

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2020

Bc. Eva Štěpanovská

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Studium průběhu Maillardovy reakce

Diplomová práce

2020

Bc. Eva Štěpanovská

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

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Eva Štěpanovská**
Osobní číslo: **C17488**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Studium průběhu Maillardovy reakce**
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. Definujte co je Maillardova reakce (MR), uveďte mechanismus reakcí, jejich využití (negativní, pozitivní) v potravinářství a vliv produktů MR na zdraví člověka.
2. S využitím bibliografických databází dostupných v knihovně UPa zpracujte rešerši o produktech MR a jejich vztahu k antioxidační charakteristice potravin nebo modelových systémů.
3. Experimentálně zjistěte, jak ovlivňuje pH tvorbu produktů MR a jejich antioxidační vlastnosti. Výsledky zpracujte a kriticky vyhodnoťte.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné 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 2019**

Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2019**


prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.


vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prohlašuji

Tuto práci 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., 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 mě 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, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Bc. Eva Štěpanovská

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu, doc. Ing. Liboru Červenkovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a připomínky během experimentální práce, odbornou pomoc a trpělivost při psaní diplomové práce.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá studiem Maillardovy reakce se zaměřením na antioxidační vlastnosti vznikající během reakcí s rutinem jako antioxidantem. Teoretická část práce se věnuje popisu jednotlivých fází Maillardovy reakce, stručnému popisu vstupujících látek, metod měření antioxidačních vlastností, ovlivnění pH prostředí a použitých metod pro měření vzniklých produktů. V experimentální části byly analyzovány vzorky glukózy, lysinu a rutinu v roztocích o pH 3, 7 a 10. Dále u těchto vzorků byly stanoveny antioxidační vlastnosti, popsána tvorba meziproduktů a konečných produktů Maillardovy reakce při použití metody UV-Vis.

KLÍČOVÁ SLOVA

Maillardova reakce, antioxidační vlastnosti, UV-Vis, kapilární izotachoforéza, glukóza, lysin, rutin

TITLE

Study of the Maillard reaction

ANNOTATION

The thesis is aimed at studying Maillard's reaction focusing on the determination of antioxidant properties arising during reactions using rutin as an antioxidant. The theoretical part of the work is devoted to describing the different phases of Maillard's reaction, a brief description of the input substances, the antioxidant properties used during the experimental work, the influence of pH and the methods used to measure the resulting products. In the experimental part, glucose, lysine and rutin samples were analyzed in solutions at pH 3, 7 and 10. Furthermore, antioxidant properties were established in these samples, the formation of intermediates and end products of the Maillard reaction was described using the UV-Vis method.

KEYWORDS

Maillard reaction, antioxidant properties, UV-Vis, capillary isotachophoretic, glucose, lysin, rutin

Obsah

ÚVOD.....	11
1. TEORETICKÁ ČÁST.....	12
1.1 Historie popisu Maillardovy reakce.....	12
1.2 Maillardova reakce.....	12
1.3 Chemická podstata Maillardovy reakce.....	12
1.3.1 Jednotlivé fáze Maillardovy reakce.....	14
1.3.2 Reakce hnědnutí.....	20
1.3.3 Hlavní typy neenzymatického hnědnutí.....	21
1.3.4 Degradace kyseliny askorbové.....	21
1.4 Ovlivnění Maillardovy reakce.....	22
1.4.1 Látky ovlivňující Maillardovu reakci.....	22
1.4.2 Vliv teploty.....	27
1.4.3 Vliv pH.....	28
1.5 Produkty Maillardovy reakce.....	32
1.6 Metody pro měření Maillardovy reakce.....	33
1.6.1. Spektrální metody.....	33
1.6.2. Kapilární izotachoforéza.....	33
1.7 Antioxidanty.....	35
1.7.1. Antioxidační aktivita s využitím stabilního radikálu DPPH.....	35
1.7.2. Stanovení fenolických látek.....	35
1.7.3. Vychytávání peroxidu vodíku.....	35
1.7.4. Redukční vlastnosti.....	36
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	37
2.1 Použité nástroje a chemikálie.....	37
2.1.1. Použité přístroje.....	37

2.1.2.	Použité počítačové programy.....	37
2.1.3.	Použité pomůcky.....	37
2.1.4.	Použité chemikálie.....	37
2.2	Příprava roztoků.....	38
2.2.1.	Příprava zásobního roztoku pufru Britton-Robinson (B-R).....	38
2.2.2.	Příprava vzorků.....	38
2.2.3.	Příprava kalibračních roztoků.....	39
2.3	Stanovení antioxidačních vlastností.....	39
2.3.1.	Stanovení antioxidační kapacity metodou DPPH.....	39
2.3.2.	Stanovení obsahu fenolických látek.....	40
2.3.3.	Stanovení redukčních vlastností.....	40
2.3.4.	Stanovení schopnosti vychytávat peroxid vodíku.....	40
2.4	Zpracování vzorků pro vybrané metody.....	41
2.4.1.	Spektrofotometrie UV-Vis.....	41
2.4.2.	Kapilární izotachoforéza.....	41
3.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	43
3.1	Vizuální hodnocení Maillardovy reakce.....	43
3.2	Spektrometrické stanovení produktů Maillardových reakcí.....	43
3.2.1.	Stanovení meziproduktů Maillardovy reakce při 294 nm.....	43
3.2.2.	Stanovení produktů Maillardovy reakce při 420 nm.....	45
3.3	Antioxidační vlastnosti.....	48
3.3.1.	Stanovení antioxidační kapacity metodou DPPH.....	48
3.3.2.	Stanovení redukčních vlastností.....	49
3.3.3.	Stanovení obsahu celkových fenolických látek.....	51
3.3.4.	Schopnost vychytávat peroxid vodíku.....	53
3.4	Stanovení lysinu kapilární izotachoforézou.....	56
4.	ZÁVĚR.....	59

5.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	60
6.	SEZNAM PŘÍLOH	67

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Upravený Hodgeho model Maillardovy reakce (Nursten, 2005, upraveno).....	13
Obrázek 2 Schéma reakce A, kondenzace cukru a aminu [15]	14
Obrázek 3 Schéma reakce B, Amadoriho přeskupení [15].....	15
Obrázek 4 Schéma reakce C, dehydratace cukrů [15]	16
Obrázek 5 Schéma reakce D, fragmentace cukrů [15]	17
Obrázek 6 Schéma reakce F, kondenzace aldolu [15]	18
Obrázek 7 Schéma tvorby radikálových kationtů [15]	19
Obrázek 8 Základní reakce enzymatického hnědnutí [4]	20
Obrázek 9 Strukturní vzorec flavonoidů (vlevo) a strukturní vzorec rutinu (vpravo).....	23
Obrázek 10 Graf lineární regrese produkce monofruktosyl-L-lysin a difruktosyl-L-lysinu (plná čára) a difruktosyl-L-lysinu (přerušovaná čára) v závislosti na pH a teplotě	24
Obrázek 11 Graf lineární regrese produkce monofruktosyl-L-lysin (plná čára) a difruktosyl-L-lysinu (přerušovaná čára) v závislosti na pH a teplotě [35].....	26
Obrázek 12 Graf koncentrace vstupních látek Maillardovy reakce (glukóza-nahoře, lysin-dole) závislý na době trvání Maillardovy reakce a při odlišných pH reakce [28]	28
Obrázek 13 Graf závislosti stanovené hodnoty hnědnutí na době průběhu Maillardovy reakce za různých hodnot pH [29].	29
Obrázek 14 Schéma hlavních reakcí Maillardovy reakcí ovlivněných hodnotou pH [31].....	30
Obrázek 15 A-C Graf tvorby meziproduktů Maillardovy reakce při teplotě 95°C (294 nm). .	44
Obrázek 16 A-C Graf tvorby konečných produktů Maillardovy reakce při teplotě 95°C (420 nm).	46
Obrázek 17 A-C Antioxidační kapacita DPPH produktů Maillardovy reakce při teplotě 95°C..	48
Obrázek 18 A-C Redukční vlastnosti produktů Maillardovy reakce při teplotě 95°C (700 nm).	50
Obrázek 19 A-C Fenolické látky v produktech Maillardovy reakce při teplotě 95°C	52
Obrázek 20 A-C Schopnost vychytávat peroxid vodíku v produktech Maillardovy reakce při 95°C	54
Obrázek 23 Stanovení koncentrace lysinu kapilární izotachoforézou pro lysin + rutin při teplotě 95°C	58

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

UV/Vis = oblast ultrafialového a viditelného záření

IČ = infračervená spektrometrie

DPPH = 1,1-difenyl-2-pykrylhydrazyl

B-R = Britton-Robinson

Glu-lys = směs glukózy a lysinu

ÚVOD

Maillardova reakce je jednou ze základních reakcí doprovázející lidstvo téměř denně. Představuje neenzymatické hnědnutí, se kterým se setkáváme při každé tepelné úpravě všech potravin obsahujících sacharidovou a aminokyselinovou složku. Tedy při pečení masa, pečiva, grilování nebo smažení. Proces Maillardovy reakce je velmi složitý děj. Během reakcí dochází k několika fázím se vznikem produktů s charakteristickou barvou, vůní a chutí. Hlavním rozdělením je vznik meziproduktů a konečných produktů Maillardovy reakce. Reakci mohou ovlivňovat další látky, například antioxidanty. Ty jsou důležité pro vychytávání volných radikálů vznikajících při vyšších teplotách zahřívání reakční směsi. Radikály mají významný negativní vliv na lidské zdraví a jejich sledování v potravinách je proto stále aktuálnější téma. Přidávky antioxidantních látek do potravin chrání lidský organismus před působením škodlivých radikálů.

Diplomová práce je zaměřena na popis průběhu Maillardovy reakce, vstupní směsi sacharidové, aminokyselinové a antioxidantní složky. Pro výzkumnou část byla vybrána kombinace glukózy, lysinu a rutinu. Reakce je silně závislá na pH prostředí, proto byl experiment prováděn v oblasti kyselého (pH 3), neutrální a bazického. Právě pH má vliv na vznik meziproduktů, konečných produktů a antioxidantních vlastností je brán velký zřetel a je sledováno, jak ovlivňuje reakci.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Historie popisu Maillardovy reakce

Maillardova reakce nese název podle francouzského biochemika Louis Camille Maillarda (1878-1936), který poprvé zaznamenal význam této reakce pro potraviny a biologické systémy (Maillard, 1912). Jedním z hlavních polí studia Maillarda byla reaktivita redukujících cukrů. Pozoroval při reakci za zvýšené teploty mezi cukry a aminokyselinami, polypeptidy, proteiny (taktéž mezi polysacharidy a polypeptidy nebo proteiny) tvorbu žluto-hnědých pigmentů. Tímto objevem dal Maillard základ pro studium jedné z nejvýznamnějších reakcí organických sloučenin odehrávající se v převážně v potravinách, ale s významem i v patologii biologických systémů.

Maillardova reakce byla rozpoznána vědeckou komunitou za podstatnou až v roce 1948 – ztráta nutritivní hodnoty při zahřívání mléčných produktů. Od tohoto roku začal trend vzrůstajícího množství článků popisujících vliv podmínek na jako je pH, teplota, složení cukrů na kvalitu potravin [1].

V roce 1953 chemik John E. Hodge integroval známá data publikovaná k této reakci a navrhl základní schéma Maillardovy reakce. Toto review je dodnes (i když s modifikacemi) považováno za základní referenční princip Maillardovy reakce. Hodge zdůraznil význam Amadoriho sloučenin a jejich reakční dráhy na výsledek Maillardovy reakce [1].

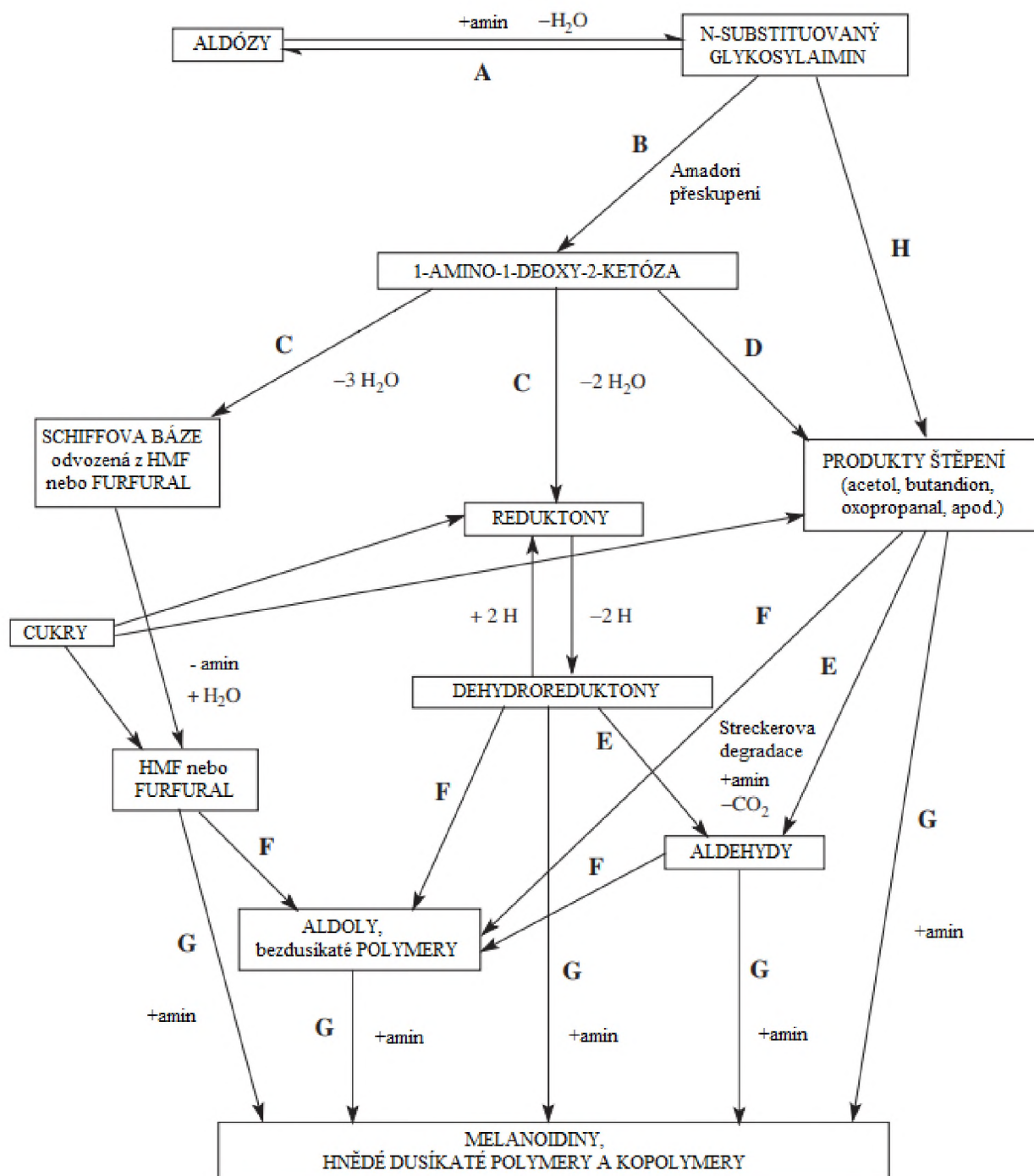
1.2 Maillardova reakce

Maillardova reakce je velmi žádaný proces degradace organických sloučenin, ke kterému dochází při pečení či opékání masa, pečiva, zeleniny či karamelizaci cukru, díky čemuž získávají takto upravené potraviny svou specifickou chuť a vůni [2]. K reakci dochází většinou za vysoké teploty. Stejně jako u masa a pečiva platí obecně u všech reakcí degradace organických sloučenin, že vznikající produkt je zbarven zpravidla dohněda [3]. Proto jsou tyto reakce souborně taktéž nazývány jako reakce neenzymatického hnědnutí (z angl. „browning reaction“).

1.3 Chemická podstata Maillardovy reakce

Od Maillardova objevu uplynulo více než 100 let, ale vzhledem ke komplexitě této reakce nejsou doposud všechny kroky reakce známy. Dodnes platí za nejuznávanější koncept pro pochopení obecného mechanismu Maillardovy reakce model z roku 1953 od Hodgeho,

který podchycuje základní komplexní povahu Maillardovy reakce včetně variability výsledného produktu reakce (upravená verze Hodgeho modelu – Obrázek 1).



Obrázek 1 Upravený Hodgeho model Maillardovy reakce (Nursten, 2005, upraveno)

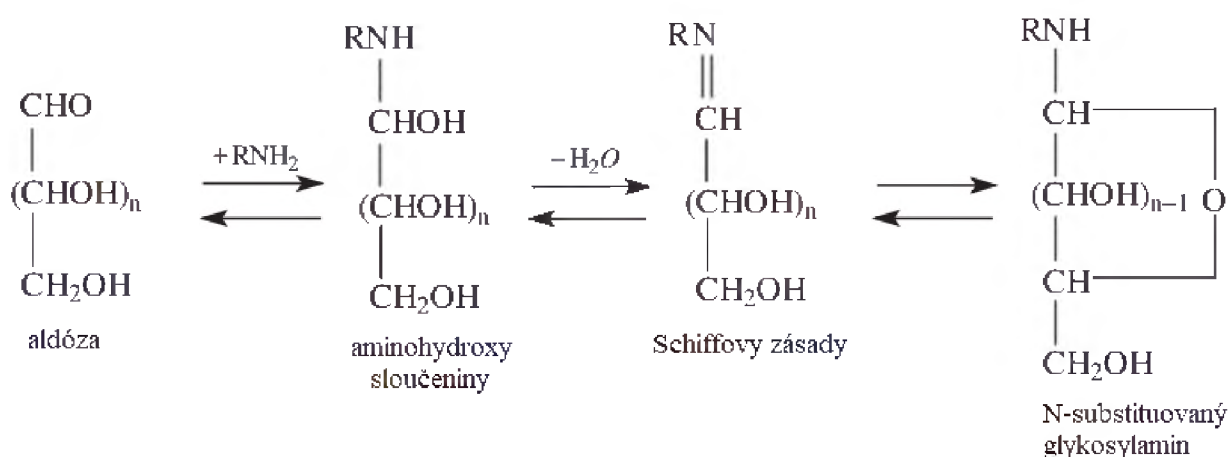
Hodge rozdělil Maillardovu reakci do tří částí [3]:

1. **Počáteční fáze:** produkty bezbarvé bez absorpce UV záření
 - Reakce A: Kondenzace cukru a aminu
 - Reakce B: Amadoriho přeskupení
2. **Pokročilá fáze:** produkty bezbarvé nebo žluté, silná absorpce UV záření
 - Reakce C: Dehydratace cukru
 - Reakce D: Fragmentace cukru
 - Reakce E: Degradace aminokyselin (Streckerova degradace)
3. **Konečná fáze:** velmi barevné produkty
 - Reakce F: Kondenzace aldolu
 - Reakce G: Kondenzace aldehydu a aminu, tvorba heterocyklických dusíkatých sloučenin
 - Reakce H: Reakce volných radikálů

1.3.1 Jednotlivé fáze Maillardovy reakce

1.3.1.1. Reakce A: Kondenzace cukru a aminu

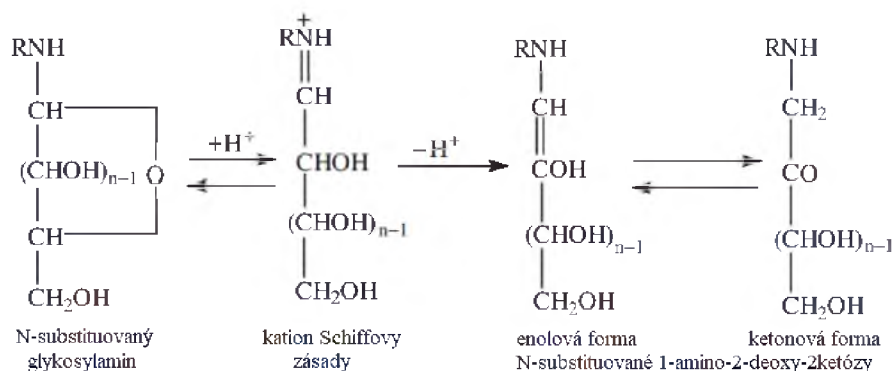
Tato reakce je reprezentována na Obrázku 2. Každý z kroků v těchto reakcích je reverzibilní. Prvním krokem je reakce aldózy s aminem, při které vznikne aminohydroxy uhlovodík (reakce urychlena zásaditým pH), který po dehydrataci dává Schiffovu bázi. Výsledný produkt této fáze – N-substituovaný glykosylamin může být opětovně aplikován do prvního kroku reakce jako kterýkoliv jiný amin [3,4].



Obrázek 2 Schéma reakce A, kondenzace cukru a aminu [4]

1.3.1.2. Reakce B: Amadoriho přeskupení

Tato reakce (Obrázek 3) je katalyzována kyselým prostředím, ale probíhá i spontánně při 25 °C. Ve většině případů tato reakce není reverzibilní. Reakce této fáze spočívají ve vzniku kationtu Schiffovy báze (kyselé pH) a po následném odtržení protonu vzniká enol forma a izomerací keto forma 1-amino-2-deoxy-2-ketózy. Výsledné produkty Amadoriho přeskupení jsou relativně stabilní. Amadoriho přeskupení probíhá u aldóz, u ketóz probíhá podobným způsobem tzv. Heynsův přesmyk, který produkuje 2-amino-2-deoxyaldózy [3,4].



Obrázek 3 Schéma reakce B, Amadoriho přeskupení [4]

1.3.1.3. Reakce C: Dehydratace cukrů

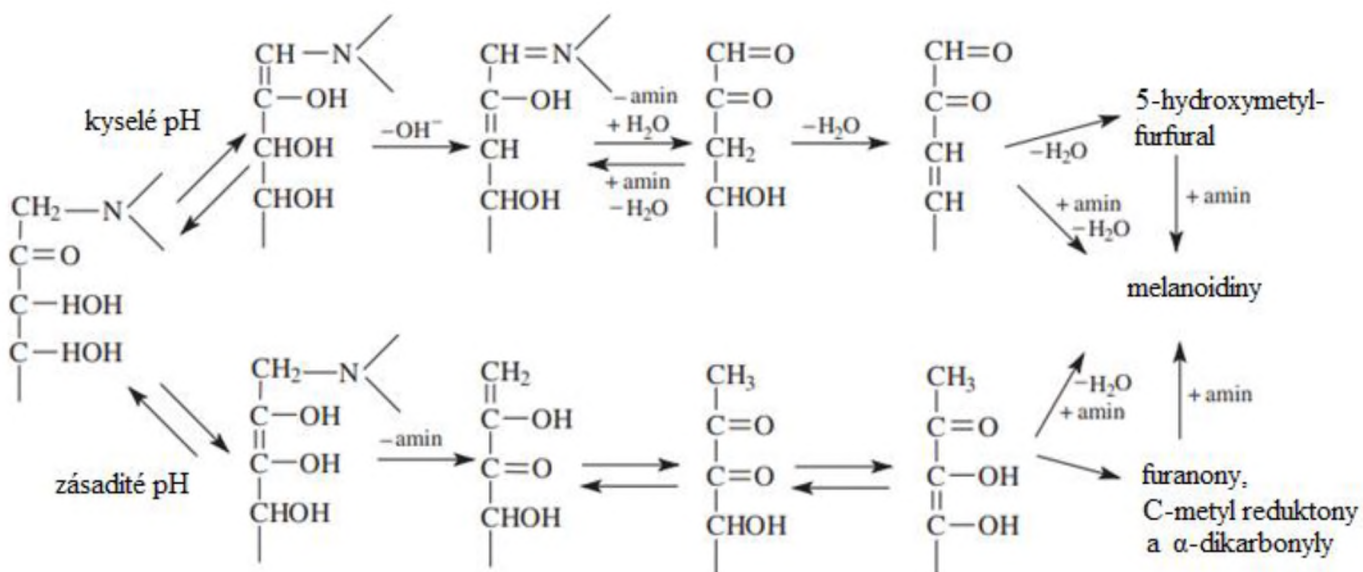
Existují dvě alternativní cesty reakce dehydratace cukrů, které probíhají v závislosti na podmínkách hodnoty (Obrázek 4):

- 1,2-enolizace (Obrázek 4, horní část schéma)

Tato reakce probíhá za kyselých podmínek. Vzniká nejprve z ketozaminu enamínol, ze kterého při následující eliminaci hydroxylové skupiny vzniká 3-deoxy-1,2-dikarbonyl. Následující reakce vedou až ke tvorbě furfuralu. Furfuraly tvoří hnědé sloučeniny za přítomnosti aminů [4].

- 2,3-enolizace (Obrázek 4, spodní část schéma)

Probíhá v neutrálním nebo zásaditém pH, při kterém probíhá první reakce přes 2,3-enolizaci. Následují další reakce s tvorbou 1-deoxy-2,3-dikarbonylu, která následně vede k tvorbě reduktonů. Reduktony jsou sloučeniny s endiolovou skupinou, která je nedaleko karbonylové skupiny, v podstatě jsou to produkty cukru po ztrátě dvou molekul vody (ztráta tří by vedla k tvorbě furfuralu). Reduktony mají skupinu $-\text{C}(\text{OH})\text{:C}(\text{OH})-$, podobně jako kyselina askorbová. Reduktony tvoří hnědé sloučeniny za přítomnosti aminů [3,4].



Obrázek 4 Schéma reakce C, dehydratace cukrů [4]

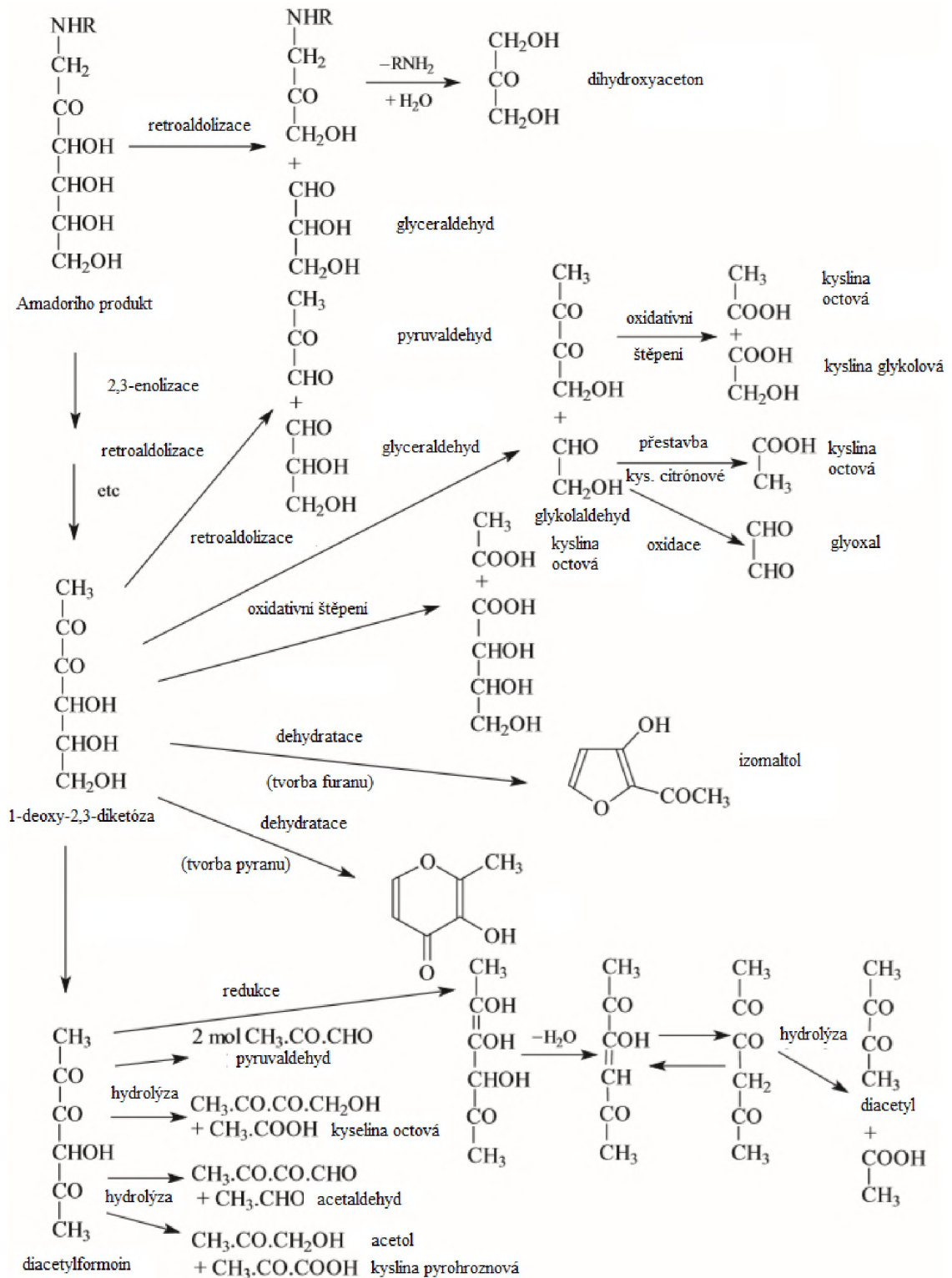
1.3.1.4. Reakce D: Fragmentace cukrů

Schéma těchto reakcí fragmentace cukru uvedeno na Obrázku 5. Princip, při kterém dochází k fragmentaci cukrů, se označuje jako dealdolizace (avšak oxidativní štěpení může též hrát roli) [5]. Štěpení hexózy může dát vzniku produktů o délce uhlíkového řetězce 5+1 nebo 4+2 nebo 3+3. Přičemž tyto fragmenty uhlovodíku, které si udrží α -hydroxymethylkarbonylovou skupinu prodělají samy další reakce vedoucí k hnědnutí [4].

Produkty Streckerovy degradace postupují reakcemi pro tvorbu hnědých produktů dvěma způsoby:

- 1) První možností je stav, kdy vzniklý aldehyd může podstoupit aldolovou kondenzací, při které vznikají bezdusíkaté polymery nebo může reagovat aminy pro tvorbu melanoidinů. Touto reakcí však vzniká pouze malá část výsledných produktů hnědnutí [4, 5].

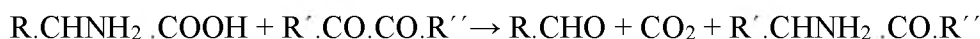
2) Druhou možností je, že dehydroreduktomy derivované z Amadoriho produktů procesem dehydratace a dehydrogenace nebo dikarbonylové produkty štěpení reagují s aminokyselinami a tvoří melanoidiny. Kyselina askorbová může taktéž zastávat funkci dikarbonylové sloučeniny v této reakci [4,5].



Obrázek 5 Schéma reakce D, fragmentace cukrů [4]

1.3.1.5. Reakce E: Degradace aminokyseliny (Streckerova degradace)

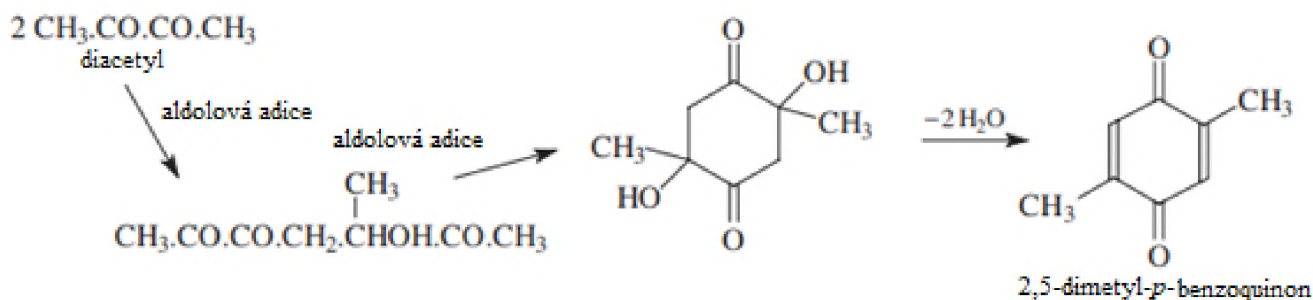
Při této reakci jsou α -aminokyseliny oxidovány pomocí oxidačních činidel do formy aldehydu s aminokyselinovou strukturou o jeden uhlík kratší. Inicijací této reakce začíná pomocí α -dikarbonylových sloučenin a některých jejich derivátů. Mechanismus reakce se může lišit v závislosti na typu oxidačního činidla a struktuře aminokyseliny, avšak obecně můžeme tuto reakci reprezentovat následujícím schématem [3,4,5]:



Vstupními látkami této reakce mohou být aldózy, ketózy, deriváty mastných kyselin, nebo třeba vitamín K. Studie s radioaktivně značeným CO_2 prokázaly, že více než 80 % CO_2 pochází právě z aminokyselin [6], což koresponduje se zmíněnou reakcí.

1.3.1.6. Reakce F: Kondenzace aldolu

Aldehydy mohou vznikat v reakcích C, D a E, přičemž mohou reagovat mezi sebou pomocí aldolové kondenzace. Do této reakce mohou vstupovat i další karbonylové sloučeniny vznikající při oxidaci lipidů. Tato reakce je katalyzována aminy, jejich solemi ale například i pomocí albuminu. Následující reakce vedoucí až v produkty hnědnutí byly popsány u furfuralu, 2-oxopropanoát, méně často s cukry a aldoly samotnými. Na Obrázku 6 je uveden jeden z příkladů kondenzace aldolů – produkty štěpení cukrů reagují principem aldolové kondenzace pro vznik chinonů [4,6].



Obrázek 6 Schéma reakce F, kondenzace aldolu [4]

1.3.1.7. Reakce G: Kondenzace mezi aldehydem a aminem, tvorba heterocyklických dusíkatých sloučenin

Aldehydy obzvláště α,β -nenasycené reagují za nízkých teplot s aminy pro tvorbu polymerních, vysokomolekulárních, barevných, dusíkatých (3-4 %) produktů neznámé struktury, které také nazýváme melanoidiny. Bylo demonstrováno, že tyto polymery obsahují mj. pyridiny, pyraziny, pyrroly a imidazoly [3,4,5].

Výsledné složení melanoidinu se liší v závislosti na sloučeninách, které vstupovaly do reakce pro jeho tvorbu [4], například:

Glukóza + glycin → vysoký podíl hydroxylových skupin

Furfural + glycin → vysoký podíl etheru

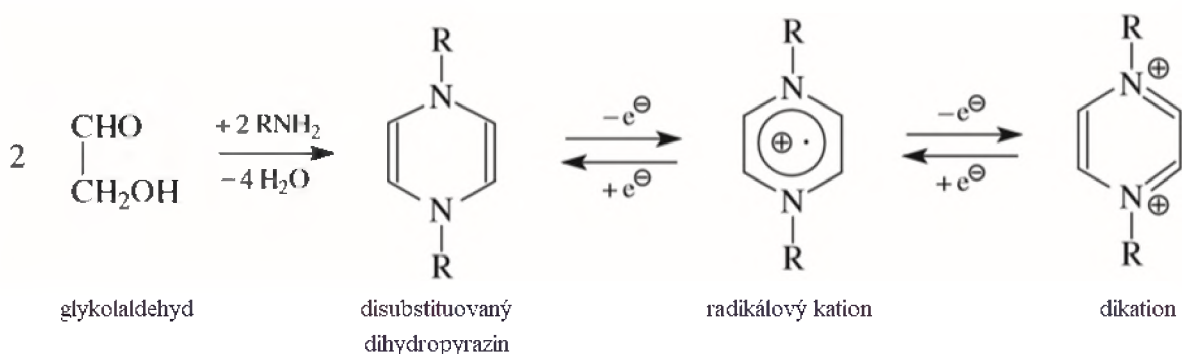
Pro charakteristiku vznikajících melanoidinů byly pozorovány následující pravidla:

- 1) Pro tvorbu vysokomolekulárních sloučenin je důležitější teplota než čas [7].
- 2) Eliminace molekul H₂O a CO₂ je častější za vyšších teplot (100 °C – 54 %) oproti nižším teplotám (68 °C – 30 %) [7].
- 3) Dusíkaté melanoidy (obecně tmavšího zbarvení) vznikají častěji za podmínek vyšší teploty a současné vyšší pH hodnoty [8].

1.3.1.8. Reakce H: Reakce volných radikálů

Přítomnost volných radikálů v průběhu Maillardovy reakce je známa, avšak popis postupu, kterým mohou přispívat k hnědnutí, byl uveden až v roce 1983 [9]. Volné radikály byly detekovány před vznikem Amadoriho produktů [10] a zároveň Amadoriho produkty jsou zodpovědné za asi 50 % produktů hnědnutí [11]. Z toho nutně vyplývá, že pro vznik produktů hnědnutí jsou tak možny dvě cesty – pomocí radikálů nebo pomocí iontů.

Vznik volných radikálů je podmíněn přítomností glykosylaminů [11] s následnou tvorbou Schiffovy báze a oxidací pro umožnění retroaldolizace. Avšak k přímé tvorbě volných radikálů dochází až po tvorbě sloučenin jako jsou glyoxal a glykolaldehyd (vznikající redukcí glyoxalu) [11], reakčním mechanismem znázorněným na Obrázku 7.



Obrázek 7 Schéma tvorby radikálových kationtů [4]

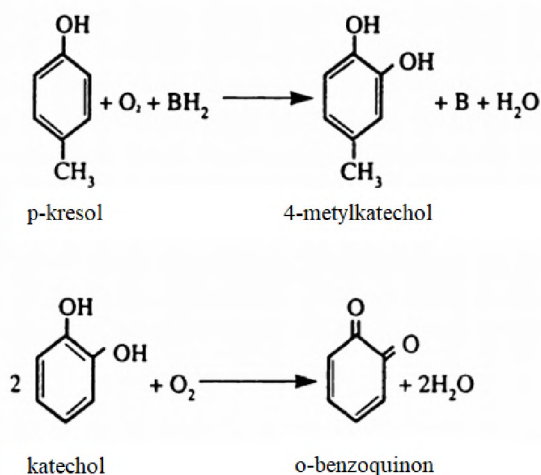
Tvorba radikálů (současně vedoucí ke zvýšení množství produktů hnědnutí) je obecně zvýšena při delším čase a za vyšší teploty pražení kávových zrn. Takováto tvorba radikálů byla asociována s přítomností 1,4-pyrazoniovými deriváty [12].

1.3.2 Reakce hnědnutí

Reakce hnědnutí zahrnují širokou škálu různých reakcí, které mnohdy nelze odlišit jednu od druhé. Hlavní kategorizace je však lehce odlišitelná podle enzymatické aktivity, na enzymatické a neenzymatické.

1.3.2.1. Enzymatické hnědnutí

Typickým příkladem této kategorie je hnědnutí ovoce a zeleniny. Při těchto procesech dochází k velkým ztrátám na kvalitě potravin u tropických plodin, které bývají transportovány delší dobu. Tomuto jevu podlehne až 50 % transportovaných potravin, zpravidla ovoce a zeleniny [13]. Za tuto reakci je zodpovědný enzym polyfenol oxidáza, který umožňuje oxidaci fenolů atmosferickým kyslíkem. Při této reakci dochází k zavádění hydroxy skupin na aromatickém jádře a k následné oxidaci hydroxylových skupin. Výsledným produktem enzymatické reakce jsou sloučeniny typu benzochinony (Obrázek 8). Tyto produkty mohou dále podstupovat neenzymatické oxidativní reakce, jejichž finálním produktem jsou hnědé pigmenty melaniny [14]



Obrázek 8 Základní reakce enzymatického hnědnutí [4]

1.3.2.2. Další reakce neenzymatického hnědnutí

Neenzymatické hnědnutí se odehrává běžně u potravin při tepelném opracování. Od enzymatických reakcí se tedy jasně odlišují podmínkami, které by jakoukoliv enzymatickou aktivitu znemožnily. Tento typ reakcí se rozděluje do několika typů, avšak jednotlivé typy

reakcí dávají produkty, které si jsou svou chemickou strukturou podobné. Zároveň produkty jednoho typu neenzymatického hnědnutí mohou vstupovat jako meziprodukty do jiného typu reakce neenzymatického hnědnutí (např. furan a furfural vzniká při degradaci askorbátu a oba produkty jsou dále zpracovány v Maillardově reakci, viz kapitola 2.3.4 Degradace kyseliny askorbové). Produkty těchto reakcí mohou být velmi různorodé, obzvláště při různých podmínkách reakce (pH a teplota) [14,15].

1.3.3 Hlavní typy neenzymatického hnědnutí

1.3.3.1. Karamelizace

Karamelizací se označuje proces degradace cukrů, pro který jsou nutné teploty 140 až 190 °C, nebo kyselé (pH < 3) či zásadité (pH > 9) prostředí [16]. Při této reakci vznikají těkavé sloučeniny (diacetyly) dávající potravinám specifickou vůni a polymery hnědého zbarvení – karamelany (C₂₄H₃₆O₁₈), karmeleny (C₃₆H₅₀O₂₅), a karmeliny (C₁₂₅H₁₈₈O₈₀) [15].

1.3.3.2. Peroxidace

Ne-enzymatická oxidace lipidů probíhá reakčním mechanismem volných radikálů, při nichž vznikají hyperoxidy. Ty jsou nestabilní a rychle reagují v mnoha různých reakčních variantách, při kterých dochází k degradaci různých substrátů, a tak vznikají produkty s různou molekulární vahou a charakteristikami (včetně vůně a hnědého zbarvení) [17].

Při peroxidaci lipidů vznikají produkty, které mohou podstupovat reakci podobného mechanismu jako je přímo Maillardova reakce. Produkty této reakce mohou ovlivnit průběh Maillardovy reakce a zároveň produkty reakcí hnědnutí mohou ovlivňovat oxidaci lipidů (obzvláště produkty s antioxidantními vlastnostmi) [18].

1.3.4 Degradace kyseliny askorbové

Kyselina askorbová je velmi dobrý antioxidant [19], jako taková je nejrozšířeněji používaným aditivem inhibující reakce hnědnutí [20]. Inhibice enzymatické reakce hnědnutí pomocí kyseliny askorbové je dosažena redukcí quinonů, které tak nemohou dále reagovat pro tvorbu pigmentů [21].

Avšak kyselina askorbová je relativně nestálá a za podmínek jako je např. vyšší teplota nebo přítomnost O₂ dochází k její degradaci [18]. Při degradaci vzniká například furan [22] nebo furfural a to jak za bez přítomnosti O₂, tak i za přítomnosti O₂ [23]. Furan, furfural a jejich deriváty jsou mj. jedny z meziproductů Maillardovy reakce, čímž může kyselina askorbová napomáhat tvorbě hnědých sloučenin v průběhu Maillardovy reakce [24].

1.4 Ovlivnění Maillardovy reakce

Vzhledem k různým aktivačním energiím a katalyzačním podmínkám jednotlivých kroků Maillardovy reakce, je zřejmé, že změny reakčních podmínek (hlavně pH a teplota) budou mít velký vliv na výsledné produkty Maillardovy reakce. Existují snahy ovlivňovat Maillardovy reakce tak, aby došlo k zabránění vzniku nežádoucích sloučenin (například karcinogeny mohou vznikat za vyšších teplot). V této práci bude kladen důraz vlivu pH na průběh Maillardovy reakce.

1.4.1 Látky ovlivňující Maillardovu reakci

Pro studium Maillardovy reakce se běžně využívá nejrůznějších kombinací aminokyselin a cukrů. Pro experimentální část diplomové práce byly vybrány lysin jako zástupce aminokyselin a glukóza z řad cukrů. Do Maillardovy reakce mohou vstupovat i další látky, které ji ovlivňují. Mohou ji například zpomalit. Pro tento účel byl vybrán rutin, který má antioxidační vlastnosti.

1.4.1.1 Lysin

Lysin, 2,6-diaminohexanová kyselina, je typ aminokyseliny s bazickými skupinami na postranním řetězci (při pH = 7 je s kladným nábojem). Lysin je jedna z devíti esenciálních aminokyselin pro člověka. Vyskytuje se obzvláště v červeném mase, rybách a mléčných produktech. L-lysin je nutriční suplement, který obsahuje biologicky aktivní L-izomer aminokyseliny lysin. Lysin se podílí na mnoha životních funkcích mj. příjmu vápníku, tvorbě kolagenu, správné funkce pojivové tkáně a imunitního systému. Správný metabolismus lysinu je závislý na niacinu, vitamínu B6, C, riboflavínu, kyseliny glutamové a atomu železa [25].

Lysin obsahuje na svém postranním řetězci ϵ -aminoskupinu, díky které se může nacházet v „blokové formě“, to je biologicky neaktivní forma, při které je ϵ -aminoskupina lysinu vázána k redukujícím cukrům. Díky ϵ -aminoskupině je taky lysin velmi reaktivní pro účely Maillardovy reakce, vzhledem k tomu, že ϵ -aminoskupina může podstupovat glykaci. Při reakcích různých aminokyselin s glukózou bylo pozorováno největší reaktivity právě s lysinem. Pokud při skladování potravin probíhá Maillardova reakce, rychle se lysin, esenciální aminokyselina, ztratí. Tak ztrácí potravina nutriční hodnotu [25].

1.4.1.2 Glukóza

Glukóza (D-glukóza, D-glukopyranóza) má prostorovou orientaci typu D konfigurace. Glukóza je monosacharid obsahující šest uhlíkových atomů s aldehydovou (aldohexóza).

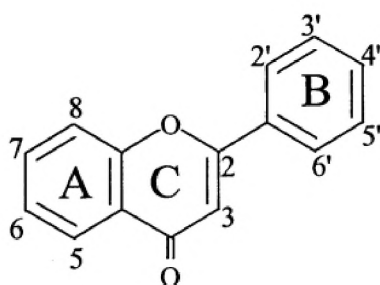
Molekula glukózy může existovat jak v otevřené, tak i v cyklické formě, a to pomocí vnitromolekulární reakce mezi aldehydovým uhlíkem a C5 hydroxylovou skupinou pro vytvoření hemiacetalu. Ve vodním roztoku jsou obě formy v rovnováze a při pH = 7 představuje cyklická forma většinu molekul. Glukóza je základní zdroj energie, u živočichů uchovávan v podobě glykogenu. Živočiškové syntetizují glukózu z meziproductů metabolitu, jako jsou pyruvát a glycerol v procesu glukoneogeneze. Glukóza je redukující cukr a jako taková může reagovat v Maillardově reakci již v prvním kroku [25].

1.4.1.3. Rutin

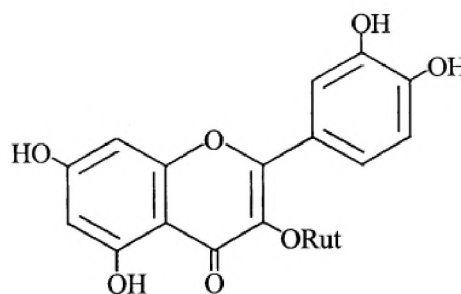
Rutin je sloučenina patřící mezi flavonoidní glykosidy vyskytující se v zelenině (nejdostupnější v pohance) a ovoci. Rutin je látka, která má pozitivní účinky na lidské zdraví díky její antioxidační schopnosti, antihypertenznímu účinku, protizánětlivému účinku ale třeba i schopnosti posilovat pevnost či flexibilitu kapilár. Vzhledem k těmto i dalším vlastnostem rutinu je tato sloučenina extenzivně studována a to jak na poli klinického výzkumu, tak i na poli biologie a chemie [25,26].

Chemický vzorec rutinu je 3,4',5,7-tetrahydroxyflavone-3-rutinoside, tento vzorec je uveden na Obrázku 9. Sumární vzorec rutinu je $C_{27}H_{30}O_{16}$ a z chemického pohledu hovoříme o jeho molekule jako o rutinosidu kvercetin, který má hydroxidovou skupinu na pozici C3 substituovanou glukózou a ramnózou (cukry). Takže je to derivát disacharidů, kvercetin O-glukosidu, tetrahydroxyflavonu a rutinosidu [25]. Velmi důležitá chemická vlastnost rutinu souvisí s jeho antioxidačními a inhibiční schopnosti produktů pokročilé glykace [26].

Vzorec struktury flavonoidů



Vzorec struktury rutinu



Obrázek 9 **Strukturální vzorec flavonoidů (vlevo) a strukturální vzorec rutinu (vpravo)**

1.4.1.4. Reakce směsi glukóza + lysin v Maillardově reakci

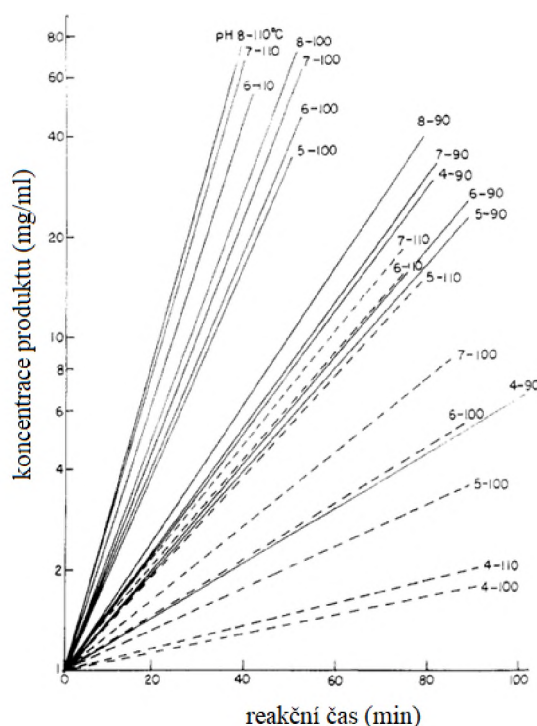
Průchod Maillardovy reakce se směsí glukózy a lysinu (model glu-lyz) probíhá, dle Hodgeho rozdělení Maillardovy reakce takto:

1) Počáteční fáze

Vzniká nestabilní Amadoriho produkt: fructosyl-lysin, ale i další Amadoriho sloučeniny: (detekované za jiných podmínek) monofructosyl-L-lysin (MFL) a difructosyl-L-lysin (DFL) [27]. První tvorba produktů Maillardovy reakce u glu-lyz systému je charakterizována detekovatelnou absorpcí v absorpčním spektru 220 nm, která koresponduje se vznikem karbonylových sloučenin.

Dle analýzy kinetického průběhu reakce glukózy s lysinem jsou v počáteční fázi zapotřebí větší než stechiometrické množství glukózy a produkty této počáteční reakce jsou úměrné na koncentraci lysinu [27].

Produkce MFL a DFL je závislá na pH i na teplotě. U použitých experimentálních podmínek dochází k největší produkci jak MFL i DFL za nejvyšší hodnoty pH a teploty [27] (Obrázek 10).



Obrázek 10 Graf lineární regrese produkce monofructosyl-L-lysin a difructosyl-L-lysinu (plná čára) a difructosyl-L-lysinu (přerušovaná čára) v závislosti na pH a teplotě [27].

2) Pokročilá fáze

Rozklad Amadoriho sloučenin, jejichž výsledkem jsou variabilní produkty v závislosti na pH. Za nízkého pH vzniká hydroxymethylfurfural (HMF). Za vyšší hodnoty pH dochází ke Streckerově degradaci, při které dikarboxylové sloučeniny reagují s aminokyselinami za konečného vzniku aldehydů nebo karbondioxidů [4].

Kyselou hydrolyzou Amadoriho produktů vzniká také ϵ -N-furoylmetyl-L-lysin (sloučenina furozinu), který se používá jako měřítko průběhu Maillardovy reakce. Touto sloučeninou se tak hodnotí kvalita a stupeň degradace u skladovaných potravin [28].

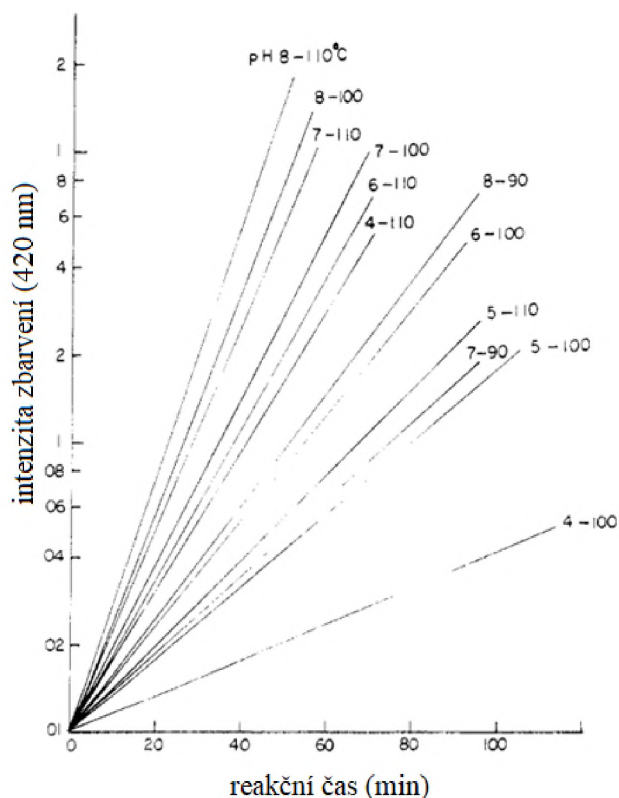
Tato fáze se vyznačuje maximem absorpčního spektra za vlnové délky 280 nm, která se alespoň částečně přisuzuje heterocyklickým derivátům. Jak reakce postupuje, tak absorpce ve vlnové délce 280 nm postupně klesá, což je způsobeno vznikem melanoidinů [29].

Dalším produktem této fáze jsou pokročilé produkty glykace, probíhající i in vivo, které souvisí s oxidativním stresem či stárnutím. Reakce ϵ -aminoskupiny lysinu s produkty oxidace glukózy (glyoxal či methylglyoxal) vedou k tvorbě N-karboxymetyllysinu nebo N-karboxyethyllysinu. Sekundárně může být N-karboxymetyllysinu produkován oxidací Amadoriho produktu fruktozyl-lysinu. N-karboxymetyllysinu se tvoří v potravinách v různých reakcích a může existovat volný nebo jako součást proteinu [30].

3) Konečná fáze

Typická je v této fázi tvorba melanoidinů se širokou škálou molekulárních hmotností, různým zastoupením obsahu dusíku v molekulách a s různou vůní či barvou. Melanoidy mají maximum absorpce při vlnové délce 320 nm. Používá se i měření při vlnové délce 420 nm pro podchycení množství produktu a pokročilost Maillardovy reakce [4,31]. Vzniklé barevné formace jsou způsobeny kombinací nízkomolekulárních sloučenin i melanoidů [32]. Největšího výsledku hnědnutí v modelu glu-lyz dochází za pH 9 až 10 [32]. Průběh závislosti výsledného produktu hnědnutí na pH je podobný v modelu glukóza-lysinu, tak i u dalších kombinací cukrů a aminokyselin, avšak nejrychleji probíhala reakce s lysinem [33].

Koncentrace produktů hnědnutí jsou úměrné vyšším hodnotám pH (Obrázek 11). Tato závislost se však snižuje s vyšší reakční teplotou. DFL potřebuje větší aktivační energii (10,4 kcal/mol) než MFL (7,9 kcal/mol), avšak aktivační energie obecně byla snížena při vyšších hodnotách pH. V porovnání s ostatními reakcemi – za pH 5 tvorba MFL nebo DFL má značně menší aktivační energii oproti tvorbě fruktóza-L-tryptofanu (19,0 kcal/mol) za pH 5.2 [27].



Obrázek 11 **Graf lineární regrese produkce monofruktosyl-L-lysin (plná čára) a difruktosyl-L-lysinu (přerušovaná čára) v závislosti na pH a teplotě [35]**

1.4.1.5. Vliv směsi lysin - glukóza na Maillardovu reakci

Do Maillardovy reakce vždy vstupuje směs aminokyseliny a redukujících cukrů. Pro experimentální část práce byl vybrán lysin a glukóza. V dalším kroku do reakce a směsi vstupuje rutin jako látka zpomalující proces reakce.

1.4.1.6. Vliv rutinu na Maillardovu reakci

Antioxidační funkce rutinu spočívá v tendenci jeho hydroxylových skupin, které jsou primárně oxidovány na B jádře. Tento děj následně ovlivňuje celou Maillardovu reakci. Obecně flavonoidy mají vliv na Maillardovu reakci a to konkrétně při tvorbě 1,4-pyrazinových derivátů při reakci mezi glukózou a 3-aminobutanoovou kyselinou. V normálních reakčních podmínkách (98 °C, pH 9,0) tvoří flavonoidy aniontové radikály, které reagují přímo s volnými radikály tvořící se za Maillardovy reakce mezi glukózou a 3-aminobutanoovou kyselinou [4,34]. Nejlépe tuto inhibici umožňují ty flavonoidy, které mají strukturu svého aromatického cyklu B v seskupení 3',4'-*ortho*-dihydroxy seskupení. Rutin toto uspořádání ve svém aromatickém cyklu B obsahuje (Obrázek 9) [35].

Během Maillardovy reakce dochází k tvorbě stabilních radikálů jak v modelových systémech [36], tak v potravinách [37]. V modelových systémech byly radikály popsány jako radikálové kationty pyrazinia, které vznikají reakcí aminu s α -dikarbonyly [36]. Tvorba těchto radikálů je spojená s produkty hnědnutí. Rutin je schopen tyto radikály efektivně redukovat, čímž znemožňuje další propagační reakce [38], a tak rutin ovlivňuje výsledky Maillardovy reakce.

V průběhu Maillardovy reakce vznikají mj. i α -dikarbonyly (glyoxal, metylglyoxal a deoxyosones) mechanismem fragmentace a dehydratace Amadoriho nebo Heynsova produktu, alternativně mohou vznikat degradací cukrů [4]. α -Dikarbonyly popsány v potravinách, spíše tepelně upravených [38,39]. α -dikarbonyly jsou reaktivní meziprodukty, které urychlují Maillardovu reakci vzhledem k jejich velké reaktivnosti oproti glukóze. Mnoho farmaceutik a potravinových aditiv, které inhibují Maillardovu reakci, jsou zároveň schopny vychytat α -Dikarbonyly. Právě rutin díky své hydroxylové skupině na aromatickém jádře A (Obrázek 9) umožňuje para- a orto- řízenou elektrofilní aromatickou substituci [11]. Tím vychytává glyoxyl a metylglyosal a směřuje tak Maillardovu reakci k inkorporaci více molekul glukózy (v případě modelu glu-X) [26]. Vychytávání α -dikarbonylů se odehrává na jádře A rutinu, přičemž oxidace se odehrává na jádře B rutinu. Jedna molekula rutinu je schopna zastávat funkce vychytávání α -dikarbonylů i po té, co bylo jádro B oxidováno [40].

Přidání vyššího množství rutinu při pečení dortu mělo efekt na zvýšení antioxidantních schopností výsledných produktů Maillardovy reakce [41]. Další pozitivní efekt přídavku rutinu spočívá v ochranném efektu na blokování lysinu, který byl patrný nižší tvorbou furozinu. Zároveň přidání rutinu indukuje větší produkci melanoidinů u Maillardovy reakce (samy melanoidiny mohou mít antioxidantní schopnosti) [4].

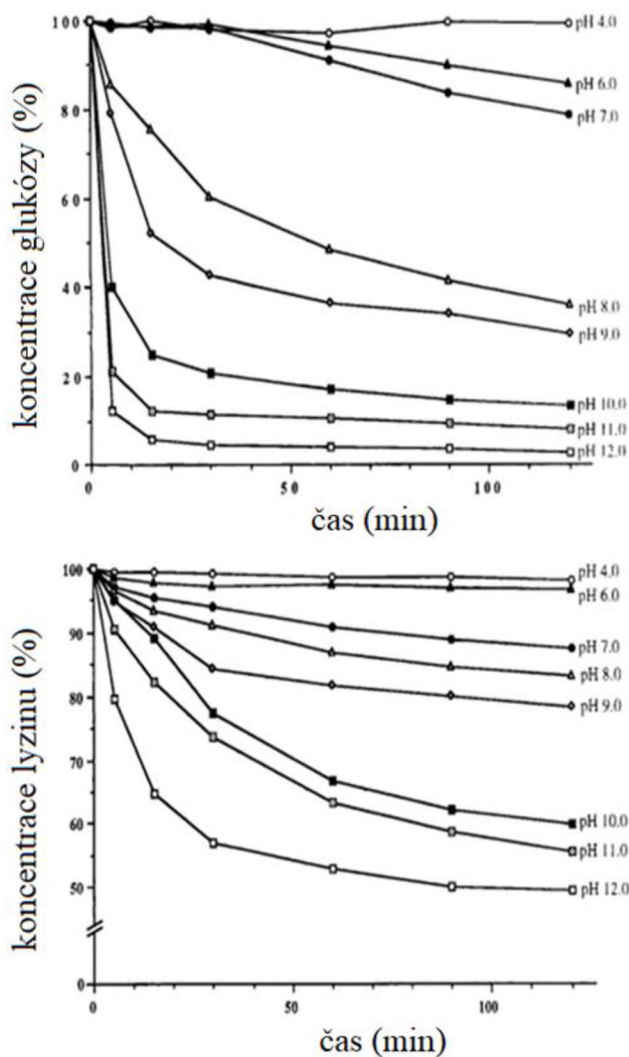
1.4.2 Vliv teploty

Maillardova reakce probíhá velmi pomalu za nízkých teplot, ale při dlouhodobém skladování můžeme pozorovat výsledné produkty hnědnutí u potravin. Avšak pokud jsou potraviny skladovány za teploty pod 10 °C, tak k hnědnoucím reakcím nedochází [4].

Ideální teplota pro Maillardovu reakci je v teplotním rozmezí 140 až 165 °C. Při zvyšující teplotě dochází k tvorbě produktů o vyšší molekulární hmotnosti [15]. Přičemž alespoň v rozmezí 100 až 155 °C dochází ke zvýšené tvorbě produktů hnědnutí se vzrůstající teplotou [42]. Zároveň platí obecné mechanismy chemických reakcí – čím vyšší je aktivační energie dané reakce, tím rychleji probíhá reakce s vyšší teplotou. Doba vystavení teploty má vliv na kvalitu produktů Maillardovy reakce [42].

1.4.3 Vliv pH

Vliv pH na Maillardovu reakci je dobře zdokumentován jako nejdůležitější efekt pro konečný výsledek reakce [36]. Základní pohled vlivu pH pro celou Maillardovu reakci nám poskytne práce od Amese (1998), který pozoroval, jak hodnota pH ovlivňuje změnu vstupních látek Maillardovy reakce v modelu glukóza-lysin [29] (Obrázek 12).

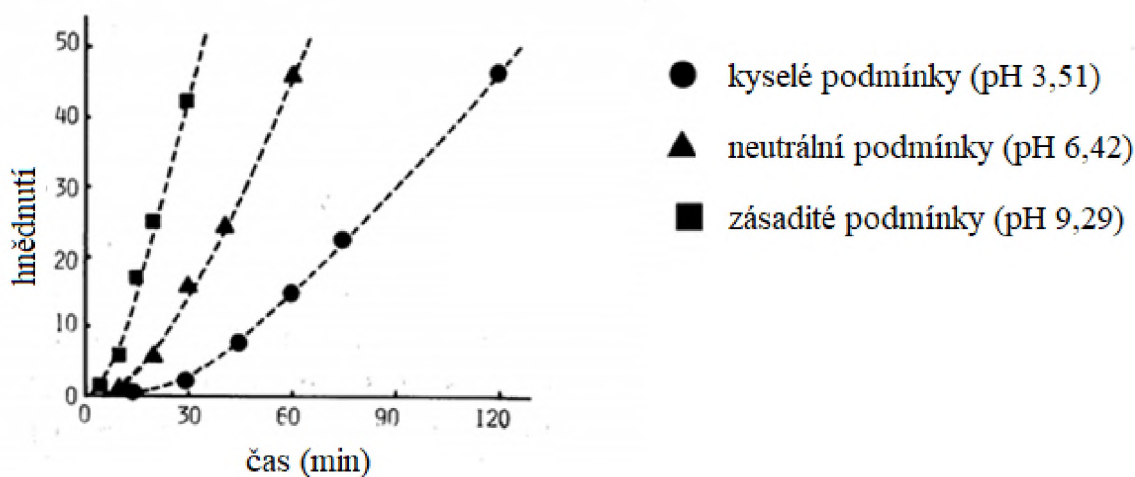


Obrázek 12 Graf koncentrace vstupních látek Maillardovy reakce (glukóza-nahoře, lysin-dole) závislý na době trvání Maillardovy reakce a při odlišných pH reakce [29]

Na Obrázku 12 můžeme pozorovat grafy závislosti pH na změny množství glukózy a lysinu v průběhu Maillardovy reakce. Podle horního grafu obrázku je zjevné, že glukóza reaguje relativně málo při pH v hodnotách 4, 6, 7. Při hodnotách pH 8 a 9 k přeměně glukózy dochází ve větší míře, avšak až za hodnot pH 10, 11 a 12 dochází k velmi rychlé změně 80 % a více množství glukózy [29].

Ve spodním grafu téhož obrázku můžeme pozorovat změnu množství lysinu za odlišných hodnot pH. Na první pohled je vidět, že vliv hodnoty pH má obdobný efekt jako na změnu množství glukózy. Konkrétně při pH 4 a 6 dochází k úbytku lysinu relativně málo. Při hodnotách pH 7, 8, 9 k úbytkům lysinu dochází ve větší míře, avšak pomalu. Až při hodnotách pH 10, 11, 12 dochází k úbytku lysinu ve větší míře, ale v porovnání s glukózou pomaleji [29].

Hodnota pH ovlivňuje zásadním způsobem i tvorbu výsledných produktů hnědnutí, jak demonstruje práce Hayashiho a Namikiho [43]. Při vyšších hodnotách pH (9,29) dochází k tvorbě hnědých produktů rychleji (30 minut) oproti neutrálnímu pH (6,42) za 60 minut, nebo kyselému pH (3,51) za 120 minut pro tvorbu srovnatelného množství hnědých produktů (Obrázek 13) [43]. A zároveň s vyšším pH (od 3 do 11) dochází k tvorbě produktů s vyšší intenzitou zbarvení [42].



Obrázek 13 Graf závislosti stanovené hodnoty hnědnutí na době průběhu Maillardovy reakce za různých hodnot pH [43].

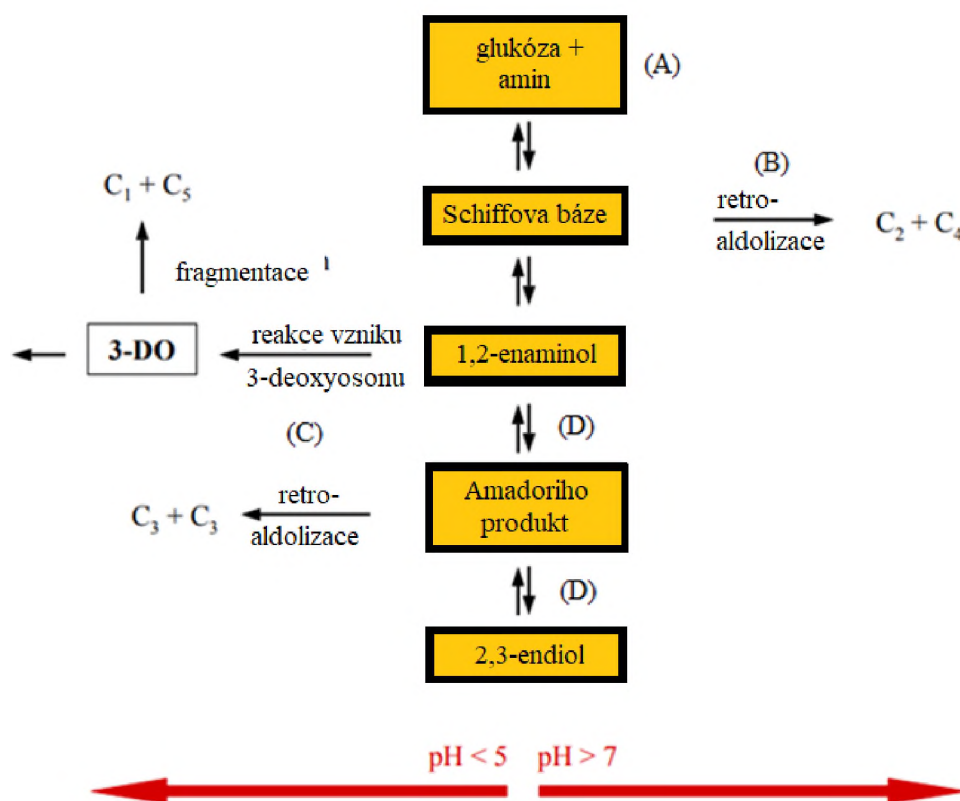
Jak autoři prokázali, pH prostředí má efekt na množství produktu vznikajícího během Maillardovy reakce. Efekt byl také závislý z velké části na průběhu reakce štěpení cukrů (reakce D v přehledu Hodgeho schématu). V modelovém systému glukóza-alanin totiž docházelo k tvorbě fragmentů cukrů o délce 2 nebo 3 uhlíků, jejichž množství vzrůstalo s hodnotou pH a korespondovalo s tvorbou produktů hnědnutí [43].

Hodnota pH má taktéž vliv na typ výsledného produktu Maillardovy reakce. Například Shaw a kolegové (1990) analyzovali aroma v závislosti na podmínkách mj. i pH v modelu ramnóza-prolin. „Popkornové“ aroma bylo produkováno za vyšší pH nezávisle na teplotě, avšak „maltolové“ aroma je přítomno pouze za vysoké hodnoty pH a nižší teploty [44].

V obecné rovině můžeme hovořit o vlivu hodnoty pH na výsledek reakce v těchto bodech:

- 1) Kyselejší pH zvyšuje protonizaci karbonylové skupiny (zvýšení reaktivit) i protonizaci aminokyselin (snížení reaktivit). Tato skutečnost má například dopad na první krok Maillardovy reakce (viz dále).
- 2) S nižší hodnotou pH se zvyšuje aktivační energie reakce tvorby melanoidinů (popsáno v systému lyz-glu, viz kapitola 2.4.1.4 Reakce směsi glukóza + lysin v Maillardově reakci). S čímž souvisí fakt, že při rostoucí hodnotě pH se zvyšuje rychlost Maillardovy reakce. Ve skutečnosti nejrychleji dochází k tvorbě hnědého zbarvení při pH v rozmezí 9–10.
- 3) Katalýza pomocí pH probíhá u Maillardovy reakce při Amadoriho přeskupení (viz reakce B), kdy je pro tvorbu enamínolu nutná protonizace dusíku molekuly N-glukosylaminu. Tato reakce bude probíhat snadněji v kyselém prostředí oproti prostředí bazickému. Protony H^+ však mohou být dodány z přítomných kyselých aminokyselin.

Typ dráhy, kterým se bude Maillardova reakce ubírat je taktéž ovlivněný hodnotami pH. Na Obrázku 14 jsou znázorněny hlavní dráhy, které jsou ovlivněny hodnotou pH, popsány budou kroky (A) až (D):



Obrázek 14 Schéma hlavních fází Maillardovy reakce ovlivněných hodnotou pH [45]

- (A) Hned první krok Maillardovy reakce, interakce aldózy a aminu, je ovlivněn hodnotou pH. V případě, že amin bude protonován, nebude mít dusík tak parciální záporný náboj a reakce mezi aldehydovým uhlíkem s parciálně pozitivním nábojem nebude probíhat.
- (B) Za bazického prostředí ($\text{pH} > 8$) Schiffova báze podstupuje reakci retroaldolizace a vznikají molekuly jako je glykoaldehyd imin nebo izomerní alkylaminoetanal, které jsou následně oxidovány atmosférickým kyslíkem pro vznik glyoxal monoiminu [9].
- (C) Obě reakce (3-deoxyrouta, 3-deoxyosone a retroaldol) jsou podmíněny mezikrokem, při kterém dochází k odtržení $-\text{OH}$ skupiny. Jako taková tato reakce neprobíhá za bazických podmínek, ale pouze za kyselějšího pH.
- (D) Obecně taky platí pro celkový výsledek Maillardovy reakce, že při vzrůstající hodnotě pH dochází k tvorbě produktů, které častěji obsahují ve své molekule atom dusíku [46].
- (E) Jeden z nejdůležitějších bodů, při němž pH reguluje Maillardovu reakci je po vytvoření Amadoriho produktu. Tehdy hodnota pH ovlivňuje typ enolizace: 1,2 za nízké pH nebo 2,3 za vysoké pH hodnoty. Vyšší pH vede k preferenci produkce furfuralů (dehydratace cukrů – reakce C, alternativa reakce 1,2-enolizace), přičemž takto dochází k větší tvorbě barevných produktů (oproti 2,3-enolizaci). Nízká pH podporuje tvorbu 2-furaldehydu (1,2-E), kdežto vysoké pH propaguje tvorbu furanonu (2,3-E). V tomto případě je důležité, jak bazicita aminu ovlivňuje reakční dráhu. Méně bazický (např. dibenzylamin) je méně často protonován, a proto více náchylný pro 2,3-E.

Některé produkty vznikají pouze za určitých podmínek pH. Např. při studiu degradace fruktoglycinu s pH hodnotami 5, 6, 7, 8 byli Davídek et al. [47] schopni identifikovat HMF pouze při pH 5, kdežto produkty alternativní k HMF byly detekovatelné u celé studované pH škály. Zajímavostí je, že fosfátový pufr akceleroval tvorbu alternativních produktů degradace za pH 5 a 6, kdežto tvorba HMF nebyla ovlivněna. Což může značit, že i podstata pufru ovlivňuje výsledek reakce, pravděpodobně katalyzou fosfátem za nižších pH hodnot [47].

1.5 Produkty Maillardovy reakce

Pravděpodobně nejdůležitější neenzymatickou reakcí hnědnutí je právě Maillardova reakce. V prvním kroku Maillardovy reakce interagují karbonylové skupiny (většinou redukujících cukrů) se sloučeninami obsahující volnou amino skupinu (často aminokyseliny ve formě bílkovin). Avšak pojem Maillardova reakce zahrnuje velké množství různých reakcí, základní kroky budou popsány v kapitole 2.3 Chemická podstata Maillardovy reakce [4].

Produkty těchto reakcí jsou závislé na velkém množství podmínek a podle toho vznikají různorodé sloučeniny s odlišnou molekulární hmotností, barevností, těkavostí, zastoupení atomu dusíku, chutí a vůní. Pro účely této práce budou relevantní tyto kategorie: melanoidiny, premelanoidiny, produkty s antioxidačními vlastnostmi nebo mutagenními vlastnostmi a i další [48]:

a) Melanoidiny

Obsahují variabilní množství dusíku, molekulární váhy a jsou různě rozpustné ve vodě. O struktuře těchto sloučenin není moc známo. Většina těchto sloučenin je hnědá, ale mohou existovat i jiné barvy. Právě mnohé z melanoidinů jsou ty produkty vznikající při pečení, smažení a grilování, které dávají pečivu, masu a obecně potravinám lepší chuť a vůni [48].

b) Premelanoidiny

Těkavé sloučeniny s obzvláště typickou vůní a chutí. Žádané při vaření, pečení, smažení apod. Avšak tyto sloučeniny zahrnují i nelibě vonící a chutnající složky, které vznikají při dlouhodobém skladování, obzvláště v dehydrovaném stavu nebo při teplotní úpravě potravin s účelem pasterizace/sterilizace vedoucí k tvorbě hořkých sloučenin (např. u přehřátého čaje nebo kávy) [49].

c) Antioxidanty

Redukční produkty a antioxidanty s velmi silnými redukčními vlastnostmi, které ochraňují před oxidativní degradací jídla. Obecně tyto sloučeniny snižují oxidativní stres, a tak snižují riziko degenerativních onemocnění. Antioxidativní vlastnosti mohou mít i melanoidiny [24] či paramelanoidiny [49].

d) Mutagenní sloučeniny

Obecně vznikají po dlouhodobém skladování [4]. Oproti antioxidantům naopak podporují oxidativní stres. Mutagenní sloučeniny mohou být jak melanoidiny, tak i paramelanoidiny [49].

1.6 Metody pro měření Maillardovy reakce

Pro účely diplomové práce byly použity klasické spektrální metody – spektrofotometrie ve viditelné a UV oblasti a infračervená spektrometrie. Dále byla experimentálně využita metoda kapilární izotachofórze.

1.6.1. Spektrální metody

Zahrnují absorpční spektroskopii ve viditelné a ultrafialové oblasti (UV-VIS), infračervenou absorpční spektroskopii (IČ), nukleární magnetickou rezonanci (NMR) a hmotnostní spektroskopii (MS) [50].

Spektrální metody jsou založeny na principu měření energetických změn, které nastávají při průchodu záření látkou. Atomy a molekuly se za normálních podmínek nachází na základní energetické hladině. Při dodání určitého množství energie pak mohou přecházet do vyšších energetických stavů, tyto stavy se nazývají excitované. Rozdíl mezi počáteční a konečnou energií je roven výměnné energie. Tato energie je rovna množství energie, která byla vyzářena látkou při přechodu z excitovaného stavu do stavu základního [51]. Výhody spektrálních metod spočívají v rychlosti měření, malého množství analytu bez destrukce. [50].

1.6.1.1. Spektrofotometrie UV-Vis

Spektrofotometrie UV-Vis patří mezi nejstarší fyzikálně-chemické metody. Využívá absorpce elektromagnetického záření látkami v UV-VIS oblasti. Řadí se mezi optické metody. Měření probíhá v rozmezí vlnových délek 200–800nm. Ultrafialové záření se měří v oblasti vlnových délek 10 až 400 nm, zatímco oblast viditelná je měřena ve vlnových délkách 400 až 800 nm. Absorpcí energie v UV-VIS oblasti se získají absorpční spektra, která se vyjádří pomocí grafu závislosti absorpance na vlnové délce. Pohlcením určitého kvanta fotonů přejde molekula ze základního stavu do stavu excitovaného, to znamená, že foton přestoupí do vyšší energetické hladiny a následně vyzáří určité kvantum fotonů z vyšší do nižší energetické hladiny, tím se emituje záření. Spektra udávají závislost absorpance nebo času na vlnové délce [52].

1.6.2. Kapilární izotachofórze

Vzorek je aplikován mezi dva elektrolyty, jedním je vedoucí elektrolyt (Leading electrolyte), který se nachází v prostoru katodové elektrody a druhý koncový elektrolyt (Terminating electrolyte), který se nachází v prostoru anodové elektrody. Následně je zapojen jednosměrný elektrický proud, jako důsledek se začnou jednotlivé kationty a anionty pohybovat

směrem opačně nabitých elektrod a řadí se dle své pohyblivosti. Po uplynutí času analýzy a dosažení rovnovážného stavu se všechny ionty pohybují stejnou elektroforetickou rychlostí. Zároveň jsou seřazeny dle pohyblivosti s klesající tendencí a sousední zóny dosáhnou ostrého rozhraní [56,5].

1.7 Antioxidanty

Antioxidanty se rozumí látky, které v porovnání s ostatními oddalují nebo inhibují oxidaci a to i v malých koncentracích. Antioxidanty jsou rozděleny do dvou základních skupin na primární a sekundární. Primární antioxidanty se přidávají ve stopových množstvích a jejich úkolem je zpozdit nebo zcela zamezit zahájení oxidačních procesů vlivem reakce s lipidovými radikály nebo s peroxylovými radikály. Sekundární antioxidanty jsou většinou sloučeniny zpomalující rychlost oxidačních procesů [57].

Antioxidační látky přidávané do potravin mohou být vyráběny synteticky nebo mohou být přirozenou součástí některých potravin (rostlinné biofenoly). V důsledku náročného zpracování potravin pro získání čistého antioxidantu jsou v současné době hojně využívány syntetické formy antioxidačních látek. Přirozeně vyskytující se antioxidanty byly dříve používány především z důvodu obav ze škodlivosti synteticky vyrobených náhražek. Antioxidační aktivita syntetické i přírodní alternativy jsou velmi podobné [57].

1.7.1. Antioxidační aktivita s využitím stabilního radikálu DPPH

Metoda popisující souvislost antioxidačních látek s redukcí DPPH radikálu (1,1-difenylyl-2-pykrylhydrazyl). V praxi se sleduje úbytek absorbance, která je měřena spektrofotometricky při vlnové délce 517 nm. Princip metody spočívá ve vychytávání volných radikálů pomocí sloučeniny DPPH., dle intenzity se barva DPPH radikálu mění ze sytě fialové do žluté a snižuje se i absorbance. Výsledky se vyjadřují ekvivalentním množstvím látky zvané Trolox (kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová) v mg/100g sušiny. Trolox je antioxidační látka podobná vitamínu E, která je používána ke snížení oxidačního stresu. Výsledná hodnota koncentrace Troloxu odpovídá antioxidační aktivitě vzorku [58,59].

1.7.2. Stanovení fenolických látek

Metodu je také možné najít pod názvem metoda dle Folin-Ciocalteua. Jejím principem je zjištění celkového obsahu fenolických látek pomocí redukce činidla Folin-Ciocalteua, které tvoří modrý komplex fosforečnanu molybdenového a fosforečnanu wolframového a je důležitým parametrem při stanovení antioxidační kapacity. Tvorba požadovaného komplexu obvykle vzniká okolo 765 nm. Výsledky se vyjadřují jako mg GAE (kyseliny gallové) na 100 g sušiny. Tedy použití ekvivalentu kyseliny gallové jako standardu [59,60].

1.7.3. Vychytávání peroxidu vodíku

Schopnost vychytávat peroxid vodíku je založena na testu zkoumající reakci železitého iontu Fe^{3+} a 1,10-fenantrolinu. Přítomné fenolické látky redukují Fe^{3+} na Fe^{2+} . Při reakci se tvoří

typický červenooranžový komplex. Po přidání peroxidu vodíku do zkumavky a následně 1,10-fenantrolinu se Fe^{2+} ion oxiduje na Fe^{3+} . Výsledek se udává jako % schopnosti vychytávat peroxid vodíku [59,60].

1.7.4. Redukční vlastnosti

Metoda zabývající se fenolickými látkami, které redukují Fe^{3+} na Fe^{2+} . Princip metody spočívá v redukcí železitých iontů na železnaté. Během zahřívání dochází ke vzniku konjugátů. Na zvýšení redukční síly vzniklých konjugátů se podílí hydroxylové a pyrrolové skupiny, které vznikají v pokročilé fázi Maillardovy reakce. Se stoupající intenzitou hnědnutí zpravidla stoupá i schopnost redukce. Absorbance se měří při 700 nm [59,60,61].

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentu bylo porovnání reakce glukózy s lysinem při teplotě 95 °C v prostředí s různým pH. a zda může rutin tuto reakci ovlivnit. Pracovní hypotéza zní: rutin účinně inhibuje Maillardovu reakci mezi glukózou a lysinem a snižuje tvorbu produktů. Průběh reakcí byl sledován spektrofotometrií UV-Vis a izotachoforézou. U všech vzorků byly rovněž sledovány různé antioxidační vlastnosti.

2.1 Použité nástroje a chemikálie

2.1.1. Použité přístroje

Vodní lázeň Memmert WNB 22 (Memmert, Německo)

Spektrofotometr UV 2600 (Shimadzu, Japonsko)

Spektrofotometr DU 530 (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA)

Dvoukolonový izotachoforetický analyzátor Electrophoretic Analyser EA 102 (Villa Labeco, Spišská Nová Ves)

Váhy KERN 440–35 N (Kern, Německo)

Analytické váhy KERN ABT 220–4 M (Kern, Německo)

2.1.2. Použité počítačové programy

Word Office 365 (Microsoft, USA)

Excel Office 365 (Microsoft, USA)

ACD/ChemSketch (Advanced Chemistry Development, Inc., Kanada)

2.1.3. Použité pomůcky

Laboratorní sklo

Laboratorní pH metr CG 842(SCHOTT, Německo)

Automatické pipety (Eppendorf, Česká republika & Slovensko)

2.1.4. Použité chemikálie

D-glukóza-monohydrát čistoty p.a. (Penta, Česká republika)

L-lysín-monohydrát čistoty 99 % (Merck, Německo)

Rutin-hydrát čistota (Chemical Industry Co, Tokyo)

Kyselina fosfočná (Riedel de Haen, Německo)

Kyselina octová (Riedel de Haen, Německo)

Kyselina boritá p.a. (Lach-ner, Česká republika)

Hydroxid sodný p.a. (Penta, Česká republika)
Metanol (Riedel de Haen, Německo)
Etanol (96%, Lach-Ner, Česká republika)
Hexakynoželezitan draselný p.a. (MikroChem, Česká republika)
Kyselina trichloroctová (Sigma-Aldrich, Německo)
Chlorid železitý (Lach-ner, Česká republika)
Síran železnatoamonný (Lach-ner, Česká republika)
Peroxid vodíku (Sigma-Aldrich, Německo)
1,10-fenantrolin (Sigma-Aldrich, Německo)
Činidlo Folin-Ciocauteua (Sigma-Aldrich, Německo)
Uhličitan sodný p.a. (Lach-Ner, Česká republika)
Kyselina gallová (Sigma-Aldrich, Německo)
DPPH radikál 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, volný radikál (Sigma-Aldrich, Německo)
Trolox 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina $\geq 98,0\%$
(Sigma-Aldrich, Německo)

2.2 Příprava roztoků

2.2.1. Příprava zásobního roztoku pufru Britton-Robinson (B-R)

Na pufr byl potřeba 0,2M roztok NaOH, který byl připraven rozpuštěním 4 g pevného NaOH v 0,5 l destilované vody.

Na směs kyselin, která se následně mísila s roztokem 0,2M NaOH, byla použita 0,04M 85% H_3PO_4 , - 1,36 ml kyseliny do 500 ml destilované vody. Dále 0,04M CH_3COOH – 1,135 ml do 500 ml destilované vody a 0,04M H_3BO_4 – 1,372 g do 500 ml destilované vody. Směs kyselin byla připravena do 500 ml baňky a následně s roztokem NaOH bylo namícháno požadované pH 3, 7, 10 pomocí pH metru.

2.2.2. Příprava vzorků

Pro experimentální část diplomové práce byl použit 0,1 M roztok glukózy. Na přípravu roztoku glukózy bylo potřeba 1,9817 g monohydrátu glukózy do 100 ml roztoku B-R pufru. Pro 0,05 M roztok lysinu bylo použito 0,82105 g monohydrátu lysinu do 100 ml roztoku pufru. Rutin byl připraven jako 0,01 M roztok, na který bylo naváženo 0,0608 g monohydrátu rutinu, který byl následně rozpuštěn v 10 ml baňce s metanolem, protože se v samotném B-R pufru nerozpouštěl.

Směs pro přípravu vzorků obsahovala 4,5 ml 0,1 M glukózy, 4,5 ml 0,1 M roztoku lysinu a 0,1 ml 0,01 M rutinu v prostředí B-R pufru o pH 3, 7 a 10. Pro kontrolu byly sledovány také reakce glukózy a lysinu (4,5 ml 0,01 M glukózy, 4,5 ml 0,01 ml lysinu a 0,1 M metanol) a samotného rutinu (0,1 ml 0,01 rutin v 9,0 ml B-R pufru). V některých případech byly použity i směsi rutinu a lysinu popř. samotné glukózy nebo lysinu.

Tyto jednotlivé směsi byly zahřívány při 95 °C. Experiment byl vždy prováděn dvakrát. Dvě zkumavky byly ponechány bez vaření a ihned vloženy do lednice. Poté byly každých 30 minut vyndány 2 zkumavky z lázně, ochlazeny pod tekoucí vodou a následně uchovávány v lednici v plastových zkumavkách. Zkumavky byly zahřívány po dobu 60 a 120 minut, jedna zkumavka byla vždy ponechána bez vaření. U vzorků v čase 0, 60 a 120 byla měřena antioxidační kapacita metodou DPPH, obsah fenolických látek, redukční vlastnosti a schopnost vychytávat peroxid vodíku.

2.2.3. Příprava kalibračních roztoků

Roztok kyseliny gallové

Na zásobní roztok kyseliny gallové bylo naváženo 0,02 g kyseliny gallové do 50 ml metanolu pro dosažení koncentrace 400 µg/ml. Ze zásobního roztoku kyseliny gallové byly připraveny kalibrační roztoky v řadě 2–50 µg/ml.

2.3 Stanovení antioxidačních vlastností

2.3.1. Stanovení antioxidační kapacity metodou DPPH

Metoda založená na sledování redukce radikálu DPPH před a po přidání rutinu jako látky zpomalující proces Maillardovy reakce. Výsledný roztok byl proměřen spektrofotometricky a byl sledován úbytek absorbance při 517 nm. Výsledky byly následně vyjádřeny jako % inhibice radikálu DPPH dle vzorce 1:

$$\% \text{ inhibice} = \frac{A(\text{slepý pokus}) - A(\text{vzorek})}{A(\text{slepý vzorek})} * 100$$

Do skleněných zkumavek byl připraven roztok, na který bylo postupně použito 100 µl vzorku všech jednotlivých kombinací použitých komponent po všech měřených časech a pH. Dále bylo přidáno 5 ml roztoku DPPH radikálu, který byl připraven 0,012 g pevného radikálu DPPH v 500 ml metanolu a následně uchováván ve skleněné baňce v lednici. Zkumavky byly ponechány 20 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Následně byl změřen úbytek absorbance při

517 nm a stejným způsobem byl změřen slepý pokus, na který bylo použito 100 μ l B-R pufru při všech pH.

2.3.2. Stanovení obsahu fenolických látek

Metoda založená na oxidaci fenolických látek obsažených ve vzorku. Oxidaci podporuje prostředí činidla Folin-Ciocalteua, který je směsí fosforečnanu molybdenového a wolframového. Po přidání vzorku s obsahem fenolických látek vznikl modrý komplex, následně byla proměřena absorbance roztoku při 765 nm. Výsledky byly vyjádřeny jako mg kyseliny gallové na 100 g vzorku.

Do skleněných zkumavek byl připraven roztok s 0,1 ml vzorku, 5 ml destilované vody a 0,5 ml činidla Folin-Ciocalteua. Roztok ve zkumavce byl promíchán a ponechán 5 minut v klidu při laboratorní teplotě. Poté byl přidán 1 ml 5% roztoku Na_2CO_3 a po opětovném promíchání zkumavek byly ponechány 20 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Po skončení inkubace byla změřena absorbance při 765 nm a stejným postupem byl změřen slepý pokus s použitím pufru. Pro stanovení koncentrace fenolických látek ve vzorku byla použita metoda kalibrační řady s kyselinou gallovou.

2.3.3. Stanovení redukčních vlastností

Metoda založená na redukčních schopnostech antioxidačních látek. Fenolické látky obsažené ve vzorku redukují Fe^{3+} na Fe^{2+} . Při reakci vznikl komplex, který byl následně měřen při 700 nm.

Ve skleněných zkumavkách bylo smícháno 500 μ l vzorku, 2,5 ml 1% hexakynoželezitanu draselného a 2,5 ml 0,2 M fosfátového pufru pH 7,4. Směs roztoku byla 30 minut zahřívána ve vodní lázni při 50 °C. Po uplynutí inkubační doby byly zkumavky vyndány z lázně a ochlazeny pod proudem tekoucí vody. Probíhající reakce byla zastavena přidáním 2,5 ml 10% kyseliny trichloroctové. Následovala inkubace 10 minut při laboratorní teplotě. Poté byla odebrána spodní vrstva roztoku, ke které bylo přidáno 2,5 ml deionizované vody a 0,5 ml 0,1% chloridu železitého. Absorbance vzniklého komplexu byla měřena při 700 nm a výsledky byly vyjádřeny jako hodnoty absorbance. Stejným způsobem byl připraven slepý vzorek s puftrem.

2.3.4. Stanovení schopnosti vychytávat peroxid vodíku

Metoda založená na reakci železitého iontu a 1,10-fenantrolinu, který se podílí na redukci Fe^{3+} na Fe^{2+} za přítomnosti fenolických látek. Přidáním peroxidu vodíku a 1,10-fenantrolinu se Fe^{2+} ion oxidoval. Při této reakci vznikl červenooranžový komplex,

jehož absorbance byla měřena při 510 nm. Výsledek byl vyjádřen jako % aktivity produktů Maillardovy reakce při vychytávání H₂O₂ viz vzorec 2:

$$\% \text{ aktivity} = \frac{A(\text{vzorek})}{A(\text{slepý vzorek})} * 100$$

Do skleněné zkumavky bylo pipetováno 0,5 ml vzorku všech komponent při všech pH a časech, 0,25 ml 1mM síranu železnatého amonného a 62,5 µl 5nM peroxidu vodíku. Inkubace směsi probíhala 5 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Po uplynutí času bylo přidáno 1,5 ml 1mM 1,10-fenantrolinu, po kterém následovala inkubace 10 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla změřena absorbance při 510 nm. Slepý pokus byl připraven s 1,562 ml destilované vody, 1,5 ml 1mM 1,10-fenantrolinu a 0,25 ml 1mM síranu železnatého amonného. Výsledky byly vyjádřeny jako % schopnost vychytávat peroxid vodíku.

2.4 Zpracování vzorků pro vybrané metody

2.4.1. Spektrofotometrie UV-Vis

Spektrofotometrie ve viditelné oblasti byla použita pro měření při 294 nm a 420 nm pro meziproducty Maillardovy reakce. Vzorky byly vždy ředěny B-R pufrům daného pH 10 krát. K měření byla použita skleněná kyveta o optické délce 1 cm.

Tato metoda byla rovněž použita pro měření antioxidačních vlastností. Postupně provedeno měření absorbance pro metodu stanovení antioxidační schopnosti pomocí DPPH radikálu, stanovení obsahu fenolických látek, stanovení redukčních vlastností a schopnost vychytávat peroxid vodíku. Vzorky byly vždy naředěny a připraveny dle návodu metody. K měření byly použity skleněné a plastové kyvety o optické délce 1 cm.

2.4.2. Kapilární izotachoforéza

K měření byl použit dvoukolonový izotachoforetický analyzátor Electrophoretic Analyser EA 102 (Villa Labeco, Spišská Nová Ves) vybavený předseparační kolonou o vnitřním průměru 0,8 mm a délce 160 mm a analytickou kolonou o vnitřním průměru 0,3 mm a délce 160 mm, obě z fluorovaného polymeru. Vzorek byl vnášen dávkovacím kohoutem o objemu 30 µl. Zaznamenáván byl signál vodivostního detektoru a jeho derivace.

Z důvodu vysoké koncentrace lysinu ve vzorcích byla k analýzám využita pouze předseparační kolona. K separaci byl použit elektrolytový systém skládající se z vedoucího elektrolytu o složení 10mM octan draselný s kyselinou octovou k úpravě pH na 6,1 a koncového

elektrolytu složeného z 10 mM kyseliny octové. Separační proud byl nastaven na hodnotu 300 μA .

Podmínky analýzy:

- Vedoucí elektrolyt: 10 mM octan sodný + kyselina octová k úpravě pH na 5,0
- Koncový elektrolyt: 10 mM β -alanin
- Separační proud: 300 μA

Vzorky k analýze připraveny pouze naředěním destilovanou vodou 100x.

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

Naměřené hodnoty experimentů byly vyhodnoceny pomocí sloupcových grafů. Výsledky představují aritmetickým průměrem opakovaných měření. Každý graf rovněž obsahuje směrodatnou odchylku.

U všech vzorků byl použit B-R pufr. Postupně byla provedena měření v prostředí pufru pH 3, 7 a 10. Od naměřených dat byl vždy odečten slepý vzorek. Vzorky byly zahřívány při teplotě 95 °C na vodní lázni (Memmert WMB 22). Jeden vzorek byl vždy ponechán bez zahřívání a označen jako čas 0. Pro vyhodnocení byly dále vybrány stěžejní časy zahřívání 60 minut a 120 minut.

První metodou experimentu byla UV-Vis spektrometrie při vlnové délce 294 nm a 420 nm. Každá oblast popisuje přítomnosti určitých produktů, které ve vzorcích vznikaly při různých časech zahřívání. Reakci vždy ovlivňovalo i pH. Druhou použitou metodou bylo vyhodnocení vybraných antioxidačních vlastností ve vzorcích pomocí UV-Vis spektrometrie. Kapilární izotachoforéza byla použita jako doplňující metoda ke stanovení obsahu lysinu.

3.1 Vizualní hodnocení Maillardovy reakce

S rostoucí dobou zahřívání byly vzorky vizuálně tmavší. Vzorky označeny jako 0, které se nezahřívaly, byly vizuálně čiré. Nejvýraznější zbarvení bylo pozorováno u pH 10 a 120 minut zahřívání. Rovněž bylo pozorováno nejvýraznější tmavnutí u směsi glukózy, lysinu a rutinu. Samotný rutin neměl v průběhu zahřívání velké barevné rozdíly. U roztoku lysinu rovněž nebylo pozorováno výraznější zbarvení během doby zahřívání. Z roztoků samostatných použitých látek byla největší změna zbarvení pozorována u glukózy. Směs glukózy a lysinu mělo intenzitu zbarvení mírně menší, než ve směsi látek s přídavkem rutinu. Samotný rutin výrazně nereagoval na dobu vaření a vizuální barevnost byla po celou dobu takřka stejná.

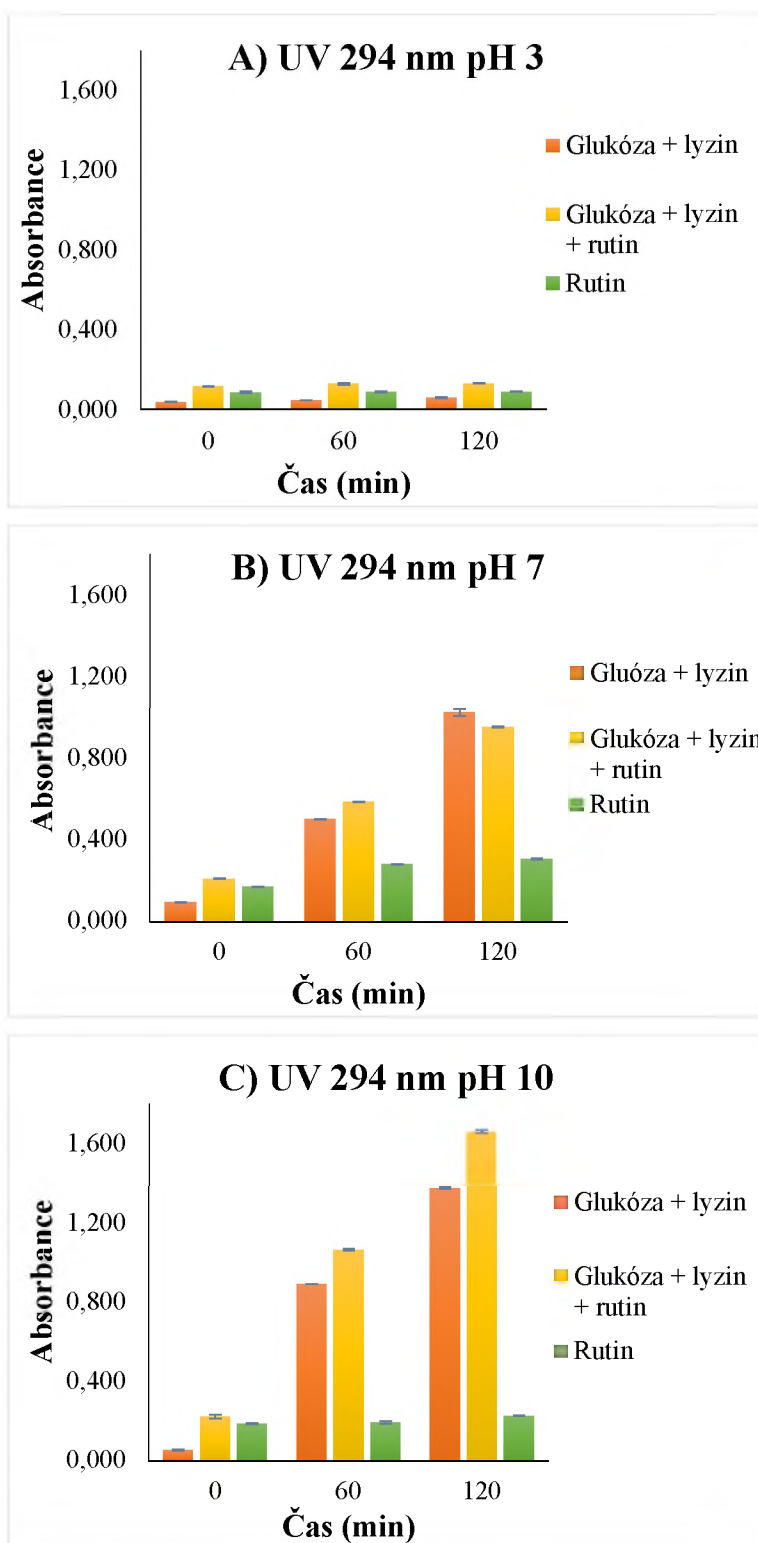
3.2 Spektrometrické stanovení produktů Maillardových reakcí

Tyto dvě vlnové délky detekují vznik produktů a meziproductů Maillardovy reakce. Konkrétně se jedná o pokročilou a konečnou fázi reakcí, popsanych v chemické podstatě dle [3], kde je popsán Hodgeho model rozdělení Maillardovy reakce.

3.2.1. Stanovení meziproductů Maillardovy reakce při 294 nm

V této pokročilé fázi Maillardovy reakce vznikají bezbarvé až žluté produkty, schopné absorbance UV záření. Probíhají zde postupně degradace cukrů, fragmentace cukrů a degradace aminokyselin. Tuto oblast lze také identifikovat jako ukazatel pro hodnocení množství

meziproduktů Maillardovy reakce. Z měření při vlnových délkách 294 nm a 420 nm, kde byla vyšší absorbance registrována u vlnové délky 294 nm, plyne závěr, že při zahřívání na 95 °C vzniká více meziproduktů, než produktů konečné fáze Maillardovy reakce.



Obrázek 15 A-C Graf tvorby meziproduktů Maillardovy reakce při teplotě 95°C (294 nm). Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku v měření.

Při pH 3 byl pozorován konstantní nárůst absorbance u všech vzorků. Nejvyšších hodnot bylo dosaženo u směsi glukózy, lysinu a rutinu, které byly poměrně vysoké již před zahříváním a pak se ještě mírně zvýšily. Vysoká absorbance značí velké množství vzniklých meziproductů Maillardovy reakce a optimální použití rutinu pro reakce pokročilé fáze popsané v teoretické části. Rutin sám dosáhl též vysokých hodnot, ale s rostoucím časem při zahřívání se hodnota absorbance neměnila. Tuto problematiku popisují v článku Xu a kol. [62], kde je názorně vidět i spektrum rutinu v oblasti UV-Vis. Glukóza a lysin bez použití rutinu nedosahuje příliš významných výsledků a vznik meziproductů je velmi nízký.

Při pH 7 byl rovněž sledován konstantní trend zvyšování hodnot absorbance. Nejnižších hodnot dosáhl samotný rutin. Ovšem ve směsi s rutinem absorbance stoupala a nejvyšších hodnot dosáhla kolem 120 minut zahřívání. Téměř srovnatelných hodnot dosáhla glukóza s lysinem, po 120 minutách zahřívání byla absorbance ještě nepatrně vyšší. Stejně jako u pH 3 byl nárůst hodnot exponenciálního charakteru s časem zahřívání, čímž bylo stanoveno, že obsah meziproductů se zvyšuje s dobou záhřevu.

Při pH 10 bylo dosaženo nejvyšších hodnot absorbance a konstantního nárůstu s časem zahřívání. Rutin mimo směs nedosáhl významných hodnot, avšak ve směsi s glukózou a lysinem reaguje velmi příznivě a dosahuje značně vysokých hodnot absorbance. Nepatrně nižších hodnot dosáhla glukóza s lysinem. Do příloh byl zařazen Obrázek P1, kde jsou pro kontrolu měřeny samostatně glukóza a lysin.

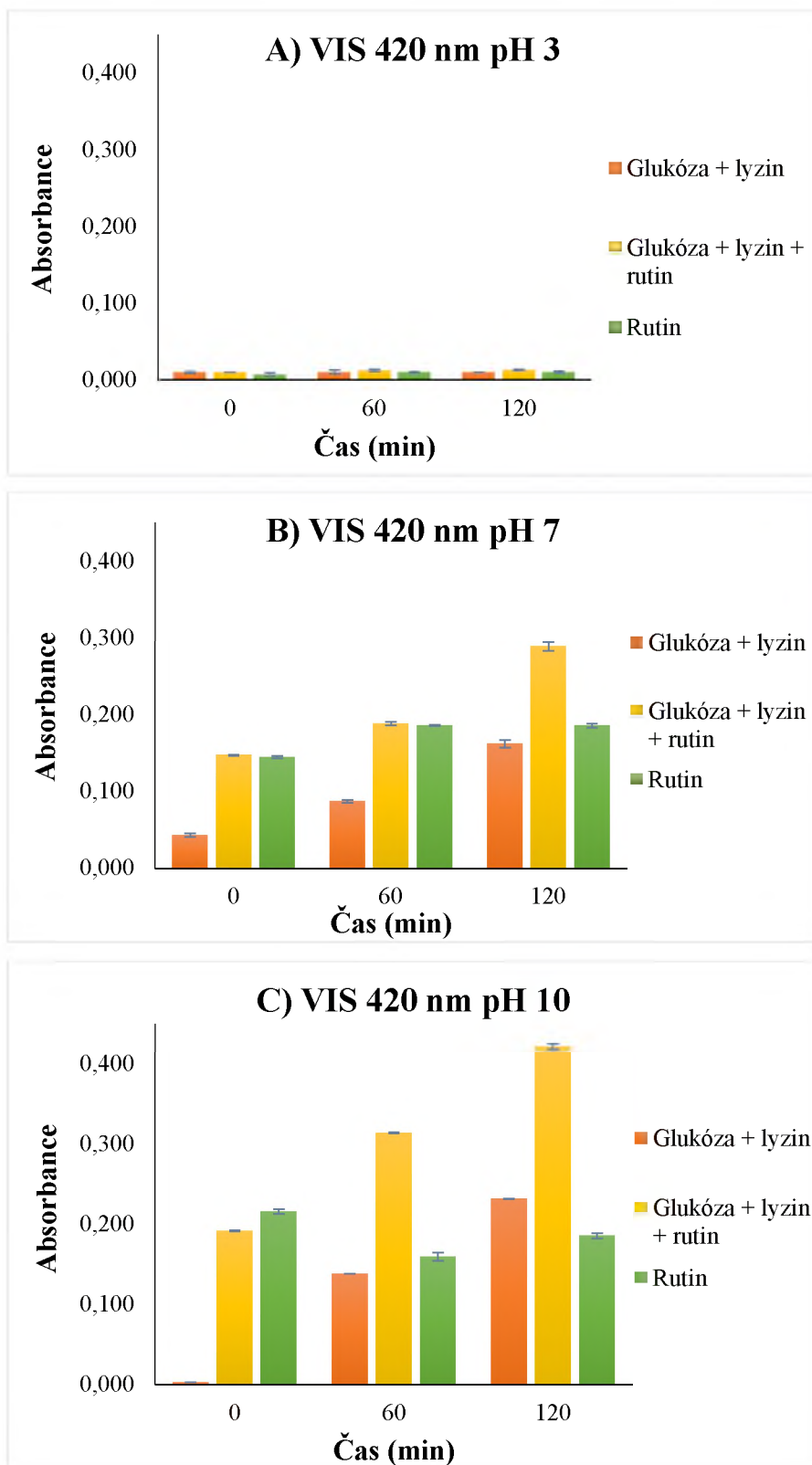
Nejlépe použití rutinu bylo zjištěno v alkalickém prostředí pH 10 ve směsi s glukózou a lysinem. Podobně příznivých výsledků bylo dosaženo při pH 3. Hodnoty absorbance rutinu se s časem zahřívání zvláště neměnily, ale ve směsi sacharidu a aminokyseliny podporuje vznik meziproductů Maillardovy reakce. Tyto produkty mohou mít významné antioxidační vlastnosti, kterým jsou věnovány další kapitoly této práce.

3.2.2. Stanovení produktů Maillardovy reakce při 420 nm

Konečná fáze Maillardovy reakce, při které vznikají výrazně zbarvené produkty hnědé barvy různé intenzity. Vznikají zde kondenzace aldolu, aldehydu a aminu, tvoří se heterocyklické dusíkaté sloučeniny, reagují volné radikály, nejčastěji registrujeme vznik melanoidů.

Tato fáze je popsána v teoretické části, která se zabývá glykosylací. Čím je tento proces výraznější, tedy vzniká větší množství melanoidů, tím intenzivnější je zbarvení systému. Stanovení probíhá měřením absorbance při 420 nm.

Samotný rutin si po celou dobu záhřevu držel podobnou absorbancí, která se lišila zanedbatelně.



Obrázek 16 A-C Graf tvorby konečných produktů Maillardovy reakce při teplotě 95°C (420 nm). Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku v měření.

Směs glukózy, lysinu a rutinu naopak vykazovala nejvyšší nárůst hodnoty absorbance a to ve všech pH. Hodnota absorbance nejvíce stoupla po zahřívání 120 minut.

Ve směsi glukózy a lysinu byl nárůst taky pozorovatelný, ovšem není tak výrazný jako při použití rutinu do směsi. Největší rozdíl absorbance byl rovněž mezi 60 a 120 minutami zahřívání.

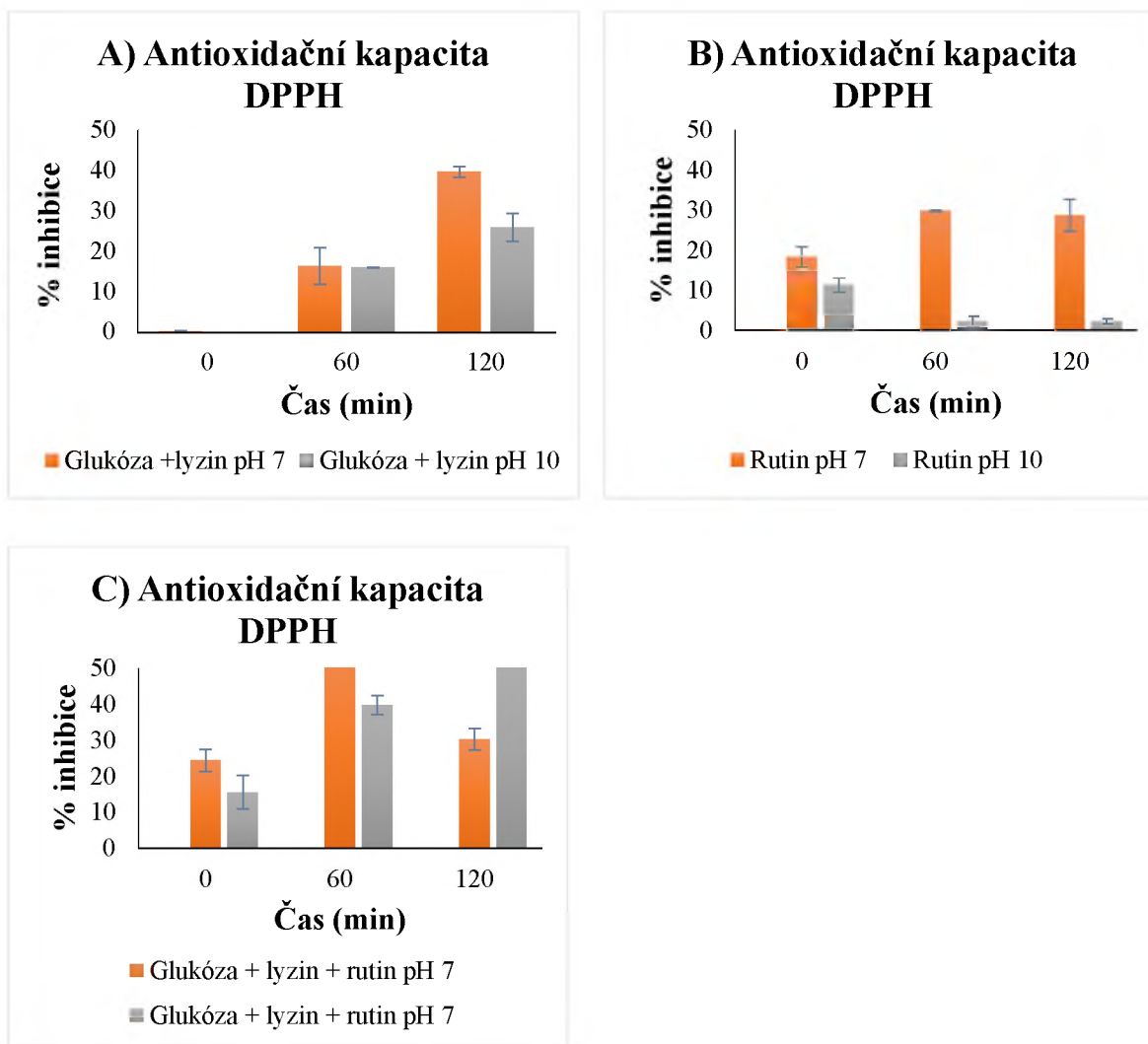
Glukóza reagovala samostatně velmi podobně, jako ve směsích. Kontrolní měření proběhlo pro pH 10. Graf glukózy a lysinu samostatně je vložen jako obrázek P2 v příloze.

Z měření vyplývá, že největší tvorba konečných produktů Maillardovy reakce probíhá při zahřívání 120 minut. Zároveň lze říci, že hodnota absorbance se zvyšuje s rostoucím pH a u pH 3 jsou hodnoty téměř zanedbatelné.

3.3 Antioxidační vlastnosti

3.3.1. Stanovení antioxidační kapacity metodou DPPH

Antioxidační kapacita udává schopnost látky vychytávat volné radikály a působí jako donor vodíku. Schopnost vychytávat radikál DPPH je dána vznikem Schiffových bází a N – alkyací v důsledku Maillardovy reakce, popsanych v teoretické části. Ve vzorcích byl měřen úbytek absorbance při 517 nm.



Obrázek 17 A-C Antioxidační kapacita DPPH produktů Maillardovy reakce při teplotě 95°C. Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku v měření.

Při pH 3 docházelo k degradaci použitého pufru, a proto naměřené hodnoty nebyly zahrnuty do výsledků.

K nejvyššímu procentu inhibice DPPH radikálu docházelo v prostředí pH 7 u všech vzorků. Při použití glukózy samostatně docházelo k exponenciálnímu trendu. Zatímco

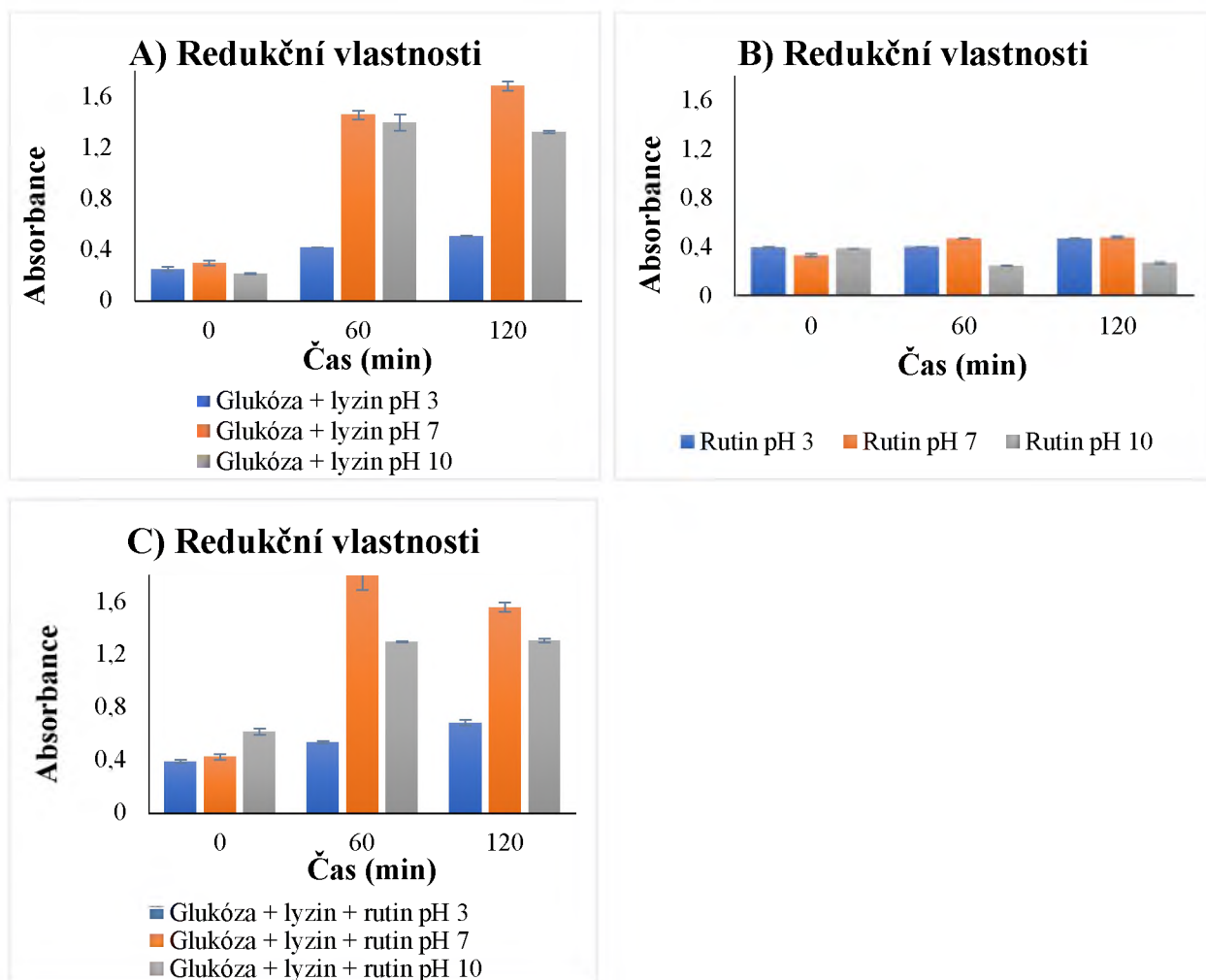
u samotného lysinu na Obrázku 5B nedocházelo k téměř žádným změnám během zahřívání. Ve směsi glukózy a lysinu byl opět exponenciální nárůst a to u obou pH. Ve směsi s rutinem i při použití bez směsi je zřejmý nejvyšší nárůst po 60 minutách zahřívání a při 120 minutách pokles, který je ve směsi výraznější.

Při pH 10 nebylo již dosaženo tak vysokých procent inhibice radikálu DPPH. Hodnoty byly o poznání nižší, než u pH 7. U glukózy a směsi glukózy s lysinem byl naměřen stoupající trend. U lysinu opět nedošlo k nárůstu ani poklesu od počáteční fáze bez zahřívání. U rutinu naopak při pH 10 s dobou zahřívání klesá procento inhibice radikálu DPPH. Ve směsi všech tří látek měl rutin stoupající tendenci, která rostla rovnoměrně s dobou zahřívání.

Z výsledků plyne, že lysin nemá na inhibici zásadní vliv. U glukózy s časem zahřívání roste a směs s rutinem je závislá na pH, kdy bylo dosaženo nejvyšších hodnot při pH 7 a 60 minutách zahřívání. Rutin zde potvrdil svou schopnost vylučovat volné radikály a nejlepší použití se zdá být v neutrálním pH okolo 60 minut zahřívání. Do příloh byl vložen Obrázek P3 a Obrázek P4, na kterém je měření glukózy a lysinu samostatně. Glukóza měla ve všech pH rovnoměrně stoupající trend a nejvyšších hodnoty % inhibice byly sledovány při pH 7. U lysinu byly hodnoty pro pH 7 a 10 po dobu zahřívání neměnné, ale pro pH 7 se pohybovaly mírně pod 100%. Při pH 3 a 10 nedosáhl lysin inhibice více jak 40 %.

3.3.2. Stanovení redukčních vlastností

V této metodě se stanovuje redukční síla konjugátů vzniklých v pokročilém stádiu Maillardovy reakce. Na redukční schopnosti se nejvíce podílejí vzniklé hydroxylové a pyrrolové skupiny. Výsledná absorbance byla měřena při 700 nm.



Obrázek 18 A-C Redukční vlastnosti produktů Maillardovy reakce při teplotě 95°C (700 nm). Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku v měření.

Při vyhodnocení hodnot u pH 3 byly zanedbatelné hodnoty samotné glukózy, v grafu lze sledovat nepatrný nárůst s rostoucím časem zahřívání. U lysinu byl zaznamenán nárůst hodnot po 60 minutách zahřívání a dále si již držel konstantní absorbanci. U směsi glukózy a lysinu se absorbance zvyšovala exponenciálně s časem zahřívání a dostala se nejvýše k hodnotě absorbance 0,6. Ve vzorku rutin a směsi s rutinem měla absorbance stoupající trend s časem zahřívání. Směs dosahovala vyšších hodnot a to absorbance 0,7.

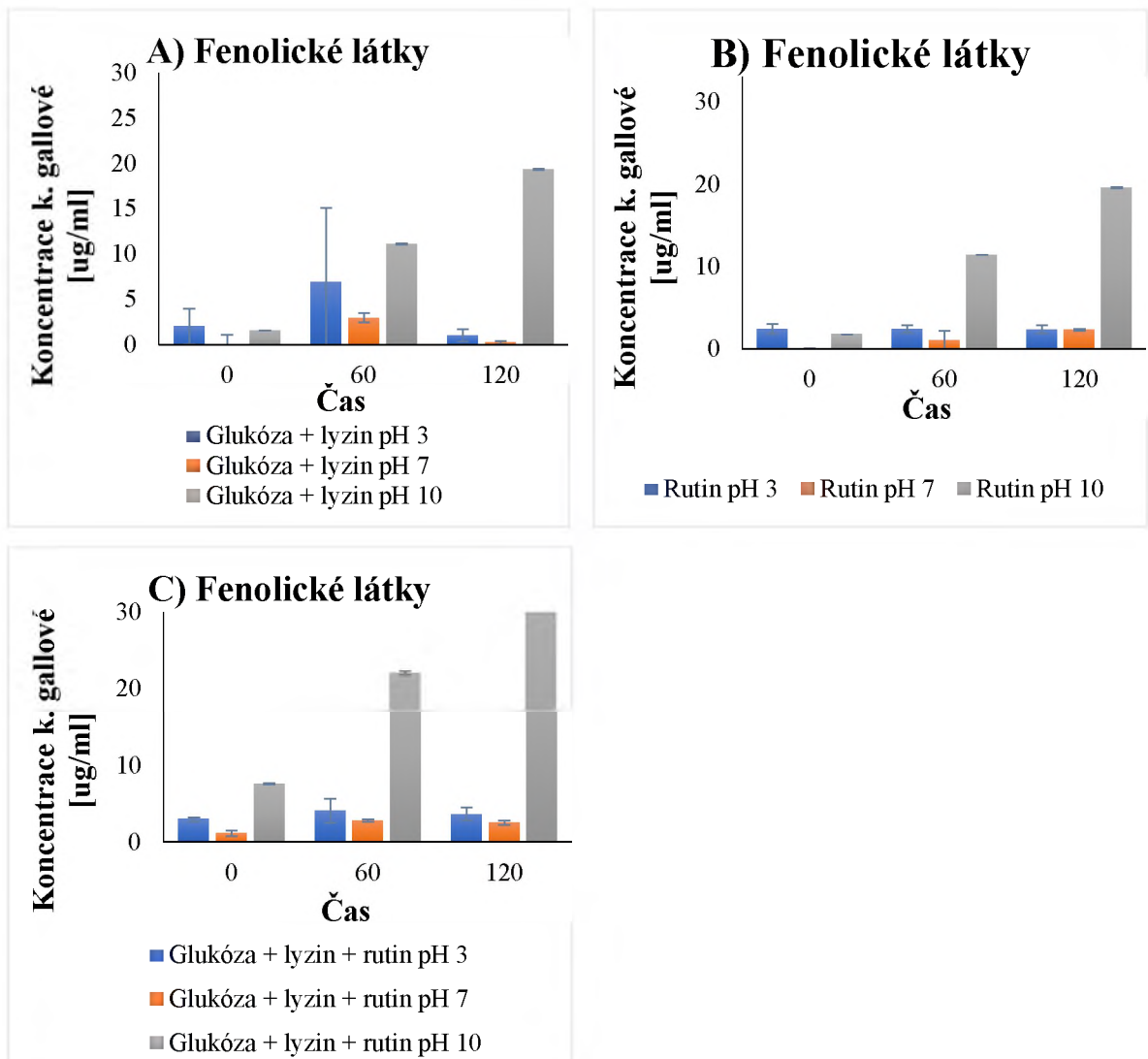
Měření vzorků v prostředí pH 7 mělo u glukózy a lysinu diskutabilní výsledky, jejichž hodnoty jsou zanedbatelné. Směs glukózy a lysinu měla stoupající tendenci v čase, nejvyšších hodnot bylo tedy dosaženo po 120 minutách zahřívání. U rutin došlo k nepatrnému zvýšení hodnot absorbance po 60 minutách zahřívání a dále se již neměnila. Nejvyšších hodnot bylo dosaženo při použití rutin ve směsi při 60 minutách zahřevu, dále začala mírně klesat.

U glukózy v prostředí pH 10 došlo k exponenciálnímu nárůstu v čase. Zde mělo měření absorbance jako jediné ze tří měřených pH viditelné výsledky. U lysinu nedošlo během zahřívání k žádným změnám. Ve směsi glukózy a lysinu bylo nejvyšších hodnot absorbance dosaženo po 60 minutách zahřívání, poté se nepatrně snížila. Při sledování rutinu je zřejmý pokles absorbance s časem zahřívání, avšak při použití ve směsi tomu bylo naopak a nejvyšší absorbance byla získána po 120 minutách zahřívání.

U této metody měření neměl rutin oproti ostatním metodám zásadní vliv na hodnotu absorbance a tedy redukční schopnosti. Malých rozdílů si však lze všimnout a hodnoty jsou mírně vyšší, než bez použití rutinu. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při pH 7 ve směsi glukózy, lysinu a rutinu po 60 minutách zahřívání. Z čehož lze usoudit, že v čase se mohou rozpadat vzniklé hydroxylové a pyrrolové skupiny, které se na redukcí silně podílejí. Pro porovnání a kontrolu byly použity vzorky glukózy a lysinu samostatně. Jejich hodnoty byly vloženy jako Obrázek P5 a Obrázek P6 do přílohy. Glukóza samostatně dosáhla při pH 3 a 7 zanedbatelných hodnot absorbance. Hodnoty v prostředí pH 10 měly stoupající trend a pohybovaly se mezi absorbancí 0,8 a 1. Lysin na Obrázku P6 měl při pH 3 a 10 téměř ustálené hodnoty hodnoty absorbance do 0,4. V pH 7 se hodnoty pohybovaly blízko nule.

3.3.3. Stanovení obsahu celkových fenolických látek

Ke stanovení fenolických látek byla použita metoda kalibrační křivky kyseliny gallové, viz tabulka P1 a obrázek P7 vložené do příloh. Pro stanovení obsahu fenolických látek byla měřena absorbance modrého komplexu, který vznikl jako důkaz oxidace fenolických látek obsažených ve vzorku. Tento komplex byl měřen při 765 nm a dle kalibrační křivky kyseliny gallové byla stanovena přítomná koncentrace fenolických látek ve vzorku na 100 g kyseliny. V experimentu se předpokládalo, že přídavek rutinu zvýší množství fenolických látek ve vzorcích.



Obrázek 19 A-C Fenolické látky v produktech Maillardovy reakce při teplotě 95°C.

Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku v měření.

Glukóza samostatně reagovala při pH 3 poměrně konstantně a nejvyšší koncentrace dosáhla při zahřívání 60 minut, přesto byla koncentrace fenolických látek velmi nízká a dosahovala nejvíce 1,8 µg/ml. Lepších výsledků bylo v tomto pH dosaženo u lysinu, kde byla maximální koncentrace pozorována rovněž po 60 minutách zahřívání a pak začala mírně klesat, stejně jako u glukózy. Grafy obou vzorků jsou vloženy do přílohy. Glukóza s lysinem dosáhly nejvyšších hodnot koncentrace fenolických látek rovněž po 60 minutách zahřívání a to 7 µg/ml, pak začala mírně klesat. Rutin a směs s rutinem nedosahoval významných výsledků, koncentrace byla téměř konstantní po celou dobu záhřevu. U obou použití rutinu byla koncentrace nejvíce 4 µg/ml.

Při pH 7 byla koncentrace fenolických látek ve všech vzorcích velmi nízká. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny ve směsích glukózy s lysinem a rovněž při přidavku rutinu. Stejně tomu

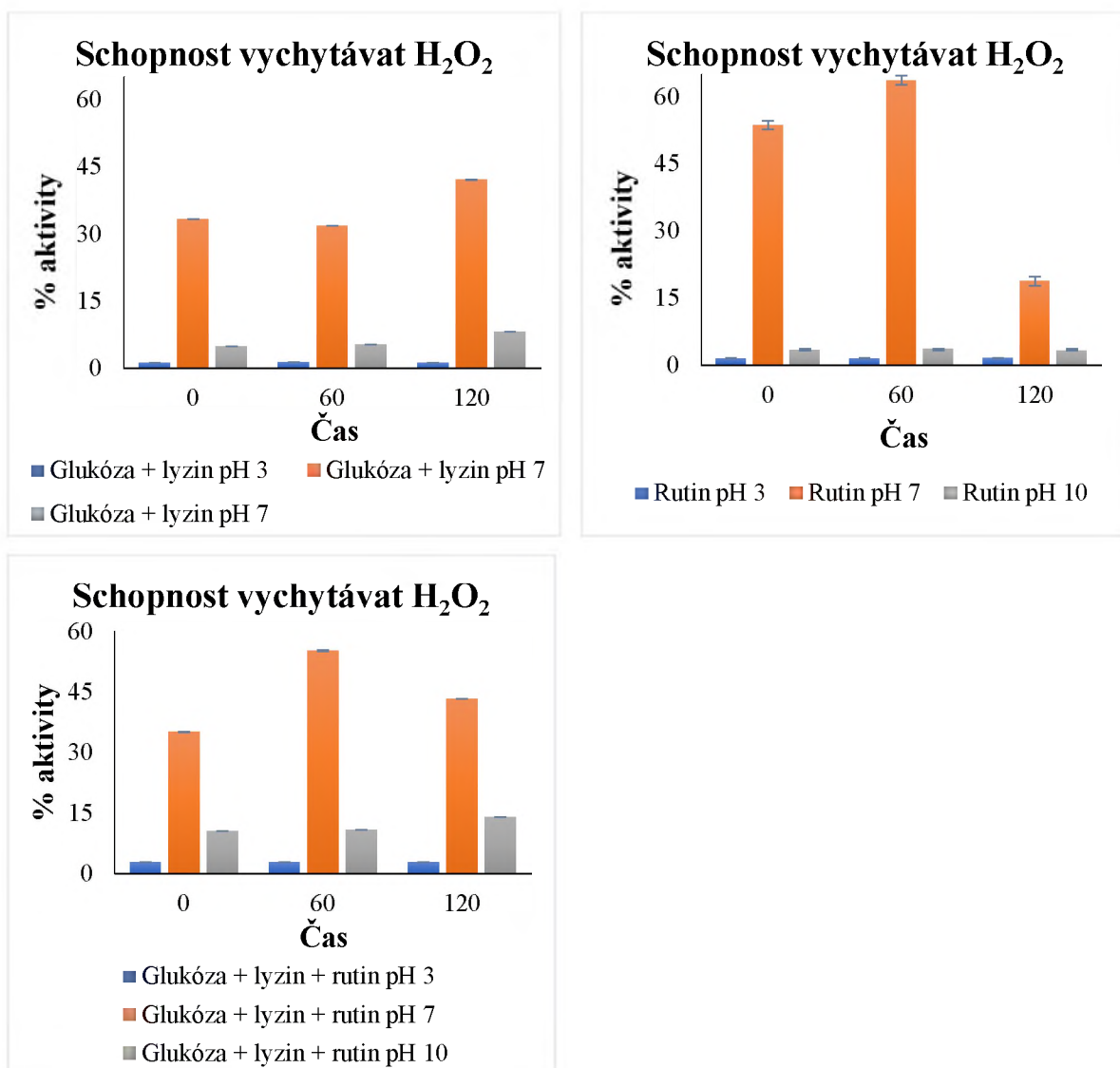
bylo u samotného rutinu. Všechny tyto vzorky nabyly maximální koncentrace při 60 minutách zahřívání a pohybovaly se kolem 3 ug/ml.

Z výsledků při pH 10 je zřejmé, že množství fenolických látek ovlivňuje glukóza a rutin. Ve všech vzorcích byl pozorován konstantní nárůst hodnot s časem zahřívání. Největší množství fenolických látek obsahovala směs glukózy, lysinu a rutinu, kde hodnoty vystoupaly až k 33 ug/ml. Samotný rutin a směs glukózy s lysinem se pohybovaly nejvýše kolem 20 ug/ml po 120 minutách zahřívání.

Po vyhodnocení naměřených dat lze konstatovat, že nejlepších hodnot bylo dosaženo při pH 10. Koncentrace s časem zahřívání plynule stoupala a dostala se až k 33 ug/ml u směsi glukózy, lysinu a rutinu. Je zřejmé, že očekávané zvýšení koncentrace při použití rutinu bylo splněno. U glukózy a lysinu samostatně nebylo zaznamenáno podstatné množství fenolických látek. Pro kontrolu byly použity vzorky glukózy a lysinu samostatně a jejich grafy byly vloženy do přílohy. Na Obrázku P8 je vidět graf glukózy. Při pH 3 se hodnoty koncentrace zvýšily po 60 minutách a pak mírně klesly. V prostředí pH 7 hodnoty s časem zahřívání klesaly a při pH 10 měly stoupající tendenci. U Lysinu na Obrázku P9 došlo při pH 3 rovněž k nárůstu koncentrace po 60 minutách zahřívání a pak k poklesu. Hodnoty pH 7 byly diskutabilní a při pH 10 měly lehce stoupající trend.

3.3.4. Schopnost vychytávat peroxid vodíku

Pro sledování vývoje schopnosti látek vychytávat peroxid vodíku byl použit železitý ion v prostředí 1,10-fenantrolinu, který se redukuje na železnatý ion. Peroxid vodíku způsobil, že se železnatý ion oxidoval. Vzniklý červenooranžový komplex byl sledován při absorbanci 510 nm a stanovena procentuální schopnost látek vychytávat peroxid vodíku.



Obrázek 20 A-C **Schopnost vychytávat peroxid vodíku v produktech Maillardovy reakce při 95°C.** Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku v měření.

Glukóza při pH 3 dosáhla velmi nízkých procent aktivního vychytávání peroxidu vodíku, nejvyšších hodnot pohybujících se do 2 % aktivity. Lysin naopak dosahoval hodnot poměrně stálých mezi 5-6 % aktivity. Glukóza a lysin ve směsi nenabývaly významných hodnot a byly spíše diskutabilní. Stejně tak tomu bylo u rutinu. Ve směsi s přidavkem rutinu došlo k malému navýšení hodnot, ale i tak se hodnoty pohybovaly kolem 5 % aktivity.

Při pH 7 došlo u všech vzorků k nejlepším výsledkům. Glukóza sice nedosáhla zásadních hodnot, ale je patrný nárůst aktivity s přibývajícím časem zahřívání. Lysin měl naopak nejvyšší aktivitu před zahříváním a poté se mírně snižovala. U směsi glukózy a lysinu nedošlo mezi časem 0 a 60 minut téměř k žádným změnám, avšak aktivita se pohybovala kolem 30 %. Po 120 minutách zahřívání došlo ke zvýšení hodnot na 45 % aktivity. Rutin reagoval

ihned před zahřátím velmi dobře a aktivita se dostala k 50 %. Po 60 minutách zahřívání se dále zvýšila a přesáhla 60 % aktivity. Po 120 minutách zahřívání však došlo k výraznému poklesu. Po přidání rutinu do směsi byl průběh velmi podobný, ale k získání nejvyšších hodnot došlo po 60 minutách a aktivita se pohybovala kolem 50 %, pak opět mírně klesla.

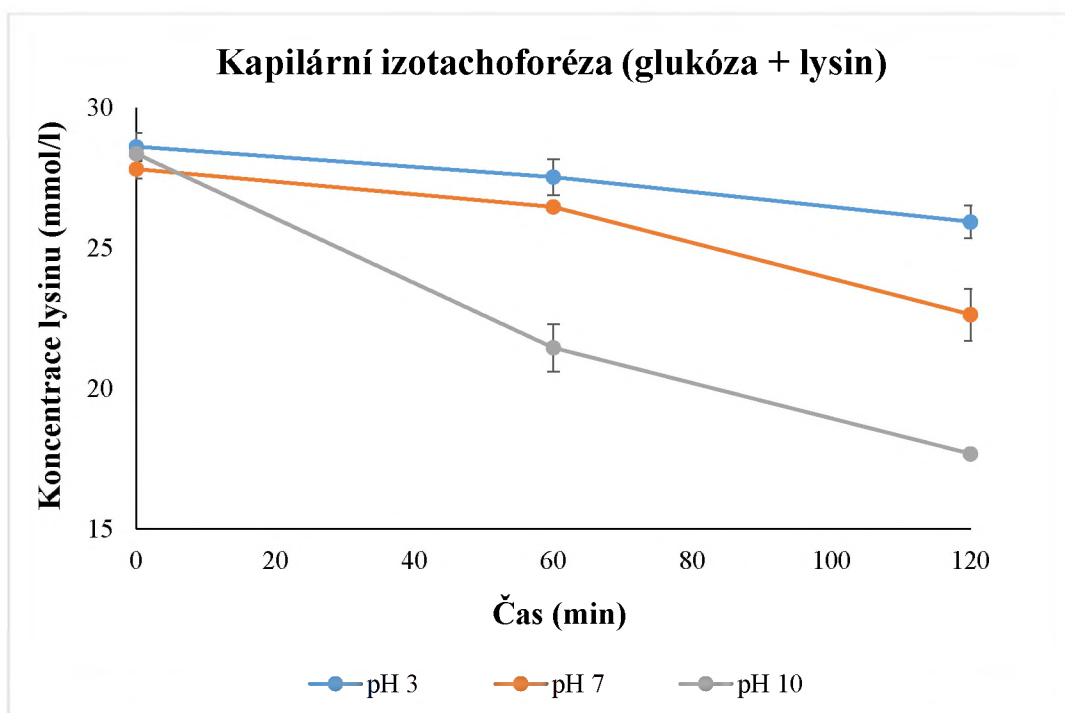
Měření vzorků při pH 10 mělo nepatrně vyšší hodnoty, než pH 3, ale % aktivity jsou u všech poměrně nízké. Nejlepších hodnot bylo dosaženo ve směsi glukózy, lysinu a rutinu po 120 minutách zahřívání. Hodnoty byly i tak téměř konstantní mezi 10-15 % aktivity a zásadně se neměnily. U ostatních vzorků se hodnoty pohybovaly mezi 5 a 10 % aktivity.

Z výsledků lze pozorovat, že rutin významně ovlivňuje průběh reakce, jak se předpokládalo v rámci experimentu a z teoretické části. Velký vliv mělo i pH. Při pH 3 a 10 nedošlo k zásadnímu nárůstu hodnot. Hodnoty byly buď konstantní, nebo se měnily minimálně. Při pH 7 oproti ostatním došlo k významnému nárůstu hodnot a jako nejlepší dobu zahřívání lze stanovit 60 minut. Při delším zahřívání docházelo již ke ztrátám, proto je ideální sledování hodnot kolem 1 hodiny zahřívání. Glukóza a lysin byly pro kontrolu použity i samostatně. Jejich měření bylo vloženo jako Obrázek P10 a P11 do přílohy. Glukóza měla v prostředí pH 3 nízké hodnoty % aktivity, které po 60 minutách zahřívání mírně klesly a pak zase stouply. V pH 7 a 10 stoupající trend, který byl vyšší u pH 7. Lysin na Obrázku P11 měl při pH 3 mírně stoupající tendenci a tyto hodnoty byly rovněž nejvyšší. V pH 7 a 10 došlo po 60 minutách zahřívání k poklesu a po 120 minách opět k mírnému nárůstu % aktivity.

3.4 Stanovení lysinu kapilární izotachoforézou

Pro kapilární izotachoforézu byla vytvořena kalibrační křivka pro stanovení koncentrace lysinu ve vzorcích.

Navážka standardu lysinu 81,4 mg/50 ml = koncentrace 11,28 mmol/l. Z hodnot byla vytvořena kalibrační závislost Tabulka P2 a kalibrační křivka Obrázek P12, které byly vloženy jako přílohy. Do příloh byl také zahrnut izotachoforegram lysinu Obrázek P1.

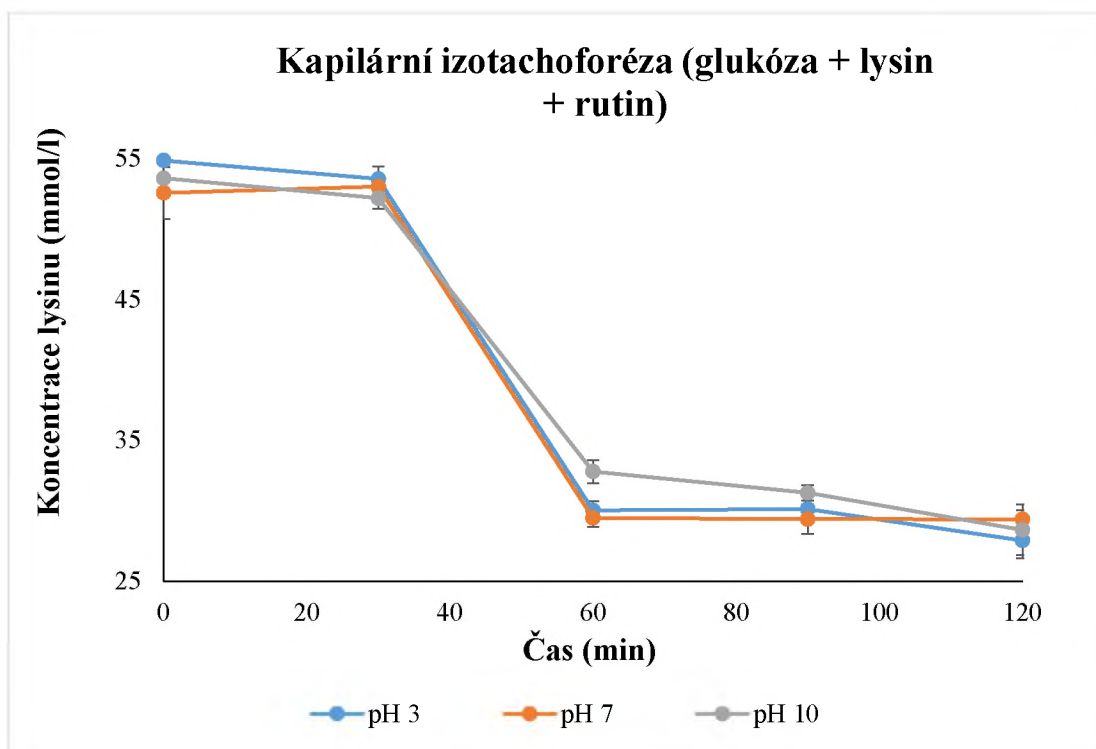


Obrázek 21 Stanovení koncentrace lysinu kapilární izotachoforézou pro glukózu + lysin při teplotě 95°C. Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku v měření.

Během separace byla měřena změna koncentrace lysinu ve vzorcích v závislosti na době zahřívání. Měření probíhalo pro směs glukózy s lysinem, glukózy s lysinem a rutinem a pro samotný lysin.

Ve směsi glukózy a lysinu při pH 3 bylo dosaženo nejvyšších hodnot koncentrace lysinu ve vzorku. Hodnoty s časem zahřívání klesají, proto je pravděpodobné, že lysin jistým způsobem degraduje. Při pH 7 byly hodnoty koncentrace opět klesající s časem zahřívání. Pokles mezi 60 a 120 minutami zahřívání byl výraznější, než tomu bylo při pH 3. V prostředí pH 10 měla koncentrace lysinu nejvýraznější klesající trend.

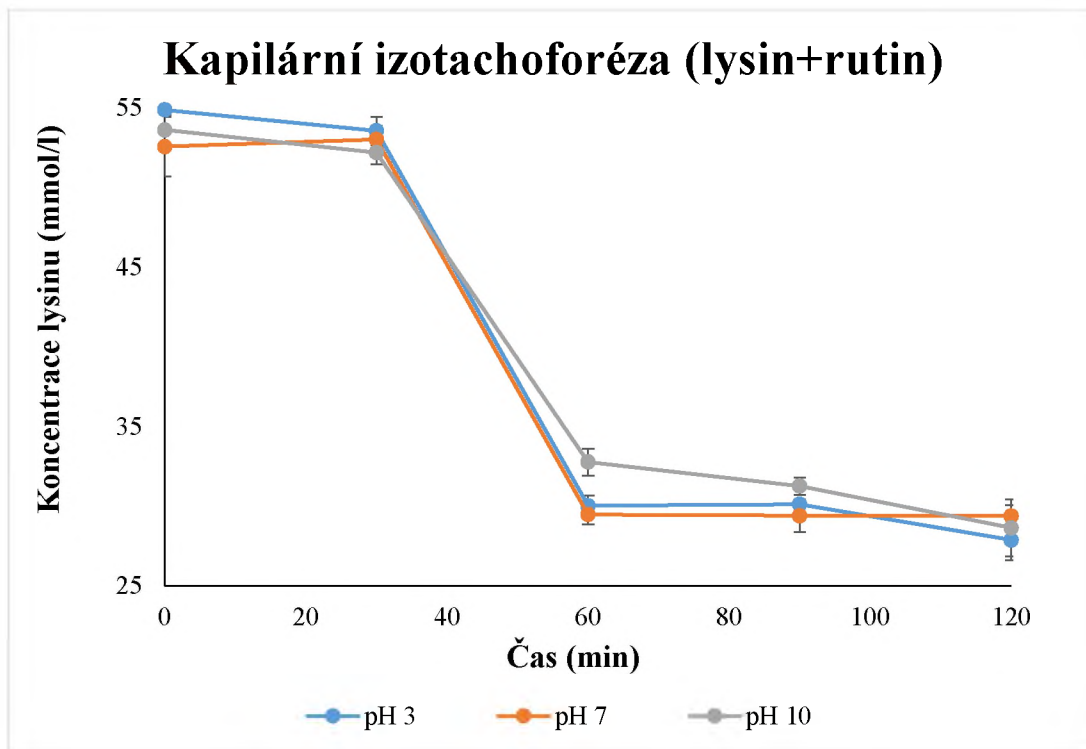
V závěru lze říci, že čím je prostředí vzorku kyselější, tím je vyšší koncentrace lysinu. Se zvyšujícím se pH a dobou zahřívání lysin nejspíše degraduje nebo reaguje s glukózou za vzniku jiných meziproduktů a konečných produktů a tím je jeho koncentrace nižší.



Obrázek 22 Stanovení koncentrace lysinu kapilární izotachoforézou glukózu + lysin + rutin při teplotě 95°C. Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku v měření.

Ve směsi glukózy a lysinu a rutinu mezi jednotlivými časy zahřívání nebylo naměřeno výraznějších rozdílů v koncentracích lysinu. Po 60 minutách zahřívání došlo k výraznému poklesu koncentrace. Mezi 60 a 120 minutami zahřívání při pH 7 nedošlo k žádným změnám. Nepatrné změny byly u pH 3 a 10, přičemž u pH 10 byl pokles výraznější, stejně jako tomu bylo ve směsi glukózy a lysinu.

Rutin významně ovlivnil reakci a během zahřívání došlo pravděpodobně ke vzniku dalších produktů vlivem reakce lysinu s rutinem, u kterých se po 60 minutách projevil výrazný pokles koncentrace lysinu, avšak při dalším zahřívání se měnila pouze minimálně s klesající tendencí.



Obrázek 21 Stanovení koncentrace lysinu kapilární izotachoforézou pro lysin + rutin při teplotě 95°C. Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku v měření.

Při přidavku rutinu k lysinu bez sacharidu lze konstatovat stejné hodnoty jako s použitím rutinu ve směsi aminokyselinové složky, tedy lysinu a glukózy jako sacharidové složky.

Rutin ve vzorku významně ovlivňuje koncentraci lysinu za vzniku produktů vzniklých reakcí lysinu s rutinem.

4. ZÁVĚR

Pomocí UV-Vis spektrometrie v oblasti absorpance 294 a 420 nm byl sledován vznik meziproduktů a konečných produktů Maillardovy reakce při pH 3, 7 a 10. Dále byly sledovány antioxidační vlastnosti pomocí metod stanovení antioxidační kapacity, redukčních vlastností, obsahu fenolických látek a schopnosti vychytávat peroxid vodíku vzniklých produktů po přidavku rutinu jako antioxidantu a bez něho. Ke stanovení se používala metoda UV-Vis.

Z naměřených výsledků vyplývá, že rutin skutečně ovlivňuje reakci jako antioxidant. Rutin nejlépe inhiboval reakce v prostředí pH 7 a 10, tedy neutrálním a bazickém. Pro další použití pro potravinářský průmysl by bylo vhodné prozkoumat i další pH hodnoty, protože zásadité pH je pro tyto účely nevhodné.

5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] P. A. FINOT. Historical perspective of the Maillard reaction in food science. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, roč. 1043, s. 1–8, 2005, doi: 10.1196/annals.1333.001.
- [2] A. MICHALSKA, M. AMIGO-BENAVENT, H. ZIELINSKI, a M. D. del CASTILLO. Effect of bread making on formation of Maillard reaction products contributing to the overall antioxidant activity of rye bread. *J. Cereal Sci.*, roč. 48, č. 1, s. 123–132, 2008, doi: 10.1016/j.jcs.2007.08.012.
- [3] J. E. HODGE. Dehydrated foods, chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.*, roč. 1, č. 15, s. 928–943, 1953, doi: 10.1021/jf60015a004.
- [4] H. E. NURSTEN. *The Maillard reaction: chemistry, biochemistry and implications*. 2005. ISBN 978-0-85404-964-6.
- [5] J., H., LEE, R., HARADA, S., KAWAMURA, & S. KOSEKI. Development of a novel time-temperature integrator/indicator (TTI) based on the Maillard reaction for visual thermal monitoring of the cooking process. *Food and bioprocess technology*, 11(1), 185–193, 2017, doi:10.1007/s11947-017-2003-3.
- [6] X. FANG a K. SCHMIDT-ROHR. Fate of the amino acid in glucose-glycine melanoidins investigated by solid-state nuclear magnetic resonance (NMR). *J. Agric. Food Chem.*, roč. 57, č. 22, s. 10701–10711, 2009, doi: 10.1021/jf9020587.
- [7] Y.-Y. ZHOU, Y. Li, A.-N. Yu, Y.-Y. ZHOU, Y. Li, a A.-N. Yu. The effects of reactants ratios, reaction temperatures and times on Maillard reaction products of the L-ascorbic acid/L-glutamic acid system. *Food Sci. Technol.*, roč. 36, č. 2, s. 268–274, 2016, doi: 10.1590/1678-457X.02415.
- [8] J. ORACZ a E. NEBESNY. Effect of roasting parameters on the physicochemical characteristics of high-molecular-weight Maillard reaction products isolated from cocoa beans of different theobroma cacao L. groups. *Eur. Food Res. Technol.*, 2019, dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-018-3144-y>.
- [9] M. NAMIKI a T. HAYASHI. A New Mechanism of the Maillard reaction Involving sugar fragmentation and free radical formation. in the Maillard reaction in foods and nutrition, roč. 215, 0 roč., *American Chem. Soc.*, s. 21–46, 1983, doi: 10.1021/bk-1983-0215.ch002.

- [10] H. MITSUDA, K. YASUMOTO, a K. YOKOYAMA. Studies on the free radical in amino-carbonyl reaction. *Agric. Biol. Chem.*, roč. 29, č. 8, s. 751–756, 1965, doi: 10.1080/00021369.1965.10858460.
- [11] T. HOFMANN, W. BORS, a K. STETTMAIER. Studies on radical intermediates in the early stage of the nonenzymatic browning reaction of carbohydrates and amino acids. *J. Agric. Food Chem.*, roč. 47, č. 2, s. 379–390, 1999, doi: 10.1021/jf980626x.
- [12] G. BUDRYN a E. NEBESNY. Changes in free radicals content in coffee beans throughout convective roasting and microwaving and during storage. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch. Z. Für Leb. Leb.*, roč. 102, s. 526–530, 2006, doi: 10.17306/J.AFS.2016.3.27.
- [13] Q. HE a Y. LUO. Enzymatic browning and its control in fresh-cut produce. *Stewart Postharvest Rev.*, roč. 3, s. 1–7, 2007, doi: 10.2212/spr.2007.6.3.
- [14] J. R. Whitaker a C. Y. Lee. Recent advances in chemistry of enzymatic browning: an overview. ACS Publications, roč. 1, s. 2–7, 1995. doi: 10.1021/bk-1995-0600.ch001.
- [15] L. W. KROH. Caramelisation in food and beverages. *Food Chem.*, roč. 51, č. 4, s. 373–379, 1994, doi: 10.1016/0308-8146(94)90188-0.
- [16] T. SEVERIN, J. HIEBL, a H. POPP-GINSBACH. Untersuchungen zur Maillard-Reaktion XX. Nachweis von glycerinaldehyd, dihydroxyaceton und anderen hydrophilen zuckerabbauprodukten in caramellisierungsgemischen. *Z. Für Lebensm.-Unters. Forsch.*, roč. 178, č. 4, s. 284–287, 1984, doi: 10.1007/BF01851353.
- [17] F. J. HIDALGO a R. ZAMORA. The role of lipids in nonenzymatic browning. *Grasas Aceites*, roč. 51, č. 1–2, s. 35–49, 2000, doi: 10.3989/gya.2000.v51.i1-2.405.
- [18] F. S. H. LU, N. S. NIELSEN, C. P. BARON, a C. JACOBSEN. Oxidative degradation and non-enzymatic browning due to the interaction between oxidised lipids and primary amine groups in different marine PL emulsions. *Food Chem.*, roč. 135, č. 4, s. 2887–2896, 2012, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.07.008.
- [19] A. BASCHIERI, R. AMORATI, T. BENELLI, L. MAZZOCCHETTI, E. D'ANGELO, a L. VALGIMIGLI. Enhanced Antioxidant Activity under Biomimetic Settings of Ascorbic Acid Included in Halloysite Nanotubes. *Antioxidants*, roč. 8, č. 2, 2019, doi: 10.3390/antiox8020030.

- [20] J. C. BAUERNFEIND a D. M. PINKERT. Food processing with added ascorbic acid. *Adv. Food Res.*, roč. 18, s. 219–315, 1970, doi: 10.1016/s0065-2628(08)60371-7.
- [21] D. REMORINI et al., Effect of chlorine dioxide and ascorbic acid on enzymatic browning and shelf life of fresh-cut red delicious and granny smith apples. *J. Food Process. Preserv.*, roč. 39, č. 6, s. 2925–2934, 2015, doi: 10.1111/jfpp.12544.
- [22] J. VELÍŠEK, J. DAVÍDEK, V. KUBELKA, Z. ZELINKOVÁ, a J. POKORNY. Volatile degradation products of l-dehydroascorbic acid. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, roč. 162, č. 3, s. 285–290, 1976, doi: 10.1007/bf01113311.
- [23] T. KURATA a Y. SAKURAI. Degradation of L-ascorbic acid and mechanism of nonenzymic browning reaction. *Agric. Biol. Chem.*, roč. 31, č. 2, s. 170–176, 1967, doi: 10.1271/bbb1961.31.170.
- [24] M. H. YU, M. T. WU, D. J. WANG, a D. K. SALUNKHE. Nonenzymatic browning in synthetic systems containing ascorbic acid, amino acids, organic acids, and inorganic salts. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, roč. 7, č. 4, s. 279–282, 1974, doi: 10.1016/S0315-5463(74)73928-1.
- [25] PubChem. [Online]. National Library of Medicine, nedat. [cit. 2020-02-04] Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- [26] D. C. LAUREAN a S. PASHIKANTI. Rutin metabolites as powerful inhibitors of advanced glycation end products. *FASEB J.*, roč. 22, č. 1_supplement, s. 614.12-614.12, 2008, doi: 10.1096/fasebj.22.1_supplement.614.12.
- [27] C. M. LEE, B. SHERR, a Y. N. KOH. Evaluation of kinetic parameters for a glucose-lysine Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.*, roč. 32, č. 2, s. 379–382, 1984, doi: 10.1021/jf00122a049.
- [28] H. F. ERBERSDOBLER a V. SOMOZA. Forty years of furosine - forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods. *Mol. Nutr. Food Res.*, roč. 51, č. 4, s. 423–430, 2007, doi: 10.1002/mnfr.200600154.
- [29] J. M. AMES. Applications of the Maillard reaction in the food industry. *Food Chem.*, roč. 62, č. 4, s. 431–439, srp. 1998, doi: 10.1016/S0308-8146(98)00078-8.
- [30] L. HAN et al.. Review of the characteristics of food-derived and endogenous ne-carboxymethyllysine. *J. Food Prot.*, roč. 76, č. 5, s. 912–918, 2013, doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-472.

- [31] A. N. WIJEWICKREME a D. D. KITTS. Influence of reaction conditions on the oxidative behavior of model Maillard reaction products. *J. Agric. Food Chem.*, roč. 45, č. 12, s. 4571–4576, 1997, doi: 10.1021/jf970040v.
- [32] S. H. ASHOOR a J. B. ZENT. Maillard browning of common amino acids and sugars. *J. Food Sci.*, roč. 49, č. 4, s. 1206–1207, 1984, doi: 10.1111/j.1365-2621.1984.tb10432.x.
- [33] S. ASHOOR a J. ZENT. Maillard browning of common amino acids and sugars. *J. Food Sci.*, roč. 49, s. 1206–1207, 2006, doi: 10.1111/j.1365-2621.1984.tb10432.x.
- [34] J. LI, Y. YAO, J. WANG, J. HUA, J. WANG, Y. YANG, C. DONG, Q. ZHOU, Y. JIANG, Y. DENG, H. YUAN. Rutin, γ -aminobutyric acid, gallic acid, and caffeine negatively affect the sweet-mellow taste of congou black tea infusions. *Molecules*, roč. 24, č. 23, 2019, doi: 10.3390/molecules24234221.
- [35] J. BROWN, H. KHODR, R. HIDER, a C. RICE-EVANS. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu^{2+} ions: Implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.*, roč. 330 (Pt 3), s. 1173–1178, 1998, doi: 10.1042/bj3301173.
- [36] F. J. MORENO, E. MOLINA, A. OLANO, a R. LÓPEZ-FANDIÑO. High-pressure effects on Maillard reaction between glucose and lysine. *J. Agric. Food Chem.*, roč. 51, č. 2, s. 394–400, 2003, doi: 10.1021/jf025731s.
- [37] U. SCHWARZENBOLZ, H. KLOSTERMEYER, a T. HENLE. Maillard reaction under high hydrostatic pressure: studies on the formation of protein-bound amino acid derivatives. *Int. Congr. Ser.*, roč. 1245, s. 223–227, 2002, doi: 10.1016/S0531-5131(02)01003-8.
- [38] J. YANG, J. GUO, a J. YUAN. In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT - Food Sci. Technol.*, roč. 41, s. 1060–1066, 2008, doi: 10.1016/j.lwt.2007.06.010.
- [39] R. BORRELLI, V. FOGLIANO, S. MONTI, a J. AMES. Characterization of melanoidins from a glucose-glycine model system. *Eur. Food Res. Technol.*, roč. 215, s. 210–215, 2002, doi: 10.1007/s00217-002-0531-0.
- [40] D. CERVANTES-LAUREAN, D. D. SCHRAMM, E. L. JACOBSON, I. HALAWEISH, G. G. BRUCKNER, a G. A. BOISSONNEAULT. Inhibition of advanced glycation end product formation on collagen by rutin and its metabolites. *J. Nutr. Biochem.*, roč. 17, č. 8, s. 531–540, 2006, doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.10.002.

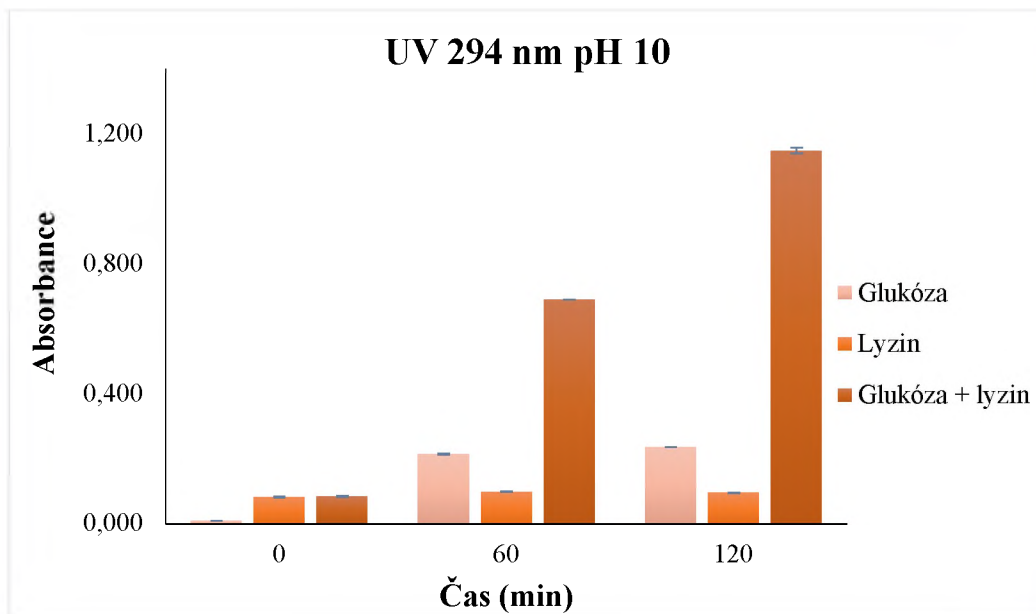
- [41] M. STAROWICZ a H. ZIELIŃSKI. Functional properties and Maillard reaction product formation in rye-buckwheat ginger cakes enhanced with rutin. *Superfood and Functional Food - An Overview of Their Processing and Utilization.*, Institute of Animal Reproduction and Food Research, Olsztyn. 2017, doi: 10.5772/65589.
- [42] L. BATES, J. M. AMES, D. B. MACDOUGALL, a P. C. TAYLOR. Laboratory reaction cell to model maillard color development in a starch-glucose-lysine system. *J. Food Sci.*, roč. 63, č. 6, s. 991–996, 1998, doi: 10.1111/j.1365-2621.1998.tb15840.x.
- [43] T. HAYASHI a M. NAMIKI. Role of sugar fragmentation in an early stage browning of amino-carbonyl reaction of sugar with amino acid. *Agric. Biol. Chem.*, roč. 50, č. 8, s. 1965–1970, 1986, doi: 10.1271/bbb1961.50.1965.
- [44] J. J. SHAW, D. BURRIS, a C.-T. HO. Response surface methodology in flavor research : reaction of rhamnose and proline. *Perfum. Flavour.*, roč. 15, č. 2, s. 60–66, 1990, dostupné z: <https://www.perfumerflavorist.com/flavor/research/Response-Surface-Methodology-in-Flavor-Research-Reaction-of-Rhamnose-and-Proline-372396371.html>.
- [45] J. J. BAERT, J. De CLIPPELEER, P. S. HUGHES, L. De COOMAN, a G. AERTS. *J. Agric. Food Chem.*, s. 11449–11472, 2012, doi.org/10.1021/jf303670z.
- [46] A. APRIYANTONO a J. M. AMES. Xylose-lysine model systems: The effect of pH on the volatile reaction products. *J. Sci. Food Agric.*, roč. 61, č. 4, s. 477–484, 1993, doi: 10.1002/jsfa.2740610416.
- [47] T. DAVIDEK, N. CLETY, S. AUBIN, a I. BLANK. Degradation of the Amadori compound N-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)glycine in aqueous model systems. *J. Agric. Food Chem.*, roč. 50, č. 19, s. 5472–5479, 2002, doi: 10.1021/jf025561j.
- [48] H.-Y. WANG, H. QIAN, W.-R. YAO. Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food Chem.*, roč. 128, č. 3, s. 573–584, 2011, doi: 10.1016/j.foodchem.2011.03.075.
- [49] F. J. MORALES, V. SOMOZA, a V. FOGLIANO. Physiological relevance of dietary melanoidins. *Amino Acids*, roč. 42, č. 4, s. 1097–1109, 2012, doi: 10.1007/s00726-010-0774-1.
- [50] M. VEČEŘA a J. GASPARIČ. *Důkaz a identifikace organických látek*. Praha, Nakladatelství technické literatury, 1973. ISBN 04-617-73.

- [51] V. MILATA a P. SEGLA. Spektrálne metódy v chémii. Bratislava: Vydavateľstvo STU. Edícia vysokoškolských učebníc. 2004. ISBN 80-227-2049-6.
- [52] J. ZÝKA a kol. Spektrofotometrie v ultrafialové a viditeľné oblasti svetla. Analytická príručka. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1988, Sv. 2, stránky 165-222. Čtvrté, upravené vydání.
- [53] B. H. STUART. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. 1st Edition. Chippingham: John Wiley and Sons, 2004, 242 s. ISBN 978-0-470-85428-0.
- [54] P. KANIA. Infračervená spektrometrie. In Laboratoř analytické chemie I [online]. Praha: VŠCHT, 2007 [cit. 2020-03-01]. Dostupné z: http://www.vscht.cz/anl/lach1/7_IC.pdf.
- [55] C. P. SHERMAN. Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. In prenhall.cz [online]. Frank A. Settle. New Jersey: Prentice Hall PTR, 1997 [cit. 2020-04-03]. Infrared spectroscopy. ISBN 0-13-177338-0. Dostupné z: <http://www.prenhall.com/settle/chapters/ch15.pdf>.
- [56] P. KLOUDA. Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [57] M. ANTOLOVICH, P. D. PRENZLER, E. PATSALIDES, S. MCDONALD. a K. ROBARDS. Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst*, 2001, 127(1), s. 183–198. doi: 10.1039/b009171p.
- [58] A. BLAINSKI, G. C. LOPES a J. C. DE MELLO. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*, 2013, 18(6), s. 6852-6855, doi: 10.3390/molecules18066852.
- [59] A. REBAYA, S. I. BELGHITH, B. BAGHDIKIAN, V. M. LEDDET, F. MABROUKI, E. OLIVIER, J. K. CHERIF a M. T. AYA. Total phenolic, total flavonoid, tannin content, and antioxidant capacity of *Halimium Halimifolium* (Cistaceae). *J. App. Pharm. Sci.*, 2014, 5(1), s. 52-57, doi: 10.7324/JAPS.2015.50110.
- [60] P. KUMAR, S. KUMARAVEL a C. LALITH. Screening of antioxidant activity, total phenolics and GC-MS study of *Vitex negundo*. *Afric. J. Biochem. Res.*, 2010, 4(7), s. 191-195, https://academicjournals.org/article/article1380110714_Kumar%20et%20al.pdf.

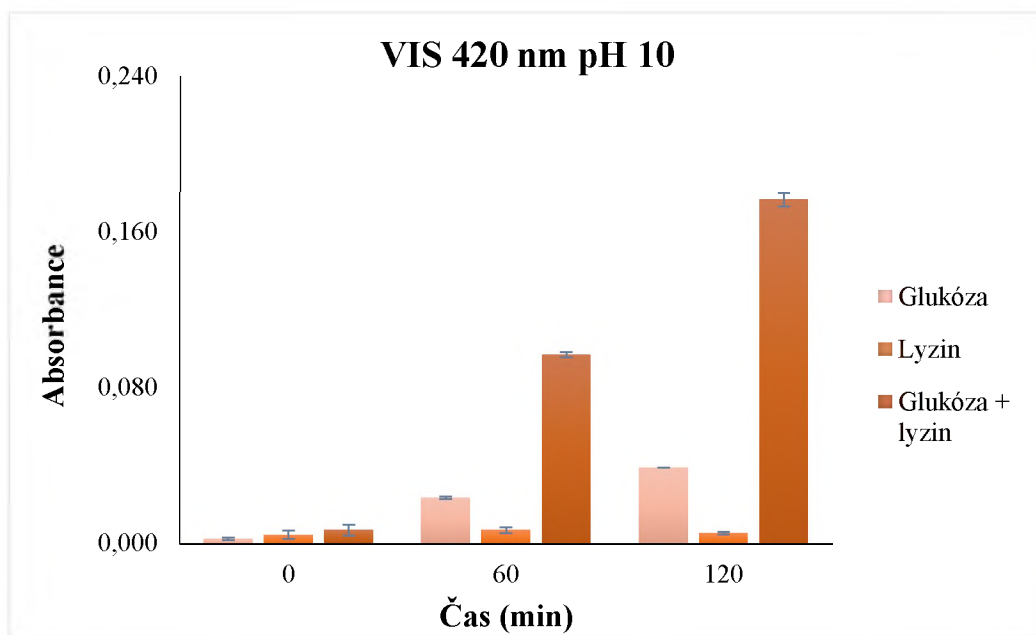
- [61] X. ZANG, X. LI, L. LIU, L. WANG, A. F. MASSOUNGA BORA, a L. DU. Covalent conjugation of whey protein isolate hydrolysates and galactose through Maillard reaction to improve the functional properties and antioxidant activity. *Int. Dairy J.*, 2019, vol. 102, 104584. doi: 10.1016/j.idairyj.2019.104584.
- [62] H. XU, Y. LI, H. W. TANG, C. M. LIU, a Q. S. WU. Determination of rutin with UV-Vis spectrophotometric and laser-induced fluorimetric detections using a non-scanning spectrometer. *Anal. Lett.*, 2010, 43(6), s. 893–904. doi: 10.1080/00032710903488795.

6. SEZNAM PŘÍLOH

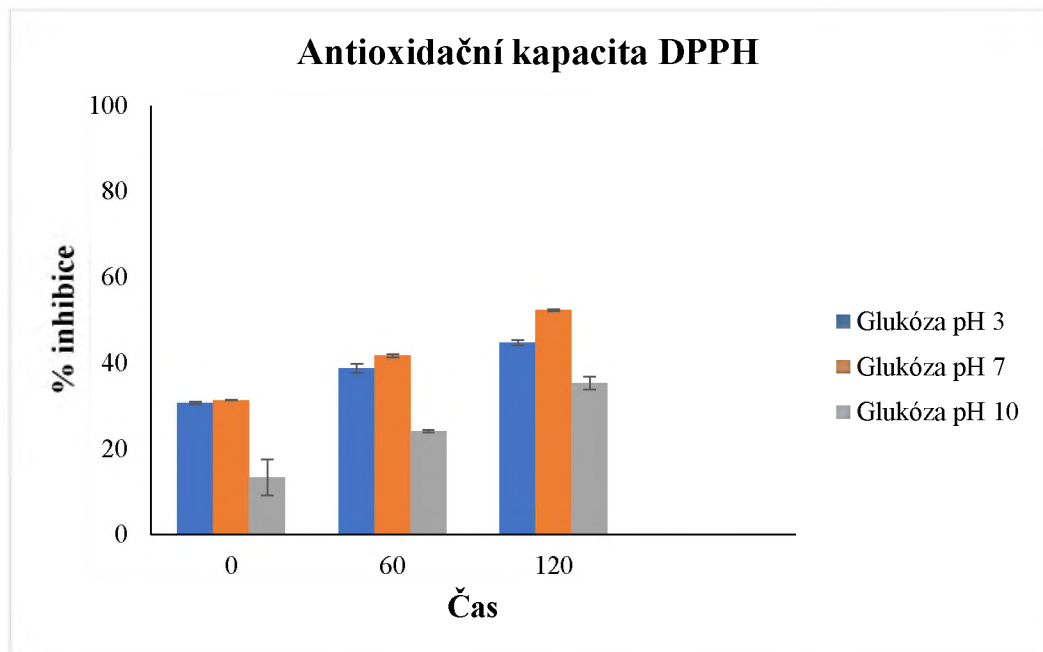
Obrázek P1 Graf tvorby meziproduktů Maillardovy reakce při teplotě 95°C (294 nm). Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku měření.	68
Obrázek P2 Graf tvorby konečných produktů Maillardovy reakce při teplotě 95 °C (420 nm). Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku měření.	68
Obrázek P3 Antioxidační kapacita DPPH produktů Maillardovy reakce při teplotě 95°C pro glukózu. Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku v měření.	69
Obrázek P4 Antioxidační kapacita DPPH produktů Maillardovy reakce při teplotě 95°C pro lysin. Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku v měření.	69
Obrázek P5 Redukční vlastnosti produktů Maillardovy reakce při teplotě 95°C pro glukózu (700 nm). Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku v měření.	70
Obrázek P6 Redukční vlastnosti produktů Maillardovy reakce při teplotě 95°C pro lysin (700 nm). Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku v měření.	70
Obrázek P7 Graf kalibrační křivky kyseliny gallové.	71
Obrázek P8 Fenolické látky v produktech Maillardovy reakce při teplotě 95°C pro glukózu. Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku v měření.	72
Obrázek P9 Fenolické látky v produktech Maillardovy reakce při teplotě 95°C pro lysin. Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku v měření.	72
Obrázek P10 Schopnost vychytávat peroxid vodíku v produktech Maillardovy reakce při 95°C pro glukózu. Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku v měření.	73
Obrázek P11 Schopnost vychytávat peroxid vodíku v produktech Maillardovy reakce při 95°C pro lysin. Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku v měření.	73
Obrázek P12 Kalibrační křivka koncentrace lysinu.	74
Obrázek P13 Izotachoforegram kapilární izotachoforézy.	74
Tabulka P1 Kalibrace kyseliny gallové.	71
Tabulka P2 Kalibrační závislost koncentrace lysinu.	74



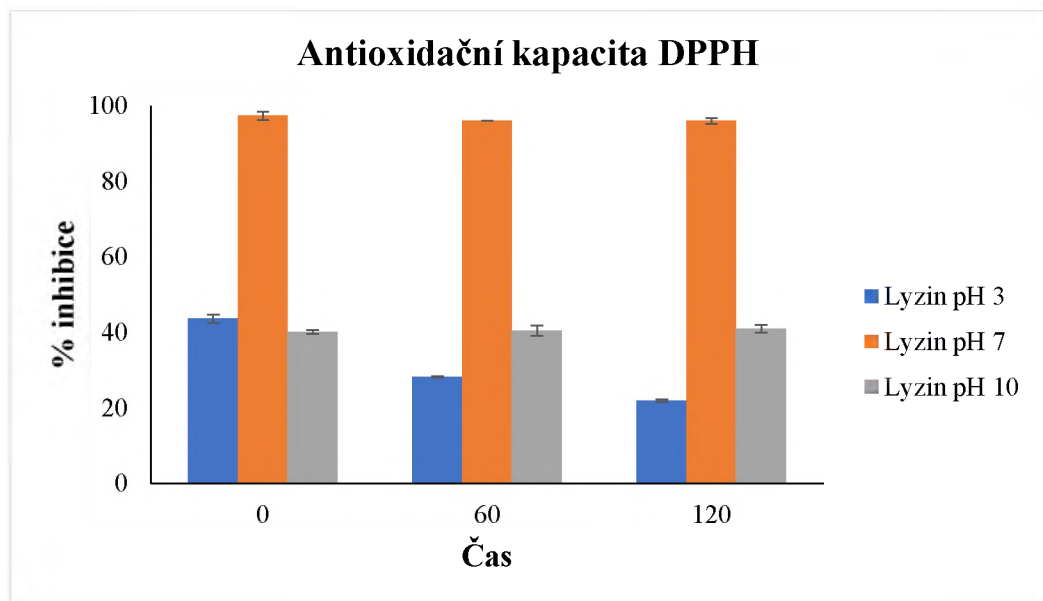
Obrázek P1 Graf tvorby meziproduktů Maillardovy reakce při teplotě 95°C (294 nm). Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku měření.



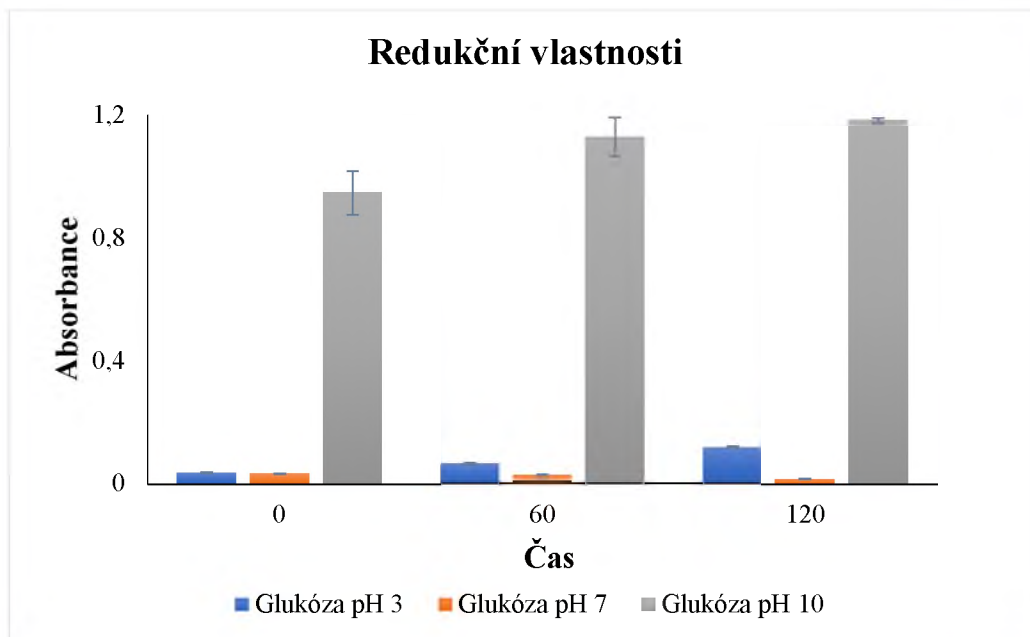
Obrázek P2 Graf tvorby konečných produktů Maillardovy reakce při teplotě 95 °C (420 nm). Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku měření.



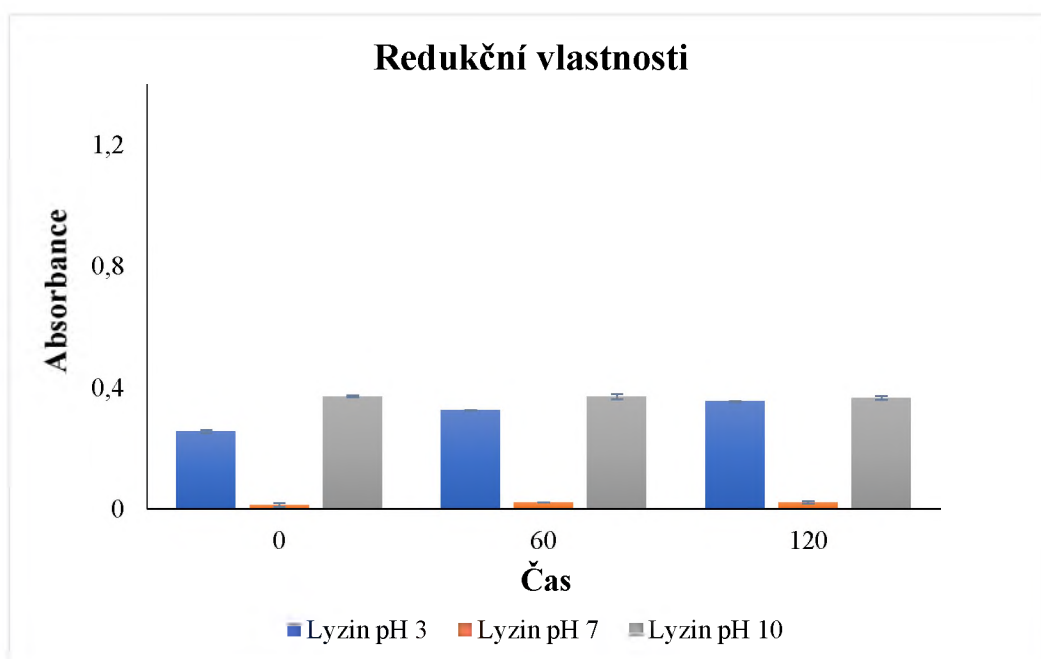
Obrázek P3 Antioxidační kapacita DPPH produktů Maillardovy reakce při teplotě 95°C pro glukózu. Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku v měření.



Obrázek P4 Antioxidační kapacita DPPH produktů Maillardovy reakce při teplotě 95°C pro lysin. Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku v měření.



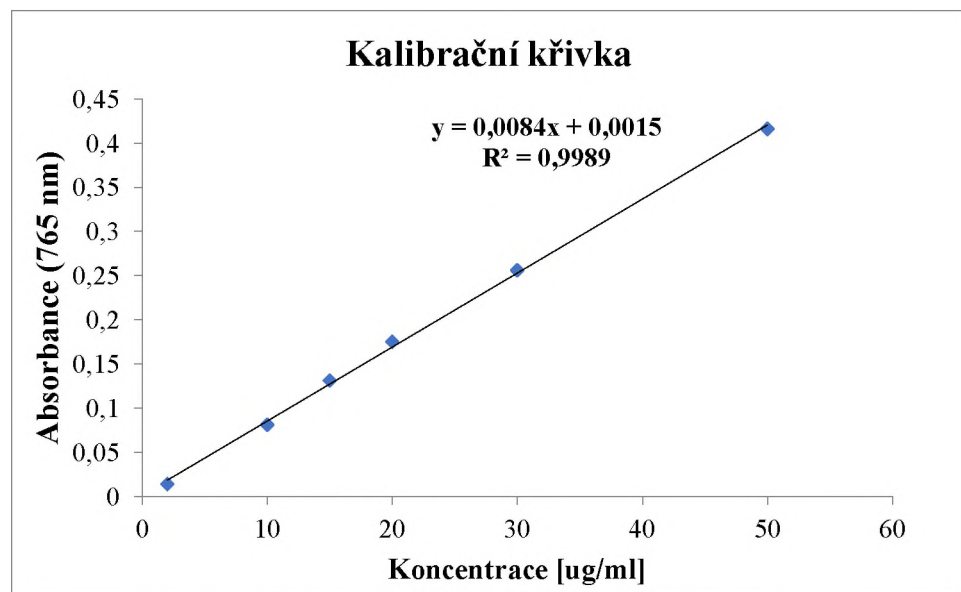
Obrázek P5 **Redukční vlastnosti produktů Maillardovy reakce při teplotě 95°C pro glukózu (700 nm)**. Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku v měření.



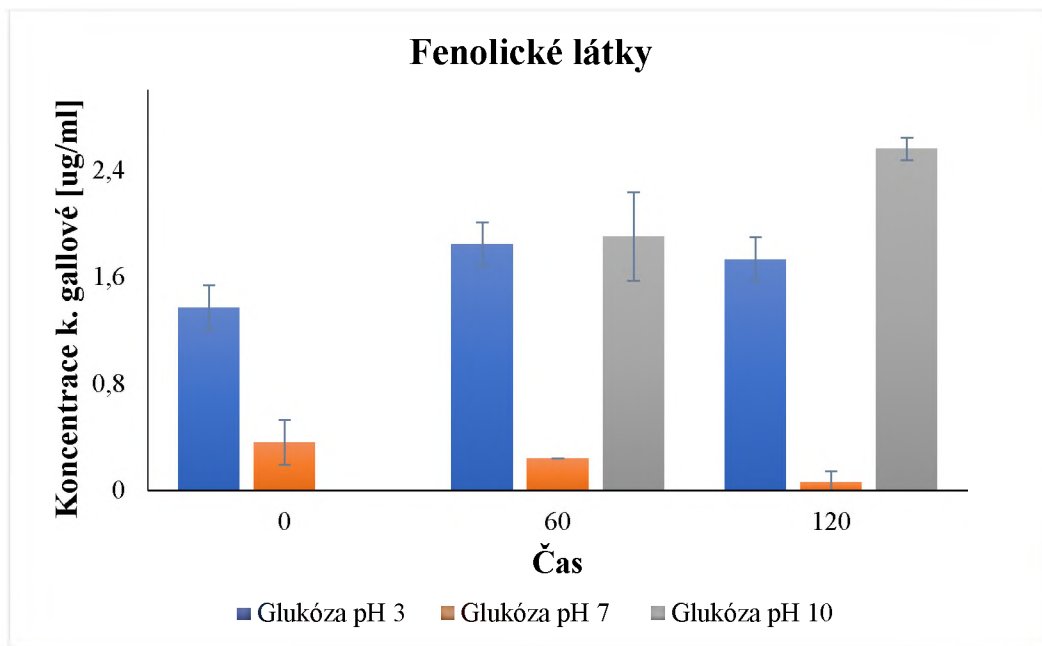
Obrázek P6 **Redukční vlastnosti produktů Maillardovy reakce při teplotě 95°C pro lysin (700 nm)**. Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku v měření.

Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]	Absorbance
2	0,014
10	0,081
15	0,131
20	0,175
30	0,256
50	0,416

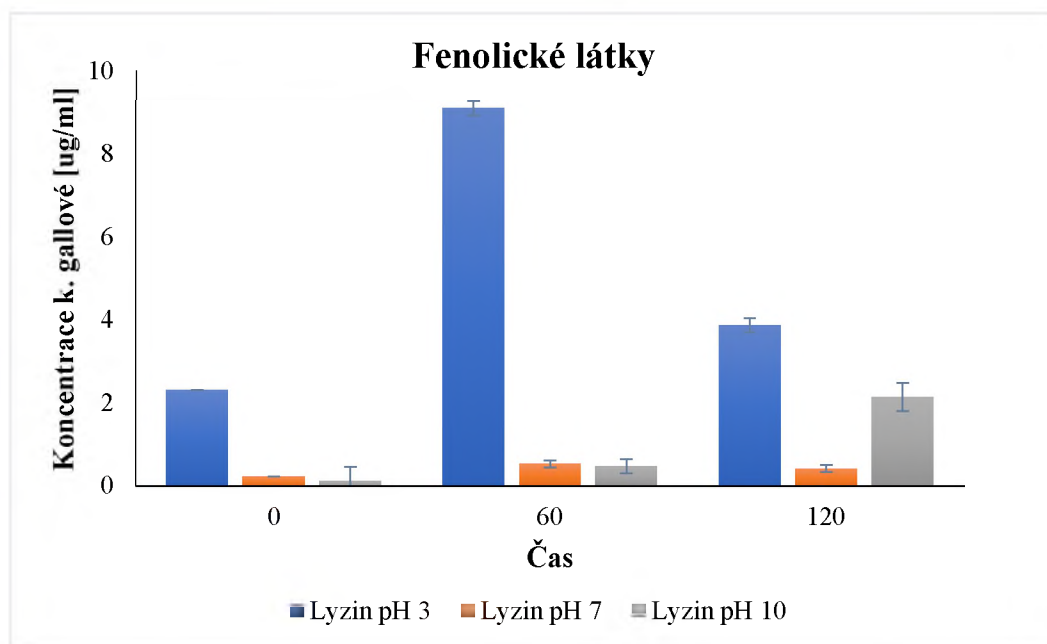
Tabulka P1 Kalibrace kyseliny gallové.



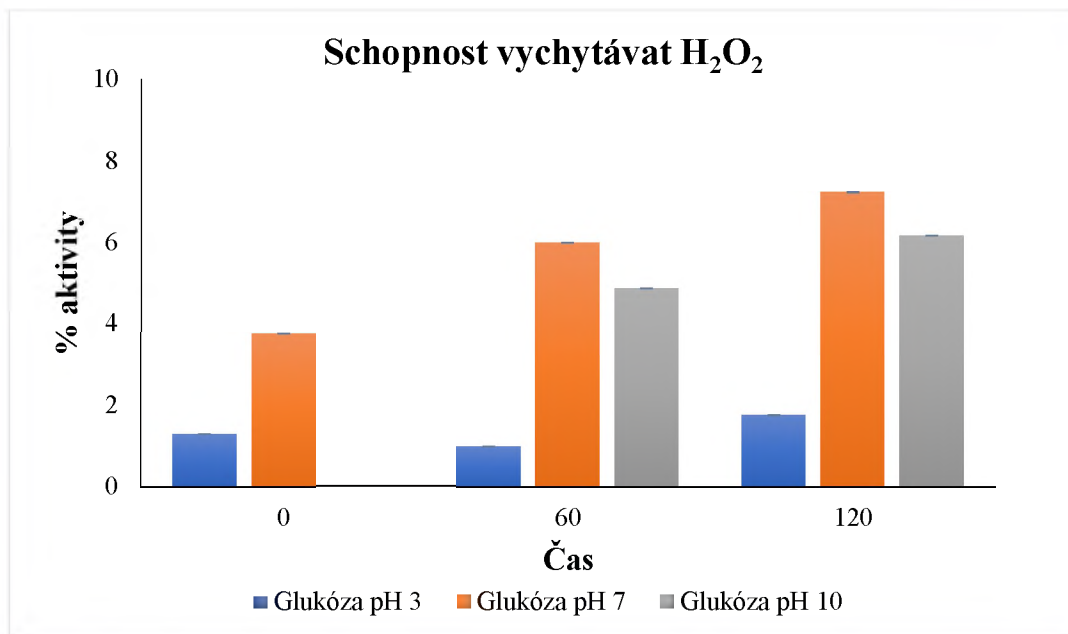
Obrázek P7 Graf kalibrační křivky kyseliny gallové.



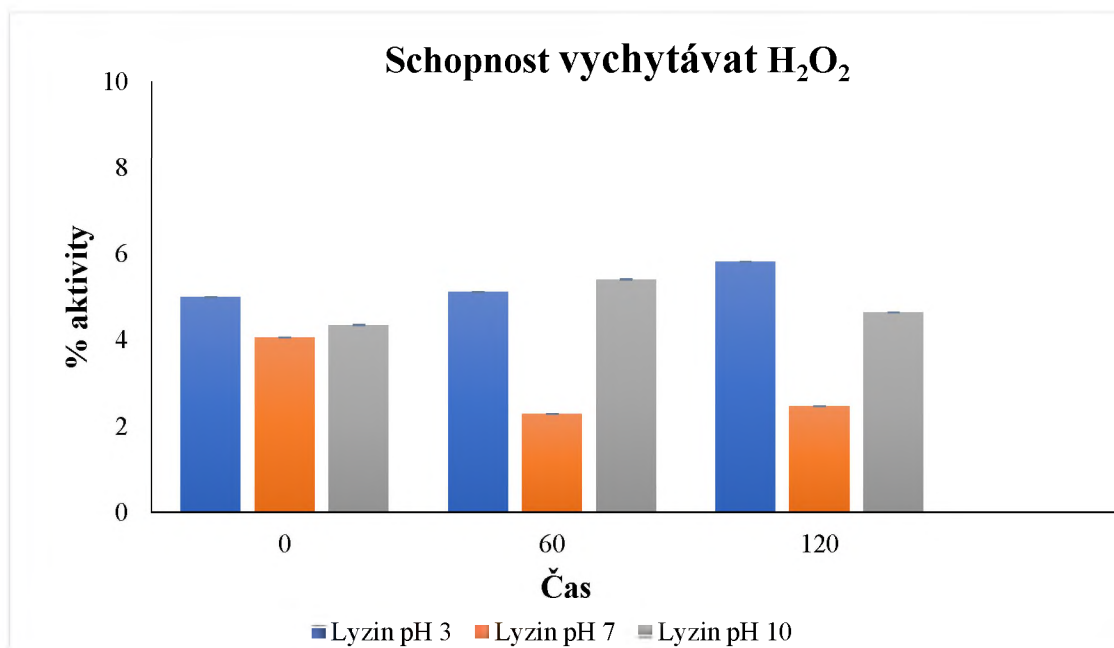
Obrázek P8 Fenolické látky v produktech Maillardovy reakce při teplotě 95°C pro glukózu. Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku v měření.



Obrázek P9 Fenolické látky v produktech Maillardovy reakce při teplotě 95°C pro lysin. Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku v měření.



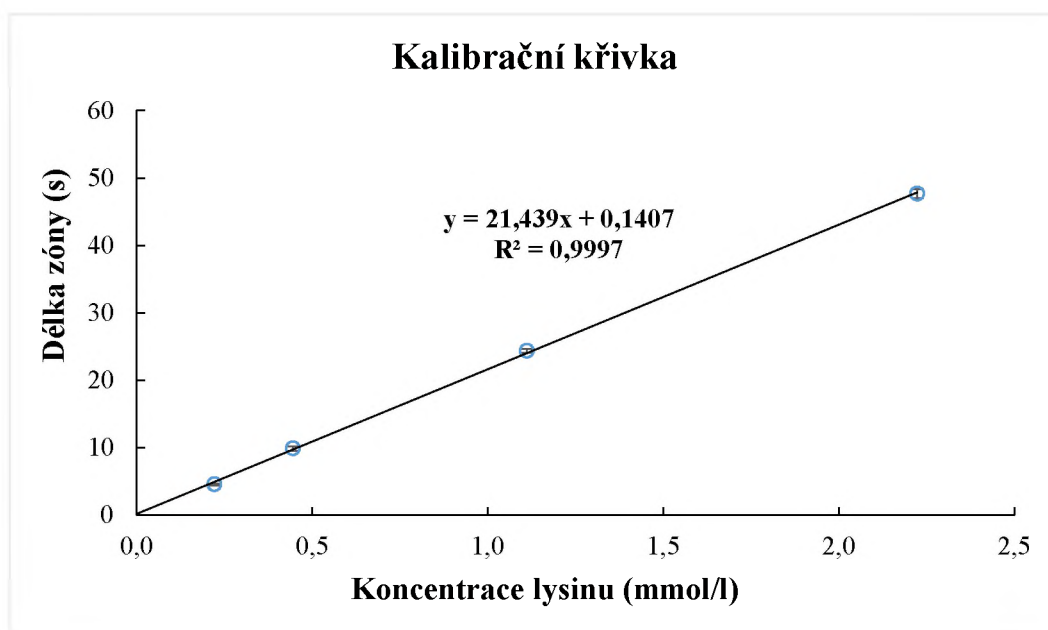
Obrázek P10 **Schopnost vychytávat peroxid vodíku v produktech Maillardovy reakce při 95°C pro glukózu.** Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku v měření.



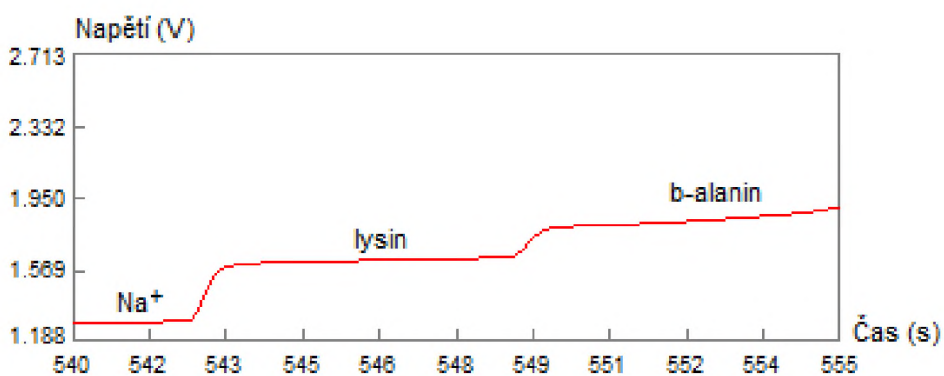
Obrázek P11 **Schopnost vychytávat peroxid vodíku v produktech Maillardovy reakce při 95°C pro lysin.** Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku v měření.

standard	ředění	koncentrace lysinu (mmol/l)	délka zóny (s)		průměr	odchylka
st 4	5x	2.22	48.10	47.19	47.65	0.64
st 3	10x	1.11	24.12	24.54	24.33	0.30
st 2	25x	0.45	10.11	9.65	9.88	0.33
st 1	50x	0.22	4.64	4.42	4.53	0.16

Tabulka P2 Kalibrační závislost koncentrace lysinu.



Obrázek P12 Kalibrační křivka koncentrace lysinu.



Obrázek P13 Izotachoforegram kapilární izotachoforézy