydrogensiřičitany souvisí s tím, že dokáže reagovat s meziprodukty vznikajícími ve všech stádiích Maillardovy reakce. U oxidu siřičitého je výhodou též funkce konzervačního činidla nebo antioxidantu. Se zvyšující se koncentrací oxidu siřičitého se zvyšuje časové zpoždění před začátkem hnědnutí, jakmile hnědnutí začne, už není zpomaleno. Siřičitany inhibují ve velmi raném stádiu, kde blokují radikálové prekurzory (2; 5).

2.7.2 Sirné aminokyseliny

Dalším možným inhibitorem jsou sirné aminokyseliny, například cysteinu. Nevýhoda je však degradace sirných aminokyselin na sensoricky aktivní látky, a proto je tato inhibice možná pouze ve výjimečných případech (2).

2.7.3 Polyfenoly

Polyfenoly se v přírodě vyskytují hlavně v rostlinách, konkrétně v jejich kůře, dřevě, listech, plodech či kořenech. Jedná se o amorfnní fenolické látky s mnoha společnými vlastnostmi, jako například srážení roztoků želatiny, s železitými solemi tvoří tmavé sraženiny nebo že se v alkalickém prostředí oxidují. Často jsou smyslově nevýrazné, některé však dodávají rostlinám zbarvení či chuť jejich plodům (8; 9).

Nejrozšířenější skupina polyfenolů jsou flavonoidy, které se dále dělí na chalkony, flavanoidy, flavonoly a anthokyanidiny. Flavonoidy se skládají ze dvou benzenových jader spojených tříuhlíkatým řetězcem a jejich struktura je odvozena od heterocyklického flavanu (8; 9).

Polyfenoly jsou považovány za antioxidanty. Antioxidační vlastnosti působí dvěma mechanismy, jako lapače volných radikálů a jako inhibitory aktivity lipoxygenas. Jako konkrétní příklad lze uvést likvidaci hydroxylových radikálů. Aktivita polyfenolů roste s počtem hydroxylových skupin na aromatickém kruhu. Antioxidační vlastnosti polyfenolů lze využít i při zachytávání volných radikálů v krvi, kde se tímto eliminují jejich nežádoucí účinky (8).

Polyfenoly jsou významné i v potravinářském průmyslu, kde mohou ovlivňovat chuť nebo vůni potravin. Polyfenolické látky se mohou vázat na bílkoviny (9).

Při Maillardových reakcích mohou potlačovat glykaci. Například diosmin či 3',5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavon snižují tvorbu glykovaného kolagenu a malondialdehydu (10).

3 Změny vlastností potravin při Maillardových reakcích

3.1 Změna barvy

Hlavní charakteristika Maillardových reakcí je tvorba barev, neboli hnědnutí. Měření vyrobených barviv provádíme pomocí odečítání absorbance při vlnové délce 420nm nebo 360nm (11).

V průběhu Maillardových reakcí vzniká mnoho zbarvených produktů, jejichž zbarvení je žluté, oranžové, červené či hnědé. Intenzita zbarvení se u daných produktů liší. Dále uvedu několik příkladů vzniklých produktů. Kondenzací aldehydů se získávají produkty zbarvené žlutě až červeně. Dimethylacetal 2-oxopropanalu vede k tvorbě žlutého derivátu. Amadoriho sloučenina z glukosy a piperidinu dává při zahřívání s furfurem žlutou barvu. Dále glukosa s butylaminacetátem poskytuje žlutooranžové zbarvení. Oranžové zbarvení poskytuje methanolická xylóza s diethylamoniumacetátem. V ethanolu poskytuje glukosa s piperidinem též oranžové zbarvení (11).

3.2 Vliv na aroma

Aroma je součinnost chuťových a čichových vjemů, proto je nutný důraz na těkavé sloučeniny vznikající v Maillardových reakcích. Mezi tyto látky řadíme furany, karbonyl, kyseliny a aldehydy vzniklé při Streckerově degradaci. Aroma závisí na přítomných látkách, například pro aroma karamelu je nutná přítomnost alifatických aminokyselin, pro pečené brambory jsou to aminokyseliny obsahující síru a pro pražené zeleninové aroma jsou to alifatické a bazické nebo amidové aminokyseliny (12).

Jako látky izolované při Maillardových reakcích, které způsobují hořkou chuť, řadíme například 2,3,6,7-tetrahydrocyklopent(b)azepin-8(1H)-on. Prahovou hodnotu hořkosti zvyšuje například zavedení methylových skupin do furylových kruhů a snižuje například odstranění již zmíněných furylových kruhů. Nedávno byla prokázána také přítomnost mentholu, který patří mezi tzv. „chladící sloučeniny“ (12).

4 Význam Maillardových reakcí

Maillardovy reakce jsou velmi významné hlavně v potravinářském průmyslu. Pomocí Maillardových reakcí se mění některé vlastnosti potravin, jako je chuť, barva nebo vůně, což jsou změny chtěné i nechtěné. K nechtěným změnám patří netypická chuť či zbarvení například u sušeného ovoce, a hlavně snížení nutriční hodnoty (2).

Nutriční hodnota se snižuje reakcemi aminokyselin s cukry. Ke snižování nutriční hodnoty během Maillardových reakcí dochází, zejména pokud jsou tepelně namáhané potraviny s nízkým obsahem vody, jako je pečení chleba nebo sušení mléka (2).

Produkty Maillardových reakcí mohou být i toxické s karcinogenními či mutagenními účinky. Vzniklé mutageny dělíme na 2 skupiny non-IQ mutageny a IQ mutageny. Mezi non-IQ mutageny patří například pyridoimidazoly a pyridoindoly, které vznikají například při grilování masa. U druhé skupiny nejsou zcela objasněny mechanismy vzniku, ale víme, že pro jejich vznik je důležitý kolagen, který se nachází v mase ryb a teplokrevných živočichů (2).

4.1 Pražení

Při pražení dochází k Maillardovým reakcím, a tím i ke změně barvy (hnědnutí), chuti nebo vůně. Při pražení kávy při nízké teplotě dochází pomaleji k rozkladu sacharidu a vzniklá káva je světlejší, oproti tomu při pražení při vysoké teplotě se sacharidy rozkládají rychleji a produkt je tedy tmavší, a navíc s nakyslou chutí (2).

4.2 Vaření, pečení a smažení

I zde, stejně jako u pražení, jsou Maillardovy reakce žádoucí. Maillardovy reakce mají však i negativní účinky jako například snížení nutriční hodnoty, tvorbu mutagenů a další. U těchto činností však stále převažují jejich pozitivní následky jako aroma při pečení masa či křupavá kůrka při pečení chleba (2).

4.3 Sušení

Sušení je příkladem, kdy jsou Maillardovy reakce nežádoucí. Do této kategorie nepatří pouze sušení za vyšší teploty, ale také při dlouhodobém skladování. Míra nežádoucích účinků závisí na technologii sušení nebo na prostředí uskladnění. U mléka dochází v důsledku Maillardových reakcí ke snižování obsahu lysinu a částečně i laktosy. Dalšími příklady jsou sušení či skladování ovoce nebo zeleniny (2).

5 Další možnosti hnědnutí

5.1 Karamelizace

Při karamelizaci cukrů vzniká karamel, což je hnědý až hnědočerný amorfni produkt různého složení (2).

Karamelizace je teoreticky reakce hnědnutí procházející cukrem při zahřívání v nepřítomnosti aminosloučeniny. Pro tuto reakci je potřebná teplota vyšší než 120 °C, nejčastěji je to 150–190 °C. Maximální možná teplota je 240 °C. Další možností je také přidavek katalyzátoru (2; 11; 13).

Karamely se vyrábějí zahříváním jedlých cukrů a tvoří 4 třídy. Třída I obsahuje hydroxid sodný, třída II obsahuje hydroxid sodný a oxid siřičitý, třída III obsahuje amoniak a třída IV obsahuje amoniak a oxid siřičitý. Karamely třídy III a IV jsou blízké melanoidinům (11).

Jako výchozí surovina pro výrobu karamelu se používá glukosa, fruktosa nebo škrob. Výroba probíhá vsádkovým způsobem při teplotě 120-180 °C a při přítomnosti katalyzátoru. Celý proces trvá 5-10 hodin. Katalyzátor je vybírán v závislosti na dalším použití karamelu (2).

Rozlišujeme 3 druhy karamelů – karamely s kladným elektrickým nábojem (přidavek amoniaku), karamely se záporným elektrickým potenciálem (přidavek siřičitanu nebo síranu amonného) a karamely bez elektrického potenciálu (přidavek hydroxidu sodného) (2).

Karamely se používají k barvení alkoholických i nealkoholických nápojů, produktů z masného, cukrářského či pekařského průmyslu (2; 11).

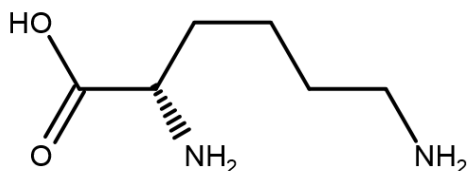
Jelikož jsou reakce probíhající při karamelizaci obdobné jako u Maillardových reakcí, jsou některé produkty karamelizace shodné s látkami vznikajícími při Maillardových reakcích. Tyto látky jsou pak důležité pro reakce vedoucí ke vzniku hnědého zbarvení (2; 13).

6 Reaktanty vstupující do Maillardovy reakce

Jako reaktanty pro Maillardovy reakce lze použít nepřeberné množství aminokyselin a cukrů. V této kapitole se budeme věnovat reaktantům použitým v experimentální části této bakalářské práce.

6.1 Lysin

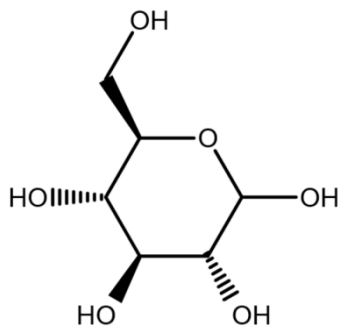
Lysin (obrázek 6), neboli 2,6-diaminohexanová kyselina, patří mezi aminokyseliny s bazickými funkčními skupinami v postranním řetězci, což znamená, že jeho postranní řetězec má v neutrálním prostředí kladný náboj. Lysin se řadí do esenciálních aminokyselin, což znamená, že si ho tělo neumí vytvořit samo, a proto musí být přijat z potravy. Lysin se vyskytuje například v parmezánu nebo v mase, a to v hovězím, vepřovém i rybím (například tuňák) (4).



Obrázek 6: Vzorec lysinu (4)

6.2 Glukosa

Glukosa (obrázek 7) patří mezi monosacharidy, přesněji aldohexosa. Glukosa (hroznový cukr) spolu s fruktosou (ovocný cukr) je hlavním monosacharidem většiny potravin. S glukosou se můžeme setkat například v mléce a mléčných výrobcích, ve vejcích nebo v ovoci a zelenině. Glukosa je také jednou z hlavních stavebních jednotek většiny oligosacharidů a polysacharidů (2).



Obrázek 7: Vzorec glukopyranosy (2)

7 UV-VIS spektrofotometrie

Spektrofotometrii v ultrafialové a viditelné oblasti světla řadíme jako nejstarší fyzikálně-chemickou metodu. Řadí se mezi optické metody, což jsou metody založené na interakci elektromagnetického záření a hmoty. Jelikož při absorpci UV a viditelného záření excituje elektronový systém, přesněji valenční elektrony, nazývá se tento obor také „Oblast elektronových spekter“ (14).

Elektromagnetické záření dělí podle vlnové délky do několika spekter. Pro tuto spektroskopickou metodu, jak už název napovídá, využíváme ultrafialové záření, které odpovídá vlnové délce 10 až 400 nm a viditelné záření, které odpovídá vlnové délce 400 až 760 nm. Pro UV-Vis spektrofotometrii však používáme rozsah vlnových délek 10 až 1000 nm, protože sem spadá ještě oblast 760 až 1000 nm, která je pro infračervenou spektroskopii nevýznamná (14; 15).

7.1 Lambertův-Beerův zákon

Tento zákon vyjadřuje vztah mezi absorbovaným zářením, koncentrací absorbujícího prostředí a jeho tloušťkou. Absorbance je rovna tloušťce absorbující vrstvy násobené koncentrací absorbujících složek a molárním absorpčním koeficientem. Pokud je absorbujících složek více, je celková absorbance dána součtem dílčích absorbancí (14; 15).

K odchýlkám od platnosti zákona dochází, pokud se veškerá zářivá energie, která se absorbuje, nepřemění na tepelnou, ale uvolňuje se současně i fluorescenční záření. Další možnost odchylky je při měření vzorku obsahujícího koloidní částice (14).

Platnost Lambertova-Beerova zákona se ověřuje graficky, vynesáním závislosti absorbance na koncentraci vzorku při konstantní tloušťce absorbující vrstvy. Pokud zákon platí, je daná závislost lineární, jedná se tedy o kalibrační křivku. Pokud je přítomna pouze jedna absorbující látka, prochází tato přímka počátkem, při přítomnosti dalších látek je hodnota na ose y posunuta o A_0 , což je absorbance prostředí (14; 15).

Množství absorbovaného záření nezávisí pouze na koncentraci a tloušťce absorpční vrstvy, ale také na teplotě, kde s rostoucí teplotou roste množství absorbovaného záření. Tento fakt je nutný zohlednit u měření, kde se teplota nesmí vychýlit o více než 1 °C, aby nedocházelo k nepřesnostem v měření (14).

7.2 Měření

Při měření je nutné konstantní pH a výsledná grafická závislost je poté závislost absorbance na koncentraci činidla. Pro udržení konstantního pH se používají tlumivé roztoky, tzv. pufry. Jsou to směsi kyselin, zásad a solí, které se používají k dosažení požadovaného pH a k udržování stálého pH (14).

Při spektrofotometrickém měření se dají používat nejen čiré roztoky, ale i roztoky, které byly původně zbarvené. Pro tyto roztoky se používá měření se slepým vzorkem. Takto se postupuje také například u reakcí probíhajících za vyšších teplot, kdy se za slepý vzorek považuje roztok připravený za laboratorní teploty (14; 15).

Měření mohou komplikovat látky, které také absorbují danou vlnovou délku. Při těchto měřeních se používají tzv. maskovací činidla. Jedná se o komplexotvorné látky, které váží do komplexu nechtěné látky. Zároveň tyto látky nesmí ovlivňovat samotné měření, například nesmí absorbovat záření. Jako maskovací činidla se používají například chelaton 3 nebo kyselina vinná (14).

Další možnost, jak odstranit nežádoucí vliv přítomných prvků je předběžná separace. Používá se například chromatografie, extrakce, destilace nebo spolusrážení (14).

Měření se provádí nejčastěji ve vodném prostředí, dá se však provést i v prostředí organického rozpouštědla jako je ethanol či dithiol (14).

Hledanou látku můžeme měřit přímo, měříme tedy záření, které absorbuje, nebo nepřímo tak, že měříme absorbanci látky, kterou námi hledaná látka odbarvuje (14).

7.3 Kvantitativní analýza

Pro kvantitativní analýzu vzorku se nejčastěji používá kalibrační křivka. Kalibrační křivka je grafická závislost absorbance na koncentraci absorbující látky, kdy se používají stejné podmínky, jako pro měření neznámého vzorku, tedy stejné pH, teplota, přístroj, laborant a další. Množství hledané látky v neznámém vzorku se vypočítá z regresní rovnice kalibrační křivky (14).

Další možností je metoda přídatku, kde se nejdříve změří neznámý vzorek a poté se změří znovu se známým objemem roztoku o známé koncentraci určité látky. Je možné použít metodu vícenásobného standardního přídatku, kde se vytváří grafická závislost absorbance na koncentraci určité látky v celkovém měřeném objemu (14).

Přístroje neměří pouze při jedné vlnové délce, ale může měřit při více najednou. Pro určení složení směsi se použije tolik vlnových délek, kolik látek chceme kvantitativně

stanovit. Pro výpočty poté použijeme soustavy rovnic, kde každé vlnové délce odpovídá jedna rovnice. Pro vzorek se dvěma látkami hledáme vlnové délky, kde je největší rozdíl absorpencí jednotlivých složek, aby bylo měření co nejpřesnější (14; 16).

7.4 Přístroje a zařízení

Pro měření při UV-Vis spektrofotometrii se používají přístroje zvané fotometry či spektrofotometry. Při měření se zaznamenává, jak se mění zářivý tok při průchodu absorbujícím prostředím. Fotometry se vyznačují tím, že mají monochromatické záření vymezované filtry, naproti tomu spektrometry používají k monochromatizaci záření hranoly nebo mřížky (14).

Jedná se o měřicí systém obsahující zdroj zářivé energie, monochromátor, kyvety se vzorkem, čidla a měrné indikátory absorpce. Pro lepší vedení zářivého toku obsahují přístroje ještě pomocnou optiku, kam patří čočky, clony, zrcadla nebo odrazové hranoly. Používá se jednopaprskový nebo dvoupaprskový systém. U jednopaprskového systému se nejdříve přístroj kalibruje, například na čisté rozpouštědlo nebo destilovanou vodu, kde dostaneme hodnotu 0. Následující měření se poté vztahují k dané hodnotě (14; 15).

U dvoupaprskového systému se monochromatické záření rozděluje na dva paprsky. Používají se zde tedy dvě kyvety, kde každou prochází jeden paprsek. V jedné kyvetě je srovnávací roztok a v druhé náš vzorek. I v tomto případě se provádí kalibrace, kdy v obou kyvetách máme srovnávací roztok. Poměr zářivých toků z jednotlivých kyvet může vyhodnocovat jeden společný nebo dva samostatné indikátory záření (14; 15).

Jako zdroj záření se používá nejčastěji vodíková nebo deuteriová výbojka, kde deuteriové spojitě záření má oproti vodíkovému dvojnásobnou až trojnásobnou intenzitu (14; 15).

Jako monochromátory se používají lámavé hranoly nebo mřížky, které se kombinují s odrazovými zrcadly. Spojité záření je rozloženo ohybem nebo lomem světla. Monochromatické záření s požadovanou vlnovou délkou se od ostatních odděluje štěrbinou. Je možno použít také dvojitý monochromátor, který se skládá ze dvou hranolů nebo dvou mřížek, případně z kombinace hranolu a mřížky. Dvojitý monochromátor poskytuje velmi monochromatické záření. U fotometrů se místo monochromátorů používají filtry, které vymezují co nejužší pás monochromatického záření, nejsou však tak účinné jako monochromátory (14; 15).

Kyvety se nejčastěji používají hranaté s neměnnou tloušťkou vrstvy, vyrobené ze skla. Výjimka je UV záření, pro které se používají křemenné kyvety (14; 15).

Většina čidel používaných při UV-Vis spektrofotometrii je založena na principu fotoelektrického jevu a jsou to například fotonky nebo fotoelektrické násobiče. Pro UV záření se používá modrá fotonka, pro viditelné záření se používá červená fotonka (cesiová) (14; 15).

7.5 Využití

V praxi se tato metoda využívá hojně pro svou jednoduchost. Pomocí této metody není vhodné stanovovat alkalické kovy a kovy alkalických zemin, je vhodná pro stanovení ostatních kovů a nekovů, stanovení organických látek, a dokonce i pro určování čistoty vody či kontrolu výrobních procesů. UV-Vis spektrofotometrie se využívá ve výzkumech v anorganické a fyzikální chemii nebo v biochemii (14).

Pro stanovování prvků je mnoho metod, kterými se dají stanovit nejen prvky jako takové, ale i prvky ve formě kationtů, aniontů nebo komplexů. Jako činidla se používají různé anorganické, a hlavně organické látky. Do první skupiny činidel patří kyseliny, nejčastěji tvořící komplexní anionty, které prohlubují zbarvení původního iontu. Podobné chování mají i činidla druhé a třetí skupiny, kde vznikají aminové nebo kyanidové komplexy. Často se stanovují prvky na základě jejich vlastního zbarvení, jako například stanovení manganu ve formě fialového manganistanu. Z organických látek se jako činidla často používá dithizon, azobarviva nebo Chelaton 3 (14; 15).

U stanovení organických látek se také používají činidla tvořící s látkou barevné produkty. Opět se více využívá organických než anorganických činidel. Z anorganických látek je typickým činidlem Nesslerovo činidlo, neboli jodortuňatan draselný, Millonovo činidlo, neboli roztok kovové rtuti v koncentrované kyselině dusičné, či Folin-Ciocalteuovo činidlo (kyselina molybdáto-wolframáto-fosforečná). Z organických činidel jsou významná barviva, fenoly či kyselina salicylová a sulfosalicylová (14).

8 Petržel

Petržel patří mezi dvouleté rostliny, dvouletá se však pěstuje pouze pro semena, pro potravinářské a jiné účely se sklízí již po roce. Pro petržel jsou typické 2x až 3x členěné až složené listy a větvená lodyha. Květy petržele jsou zelenobílé a mohou být oboupohlavní nebo pouze samčí. Petržel původně pochází z Evropy, přesněji z okolí středozemního moře (17).

Petržel se pěstuje ve dvou modifikacích, a to buď jako listová petržel, pěstovaná hlavně pro bohatě členěné listy, a kořenová petržel, pěstovaná pro ztloustlý a dužnatý kořen. Pro kořenovou zeleninu jsou typické podzemní jedlé bulvy, vzniklé přeměnou kořene, jako například u mrkve, petržele nebo řepy, ze základu listu jako u cibule nebo ze stonkových hlíz, což je příklad brambor (18).

Petržel obecná pro své pěstování nepotřebuje žádné zvláštní klima, vyžaduje vlhkou a hlubokou půdu bohatou na humus. Petržel je pěstována pro aromatické listy a pro kořen, kde oboje se používá jak v potravinářství, tak i jako léčivka (17).

Petržel obsahuje glykosid apiin a silice obsahující apiol či myristicin. V listech nalezneme mnoho vitamínu C, dokonce je v petrželi čtyřikrát více vitamínu C než v pomeranči. Jako další vitamíny nalezneme v petrželi A, B1, B2, B3, B6, E nebo kyselinu listovou. Mimo vitamínů obsahuje petržel i minerální látky, například vápník, fosfor, draslík a hořčík. Hlavním zdrojem provitamínu A je nať, kde nalezneme čtyřikrát více provitamínu A, než potřebuje lidský organismus. Flavonoidy a silice jsou obsaženy v kořeni, ale také mnohem více v semenech. V petrželi je i velké množství chlorofylu (17; 19).

V lékařství se dá petržel použít k léčbě mnoha chorob, jako například močových kamenů, střevních parazitů či revmatismu. Petržel také zlepšuje trávení, snižuje krevní tlak a posiluje zrak. Ve velkých množstvích může dojít k podráždění ledvin či poškození sliznice trávicího traktu (19).

9 Antioxidanty

Antioxidanty jsou látky používané k neutralizaci nadměrného množství volných radikálů, které by v lidském těle mohly způsobit urychlení stárnutí buněk či poškození genetického vybavení buňky. Tělo si dokáže antioxidanty vyrábět samo ve formě enzymů, antioxidanty přijímané z potravy, jako například vitamíny a minerální látky, obsahují však mnohem více antioxidačních látek (20; 21).

Lidské tělo si antioxidační látky vyrábí ve formě hormonů, koenzymu Q či enzymů (21).

Antioxidační vlastnosti mají téměř všechny vitamíny. Vitamín A je významný pro imunitní systém, kde je nutný pro tvorbu bílých krvinek a protilátek, nebo pro zlepšování zraku. Vitamín C stabilizuje imunitu a psychiku lidského jedince. Vitamín C je důležitý hlavně, když je člověk nemocný. V tomto případě vzroste potřeba vitamínu C dvacetkrát až čtyřicetkrát. Stejně tak je vitamín C velmi důležitý při alergiích či revmatismu. Pro vitamín E je typické, že zabraňuje vzniku rakoviny a srdečním i mozkovým mrtvicím (20; 21).

Antioxidační látky nemají pouze vitamíny, ale také například některé prvky. Jedním z nich je mangan, který podporuje správnou funkci nervů a svalů a má důležitou funkci při tvorbě hormonu štítné žlázy. Dalším významným prvkem je měď, kterou lidské tělo potřebuje k tvorbě RNA a dokonce je i součástí mnoha enzymů. Zinek je také součástí enzymů. Mimo to je velmi všestranný a pomáhá zmírňovat mnoho nemocí (20).

Pro tuto práci jsou významné flavonoidy, které patří mezi polyfenoly. Flavonoidy mohou zvýšit účinnost vitamínu C až na dvacetinásobek. V lidském těle zamezují anémii, pomáhají s léčením chudokrevnosti či mírní sklony k velké krvácivosti. Flavonoidy jsou schopny vázat přechodné kovy či ovlivňovat některé enzymy. Působí v hydrofilním i lipofilním prostředí, ale způsob jejich metabolismu a vstřebávání nebyl plně prostudován (20; 21).

Další látky s antioxidačními účinky mají vitamíny B komplexu, minerální látky, jako například hořčík, sodík nebo vápník, či stopové prvky, jako jsou bor, fosfor, jod, křemík, nikl nebo železo (20; 21).

10 Experimentální část

Jako experiment byla provedena inhibice Maillardových reakcí pomocí extraktu z kořene petržele. Jako měřicí metoda byla použita UV-Vis spektrofotometrie, kterou byl pozorován průběh reakcí, a také bylo stanoveno množství polyfenolů v extraktech.

10.1 Použité přístroje

Nožový mlýnek Grindomix GM 200 (Retsch, Německo)
Váhy KERN 440–35 N (KERN, Německo)
Analytické váhy KERN ABT 220–4 M (KERN, Německo)
Rotační míchadlo (VWR International)
Horkovzdušný sterilizátor HS62A (Chirana, Česká republika)
Centrifuga Universal 320 (Hettich, Německo)
Centrifuga MiniStar silverline (VWR International)
Vodní lázeň Memmert WNB 22 (Memmert, Německo)
UV-Vis spektrofotometr UV 2600 (Shimadzu, Japonsko)

10.2 Použitý software

UVProbe (Shimadzu, Japonsko)
Word a Excel, edice Office 365 (Microsoft, USA)

10.3 Použité chemikálie

Fosfátový pufr pH 7,0 (tablety)
D-glukosa-monohydrát čistoty p.a. (PENTA, Česká republika)
L-lysin-monohydrát čistoty 99 % (Merck, Německo)
96 % ethanol (Lach-Ner, Česká republika)
Kyselina galová (Sigma-Aldrich, Německo)
Folin a Ciocatheu's phenol reagent
Uhličitan sodný čistoty p.a. (Lach-Ner, Česká republika)

10.4 Příprava extraktů

Pro první extrakt byla petržel nakrájena na menší části a mleta po dobu 15 sekund při rychlosti 6 000 otáček za minutu (nožový mlýnek Grindomix GM 200). Po namletí byly naváženy 3 g petržele (váhy KERN 440–35 N) a dány do 30 ml roztoku fosfátového pufru o pH 7,0. Pufir byl připraven rozpuštěním jedné tablety ve 100 ml destilované vody.

Pro druhý a třetí extrakt byla petržel nakrájena na kolečka a sušena 12 hodin při teplotě 50 °C (horkovzdušný sterilizátor HS62A). Po sušení byla petržel nadrcena ve třecí misce. Nadrcená petržel byla navážena po 3 g (váhy KERN 440–35 N) a dána do roztoku fosfátového pufru pH 7,0 (stejná příprava jako u prvního extraktu) nebo do roztoku 60 % ethanolu, který byl připraven smícháním 250 ml 96 % ethanolu a 150 ml destilované vody.

Všechny tři extrakty byly hodinu míchány na rotačním míchadle (VWR), aby se petržel extrahovala. Po hodině míchání byly dány do centrifugy (centrifuga Universal 320) na 15 minut při rychlosti 5 000 otáček za minutu. Před použitím byl ze zkumavek odpipetován roztok, který byl dán ještě na 5 minut do odstředivky (centrifuga MiniStar silverline) s rychlostí 6 000 otáček za minutu.

10.5 Příprava roztoků glukosy, lysinu a kyseliny galové

Pro reakci byly připraveny roztok glukosy a roztok lysinu. Pro tento experiment byl použit reakční poměr glukosa:lysin = 2:1, a proto byl připraven roztok glukosy o koncentraci 0,1 mol/l a lysinu o koncentraci 0,05 mol/l. Pro 100 ml roztoku glukosy bylo naváženo 1,9817 g monohydrátu glukosy a pro 100 ml roztoku lysinu bylo naváženo 0,82105 g monohydrátu lysinu. Dané roztoky poté byly smíchány 1:1, přesněji se do každé zkumavky bylo odpipetování 2,5 ml roztoku glukosy a 2,5 ml roztoku lysinu.

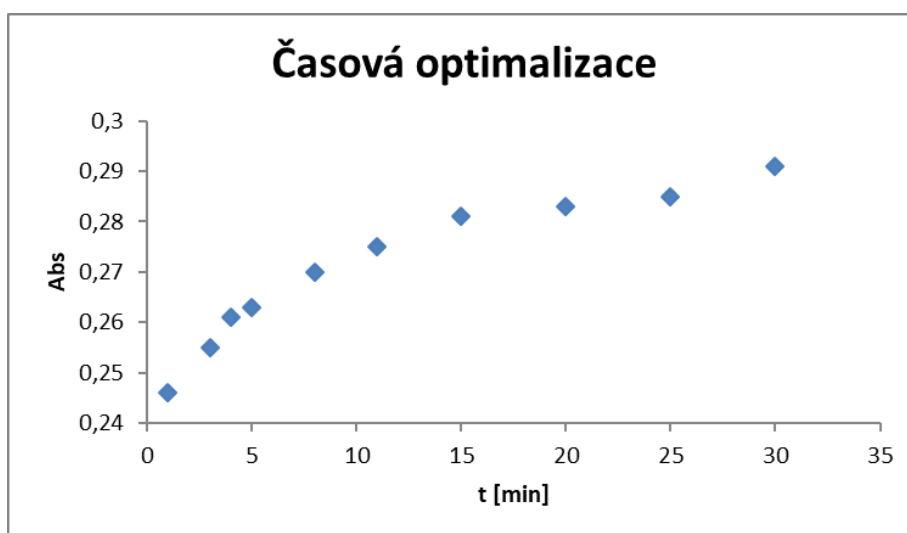
Roztoky kyseliny galové byly připraveny postupným ředěním zásobního roztoku kyseliny galové v ethanolu o koncentraci 500 µg/ml.

10.6 Postupy metod analýz

10.6.1 Stanovení polyfenolických látek

Ke stanovení polyfenolických látek byla vybrána metoda kalibrační křivky, která byla provedena na kyselinu galovou.

Nejdříve byla provedena časová optimalizace pro koncentraci kyseliny galové 40 $\mu\text{g/ml}$, kde pro následující reakce byl vybrán čas 25 minut. Tento čas byl vybrán z grafické závislosti absorbance na čase (graf 1), kde byl zvolen bod, ve kterém už není růst absorbance s časem tak strmý a hodnota absorbance se ustaluje.



Graf 1 Časová optimalizace pro koncentraci kyseliny galové 40 $\mu\text{g/ml}$

Do zkumavky bylo odpipetováno 5 ml destilované vody, 1 ml roztoku kyseliny galové o dané koncentrace / extraktu a 0,5 ml činidla (Folin–Ciocatteu). Zkumavka byla nechána po dobu 5 minut ve tmě. Poté byl přidán 1 ml 5 % roztoku Na_2CO_3 a zkumavka byla opět umístěna do tmy, tentokrát na dobu 25 minut. Jako důkaz přítomnosti polyfenolů změnil roztok barvu ze žluté na zelenou. Po proběhnutí reakce byla změřena absorbance při vlnové délce 765 nm (UV-Vis spektrofotometr).

10.6.2 Průběh Maillardových reakcí

Do zkumavky bylo odpipetováno 2,5 ml roztoku glukosy a 2,5 ml roztoku lysinu.

Do devíti zkumavek s roztoky glukosy a lysinu byl přidán 1 ml roztoku fosfátového pufru, do dalších devíti zkumavek byl přidán 1 ml roztoku extraktu syrové petržele v roztoku fosfátového pufru, do dalších devíti zkumavek byl přidán 1 ml roztoku extraktu sušené petržele v roztoku fosfátového pufru, do dalších devíti zkumavek byl přidán 1 ml roztoku 60 % ethanolu a do posledních devíti zkumavek byl přidán 1 ml roztoku extraktu sušené petržele v roztoku 60 % ethanolu.

Všechny zkumavky byly zahřívány ve vodní lázni při teplotě 90 °C (vodní lázeň Memmert WMB 22). Z každé skupiny devíti zkumavek byly tři zahřívány 0 minut, další tři 60 minut a poslední tři 120 minut. Po uplynutí daného času byly zkumavky ochlazeny, aby se zastavil průběh reakce. U všech zkumavek byla změřena absorbance při vlnové délce 420 nm a poté byly výsledky porovnány mezi sebou.

11 Výsledky měření

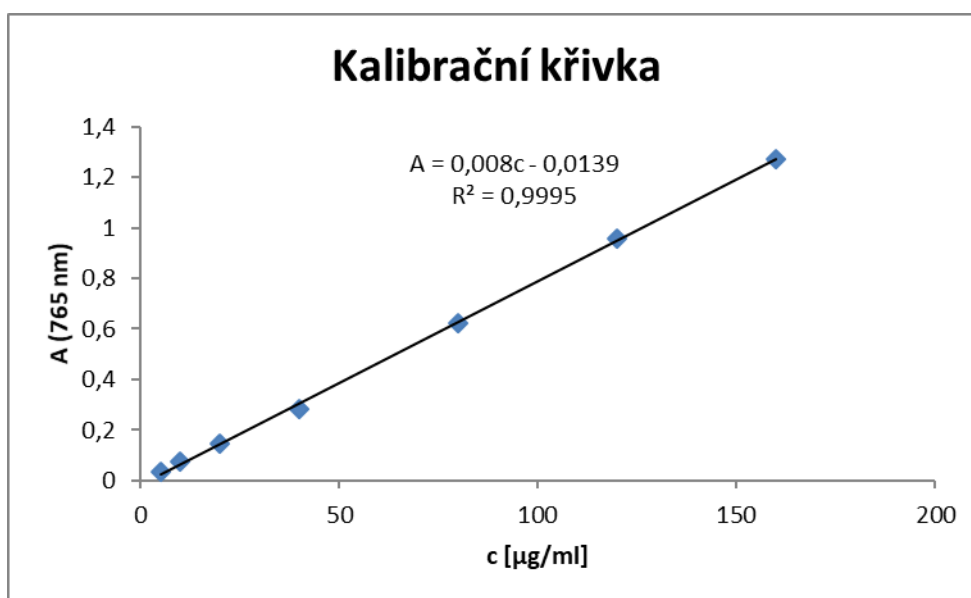
U naměřených hodnot byl vypočítán aritmetický průměr absorbancí a jejich průměrná odchylka. Z průměrné odchylky byl, s použitím Studentova rozdělení s intervalem spolehlivosti 95 %, vypočítán kvantil.

11.1 Stanovení polyfenolických látek

Jak již bylo zmíněno, polyfenolické látky byly stanovovány pomocí metody kalibrační křivky na kyselinu galovou (graf 2) a výsledky jsou vyjádřeny jako ekvivalent kyseliny galové. Hodnoty naměřené pro sestavení kalibrační křivky jsou v tabulce 1.

Tabulka 1 Hodnoty pro kalibrační křivku kyseliny galové

c [$\mu\text{g/ml}$]	5	10	20	40	80	120	160
A (765 nm)	0,036	0,074	0,147	0,285	0,625	0,958	1,272



Graf 2 Kalibrační křivka na celkový obsah polyfenolických látek s využitím kyseliny galové

Tabulka 2 Hodnoty pro jednotlivé extrakty

Surová petržel (fosfátový pufr pH 7)		Sušená petržel			
		Fosfátový pufr pH 7		60 % ethanol	
A (765 nm)	c [$\mu\text{g/ml}$]	A (765 nm)	c [$\mu\text{g/ml}$]	A (765 nm)	c [$\mu\text{g/ml}$]
0,136	18,7	0,420	54,2	0,561	71,9
0,143	19,6	0,431	55,6	0,577	73,9
0,135	18,6	0,442	57,0	0,580	74,2
Průměrná hodnota	19,0	Průměrná hodnota	55,6	Průměrná hodnota	73,3
Kvantil	1,0	Kvantil	2,2	Kvantil	2,3

Z rovnice regrese kalibrační křivky a naměřených hodnot pro jednotlivé extrakty petržele (tabulka 2) bylo stanoveno množství polyfenolů v jednotlivých extraktech, a to v prvním extraktu syrové petržele ve fosfátovém pufru pH 7,0 na $19 \pm 1 \mu\text{g/ml}$, v druhém extraktu sušené petržele ve fosfátovém pufru pH 7,0 na $55,6 \pm 2,2 \mu\text{g/ml}$ a ve třetím extraktu petržele v 60 % roztoku ethanolu na $73,3 \pm 2,3 \mu\text{g/ml}$.

Jak je vidět z výsledků měření, sušení petržele výrazně zvýšilo množství extrahovaných polyfenolických látek. Nutné je zmínit to, že kořen petržele obsahuje velké množství vody, není tudíž totéž vážit nesusušený a sušený kořen petržele.

11.2 Průběh Maillardovy reakce

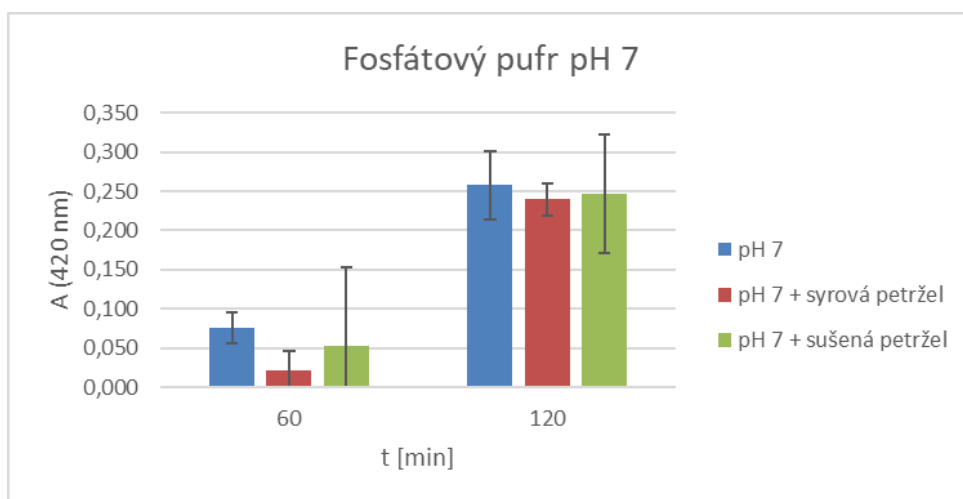
Jelikož extrakty nebyly zcela bezbarvé, byla od průměrných hodnot absorbancí odečtena průměrná hodnota absorbance v čase 0. Byly vyřazeny výsledky měření, u kterých došlo k prokazatelnému úniku kapaliny při reakcích (netěsnost víček u reakčních zkumavek).

V první části byl použit jako prostředí fosfátový pufr pH 7,0. Průměrná hodnota absorbance v čase 0 pro reakci bez extraktu v prostředí fosfátového pufru je tato hodnota 0,009, pro reakci v přítomnosti extraktu syrové petržele ve fosfátovém pufru 0,081 a pro reakci za přítomnosti extraktu sušené petržele ve fosfátovém pufru na 0,090. Zbylé naměřené hodnoty se nacházejí v tabulce 3. Pro snadnější porovnání byl vytvořen sloupcový graf (graf 3).

V druhé části byl jako prostředí použit 60 % roztok ethanolu. Průměrná hodnota absorbance v čase 0 pro reakci bez přítomnosti extraktu v prostředí 60 % roztoku ethanolu je 0,017 a pro reakci za přítomnosti extraktu sušené petržele v 60 % roztoku ethanolu 0,789. Zbylé naměřené hodnoty se nacházejí v tabulce 4. Pro snadnější porovnání byl vytvořen sloupcový graf (graf 4).

Tabulka 3 Naměřené a vypočítané hodnoty pro prostředí fosfátového pufru pH 7

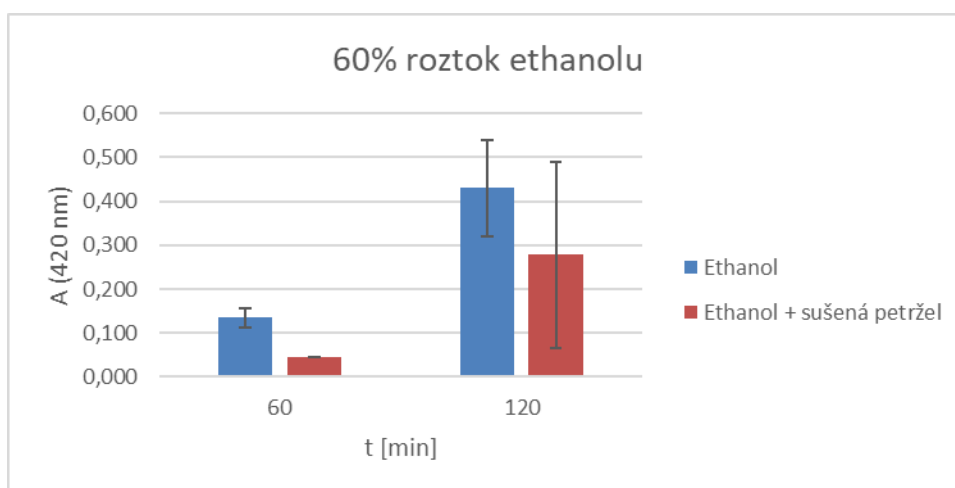
	Fosfátový pufr pH 7		Fosfátový pufr pH 7 + syrová petržel		Fosfátový pufr pH 7 + sušená petržel	
	60	120	60	120	60	120
Čas [min]	60	120	60	120	60	120
A (420 nm)	0,082	0,294	-	0,332	0,080	-
	0,074	0,247	0,111	0,308	0,159	0,311
	0,097	0,258	0,094	0,323	0,191	0,363
Průměrná hodnota	0,084	0,266	0,103	0,321	0,143	0,337
Průměrná hodnota – průměrná hodnota v čase 0	0,076	0,258	0,021	0,240	0,053	0,247
Kvantil	0,020	0,043	0,025	0,020	0,099	0,076



Graf 3 Grafické porovnání hodnot v prostředí fosfátového pufru pH 7

Tabulka 4 Naměřené a vypočítané hodnoty pro prostředí 60 % roztoku ethanolu

	60 % roztok ethanolu		60 % roztok ethanolu + sušená petržel	
	60	120	60	120
Čas [min]	60	120	60	120
A (420 nm)	0,157	0,377	-	1,203
	0,138	0,462	0,835	0,951
	0,161	0,501	-	1,047
Průměrná hodnota	0,152	0,447	0,835	1,067
Průměrná hodnota – průměrná hodnota v čase 0	0,135	0,430	0,046	0,278
Kvantil	0,022	0,109	0	0,213



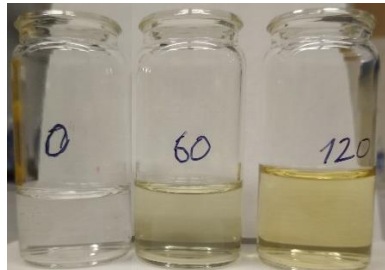
Graf 4 Grafické porovnání hodnot v prostředí 60 % roztoku ethanolu

Z daných hodnot lze říci, že u extraktů petržele ve fosfátovém pufru pH 7 je inhibice diskutabilní, naproti tomu u extraktu petržele v 60 % roztoku ethanolu je inhibice znatelná.

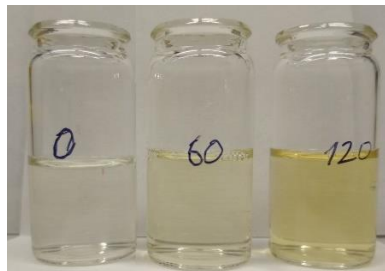
Ze získaných hodnot pro stanovení polyfenolických látek by se však dalo očekávat, že inhibice pomocí extraktu sušené petržele ve fosfátovém pufru pH 7 bude mnohem výraznější než u extraktu syrové petržele ve fosfátovém pufru pH 7. U extraktu sušené petržele v 60 % roztoku ethanolu byla inhibice nejvýraznější, což bylo očekáváno.

11.2.1 Vizuální porovnání

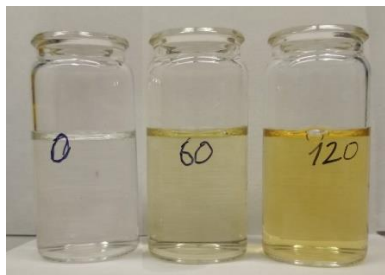
Při vizuálním porovnání je jasně vidět hnědnutí se zvyšující se dobou zahřívání. Porovnávání mezi sebou již je složitější z důvodu zbarvení extraktu. Jako názorná ukázka jsou zde obrázky 8 – 11.



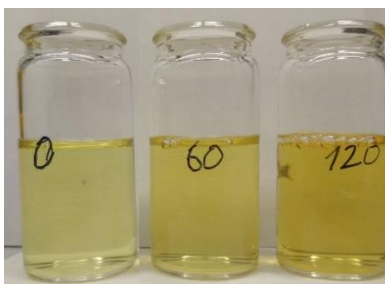
Obrázek 8 Reakce bez přítomnosti extraktu v prostředí fosfátového pufru pH 7



Obrázek 9 Reakce s přítomností extraktu sušené petržele v prostředí fosfátového pufru pH 7



Obrázek 10 Reakce bez přítomnosti extraktu v prostředí 60 % roztoku ethanolu



Obrázek 11 Reakce s přítomností extraktu sušené petržele v prostředí 60 % roztoku ethanolu

Závěr

Maillardovými reakcemi vzniká řada produktů, které mají kladný vliv na potraviny, přesněji na jejich barvu, chuť nebo vůni, ale také produkty s karcinogenními a mutagenními účinky. Kvůli těmto produktům se hledají možnosti inhibice.

Pomocí UV-VIS spektrofotometrie byly změřeny absorbance pro reakce v prostředí fosfátového pufru pH 7,0, kde k inhibici byl použit extrakt z nesusušené a extrakt ze sušené petržele v prostředí fosfátového pufru pH 7,0, a v prostředí 60 % roztoku ethanolu, kde byl k inhibici použit extrakt ze sušené petržele v 60 % roztoku ethanolu. Z naměřených výsledků lze říci, že inhibice pomocí extraktů petržele ve fosfátovém pufru pH 7 nejsou zcela průkazné, ale pomocí extraktu sušené petržele v 60 % roztoku ethanolu je inhibice značná.

Použitá literatura

1. **NURSTEN, H. E.** Introduction. *The Maillard reaction: chemistry, biochemistry and implications*. Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2005, 1, stránky 1-4. ISBN 978-0-85-404-964-6 Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpMRCBI00B/maillard-reaction-chemistry/maillard-reacti>.
2. **VELÍŠEK, J.** Sacharidy. *Chemie potravin*. Tábor : OSSIS, 2002, Sv. 1, stránky 163-304. 2. Vydání. ISBN 80-86659-00-3
3. **NURSTEN, H. E.** The chemistry of nonenzymic browning. *The Maillard reaction: chemistry, biochemistry and implications*. Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2005, 2, stránky 5-30. ISBN 978-0-85-404-964-6 Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpMRCBI00B/maillard-reaction-chemistry/maillard-reacti>.
4. **VELÍŠEK, J.** Aminokyseliny, peptidy a bílkoviny. *Chemie potravin*. Tábor : OSSIS, 2002, Sv. 1, stránky 3-72. 2. Vydání. ISBN 80-86659-00-3
5. **NURSTEN, H. E.** Inhibition of Nonenzymic Browning in Foods. *The Maillard reaction: chemistry, biochemistry and implications*. Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2005, 13. ISBN 978-0-85-404-964-6 Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpMRCBI00B/maillard-reaction-chemistry/maillard-reacti>.
6. **NURSTEN, H. E.** Other Consequences of Technological Significance. *The Maillard reaction: chemistry, biochemistry and implications*. Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2005, 9, stránky 124 - 142. ISBN 978-0-85-404-964-6 Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpMRCBI00B/maillard-reaction-chemistry/maillard-reacti>.
7. **NURSTEN, H. E.** Recent Advances. *The Maillard reaction: chemistry, biochemistry and implications*. Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2005, 3, stránky 31-51. ISBN 978-0-85-404-964-6 Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpMRCBI00B/maillard-reaction-chemistry/maillard-reacti>.
8. **ČEPIČKA, J., KARABÍN, M.** Polyfenolové látky piva - přirozené antioxidanty. *Chemické listy*. 96, 2002, stránky 90 - 95.
9. **BKAŽEJ A., ŠUTÝ L.,** *Rastinné fenolové zlúčeniny*. Bratislava : ALFA, Vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatúry, 1973.
10. **NURSTEN, H. E.** Inhibition of the Maillard Reaction in Vivo. *The Maillard reaction: chemistry, biochemistry and implications*. Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2005, 13 , stránky 161 - 171. ISBN 978-0-85-404-964-6 Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpMRCBI00B/maillard-reaction-chemistry/maillard-reacti>.
11. **NURSTEN, H. E.** Colour Formation in Nonenzymic Browning. *The Maillard reaction: chemistry, biochemistry and implications*. Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2005, 4, stránky 52-61. ISBN 978-0-85-404-964-6 Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpMRCBI00B/maillard-reaction-chemistry/maillard-reacti>.

12. **NURSTEN, H. E.** Flavour and Off-Flavour Formation in Nonenzymic Browning. *The Maillard reaction: chemistry, biochemistry and implications*. Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2005, 5, stránky 62 - 89. ISBN 978-0-85-404-964-6 Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpMRCBI00B/maillard-reaction-chemistry/maillard-reacti>.
13. **NURSTEN, H. E.** Caramelisation. *The Maillard reaction: chemistry, biochemistry and implications*. Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2005, 12. ISBN 978-0-85-404-964-6 Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpMRCBI00B/maillard-reaction-chemistry/maillard-reacti>.
14. **ZÝKA, J. a kolektiv.** Spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti světla. *Analytická příručka*. Praha : SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1988, Sv. 2, stránky 165-222. Čtvrté, upravené vydání.
15. **HIGSON S.** An introduction to the use of visible and ultraviolet light for analytical measurements. *Analytical chemistry*. New York : Oxford University Press, 2004, stránky 111-148. ISBN 978-0-19-850289-0
16. **HIGSON S.** Further applications of UV-visible absorption and fluorescence phenomena including X-ray fluorescence, Raman, Mössbauer, and photoelectron spectroscopic techniques. *Analytical chemistry*. New York : Oxford University Press, 2004, stránky 151-177. ISBN 978-0-19-850289-0
17. **TOMŠOVIČ, P.** Petroselinum HILL - petržel. [autor knihy] B. SLAVÍK. *Květena České republiky 5*. Praha : Academia, 1997, Sv. 5, 24, stránky 336 - 337. ISBN 80-200-590-0
18. **FARNDON, J.** *Školní encyklopedie*. Praha : Svojtka & Co., 2008. stránky 58-61. ISBN 978-80-7237-261-4.
19. **ANONYM.** *Petržel - bohatý zdroj kyseliny listové i vápníku*. [Zdravezdрави.cz] Praha : Schema.PRO s.r.o, 2017. Dostupné na: <https://zdravezdрави.cz/potraviny/petrzel-a-zdravi?fbclid=IwAR1Iq2U7RBxXXKJsF2raPWYQkEzIfVBcXCqW4QguBnPVkyGHyRZ8-Czb-2E>, citováno [09. 06. 2019].
20. **JORDÁN V., HEMZALOVÁ M.,.** *Antioxidanty*. Brno : Jota, 2001. ISBN 80-7217-156-9.
21. **ŠTÍPEK S. a kol.** Antioxidační terapie - elixír života, nebo komerční kampaň? *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. Praha : Grada Publishing, 2000, 16, stránky 273 - 294. ISBN 80-7169-704-4