

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Stanovení prekurzorů tvorby akrylamidu v pšenici
metodou ^1H NMR**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Karolína Nováková

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Oldřich Faměra, CSc.

Konzultant: Doc. ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.

© 2018-2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Stanovení prekurzorů tvorby akrylamidu v pšenici metodou ^1H NMR" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Oldřichu Faměrovi, CSc. a Ing. Jaroslavu Havlíkovi, Ph.D. za vedení, odbornou spolupráci, cenné rady a velmi vstřícný přístup během vypracování této diplomové práce. Rovněž bych chtěla poděkovat spolužačkám Andree Slavičkové a Blance Sládkové za spolupráci a také celé své rodině za trpělivost a podporu.

Stanovení prekurzorů tvorby akrylamidu v pšenici metodou ^1H NMR

Souhrn

Akrylamid je zdravotně škodlivá látka, která vzniká během Maillardovy reakce, při které reaguje aminokyselina asparagin s redukujícími cukry (glukosa, fruktosa, sacharosa) vlivem tepelných úprav nad 120 °C. Spektroskopie ^1H NMR je vysoce moderní a informačně bohatá metoda s velkým potenciálem v oblasti potravinářství.

Cílem práce bylo kvantifikovat obsah asparaginu, glukosy, fruktosy a sacharosy, jako prekurzory vzniku akrylamidu v českých odrůdách pšeničné mouky. Dále stanovit vliv následujících faktorů: odrůdy, kategorie pekařské kvality a stanoviště na úroveň a vzájemný poměr prekurzorů s ohledem na možnou tvorbu akrylamidu u pekařských výrobků.

Bylo hodnoceno 27 vzorků pšenice ozimé (*Triticum aestivum*) ze stanic Vysoká u Příbramě, Čáslav a Lednice na Moravě, sklizených v roce 2017. Vzorky byly děleny dle následujících kategorií pekařské jakosti: E, A, B, C a odrůd: Annie, Bernstein, Dagmar, Fakir, Pankratz, Gordian, Hyfi, Bonanza a Frisky. Naměřeno bylo 128 skenů 1D noesy spektrum na Bruker Avance III s frekvencí 500,23 MHz. Data byla zpracována v softwarech Topspin 3.5 pl7, Chenomx 8.4 a MNova 12. Statistické zpracování bylo provedeno v programech MetaboAnalyst 4.0 s využitím metod analýzy hlavních komponent (PCA) a diskriminační analýzy částečných nejmenších čtverců (PLS-DA) a SPSS Statistics 24.0 s využitím Kruskal-Wallisova testu.

Prekurzory akrylamidu lze kvantitativně stanovit metodou ^1H NMR. Během měření bylo touto metodou identifikováno celkem 39 sloučenin. Vzorky se dle chemometrie lišily, i když obsah prekurzorů akrylamidu nebyl ovlivněn sledovanými faktory (odrůda a lokalita), pouze v případě faktoru pekařské kvality byl zjištěn vliv sacharosy. Sacharosa byla dle Kruskal-Wallisova testu rozdílná mezi skupinami pekařské kvality B a E. Vzorky ze stanice Lednice se výrazně lišily od vzorků z Vysoké a Čáslavi, avšak ne v prekurzorech akrylamidu. Metoda NMR nabízí zajímavé možnosti analýzy pro vstupní kontroly pšeničné mouky.

Klíčová slova: pšenice, odrůdy, akrylamid, aminokyseliny

Determination of acrylamide formation precursors in wheat by ^1H NMR method

Summary

The Acrylamide is a harmful compound formed during the Maillard reaction, in which the amino acid asparagine is reacting with reducing sugars (glucose, fructose, sucrose) due to heat treatments above 120°C. The ^1H NMR spectroscopy is a modern and information-rich method with high potential in the food industry.

The aim of this thesis was to quantify the content of asparagine, glucose, fructose and sucrose as precursors of acrylamide formation in Czech wheat flour varieties. Another aim was to determine the impact of the following factors: varieties, baking quality categories and location on the level and ratio of precursors with regard to the possible formation of acrylamide in bakery products. 27 common wheat (*Triticum aestivum*) samples from Vysoká u Příbramě, Čáslav and Lednice na Moravě harvested in 2017 were evaluated. Samples were divided according to the following baking quality categories: E, A, B, C and varieties: Annie, Bernstein, Dagmar, Fakir, Pankratz, Gordian, Hyfi, Bonanza, and Frisky. 128 scans of 1D noesy spectrum were measured on a Bruker Avance III with a frequency of 500.23 MHz. Data were processed in Topspin 3.5 pl7, Chenomx 8.4 and MNova 12 software. Statistical processing was performed in MetaboAnalyst 4.0 using Principal Component Analysis (PCA) and Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) and SPSS Statistics 24.0 using Kruskal-Wallis test.

Acrylamide precursors can be quantitatively determined by the ^1H NMR method. During the measurement, 39 compounds were identified by this method. Samples differed according to chemometrics, although the content of acrylamide precursors was not influenced by the monitored factors (varieties and location), only the influence of sucrose was found in the baking quality factor. Sucrose according to the Kruskal-Wallis test was different between the B and E baking quality categories. The samples from Lednice area differed significantly from samples from Vysoká and Čáslav areas. The NMR method offers interesting options for analysis for the input control of wheat flour.

Keywords: wheat, varieties, acrylamide, amino acids

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíl práce	2
3 Literární rešerše.....	3
3.1 Pšenice obecná	3
3.1.1 Morfologická stavba zrna	3
3.1.2 Chemické složení pšeničné mouky	3
3.1.3 Kvalita pšeničné mouky	8
3.1.4 Zpracování těsta	9
3.1.5 Pečení	11
3.2 Akrylamid.....	13
3.2.1 Vznik akrylamidu.....	13
3.2.2 Toxické účinky akrylamidu	14
3.2.3 Snížení tvorby akrylamidu v potravinách.....	15
3.3 Princip a využití spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR)18	
4 Materiál a metody	20
4.1 Materiál	20
4.2 Metody	23
5 Výsledky	25
5.1 Necílová analýza NMR spekter (binning).....	25
5.1.1 Analýza hlavních komponent (PCA)	25
5.1.2 Diskriminační analýza částečných nejmenších čtverců (PLS-DA)	26
5.2 Cílová analýza NMR spekter (koncentrace)	28
5.2.1 Analýza hlavních komponent (PCA)	28

5.2.2	Diskriminační analýza částečných nejmenších čtverců (PLS-DA)	29
5.2.3	Kruskal-Wallisův test.....	31
6	Diskuze	35
7	Závěr	37
8	Literatura.....	38
9	Seznam tabulek	42
10	Seznam obrázků.....	43

1 Úvod

Akrylamid je zdraví škodlivá látka vznikající během Maillardovy reakce, při které reaguje aminokyselina asparagin s redukujícími cukry (glukosa, fruktosa, sacharosa) vlivem tepelných úprav nad 120 °C. Přestože je akrylamid součástí jídelníčku od doby, kdy člověk vynalezl oheň, od roku 2002 vznikají zvýšené obavy ohledně množství akrylamidu v potravinách a světoví odborníci kvůli škodlivosti doporučují jeho obsah v potravinách snížit. Mezi rizikové potraviny z hlediska výskytu akrylamidu patří zejména výrobky z brambor (hranolky, smažené lupínky), obilovin (pečivo, snídaňové cereálie, sušenky, oplatky) a pražená káva. Bylo zjištěno, že akrylamid může působit neurotoxicky a potencionálně zvyšuje riziko vzniku karcinogenu.

Vzhledem k tomu, že pšeničná mouka a výrobky z ní se v našem jídelníčku objevují denně a zároveň patří do skupin rizikových potravin z hlediska výskytu akrylamidu, je nutné se touto problematikou dále zabývat. Současná data zabývající se účinky akrylamidu či vlivem jeho tvorby jsou stále velice limitována.

V této práci je popsáno chemické složení pšeničné mouky, její kvalitativní parametry, pekárenské technologie a děje, které probíhají během pečení. Akrylamid vzniká právě během pečení z redukujících cukrů a asparaginu, proto byla tato práce zaměřena na kvantifikaci těchto prekurzorů v českých odrudách pšeničné mouky. Další část se zabývá již zmíněným akrylamidem, jakým způsobem vzniká, proč je nebezpečný a návrhy pro snížení obsahu akrylamidu v potravinách. V teoretické části je také popsán princip a využití metody spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR).

V praktické části bylo metodou ^1H NMR hodnoceno 27 vzorků pšeničné mouky sklizených v roce 2017. Vzorky pocházely ze tří oblastí (Lednice na Moravě, Vysoká u Příbramě a Čáslav), z každé oblasti bylo vybráno devět odrůd (Annie, Bernstein, Bonanza, Dagmar, Fakir, Frisky, Gordian, Hyfi, Pankratz) různých pekařských jakostí (E, A, B, C). Cílem práce bylo kvantifikovat obsah prekurzorů akrylamidu a stanovit vliv daných faktorů (odrůda, lokalita, kategorie pekařské jakosti) pro vznik a množství akrylamidu v pekařských výrobcích. Dále byla využita chemometrika na základě NMR spekter s cílem zjistit, zda lze na základě ^1H NMR zjistit rozdíly mezi českými moukami a jejich vhodnosti k pekařskému využití.

2 Cíl práce

Hypotéza

Sacharidy (glukosu, fruktosu, sacharosu) a aminokyselinu asparagin v pšeničné mouce, jako prekurzory akrylamidu, je možné kvantitativně stanovit metodou ^1H NMR. Obsah těchto látek může být ovlivněn odrůdami.

Cíl

Zavést a validovat metodu ^1H NMR na kvantifikaci obsahu asparaginu, glukosy, fruktosy a sacharózy v pšeničné mouce. Stanovit vliv vybraných faktorů (odrůdy, pekařské jakosti, stanoviště a ročníku) na úroveň a vzájemný poměr těchto látek s ohledem na možnou tvorbu akrylamidu u pekařských výrobků.

3 Literární rešerše

3.1 Pšenice obecná

3.1.1 Morfologická stavba zrna

Obilka se skládá ze tří hlavních částí: obalových vrstev (vnější oplodí a podpovrchové osemení), klíčku a endospermu. Na rozhraní obalových vrstev a endospermu se nachází aleuronová vrstva. Z hlediska hmotnostního podílu tvoří obilku z 82 % endosperm, 15 % obalové vrstvy a z 3 % klíček (Příhoda et al. 2004).

Obalové vrstvy neboli otruby mají za úkol chránit obilku před vnějšími vlivy, především proti mechanickému a mikrobiologickému poškození. Oplodí je z větší části složené z nerozpustných polysacharidů (celulosa) s velkou mechanickou pevností. Osemení je taktéž složené z polysacharidů, které jsou však částečně rozpustné ve vodě. Vnější obalové vrstvy mohou být využity jako zdroje vlákniny, což je výhodné z hlediska racionální stravy, ale z hlediska pekárenské technologie se horší kvalita a zpracovatelnost těsta. Klíček je nositelem genetických informací a při mlýnském zpracování je vždy oddělován z důvodu brzké oxidace. Ohledně výživy člověka je klíček bohatým zdrojem některých významných látek. Největší podíl zrna tvoří endosperm, který obsahuje zásobní látky pro klíčící rostlinu, a také se z něj vyrábí mouka. Z velké části je endosperm tvořen škrobem a z cca 10 % bílkovinami (Příhoda et al. 2003).

3.1.2 Chemické složení pšeničné mouky

Z pohledu racionální výživy jsou jednotlivé živiny v pšeničném zrně zastoupeny v nevyrovnaném poměru. Jsou zdrojem hlavně sacharidů a bílkovin, v menším množství obsahují lipidy, některé vitaminy a minerální látky (Dostálová et al. 2016).

Tabulka 1: Nutriční hodnoty pšeničné mouky

Pšeničná mouka	množství 100 g
Energie	1466 kJ
Tuky	2 g
– nasycené mastné kyseliny	0,23 g
– monoenoové kyseliny	0,41 g
– polyenoové kyseliny	0,78 g
Sacharidy	73 g
– cukry	2 g
Vláknina	3 g

www.kaloricketabulky.cz

Sacharidy

V pšeničné mouce se sacharidy vyskytují ve formě:

- monosacharidů,
- oligosacharidů,
- polysacharidů.

Monosacharidy se v mouce vyskytují v malém množství (maximálně 1–3 %) a v obilném zrně jich je nejvíce obsaženo v klíčku. Nejvýznamnějšími monosacharidy v obilovinách jsou pětičlenné pentosy – arabinosa, xylosa, ribosa, a šestičlenné hexosy – glukosa, fruktosa, galaktosa, manosa.

Oligosacharidy (i polysacharidy) se skládají z molekul monosacharidů, které jsou spojeny glykosidickými vazbami. Pšeničná mouka obsahuje maltosu a sacharosu. Sacharosa je složená z molekul glukosy a fruktosy a není přímo zkvasitelná kvasinkami alkoholové fermentace. Přímo zkvasitelnou se sacharosa stává až po hydrolyze. Maltosa je složená ze dvou molekul glukosy a vzniká jako předposlední produkt hydrolyzy škrobu (Příhoda et al. 2003).

Polysacharidy v obilovinách dělíme na škrobové a neškrobové polysacharidy (vláknina), které plní funkce zásobní a stavební (Příhoda et al. 2004). Obilná zrna uchovávají energii ve formě škrobu. Jeho množství tvoří 60–75 % celkové sušiny zrna (Šrámková et al. 2009). Obsah škrobu v mouce činí přibližně 75–80 % sušiny. (Příhoda et al. 2004). Škrob se vyskytuje ve formě škrobových zrn, které se rozdělují u pšenice na dva typy: velké lentikulární (25–40 μm) a malé sférické (5–10 μm). Škrob je polymer glukosy a skládá se ze dvou frakcí – lineární amylosy a rozvětveného amylopektinu. Molekuly glukosy jsou u amylosy spojeny α -1,4 glykosidickou vazbou a v molekulách amylopektinu se vyskytují vazby α -1,6. Pšeničný škrob obsahuje 20–30 % amylosy a 70–80 % amylopektinu (Šrámková et al. 2009).

Hlavní použití škrobu v potravinářství je spojené s bobtnáním, mazováním (želatinace) a retrogradací. Škrobová zrna jsou nerozpustná ve studené vodě, avšak se zvyšující se teplotou začínají mazovatět. Počáteční teplota mazovávání u pšeničné mouky se pohybuje zpravidla mezi 53–64 °C (Bonomi et al. 2014). Úplné zmazování škrobu nastává mezi 70–95 °C. Teploty mazovávání se u různých škrobů liší. Například žitný škrob patří mezi škroby s nejnižší teplotou mazovávání. V pekařském těstě nikdy nedochází k úplnému zmazování z důvodu nedostatku vody v těstě, ale dochází především k bobtnání (Příhoda et al. 2003). Po vychladnutí těsta dochází k retrogradaci, která se zásadně podílí na stárnutí pečiva (Česká technologická platforma pro potraviny 2015).

Nutriční hodnota škrobu závisí na jeho struktuře a modifikaci upravující biologickou dostupnost (chemická, mechanická, tepelná). Významnou vlastností škrobu je hydrolyza v tenkém střevě. Štěpení škrobu v tenkém střevě uskutečňuje α -amylasa ze slinivky břišní. Amylosa je štěpena na maltooligosacharidy, zatímco amylopektin na maltosu, maltotriosu a dextriny. Amylosa je trávena pomaleji než amylopektin. Výjimkou je rezistentní škrob, který není rozštěpen enzymy v tenkém střevě, ale přechází do tlustého střeva. Rezistentní škrob se svými účinky podobá vláknině a řadí se do stejné skupiny polysacharidů. U cereálních produktů vlivem tepelného zpracování a následovného ochlazení dochází k nárůstu rezistentního škrobu (starší pečivo) (Šárka et al. 2013).

Mezi neškrobové polysacharidy patří celulosa, pentosany a β -glukany, které zastávají funkci stavební. Tvoří základ vlákniny, která je důležitou složkou lidské potravy. Celulosa se skládá obdobně jako škrob z glukosových jednotek spojených vazbou β -1,4, je zcela nerozpustná a za normálních teplot výrazně nebobtná. Pentosany obsahují ve své molekule podstatnou část pentos, především arabinosy a xylosy. Strukturně se jedná hlavně o polysacharid arabinoxylan s lineárním řetězcem, který tvoří jednotky xylosy s vazbami β -1,4 a odvětvené řetězce arabinosy. Jedná se o pestrou skupinu látek, kterou lze rozdělit podle rozpustnosti ve vodě. Obsah pentosanů v různých obilovinách se liší, v pšeničné mouce se jich nachází pouze 1–3 % (Příhoda et al. 2004).

Pojmem β -glukan se značí skupina látek tvořená glukosovými jednotkami, které jsou vzájemně spojené β -glykosidovou vazbou. Liší se strukturou, fyzikálně-chemickými vlastnostmi, ale i účinkem na zdraví. Mezi tyto látky patří i ve vodě nerozpustná celulosa (viz výše) a částečně rozpustná hemicelulosa (Blažková et al. 2017).

Tabulka 2: Obsah významných polysacharidů v pšeničné mouce (Velíšek & Hajšlová 2009)

Polymer	Obsah (%)
škrob	60–80
neškrobové polysacharidy	3–11
celulosa	0,2–3
hemicelulosa	2–7
arabinoxylany	1–3
β-glukany	0,5–2
xyloglukany	0,2–0,4
pektiny	0,3–0,5
glukofruktany	1–4

Obsah polysacharidů se pohybuje v širokých mezích, jelikož závisí na stupni vymletí mouky i na dalších faktorech. Vysoce vymílané mouky obsahují vyšší množství neškrobových polysacharidů (Velíšek & Hajšlová 2009).

Proteiny

Většina technologických vlastností spojených s výrobou těsta a pečením závisí na pšeničných proteinech. Pšenice obsahuje čtyři typy proteinů – albuminy, globuliny, prolaminy a gluteliny (Khan et al. 2010).

Albuminy jsou neutrální bílkoviny rozpustné ve vodě, teplem koagulují a větší význam mají u živočišných výrobků (laktalbumin, ovalbumin).

Globuliny představují slabě kyselé bílkoviny, které nejsou rozpustné ve vodě, ale jsou rozpustné ve zředěných roztocích solí, kyselin a zásad, také koagulují vlivem tepla. Mají širší význam u rostlin i zvířat.

Prolaminy (gliadiny) jsou rozpustné ve zředěném ethanolu, roztocích solí, kyselin, zásad a vlivem tepla nekoagulují. Jde o početnou skupinu proteinů, která je důležitá především u rostlin. Skládají se z velkého množství glutaminu a prolinu.

Gluteliny jsou rozpustné ve zředěných roztocích solí, kyselin a zásad, koagulují teplem. Obsahují kyselinu glutamovou a mají význam v rostlinné říši (glutenin, hordenin, oryzenin, zeanin) (Gabrovská et al. 2016).

Pšeničná mouka obsahuje 7–15 % proteinů, z toho 80 % tvoří prolaminy a gluteliny, a zbylých 20 % tvoří albuminy, globuliny a enzymy (proteasy, lipasy a další) (Velíšek & Hajšlová 2009).

Tabulka 3: Procentuální obsah proteinů v pšenici, jejich triviální název
(Velíšek & Hajšlová 2009)

Obilovina	Albuminy (leukosin)	Globuliny (edestin)	Prolaminy (gliadin)	Gluteliny (glutenin)
pšenice	14,7 %	7 %	32,6 %	45,7 %

V primární struktuře se molekuly proteinů skládají z řetězců aminokyselin spojených peptidovou vazbou. Ta spojuje jednoduchou kovalentní vazbou aminoskupinu (NH₂) jedné aminokyseliny a karboxylovou skupinu (COOH) druhé aminokyseliny. V proteinech obilovin se vyskytuje zhruba 18 různých aminokyselin. Poměry, ve kterých se vyskytují, a jejich pořadí v řetězcích udávají charakteristiku konkrétních proteinů (Kent 1983).

Tabulka 4: Skladba aminokyselin, jejich zkratka a množství v pšeničném zrně a mouce
(16 g dusíku ve 100 g bílkoviny) (Kent 1983)

Aminokyselina	Pšeničné zrně	Pšeničná mouka
Alanin (Ala)	3,4	2,7
Arginin (Arg)	4,8	3,9
Kyselina asparagová (Asp)	5	4
Cystein (Cys)	1,7	1,7
Kyselina glutamová (Glu)	30,4	34,6
Glycin (Gly)	3,9	3,1
Histidin (His)	2,0	1,9
Isoleucin (Ile)	3,8	4,0
Leucin (Leu)	6,6	6,8
Lysin (Lys)	2,7	2,0
Methionin (Met)	1,7	1,7
Phenylalanin (Phe)	4,5	5
Prolin (Pro)	10,1	11,7
Serin (Ser)	5,2	5,5
Threonin (Thr)	2,9	2,8
Tryptofan (Trp)	1,2	1
Tyrosin (Tyr)	3,2	3,3
Valin (Val)	4,7	4,5

Lipidy

Přestože jsou lipidy v pšeničné mouce zastoupeny v minoritním množství (1–2 %), mají významný vliv na kvalitu a strukturu těsta. Mají schopnost pojit se s bílkovinami kvůli jejich amfipatické povaze a se škrobem vytvářejí inkluzní komplexy (Šrámková et al. 2009).

V pšeničné mouce se nacházejí neutrální acylglyceroly, volné mastné kyseliny, polární glykolipidy a fosfolipidy (Gonzalez-Thuillier et al. 2015). Mezi acylglyceroly patří triglyceridy, mono- a di-galaktosyldiglyceridy, N-acylfosfatidylethanolamin, fosfatidylethanolamin, fosfatidylglycerol a fosfatidylcholin (Morrison 1994). V pšeničné mouce převládají následující

mastné kyseliny: linolová (18:2), palmitová (16:0) a olejová (18:1) (Gonzalez-Thuillier et al. 2015).

V obilovinách se vyskytují také lipofilní pigmenty, především karotenoidy a lutein. Vyšší obsah karotenoidů v bílém pečivu je nežádoucí (Příhoda et al. 2004).

Vitaminy a minerální látky

Obiloviny jsou zdrojem vitaminů skupiny B – thiaminu (B₁), riboflavinu (B₂), niacinu (B₃), kyseliny listové, pyridoxinu (B₆) a lipofilních vitaminů E a K. Největší množství vitaminů se nachází v obalových vrstvách a klíčku, zatímco endosperm, ze kterého se mouka vyrábí, je na vitaminy chudý. V pšeničné mouce se nacházejí tyto minerální látky: fosfor, draslík, hořčík, železo, vápník, sodík a zinek (Finnie & Atwell 2016).

3.1.3 Kvalita pšeničné mouky

Jakost pšeničné mouky je daná zejména kvalitou zpracovávaného zrna. Zpracovává se pšenice určená pro potravinářské účely, která splňuje definovaná kritéria. Určitým nositelem jakosti může být i odrůda, ale není tomu tak vždy. Na kvalitě se podílejí i další faktory např. lokalita a s ním související kvalita půdy, klimatické podmínky a správně zvolená agrotechnika (Kovaříková & Netolická 2011).

Požadavky, které musí pšenice splňovat, aby mohla být zařazena do potravinářské pšenice, uvádí ČSN 461100-2 Obiloviny potravinářské – část 2: Pšenice potravinářská. Kritéria, které se hodnotí u potravinářské pšenice jsou následující (Burešová & Pavlík 2005):

- Vlhkost (ČSN ISO 712)
- Objemová hmotnost (ČSN ISO 7971-2)
- Obsah dusíkatých látek v sušině (ČSN 1011-18)
- Číslo poklesu (ČSN ISO 3093)
- Sedimentační index (ČSN ISO 5529)
- Příměsi a nečistoty (ČSN 461011-6)

Podle registru ÚKZÚZ jsou odrůdy pšenice pro pekárenské zpracování děleny do následujících kategorií pekařské jakosti (Kulovaná 2002):

- E – elitní, velmi dobrá, zlepšující.
- A – kvalitní, dobrá, samostatně zpracovatelná
- B – chlebová, odrůdy doplňkové, zpracovatelné ve směsi

- C – nevhodná pro pekařské zpracování

Pro zařazení do skupin pekařské jakosti se hodnotí následující kritéria (Horáková & Dvořáčková 2018):

- Rapid Mix Test (objemová výtěžnost pečiva)
- Obsah dusíkatých látek v sušině (%)
- Sedimentační Zelenyho test (ml)
- Číslo poklesu (s)
- Objemová hmotnost (g/l)
- Vaznost mouky (%)

Kvalita pšeničné mouky se obecně vyjadřuje silou mouky a plynotvornou schopností mouky. Obecně je kvalita vlastnost, která umožní vytvořit z mouky, vody, droždí a dalších ingrediencí výrobek s dobrým objemem, lákavého vzhledu, s kyprou a pružnou střídkou, křupavou kůrkou, příjemné chuti a vůně. Síla mouky je daná množstvím a kvalitou bílkovin, především lepku. Plynotvorná schopnost je charakterizována stavem škrobu a aktivitou amylolytických enzymů (Kovaříková & Netolická 2011).

3.1.4 Zpracování těsta

Samotnému zpracování těsta předchází standardní proces zpracování a proces mletí pšeničného zrna. Standardní proces zpracování je založen na čištění a kondicionování zrn, má za úkol připravit zrna k vlastnímu mletí. Vlastní proces mletí opakovaně drtí a třídí melivo v několika mlecích pasážích. Cílem je oddělit endosperm od obalových vrstev a klíčku a získat mouku o požadované čistotě a granulaci (Skřivan et al. 2016).

Suroviny pro přípravu pšeničného těsta

Mezi základní suroviny pro výrobu běžného pšeničného pečiva patří (kromě pšeničné mouky) voda, sůl, droždí, tuk a cukr. Sůl v podobě chloridu sodného (NaCl) je důležitou surovinou, která má vliv na chuť výsledného produktu i strukturu těsta. Působí jako silný elektrolyt, ve vodě způsobuje ztužení bílkoviny a tím zpevnění textury těsta (Sluková & Skřivan 2016).

Pro nakypření těsta běžného pšeničného pečiva se využívá pekařské droždí (kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*). Po přidání těchto kvasinek probíhá alkoholová fermentace a vzniká oxid uhličitý (CO₂), který způsobí oné nakypření. Během alkoholové fermentace vznikají

organické sloučeniny, které zlepšují chuť finálního výrobku. V České republice se tradičně používá žitný kvas pro výrobu chleba, pšeničný kvas se používá spíše v zahraničí. Příprava kvasu je časově velmi náročná (Příhoda et al. 2013). Při výrobě jemného a trvanlivého pečiva se užívá chemické kypření, nejčastěji hydrogenuhličitan sodný.

Cukr se do pekařských výrobků přidává ve formě prášku (sacharóza), sirupu (glukózový, glukózo-fruktózový), nebo se také přidává med. Tuky (oleje, máslo, margaríny) obsahují zejména cukrářské výrobky a jemné pečivo (Sluková & Skřivan 2016).

Jako vedlejší suroviny mohou být použity mléčné výrobky, které pečivu dodávají chuť a barvu kůrky, nebo také vejce a různá aditiva jako emulgátory, oxidační činidla (kyselina askorbová) a konzervanty (Cauvain 2015).

Příprava těsta

Pokud k mouce přidáme vodu, bílkoviny a pentosanové polysacharidy začnou bobtnat. Hnětení ještě více podpoří bobtnání bílkovin a lepek začne vytvářet trojrozměrnou souvislou síť (Pažout et al. 2012). Ta má charakter tuhého elastického gelu, při jehož vzniku mají význam disulfidické vazby. Na tvorbu pšeničného těsta mají vliv také oxidační látky a škrob. Oxidační látky se používají ke zkrácení procesu zrání, při hnětení dojde k vytvoření konečné struktury těsta za velice krátkou dobu. Navíc bude bílkovinná struktura těsta pevnější, zvýší se objem výrobků a tenké stěny pórů zajistí pružnou texturu střídy. Přídavek škrobu ve zmazovatěném stavu se podílí na vláčnosti těsta i konečného výrobku (Edwards 2007).

Na přípravu těsta se využívají dva způsoby – přímé a nepřímé vedení těsta. Přímé vedení těsta tzv. „na záraz“ spočívá v tom, že se všechny suroviny nadávkují do mísícího stroje a k nakypření se použije pekařské droždí. Jde tedy o výrobu těsta bez kvasných předstupňů. Zrání těsta a jeho doba závisí na způsobu hnětení a zlepšujících přídavcích. Při nepřímém vedení se nejprve připraví kvasný předstupeň a až poté vmíchá do konečného těsta. V minulosti se jako tradiční kvasný předstupeň používal omládek, který byl vyroben z mouky, vody, droždí a ječného sladu. Vzniklá řídká směs se nechala jednu hodinu zrát. Nyní je omládek využíván jen zřídka a spíše v menších pekárnách (Kučerová 2016).

Dělení a tvarování těsta

Po vyzrání je těsto použitím děličky rozděleno na tzv. klonky. V průmyslových pekárnách mají kontinuální dělicí a tužící stroje, dopravní zařízení pro nepřetržitý odsun klonů, zatímco v malých provozech využívají periodické automaty. Po dělení nastává tvarování těsta, u běžného pečiva se používají rohlíkové nebo razící stroje. Rohlíkový stroj těsto rozválí na

tenké pláty a poté ho sroluje do tvaru rohlíku, či vecky. Razicí stroj vyrazí do klonku tvar např. housky. Součástí kontinuálních linek bývají také kynárny, z nichž se už vykynuté klonky automaticky sází do pece (Kučerová 2016).

3.1.5 Pečení

Aktivita kvasinek klesá, pokud se těsto zahřeje nad 45 °C a úplně se inaktivují až teplota dosáhne 55 °C (Cauvain 2015). Počáteční pečení (tzv. zapékání) probíhá při teplotě 200–240 °C a po určité době se teplota sníží na úroveň okolo 200 °C – tato konečná fáze se nazývá zapékání. Obvykle se běžné pečivo peče v zapáreném prostoru (Kučerová 2016).

Mazovatění škrobu

Během pečení dochází k mazovatění škrobu, které začíná přibližně při teplotě 60 °C. Zpočátku škrobová zrna absorbují volnou vodu v těstě a bobtnají, tedy zvětšují svůj objem (Cauvain 2015). Od určité teploty dojde vlivem přijaté energie ve formě tepla k zásadním změnám ve struktuře škrobového zrna. Přerušuje se některé stávající vazby, což umožní vodě pronikat do struktury zrna a vytvářet interakce s dalšími vazebnými místy polymeru. Postranní řetězce amylopektinu se od sebe vzdalují a dochází k jejich rozpadu (Institut Galenus 2008–2019). K úplnému zmazovatění však v těstu nikdy nedojde, jelikož neobsahuje dostatečné množství vody (Příhoda et al. 2004).

Maillardova reakce a tvorba akrylamidu

Při teplotě 100 °C se odpařuje vlhkost a začne se vytvářet kůrka. Zabarvení kůrky nastane až při vyšších teplotách, kdy redukující cukry přirozeně se vyskytující v těstě začnou karamelizovat. Toto neenzymatické hnědnutí se nazývá Maillardova reakce, při které reagují redukující cukry (fruktosa, glukosa, sacharóza) s aminokyselinami (asparagin). V průběhu této reakce se vytváří charakteristická chuť, barva a aroma pečiva (Suas 2009).

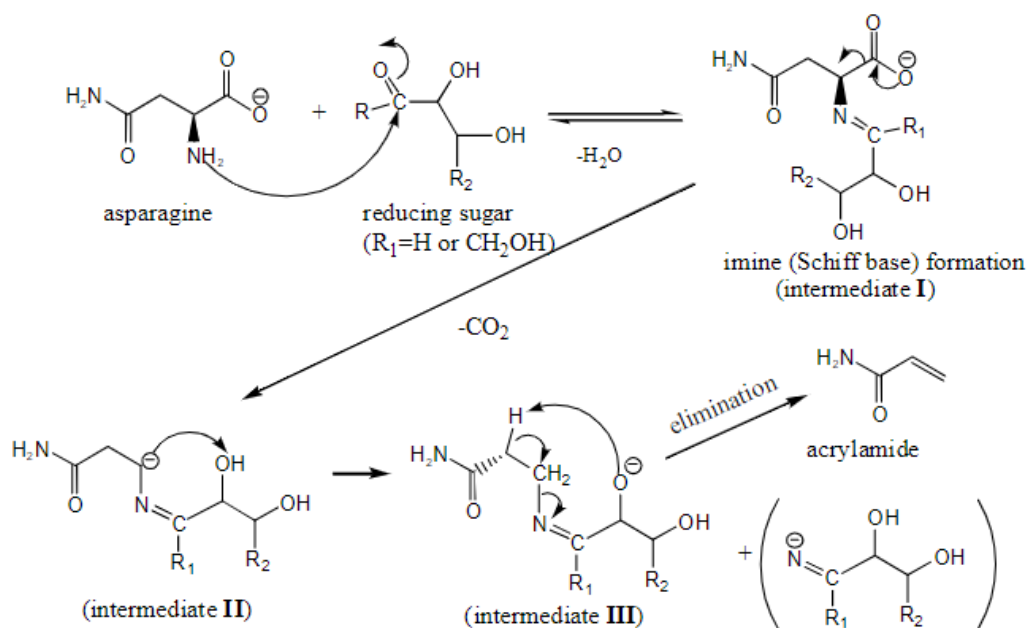
Maillardova reakce se nevztahuje pouze k pečivu, ale také k dalším potravinářským procesům jako je pražení kávy a kakaových bobů nebo grilování masa. Maillardova reakce probíhá ve třech fázích. Počáteční fáze zahrnuje kondenzaci mezi karbonylovou skupinou a volnou aminoskupinou, která uvolňuje dvě molekuly vody a vede k tvorbě N-glykosaminů. Nestabilní N-glykosamin podléhá tzv. Amadoriho přeskupení za vzniku ketosaminů. Ve druhé fázi mohou ketosaminy reagovat třemi způsoby:

- 1) dehydratací dvou molekul vody za vzniku reduktonů (karamel a silný antioxidant);

- 2) hydrolytickým štěpením s krátkým řetězcem, který produkuje diacetyl, aceton a pyruvát a dochází k degradaci aminokyseliny za vzniku aldehydu;
- 3) dehydratací tří molekul vody, které reagují s aminoskupinou. Produkty, které vznikly ve druhé fázi mohou reagovat navzájem s aminoskupinou za vzniku hnědé dusíkaté sloučeniny melanoidinu (Lee et al. 2017).

Melanoidiny jsou heterogenní hnědé pigmenty, které způsobují charakteristicky hnědou barvu potravin, které prošly tepelnou úpravou. Pro potravinářský průmysl jsou obzvláště zajímavé, jelikož barva, kterou tato sloučenina přináší, je pro spotřebitele spojena s kvalitním produktem. Avšak chemická charakterizace a zdravotní účinky melanoidinů jsou stále předměty zkoumání. U některých forem se předpokládá, že mají příznivý vliv na lidské zdraví, jelikož vykazují antioxidační, antimikrobiální a probiotickou aktivitu ve střevě. Melanoidiny v potravinách mohou také sloužit jako konzervanty a chránit tak kvalitu jídla během skladování (Wang et al. 2011).

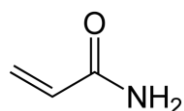
Jako vedlejší produkt Maillardovy reakce vzniká akrylamid, jehož množství v potravine závisí na teplotě, době pečení či receptuře dané potraviny, ve které vzniká (Vím, co jím 2013). Prvním krokem reakce, která následuje po Maillardově reakci je tvorba tzv. Shiffových bází (meziprodukt I). Vzhledem k tomu, že pH ve většině potravin je výrazně nad první disociační konstantou asparaginu, musí být hlavní částí meziproduktu I karboxylátový iont, který zvyšuje dekarboxylaci na meziprodukt II. Dekarboxylační reakce mezi meziprodukty I a II způsobuje, že negativně nabitý uhlík se přenesse za účelem odstranění vodíku na hydroxy skupině. Výsledný hydroxyanion je nyní schopný odstranit kyselý vodík v šestičlenném kruhu (meziprodukt III) a zahájit poslední krok degradace na akrylamid (Eriksson 2005).



Obrázek 1: Mechanismus následující po Maillardově reakci, tvorba akrylamidu z asparaginu a redukujícího cukru (Eriksson 2005)

3.2 Akrylamid

Akrylamid (CH₂=CH-CONH₂) se řadí mezi tzv. procesní potravinové kontaminanty, což znamená, že vznikají v průběhu zpracování potravin a jsou charakteristické tím, že do potravin nejsou záměrně přidávány, kontaminace může nastat na jednom nebo více stupních při technologickém zpracování a jsou zdravotně škodlivá (Cwиковá 2014).

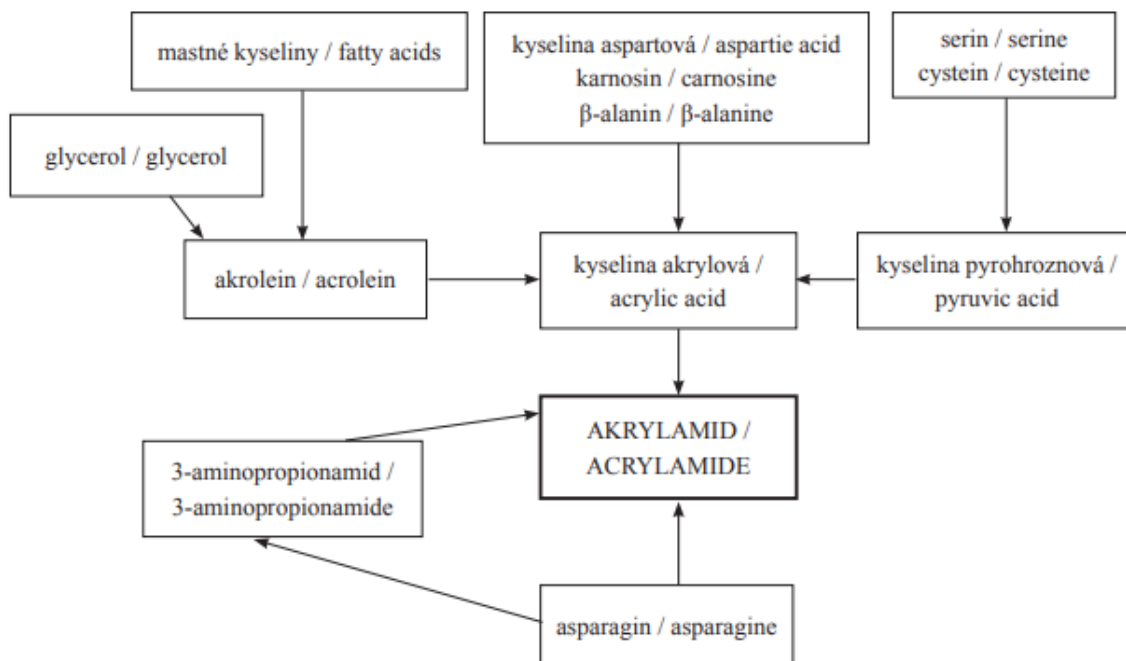


Obrázek 2: Chemický vzorec akrylamidu

3.2.1 Vznik akrylamidu

Akrylamid (dále také „AA“) vzniká při teplotě 120 °C, nízké vlhkosti během pražení, pečení či smažení (EFSA 2017). V potravinách AA do značné míry vzniká reakcí mezi aminoskupinou aminokyseliny asparaginu a karbonylové skupiny redukujících cukrů, mezi které patří např. glukosa. Potraviny bohaté na tyto prekurzory jsou především výrobky z obilovin či brambor (Friedman 2003). Byly prokázány i další faktory ovlivňující tvorbu akrylamidu – především pH, další aminokyseliny kromě asparaginu a některé bílkoviny (Eriksson 2005).

AA může vznikat také hydratací akrylonitrilu. Používá se jako pojídlo cementu, v papírenském, textilním a kosmetickém průmyslu, při kypření půdy a také je složkou tabákového kouře. Z hlediska chemických vlastností se jedná o bílou krystalickou látku bez zápachu, dobře rozpustnou v polárních rozpouštědlech. Je to v podstatě jednoduchá sloučenina složená z uhlíku, vodíku, kyslíku a dusíku. Vyskytuje se ve dvou formách – monomeru (akrylamid) a polymeru (polyakrylamid) (Friedman 2003).



Obrázek 3: Vznik akrylamidu (Eriksson 2005)

3.2.2 Toxické účinky akrylamidu

Akrylamid má hned několik toxických účinků najednou, což zvyšuje jeho celkovou toxicitu. Vykazuje neurotoxicitu, karcinogenitu, mutagenitu, teratogenitu, genotoxicitu i vliv na reprodukci (Cwíková 2014). Po požití je AA absorbován z gastrointestinálního traktu, distribuován do všech orgánů a široce metabolizován. Hlavním metabolitem je glycidamid, který je pravděpodobně příčinou vzniku nádorů u laboratorních zvířat (EFSA 2017).

Hlavní metabolická dráha AA je podobná v lidském těle i v těle pokusných zvířat. Nicméně kvantitativní odlišnosti musí být uváženy z hlediska rizika pro člověka (Taeymans et al. 2004).

Laboratorní zvířata po podání AA perorálně mají zvýšenou pravděpodobnost vývoje genetických mutací a nádorů (u potkanů – mléčné a štítné žlázy, varlat; u myši – mléčné žlázy, plic, vaječníků, kůže a žaludku). Expozice AA může vést k negativním účinkům na nervový systém před i po narození a nepříznivě ovlivňuje plodnost samců. Výsledky lidských studií ohledně vzniku rakoviny po expozici AA poskytují dosti omezené výsledky a je třeba dalšího výzkumu (EFSA 2017).

Zvýšené obavy o expozici AA v potravinách vznikly v roce 2002, kdy organizace FAO a WHO uspořádaly mezinárodní konzultaci s cílem přezkoumat a vyhodnotit nové i stávající údaje a výzkum AA v potravinách. Předpokládalo se, že průměrný příjem AA činil 0,3–0,8 µg na kg tělesné hmotnosti za den. U dětí se předpokládal vyšší příjem, přibližně dvojnásobný až trojnásobný (EFSA 2015).

V červnu roku 2015 vydala EFSA vědecké stanovisko ohledně rizika akrylamidu pro veřejné zdraví v potravinách, které zní takto:

- Akrylamid v potravinách potenciálně zvyšuje rozvoj rakoviny pro spotřebitele ve všech věkových skupinách.
- Vzhledem k tomu, že je akrylamid přítomen v širokém rozsahu potravin, které se konzumují denně, týkají se tyto rizika všech spotřebitelů, ale nejvíce ohroženy jsou děti (kvůli nízké tělesné hmotnosti).
- Možné škodlivé účinky akrylamidu na nervový systém, pre- a postnatální vývoj, plodnost mužů nebyly potvrzeny vzhledem k současné úrovni dietní expozice.
- Nejvíce akrylamidu se tvoří ve smažených bramborových výrobcích, kávě, sušenkách, oplatkách, chlebu a pečivu.
- Ingredience, podmínky skladování a zpracování (především teplota pečení) výrazně ovlivňují množství akrylamidu v potravinách.
- Domácí příprava jídla může mít značný vliv na obsah akrylamidu ve stravě.

3.2.3 Snížení tvorby akrylamidu v potravinách

Nařízení Komise (EU) 2017/2158 ze dne 20. listopadu 2017 (vstup v platnost 11. dubna 2018) stanovilo zmírňující opatření a porovnávací hodnoty pro snížení přítomnosti akrylamidu v těchto potravinách:

- a) hranolky, jiné krájené (fritované) výrobky a plátkované bramborové lupínky z čerstvých brambor;
- b) bramborové lupínky, snacky, krekry a jiné bramborové výrobky z bramborového těsta
- c) chléb;

- d) snídaňové cereálie (kromě obilné kaše);
- e) jemné pečivo: keksy, sušenky, suchary, cereální tyčinky, scones, kornouty, oplatky, lívance a perník, jakož i krekrý, křupavé chleby a náhražky chleba. V této kategorii je krekr trvanlivá sušenka (pečený výrobek se základem z obilné mouky);
- f) káva:
 - i. pražená káva;
 - ii. instantní (rozpustná) káva;
- g) náhražky kávy;
- h) potraviny pro malé děti a obilné příkrmy určené pro kojence a malé děti podle definice v nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 609/2013.

Provozovatelé potravinářských podniků, kteří vyrábějí a uvádějí na trh potraviny uvedené (viz výše), uplatní následující zmírňující opatření:

Chléb – Návrh, zpracování a ohřívání výrobků

1. Provozovatelé potravinářských podniků zajistí, aby byl chléb pečený do světlejší výsledné barvy tak, aby se snížila tvorba akrylamidu, s přihlédnutím k individuálnímu návrhu výrobků a technickým možnostem.
2. Provozovatelé potravinářských podniků prodlouží dobu fermentace kvasu/droždí, s přihlédnutím k návrhu výrobku a technickým možnostem.
3. Provozovatelé potravinářských podniků sníží tepelný příkon optimalizací teploty a doby pečení, co nejvíce je to možné.
4. Provozovatelé potravinářských podniků poskytnou pokyny k pečení pro chléb, který má být dopečen doma, v rozpékacích zařízeních, maloobchodních prodejnách nebo ve stravovacích zařízeních.
5. Provozovatelé potravinářských podniků nahradí složky, které mohou potenciálně zvýšit množství akrylamidu v konečném výrobku, pokud je to kompatibilní s návrhem výrobku a technickými možnostmi, což zahrnuje například použití ořechů a semen pražených spíše při nižších než při vyšších teplotách.
6. Provozovatelé potravinářských podniků nahradí fruktosu glukosou, zejména v recepturách obsahujících hydrogenuhličitan amonný (E503), pokud to návrh výrobku umožňuje a nakolik je to možné. To zahrnuje například nahrazení sirupu z invertního cukru a medu, které obsahují vyšší množství fruktosy, glukosovým sirupem.

7. Ke snížení množství asparaginu u výrobků s nízkým obsahem vlhkosti použijí provozovatelé potravinářských podniků asparaginasu, pokud je to možné, a s přihlédnutím k receptuře výrobku a jeho složkám, obsahu vlhkosti a procesu.

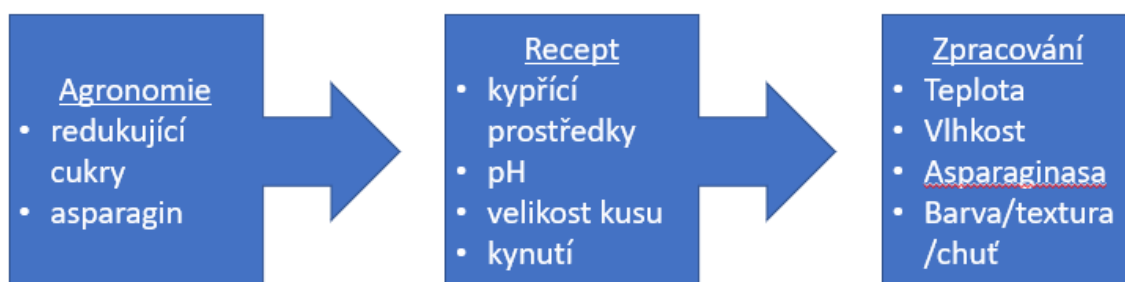
Tabulka 5: Porovnávací hodnoty pro přítomnost akrylamidu v potravinách dle nařízení komise (EU) 2017/2158

Potravina	Porovnávací hodnota (µg/kg)
Hranolky (k přímé spotřebě)	500
Bramborové lupínky z čerstvých brambor a z bramborového těsta	750
Bramborové kreky	
Jiné bramborové výrobky z bramborového těsta	
Měkký chléb	
a) Pšeničný chléb	50
b) Měkký chléb, jiný než pšeničný chléb	100
Snídaňové cereálie (kromě obilné kaše)	
— výrobky z otrub a celozrnné cereálie, zrna pufovaná v pufovacím dělu	300
— pšeničné a žitné výrobky ⁽¹⁾	300
— výrobky z kukuřice, ovsa, pšenice špaldy, ječmene a rýže ⁽¹⁾	150
Sušenky a oplatky	350
Krekry s výjimkou bramborových kreků	400
Křupavý chléb	350
Perník	800
Výrobky podobné ostatním výrobkům této kategorie	300
Pražená káva	400
Instantní (rozpustná) káva	850
Náhražky kávy	
a) náhražky kávy výhradně z obilovin	500
b) náhražky kávy ze směsi obilovin a čekanky	⁽²⁾
c) náhražky kávy výhradně z čekanky	4 000
Potraviny pro malé děti, obilné příkrmy pro kojence a malé děti, kromě sušenek a sucharů ⁽³⁾	40
Sušenky a suchary pro kojence a malé děti ⁽³⁾	150

(1) Jiné než celozrnné cereálie a/nebo jiné než otrubové cereálie. Obilovina přítomná v největším množství určuje kategorii.

(2) Porovnávací hodnota, která se použije na náhražky kávy ze směsi obilovin a čekanky, zohledňuje relativní podíl těchto složek v konečném výrobku.

(3) Podle definice v nařízení (EU) č. 609/2013.



Obrázek 4: Faktory závislé na množství AA v pečivu (FoodDrink Europe 2013)

FoodDrinkEurope shromáždil výsledky a vytvořil soubor nástrojů Acrylamide Toolbox. Tento soubor obsahuje podrobnosti o stávajících metodách, které vedou ke snížení obsahu AA v potravinách. Také umožňuje uživatelům zhodnotit a určit, jaká opatření ke snížení zvolit. Může být užitečný v sektorech jako jsou catering, maloobchod, restaurace či domácí vaření. Pracuje na principu ALARA což je zkratka slov „as low as reasonably achievable“ a znamená „tak nízké, jak je rozumně dosažitelné“. Znamená to, že provozovatel potravinářského podniku (dále jen „PPP“) by měl přijmout vhodná opatření ke snížení přítomnosti dané kontaminující látky v konečném produktu na minimum. PPP by měli sledovat účinnost prováděných opatření a měly je podle potřeby přezkoumat. ALARA aplikovaná přímo na AA určuje opatření k omezení AA ve finálním produktu prostřednictvím intervence v různých fázích výroby (agronomie, recept, zpracování a konečná úprava). Jsou založeny na vědeckých poznatcích a praktické aplikaci. Technologie se neustále vyvíjí a PPP by měli pravidelně aktualizovat jaké nástroje mohou implementovat do své výroby (FoodDrink Europe 2013)

3.3 Princip a využití spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR)

NMR spektroskopie je analytická metoda, která se používá ke stanovení struktury sloučenin. V organických sloučeninách je tato nedestruktivní metoda schopná odhalit počet atomů uhlíku a protonů, jejich konektivitu a konformaci molekul (McClure 2017). NMR spektrometr se zjednodušeně skládá ze tří hlavních částí – magnetu, konzole a počítače (Teng 2013). Stejně jako u ostatních spektroskopických metod založených na absorpci záření, NMR zkoumá, jak vzorek absorbuje záření o různých hodnotách energie. Nutnou podmínkou je, aby byl vzorek umístěn v silném magnetickém poli a obsahoval magneticky aktivní jádra, což

znamená izotopy s nenulovým spinovým kvantovým číslem (spin $I = 1/2$) a také s lichým počtem protonů a neutronů. Příkladem je nejpoužívanější vodík, který má měřitelné všechny tři izotopy (^1H , ^2H deuterium a ^3H tritium) (Tkadlecová 2004).

Jádra s $I = 1/2$ mohou nabývat dvou spinových stavů (hladin) pokud na ně působí magnetické pole. Rozdělí se do hladiny s nižší a vyšší energií oproti základnímu stavu, kdy jsou spiny uspořádány náhodně a mají stejnou energii. Přechody z nižší energetické úrovně na vyšší úroveň energie mohou nastat absorpcí radiofrekvenčního záření správné frekvence. Magnetické pole způsobuje, že spiny vykonávají charakteristický krouživý pohyb kolem osy směru magnetické indukce tzv. Larmorovu precesi. Po ukončení aplikace radiofrekvenčního záření dochází k deexcitaci, která je měřena detektorem jako signál „free induction decay“ (FID) a Fourierovou transformací je tento signál převeden na NMR spektrum (Rahman et al. 2016).

NMR spektrum po transformaci z časové do frekvenční domény obsahuje peaky, které jsou charakterizovány chemickým posunem (na ose x) a intenzitou (osa y). Chemický posun se udává v hodnotách ppm (10^{-6}) a podle této hodnoty jsou vodíky rozlišené na vodíky alifatické (1–4 ppm) a aromatické (6–9 ppm), hodnoty chemického posunu jdou sestupně. S intenzitou souvisí tzv. multiplicita signálů, tedy počet linií, ze kterých je signál složen. Například signál tvořený jednou linií se nazývá singlet, dvěma doublet, třemi triplet a čtyřmi kvartet (Tkadlecová 2004).

NMR spektroskopie je obzvláště informačně bohatá metoda, která nabízí možnosti strukturní a funkční charakterizace metabolomů. Tradiční NMR spektroskopie je určena pro charakterizaci čistých sloučenin, v dnešní době je hojně využívána pro charakterizaci komplexních metabolitových směsí. Vývojem nových metod bylo zjištěno, že NMR směsí může pomoci identifikovat jinak nepřístupné malé molekuly, například sloučeniny náchylné k chemickému rozkladu. Navíc se ukázalo, že srovnávací metabolomika a statistické analýzy NMR spekter jsou vysoce účinné při identifikaci nových i známých metabolitů, které korelují se změnami genotypu i fenotypu (Forseth & Schroeder 2010).

Metoda NMR se využívá pro profilování vína, medu nebo ovocných šťáv, pomáhá ověřit pravost produktů a porovnat kvalitu se spektry v databázi (Bruker 2019).

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

Pšeničná mouka

Bylo hodnoceno 27 vzorků pšenice ozimé ze stanic Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ) Vysoká u Příbramě, Čáslav a Lednice na Moravě, sklizených v roce 2017. Vzorky byly rozděleny dle kategorií pekařské jakosti (E, A, B, C). K hodnocení byly vybrány odrůdy Annie, Bernstein, Dagmar, Fakir, Pankratz, Gordian, Hyfi, Bonanza a Frisky. Odrůdové vzorky zrna pšenice byly standardním způsobem zpracovány na mouku v mlýnu YM-10.

Tabulka 6: Charakteristika vzorků pšenice ozimé

	Vysoká u Příbramě	Čáslav	Lednice na Moravě
E	Annie	Annie	Annie
E	Bernstein	Bernstein	Bernstein
A	Dagmar	Dagmar	Dagmar
A	Fakir	Fakir	Fakir
A	Pankratz	Pankratz	Pankratz
B	Gordian	Gordian	Gordian
B	Hyfi	Hyfi	Hyfi
C	Bonanza	Bonanza	Bonanza
C	Frisky	Frisky	Frisky

ANNIE – má nadstandardně vysokou pekařskou jakost neboli elitní. V ČR je registrovaná od roku 2014, prokázala se vysokou stabilitou výnosu a vynikající adaptační schopností. Hlavní předností této odrůdy je vysoký obsah dusíkatých látek (14,8 %), vysoká objemová hmotnost (814 g/l) a stabilní číslo poklesu (365 s) (Chrpová et al. 2015).

BERNSTEIN – polopozdní až pozdní odrůda elitní pekařské jakosti, registrovaná v roce 2015. Předností odrůdy Bernstein je vysoký obsah dusíkatých látek (14,3 %), vysoká objemová hmotnost (826 g/l) a vysoké i stabilní číslo poklesu (386 s). Nevýhodou může být malá odolnost proti vymrzání.

DAGMAR – poloraná odrůda kvalitní pekařské A jakosti. Mezi její přednosti patří především odolnost proti poléhání, vysoké a stabilní číslo poklesu (361 s), vysoká objemová hmotnost (819 g/l) a menší náchylnost k napadení furiózami klasů. Obsah dusíkatých látek činí 12,9 %.

FAKIR – polopozdní odrůda, která se řadí do kvalitní pekařské A jakosti. Výhodou této odrůdy je vysoká odolnost proti vymrzání a vysoká objemová hmotnost (806 g/l). Pěstitelským

rizikem je nízká stabilita čísla poklesu (395 s). Obsah dusíkatých látek činí 13,7 %. Registrace proběhla v roce 2013.

PANKRATZ – polopozdní odrůda řazená do kvalitní (A) jakosti. Vyniká vysokou objemovou hmotností (810 g/l). Má střední stabilitu čísla poklesu (810 g/l) a 12,8 % dusíkatých látek.

GORDIAN – polopozdní odrůda chlebové jakosti (B). Obsahuje 12,6 % dusíkatých látek, má střední stabilitu čísla poklesu (379 s) a objemová hmotnost činí 795 g/l. Tato odrůda nevykazuje žádná výrazná pěstitelská rizika.

HYFI – středně raná hybridní odrůda chlebové jakosti (B). Pěstitelské riziko představuje malá stabilita i nízké číslo poklesu (294 s) a malá objemová hmotnost (789 g/l). Obsah dusíku činí 12,8 %.

BONANZA – pozdní odrůda, která není vhodná pro pekařské použití (C). Vykazuje nízkou stabilitu i číslo poklesu (336 s) a malou objemovou hmotnost (777 g/l). Tato odrůda obsahuje 12,4 % dusíkatých látek.

FRISKY – polopozdní odrůda nevhodná pro pekařské použití (C). Vyniká velkou stabilitou i vysokým číslem poklesu (346 s). Objemová hmotnost činí 806 g/l a obsah dusíkatých 12,1 % (Horáková & Dvořáčková 2017).

Tabulka 7: Vybrané parametry kvality jednotlivých odrůd (Chrpová et al. 2015; Horáková & Dvořáčková 2017)

Odrůda	Jakost	Obsah dusíkatých látek (%)	Číslo poklesu a stabilita (s)	Objemová hmotnost (g/l)
Annie	E	14,8	365 (+)	814
Bernstein	E	14,3	386 (+)	826
Dagmar	A	12,9	361 (+)	819
Fakir	A	13,7	395 (-)	806
Pankratz	A	12,8	390 (0)	810
Gordian	B	12,6	379 (0)	795
Hyfi	B	12,8	294 (-)	789
Bonanza	C	12,4	336 (-)	777
Frisky	C	12,1	346 (+)	806

+ vysoká stabilita, 0 střední, - nízká

Pro měření byla vybrána rozdílná stanoviště, která se liší v nadmořské výšce, v průměrné teplotě i průměrném úhrnu srážek a v půdním typu i druhu. Zkušební stanoviště také byla rozdílná v následujících zkušebních oblastech (Horáková & Dvořáčková 2018):

- Kukuřičná – Lednice
- Řepařská – Čáslav
- Bramborářská – Vysoká

Tabulka 8: Charakteristiky zkušebních stanic (Horáková & Dvořáčková 2018)

Zkušební stanice	Nadmořská výška (m)	Dlouhodobá průměrná teplota (°C)	Dlouhodobý průměrný úhrn srážek (mm)	Půdní typ a druh
Čáslav	260	8,9	555	Černozem hnědozemní-hlinitá půda
Lednice na Moravě	171	9,6	461	Černozem typická-hlinitá půda
Vysoká	585	7,1	611	Luvizem pseudoglejová-hlinitá půda

Pěstitelské pokusy pšenice ozimé byly založeny v ošetřené variantě. Bylo použito mořidlo (účinné proti sněti), základní dávka dusíku zvýšená o 40 kg/ha, síra (15–25 kg/ha), morforegulátor dle potřeby a povinné ošetření dvěma fungicidy.

Spotřební materiál

- Eppendorf pipetovací špičky (CZ)
- NMR kyvety Norell 5 mm, High-Throughput 7“ Standard series (USA)
- Centrifugační zkumavky VWR 15 ml (USA)
- Eppendorf zkumavky s víčkem 2 ml (CZ)

Chemikálie

- HCl kyselina chlorovodíková 35%, p.a., Lach-Ner (CZ)
- D₂O deuterium oxid (čistota 99,96 %) VWR (CZ)
- NMR pufr – D₂O (čistota 99,9 %), 0,2 % NaN₃, 5 mM TSP (čistota 98 %), 1.5 M K₂HPO₄ (čistota 99 %), 1.5 M NaH₂PO₄ (čistota 99 %), pH 7,4, Sigma Aldrich (CZ)

Laboratorní vybavení, přístroje

- Analytické váhy ExplorerPro Ohaus (USA)
- Digestoř Merci (CZ)
- Pipety VWR 20–200 µl, 1–5 ml a Eppendorf 500–5000 µl (CZ)
- Vortex IKA MS 3 Basic (DE)
- Třepačka GFL 3006 (DE)
- Lyofilizátor L10-55 Gregor Instruments (CZ)

- Centrifuga Rotanta 460R Hettich Zentrifugen (DE)
- Ultrazvuková lázeň CS Witeg (DE)
- NMR spektrometr Avance III Bruker s ^1H frekvencí 500,23 MHz (DE)

Software

- Topspin 3.5 pl7, Bruker (DE)
- Chenomx NMR suite 8.4, Chenomx Inc. (CA)
- MNOVA 12, Mestrelab Research (ESP)
- MetaboAnalyst 4.0 (CA)
- International Business Machines SPSS Statistics 24.0 (USA)

4.2 Metody

Příprava vzorků

Do 15ml centrifugačních zkumavek bylo naváženo 200 mg mouky. K mouce bylo přidáno 5 ml 0,1M HCl a obsah zkumavky byl rychle protřepán na vortex, aby nedošlo k vytvoření hrudek na dně zkumavky. Vzorky byly nejdříve vloženy do třepačky (10 min) a následně do centrifugy (9 000 rpm, 21 °C, 10 min). Ze vzorku byly odebrány 4 ml supernatanu do prázdné 15ml centrifugační zkumavky. Poté byly vzorky zmrazeny (1 hod, -80 °C) a vloženy do lyofilizátoru (2–3 dny, -55 °C). Po úplném vysušení bylo ke vzorkům přidáno 580 μl D₂O a 64,44 μl NMR pufru. Obsah zkumavky byl důkladně rozpuštěn v pufru pomocí vortexu a ultrazvuku (10 min). Následně byl obsah přenesen do 2ml Eppendorf zkumavky a centrifugován (15 000 rpm, 20 °C, 15 min). Následně bylo odebráno 600 μl supernatanu do NMR zkumavek.

Měření vzorků

Bylo naměřeno 128 skenu 1D noesy spektrum na Bruker Avance III s frekvencí 500,23 MHz při teplotě 298 K. Acquisition time byl 4 s, presarution time 1 s a mixing time 100 ms. Data byla manuálně zpracována v softwaru Topspin, ve kterém byla provedena Fourierova transformace, korekce fáze a baseline, úprava reference na signál TSP (0,000 ppm). V programu Chenomx Processor byla provedena korekce shimmu a kalibrace CSI. V Chenomx Profiler bylo kvantifikováno 39 sloučenin. Binning byl zpracován v softwaru Mnova od -0,15 do 10 ppm se šířkou jednoho binu 0,01 ppm po vyříznutí úseku suprese vody.

Statistické zpracování

Data byla zpracována v programu MetaboAnalyst 4.0 a International Business Machines SPSS Statistics 24.0. Pro vyhodnocení dat v MetaboAnalyst 4.0 byly použity binny se šířkou 0,01 ppm a koncentrace v mg/g. Data byla rozdělena dle tří faktorů na odrůdy (n=9, Annie, Bernstein, Dagmar, Fakir, Pankratz, Gordian, Hyfi, Bonanza, Frisky), kvalitu (n=4, E, A, B, C) a lokalitu (n=3, Lednice, Čáslav, Vysoká). Před samotným statistickým vyhodnocením bylo třeba data v MetaboAnalyst normalizovat (normalization by sum), transformovat (log transformation) a škálovat (auto scaling). Byla použita analýza hlavních komponent (PCA) a diskriminační analýza částečných nejmenších čtverců (PLS-DA) pro cílovou i necílovou analýzu. Z důvodu vyšší přehlednosti byly odebrány odlehlé hodnoty (outliery), přesně vzorky odrůdy Fakir, Hyfi, Bonanza, Frisky z oblasti Lednice na Moravě.

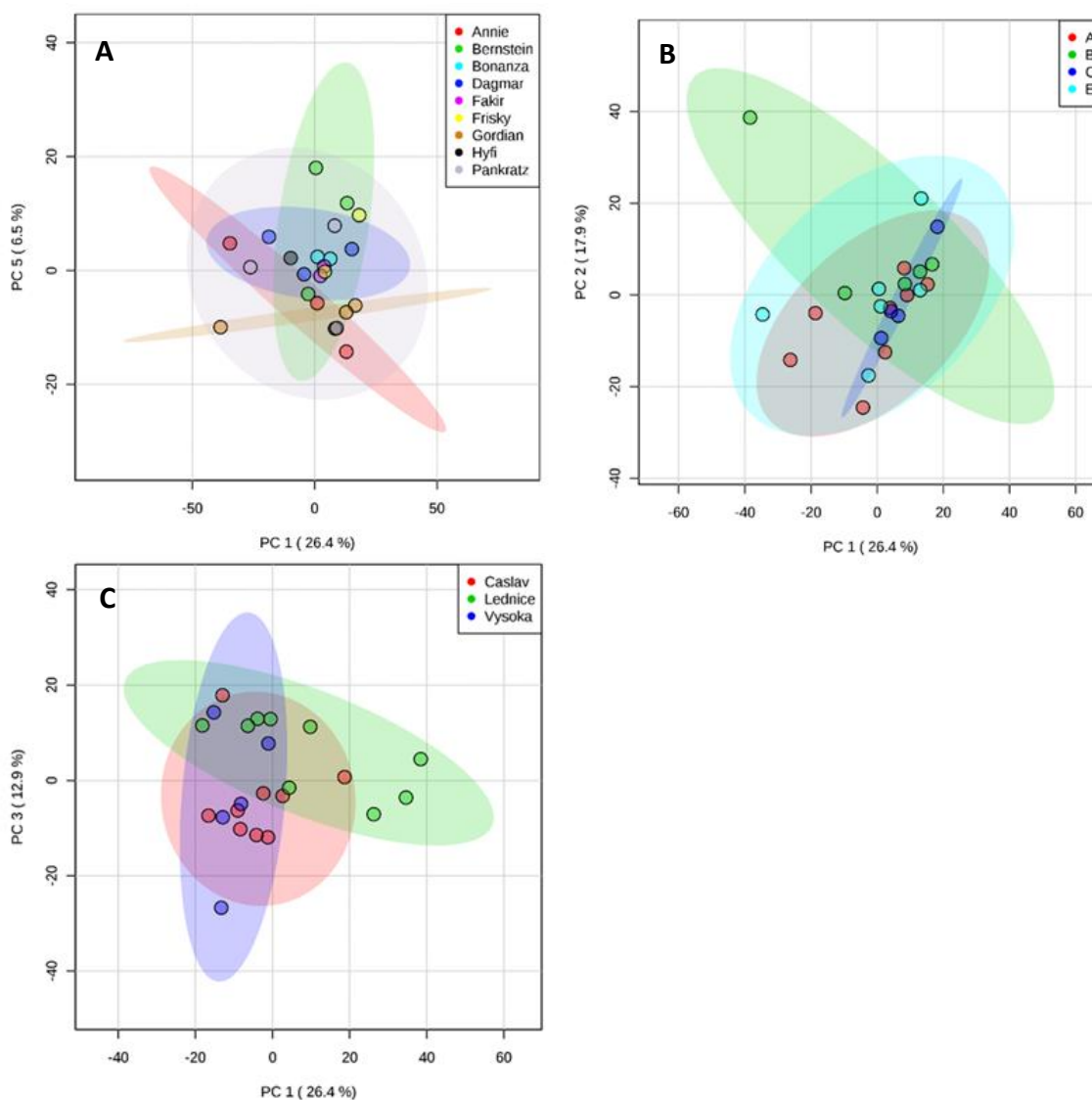
V International Business Machines SPSS Statistics 24.0 byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test.

5 Výsledky

5.1 Necílová analýza NMR spekter (binning)

5.1.1 Analýza hlavních komponent (PCA)

Na základě analýzy hlavních komponent vytvořené z binnů vyplývá rozdíl mezi Gordian a Dagmar, Gordian se dále liší od Frisky, Fakiru a Bonanzi. Annie se liší od Frisky a Fakiru. Kategorie B se rozdělila od ostatních kategorií A, C a E. Oblast Lednice na Moravě se liší od oblasti Čáslav a Vysoké u Příbramě.



Obrázek 5: PCA rozptylové diagramy komponentních skóre (score plot) rozděleny dle sledovaných faktorů: A) odrůdy pšenice, B) kategorie pekařské kvality, C) lokality

5.1.2 Diskriminační analýza částečných nejmenších čtverců (PLS-DA)

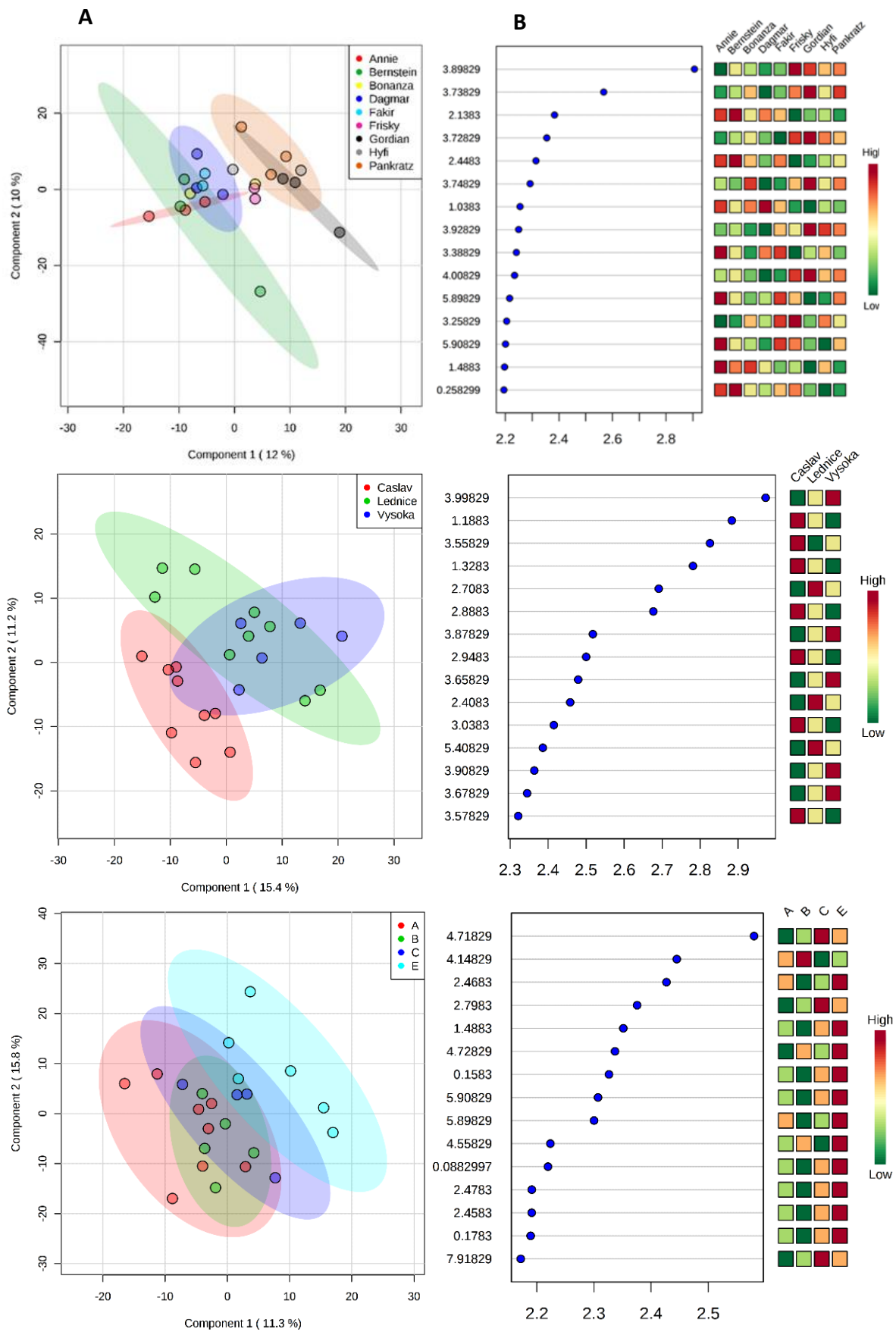
Modely PLS-DA vyžadují validaci, vzhledem k tomu, že data jsou často přefitovaná „over-fitted“, což znamená, že algoritmus je vždy schopný najít nějakou vazbu mezi vzorky neohledně na to, zda reálně opravdu existuje. Byla použita křížová validace „cross-validation“ s využitím „leave-one-out“ (LOO), ze které vyplývá, že žádný z modelů PLS-DA není validní.

Tabulka 9: Hodnoty Q^2

	Odrůdy	Jakost	Lokalita
1comps	-0,49134	-0,66003	0,18956
2comps	-0,25678	-0,40954	0,13134

Podle obrázku 6 jsou odrůdy Gordian a Pankratz podobné a liší se od odrůdy Annie, Dagmar, Bernstein a Fakir. Kategorie kvalitní (A) a chlebová (B) jsou podobné, liší se kategorie pro nepekařské účely (C) a elitní (E). PLS-DA model lokalit poukazuje na podobnost Lednice a Vysoké, Čáslav se liší.

VIP skóre (B) zobrazuje 15 nejdůležitějších binnů PLS-DA. Barevné rámečky vpravo ukazují relativní koncentraci odpovídajícího binnu pro odrůdy, kvalitu a lokality.

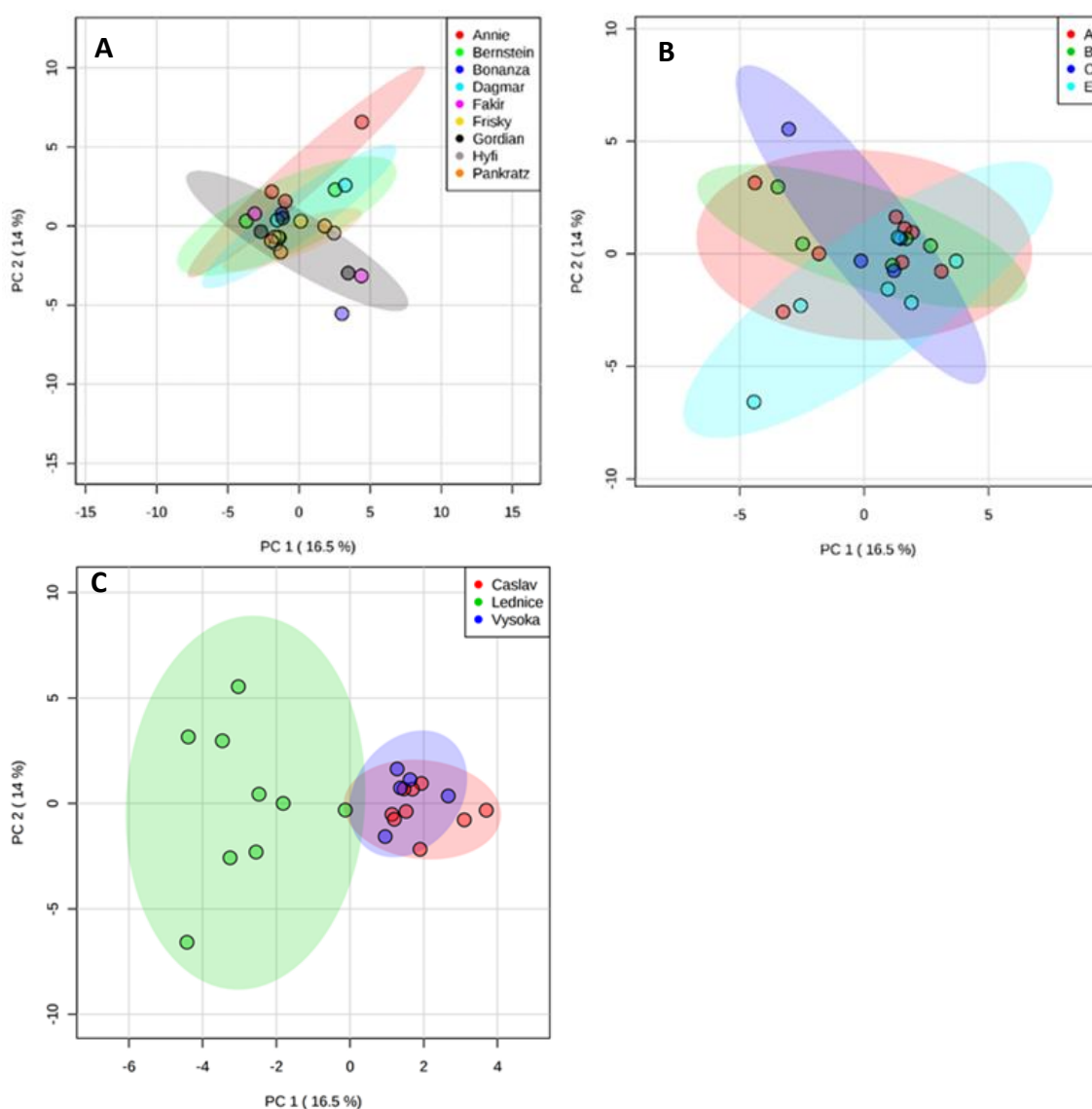


Obrázek 6: Dva různé způsoby vizualizace PLS-DA: A) score plot, B) variable importance (VIP) score – data rozdělena dle faktorů (odrůdy, kvalita, lokalita)

5.2 Cílová analýza NMR spekter (koncentrace)

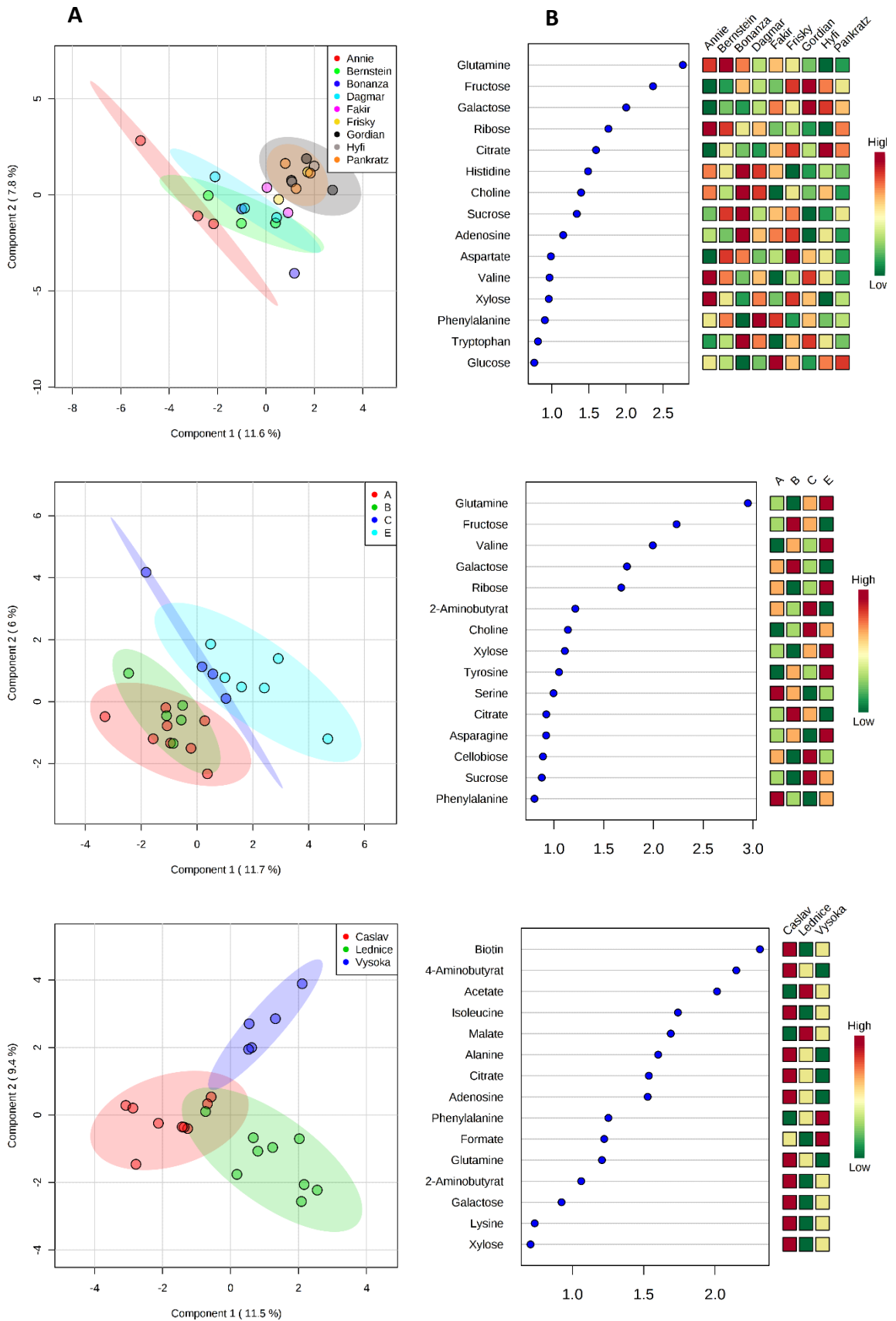
5.2.1 Analýza hlavních komponent (PCA)

Z obrázku 7 je patrné, že se rozdělily odrůdy Annie a Pankratz, Annie a Frisky. Liší se kategorií pekařské jakosti, Annie je odrůda elitní jakosti, zatímco Frisky je odrůda nevhodná pro pekařské účely a Pankratz je odrůdou kvalitní. Pekařské kategorie A a B jsou si podobné, C a E se liší. Z pohledu lokalit se výrazně liší vzorky pocházející z Lednice od vzorků pocházejících z Čáslavi a Vysoké.



Obrázek 7: PCA rozptylové diagramy komponentních skóre (score plot) rozděleny dle sledovaných faktorů A) odrůdy B) kategorie pekařské jakosti C) lokality

5.2.2 Diskriminační analýza částečných nejmenších čtverců (PLS-DA)



Obrázek 8: Dva způsoby vizualizace PLS-DA A) score plot B) VIP score, data rozdělena dle faktorů (odrůdy, kvalita, lokalita)

Pro metodu PLS-DA byla opět použita křížová validace „cross-validation“ s využitím „leave-one-out“ (LOO). Žádný z modelů PLS-DA není validní. Jelikož je počet vzorků malý, je vhodnější dále použít robustnější testy jako je Kruskal-Wallisův test.

Tabulka 10: Hodnoty Q^2

	Odrůdy	Jakost	Lokalita
1comps	0,036304	-0,40607	-0,17285
2comps	0,0057878	-0,67415	-0,33082

Z modelů PLS-DA (obrázek 8) je patrné, že odrůdy Gordian a Pankratz jsou si podobné a liší se od odrůdy Annie. Dále jsou si podobné odrůdy Bernstein a Dagmar a liší se od odrůd Gordian a Pankratz. Podobné jsou si také odrůdy Frisky, Fakir a Gordian s Pankratzem. Kategorie A a B jsou rozdílné od kategorií C a E. Oblasti Lednice, Vysoká a Čáslav nejsou podobné.

VIP skóre zobrazuje 15 nejdůležitějších metabolitů identifikovaných PLS-DA. Barevné rámečky vpravo ukazují relativní koncentraci odpovídajícího metabolitu pro odrůdy, kvalitu a lokality. Nejdůležitější metabolity odpovídající za rozdělení pro faktor odrůdy jsou následující: glutamin, fruktosa, galaktosa, ribosa, citrát, histidin, cholin, sacharosa, adenosin, aspartát, valin, xylóza, fenylalanin, tryptofan a glukosa. Nejvýznamnějšími metabolity odpovídající za separaci pro faktor kvality jsou následující: glutamin, fruktosa, valin, galaktosa, ribosa, 2-aminobutyryát, cholin, xylosa, tyrosin, serin, citrát, asparagin, celobiosa, sacharosa a fenylalanin. Za rozdělení faktoru lokality jsou odpovědné tyto metabolity: biotin, 4-aminobutyryát, acetát, izoleucin, malát, alanin, citrát, adenosin, fenylalanin, formát, glutamin, 2-aminobutyryát, galaktosa, lysin, a xylosa.

5.2.3 Kruskal-Wallisův test

Tabulka 11: Průměrné koncentrace kvantifikovaných metabolitů (mg/g) v pekařských kategoriích pšeničné mouky

	A	B	C	E
Fructose	2,31	3,00	2,93	2,43
Glucose	1,94	1,74	2,00	1,33
Sucrose	1,30 _{a,b}	0,79 _a	1,64 _{a,b}	1,60 _b
Asparagine	0,17	0,19	0,22	0,26
Malate	1,42	1,38	1,31	1,24
Maltose	1,05	1,35	0,57	1,54
Cellobiose	1,14	0,98	1,21	1,05
Serine	0,59	0,61	0,58	0,64
Ribose	0,44	0,32	0,29	0,91
Glucuronate	0,29	0,39	0,24	0,42
Galactose	0,31	0,34	0,25	0,37
Aspartate	0,27	0,29	0,34	0,31
Glutamate	0,23	0,23	0,26	0,34
Xylose	0,18	0,23	0,12	0,34
Glycine	0,23	0,24	0,19	0,21
Proline	0,18	0,20	0,16	0,19
Mannose	0,13	0,16	0,09	0,20
Choline	0,11	0,11	0,13	0,12
Glutamine	0,08 _a	0,07 _a	0,09 _{a,b}	0,15 _b
Fumarate	0,09	0,07	0,07	0,08
Biotin	0,09	0,05	0,08	0,07
Alanine	0,06	0,06	0,07	0,08
Tryptophan	0,06	0,08	0,09	0,04
Leucine	0,05	0,05	0,05	0,06
Citrate	0,05	0,04	0,05	0,04
Formate	0,04	0,05	0,05	0,04
4-Aminobutyrate	0,05	0,03	0,05	0,05
Lysine	0,04	0,05	0,05	0,02
Threonine	0,03	0,03	0,04	0,04
Isoleucine	0,03	0,03	0,03	0,03
Valine	0,02 _a	0,03 _{a,b}	0,02 _{a,b}	0,04 _b
2-Aminobutyrate	0,03	0,02	0,03	0,02
Acetate	0,02	0,02	0,02	0,02
Histidine	0,02	0,01	0,04	0,01
Riboflavin	0,02	0,02	0,02	0,02
Tyrosine	0,02	0,02	0,02	0,02
Methionine	0,02	0,01	0,02	0,02
Phenylalanine	0,02	0,02	0,01	0,02
Adenosine	0,01	0,01	0,02	0,02

hodnoty ve stejném řádku, které nesdílejí stejný index, se významně liší ($p < 0,05$)

Ve vzorcích pšeničné mouky bylo kvantifikováno celkem 39 metabolitů, z toho 20 aminokyselin, 9 sacharidů, 7 kyselin, 2 vitaminy a sůl kyseliny octové. Z hlediska prekurzorů pro vznik AA (asparagin, fruktosa, glukosa a sacharosa) se nejvíce asparaginu nachází v kategorii E (0,26 mg/g) a nejméně v A (0,17 mg/g). Fruktosu v nejvyšším množství obsahuje kategorie B (3 mg/g) a v nejnižším množství kategorie A (2,31 mg/g). Glukosu bylo nejvíce zjištěno v kategorii C (2 mg/g) a nejméně v E (1,33 mg/g). Sacharosu obsahuje v nejvyšší koncentraci kategorie C (1,64 mg/g) a v nejnižší B (0,79 mg/g).

Statisticky významný rozdíl dle Kruskal-Wallisova testu se nachází u glutaminu, sacharosy a valinu. U glutaminu jsou rozdílné kategorie pekařské kvality B-E a A-E. Další průkaznou látkou je sacharosa, u které se liší kategorie B od E. U valinu se liší skupina A od skupiny E.

Tabulka 12: Průměrné koncentrace statisticky významných metabolitů v lokalitách (mg/g)

	Čáslav	Lednice	Vysoká
2-Aminobutyrate	0,03 _a	0,02 _b	0,03 _{a,b}
Aspartate	0,30 _{a,b}	0,24 _a	0,38 _b
Choline	0,10 _a	0,13 _b	0,12 _{a,b}
Formate	0,04 _{a,b}	0,03 _a	0,06 _b
Glutamate	0,29 _{a,b}	0,20 _a	0,34 _b
Malate	1,10 _a	1,64 _b	1,24 _{a,b}
Serine	0,66 _{a,b}	0,27 _a	0,98 _b

hodnoty ve stejném řádku a podsystemu, které nesdílejí stejný index, se významně liší v $p < 0,05$ v oboustranném testu rovnosti

Dle Kruskal-Wallisova testu bylo statisticky významných sedm následujících metabolitů: 2-aminobutyrate, aspartate, glutamate, serine, choline, formate, malate, avšak žádný z nich není prekurzor akrylamidu (glukosa, fruktosa, sacharosa, asparagin).

2-aminobutyrate, choline a malate se liší v Čáslavi a Lednici. Aspartate, formate, glutamate a serine jsou významně rozdílné mezi Lednicí a Vysokou.

Tabulka 13: Průměrné koncentrace prekurzorů AA v jednotlivých odrůdách (mg/g)

Variety	Statistics	Asparagine	Fructose	Glucose	Sucrose
Annie	Mean	0,29	2,87	1,47	1,32
	SD	0,05	0,35	0,94	0,91
	Median	0,29	2,91	1,74	1,76
Bernstein	Mean	0,23	2,00	1,20	1,89
	SD	0,05	1,32	0,69	0,36
	Median	0,24	2,33	1,14	1,81
Bonanza	Mean	0,17	2,40	2,10	1,63
	SD	0,05	0,52	0,21	0,20
	Median	0,17	2,40	2,10	1,63
Dagmar	Mean	0,15	1,66	1,52	0,94
	SD	0,05	0,40	0,26	0,40
	Median	0,15	1,60	1,40	1,09
Fakir	Mean	0,20	2,23	2,16	1,46
	SD	0,07	0,98	0,78	0,29
	Median	0,20	2,23	2,16	1,46
Frisky	Mean	0,27	3,46	1,90	1,64
	SD	0,16	1,41	1,34	0,02
	Median	0,27	3,46	1,90	1,64
Gordian	Mean	0,18	3,12	1,68	0,75
	SD	0,07	0,31	0,46	0,41
	Median	0,15	3,26	1,45	0,54
Hyfi	Mean	0,22	2,83	1,82	0,85
	SD	0,00	0,01	0,12	0,25
	Median	0,22	2,83	1,82	0,85
Pankratz	Mean	0,18	3,00	2,21	1,55
	SD	0,02	0,19	0,40	0,26
	Median	0,19	3,10	2,11	1,57
p-value		0,322	0,280	0,565	0,123

Mean – průměr, SD – směrodatná odchylka, p-value – p-hodnota

Dle Kruskal-Wallisova testu (hladina významnosti 0,05) u faktoru odrůdy není žádný z prekurzorů AA statisticky významný. Jediný statisticky významný rozdíl mezi odrůdami se nachází v obsahu threoninu, u kterého je možné odlišit odrůdu Dagmar od odrůd Annie, Bernstein, Frisky a Pankratz.

Největší množství asparaginu se nachází v odrůdě Annie (0,29 mg/g) a nejmenší v Dagmar (0,15 mg/g). Fruktosy je nejvíce v odrůdě Frisky (3,46 mg/g) a naopak nejméně v Dagmar (1,66 mg/g). Pankratz dosahuje nejvyšší koncentrace glukosy (2,21 mg/g) a Annie

(1,47 mg/g) nejnižší koncentrace. Sacharosa je v nejvyšším množství v Bernstein (1,89 mg/g) a v nejnižším v Gordian (0,75 mg/g).

6 Diskuze

Cílem experimentu bylo zavést a validovat vysoce moderní metodu ^1H NMR na kvantifikaci prekurzorů akrylamidu (asparagin, glukosa, fruktosa a sacharosa) ve vzorcích pšeničné mouky. Stanovit vliv vybraných faktorů (odrůdy, pekařské kvality a lokality) na úroveň a vzájemný poměr těchto látek s ohledem na možnou tvorbu akrylamidu v pekařských výrobcích. Bylo měřeno celkem 27 vzorků mouky pšenice ozimé pocházejících ze tří stanic ÚKZÚZ (Lednice, Vysoká, Čáslav) sklizených v roce 2017. Z každé stanice bylo vybráno devět odrůd (Annie, Bernstein, Dagmar, Fakir, Pankratz, Gordian, Hyfi, Bonanza a Frisky) různých kategorií pekařské jakosti (E, A, B, C).

Nejvýznamnějším zjištěním této práce bylo, že metodou ^1H NMR lze kvantifikovat prekurzory akrylamidu ve všech měřených vzorcích pšeničné mouky. Vliv odrůdy a lokality na vzniku prekurzorů akrylamidu, však nebyl při měření prokázán. Vliv pekařské jakosti byl prokázán na vzniku sacharosy, ale u ostatních prekurzorů prokázán nebyl. Sacharosa byla rozdílná u kategorie pekařské jakosti B a E. Bylo měřeno malé množství vzorků a v budoucnu by bylo vhodné se na to zaměřit.

Mezi odrůdami neexistuje statisticky významný rozdíl v koncentraci prekurzorů akrylamidu. Jediný rozdíl se nachází v obsahu threoninu, podle kterého lze odlišit odrůdu Dagmar od Annie, Bernstein, Frisky a Pankratz. Koncentrace asparaginu v odrůdách kolísala od 0,15 do 0,29 mg/g, fruktosy od 1,66 do 3,64 mg/g, glukosy od 1,2 do 2,21 mg/g a sacharosy od 0,75 do 1,89 mg/g. Nejvyšší obsah asparaginu byl zjištěn u Annie (E) a nejméně u Dagmar (A). Carol et al. (2016) uvádí, že koncentrace asparaginu v bílé pšeničné mouce kolísá od 0,12 do 0,73 mg/g. Zkoumané odrůdy pocházely z Francie, Maďarska, Polska a Velké Británie. Lze konstatovat, že odrůdy pocházející z České republiky obsahují nižší koncentrace asparaginu, jenž je hlavním prekurzorem pro tvorbu akrylamidu v pečivu. Curtis et al. (2018) zjišťoval množství asparaginu v různých odrůdách pšenice vypěstovaných ve Velké Británii v letech 2011–2013. Potvrzuje, že odrůdy v testovaném souboru nebyly statisticky rozdílné v koncentraci asparaginu. Pro další měření by bylo zajímavé zjistit vliv odrůdy na vznik prekurzorů akrylamidu nezávisle na lokalitě. Metodou NMR sice nejsme schopni najít vliv odrůdy na vznik prekurzorů akrylamidu, ale má potenciál pro jejich detekci.

Dle Pečivová et al. (2008) threonin působí jako oxidační činidlo a ovlivňuje vlastnosti lepku, zvyšuje pevnost a zároveň snižuje tažnost těsta. Bylo zjištěno, že těsto rychleji měkne, tudíž je čas míchání a kynutí těsta zkrácen.

Překvapujícím zjištěním bylo, že kategorie pekařské jakosti A a E, které jsou nejkvalitnější, byly vyhodnoceny jako rozdílné a elitní E a nepekárenské C byly vyhodnoceny jako podobné. Toto zjištění lze odůvodnit tím, že kategorie, která je k dané odrůdě přiřazena, by mohla být částečně ovlivněna vnějšími podmínkami, např. počasím, lokalitou nebo použitou agrotechnikou. Řazení do pekařských kategorií kvality se hodnotí bodovým systémem podle definovaných ukazatelů, tudíž metoda NMR s nimi nemusí korelovat. Statisticky významný rozdíl byl zjištěn u sacharosy, glutaminu a valinu. Glutamin je indikátorem lepku a v největším množství byl nalezen v elitní kategorii. U glutaminu by nalezen rozdíl mezi skupinami pekařské jakosti B-E a A-E, u sacharosy mezi B-E a u valinu mezi A-E. Metoda NMR však není pro analýzu bílkovin vhodná, jelikož nevystihuje přesné složení aminokyselin. V této práci byla použita slabá hydrolyza, jelikož akrylamid vzniká pouze z volného asparaginu.

Dalším sledovaným faktorem byla lokalita. Ze score plotů analýzy hlavních komponent se lišilo stanoviště Lednice na Moravě od Čáslavi a Vysoké u Příbramě, které byly podobné. Což je v tomto případě spíše trend a nelze to považovat za validní výsledek. Nicméně rozdíl Lednice od ostatních lokalit potvrdil i s Kruskal-Wallisův test. Existuje statisticky významný rozdíl mezi stanovištěm Čáslav a Lednice v metabolitech 2-aminobutyát a malát, nikoliv ale v látkách známých jako prekurzory akrylamidu. Další statisticky významný rozdíl vykazovala Lednice a Vysoká v metabolitech serin, kyselina asparagová, formát a kyselina glutamová.

Carol et al. (2016) uvádí, že lokalita má vliv na koncentraci asparaginu v pšenici, je to způsobeno rozdílným množstvím srážek a teplotou v dané lokalitě během růstu pšenice. Avšak jeho vzorky pocházely z různých států Evropy a v našem měření byly použity vzorky pocházející pouze z území České republiky.

Muttucumaru et al. (2006) publikuje, že pšenice obsahuje více asparaginu, pokud půda, kde byla pšenice vypěstována, byla chudá na síru.

7 Závěr

- Byla potvrzena hypotéza, že sacharidy (glukosa, fruktosa, sacharosa) a aminokyselinu asparagin v pšeničné mouce, jako prekurzory akrylamidu, je možné kvantitativně stanovit metodou ^1H NMR. Koncentrace asparaginu v odrůdách kolísala od 0,15 do 0,29 mg/g, fruktosy od 1,66 do 3,64 mg/g, glukosy od 1,2 do 2,21 mg/g a sacharosy od 0,75 do 1,89 mg/g.
- Ve vzorcích pšeničné mouky bylo nalezeno celkem 39 sloučenin, z toho 20 aminokyselin, 9 sacharidů, 7 kyselin, 2 vitaminy a sůl kyseliny octové.
- Nebyla potvrzena hypotéza, že obsah prekurzorů akrylamidu je ovlivněn vybranými faktory (odrůdy, lokalita). Hypotéza byla potvrzena pouze v případě sacharosy u faktoru pekařské kvality, kde se od sebe lišily kategorie B a E, ostatní prekurzory akrylamidu (glukosa, fruktosa, asparagin) nebyly statisticky průkazné.
- Metodou NMR lze detekovat odrůdy, odrůda Dagmar byla odlišná v obsahu v threoninu od Annie, Bernstein, Frisky a Pankratz.
- Dle Kruskal-Wallisova testu byly vzorky ze stanice Lednice na Moravě rozdílné od Čáslavi v obsahu 2-aminobutyátu, cholinu a malátu. Oblasti Lednice a Vysoká byly rozdílné v obsahu serinu, kyseliny asparagové, formátu a kyseliny glutamové, nikoliv však v obsahu prekurzorů akrylamidu.
- Statisticky rozdílné látky u kategorií pekařské kvality byly sacharosa, glutamin a valin. Obsah sacharosy byl rozdílný mezi skupinami pekařské jakosti B-E, u glutaminu mezi A-E a B-E, koncentrace valinu mezi skupinami A-E.

8 Literatura

1. Bajerová E et al. 2016. Obiloviny v lidské výživě. Potravinářská komora České republiky, Česká technologická platforma pro potraviny, Praha.
2. Blažková L, et al. 2017 Obiloviny v lidské výživě: Shrnutí poznatků o obilovinách se zaměřením na problematiku sacharidů obilovin. Potravinářská komora České republiky, Česká technologická platforma pro potraviny, Praha.
3. Bonomi F, Ferranti P, Mamone G. 2014. Wheat Flour: Chemistry and Biochemistry. Bakery products science and technology. Wiley Blackwell, Hoboken.
4. Bruker. 2019. Massachusetts, USA. Available from <https://www.bruker.com/> (accessed March 2019).
5. Burešová I, Pavlík S. 2005. Kvalita obilovin. Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž s.r.o., Kroměříž.
6. Cauvain S. 2015. Technology of Breadmaking. Springer, Switzerland.
7. Corol DI, Ravel C, Rakszegi M, Charmet G, Bedo Z, Beale MH, Shewry PR, Ward J. 2016.
8. Curtis TY, Powers SJ, Wang R, Halford NG. 2018. Effects of variety, year of cultivation and sulphur supply on the accumulation of free asparagine in the grain of commercial wheat varieties. Food Chemistry. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.06.11.
9. Cwиковá O. 2014. Toxické účinky akrylamidu a jeho výskyt v potravinách. Chemické listy, Brno. Available from http://chemicke-listy.cz/docs/full/2014_03_205-210.pdf (accessed March 2019)
10. Česká technologická platforma pro potraviny. 2015. Sacharidy obilovin-jejich vlastnosti a účinky. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha. Available from <http://www.ctpp.cz/?strana=clanek&id=836> (accessed December 2018).
11. Dostálová R, Horáček J, Skřivan P, Sluková M. 2016. Obiloviny a luštěniny: Jak poznáme kvalitu?. Sdružení českých spotřebitelů, Praha.
12. Edwards WP. 2007. The Science of Bakery Products. RSC Publishing, Cambridge.
13. EFSA (European Food Safety Authority). 2015. Scientific Opinion on acrylamide in food. EFSA Journal. DOI:10.2903/j.efsa.2015.4104
14. EFSA (European Food Safety Authority). 2017. Acrylamide in food. EFSA Journal. DOI:10.2805/90424
15. Eriksson S. 2005. Acrylamide in food products: Identification, formation and analytical methodology [Dsc. Thesis]. Stockholm University, Stockholm.

16. Evropská komise. 2017. NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) 2017/2158 ze dne 20. listopadu 2017, kterým se stanoví zmírňující opatření a porovnávací hodnoty pro snížení přítomnosti akrylamidu v potravinách. Úřední věstník Evropské unie, Lucemburk.
17. Finnie S, Atwell W. 2016. Wheat flour. AACC International, Minnesota USA.
18. FoodDrink Europe. 2013. Acrylamide Toolbox 2013. FoodDrink Europe, Brussel.
19. Forseth RR, Schroeder FC. 2010. NMR-spectroscopic analysis of mixtures: from structure to function. *Current Opinion in Chemical Biology*. DOI: 10.1016/j.cbpa.2010.10.010.
20. Friedman M. 2003. Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 4504–4526.
21. Gabrovská D, Hálová I, Chrpová I, Ouhřabková J, Sluková M, Vevreinová S, Faměra O, Kohout P, Pánek J, Skřivan P. 2016. Obiloviny v lidské výživě: Stručné shrnutí poznatků se zvýšeným zaměřením na problematiku lepku. Forsapí, Praha.
22. González-Thuillier I et al. 2015. Distribution of Lipids in the Grain of Wheat (cv. Hereward) Determined by Lipidomic Analysis of Milling and Pearling Fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, United Kingdom*. 63(49). DOI: 10.1021/acs.jafc.5b05289
23. H-NMR screening for the high-throughput determination of genotype and environmental effects on the content of asparagine in wheat grain. *Plant Biotechnology Journal*. DOI: 10.1111/pbi.12364.
24. Horáková V, Dvořáčková O. 2017. Seznam doporučených odrůd 2017. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v Brně, Brno.
25. Horáková V, Dvořáčková O. 2018. Seznam doporučených odrůd 2018 pšenice ozimá, pšenice jarní, ječmen jarní, ječmen ozimý, tritikale ozimé, oves setý. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno, Brno.
26. Chrpová J, Šíp V, Hanzalová A, Dumalášová V, Veškrna O, Bízová I, Hořčíčka P, Švehlová J. 2015. Pěstební technologie odrůdy ozimé pšenice Annie. Kurent. České Budějovice.
27. Institut Galenus. 2008-2019. Škroby. Available from <https://www.galenus.cz/clanky/vyziva/polysacharidy-skroby> (accessed March 2019)
28. Kent NL. 1983. *Technology of cereals: an introduction for students of food science and agriculture*. Pergamon, New York.

29. Khan F, Anjum M, DIN A, Hussain S, Shabbir MA, Nadeem M. 2010. Immunochemical characteristics of wheat proteins. *Food and Agricultural Immunology*, 21(4), 279-294. DOI: 10.1080/09540105.2010.511151.
30. Kovaříková D, Netolická V. 2011. Kvalita obilí pro mlýnské zpracování. Investice do rozvoje vzdělání, Pardubice.
31. Kučerová J. 2016. Technologie cereálií. Mendelova univerzita v Brně, Brno.
32. Kulovaná E. 2002. Úroda. Profi Press s.r.o. Available from <https://uroda.cz/kvalita-obilnin/> (accessed March 2019).
33. Lee YY, Tang TK, Phuah ET, Alitheen NB, Tan CP, Lai OM. 2017. New Functionalities of Maillard Reaction Products As Emulsifier and Encapsulating Agent and Its Processing Parameters: A Brief Review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. DOI: 10.1002/jsfa.8124.
34. McClure CK. 2017. Structural Chemistry Using NMR Spectroscopy, Organic Molecules. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. DOI:10.1016/b978-0-12-803224-4.00294-6.
35. Morrison WR, Rasper VF, Bushuk W. Wheat lipids: structure and functionality. Springer, Boston.
36. Muttucumar N, Halford NG, Elmore SJ, Dodson AT, Parry M, Shewry PR, Mottram DS. 2006. Formation of High Levels of Acrylamide during the Processing of Flour Derived from Sulfate-Deprived Wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. DOI: 10.1021/jf0623081.
37. Pažout V, Hemalová V, Aldorfová M. 2012. Hygiena a technologie vegetabilních produktů: Hygiena a technologie mlýnských obilných výrobků, pekárenských výrobků, těst a těstovin. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno.
38. Pečivová P, Pavlínek V, Hrabě J, Kráčmar S. 2008. The influence of reducing and oxidising agents on the rheology of wheat flour dough. *Sborník Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně* (5):163–170.
39. Příhoda J, Hrušková M, Skřivan M. 2004. Cereální chemie a technologie I: cereální chemie, mlýnská technologie, technologie výroby těstovin. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha.
40. Příhoda J, Humpolíková P, Novotná D. 2003. Základy pekárenské technologie. I. Pekař a cukrář, Praha.

41. Příhoda J, Sluková M, Dřízal J. 2013. Jak poznáme kvalitu: Chléb a pečivo. Sdružení českých spotřebitelů pro Českou technologickou platformu pro potraviny, Praha.
42. Rahman A, Choudhary MI, Wahab A. 2016. The Basics of Modern NMR Spectroscopy. Pages 1-34 in Rahman A, Choudhary MI, Wahab A, editors. Solving Problems with NMR Spectroscopy. Academic Press, Pakistan.
43. Sluková M, Skřivan P. 2016. Pekařské a cukrářské výrobky ve školním stravování. Výživa a potraviny, Praha. Available from <http://www.vyzivaspol.cz/wp-content/uploads/2016/09/cukrar-vyrobky.pdf> (accessed February 2019)
44. Suas M. 2009. Advanced Bread and Pastry a Professional Approach. Delmar Cengage Learning, New York.
45. Šárka E, Smrčková P, Seilerová L. 2013. Rezistentní a pomalu stravitelný škrob. Chemické listy. Praha. Available from http://chemicke-listy.cz/docs/full/2013_12_929-935.pdf (accessed March 2019).
46. Šrámková Z, Gregorová E, Šturdík E. 2009. Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. Acta Chimica Slovaca (e2), Bratislava. Available from: https://www.researchgate.net/publication/228355199_Chemical_composition_and_nutritional_quality_of_wheat_grain-Review (accessed March 2019).
47. Taeymans D et al. 2004. A Review of Acrylamide: An Industry Perspective on Research, Analysis, Formation, and Control. Food Science and Nutrition. 44:323-347. DOI: 10.1080/10408690490478082
48. Teng Q. 2013. Structural Biology - Practical NMR Applications. Springer. Georgia.
49. Tkadlecová M. 2004. Co nám jaderný spin může říci o molekulách a lidském těle?. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha.
50. Velíšek J, Hajšlová J. 2009. Chemie potravin. OSSIS, Tábor. ISBN 978-80-86659-15-2.
51. Vím, co jím. 2013. Jak můžeme snížit obsah akrylamidu v potravinách?. Available from https://www.vimcojim.cz/magazin/clanky/o-vyzive/Jak-muzeme-snizit-obsah-akrylamidu-v-potravinach__s10010x7732.html (accessed March 2019)
52. Wang HY, Qian H, Yao WR. 2011. Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. Food chemistry. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.03.075.

9 Seznam tabulek

Tabulka 1: Nutriční hodnoty pšeničné mouky.....	3
Tabulka 2: Obsah významných polysacharidů v pšeničné mouce (Velíšek & Hajšlová 2009) .	6
Tabulka 3: Procentuální obsah proteinů v pšenici, jejich triviální název (Velíšek & Hajšlová 2009).....	7
Tabulka 4: Skladba aminokyselin, jejich zkratka a množství v pšeničném zrně a mouce (16 g dusíku ve 100 g bílkoviny) (Kent 1983).....	7
Tabulka 5: Porovnávací hodnoty pro přítomnost akrylamidu v potravinách dle nařízení komise (EU) 2017/2158.....	17
Tabulka 6: Charakteristika vzorků pšenice ozimé	20
Tabulka 7: Vybrané parametry kvality jednotlivých odrůd (Chrpková et al. 2015; Horáková & Dvořáčková 2017).....	21
Tabulka 8: Charakteristiky zkušebních stanic (Horáková & Dvořáčková 2018)	22
Tabulka 9: Hodnoty Q^2	26
Tabulka 10: Hodnoty Q^2	30
Tabulka 11: Průměrné koncentrace kvantifikovaných metabolitů (mg/g) v pekařských kategoriích pšeničné mouky	31
Tabulka 12: Průměrné koncentrace statisticky významných metabolitů v lokalitách (mg/g) ..	32
Tabulka 13: Průměrné koncentrace prekurzorů AA v jednotlivých odrůdách (mg/g).....	33

10 Seznam obrázků

Obrázek 1: Mechanismus následující po Maillardově reakci, tvorba akrylamidu z asparaginu a redukujícího cukru (Eriksson 2005)	13
Obrázek 2: Chemický vzorec akrylamidu	13
Obrázek 3: Vznik akrylamidu (Eriksson 2005)	14
Obrázek 4: Faktory závisící na množství AA v pečivu (FoodDrink Europe 2013)	18
Obrázek 5: PCA rozptylové diagramy komponentních skóre (score plot) rozděleny dle sledovaných faktorů: A) odrůdy pšenice, B) kategorie pekařské kvality, C) lokality	25
Obrázek 6: Dva různé způsoby vizualizace PLS-DA: A) score plot, B) variable importance (VIP) score – data rozdělena dle faktorů (odrůdy, kvalita, lokalita)	27
Obrázek 7: PCA rozptylové diagramy komponentních skóre (score plot) rozděleny dle sledovaných faktorů A) odrůdy B) kategorie pekařské jakosti C) lokality	28
Obrázek 8: Dva způsoby vizualizace PLS-DA A) score plot B) VIP score, data rozdělena dle faktorů (odrůdy, kvalita, lokalita)	29