



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVÍN A BIOTECHNOLÓGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ENZÝMOVÁ HYDROLÝZA GLUTÉNU PRE APLIKAČNÉ ÚČELY V BEZLEPKOVEJ DIÉTĚ

ENZYME HYDROLYSES OF WHEAT GLUTEN FOR THE GLUTEN FREE APPLICATION

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. DOMINIKA SVOBODOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. SILVIA MOŠOVSKÁ, Ph. D.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0918/2014** Akademický rok: **2014/2015**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Bc. Dominika Svobodová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (N2901)
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)
Vedoucí práce: **Ing. Silvia Mošovská, Ph.D.**
Konzultanti: doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.

Název diplomové práce:

Enzymová hydrolýza gluténu pre aplikačné účely v bezpečnej diéte

Zadání diplomové práce:

1. Enzymatická degradácia škrobu prostredníctvom amyláz
2. Enzymatická hydrolýza gluténu komplexom proteáz, prípadne sladovými extraktmi
3. Kvantitatívne stanovenie obsahu gluténu v hydrolyzáte prostredníctvom sendvičovej ELISA (kit)

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2015

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Dominika Svobodová
Student(ka)

Ing. Silvia Mošovská, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Celiakia sa zaraďuje k tzv. autoimunitným ochoreniam, ktorej liečba spočíva v absolútnom dodržiavaní bezlepkovej diéty. Nakoľko sa lepok používa v značnej miere vo všetkých sférach výroby potravín, dodržiavanie skutočne striktne bezlepkovej stravy môže byť pre celiatika ťažké. Taktiež výrobky vhodné pre pacientov trpiacich týmto ochorením sú zväčša finančne náročné. V neposlednom rade pacienti tým, že prejdú na výhradne bezlepkovú stravu sa ochudobňujú o dôležité nutričné komponenty. Z tohto dôvodu rastie záujem o inováciu takéhoto typu výrobkov ako za účelom zvýšenia ich nutričných, technologických, ale i organoleptických vlastností.

Cieľom predkladanej diplomovej práce bolo v prvom kroku vypracovať literárnu rešerš z oblasti celiakie a alergénu gluténu, respektíve jeho konkrétnej časti gliadínu. V experimentálnej časti bola pozornosť upriamená najskôr na hydrolytické štiepenie škrobu, pričom substrátom bol sterilizát pšeničnej múky a vody, v ktorého špirále je inkorporovaný práve glutén. Najlepšiu schopnosť degradovania škrobových zín mala kombinácia enzýmov MT3K a GLUAMK v 0,1 % koncentrácii po dobu pôsobenia 4 hodiny, čomu nasvedčuje zníženie obsahu škrobu z pôvodného množstva 72,65 % na výslednú koncentráciu 29,00 %. Ďalším bodom práce bolo pôsobenie rôznych proteáz, za účelom zníženia množstva gliadínu pod hodnotu 20 ppm na kilogram produktu. Najnižšia hladina skúmaného alergénu (10,79 ppm/kg) bola zaznamenaná pri enzymatickej kombinácii exoproteázy Flavourzyme (0,1 %) a endoproteázy Neutral Protease (0,1 %) po 7. hodine hydrolytického pôsobenia.

Záverom diplomovej práce bolo pripravených viacero alternatív bezgluténových chlebov a prostredníctvom senzorického hodnotenia posúdené ich vlastnosti farby, vône a chuti, pre predikciu umiestnenia výrobkov na komerčný trh.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: celiakia, bezlepková diéta, glutén, gliadín, enzým

ABSTRACT

Celiac disease is attributable to autoimmune diseases, where treatment is based on absolute respect for gluten-free diet. As the gluten used widely in all areas of food production, strict adherence to a gluten-free diet really can be difficult for people with celiac disease. Products suitable also for those suffering from the disease are usually expensive. Finally, patients that undergo exclusively on a gluten-free diet are robbing the important nutritional components. Therefore, interest in this type of products innovation enhance as to the nutritional, technological, as well as organoleptic properties.

The aim of this final thesis was to draw up literature review of the celiac disease and gluten allergen, or his particular part of gliadin. In the experimental part, attention was focused on the first hydrolytic cleavage of starch, the substrate was sterilized wheat flour and water, where is incorporated spiral just gluten. The best ability of degrading the starch grains, the combination of enzymes and MT3K and GLUAMK concentration of 0,1% over 4 hours of action, as indicated by a reduction in the starch content of the original amount of 72,65 % at a concentration of 29,00 %. The next item of work distribution used different proteases, to reduce the amount of gliadin to below 20 ppm per kilogram of final product. Low levels investigated allergen (10,79 ppm/kg) recorded by the enzyme combination exoprotease Flavourzyme (0,1 %) and endoprotease Neutral Protease (0,1 %) at 7 hours hydrolytic action.

The conclusion of the thesis was prepared several alternatives gluten-free breads and through sensory evaluation assessed the characteristics of color, aroma and taste to predict the location of the products on the commercial market.

KEY WORDS: celiac disease, gluten free diet, gluten, gliadin, enzymes

SVOBODOVÁ, D. Enzymová hydrolýza gluténu pre aplikačné účely v bezlepkovej diéte. Brno: Vysoké učení technické v Brne, Fakulta chemická, 2015. 67 s. Vedúca diplomovej práce Ing. Silvia Mošovská, Ph. D..

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne odcitovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom iba so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....

podpis študentky

„Úspech je schopnosť ísť od jedného neúspechu k druhému, bez straty nadšenia.“

[*Winston Churchill*]

Tieto riadky by som rada venovala ľuďom, vďaka ktorým mohla byť táto práca realizovaná. V prvom rade patrí moja veľká vďaka Ing. Silvii Mošovskej, Ph.D., ktorá mi bola odbornou i personálnou oporou a svojim individuálnym prístupom a erudovanými radami vytvorila inšpiratívne prostredie, v ktorom bola radosť pracovať.

Ing. Borisovi Žitnému, Ph.D. za možnosť spolupráce a realizácie reologických meraní, ktoré boli veľkým prínosom pre aplikačný aspekt mojej práce. Taktiež vedeniu a pracovníkom Fakulty chemickej a potravinárskej technológie STU v Bratislave za možnosť pracovať na danej problematike a vytvoriť tak tému „šitú na mieru“.

A na záver, no nie na poslednom mieste, patrí moja obrovská vďaka doc. Ing. Ernestovi Šturdíkovi, Ph.D., ktorý mi ukázal pravú tvár vedy a umožnil mi „podať si s ňou ruku a zoznámiť sa.“

OBSAH

1 ÚVOD	9
2 TEORETICKÁ ČASŤ.....	10
2.1 Pšeničný glutén.....	10
2.2 Neznášanlivosť gluténu – celiakia.....	13
2.3 Enzýmová hydrolýza bielkovinovej matrice	16
2.3.1 Rozdelenie proteínových hydrolyzátov podľa stupňa hydrolýzy	16
2.3.2 Charakteristika a využitie proteolytických hydrolyzátov	17
2.3.3 Proteolytické enzýmy.....	19
2.3.4 Faktory ovplyvňujúce hydrolýzu, metódy zisťovania stupňa hydrolýzy.....	21
2.4 Enzýmová hydrolýza škrobu	22
3 CIELE PRÁCE.....	26
4 MATERIÁL A METÓDY	27
4.1 Použité suroviny	27
4.2 Použité enzýmy.....	27
4.3 Použité chemikálie.....	27
4.4 Použité prístroje a pomôcky	28
4.5 Použité roztoky	28
4.6 Metódy a postupy	29
4.6.1 Príprava suspenzie	29
4.6.2 Ocharakterizovanie pšeničnej múky a jej sterilizátu.....	29
4.6.3 Základné nutričné charakteristiky pšeničnej múky a jej sterilizátu	31
4.6.4 Reológia pšeničnej múky a jej sterilizátu	33
4.6.5 Hydrolýza.....	33
4.6.6 Pekárske pokusy.....	33
4.6.7 Senzorické hodnotenie výrobkov.....	34
5 VÝSLEDKY A DISKUSIA	35
5.1 Charakteristika pšeničnej múky a jej sterilizátu	35
5.2 Stanovenie základných nutričných charakteristík pšeničnej múky a jej sterilizátu.....	36
5.2.2 Stanovenie vybraných funkčných vlastností pšeničnej múky a jej sterilizátu.....	37
5.2.3 Reológia pšeničnej múky a jej sterilizátu	38

5.3 Hydrolýza sterilizátu.....	39
5.3.1 Hydrolytické štiepenie škrobu amylázami a glukoamylázami	39
5.3.2 Selekcia vhodných proteáz pre úspešnú hydrolýzu gluténu v sterilizáte.....	47
5.3.3 Nutričná charakteristika hydrolyzátu	50
5.4 Pekárske zapracovanie vybraného hydrolyzátu a senzorická analýza finálneho výrobku	50
5.4.1 Príprava receptúry pre pekársky pokus	50
5.4.2 Aktivita vody finálneho produktu s pšeničným hydrolyzátom	51
5.4.3 Senzorická analýza finálneho výrobku	51
6 ZÁVER.....	57
7 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV	59
8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	65
8.1 Použité skratky	65
9 ZOZNAM POUŽITÝCH PRÍLOH.....	66
9.1 Použité prílohy.....	66
10 PRÍLOHY	67

1 ÚVOD

Hoci je pšenica základ ľudskej stravy, mnohí nutriční odborníci argumentujú, že ľudia nie sú vyvinutí pre jej správne strávenie. Tvrdia, že imunitná reakcia na cudzie proteíny v pšenici môže viesť k sérii symptómov, ktoré sa následne prejavia rôznymi ochoreniami. Najčastejším ochorením spojeným práve s touto ideou je celiakia.

Celiakia (CD) je definovaná ako autoimunitné ochorenie, ktorévzniká pôsobenímgluténuu geneticky predisponovaných jedincov. Jedná sa o poruchu metabolizmu gluténu, kedy vzikajú jeho toxické látky poškodzujúce sliznicu tenkého čreva. U jedincov trpiacich týmto ochorením dochádza v dôsledku tvorby týchto látok k strate klkov tenkého čreva a následným zmenšením absorpčného povrchu. Neliečená celiakia môže viesť k malnutrícií a dokonca až k rakovine tenkého čreva.

V roku 2008bola na Slovensku vyhotovená posledná štúdia týkajúca sa prevalencie celiakie. Na ochorenie celiakia bolo diagnostikovaných iba 7930 ľudí, čo je pomer výskytu 1:677. Avšak trend výskytu ochorenia je stále narastajúci, pričom celiakia môže postihovať ľudí všetkých vekových kategórií. Z tohto dôvodu problematika celiakie je vysoko aktuálna.

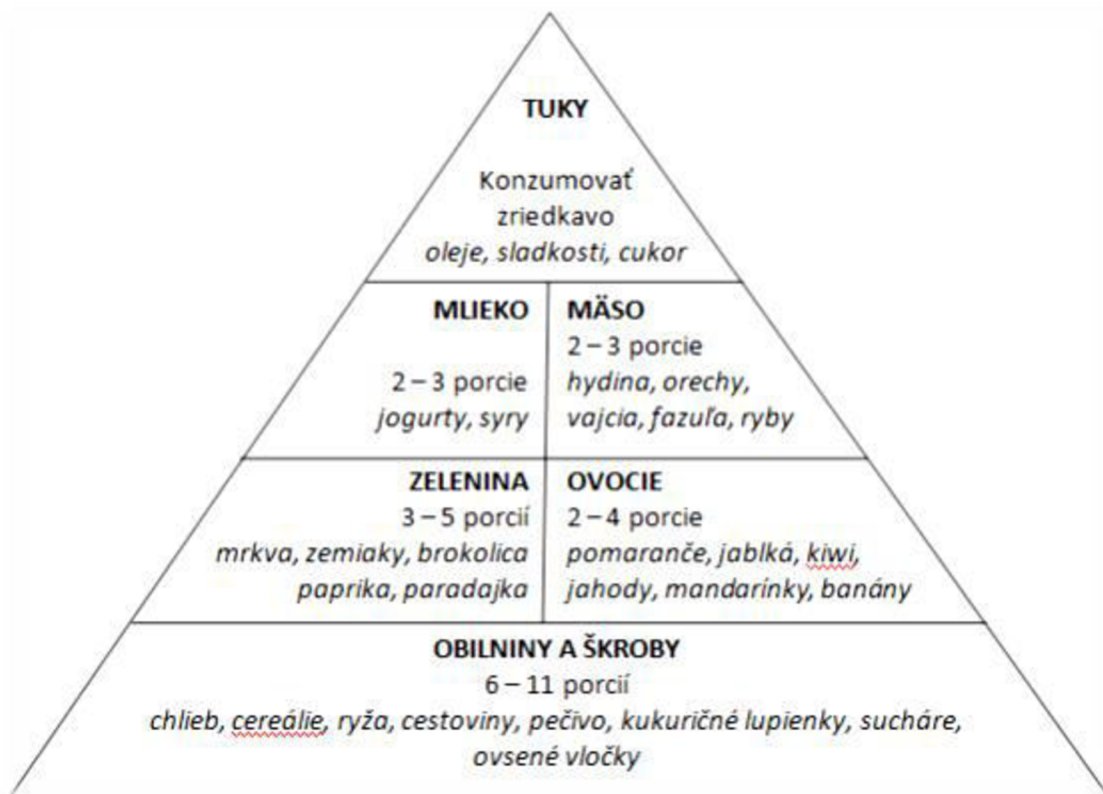
V súčasnosti jedinou efektívnou liečbou tohto ochorenia je striktné dodržiavanie bezlekovkej diéty. Nakoľko glutén sa môže okrem samotných pekárskych výrobkov vyskytovať taktiež v skrytej forme ako aditívum v rôznych potravinách, dodržiavanie čisto bezlekovkej diéty je ťažké. Navyiac, celiatické výrobky sú častokrát veľmi finančne náročné. Taktiež bezlepková strava je často ochudobnená o nutrične dôležité zložky, vďaka čomu celiatici môžu trpieť na nedostatok dôležitých látok. Preto je predmetom záujmu komunity celiaticov vývin nových výrobkov, ktoré by im poskytovali dostatok výživových látok. Zároveň by dané produkty mali dobré organoleptické vlastnosti a v konečnom dôsledku aj prijateľnú cenu.

Skutočnosť spomínané vyššie iniciovali vznik predkladanej diplomovej práce, ktorej predmetom bola hydrolýza gluténu v pšeničnej múke. Časť práce je taktiež venovaná náčrtu prípravy inovovaných pekárskych výrobkov a ich sensorickému posúdeniu.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

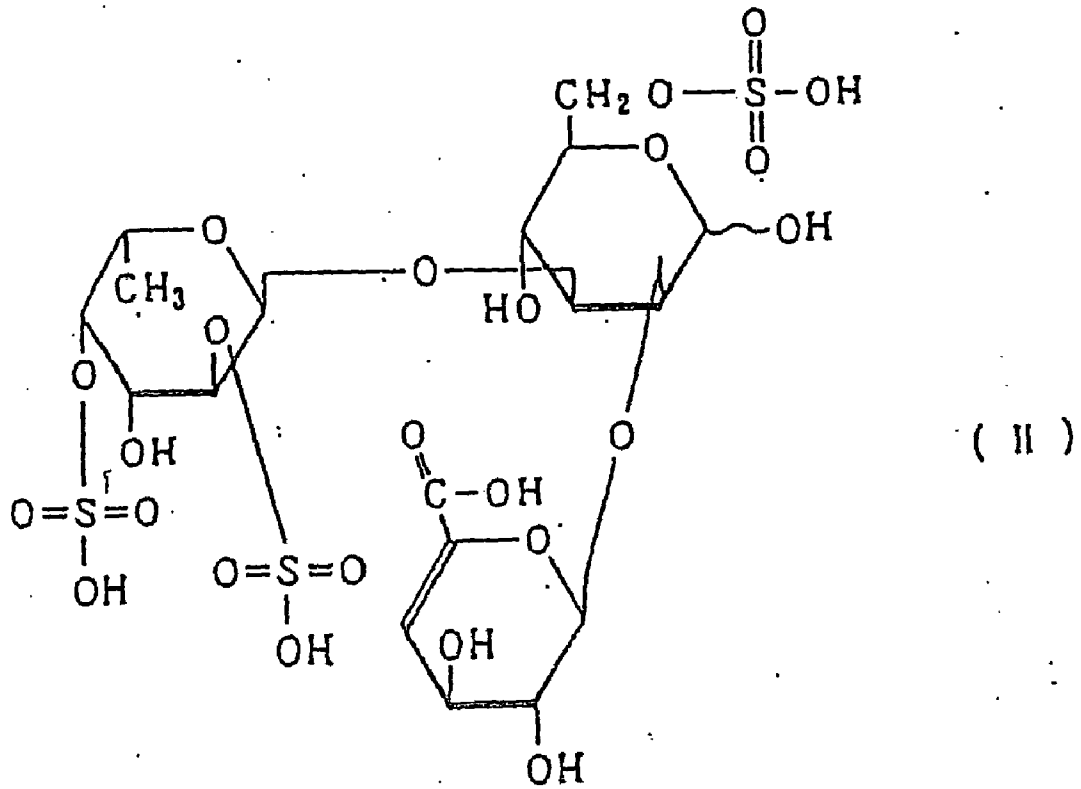
2.1 Pšeničný glutén

Obilniny ako majoritná surovina v ľudskej výžive tvoria základ potravinovej pyramídy (Obrázok 1). K najviac pestovaným obilninám na celom svete patrí pšenica. Tvorí približne 20 % z celkového energetického príjmu. Je zdrojom rôznych prospešných látok vrátane minerálov a vitamínov [1]. K hlavným nutričným zložkám nachádzajúcich sa v pšenici sú sacharidy, proteíny, aminokyseliny, lipidy a vláknina.



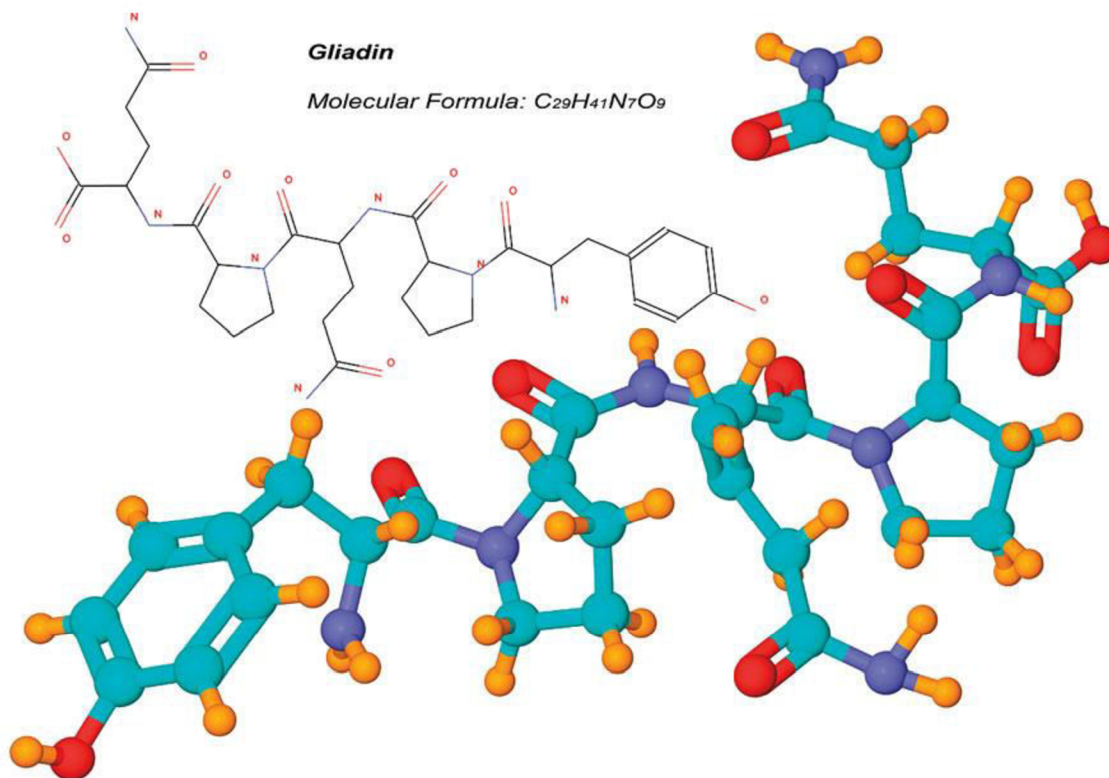
Obrázok 1: Vzor potravinovej pyramídy vhodný pre zdravú výživu[2].

K majoritným proteínom pšenice patrí glutén resp. lepok [3]. Glutén je súdržná hmota, ktorá zostane keď sa cesto premyje po odstránení škrobu (Obrázok 2). Je to komplex rôznych zložiek prítomných ako monoméry, oligoméry a polyméry. Pšeničný lepok je zmes dvoch hlavných bielkovín, rozpustný gliadín a nerozpustný glutenín, ktoré sa navzájom od seba odlišujú v rozpustnosti vo vodných alkoholoch.



Obrázok 2: Chemická štruktúra gluténu[3]

Gliadíny (Obrázok 3) sú najmä monomérne proteíny s molekulovou hmotnosťou 28 - 55 kDa, zatiaľ čo gluteníny sú agregované proteíny spojené pomocou medzireťazcovýchdisulfidových väzieb s molekulovou hmotnosťou asi 500 až 10.000 kDa. Po redukcii disulfidových väzieb, podjednotkyglutenínu vykazujú rozpustnosť vo vodných alkoholoch rovnako ako gliadínové [4].



Obrázok 3: Gliadín[4]

Názov lepok bol pôvodne používaný pre označovanie pšeničných proteínov, no stále viac sa používa ako termín pre prolín-glutamíny, bohaté na proteíny z pšenice, jačmeňa, raže a ovsu[5]. Proteíny gluténu hrajú dôležitú úlohu v kvalite múky. Majú za následok kapacitu absorpcie vody, súdržnosť, viskozitu a elasticitu cesta [4]. K jeho vlastnostiam patrí zvýšenie pevnosti múky čo je priaznivý ukazovateľ pri pečení resp. má dobré texturačné vlastnosti. Avšak jeho minimálna rozpustnosť vo vode pri neutrálnom pH obmedzuje jeho ďalšie uplatnenie v potravinárskej[3]. V pšenici sa lepok skladá z gliadínu, gluteínu a čiastkových komponentov. V gliadíne je možné proteíny rozdeliť na α -, γ -, a ω -gliadíny, zatiaľ čo glutenínové proteíny sa rozdeľujú na základe vysokej (HMW) a nízkej molekulovej hmotnosti (LMW) [5]. V jednej odrode pšenice existuje niekoľko 100 rôznych typov bielkovín, z ktorých mnohé sa líšia iba tým, že majú niekoľko rozdielnych aminokyselín. Vysoký obsah prolínových zvyškov robí proteíny gluténu obzvlášť odolnými proti gastrointestinálnemu tráveniu[6]. Tieto frakcie obsahujú vysoké množstvo hydrofóbných aminokyselín. Gliadíny sú jednoduché peptidové reťazce, ktoré sú pospájané 6 alebo 8 cisteínovými zvyškami tvoriacich vzájomne disulfidové väzby. Na druhej strane gluteníny sú veľké proteíny, ktoré sú tvorené polypeptidovým reťazcom prepojeným disulfidovými väzbami [7].

Avšak u geneticky vnímavých jedincov glutén, respektíve jeho konkrétna časť gliadín, je aktivátorom imunitných reakcií v sliznici tenkého čreva. Ochorenie sa nazýva celiakia [8].

Klinické pozorovania naznačujú, že proteíny lepku u iných obilnín ako je jačmeň a raž sú tiež toxické pre celiatikov [6].

Všeobecne platí, že ovos je bezpečný pre celiatikov. Pri poslednej spomínanej cereálii je dlhodobo vedená diskusia vo vedeckých kruhoch, nakoľko má nižší obsah prolamínu ako ostatné tri obilniny avšak za istých okolností vykazuje toxické účinky pre celiatikov. Toxicita ovsu je pozorovaná ako dlhodobá, pričom k nej dochádza po kontaminácii s vyššie uvedenými obilninami pšenice, raže a jačmeňa. Bez ohľadu na to, väčšina krajín ovos zahŕňa medzi obilniny nevhodné pre celiatikov [9].

2.2 Neznášanlivosť gluténu – celiakia

Celiakia patrí k jednej z najčastejšie sa vyskytujúcich gastrointestinálnych porúch na celom svete. Označuje sa ako autoimunitná enteropatia alebo zápalové ochorenie tenkého čreva u geneticky vnímavých jedincov. Spôsobuje trvalú neznášanlivosť lepku (gluténu), ktorý sa nachádza predovšetkým v pšenici, jačmeni a raži. Výsledkom takejto imunitnej odpovede je atrofia klkov tenkého čreva čo následne vedie k jeho disfunkcii [8].

➤ História ochorenia

Prvé známe opisy symptómov ochorenia v súlade s celiakiou boli vďaka gréckemu lekárovi Aretaeusovi v 2. storočí. V 19. storočí Samuel Gee a ďalší lekári ďalej definovali príznaky a charakteristiky ochorenia, pričom ponúkli aj rôzne predstavy o liečbe. Avšak až Willem Karel Dicke bol prvý, ktorý počas 2. svetovej vojny rozpoznal význam odstránenia „pochybných“ obilných zŕn zo stravy celiatikov, zatiaľ čo John W. Paulley popísal v roku 1940 histologické zmeny v tenkom čreve súvisiace s celiakiou [10].

Prvý objav zaoberajúci sa ochorením s konkrétnymi markermi HLA a pre glutén špecifické T lymfocyty sa konal v roku 1980 nasledovaný rokom 1990. Základom týchto výskumov bolo objavenie tzv. HLA markerov, ktoré sú antigénmi pre špeciálnu triedu II ľudských leukocytov a poskytujú asi 40 % genetickú predispozíciu pre potravinovú intoleranciu. Tieto proteíny pôsobia na povrchu buniek a spolu s antigén-prezentujúcimi bunkami určujú náchylnosť k celiakii tým, že sú prítomné imunogénne peptidy lepku v špecifických T bunkách tenkého čreva. Kým prítomnosť HLA proteínov je síce pre rozvoj ochorenia nevyhnutná, samotná genetická výbava jedinca prispieva ku genetickému riziku vzniku choroby [10].

➤ Prevalencia ochorenia

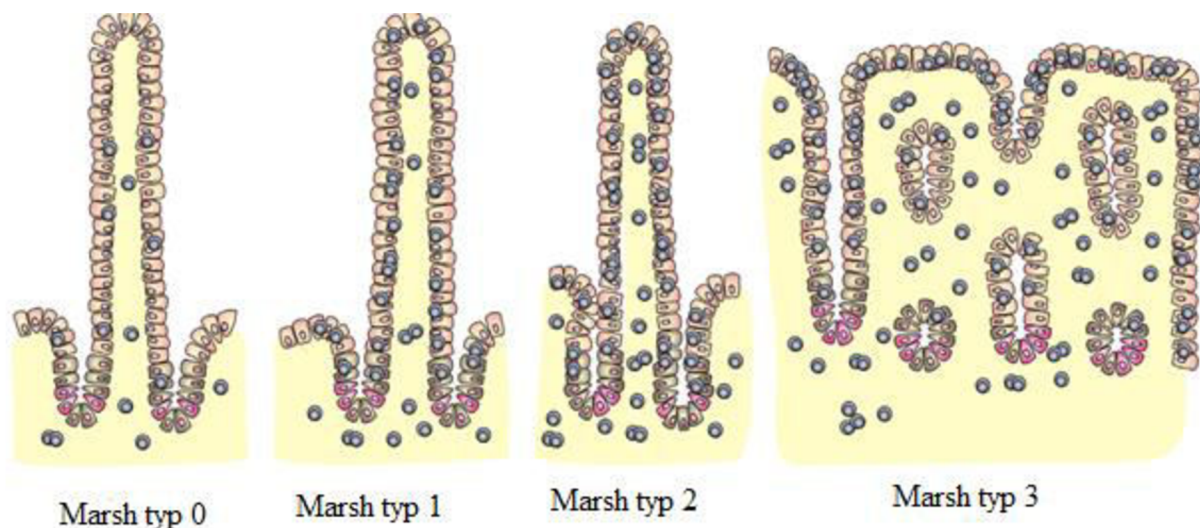
V minulosti bolo toto ochorenie považované za zriedkavé. Postupné získavanie nových poznatkov o problematike viedlo k záveru, ktorý upravoval pôvodnú ideu ojedinelosti výskytu, avšak ešte stále nezachytával skutočnú podstatu.

V súčasnosti je odhad výskytu celiakie celosvetovo 1 %, pričom postihuje ľudí všetkých vekových kategórií. Medzi činitele podmieňujúce prejav choroby patria životné prostredie a taktiež genetické a imunologické faktory. U tých, ktorí sú geneticky náchylní, expozícia lepku môže vyvolať aj vrodené a adaptívne imunitné odpovede [11].

Z geografického hľadiska sa toto ochorenie vyskytuje najviac v Európe, následne v Spojených štátoch amerických. I keď je stále menej častá u Afroameričanov, Hispáncov a Aziatov, i tam je v poslednej dobe evidovaný nárast pacientov s intoleranciou lepku, čo nasvedčuje tomu, že ide o celosvetový problém [12].

➤ Charakteristika ochorenia a súčasná terapia

Niektoré kroky celiakie a jej patogenézy sú stále nejasné. Je zrejmé, že glykoproteíny DQ2 typu HLA II a / alebo DQ8 haplotypov, spôsobujú po požití peptidov z pšeničnej múky nenormálnu Th1-riadenú imunitnú reakciu, ktorá sa nakoniec obráti až do autoimunitnej reakcie. Za takúto odpoveď zodpovedajú tkanivové transglutaminázy typu 2 (TG2, tiež označované tkanivové transglutaminázy, tTG). Rozhodujúce pre expanziu celiakie + T-buniek je prezentácia malých lepkových peptidových fragmentov na molekuly HLA. Tieto peptidy majú podobné aminokyselinové sekvencie, bohaté na glutamín a prolín, a obsahujú aj rôzne aminokyselinové zvyšky napríklad tyrozín alebo fenylalanín. Vzhľadom na vysoký obsah prolínu v peptidochštiepených enzymaticky v črevnom lumene a dostatočné percentuálne zastúpenie zvyškov glutamínu (> 30 %), sú vhodným substrátom pre transglutaminázu. Enzymatická úprava lepku prostredníctvom transglutaminázy a lyzínu bráni tvorbe imunologických účinkov, čo udáva nový smer pre alternatívnu terapiu pacientov trpiacich celiakiou [13]. Stupeň celiakie sa charakterizuje tzv. Marshovou stupnicou (Obrázok 4.), ktorá rozdeľuje intestinálne lézie do 3 skupín a to na infiltračné, hyperplastické a deštruktívne [14].



Obrázok 4: Schematické znázornenie etáp črevných lézií pri celiakii podľa Marsha.

Jedinou účinnou liečbou pre tých, ktorí trpia celiakiou je prísna celoživotná bezlepková diéta. Bezlepková diéta charakterizovaná ako spôsob liečby celiakie, ktorá pacientovi

zamedzuje potravinový kontakt s alergénom, teda lepkom. Inými slovami, všetky výrobky z múky pšenice, jačmeňa, raže a aj z ovsu sú pri stravovaní neprijateľné [9].

➤ **Výživa celiatikov**

Dodržiavať skutočne striktnu bezlepkovú stravu je ťažké, nakoľko glutén sa používa v značnej miere vo všetkých sférach výroby potravín. Predstavuje to istú výzvu pre pacientov, ktorej obtiažnosť závisí aj od veku celiatika, nakoľko prechod na túto diétu u dospelých býva zložitejší [9]. Po prechode pacienta na bezlepkovú stravu sa často naskytajú otázky, kde všade sa lepek nachádza. Glutén je prevažne uvádzaný iba ako súčasť cereálií, chleba a cestovín. Mnohé potraviny, ktoré nemajú s obilninami priamo nič spoločné, obsahujú stopy gluténu. Ide o koreniny, omáčky, marinády, polievky, polotovary, mäsové výrobky, jogurty, zahusťovadlá a rôzne dochucovadlá [15]. Taktiež glutén sa používa pri výrobe produktov pre osobnú starostlivosť, v potravinových doplnkoch či liekoch. Hoci je jeho prítomnosť vo výrobku zvyčajne uvedená na jeho obale, jestále veľa skrytých zdrojov gluténu, pochádzajúcich z krížovej kontaminácie pri výrobe a pri preprave produktov [9].

➤ **Deficit vo výžive**

Bez ohľadu na typ a stav celiakie je známe, že ľudia trpiaci týmto ochorením majú zvýšené riziko úmrtnosti v porovnaní s bežnou populáciou. Najvyššie riziko mortality v ich prípade predstavuje rakovina zažívacieho ústrojenstva [12]. Glutén prijímaný v potravinách je spúšťačom celého radu poškodení črevnej sliznice, čo spôsobuje, že sa potrava dostatočne netrávi a správne neabsorbuje. Dôsledkom nezistenej celiakie alebo nedodržiavania bezlepkovej diéty je chronická podvýživa, pacient nemá dostatočný príjem energie, tak i esenciálnych mastných kyselín, proteínov, vitamínov a minerálov [16]. Pacienti potrebujú poznať typické aj atypické príznaky a možné komplikácie spojené s ich zdravotným stavom, taktiež čo robiť, keď nastanú komplikácie [9].

Bezlepkové zmesi sa vyznačujú vysokým obsahom tukov, sú energeticky bohaté, je u nich zjavný trend pridávania rôznych dochucovadiel, vylepšovania textúry, aby sa zvýšila prijateľnosť a chuť bezlepkového tovaru. Múky z pšenice, raže a jačmeňa sú prirodzeným zdrojom vitamínov a minerálov, najmä vitamíny skupiny B a železo, o čo je však celiatická strava prirodzene ochudobnená [15]. Nedávno bolo zistené, že mnohé bezlepkové výrobky z pseudoobilnín, obsahujú nedostatočné množstvo tiamínu, riboflavínu, niacínu a železa v porovnaní s pšeničnými produktmi. Pre celiatikov je veľmi dôležitý príjem práve týchto zložiek v strave, pre správny vývoj a prosperitu zdravotného stavu. Bezlepkové výrobky sú často vyrábané pridávaním rôznych proteínov na škrobovej báze, aby sa zvýšila ich nutričná hodnota. Cereálie vhodné pre celiatikov trpia výrazným nedostatkom lyzínu, čo je jedna z esenciálnych aminokyselín potrebná pre správny vývoj človeka. Strukoviny poskytujú vysoký obsah práve tejto aminokyseliny, sú teda vhodným zdrojom pre obohacovanie deficientných matric pre výrobu celiatických potravín [17].

Nedostatočné absorpcie vyvolané ochorením vedú k nedostatku živín, ako je železo, kyselina listová a vitamín K, ktoré sú nevyhnutné pre organogénu v tukoch rozpustných vitamínov. Ich dôležitosť sa prejavuje pri spermatogéze, absorpcii vitamínu D a vápnika, pričom vápnik je nevyhnutný pre udržanie štruktúry kostí [18]. Predchádzajúce štúdie preukázali, že 20 až 38% pacientov s celiakiou má nedostatočný príjem energie, proteínov, vlákniny, minerálov a vitamínov. Pri malabsorpcii železa, folátov a vápnika je bežné, že tieto živiny sú absorbované v proximálnej časti tenkého čreva. Najzávažnejším zistením je, že sa frekvencia nedostatočného príjmu železa u celiatikov pohybuje od 12 do 69 % . Príjem vitamínu B12 bol taktiež deficitný pri neliečenej forme. Jeho príjem sa u pacientov pohyboval v rozmedzí od 8 do 41 % pri relatívne nízkej atrofii klkov v ileu, kde sa vstrebáva vitamín B12. Nedostatok vápnika, fosforu a vitamínu D je mnohokrát zapríčinený zníženým prísunom mlieka a mliečnych výrobkov, v snahe zabrániť vzniku intolerancie na laktózu. Závažnosť uvedených nedostatkov vo výžive je ovplyvnená dĺžkou obdobia, počas ktorého ľudia žili aktívnou, ale nediagnostikovanou chorobou [19]. Nedostatočné nutričné vyváženie vlákniny sa pravdepodobne vzťahuje k zloženiu mnohých glutén neobsahujúcich potravín, ktoré sú pripravené zo škrobu alebo necelozrnných tzv. „bielych“ múk s nízkym obsahom vlákniny. V skutočnosti v priebehu odplevnenia múky sa oddelí vonkajšia vrstva zrn obsahujúca vlákninu. Štúdie skúmajúce nutričné zloženie spracovaných negluténových výrobkov preukázali, že obsahujú vysokú hladinu sacharidov, tukov a solí. Celiatici majú taktiež tendenciu kompenzovať si obmedzenie v podobe bezpečnej diéty potravinami, ktoré majú vysoké hladiny tukov, sacharidov a kalórií [20].

Ľudia s celiakiou sú predurčení k celoživotnej kontrole etikiet o zložení, aby sa presvedčili, že výrobky sú bezpečné pre osobnú potrebu alebo spotrebu. Špeciálne vyrábané bezpečkové výrobky sú stále ťažko dostupné a majú tendenciu byť nielen menej chutné, ale i nutrične chudobnejšie a drahšie. Preto je veľmi dôležité, zlepšiť kvalitu života celiatikov [9].

Niekoľko skupín výskumných odborníkov pracuje na stanovení skutočne bezpečného denného príjmu lepku pre celiatikov bez zhoršenia stavu negatívneho vplyvu na fyziologický stav klkov v tenkom čreve. V súčasnosti je obsah lepku stanovený na nulovej koncentrácii.

2.3 Enzymová hydrolýza bielkovinovej matrice

Jedným z hlavných metód pozmeňovania proteínov v potravinách je enzymová hydrolýza. Počas tohto procesu sú proteíny štiepené na menšie molekuly, menovite peptidy a aminokyseliny čo môže viesť k zlepšeniu nutričnej kvality a bezpečnosti potravinových produktov. Proteínové hydrolyzáty majú vlastnosti, ktoré ich robia atraktívne ako zdroje proteínov v ľudskej výžive. Sú používané ako nutričné suplementy, funkčné zložky. Používajú sa na fortifikáciu drinkov, džúsov, polievok i omáčok [1].

2.3.1 Rozdelenie proteínových hydrolyzátov podľa stupňa hydrolýzy

Produkty enzymovej hydrolýzy sa vyznačujú lepšími fyzikálno - chemickými vlastnosťami, ako zlepšená rozpustnosť či emulgačná schopnosť. V závislosti od stupňa hydrolýzy môžu

byť proteínové hydrolyzáty klasifikované do troch základných skupín, ktoré determinujú ich použitie [21].

- ❖ Hydrolyzáty s nízkym stupňom hydrolýzy (1 až 10 %) využívajú sa na zlepšenie funkčných vlastností ako je penivosť a emulzifikačná schopnosť. Ich aplikácia je žiadaná v procesoch výroby chleba, pekárenských výrobkov, zmrzliny, majonézy;

Hydrolyzáty s premenlivým stupňom hydrolýzy (príchute), ktoré sa využívajú pre zlepšenie chuti. Sem patria aj hydrolyzáty lepku. Tieto hydrolyzáty sa používajú zvyčajne do polievok, mäsových vývarov, omáčok, predvarených jedál a mäsových produktov ako arómotvorné pomocné aditíva;

- ❖ Hydrolyzáty s premenlivým stupňom hydrolýzy (príchute), ktoré sa využívajú pre zlepšenie chuti. Sem patria aj hydrolyzáty lepku. Tieto hydrolyzáty sa používajú zvyčajne do polievok, mäsových vývarov, omáčok, predvarených jedál a mäsových produktov ako arómotvorné pomocné aditíva;
- ❖ Hydrolyzáty s vysokým stupňom hydrolýzy (viac ako 10 %), ktoré sa využívajú ako nutričné suplementy a v lekárskejších diétach (napr. hypoalergénne mlieka). Zahŕňajú totiž hydrolyzáty, ktorých cieľom je využiť alebo zlepšiť nutričné parametre bielkovín, z ktorých boli vyrobené;

2.3.2 Charakteristika a využitie proteolytických hydrolyzáto

Proteínové hydrolyzáty sú predovšetkým zmesi oligopeptidov, polypeptidov a voľných aminokyselín. Enzymatickou hydrolýzou sa získava z pôvodnej bielkoviny komplex štiepných produktov od vysokomolekulových peptidov až po nízkomolekulové peptidy a aminokyseliny. Je to efektívna metóda ako vylepšiť funkčné vlastnosti proteínov a rozšíriť tak ich možnosť aplikácie [22].

V potravinárstve sa enzýmová hydrolýza využíva ako na živočíšnych tak i rastlinných proteínoch. Zo živočíšnych surovín sa najčastejšie hydrolyzujú mliečne, mäsové proteíny ako jatočná krv, kolagén, želatína alebo vaječný albumín. Z rastlinných substrátov sa týmto technologickým spôsobom opracúvajú strukoviny, z ktorých najvyužívanejším substrátom je sója. Avšak zaujímavé sú tiež fazuľa, šošovica, hrach, bôb, cícer a iné. Okrem spomínaných ďalším rastlinným substrátom sú olejniny a obilniny [23].

Obilninové hydrolyzáty sú univerzálnou potravinovou komoditou a hrajú významnú úlohu čo sa týka prídavných látok. V závislosti na stupni hydrolýzy tieto hydrolyzáty môžu byť použité pre emulsifikáciu, želatinizáciu alebo ako korenie. Pšeničný glutén obsahuje až 85 % proteínov, je vysoko dostupný a jeho hydrolyzáty sa už používajú v širokej škále potravinárskych produktov. Avšak tieto aplikácie vyžadujú vysoký stupeň hydrolýzy [24].

Hydrolýza potravinových bielkovín je široko uznávaná a využívaná pre jej pridanú hodnotu. Jedná sa o zlepšenie nutričných znakov, eliminácia zhoršenia kvality, zlepšenie parametrov funkčných vlastností, odstránenie toxických a inhibičných zložiek [25].

Hydrolyza bielkovín slúži na tvorbu produktov, ktoré kvalitatívne zlepšujú charakter potravín a umožňuje prípravu hypoalergénnych a diétnych potravín [25].

2.3.2.1 Gluténové hydrolyzáty

Zníženie hladiny toxických gluténových epitopov v obilí sa dostáva do popredia ako potencionálny zdroj k diverzifikácii zmyslového i nutričného profilu bezpečkových produktov. V súvislosti s tým stojí tiež poznamenať, že niektoré tímy vedcov [26] publikovali v roku 2014 štúdiu, kde sa zaoberali schopnosťou extraktov z pšenice, jačmeňa a raži účinne hydrolyzovať zásobné proteíny gluténu na netoxickú formu pre pacientov trpiacich celiakiou. Za pozornosť stojí, že použitie hydrolytických enzýmov v spomínanej štúdií bolo vyhodnotené pozitívne. Zakomponovanie hydrolyzáto do bezpečkových receptov stále udržiavalo úroveň prolaminov pod limitmi, ktoré ustanovuje pre bezpečkové produkty Potravinový kódex. Takýto materiál prinesie mimo zlepšenia ekonomických parametrov bezgluténových výrobkov i bohatý zdroj aminokyselín a peptidov, ktoré ako je známe prispievajú k lepším sensorickým a organoleptickým vlastnostiam finálnych výrobkov.

Uvedení autori hydrolyzovali pšeničný glutén pomocou enzýmu Protamex™ (Novozymes) pri pH 4,8 pri teplote 48 °C. Po inaktivácii enzýmu z daného proteolytického hydrolyzátu membránovou ultrafiltráciou (filter s pórmí 50 kDa) separovali dve frakcie (retentáta permeát). Cieľom bolo otestovať vplyv daných frakcií na vlastnosti pšeničnej múky pri pečení chleba. Zistili, že prídavok hydrolyzovaného pšeničného gluténu a jeho frakcií zlepšil viskoelastickú charakteristiku pšeničnej múky, pričom najvýraznejší vplyv na zmenu vlastností mal prídavok retentátu. Prídavok retentátu tiež zvýšil tvrdosť kôrky chleba. Pri chlebe vyrobenom zo pšeničnej múky s prídavkom hydrolyzovaného pšeničného gluténu a permeátu bola kôrka mäkkšia. Na predĺženie trvanlivosti chleba mali priaznivý efekt obidve frakcie. Autor Kognet a kolektív [26] enzymaticky hydrolyzovali glutén niekoľkými komerčne dostupnými peptidázami (Alcalase 2.4L, PTN 6.0S, Pepsin, Pancreatin, Neutrase and Protamex™), pričom porovnávali aj hydrolytický efekt použitých enzýmov.

Nevýhodou aplikácie pšeničného gluténu v potravinárstve je jeho nízka rozpustnosť. Tá je spôsobená vysokou koncentráciou nepolárnych aminokyselinových zvyškov ako sú prolín, leucín a glutamín s nízkou koncentráciou ionizovateľných postranných reťazcov (lyzín, arginín, kyseliny glutámová a asparágová). Enzymatickou úpravou jeho štruktúry je možné získať surovinu s vyššou rozpustnosťou, ako aj ďalšími zlepšenými vlastnosťami [27].

Taktiež gluténové hydrolyzáty sa môžu využiť aj iným spôsobom ako len aplikácia do potravín. Nordqvist [28] vo svojej práci uvádza úspešné použitie gluténového hydrolyzátu ako drevné adhezívum. Takto upravený glutén bol následne modifikovaný formaldehydom alebo glyoxalom a ten následne upravený ďalšími crosslinkermi.

Vzhľadom k tomu, že hydrolytický postup sa preukázal ako veľmi účinný pri znižovaní hladiny lepku v základnej matici obilnín, technologické hodnotenie týchto

hydrolyzátor v potrave a aplikácia pre bezpečkové potraviny si zaslúži ďalšie úsilie a nadobúdanie poznatkov [29].

2.3.3 Proteolytické enzýmy

Proteolytické enzýmy (peptidázy) tvoriace veľkú skupinu enzýmov štiepia dlhé reťazce molekúl proteínov na kratšie fragmenty (peptidy) a/alebo ich komponenty aminokyseliny. Sú fyziologicky a komerčne veľmi dôležitou skupinou enzýmov, ktorá sa zaraďuje do tretej triedy enzýmov – Hydrolázy (EC 3.4.). V závislosti od spôsobu a miesta hydrolýzy sa delia na endopeptidázy a exopeptidázy [23].

Peptidázy zastupujú triedu enzýmov, ktorá má dôležitú úlohu vo fyziologických procesoch organizmov a v súčasnosti patrí do jednej z troch najrozšírenejších komerčne využívaných enzymatických skupín. Až 60 % svetového predaja enzýmov je zastrešených práve proteázami. Jednou z výhod tohto typu enzýmov je možnosť rôznorodého získavania napríklad extrakciou z rastlinných či živočíšnych zdrojov alebo mikrobiálnou produkciou, pričom každá skupina enzýmov je špecifická [30].

Z rastlín sú pre izoláciu peptidáz využívané časti a plody rastlín: *Ananascomosu* (bromelaín), *Caricapapaya* (papaín), *Ficusglabatra* a *Ficuscarica* (ficín).

Enzýmy **živočíšneho pôvodu** (trypsín, chymotrypsín, pepsín, renín) sú získavané z pankreasu jatočných zvierat. Ich obmedzenie je späté s dostupnosťou živočíšneho materiálu. Nevýhodou živočíšnych aj rastlinných peptidáz je ich producent, nakoľko rast a vývoj týchto organizmov je náročnejší v porovnaní s mikrobiálnou produkciou. Preto sú najrozšírenejším zdrojom pre produkciu industriálnych enzýmov mikroorganizmy [31].

➤ Endopeptidázy

Endopeptidázy štiepia peptidové väzby vo vnútri proteínovej štruktúry vzdialenej od konca substrátu. Podľa typu zlúčeniny, ktorá inhibuje ich aktivitu sa delia na serínové, cysteínové, aspartátové, metaloendopeptidázy, treonínové a zatiaľ neklasifikované endopeptidázy [23]. Serínové endopeptidázy sú široko rozšírené v prírode a nachádzajú sa vo všetkých bunkách ako i mnohých vírusových genómoch. Ich katalytické centrum je tvorené serínovým zvyškom, ktorý atakuje karbonylovú časť substrátu za vzniku acyl-enzým medziproduktu. Nukleofilita katalytického serínu je zväčša závislá od katalytickej triády asparagín, histidín a serínových zvyškov [32]. Zúčastňujú sa širokej škály fyziologických procesov organizmu, vrátane trávenia, hemostázy a imunitnej odpovede. Zaraďuje sa k nim trypsín, chymotrypsín, mikrobiálne Ser-peptidázy a alkalické Ser-peptidázy [23].

➤ Cysteínové endopeptidázy

V priebehu vývoja a dozrievania obilných zŕn sa zásobné proteínyhromadia v škrobovom endosperme. Enzýmy zodpovedné za mobilizáciu uložených bielkovín pri klíčení semien sú cysteínové endopeptidázy a serínové karboxypeptidázy. Ako uvádza výskum Prabuckej a kolektívu [33], tento enzým je syntetizovaný priamo v lepku počas klíčenia.

Cysteínové proteázy sú syntetizované ako neaktívne alebo menej aktívne prekurzory, v zložení signálnej N-terminálnej sekvencie, po ktorej nasleduje prosekvenca a sekvencia zrelého enzýmu. Aktivita cysteínových endopeptidáz zapojených do klíčenia sa všeobecne reguluje na dvoch úrovniach. Jedná sa o hormonálnu indukciu syntézy gibberelínov a predpokladanú reguláciu aktivity fytoycystatínov [34], aj keď tento mechanizmus nie je úplne potvrdený. Neexistuje totiž žiadny priamy dôkaz, že odstránenie týchto zložiek vedie k aktivácii proteázy i keď niektoré štúdie ukázali, že nadmerná expresia génu jedného fytoycystatínu nielen znižuje aktivitu endopeptidáz počas klíčenia, ale tiež inhibuje klíčenie ako samotný proces [33].

➤ **Asparágové endopeptidázy**

Asparágová peptidáza sa líši od ostatných peptidáz tým, že nukleofil, ktorý napadá pri štiepení peptidovú väzbu, je aktivovaný molekulou vody skôr, ako postranné reťazce aminokyseliny. Zvyšky, ktoré sa podieľajú na katalýze zahŕňajú aminokyseliny, ktoré pôsobia ako ligandy a to buď priamo na aktivované molekuly vody práve ako asparágová endopeptidáza alebo medzi jedným či dvomi iónmi kovov, ktoré následne viažu molekuly vody.

Pozoruhodným poznatkom pri skúmaní asparágových peptidáz je fakt, že všetky enzýmy, ktoré boli doposiaľ popísané sú endopeptidázy, hoci nie je zatiaľ žiaden zrejmy dôvod, prečo by tento typ katalytického mechanizmu nemal existovať i vo forme exopeptidázy.

Asparágovým peptidázam sú priradené rody AA, AC, AD, AE a AF. Terciárna konštrukcia pre členov klanov AA, AD, AE a AF vykazuje jedinečný proteín, ktorý umožňuje vytvoriť vzťah k akejkoľvek inej peptidáze. Pre klan AC neexistuje doteraz žiadna kryštalická štruktúra, ale aj iné kritériá vyčleňujú jeho rozlišovaciu spôsobilosť od ostatných asparágových rodín [35].

➤ **Metalopeptidázy**

Metalopeptidázy patria medzi hydrolázy, v ktorých je nukleofilný útok na peptidové väzby sprostredkovaný molekulami vody. To je vlastnosť spoločná s asparágovými peptidázami. V metalopeptidázach sa kationmi dvojmocného kovu, zvyčajne zinku ale niekedy aj kobaltu, mangánu, niklu alebo medi, aktivuje molekula vody. Kovové ióny sú držané na mieste ako aminokyselinové ligandy, zvyčajne tri v rade.

Metalopeptidázy možno rozdeliť do dvoch veľkých skupín, v závislosti na počte kovových iónov potrebných pre katalýzu. V mnohých metalopeptidázach je potrebný iba jeden ión zinku, ale v niektorých rodinách sú dva kovové ióny, ktoré pôsobia spoločne. Všetky metalopeptidázy, v ktorých je nevyhnutný kobalt alebo mangán vyžadujú dva ióny kovov. Všetky peptidázy s obsahom niklu vyžadujú iba jeden ión, ale niektoré nepeptidázové homológy majú kokatalytické ióny niklu. V peptidázach s kokatalytickými kovovými iónmi je výskyt aminokyselinových zvyškov zvyčajne päť, pôsobiacich ako ligandy.

Metalopeptidázy s jedným katalytickým kovovým iónom môžu byť aj exopeptidázy aj endopeptidázy [36].

➤ **Exopeptidázy**

Vzhľadom k tomu, že hydrolyzátymajú často horkú chuť, je jedným z atribútov, ktorý môže znížiť tieto negatívne sensorické vlastnosti aplikovanie endopeptidáz [37]. Využitie hydrolyzátov ako funkčných zložiek potravín, môže byť ohrozené odmietnutím zo strany spotrebiteľa pre neakceptovateľnosť cieľového potravinárskeho výrobku. Boli skúmané rôzne spôsoby pre zvýšenie chutnosti bielkovinových hydrolyzátov, ako napríklad odstránenie hydrofóbných peptidov, maskovanie horkej chuti, a zapúzdrenie hydrolyzátov. Liečba exopeptidázami, čo sú enzýmy, ktoré uvoľňujú terminálne aminokyselinové zvyšky z peptidov, je perspektívny metóda, ktorá znižuje horkosť hydrolyzátov bez zníženia výťažku [38].

2.3.3.1 Sladové extrakty

Sladové extrakty predstavujú bohatý zdroj malých molekúl peptidov a aminokyselín, taktiež sú zdrojom vitamínov, minerálov a vlákniny. Prostredníctvom transformácie cez aromatické zlúčeniny ako sú 3-metylbutanal a 2-fenylacetalaldehyd i voľné aminokyseliny ako izoleucín, leucín či fenylalanín zohrávajú významnú úlohu v pečiacom procese, nakoľko mimo priaznivej sladovej príchute prinášajú benefit v podobe enzýmov amyláz, hemiceluláz, lipáz a proteáz, ktoré do istej miery vplývajú na bezpečkové pečenie a zlepšujú tak jeho kvalitatívne aspekty.

Zníženie hladiny toxických gluténových epitopov v obilí sa dostáva do popredia ako potencionálny zdroj k diverzifikácii zmyslového i nutričného profilu bezpečkových produktov. V súvislosti s tým stojí za to poznamenať, že Hartmann [39] a kolektív publikovali v roku 2006 štúdiu, kde sa zaoberali schopnosťou extraktov z pšenice, jačmeňa a raži účinne hydrolyzovať zásobné proteíny gluténu na netoxickú formu pre pacientov trpiacich celiakiou.

Za pozornosť stojí, že použitie hydrolytických enzýmov v spomínanej štúdií bolo vyhodnotené pozitívne, zakomponovanie hydrolyzátov do bezpečkových receptov stále udržiavalo úroveň prolaminov pod limitmi, ktoré ustanovuje pre bezpečkové produkty Potravinový kódex. Takýto materiál prinesie mimo zlepšenia ekonomických parametrov bezgluténových výrobkov i bohatý zdroj aminokyselín a peptidov, ktoré ako je známe prispievajú k lepším sensorickým a organoleptickým vlastnostiam finálnych výrobkov.

Vzhľadom k tomu, že hydrolytický postup sa preukázal ako veľmi účinný pri znižovaní hladiny lepku v základnej matici obilnín, technologické hodnotenie týchto hydrolyzátov v potrave a aplikácia pre bezpečkové potraviny si zaslúži ďalšie úsilie a nadobúdanie poznatkov [40].

2.3.4 Faktory ovplyvňujúce hydrolyzu, metódy zisťovania stupňa hydrolyzy

Enzymová hydrolyza je podmienená špecificitou použitého enzýmu a faktormi, ktoré celý proces podmieňujú. Nižšie sú uvedené dominantné faktory ovplyvňujúce samotný priebeh hydrolyzy [41]

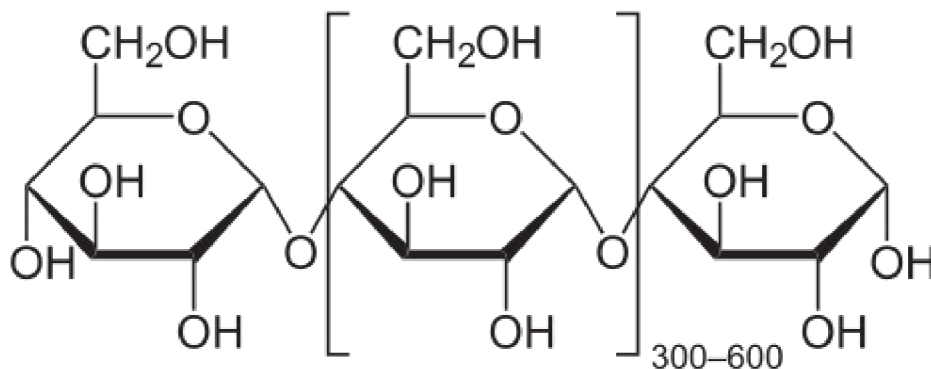
- Koncentrácia substrátu a pomer enzýmu k substrátu;
- Rozmanitosť reakcií, množstvo peptidových väzieb narušených paralelne i v sekvenciách súčasne;
- Rôznorodosť reakčných komponentov, peptidové fragmenty sú ako produkty, tak aj reaktanty pre nasledujúce reakcie;
- Komplexnosť reakčnej skupiny, existencia substrátovej inhibície, produktovej diverzity a enzýmovej inaktivácie počas hydrolýz;
- Exogénne vplyvy vrátane : pH, teplota, iónová sila a ďalšie.

2.4 Enzýmová hydrolýza škrobu

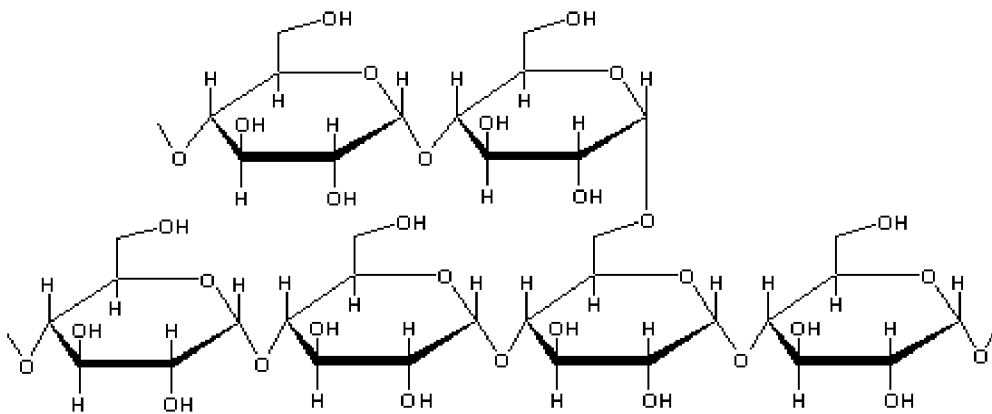
Základná chemická reakcia inak nazývaná hydrolýza škrobu, prebieha pri dostatočnom zriedení a účinku katalyzátorov (amyláz) a zapríčiňuje tak kvantitatívny prechod škrobu na D-(+)-glukózu (α -D-glukopyranózu) podľa rovnice



Dva vzniknuté polysacharidy – amylóza a amylopektín, ktoré sú získavané frakcionáciou škrobu, sú od seba odlišené stavbou a charakterom väzieb medzi glukózovými zvyškami, čo je možné vidieť na Obrázok 5 a 6.



Obrázok 5: Vzorec amylózy



Obrázok 6: Vzorec amylopektínu

V molekule škrobu sú prítomné zvyšky glukózy spojené α -glukozidovými väzbami. Na začiatku hydrolýzy škrob prejavuje veľmi slabú redukčnú schopnosť. V produktoch hydrolýzy škrobu sa nachádza malé množstvo látok neuhlíkatého pôvodu. Ide o prímiesy, ktoré nemožno z produktu pri izolácii škrobu odstrániť. V hydrolyzátoch mimo iného možno nájsť i mastné kyseliny, dusíkaté látky či anorganické ióny [42].

➤ α -amylázy

Komplexné sacharidy sú odporúčané ako minimálne 50 % príjem energie prostredníctvom ľudskej potravy [43]. Hlavným zdrojom stráviteľného cukru v ľudskej potrave je škrob. Amylóza v podstate lineárny polymér z α - (1 \rightarrow 4) reťazcov a amylopektín, veľká rozvetvená molekula obsahujúca reťazce α - (1 \rightarrow 4) spojené α - (1 \rightarrow 6) bodmi vetvenia. Po požití, α - (1 \rightarrow 4) väzby sa hydrolyzujú α -amylázy na výrobu prevažne maltózy, maltotriózy a dextrínov, ktoré sú potom hydrolyzujú na glukózu. Povrch škrobových zŕn je počiatočným substrátom pre amylázy. Mikroskopia atomárnych síl (AFM) naznačuje, že tzv blockletové štruktúry, ktoré sa menia značne medzi rôznymi typmi škrobu sú dominantné organizačné funkcie na povrchu škrobových granúl. Blocklety sú kryštalické oblasti amylopektínu (AP), prerušované bočnými reťazcami a je pravdepodobné, že ide o dôležité body pre čo najefektívnejšiu hydrolýzu prostredníctvom enzýmu [44].

V biologických reakciách, ako je fermentácia, kličenie alebo štiepenie sú α -amylázy veľmi dôležité, ale tiež široko uplatňované napr. v priemysle na výrobu glukózových sirupov či načinnosti zabraňujúce procesom zvetrávania v pečive.

Natívny škrob je vo vode pri izbovej teplote nerozpustný, preto sa mnoho aplikácií amyláz vykonáva pri vysokej teplote a tlaku, za ktorých je škrob želatinovaný. V priebehu tvorby gélu sú granulová architektúra a molekulárne usporiadanie (dvojzovitnice) granúl škrobu

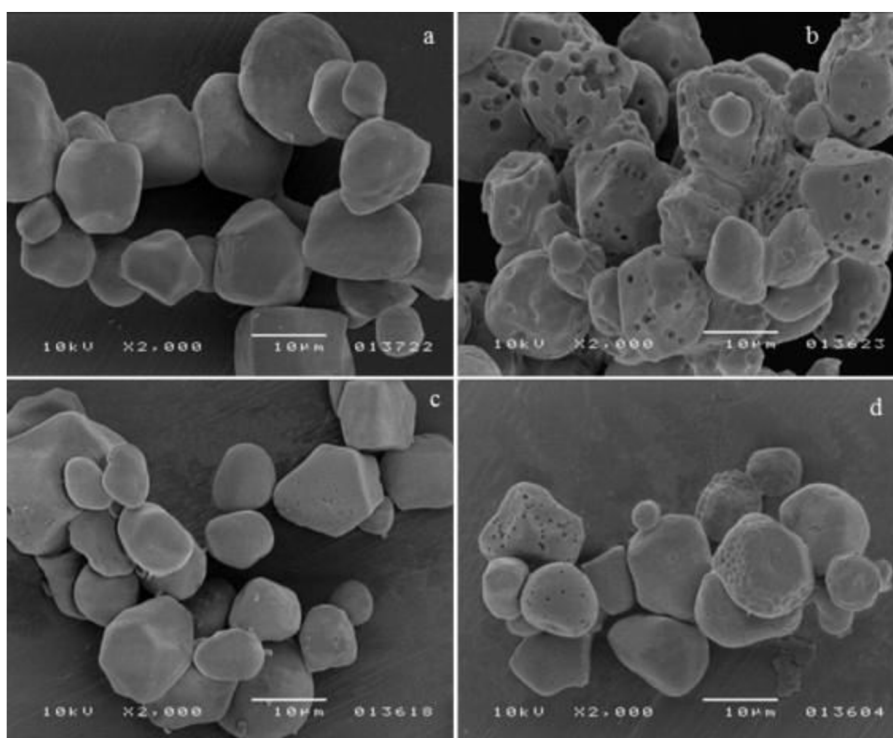
narušené. Táto zmena skupenstva je známa tým, že zvyšuje citlivosť na enzymatickú hydrolýzu škrobu [45].

Naopak, hydrolýza pevných substrátov obsahujúcich škrob silne závisí na štruktúre škrobu a na zdroji amylázy. Morfológia a povrch granúl, obsah amylózy, kryštalická štruktúra alebo prítomnosť amylózy boli vyhodnotené ako obmedzujúce faktory pri hydrolýze granúl škrobu [46].

➤ Amyloglukozidázy

Amyloglukozidáza (AMG) je exo-pôsobiaci enzým, ktorý katalyzuje hydrolýzu ako α -D- (1 → 4) tak aj α -D- (1 → 6) väzbu z neredukujúcich koncov škrobového reťazca. Mnoho vedcov skúmalo enzymatickú hydrolýzu škrobov z obilnín, koreňov, hľúz a strukovín z hľadiska adsorpcie enzýmu a produktov hydrolýzy [47].

Rýchlosť hydrolýzy závisí od typu väzby, rovnako ako aj od dĺžky reťazca, tj, 1,4-alfa väzby sú hydrolyzované ľahšie než 1,6-alfa väzby, a maltotrióza a maltóza sú rozdelené na menšie rýchlojšie, než dlhšie reťazce oligosacharidov. AMG má optimálnu hodnotu pH asi 4,0 a teplotné optimum 55 - 75 ° C.



Obrázok 7: Skenovanie škrobu elektrónovým mikroskopom opracovaným enzymaticky (B a D) a ich náprotivkami kontrolami (A a C). Zväčšenie je 2000 ×. Kontrola pH 4 (a); AMG (b); Kontrola pH 6 (c); AM (d).

Ako bolo zistené výskumom Dura a kolektívu [47] enzymatické pôsobenie amyláz a amyloglukozidáz spôsobuje výrazné zmeny v štruktúre škrobu. Obrázok 6 názorne zobrazuje pôsobenie jednotlivých typov enzýmov na škrobovú maticu.

Je zrejmé, že enzymatická úprava škrobu vykonávaná nezávisle na sebe s α -amylázou alebo amyloglukozidázou za optimálnych podmienok, pH 6,0 pre α -amylázu a 4,0 pre amyloglukozidázu v porovnaní so vzorkami bez enzymatického opracovania, má významný dosah na zmenu škrobovej matrice. Výsledky odrážajú vplyv pH a enzýmy na vlastnostiach škrobu po ošetrovaní pri teplote (50 - 55 °C). Bolo zistené, že 50 °C je najvhodnejšia teplota pre získanie porézneho škrobu v kombinácii pôsobenia AM a AMG. Taktiež, že táto teplota bola užitočná pre udržanie hydrolýzy pod kontrolou, čiže bráni zráteniu a zániku granúl, ktoré sa vytvárajú v priebehu želatinácie.

3 CIELE PRÁCE

Zníženie hladiny toxických gluténových epitopov v obilí sa dostáva do popredia ako potencionálny zdroj k diverzifikácii zmyslového i nutričného profilu bezpečných produktov. Z tohto dôvodu takýto materiál by mohol priniesť mimo zlepšenia ekonomických parametrov bezgluténových výrobkov i bohatý zdroj aminokyselín a peptidov, ktoré ako je známe, prispievajú k lepším sensorickým a organoleptickým vlastnostiam finálnych výrobkov. Tieto skutočnosti ako aj už vedecká literatúra iniciovali vznik predkladanej diplomovej práce, ktorej ciele sú zhrnuté do nasledovných bodov:

- Príprava sterilizátu vhodného na enzýmovú hydrolýzu.
- Fyzikálna a chemická charakteristika pšeničnej múky a jej sterilizátu.
- Stanovenie základných nutričných charakteristík pšeničnej múky a jej sterilizátu.
- Analýza vybraných funkčných vlastností pšeničnej múky a jej sterilizátu.
- Účinná hydrolýza škrobu na dextríny resp. redukujúce monosacharidy v sterilizáte vybranými amylázami.
- Selekcia vhodných proteáz pre úspešnú hydrolýzu gluténu v sterilizáte.
- Stanovenie obsahu gluténu v hydrolyzátoch kitom ELISA.
- Výber a nutričná charakteristika bezgluténového hydrolyzátu.
- Pekárske zapracovanie vybraného hydrolyzátu.
- Sensorická analýza pripraveného chleba s prídavkom hydrolyzátu.

4 MATERIÁL A METÓDY

4.1 Použité suroviny

Jednou z hlavných snáh ako v potravinárskom tak i mlynskom priemysle je, aby sa pre každý produkt dosiahla kvalita, ktorá bude vnímaná spotrebiteľom ako konštantná. Tento cieľ však nie je ľahké dosiahnuť, vzhľadom k vnútornej variabilite múky, ktorá môže závisieť od niekoľkých faktorov. Po každom zbere, prichádza múka s vysokou variabilitou z hľadiska reologických parametrov, ktoré môžu závisieť ako od odrody pšenice, klimatických podmienok, tak v neposlednom rade techniky zberu.

Z týchto dôvodov sme si pre naše testovanie zvolili ako vstupnú surovinu pšeničnú múku T 512 z mlyna (Mlyn Trenčan spol. s. r.o., Trenčianska Turná, Slovensko).

4.2 Použité enzýmy

Na prípravu hydrolyzátov boli použité nasledovné enzýmy.

Enzymesupplies, Veľká Británia

Amyláza: Amylase MT-3K

glukoamyláza: Glucoamylase 200K

proteáza: Protease CT-L

celulóza: CellulaseACx 3000L

Senson, Fínsko

sladové extrakty: Malt Extract GF

Novozymes, Dánsko

proteáza : Flavourzyme

amyláza: Fungamyl

Biocatalyst, Veľká Británia

proteáza: Fungal Protease, Neutral Protease

4.3 Použité chemikálie

Sigma Aldrich, Nemecko

dinitrosalicilová kyselina, heptahydrátsíranu zinočnatého, hexakynoželeznatán draselný

MikroChem, Pezinok, Slovensko

NaOH, vínán sodno-draselný,

Brenntag, Pezinok, Slovensko

Etanol, HCl, NaOH,

4.4 Použité prístroje a pomôcky

- analytické váhy (Merci, Kanada)
- predvážky (Kern, Nemecko)
- termostat (Merci, Kanada)
- sušiareň (Memmert, Nemecko)
- mikropipety (Eppendorf, Nemecko)
- teplomer (Testo, Nemecko)
- pH meter (Hach, Nemecko)
- tlakový hrniec (Tescoma, Slovensko)
- vortex (Heidolph, Nemecko)
- muflová pec (LAC, Česká republika)
- aw meter Novasina (Labmaster Standard, Švajčiarsko)
- domáca pekáreň MOULINEX OW 610131 HomeBreadBaguette (Francúzsko)

4.5 Použité roztoky

V rámci všetkých stanovení boli použité nasledovné roztoky:

Carrezovo činidlo I

ZnSO ₄ ·7H ₂ O	204,3 g
voda	1000 ml

Carrezovo činidlo II

K ₄ Fe(CN) ₆ ·3H ₂ O	150 g
voda	1000 ml

Príprava DNS reagentu

3,5-dinitrosalicilová kyselina (DNS)	1 g
2 M NaOH	20 ml
vínan sodno-draselný	30 g

DNS sme rozpustili v 20 ml 2 M NaOH a následne zriedili do 50 ml destilovanou vodou. Pridali sme 30 g vínanu sodno-draselného a doplnili vodou na 100 ml.

4.6 Metódy a postupy

Nasledujúca časť diplomovej práce je venovaná experimentálnemu riešeniu danej problematiky. V stati sú uvedené metódy použité pri stanovení chemického, nutričného zloženia pšeničnej múky a jej sterilizátu a taktiež postupy stanovenia reologických parametrov cesta pripraveného z hydrolyzátu. Taktiež kapitola popisuje priebeh hydrolyz ako príslušnými amylázami tak i proteázami. Záverečná časť je venovaná metodickým operáciám použitým pri pokusnom pečení a hodnotení hotových výrobkov.

4.6.1 Príprava suspenzie

Na hydrolyzu pšeničnej múky boli pripravené jej suspenzie a to v koncentracii 10, 20, 30, 40 a 50 %. Suspenzia bola zarobená nasledovným spôsobom. Pripravil sa vodný roztok múky v príslušnej koncentrácii, ktorý sa nechal sterilizovať v tlakovom hrnci po dobu 20 minút. Po vychladnutí sa zhodnotila konzistencia pripravených suspenzií. Na následné hydrolyzy bola vybratá suspenzia pre nás optimálnou konzistenciou.

Pred enzýmovou hydrolyzou bolo na múke ako i sterilizáte urobené ich základné ocharakterizovanie zahrňujúce stanovenie sušiny, popola, vlhkosti, pH, titrovateľných kyselín, obsahu mokrého gluténu a väznosti múky. Taktiež boli analyzované základné nutričné parametre a reológia a v závere uskutočnené pekárske pokusy.

4.6.2 Ocharakterizovanie pšeničnej múky a jej sterilizátu

4.6.2.1 Stanovenie sušiny

Vysušené misky s viečkom sa sušili 30 minút pri teplote 130 °C - po vychladnutí v exikátore (30 minút) sa odvážili misky s presnosťou na 0,001 g - s rovnakou presnosťou sa navážilo do vysušených misiek asi 5 g dôkladne premiešanej, predsušenej laboratórnej vzorky, ktorá sa umiestnila do súvislej vrstvy na dno misky. Miska s odklopeným viečkom sa následne vložila do vopred na 130 °C vyhriatej sušiarne, ponechala sa tam 60 minút. Po uplynutí tejto doby sa miska ešte v sušiarne uzavrela viečkom a premiestnila do exikátora na dobu 30 minút. Po vychladnutí misiek na laboratórnu teplotu sa opäť zväžili spolu so vzorkou s presnosťou na 0,001 g.

Výpočet sušiny predsušenej vzorky:

Hmotnostný podiel sušiny predsušenej vzorky v % (ω) sa vypočíta podľa vzorca:

$$\omega = (m_1 - m_2) \cdot 100 \quad (6) \quad n$$

m_1 – hmotnosť misky so vzorkou po vysušení pri 130 °C v g

m_2 – hmotnosť suchej prázdnej misky v g n – navážka predsušenej vzorky v g.

2 Výpočet celkovej vlhkosti pôvodnej vzorky v % (χ) sa vypočíta podľa vzorca:

$$\chi = 100 - m \cdot \omega \quad (7) \quad 100$$

m- hmotnosť vzorky po predsušení v g (z pôvodného návažku 100g)

ω - množstvo sušiny predsušenej vzorky v %.

4.6.2.2 Stanovenie pH

10 g vzorky sa rozsuspendovalo v 100 ml destilovanej vody a na pH metri sa zmerala hodnota pH.

4.6.2.3 Stanovenie titrovateľných kyselín

Vzorka (10 g) sa zriedila destilovanou vodou a doplnila do odmernej banky na objem 100 ml, následne sa premiešala. Alikvotný objem (10 ml) sa odobral pipetou, prefiltraval a napipetoval do titračnej banky. Následne sa zmes titrovala 0,1 M roztokom NaOH do slaboružového zafarbenia. Pracovalo sa v troch paralelkách.

Výpočet:

$$w_k = r \cdot K \cdot V_a \cdot b \cdot 10/m$$

w_k - titračná kyslosť sa v %

V_a - spotreba NaOH (ml)

r- stupeň riedenia

K- koeficient odmerného roztoku NaOH

b- prepočítavací faktor na organické kyseliny

4.6.2.4 Stanovenie obsahu mokrého gluténu

Hmotnosť vzorky (10 g) sa vsype na sklíčko, pridá sa 4 - 5 ml 2% roztoku NaCl. Pripraví sa guľička, ktorá sa následne vypiera pod prúdom tečúcej vody, pokým nie je odtekajúca voda číra. Glutén sa zbaví prebytočnej vody hnetením a vymačkáva sa dotedy pokým sa nezačne lepíť. Následne sa zvaží.

Výpočet:

$$G_0 = [(a \cdot 100) / (100 - b)] \cdot n \quad (\%)$$

G_0 - obsah mokrého gluténusa vyjadří v %

a - množstvo vypraného gluténu

b - vlhkosť

n – návažok (g)

4.6.2.5 Stanovenie väznosti múky

Táto metóda vyjadruje schopnosť múky prijať určité množstvo vody pri vytváraní cesta optimálnej konzistencie, pričom optimum je stanovené pri pšeničnej múke na cca 50 %. K návažku 10 g múky sa biretou postupne pridáva voda, kým sa nezíska kompaktné cesto optimálnej konzistencie. Zaznamenáva sa spotreba vody a hmotnosť cesta, ktoré sa porovnávajú s dostupnou literatúrou.

4.6.2.6 Stanovenie popola

Do vyžíhanej, v exikátore schladenej a zvaženej porcelánovej misky sa navážili 3 g jemne zomletej vzorky. Obsah misky sa opatrne zuhoľnil a po ukončení vývoja dymu sa misky vložili do elektrickej muflovej pece a žihali pri teplote 920 °C do úplného spopolnenia vzorky. Potom sa miska ochladila v exikátore a zvažila.

Výpočet:

$$X = 100 \times A/n$$

X = obsah popola v %

A – hmotnosť popola v g

n – návažok vzorky v g

4.6.3 Základné nutričné charakteristiky pšeničnej múky a jej sterilizátu

4.6.3.1 Stanovenie obsahu bielkovín

Obsah bielkovín bol stanovený metódou podľa Kjeldahla. 0,5 g vzorky sa nechalo mineralizovať. Mineralizát sa po ochladení destiloval a vznikajúci amoniak sa zachytával do titračnej banky s 25 ml 2 % kyseliny boritej s indikátorom Tashiro (fialové sfarbenie). Destilát sa nakoniec titroval 0,01M H₂SO₄ do cyklámenova.

Výpočet:

$$\text{Množstvo dusíka (\%)} = \frac{(V1-V2) \times f \times 0,01 \times 14 \times V3 \cdot 100 \cdot 10^{-3}}{n \times V4}$$

V1 – spotreba kyseliny sírovej na titráciu

V2 – spotreba kyseliny sírovej na filtračný papier

V3 – objem mineralizátu

V4 – objem vzorky pipetovaný na destiláciu

n – návažok vzorky (g)

f – faktor H₂SO₄

4.6.3.2 Stanovenie obsahu tuku

Obsah tuku sa stanovil metódou podľa Soxhleta. 5 g vzorky sa odvážilo do extrakčnej patróny a do vopred zváženej banky sa pridalo 250 ml dietyléteri. Vzorka sa nechala extrahovať po dobu 4 hod. Po skončení extrakcie sa dietyléter v banke oddestiloval a banka sa dosušila v sušiarňi pri 105 °C do konštantného úbytku a po ochladení v exikátore sa odvážila.

Výpočet:

$$X = \frac{100x(b-a)}{n}$$

X – obsah tuku (%)

a – hmotnosť prázdnej banky v g

b – hmotnosť banky s vyextrahovaným tukom v g

n – návažok vzorky v g

4.6.3.3 Stanovenie škrobu

Obsahu škrobu bol stanovený metódou podľa Ewersa. Do 100 ml odmernej banky sa navážilo 5 g jemne pomletej vzorky, pridalo sa 50 ml zriedenej HCl (1,128 % pre obilný škrob). Obsah banky sa dôkladne premiešal a umiestnil do vriaceho kúpeľa, kde sa miešal po dobu 3 minút. Po 15 minútach sa banka vybrala z kúpeľa, pridalo sa 30 ml studenej destilovanej vody a zmes sa ihneď ochladila. Po ochladení sa pridalo 5 ml Carezovho činidla I a zmes sa 1 minútu miešala. Následne sa pridalo 5 ml Carezovho činidla II a obsah sa miešal opäť 1 minútu. Po vyčírení sa odmerná banka doplnila destilovanou vodou na objem 100 ml, zmes sa dôkladne premiešala a nechala stáť 25 minút pri laboratórnej teplote. Následne sa obsah banky prefiltroval cez skladaný filter, pričom prvý filtrát sa odstránil. Filtrát polarizoval v polarizačnej trubici s dĺžkou 20 cm pri 20 °C.

Výpočet:

$$\text{škrob} = 5,4171 \times \alpha_1 \quad (\%)$$

α_1 – uhol natočenia pri T = 20°C

korekcia na špecificky aktívne látky – 5,4171 (pšenica)

4.6.3.4 Stanovenie redukujúcich sacharidov spektrofotometricky metódou DNS

Na analýzu sa pipetovalo 0,5 ml vzorky, 0,5 ml DNS reagentu a zmes sa nechala inkubovať 5 minút vo vriacom vodnom kúpeli. Po vybratí z kúpeľa sa zmes nechala na vzduchu ochladiť. Po ochladení sa pridalo 2 ml vody a zmerala absorbancia pri 540 nm.

4.6.4 Reológia pšeničnej múky a jej sterilizátu

Vlastnosti sacharido-amylázového komplexu boli stanovené použitím amylografu 6 (Amylograph-E, ICC štandardná metóda 126/1). Pre nedostatok času neboli metódy farinografickej a extenzografickej analýzy modifikované pre sterilizát.

Amylografické merania, pre ktoré bol využívaný prístroj Amylograf (BrabenderOhG, Duisburg, Germany). Ide o reologický prístroj, ktorým je možné charakterizovať amylolytickú aktivitu vo vzorke múky, ako aj poškodenie škrobu. Využitím tohto zariadenia je možné sledovať kvalitatívnu zmenu škrobovej matrice. Amylogram poskytuje informáciu o škrobnatej časti múky, ktorá môže byť viac či menej porušená činnosťou enzýmov alebo mechanickým spôsobom. Pri meraní, teplota počas testu narastá o 1,5 °C za každú minútu. Meranie odporu suspenzie a vznikajúceho gélu sa premieta na os y v amylografických jednotkách [AJ]. Fyzikálne sa jedná o meranie krútiaceho momentu [N.m], ktorý sa mení v závislosti od meniacej sa konzistencie vzorky počas testu.

4.6.5 Hydrolýza

4.6.5.1 Hydrolýza škrobu

Suspensia z pšeničnej múky a vody, pripravená v pomere 1:4 v prospech vody, bola po procese sterilizácie vychladená na laboratórnu teplotu. Následne sa zmeralo pH a zmes sa nechala vytemperovať na teplotu 55 °C. Po dosiahnutí teploty sa nadávkoval enzymatický preparát v danej koncentrácii a celá hmota bola zhomogenizovaná tyčovým mixérom po dobu 1 minúty. Následne sa pripravená zmes umiestnila do termostatu vytemperovaného na 55 °C. Hydrolýza sa ukončila zahriatím zmesi pri teplote 100 °C po dobu 15 min. Miera hydrolýzy škrobu sa vyhodnotila stanovením škrobu podľa Ewersa a redukujúcich sacharidov DNS metódou.

4.6.5.2 Hydrolýza gluténu

Pripravená suspenzia sa nechala hydrolyzovať vybranými amylázami podľa postupu uvedeného v predchádzajúcej podkapitole (4.6.5.1 Hydrolýza škrobu). Po uplynutí hydrolýzy (4 hod) sa enzýmy inaktivovali pri teplote 100 °C po dobu 15 min. Následne sa hydrolyzát nechal ochladiť na laboratórnu teplotu (25 °C) a upravilo sa pH. Takto pripravená zmes sa nechala vytemperovať na teplotu 60 °C. Po dosiahnutí teploty sa nadávkoval enzymatický preparát v danej koncentrácii a celá hmota bola zhomogenizovaná tyčovým mixérom po dobu 1 minúty. Následne sa pripravená zmes umiestnila do termostatu vytemperovaného na 60 °C. Hydrolýza sa ukončila zahriatím zmesi pri teplote 100 °C po dobu 15 min. Miera hydrolýzy gluténu sa vyhodnotila stanovením gluténu pomocou gliadin competitive ELISA kitom.

4.6.6 Pekárske pokusy

Pokusné pečenie za presne definovaných podmienok poskytuje najkomplexnejší prehľad o pekárskej kvalite múky a ďalších zložiek cesta a dáva možnosť posúdenia vplyvu

receptúrnych zložiek na vlastnosti finálneho výrobku. Boli pripravené skúšobné bochníky chleba z bezlepkovej múky a prídavku rôznych koncentrácií hydrolyzovaného prípravku (Tabuľka 1). Základné receptúry a aditíva na prípravu cesta boli chlebová bezlepková zmes, hydrolyzovaný prípravok s obsahom gluténu menej ako 20 ppm, voda, olej, ocot a droždie.

Tabuľka 1: Zloženie zmesí pre pekársky pokus s použitím rôznych pomerov hydrolyzátu

zložky	K	1	2	3
chlebová BZL zmes [g]	450	400	375	350
hydrolyzáat [g]	0	50	75	100
voda [g]	400	360	340	320
droždie [g]	7	7	7	7
kvasný ocot [g]	10	10	10	10
repkový olej [g]	15	15	15	15

4.6.6.1 Technologický postup prípravy chlebov

Na spracovanie všetkých surovín pre pekárske účely bola použitá automatická domáca pekáreň značky MOULINEX OW 610131 HomeBreadBaguette. Miesenie trvalo 20 minút, cesto zrelo 30 minút, následne prístroj opätovne cesto premiesil a kyslo ďalších 15 minút. Príprava samotného chleba trvala 2 hodiny a 5 minút, pričom program bol nastavený na silnejšie pečenie, čo predĺžilo čas pečenia o 10 minút.

4.6.6.2 Stanovenie aktivity vody v pekárskom výrobku

Nádoby na stanovenie aktivity vody sa naplnili do jednej tretiny vypečeným výrobkom obsahujúcim rôznym pomer hydrolyzátu a zakryli sa ochranným viečkom. Po temperácii prístroja na 25 °C (a_w meter Novasina Labmaster Standard, Švajčiarsko) a taktiež vorky, bola zameraná aktivita vody. Výsledná hodnota je priemerom troch paralelných meraní.

4.6.7 Senzorické hodnotenie výrobkov

Hlavným cieľom senzorického hodnotenia bolo zistiť prijateľnosť pripraveného hydrolyzátu v tradičnom pekárskom výrobku určenom pre aplikáciu v bezgluténovej diéte. Posudzované boli 3 vzorky s rôznym prídavkom hydrolyzátu pšeničnej múky s obsahom gluténu pod 20 ppm a tiež kontrolná vzorka K. Ich receptúry sú popísané v podkapitole 4.6.6 Pekárske pokusy. Hodnotenia sa zúčastnilo 30 hodnotiteľov (5 mužov a 25 žien vo veku od 24 do 73 rokov), reprezentujúcich skupinu potencionálnych spotrebiteľov. Jedna časť posudzovateľov pochádzala z pracoviska Ústavu výživy a hodnotenia potravín FCHPT STU v Bratislave a druhá časť reprezentovala pacientov s ochorením celiakia. Vzorky boli hodnotiteľom predložené pod kódmi (1, 2, 3, K). Senzorický test bol vytvorený a modifikovaný podľa typu chleba a pozostával zo siedmych častí. Posudzovatelia hodnotili tvar, celkovú kvalitu výrobkov a iné parametre. Vzorky boli hodnotené hedonicky z hľadiska chutnosti a s ohľadom na textúru. Bola posudzovaná taktiež prijateľnosť vybraných deskriptov vône a chuti pripravených chlebov. Ukážka protokolov senzorického hodnotenia formou dotazníkov je uvedená v Prílohe 1.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

V nasledujúcej časti diplomovej práce sú uvedené výsledky, ktoré boli získané počas riešenia danej problematiky, a sú tiež diskutované s relevantnými literárnymi poznatkami.

Úvodná podkapitola poskytuje informácie o zložení chemických a nutričných komponentov ako vo vybranej pšeničnej múke, tak i pripravenom sterilizáte. Časť práce je taktiež zameraná na vývoj hydrolyzovaného prípravku obsahujúceho množstvo gluténu pod 20 ppm, ktorý bol v ďalšom kroku použitý na prípravu chleba. Pozornosť bola venovaná aj reologickým meraniam chlebového cesta vykonaným pomocou farinografickej, extenzografickej i amylografickej analýzy. V kapitole sú na záver uvedené výsledky senzorického hodnotenia upečených bochníkov chleba a charakterizácii ich kvalitatívnych vlastností.

5.1 Charakteristika pšeničnej múky a jej sterilizátu

Základné ocharakterizovanie natívnej pšeničnej múky T512 a jej suspenzie s vodou, ktorá bola taktiež ošetrená procesom sterilizácie bolo nevyhnutné pre potvrdenie či vyvrátenie poznatkov nadobudnutých od Bell a kolektív [48]. Daní autori poukazujú na skutočnosť, že tepelné ošetrenie a teda aplikovanie fyzikálnych metód na opracovanie suspenzií má pozitívny vplyv na fyzikálno-chemické a taktiež nutričné parametre. Pri tomto kroku dochádza zároveň k tepelnej degradácii škrobu, čoho výsledkom je tvorba redukujúcich sacharidov a dextrínov. Percentuálny rozdiel medzi štandardom, čiže natívnou pšeničnou múkou T512 a jej sterilizátom je uvedený v Tabuľka 2.

Tabuľka 2: Fyzikálne a chemické parameter pšeničnej múky a jej sterilizátu

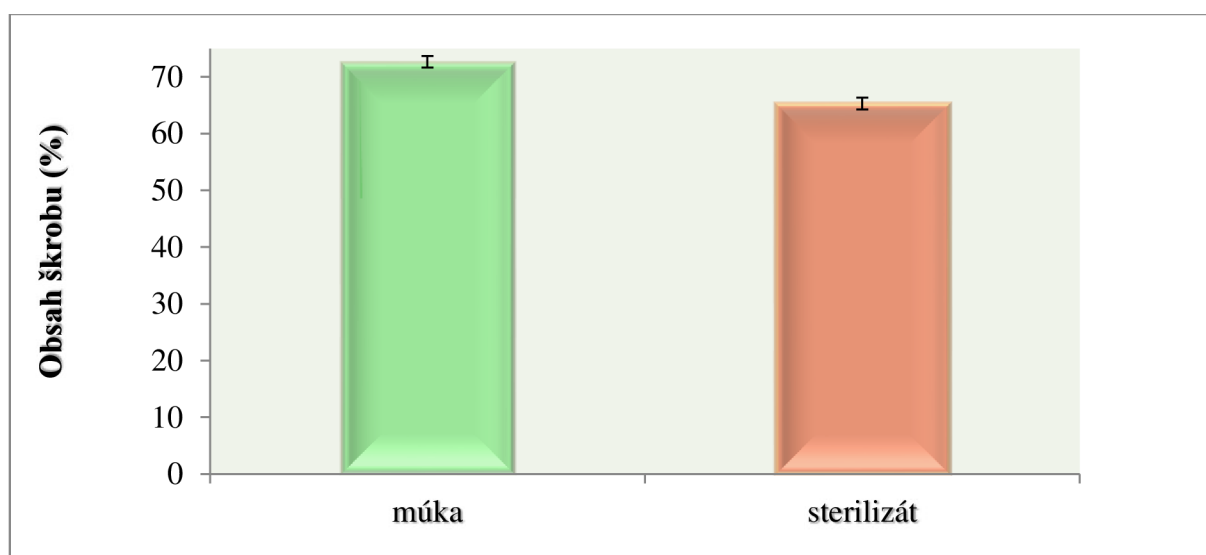
	<i>múka T512</i>	<i>sterilizát</i>
<i>Sušina (%)</i>	88,60 ± 0,062	93,69 ± 0,039
<i>pH</i>	6,20 ± 0,049	6,45 ± 0,001
<i>Titrovateľné kyseliny [mol/g]</i>	50,76 ± 2,306	26,99 ± 2,485
<i>Obsah mokrého lepku(%)</i>	26,86 ± 1,343	23,80 ± 1,190

Ako je možné vidieť v tabuľke 2 sterilizácia nemala výrazný vplyv na zmenu obsahu mokrého lepku, avšak množstvo titrovateľných kyselín sa týmto technologickým procesom značne znížilo, v dôsledku čoho došlo k zvýšeniu konečného pH sterilizátu.

5.2 Stanovenie základných nutričných charakteristík pšeničnej múky a jej sterilizátu

Cieľom tejto experimentálnej časti práce bolo stanoviť celkový obsah nutričných zložiek (škrob, redukujúce sacharidy, tuky a bielkoviny) v použitej pšeničnej múke a porovnať ich s nameranými hodnotami v sterilizáte.

Najväčší podiel obilného zrna tvoria sacharidy, z ktorých podstatnú časť zastupuje škrob. V pšeničnom zrne škrob slúži ako zdroj energie pre fyziologické procesy. Obsah tohto nutričného parametra bol v pšeničnej múke 72,65 %. Ako naznačuje obr. 1 sterilizácia nemala výrazný vplyv na obsah škrobu vo vzorke, čo potvrdzuje taktiež práca Grausgruber a kolektív [49]. V sterilizáte klesol jeho obsah oproti pšeničnej múke o 10 %.



Obrázok 8: Obsah škrobu nameraný pri pšeničnej múke T512 a jej sterilizáte. Výsledky vyjadrujú priemerné hodnoty minimálne troch meraní ($SD \leq 5\%$).

Avšak sterilizáciou došlo k nárastu obsahu redukujúcich sacharidov (3,7 násobne vyšší obsah redukujúcich cukrov v sterilizáte oproti pšeničnej múke), čo je možné vidieť v Tab. 3.

Tabuľka 3: Stanovenie redukujúcich sacharidov v pšeničnej múke a jej sterilizáte

	múka T512	sterilizát
Red. Sacharidy (%)	1,46 ± 0,0002	5,46 ± 0,0002

Bielkoviny, ktoré sa v zrne nachádzajú, sú dôležitým determinantom technologickej kvality a zároveň sú významným faktorom vo výžive obyvateľstva [50] na kvalitu konzumného obilia sú uvedené v potravinovom kódexe, kde minimálne množstvo bielkovín je limitované 11%. Tak ako je vidieť z tabuľky 4 tento aspekt bol splnený ako v prípade pšeničnej múky (13,2 %) tak i sterilizáte (12,6%).

Tabuľka 4: Prehľad obsahu nutričných zložiek bielkovín a tuku v pšeničnej múke a sterilizátu. Výsledky vyjadrujú priemerné hodnoty minimálne troch meraní ($SD \leq 5\%$).

	<i>múka T512</i>	<i>sterilizát</i>
<i>Bielkoviny(%)</i>	13,13± 0,109	12,60 ± 0,067
<i>Tuky (%)</i>	1,23± 0,065	0,34± 0,020

Na druhej strane sterilizáciou prišlo k viacnásobnému zníženiu tuku v sterilizáte (tabuľka), čo koreluje so získanými poznatkami, ktoré uvádza Wang a kolektív [51]. Ako uvádza Stuper-Szablewska a kolektív [52] obsah tuku varírujev pšeničných zrnách okolo 1,9%. Ani pri natívnej pšeničnej múke sa nepodarilo preukázať obdobnú hodnotu. Koncentrácia tukov však sa môže odlišovať podľa odrody, čomu sa pripísal i tento nameraný rozdiel [50].

5.2.2 Stanovenie vybraných funkčných vlastností pšeničnej múky a jej sterilizátu

Samostatnú analytickú skupinu tvoria metódy, ktoré sa nezaoberajú posudzovaním jednotlivých zložiek múky, ale posudzujú múku ako komplex [53]. K takýmto metódam sa zaraďuje väznosť múky a výtťažnosť cesta.

Tabuľka 5: Vybrané funkčné vlastnosti pšeničnej múky a jej sterilizátu

	<i>múka</i>	<i>sterilizát</i>
<i>Väznosť múky (%)</i>	52,75 ± 0,627	66,19 ± 0,167
<i>Výtťažnosť cesta (%)</i>	66,75 ± 0,627	84,19 ± 0,834

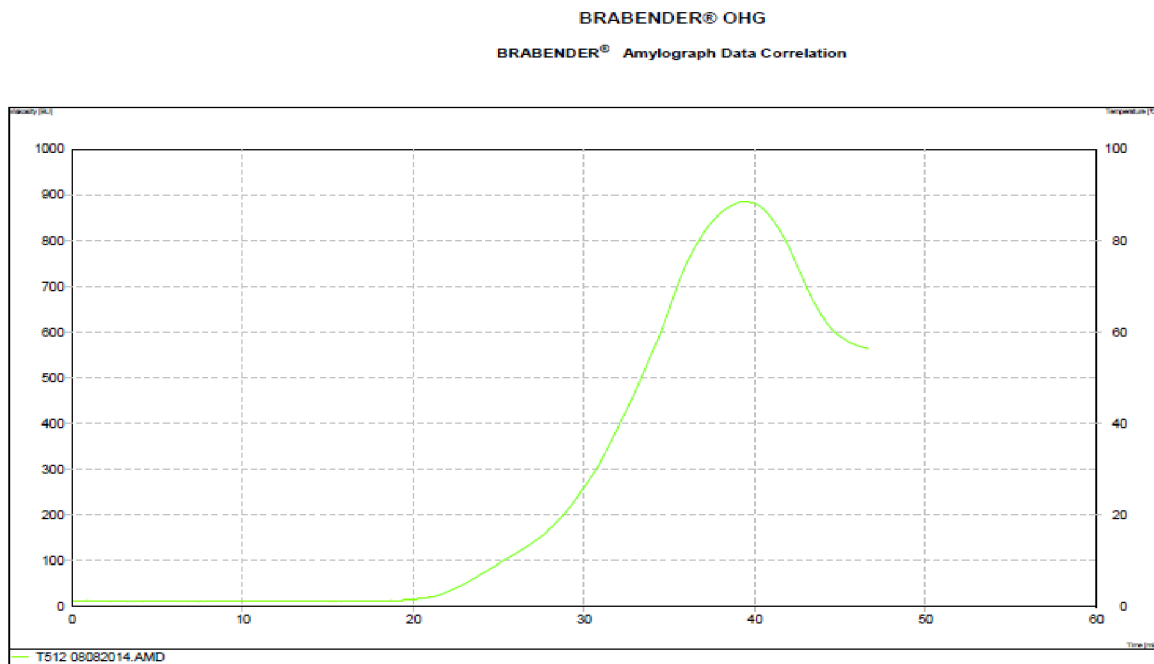
Zvolený prístup fyzikálneho opracovania pšeničnej múky procesom sterilizácie sa prejavil pri zmene jej funkčných vlastností. Hore uvedené údaje v tabuľke 5 predikujú vplyv

sterilizátu pri ďalšej manipulácii a následnom zakomponovaní nami vytvoreného medziproduktu do pekárskych receptúr. Parametre väznosti múky a výťažnosti cesta, ktoré sa pri pšeničnej múke T512 nachádzali v optimálnom intervale, sa po tlakovom a tepelnom opracovaní posunuli smerom k zhoršeniu vlastností suspenzie. Pre tieto skutočnosti nie je možné vysubstituovať nami pripravenou suspenziou majoritné množstvo zložiek v tradičných pekárskych receptúrach ani po vybilancovaní množstva vody, nakoľko jej schopnosť vyviazať vodu nie je adekvátne a tento fakt sa prejavuje ako pri konzistencii finálneho produktu, tak i pri aktivite vody výrobku a jeho trvanlivosť by sa rapídne znížila.

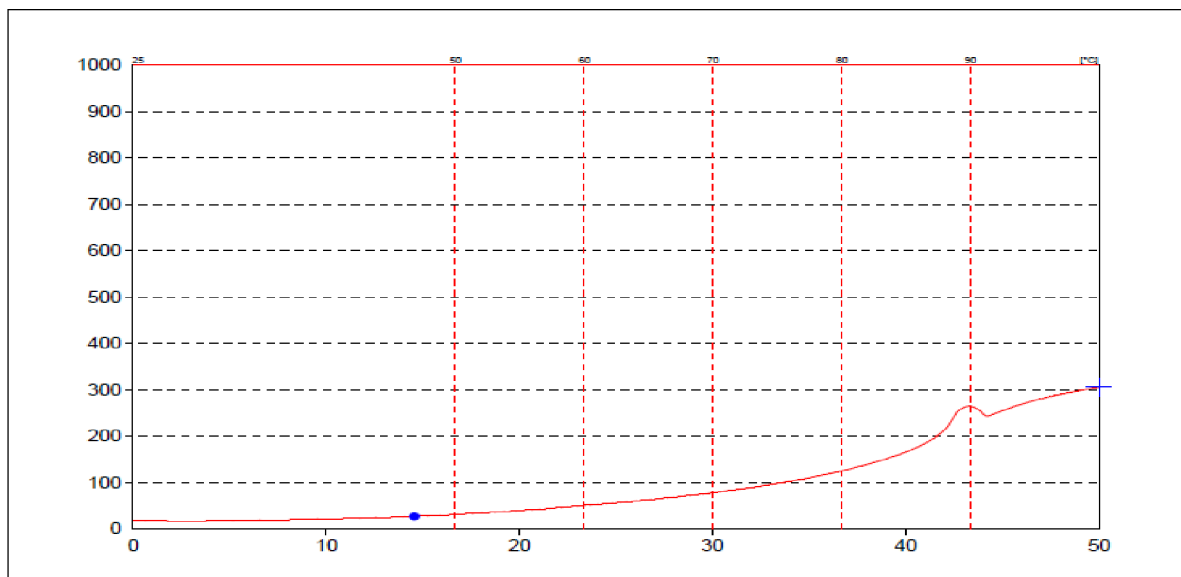
5.2.3 Reológia pšeničnej múky a jej sterilizátu

➤ Amylografické stanovenie

Ako bolo už spomenuté v kapitole Pre posúdenie kvality múky je preto potrebné poznať vlastnosti sacharidovo-amylázového komplexu. Ten sa v technologickom procese uplatňuje v dvoch fázach a to počas hydrolýzy (vtedy je činnosť amylolytických enzýmov žiaduca, aby bolo zabezpečené adekvátne množstvo skvasiteľných sacharidov pre tvorbu kypriaceho plynu) a počas pečenia. Vplyvom narastajúcej teploty dochádza k mazovateniu škrobu. Zmazovaľtený škrob viaže veľké množstvo vody a je amylázam prístupnejší než škrob v natívnej forme. Tvorba sacharidovo-amylázového komplexu sa hodnotila pomocou amylografu. Je funkciou konzistencie suspenzie múky a vody meranej v amylografických jednotkách. Jedná sa o závislosť teploty a času. Pri meraní teplota v priebehu testu narastá o 1,5 °C každú minútu. Meranie odporu suspenzie a vznikajúceho gélu sa premieta na os y [54].



Obrázok 9: Amylografické stanovenie sacharidovo-amylázového komplexu pšeničnej múky T512



Obrázok 10: Amylografické stanovenie sacharidovo-amylázového komplexu sterilizátu pšeničnej múky

Výstupom je amylogram (Obrázok 10). Na tomto obrázku 10 je pre porovnanie urobená amylografická analýza sterilizátu. Ako je možné vidieť z vyššie uvedených kriviek, počas procesu sterilizácie došlo ku kvalitatívnej zmene sacharidovo-amylázového komplexu. Tieto poznatky spolu s informáciami, že glutén je inkorporovaný do helikálnej matrice škrobu viedli k zavedeniu technologického kroku fyzikálno-termického opracovania múky sterilizáciou, ktorej výsledkom bol tzv. sterilizát – základný substrát pre nadchádzajúci krok hydrolýzy [55].

5.3 Hydrolýza sterilizátu

5.3.1 Hydrolytické štiepenie škrobu amylázami a glukoamylázami

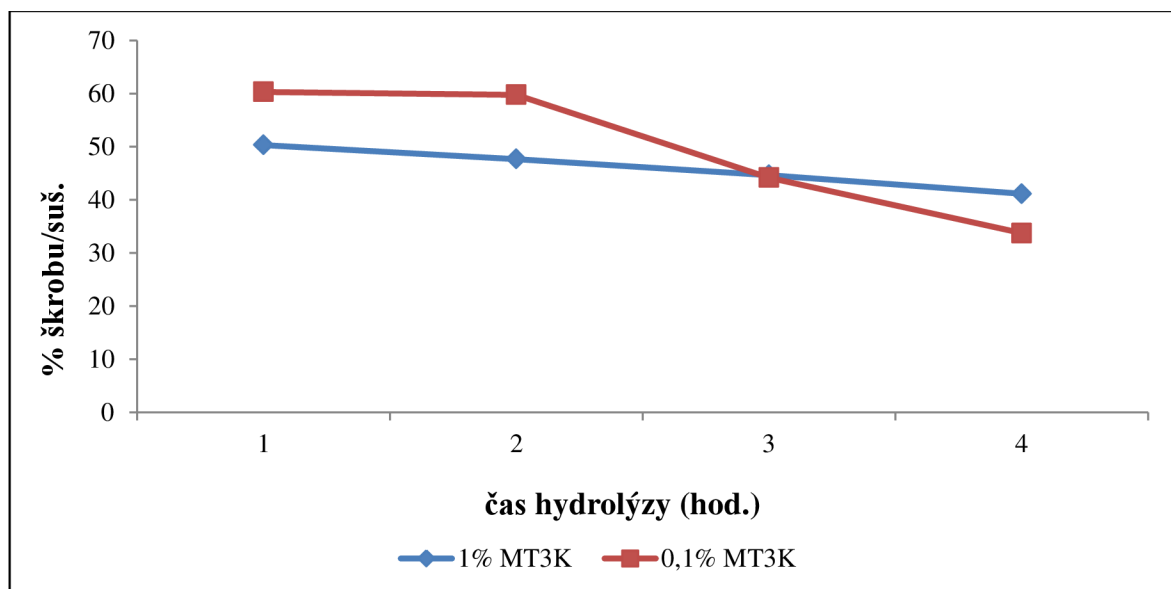
Spôsoby stanovenia cukrenej hodnoty enzymatických hydrolyzátov sa rozdeľuje do dvoch skupín podľa toho, aký bol zvolený analytický postup. Prvý skúma úbytok substrátu, to znamená škrobu, zatiaľ čo druhý postup meria prírastok redukujúcich látok, ktoré vznikajú počas hydrolytického štiepenia substrátu.

Kjeldahlov zákon o proporcionalite medzi množstvom amylázy a vzniknutými redukujúcimi látkami je základným informačným kanálom pre druhý postup stanovenia redukujúcich sacharidov v hydrolyzáte. Tento zákon popisuje empirickú skutočnosť, že pri hydrolýze škrobu je množstvo vytvoreného cukru úmerné hodnote prítomnej amylázy tak dlho, kým sa nevytvorí zo 100 jednotiek škrobu viac ako 40 dielov maltózy [56]. Tieto poznatky prispeli k sledovaniu oboch vyššie uvedených parametrov pri enzymatickom opracovaní

sterilizátu za účelom degradácie škrobu a sprístupnenia inkorporovaných gliadínových molekúl v jeho špirále.

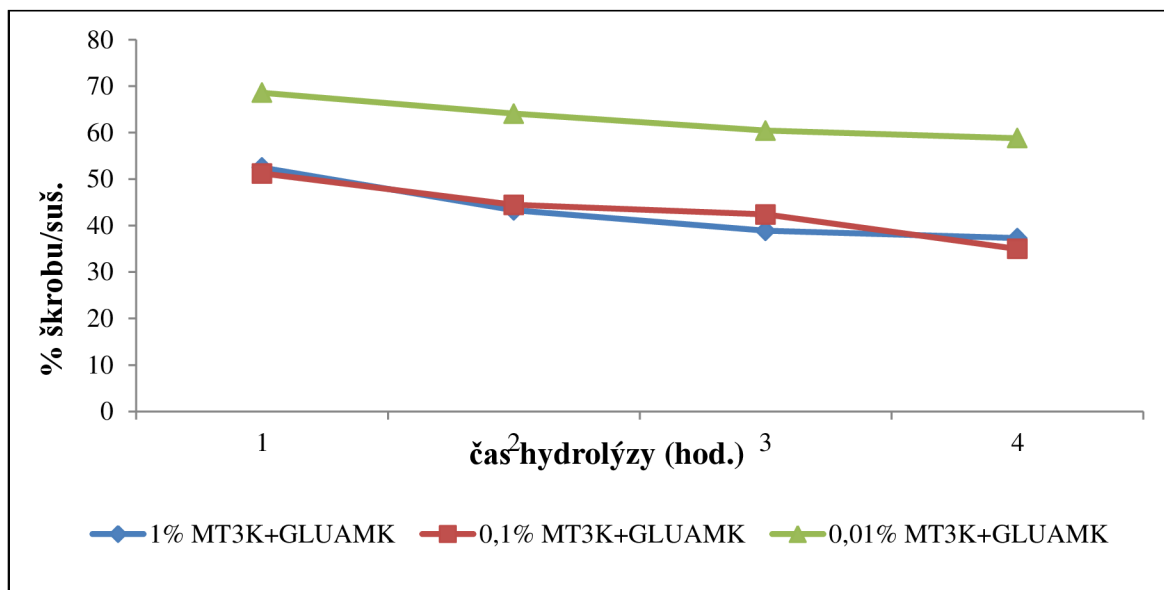
Enzymatická hydrolýza bola uskutočnená prostredníctvom komerčných enzymatických preparátov a ich kombinácií. Podmienky hydrolytického štiepenia škrobu boli optimalizované na teplotu 55 °C na základe informácií uvedených v špecifikácii príslušných enzýmov. V prvom kroku prípravy hydrolyzovaného preparátu z pšeničnej múky, ktorý spĺňa parametre vhodné pre aplikáciu v bezpečnej diéte, boli pre potreby degradácie škrobovej matrice testované mimo rôznych enzýmov a ich kombinácií i rozdielne koncentrácie.

Ako je vyššie spomenuté, úspešnosť hydrolýzy bola vyhodnotená na základe merania obsahu škrobu resp. redukujúcich sacharidov. Taktiež počas hydrolýzy sa súčasne merala hodnota pH. Výsledky sú uvedené na Obrázku 11 až 15.

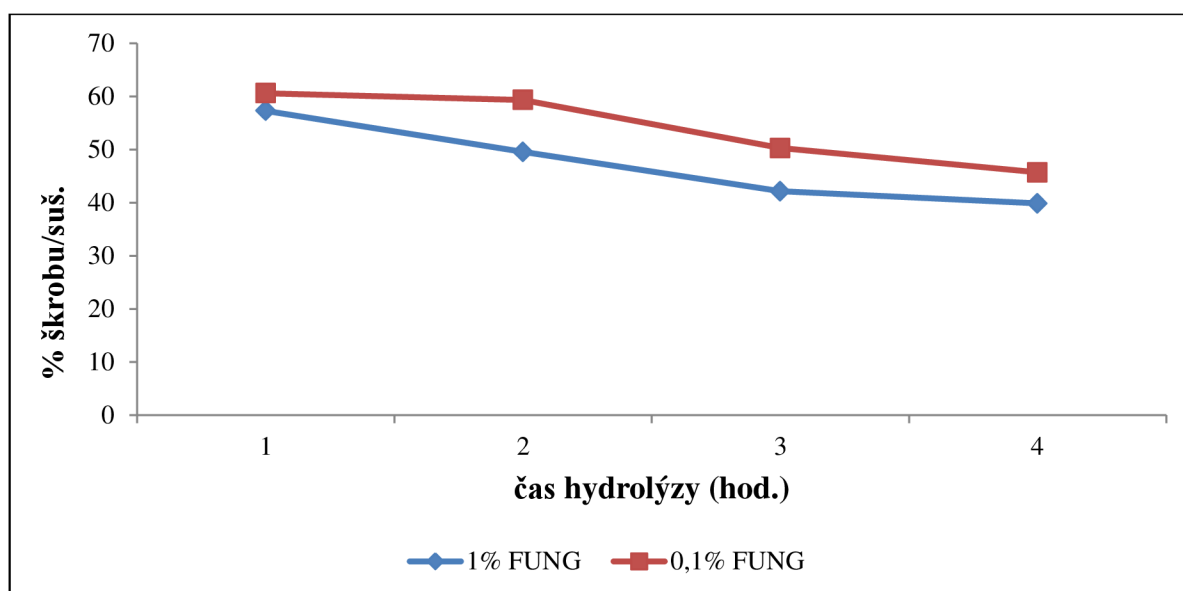


Obrázok 11: Hydrolytické štiepenie škrobu v sterilizáte pri aplikácii enzýmu MT3K

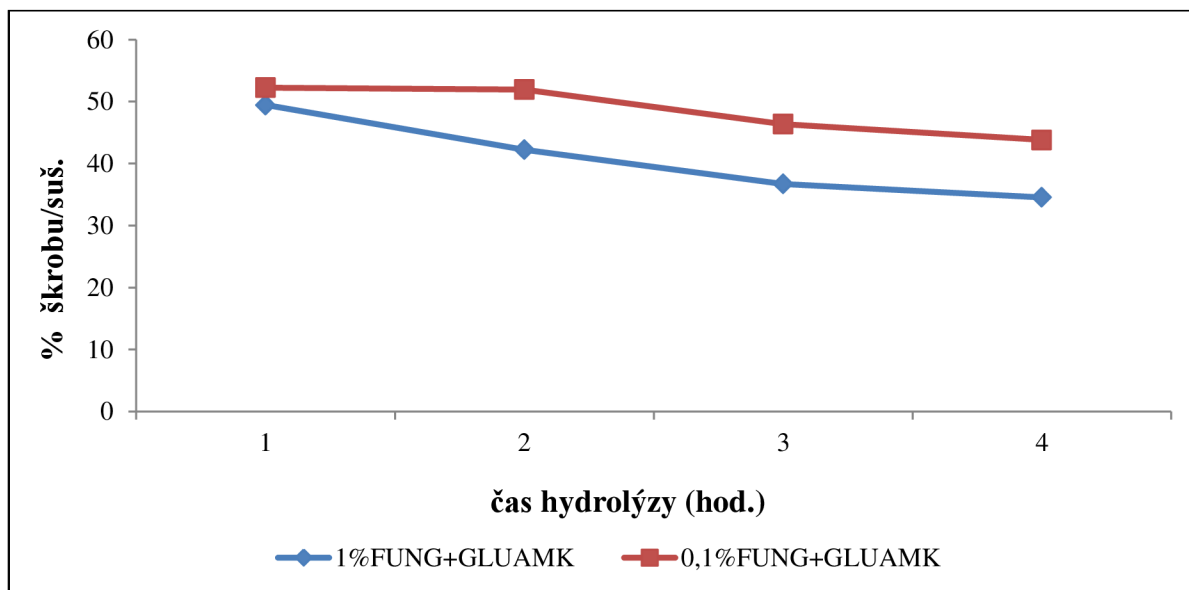
Odporúčané dávkovanie 1 % na sušinu substrátu pri všetkých preparátoch sa po uskutočnení hydrolýz ukázalo ako prehnané, čo je možné vidieť aj na spomínaných obrázkoch. Rozdiely medzi koncentráciou 0,1 % a jej 10-násobkom 1 % prídavkom boli zanedbateľné, čo potvrdzujú i hodnoty namerané pri stanovení škrobu a nárastu redukujúcich sacharidov.



Obrázok 12: Hydrolytické štiepenie škrobu v sterilizáte pri aplikácii kombinácii enzýmov MT3K + GLUAMK

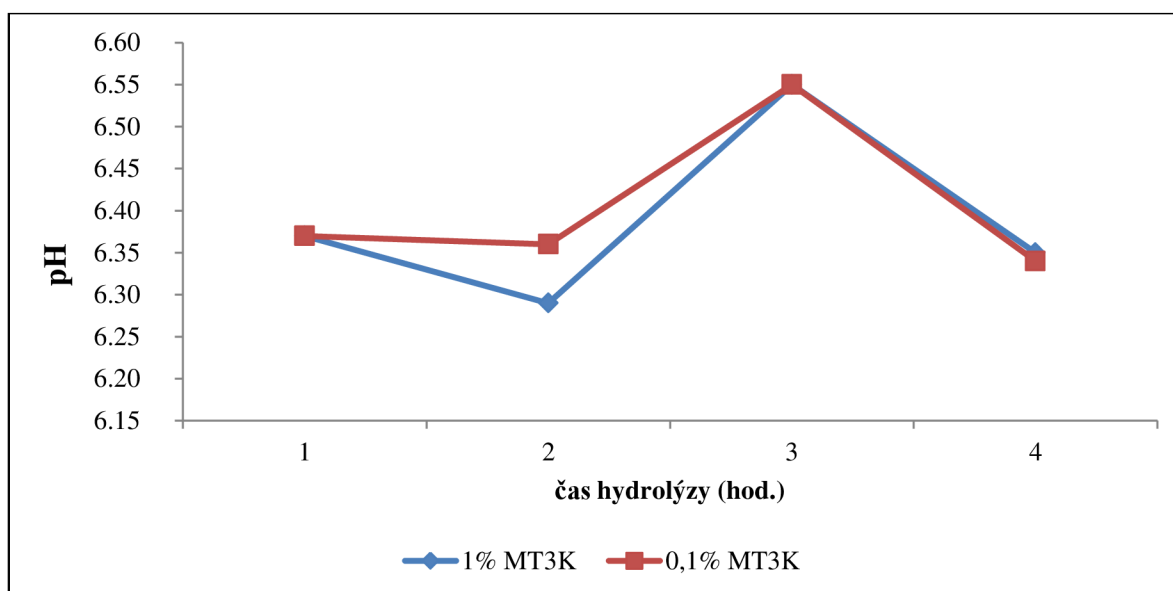


Obrázok 13: Hydrolytické štiepenie škrobu v sterilizáte pri aplikácii enzýmu FUNG

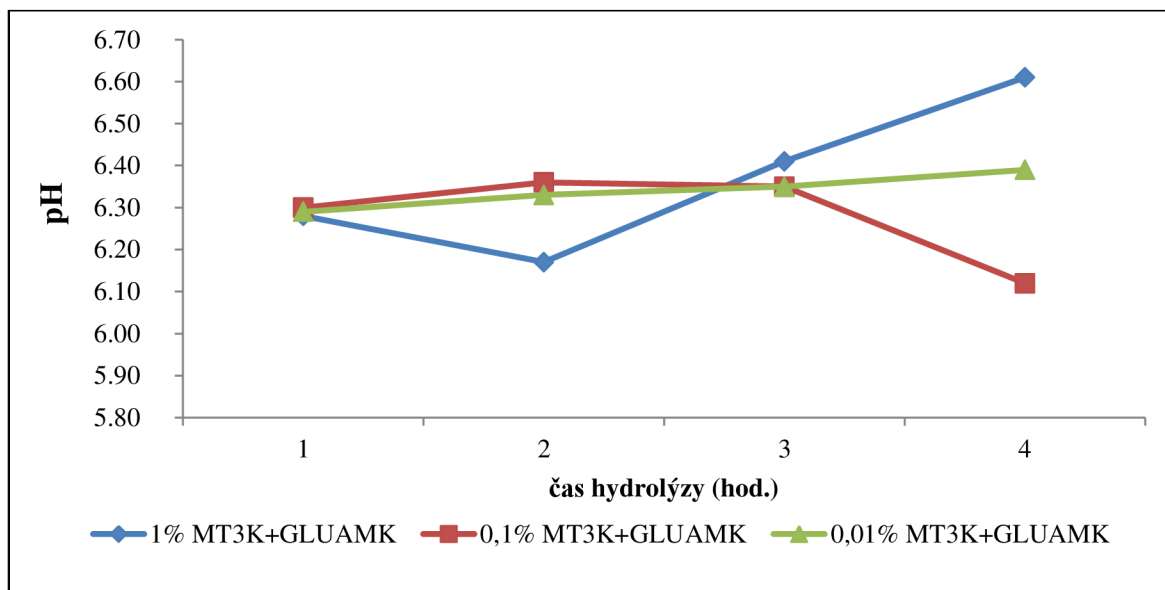


Obrázok 14: Hydrolytické štiepenie škrobu v sterilizáte pri aplikácii kombinácii enzýmov FUNG + GLUAM

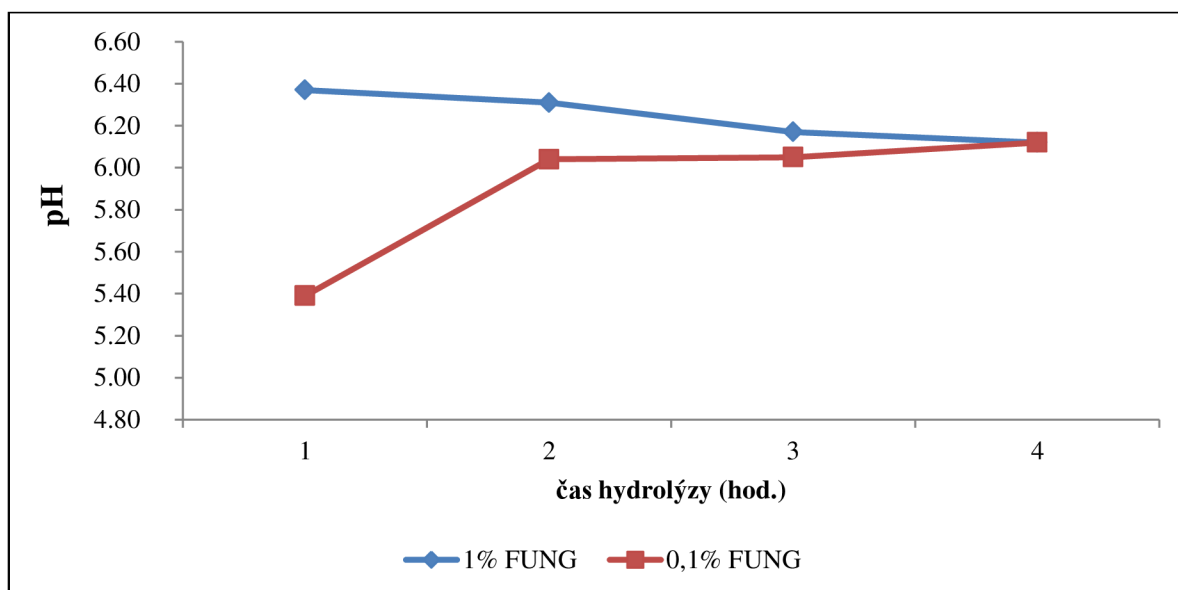
Počiatkové pH sterilizátu bolo $6,45 \pm 0,001$, preto jeho úprava roztokom kyseliny citrónovej bola $4,02 \pm 0,001$. Rozpätie pH medzi 6,0 až 4,0 vytvára optimálne podmienky pre degradáciu škrobu za nízkej koncentrácie α -amylázy [57]. Tento fakt sa potvrdil medzi výsledkami nameranými pri rovnakej koncentrácii enzymatického komplexu 0,1% MT3K+GLUAMK. Pôvodná hodnota pH a optimalizácia pH je dôkazom správnosti zvoleného postupu.



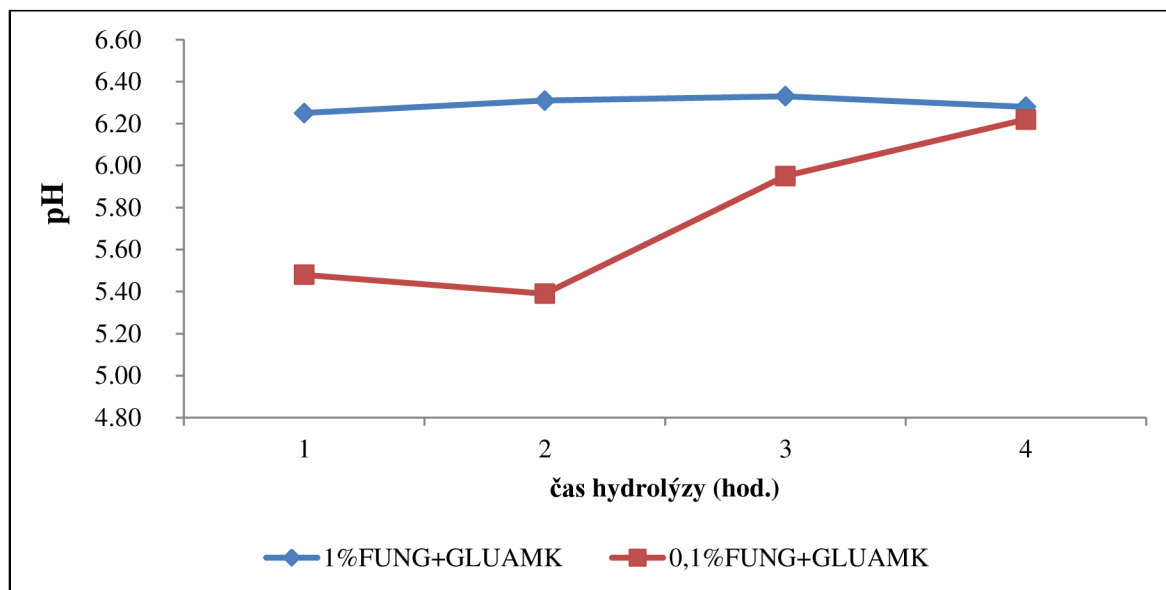
Obrázok 15: Zmena pH počas hydrolytického pôsobenia enzymatickej kombinácie MT3K



Obrázok 16 Zmena pH počas hydrolytického pôsobenia enzymatickej kombinácie MT3K + GLUAMK

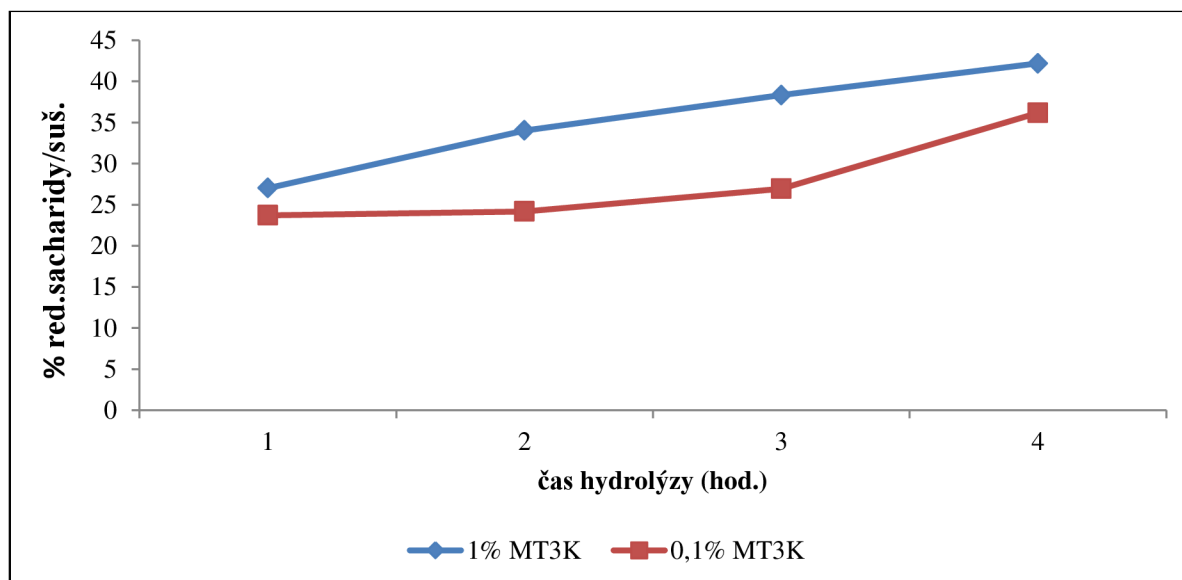


Obrázok 17: Zmena pH počas hydrolytického štiepenia škrobu v sterilizáte po aplikácii enzýmu FUNG

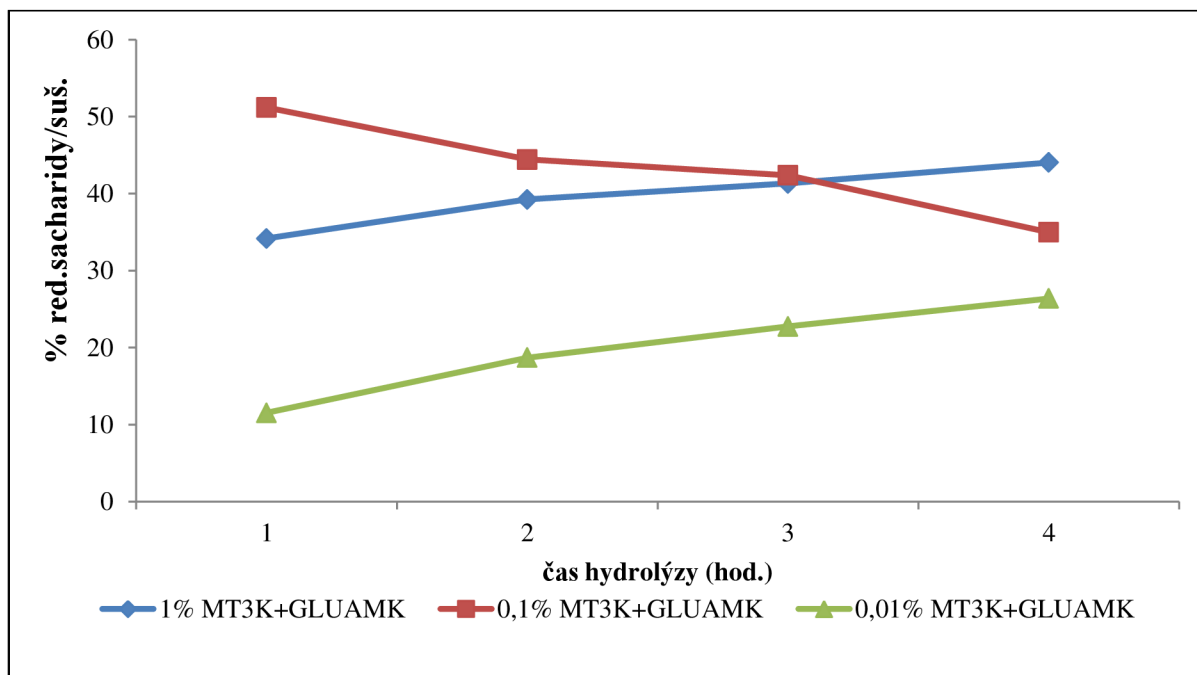


Obrázok 18: Zmena pH počas hydrolytického štiepenia škrobu v sterilizáte po aplikácii enzymatického komplexu FUNG + GLUAMK

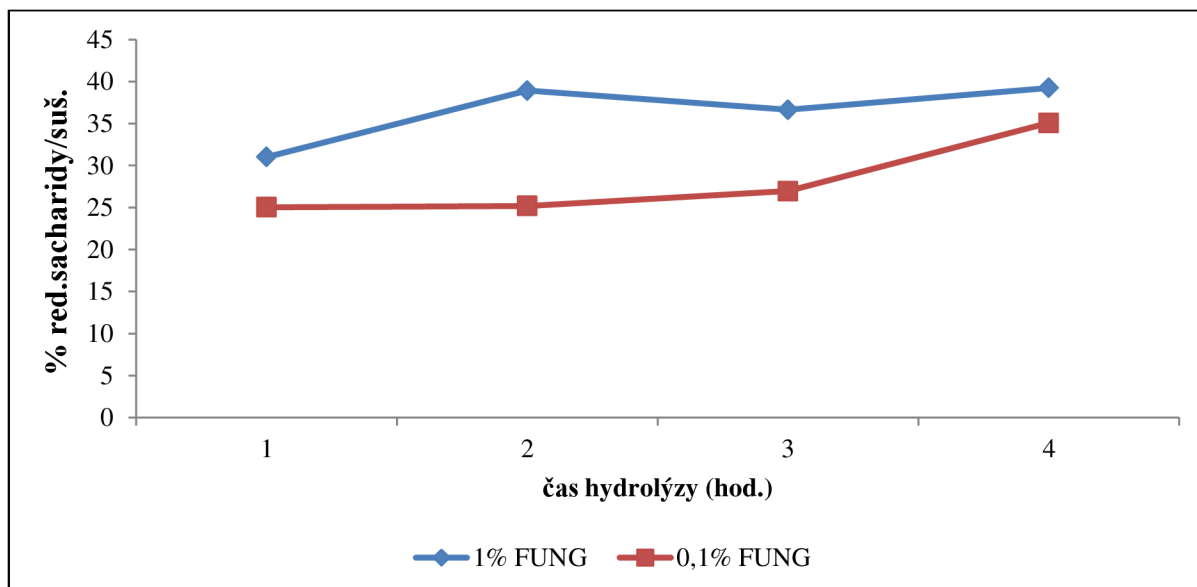
Koncentračný interval v rozmedzí 0,01 – 1% poskytol praktický prehľad o možnostiach enzymovej aktivity vytvorených komplexov a zároveň substrátové limity. Na základe výskumu prvoautora Hashemiho [58] bol modifikovaný vstupný substrát, t.j. sterilizát úpravou pH a to prídavkom 1% roztoku kyseliny citrónovej. Táto zmena prispela k efektívnejšiemu priebehu hydrolýzy a vyšším výnosom ako pri obsahu redukujúcich sacharidov, tak i pri degradácii škrobu.



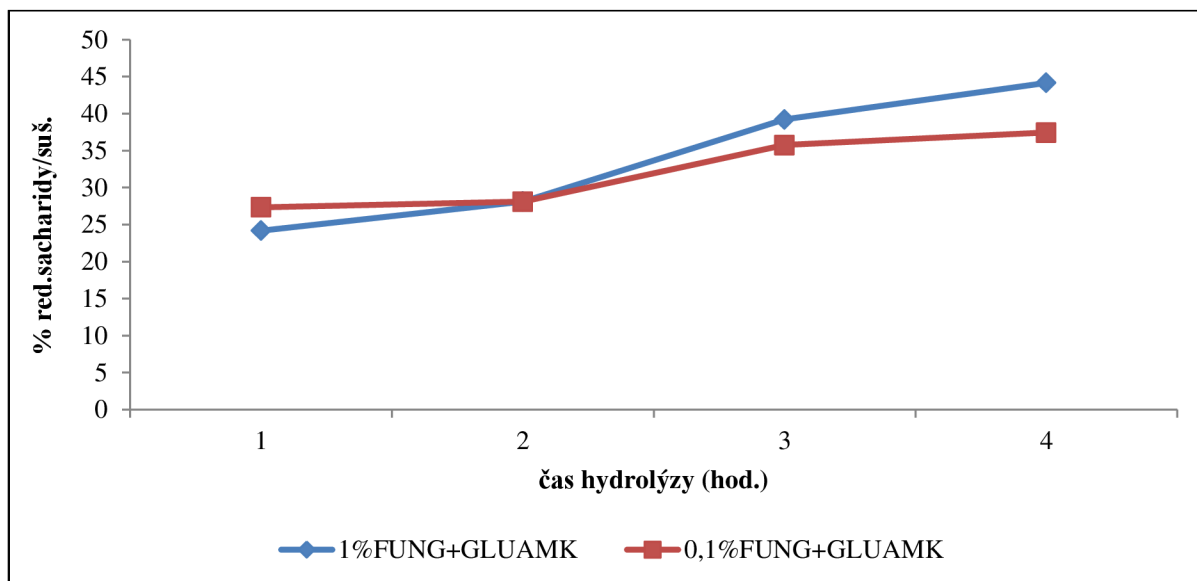
Obrázok 19: Redukujúce sacharidy po hydrolýze škrobu v sterilizáte pri aplikácii enzýmu MT3K



Obrázok 20: Redukujúce sacharidy po hydrolýze škrobu v sterilizáte pri aplikácii enzýmu MT3K+GLUAMK

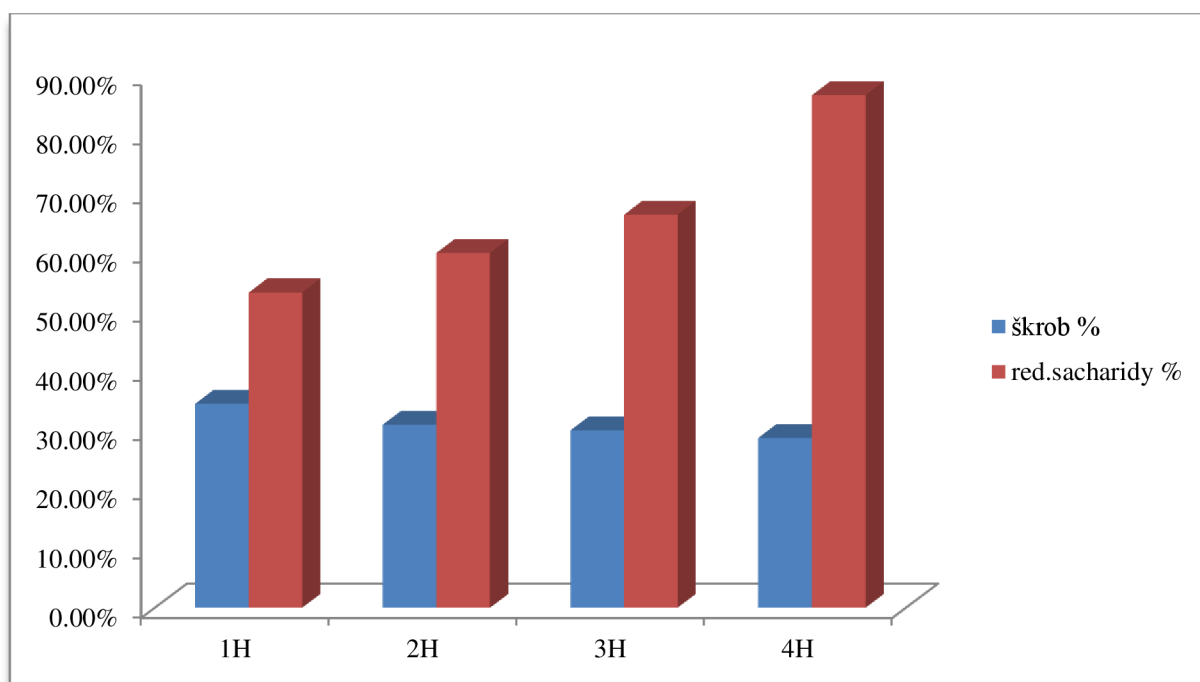


Obrázok 21: Redukujúce sacharidy po hydrolýze škrobu v sterilizáte pri aplikácii enzýmu FUNG



Obrázok 22: Redukujúce sacharidy po hydrolyze škrobu v sterilizáte pri aplikácii enzýmu FUNG+GLUAMK

10-násobný rozdiel v dávkovaní enzýmu nepriniesol požadovaný efekt, nakoľko substrátová kapacita bola limitujúcim faktorom pre úspešnosť hydrolyz. Tieto výsledky však nie sú prekvapujúce, keďže sa o nepriamej úmere medzi množstvom substrátu a koncentráciou enzýmu pri enzymatických procesoch zmieta už v roku 1932 Hanes [59].



Obrázok 23: Prehľad nameraných hodnôt zvoleného enzýmového komplexu 0,1 % MT3K a 0,1 % GLUAMK po hydrolyze s úpravou pH kyselinou citrónovou

Zo všetkých vykonaných hydrolyz bola ako najlepšie vyhodnotená kombinácia MT3K a GLUAMK v koncentrácii 0,1 % po úprave pH na hodnotu 4,02. Na obrázku 16 je znázornené postupný úbytok škrobu hydrolytickým štiepením tohto komplexu a lineárne pribúdanie redukujúcich sacharidov ako produktov hydrolyzy. Najvyššieho výťažku redukujúcich sacharidov a tým pádom i najlepšej degradácii škrobu sa dosiahlo po ukončení 4 hodinovej hydrolyzy. Nameraná hodnota 86,63 % redukujúcich sacharidov v 4 hodine koreluje s výsledkami Soniho a kolektívu [60] ponímajúca o vysokej scukrovacej schopnosti glukoamyláz pri optimálnych podmienkach. Pri aplikácii komplexu amylázy a glukoamylázy sa dosahuje vysokého stupňa konverzie pšeničného škrobu, čo sa potvrdilo i pri 28,87 % množstve škrobu po 4 hodinách opracovávania enzymatickou kombináciou MT3K a GLUAMK.

5.3.2 Selekcia vhodných proteáz pre úspešnú hydrolyzu gluténu v sterilizáte

Tradične sa diétne proteíny považujú za zdroj energie a esenciálnych aminokyselín, ktoré sú nevyhnutné pre rast a udržiavanie fyziologických funkcií. V poslednej dobe sa záujem týkajúci identifikácie a charakterizácie bioaktívnych peptidov z rastlinných zdrojov zvyšuje. Medzi potravinové zdroje rastlinných bielkovín patrí predovšetkým pšeničný glutén, nakoľko je nielen nutričnou zložkou typickej obilniny pšenice, ale zároveň vedľajším produktom procesu pri získavaní pšeničného škrobu, čo ho predurčuje na surovinu získavanú pri relatívne nízkych nákladoch. Použitie týchto proteínov ako zdroj biologicky aktívnych peptidov je veľmi vzácne a doposiaľ komerčne príliš nevyužívané [61].

Nerozpustnosť gluténu vo vodných roztokoch je jedným z hlavných obmedzení pre jeho širšie použitie pri spracovaní potravín vo všeobecnosti. Pšeničný glutén sanajčastejšie enzymaticky hydrolyzuje niekoľkými komerčne dostupnými proteázami (Alcalase 2.4L, PTN 6.0s, pepsín, pankreatín, Neutrase n Protamex TM, Flavourzyme®). Použitie proteolytických enzýmov je účinná metóda modifikácie proteínov [62]. Tým, že sa riadia reakčné podmienky v priebehu enzymatickej hydrolyzy, je možné získať hydrolyzáty, ktoré majú odlišné vlastnosti. Výskumy zamerané na chemickú alebo enzymatickú modifikáciu pšeničného gluténu mali za následok zvýšenie jeho rozpustnosti, možnosti aplikácii i v oblastiach dietickej výživy ako i iných výstupov [63].

Počas riešenia problematiky enzymatickej degradácie gluténu na menšie peptidové frakcie boli aplikované rôzne enzymatické preparáty samostatne i v komplexoch. Priebeh hydrolyzy bol zaznamenávaný pri pravidelných odberoch v rôznych časových intervaloch.

Tabuľka 7 pojednáva o prvotnom prístupe aplikácie sladových extraktov po úvodnom kroku enzymatického štiepenia škrobu komplexom 0,1 % MT3K+GLUAMK po dobu 4 hodín. Hodnoty sú vyjadrené v jednotkách ppm, nakoľko cieľom práce bolo vytvoriť hydrolyzáty s obsahom gluténu nižším než 20 ppm na kilogram suroviny. Tento údaj vyplýva z ustanovenia Potravinového kódexu a príslušného nariadenia Komisie pre Codex Alimentarius EÚ.

Tabuľka 7: Enzýmová hydrolýza gluténu sladovým extraktom Maltextract GF

Čas hydrolýzy	2H	4H	6H
Malt extract GF koncentrácia	[ppm]		
0,5 %	1942,37	1939,74	1939,74
1 %	1950,26	1947,63	1931,84
1,5 %	1945,00	1939,74	1937,11
3 %	1942,37	1916,05	1897,63

Sladové hydrolyzáty predstavujú bohatý zdroj malých peptidov a aminokyselín. Sú používané predovšetkým pri pekárskejších aplikáciách a ako zdroj zlúčenín so zdravotným benefitom (minerály, vitamíny a vlákna). Navyše, enzýmy aktivované v priebehu klíčenia, ako amylázy, lipázy, hemicelulázy a proteázy môžu do istej miery tiež pôsobiť ako prídavok v bezlepkovom pečení, zatiaľ čo minerálne látky a vitamíny prítomné v slade prinášajú pridanú hodnotu finálnemu produktu. Tieto kvalitatívne aspekty sú obzvlášť dôležité pre celiatikov, závislých od bezlepkových výrobkov, ktoré však majú často zlú chuť a celkovú kvalitu [64].

Chuťový profil získaný po hydrolytickom opracovaní týmito extraktmi bol dobrý. Prijemná sladová vôňa a nasladlá chuť výsledného produktu mohli slúžiť ako aditívum predovšetkým v pekárskejších a pečivárskych aplikáciách. Avšak vysoký obsah zvyškového gluténu bol neakceptovateľný pre využitie v bezlepkových potravinách.

Verhoeckx a kolektív [65] sa vo svojej práci venovali obdobne stanovovaniu gluténu po jeho enzýmovej degradácii. Kvantita alergénnej zložky v hydrolyzáte sa zisťovala imunologickou metódou ELISA. Zvolený prístup kombinácie exoproteázy a endoproteázy pre umocnenie enzymatického účinku je možné pozorovať i v predkladanej diplomovej práci (Tabuľka 8 a 9).

Tabuľka 8: Enzýmová hydrolýza sterilizátu 1 % Fungal Protease a 0,5 % Neutral Protease

Čas hydrolýzy	2H	4H	6H	8H	12H	20H	22H	24H
Množstvo gliadínu [ppm]	1950,2	1931,8	1905,5	1550,2	1308,2	1450,26	1308,2	1247,63

Pôsobenie NeutralProtease a exoproteázy FungalProtease nebolo dostatočné ani po 24 hodinovej hydrolýze, čomu nasvedčujú i namerané hodnoty gliadínu (Tabuľka 8).

Tabuľka 9: Enzýmová hydrolýza sterilizátu 1 % Flavourzyme a 0,5 % Neutral Protease

Čas hydrolýzy	2H	4H	6H	8H	12H	20H	22H	24H
Množstvo gliadínu [ppm]	1492,37	1471,3	1384,5	1297,6	1229,2	1050,26	1071,32	889,74

Proces prebiehajúci medzi substrátom (glutén) a proteolytickým enzýmom Flavourzyme® sa komplexne vyznačuje tým, že enzymatická stabilita a aktivita je veľmi ovplyvňovaná rozhodujúcimi faktormi ako teplota, pH, doba pôsobenia, miešanie a inými vonkajšími podmienkami. Jednotlivé parametre procesu boli vybrané tak, aby sa dosiahlo dostatočnej enzýmovej stability procesu po celú dobu hydrolýzy [66].

Táto kombinácia preparátov dosahovala obdobné hodnoty za 1/3 času oproti predchádzajúcemu testovaniu enzymatického komplexu (Tabuľka 7), preto boli uskutočnené ďalšie analýzy s použitím enzýmu Flavourzyme.

Tabuľka 10: Enzýmová hydrolýza sterilizátu 1 % komplexom Flavourzyme a Neutral Protease

Čas hydrolýzy	1H	2H	3H	4H	5H	6H	7H
Množstvo gliadínu [ppm]	1702,89	1895,00	1942,37	1618,68	1442,37	1379,21	1321,32

Tabuľka 11: Enzýmová hydrolýza sterilizátu 1 % komplexom Flavourzyme a Neutral Protease

Čas hydrolýzy	1H	2H	3H	4H	5H	6H	7H
Množstvo gliadínu [ppm]	1658,16	1184,47	1158,16	934,47	231,84	55,53	10,79

Kombinácia komerčne dostupných enzýmov Flavourzyme a Neutral Protease v koncentrácii 1 % na sušinu sterilizátu sa v 7. hodine hydrolýzy ukázala ako vhodná pre naplnenie cieľov

tejto diplomovej práce. Finálny produkt by mal mať žiaduce senzorické i nutričné vlastnosti a je taktiež cenovo dostupný.

Flavourzyme obsahuje aspoň päť rôznych proteolytických druhov aktívktoré pozostávajú z menšej častiendo, ale hlavne exoproteázovej aktivity v priebehu hydrolýzy pšeničného gluténu podľa údajov dodávateľa [67]. Táto aktivita bola podporená prídavkom neutrálnej proteázy pre doplnenie absentujúceho dostatočného množstva endoproteázovej aktivity.

5.3.3 Nutričná charakteristika hydrolyzátu

Množstvo bielkovín v hydrolyzáte po enzymatickom štiepení sa pohybovalo v priemere $12,995 \% \pm 0,021$. V porovnaní s obsahom bielkovín v sterilizáte a po hydrolýze nedošlo k zmene. Tento výsledok však nepredikuje nepresnosť či chybu v meraní, nakoľko Kjeldahlova metóda stanovuje celkový dusík, a teda aj aminokyseliny. Tým pádom hydrolytické štiepenie gluténu mohlo byť úspešné i napriek takmer nezmenenému množstvu bielkovín. Tak ako pri porovnávaní sterilizátu a pšeničnej múky, bol mimo tohto parametru stanovená opätovne i výsledná hodnota pH, škrobu a redukujúcich sacharidov (Tabuľka 12).

Tabuľka 12: Nutričné parametre namerané v pšeničnom hydrolyzáte

Škrob (%)	Redukujúce sacharidy (%)	Bielkoviny (%)	pH
$25,38 \pm 0,011$	$49,72 \pm 0,003$	$12,995 \% \pm 0,021$	4,63

5.4 Pekárske zapracovanie vybraného hydrolyzátu a senzorická analýza finálneho výrobku

5.4.1 Príprava receptúry pre pekársky pokus

Základná receptúra bezlepkových chlebov bola upravená tak, aby obsahovala čo najvyšší podiel hydrolyzátu a zároveň nezhoršila senzorickú stránku výrobku. Dôležitým ukazovateľom zlepšenia receptúry bola voľba vhodného technologického postupu spracovania výrobku.

Pre pekárske účely bola zvolená domáca pekáreň značky Moulinex, ktorá obsahovala špeciálny bezlepkový program. Pôvodné prednastavené parametre na pekárni v bezlepkovom programe sa ukázali ako nevhodné, keďže striedka bochníka bola konzistenciou podobná kaši a obsahovala nadmerné množstvo vody a výrobok sa javil nedopečene. Ako optimálna sa ukázala úprava teploty na 170°C a taktiež optimalizácia doby hnetenia pred vypečením. Jednotlivé pekárske pokusy sú zadokumentované na Obrázku 24.



Obrázok 24: Chlieb pripravený z bezlepkovej chlebovej zmesi a prídavku pšeničného hydrolyzátu (zlava 50 g prídavok, v strede s prídavkom 75 g hydrolyzovanej pšeničnej múky, sprava prídavok 100 g hydrolyzátu).

V kapitole 4.6.6 boli popísané jednotlivé zloženia použitých zmesí na prípravu bezlepkových chlebov aj prídavky hydrolyzovanej pšeničnej múky. Chlieb bol pečený vždy v dvoch paralelných meraniach.

5.4.2 Aktivita vody finálneho produktu s pšeničným hydrolyzátom

Vo vypečených produktoch bola meraná hodnota aktivity vody a_w . Predpokladaný prídavok pšeničného hydrolyzátu zbaveného gluténu zvýšil aktivitu vody oproti kontrole (Tabuľka 13).

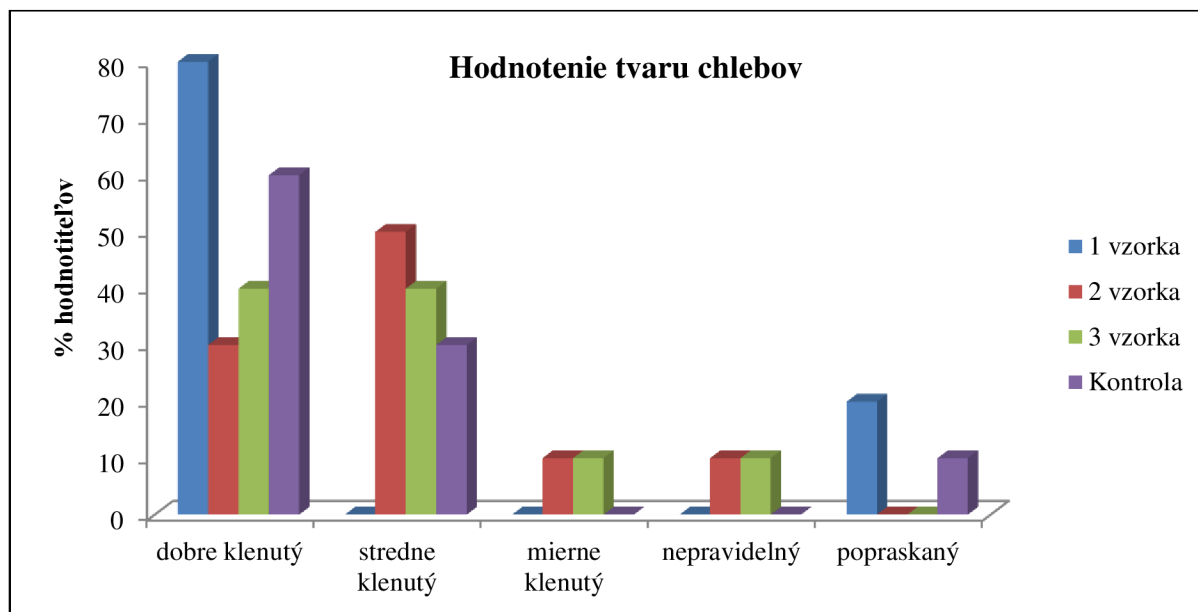
Tabuľka 13: Hodnoty aktivity vody finálnych produktov vypečených pekárskych výrobkov

	Vzorka 1	Vzorka 2	Vzorka 3	Kontrola K
a_w	0,980	0,991	0,986	0,958

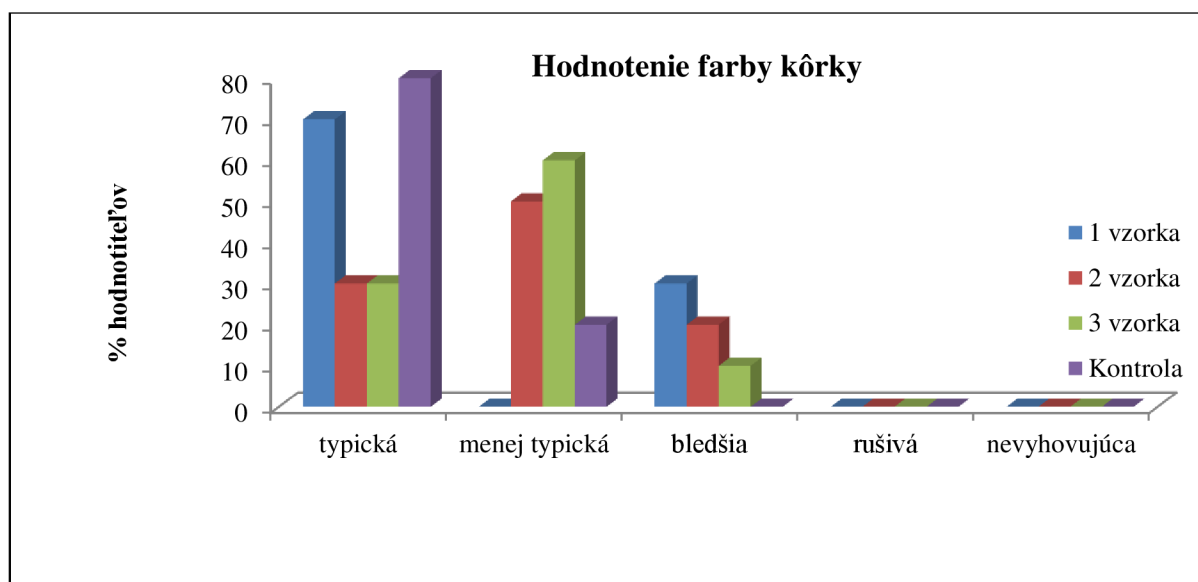
5.4.3 Senzorická analýza finálneho výrobku

Hlavným cieľom sensorického hodnotenia bolo posúdiť prijateľnosť nového druhu bezlepkového chleba obohateného o pšeničný hydrolyzáat (hodnota gliadínu 10,79 ppm) v prídavkoch 6 %; 9 % a 12,5 %. Pripravené chleby boli porovnané s kontrolnou vzorkou,

ktorá bola bez prídavku hydrolyzovanej suspenzie. Vzorky boli hodnotiteľom predložené pod kódmi (1, 2, 3, K).



Obrázok 25: Výsledky hodnotenia tvaru pekárskeho výrobku bodovou metódou. 1 vzorka obsahuje 6 % prídavok hydrolyzáta pšeničnej múky; 2 vzorka 9 % prídavok hydrolyzovanej suspenzie a vzorka 3 12 % prídavok pšeničného hydrolyzáta, K je kontrola, respektíve tradičná receptúra používaná v pekárske bezlepkových aplikáciách bez prídavku hydrolyzáta.

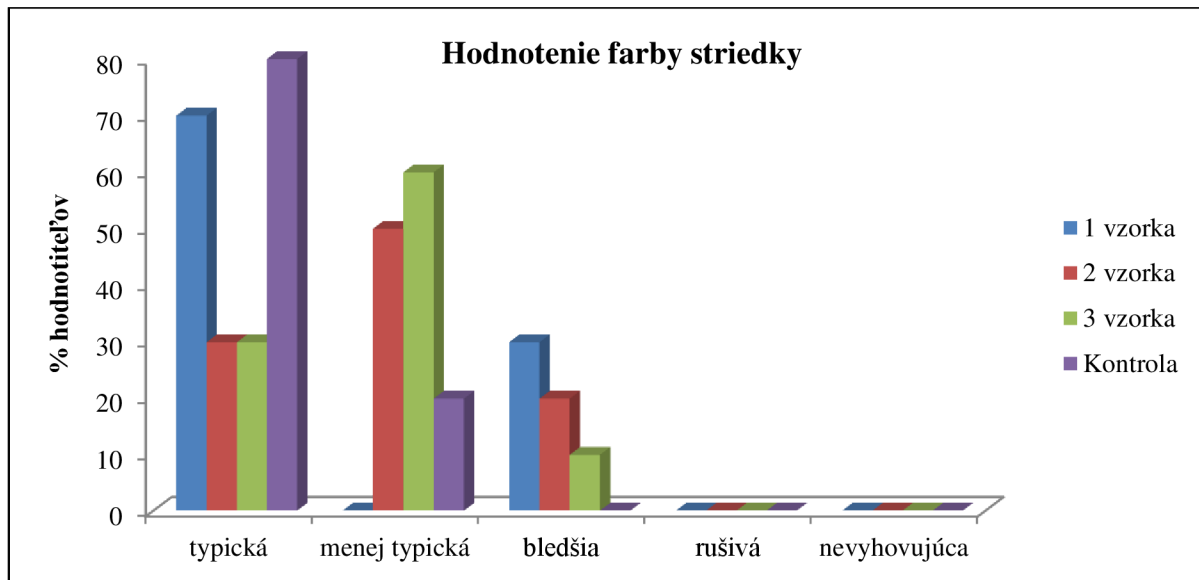


Obrázok 26: Výsledky hodnotenia farby kôrky pekárskeho výrobku. Vysvetlenie legendy je uvedené v popise k Obrázok 18.

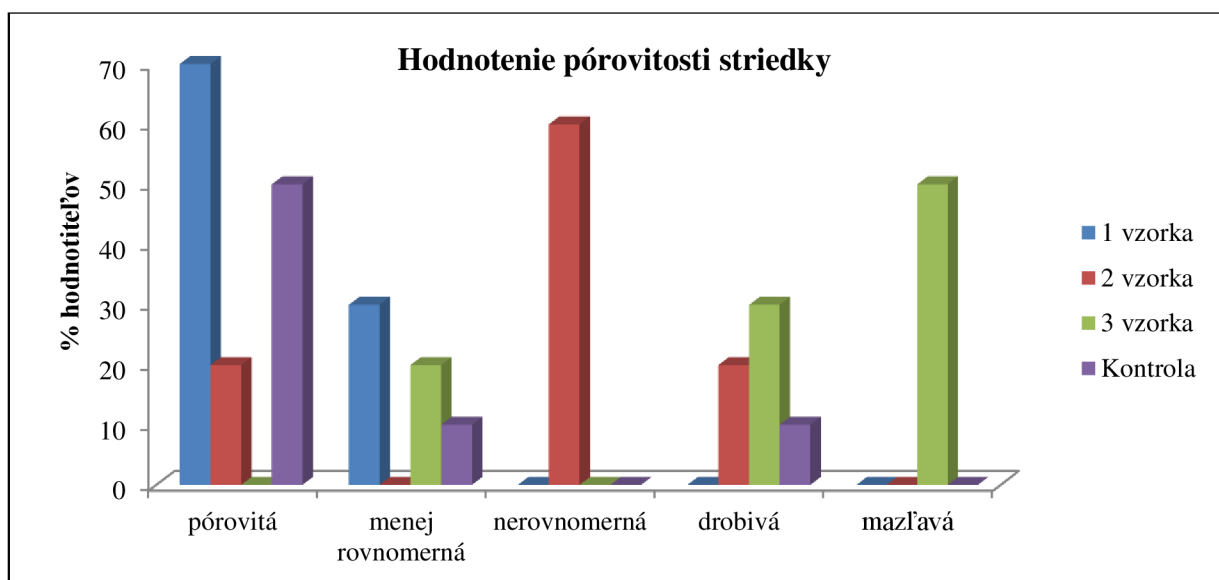
Vplyvom prídavku hydrolyzáta v množstve 12 % (vzorka 3) došlo k vzniku praskliny na spodnej časti povrchu bochníka. Tento fakt však neznížil hodnotenie kvality tvaru

a povrchu posudzovateľmi. Uvedená skutočnosť súvisí s tým, že špecializované bezlepkové pekárské výrobky obsahujú praskliny a ide o prirodzenú súčasť týchto produktov.

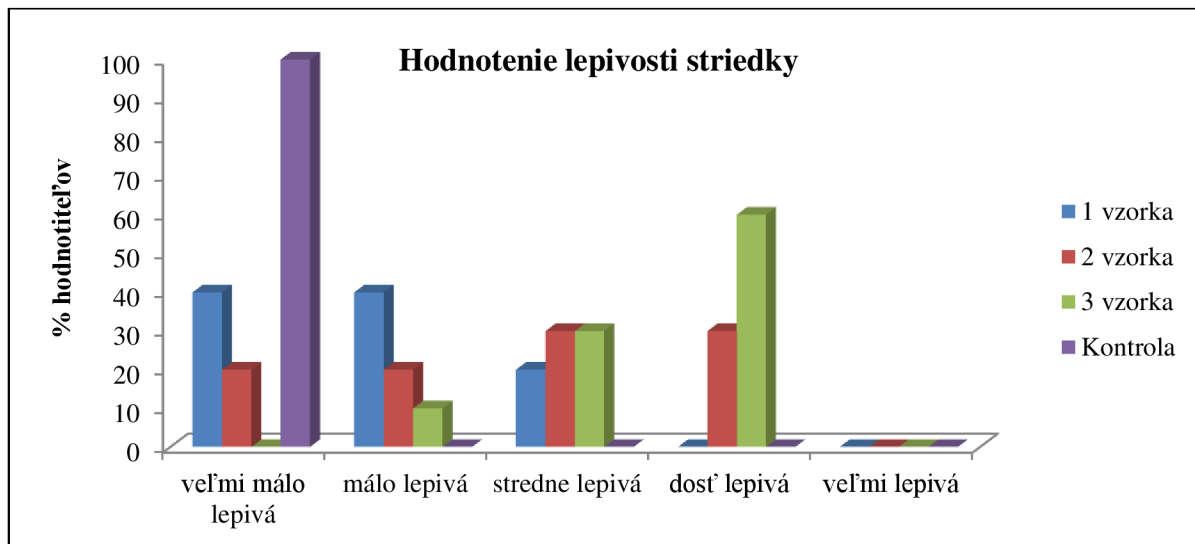
Hodnotenie farby striedky (Obrázok 27) pripravených chlebov bolo ovplyvnené predovšetkým porovnaním s bežným pekárskymi výrobkami, ktoré majú typickú tmavú farbu kôrky, prejavom čoho bolo viac ako 50 %-né hodnotenie posudzovateľov, že vzorky 2 a 3 majú menej typickú farbu, na akú sú konzumenti zvyknutí.



Obrázok 27: Výsledky hodnotenia farby striedky pekárskych výrobkov. Vysvetlenie legendy je uvedené v popise k Obrázok 18.

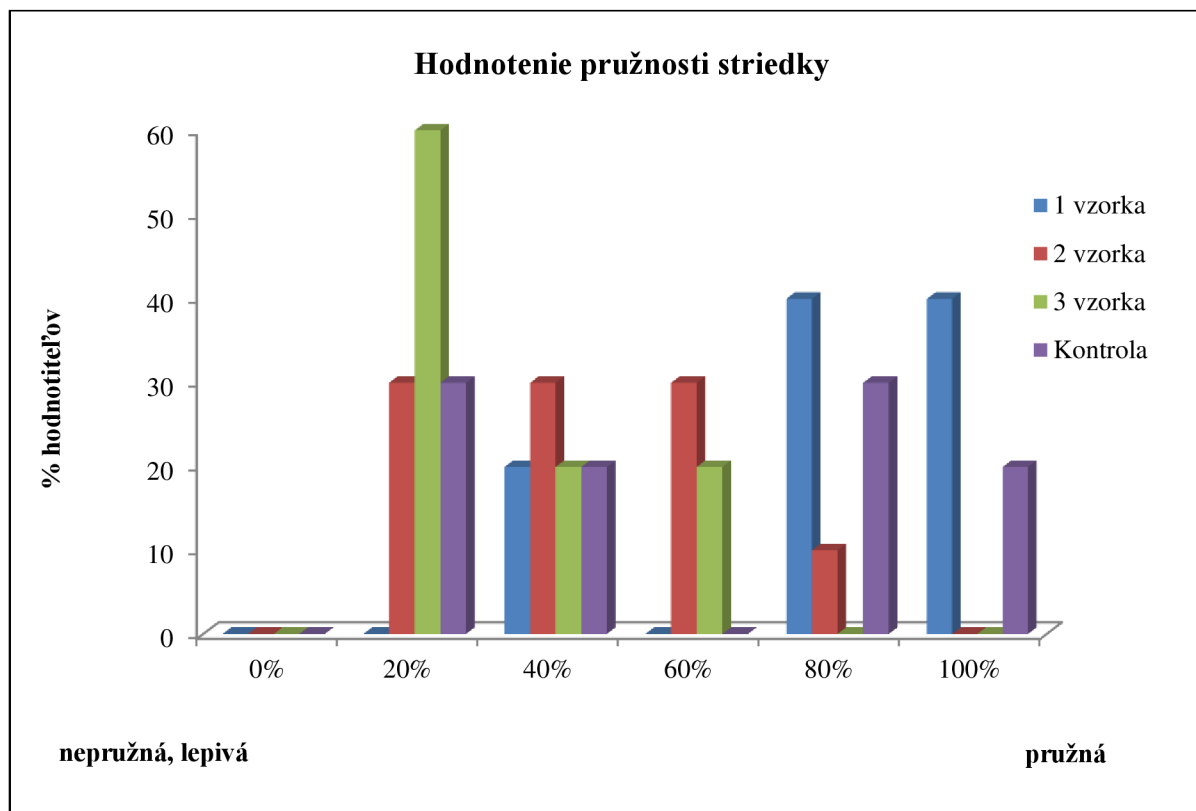


Obrázok 28: Hodnotenie pórovitosti striedky pekárskych výrobkov. Vysvetlenie legendy je uvedené v popise k Obrázku 18



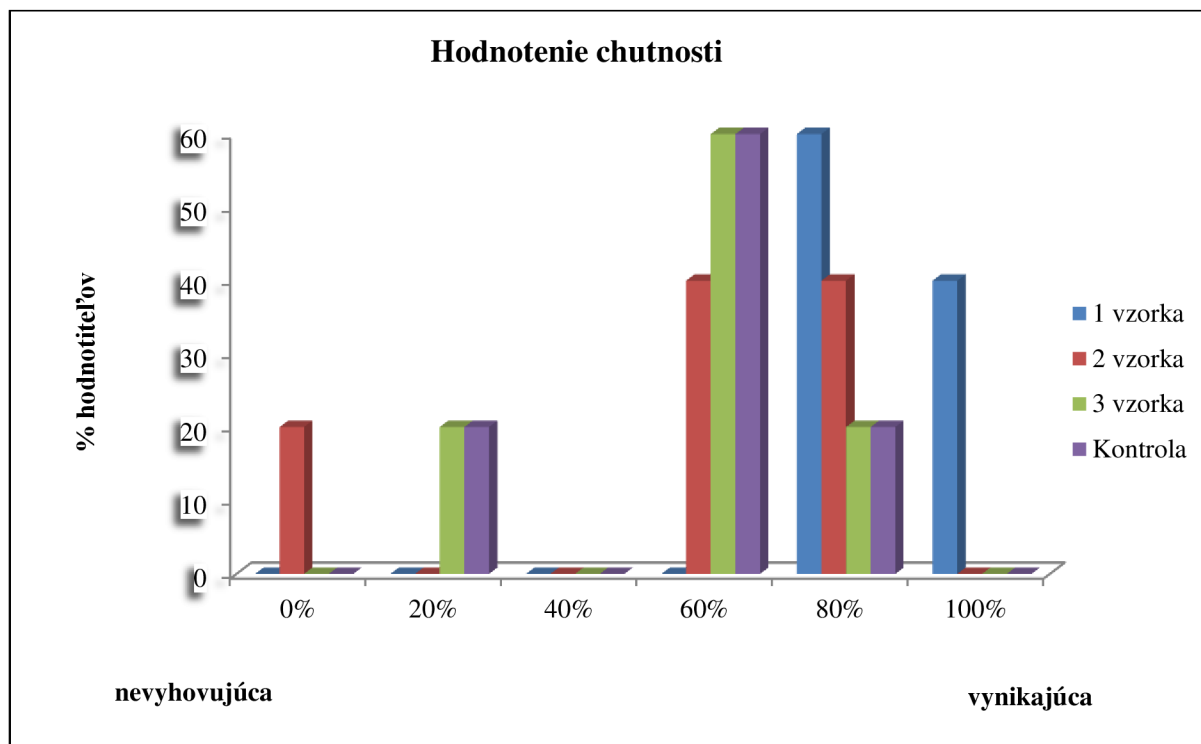
Obrázok. 29: Hodnotenie lepivosti striedky pekárskeho výrobku. Vysvetlenie legendy je uvedené v popise k Obrázku 18.

Približne 40 % hodnotiteľov označilo, že im daný druh chleba, respektíve konkrétne vzorka 1 vyhovuje, čo sa týka konzistencie a lepivosti. Vzorka 2 sa pohybovala v intervaloch málo až dost' lepivých produktov, v závislosti od preferencií konečného konzumenta (Obrázok 29). Vzorka 3 však bola polovicou hodnotiteľov označená za mazľavú, čo môže negatívnym spôsobom ovplyvniť prípadnú voľbu kúpy takéhoto bezpečného chleba (Obrázok 28). Ani jeden typ však nebol vyhodnotený ako veľmi lepivý či neakceptovateľný.



Obrázok 30: Hodnotenie pružnosti striedky pekárskeho výrobku. Vysvetlenie legendy je uvedené v popise k Obrázku 18.

Pri hodnotení pružnosti bez obsahu prídavku hydrolyzáta (Obrázok 30) sa prejavila výrazná odlišnosť oproti ktorémukoľvek chlebu pripraveného s touto zložkou, a to najmä v intenzite lepivosti a nepružnosti. Avšak absentujúca schopnosť inovovaných výrobkov vzorky 2 a 3 plnohodnotne vysubstituovať pružnosť klasických chlebov nebola hodnotiteľmi vnímaná negatívne, nakoľko ide o typický prejav bezlepkových výrobkov, čo potvrdilo i 50 % posudzovateľov priradením k vlastnosti striedky u kontroly K, prívlastok lepivá až menej lepivá.



Obrázok 31: Hodnotenie celkovej chutnosti pekárskeho výrobku. Rozlíšenie I-K uvedené v texte k Obrázku 18.

Vôňa a chuť výrobku bola hedonicky hodnotená na základe posúdenia intenzity a príjemnosti vybraných deskriptív použitím neštruktúrovanej úsečky, ktorej začiatok vyjadroval nevyhovujúci chuťový profil a koniec naopak vynikajúcu chuť (Obr. 31). Z hľadiska chutnosti bola najlepšie prijatá vzorka 1 s prídavkom 6% pšeničného hydrolyzátu, pričom vyhovovala 40 % respondentov. Akceptácia vzorky s najvyšším prídavkom hydrolyzátu bola totožná ako pri kontrole, čo je vyhodnocované ako veľmi pozitívny výsledok. 20% respondentov označilo vzorku 2 ako nevyhovujúcu a daný produkt by do jedálneho lístka nezakomponovali.

Na základe údajov uvedených vyššie je možné konštatovať, že v rôznych posudzovaných parametroch bola akceptovateľnosť konzumentmi odlišná, preto nie je možné s presnosťou stanoviť najvhodnejšiu receptúru, ktorá by dominovala vo všetkých skúmaných vlastnostiach širokej škály konzumentov. Uvedená skutočnosť môže súvisieť s tým, že v súčasnosti rôzni spotrebitelia dbajú na široké spektrum nutričných, senzorických a technologických skutočností, čo sa prejavilo i v rôznorodosti nadobudnutých výsledkov.

6 ZÁVER

Zámerom diplomovej práce s ohľadom i na súčasný stav vedeckých poznatkov a potreby praxe bolo pripraviť inovovaný pšeničný hydrolyzát so zníženým obsahom gluténu pod hranicu 20 ppm na kilogram produktu pre aplikáciu v bezpečkových potravinách.

V prvom kroku bola na základe stanovenia obsahu nutričných zložiek zvolená predúprava pšeničnej suspenziesterilizáciou. Amylografickým stanovením jeho reologických vlastností sa zistilo, že tento technologický medzikrok kvalitatívne ovplyvnil škrobovú maticu, čím významne uľahčil následné hydrolytické štiepenie škrobu komplexom amylázy a glukoamylázy.

Nasledujúca časť práce bola zameraná na vyššie spomínanú hydrolyzu škrobovej matrice, za účelom sprístupnenia gluténových molekúl inkorporovaných v tejto špirále. Enzýmy boli analyzované z hľadiska ich aktivít a schopnosti degradovať škrob a tvoriť redukujúce sacharidy. Ako najvhodnejšia kombinácia enzýmov bola vybraná amyláza MT3K (0,1 %) a glukoamyláza GLUAMK (0,1 %). Produkcia redukujúcich sacharidov a teda úspešnosť degradácie škrobu bola sledovaná meraním oboch týchto parametrov nezávisle od seba. Výsledná hodnota škrobu v sterilizáte po 4 hodinovom hydrolytickom štiepení bola 29 % a nárast redukujúcich sacharidov bol z pôvodnej hodnoty 1,47 % na 87 %. Nadobudnuté výsledky korešpondujú so zaznamenaným poklesom pH.

V ďalšom kroku bol hydrolyzát podrobený enzymatickému pôsobeniu proteáz. V pravidelných intervaloch (0 až 24 hodín) sa odoberala zhydrolyzovaná suspenzia, v ktorej sa stanovoval obsah gliadínu pomocou imunologickej metódy ELISA. Najnižšia hladina skúmaného alergénu (10,79 ppm/kg) bola zaznamenaná pri enzymatickej kombinácii exoproteázy Flavourzyme (0,1 %) a endoproteázy Neutral Protease (0,1 %) po 7. hodine hydrolytického pôsobenia. Táto hodnota je takmer polovicou z povolenej hladiny 20 ppm/kg gliadínu v bezpečkových výrobkoch podľa nariadenia Komisie pre Codex Alimentarius EÚ.

Ukončením práce bolo odskúšanie nami vytvoreného hydrolyzovaného pšeničného preparátu v pekárskych bezpečkových výrobkoch, konkrétne v celiatickom chlebe. Hydrolyzovaný prípravok bol inkorporovaný do základnej receptúry bezpečkového chleba v rôznych množstvách. Boli pripravené chleby s 0; 6; 9 a 12,5 % prídavkom hydrolyzátu. Upečené chleby boli senzoricky posúdené. Z hľadiska chutnosti bola najlepšie prijatá vzorka 1 s prídavkom 6 % pšeničného hydrolyzátu, pričom vyhovovala 40 % posudzovateľov. Akceptácia vzorky s najvyšším prídavkom preparátu 12,5 % bola totožná ako pri kontrole, čo bolo vyhodnocované ako pozitívny výsledok. V prípade merania farby mal chlieb s prídavkom hydrolyzátu mierne svetlejšiu kôrku i striedku v porovnaní s chlebom neobsahujúcim prípravok, nie však výrazne.

Záverom je možné konštatovať, že nadobudnuté charakteristiky týkajúce sa hydrolyzovaných pšeničných sterilizátov dávajú šancu implementácie do bezpečkových výrobkov a teda zaujať výrobcov i pacientov trpiacich ochorením celiakia. Nami vytvorený

enzymaticky upravený preparát je vhodný nielen na prípravu pekárenských produktov, ale i iných typov celiatických potravín (pečivárenské výrobky, funkčné nápoje a iné).

7 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] WANG, CH. Y., WU, S. J., SHYU, Y. T. Antioxidant properties of certain cereals as affected by food-grade bacteria fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2014, vol. 117, p. 449-456.
- [2] ROSENFELDER, P., EKLUND, M., MOSENTHIN, R. Nutritive value of wheat and wheat by-products in pig nutrition: A review. *Animal Feed Science and Technology*. 2013, vol. 185, issues 3-4, p. 107-125.
- [3] HARDT, N. A., BOOM, R. M., VAN DER GOOT, A. J., Starch facilitates enzymatic wheat gluten hydrolysis. *LWT – Food Science and Technology*. 2015, vol. 61, p. 557-563.
- [4] KIEFFER, R., SCHURER P., KOHLER P., WIESER, H. Effect of hydrostatic pressure and temperature on the chemical and functional properties of wheat gluten: Studies on gluten, gliadin and glutenin. *Journal of Cereal Science*. 2007, vol. 45, issue 3, p. 285-292.
- [5] LAFIANDRA, D., RICCARDI G., SHEWRY, P. R. Improving cereal grain carbohydrates for diet and health. *Journal of Cereal Science*. 2014, vol. 59, issue 3, p. 312-326.
- [6] KOEHLER, P. Chapter 1 – Celiac Disease-A Complex Disorder. *Celiac Disease and Gluten*. 2014, p.1-96.
- [7] LANGSTRAAT, T. D., JANSSENS, K. J. A., DELCOUR, J. A., VAN PUYVELDE P., GODERIS B. Controlling wheat gluten cross-linking for high temperature processing. *Industrial Crops and Products*. 2015. Dostupné z: <http://ezproxy.cvtisr.sk:2057/science/article/pii/S0926669014008206>
- [8] LIONETTI, E., CATASSI, C. New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment. *International Reviews of Immunology*. ISSN 1563-5244, 2011, vol. 30, no. 4, p. 219-231.
- [9] PÉREZ, CRESPO, L., CASTILLEJO DE VILLASANTE, G., RUIZ, A., C., LEÓN, F. Non-dietary therapeutic clinical trials in coeliac disease. *European Journal of Internal Medicine*. ISSN 1879-0828, 2012, vol. 23, no. 1, p.9–14.
- [10] BRIANI, CH., SAMAROO, D., ALAEDINI, A. Celiac disease: from gluten to autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*. ISSN 1568-9972, 2008, vol. 7, no. 8, p. 644–650.
- [11] SEALEY-VOYKSNERA, J. A., KHOSLAB, CH., VOYKSNERC, R. D., JORGENSONA, J. W. Novel aspects of quantitation of immunogenic wheat gluten peptides by liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. ISSN 0021-9673, 2010, vol. 1217, no. 25, p. 4167–4183.

- [12] STRAUCH, K., A., COTTER, V., T. Celiac disease: an overview and management for primary care nurse practitioners. *The Journal for Nurse Practitioners*. ISSN 1555-4155, 2011, vol. 7, no. 7, p. 588-599.
- [13] ELLI, L., RONCORONI L., HILS M., PASTERNAK, R., BARISANI D., TERRANI C., VAIRA V., FERRERO S., BARDELLA, M. T. Immunological effects of transglutaminase-treated gluten in coeliac disease. 2012, *Human Immunology*, vol. 10, p. 992-997.
- [14] MARSH, M. N. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). 1992, *Gastroenterology*, vol. 102, issue 1, p. 330-354.
- [15] NIEWINSKI, M.M. Advances in celiac disease and gluten-free diet. *Journal of the American Dietetic Association*. ISSN 0002-8223, 2008, vol. 108, no. 9, p. 661-672.
- [16] DUGGAN, J.M. Coeliac disease: the great imitator. *Medical Journal of Australia*. ISSN 1326-5377, 2004, vol. 180, no. 10, p. 524-526.
- [17] TENNYSON, C. A., LEWIS S. K., GREEN, P. H. R. New and Developing Therapies for Celiac Disease. *Therapy Advances in Gastroenterology*. 2009, vol. 2, issue 5, p. 303-309.
- [18] IQBAL, A., KHALIL, I. A., ATEEQ, N., KHAN, M. S. Nutritional quality of important food legumes. *Food Chemistry*. ISSN 0308-8146, 2006, vol. 97, no. 2, p. 331-335.
- [19] STAZI, A.V., TRECCA, A., TRINTI, B. Osteoporosis in celiac disease and in endocrine and reproductive disorders. *World Journal Gastroenterology*. ISSN 2219-2840, 2008, vol. 14, no. 4, p. 498-505.
- [20] HALFDANARSON, T.R., LITZOW, M.R., MURRAY, J.A. Hematological manifestations of celiac disease. *Blood, Journal of The American Society of Hematology*. ISSN 1528-0020, 2006, vol.109, no. 2, p. 412-421.
- [21] YUST, M. M., PEDROCHE, J., GIRÓN-CALLE, J., ALAIZ, M., MILLÁN, F., VIOQUE, J. Production of face inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. *Food Chemistry*. 2003, vol. 81, p. 363-369.
- [22] DRAGO, S., EL ASMAR, R., GRAZIA, C. M., TRIPATHI, A., SAPONE, A., THAKAR, M., IACONO, G., CARROCCIO, A., ZAMPINI L., FASAMO A. Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. 2006, vol. 41, issue 4, p. 408-419.
- [23] HALÁSOVÁ Renáta. *Aplikácia mikrobiálnych peptidáz pri úprave bielkovinovej suroviny pre potreby humánnej výživy*. Nitra, 2010. Diplomová práca. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Fakulta biotechnológie a potravinárstva.

- [24] MERZ, M., EISELE T., CLAASEN W., APPEL D., RABE S., STRESSLER T., FISCHER L. Continuous long-term hydrolysis of wheat gluten using a principally food-grade enzyme membrane reactor system. *Biochemical Engineering Journal*. 2015, vol. 99, p. 114-123.
- [25] CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysed in human nutrition. *Trends Food Science Technology*. 2000, vol. 11, issue 7, p. 254-262.
- [26] RIZZELLO, C.G., CURIEL, J. A., NIONELLI, L., VINCENTINI, O., DI CAGNO, R., SILANO, M., GOBBETTI, M., CODA, R. Use of fungal proteases and selected sourdough lactic acid bacteria for making wheat bread with an intermediate content of gluten. *Food Microbiology*. 2014, vol. 37, p. 59-68.
- [27] FUENTES-PRADO, E., MARTINEZ-PADILLA, L. P. Colloidal stability and dilatational rheology at the air-water interface of peptides derived from thermal-acidic treated wheat gluten. *Food Hydrocolloids*. 2014, vol. 41, p. 210-218.
- [28] NORDQVIST, P., LAWThER, M., MALMSTROM, E., KHABBAZ, F. Adhesive properties of wheat gluten after enzymatic hydrolysis or heat treatment – A comparative study. *Industrial Crops and Products*. 2012, vol. 38, p. 139-146.
- [29] AGYARE, K. K., KWAKU, A., XIONG, Y. L. Emulsifying and foaming properties of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate as influenced by pH, temperature and salt. *Food Hydrocolloids*. 2009, vol. 23, issue 1, p.72-81.
- [30] SONDERGAARD, A.H. - GRUNERT, G. K.- SCHOLDERER, J. Consumer Attitudes to Enzymes in Food Production. *Trends in Food Science & Technology*. 2005, vol.16, no. 10, p. 466-474. ISSN 0921-2244
- [31] IBRAHIM, C. O. Development of applications of industrial enzymes from Malaysian indigenous microbial sources. *Bioresource Technology*. 2008, vol. 99, issue 11, p. 4572-4582.
- [32] CERA, D.C. Serine proteases. *IUBMB Life*. 2009, vol.61, no. 5, p. 510 -515.
- [33] PRABUCKA, B., DRZYMALA, A., GRABOWSKA, A. Molecular cloning and expression analysis of the main gliadin-degrading cysteine endopeptidase EP8 from triticale. *Journal of Cereal Science*. 2013, vol. 58, issue 2.
- [34] MARTÍNEZ, A.T.; RUIZ-DUEÑAS, F.J.; MARTÍNEZ, M.J.; RIO, J.C., GUTIÉRREZ, A. Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Current Opinion in Biotechnology*. 2009, vol. 20, no. 3, p. 348-357.
- [35] WEIHOFEN, A., BINNS, K., LEMBERG, M.K., ASHMAN, K., MARTOGLIO, B. Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease. *Science*. 2002, vol. 296, p. 2215-2218.

- [36] BARRET, A. J., RAWLINGS, N. D., WOESSNER, J. F. Introduction metallopeptidases and their clans. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 2004, vol. 1, p. 325-370. ISBN 0-12-079610-4.
- [37] TEMUSSI, P. A. The good taste of peptidases. *Journal of Peptide Science*. 2011, vol. 18, p. 73-82.
- [38] SAHA, B. C., HAYASHI, K. Debittering of protein hydrolyzates. *Biotechnology Advances*. 2001, vol. 19, p. 355-370.
- [39] HARTMANN, G., KOEHLER, P., WIESER, H. Rapid degradation of gliadin peptides toxic for coeliac disease patients by proteases from germinating cereals. *Journal of Cereal Science*. 2006, vol. 44, issue 3, p. 368-371.
- [40] LAZARIDOU, A., CHORNICK, T., BILLIADERIS, C. G., IZYDORCZYK, M. S. Compositoin and molecular structure of polysaccharides released from barley endosperm cell walls by sequential extraction with water, malt enzymes, and alkali. *Journal of Cereal Science*. 2008, vol. 48, issue 2, p. 304-318.
- [41] WEI, Q. – ZHIMIN, H. Enzynatic hydrolysis of protein: Mechanism of kinetic model. *Journal Frontiers of chemistry in China*. 2006, vol.1, no.3, p. 308-314. ISSN 1673-3614
- [42] CINELLI, B. A., CASTILHO, L. R., FREIRE, D. M. G., CASTRO, A. M. A brief review on the emerging technology of ethanol production by cold hydrolysis of raw starch. *Fuel*. 2015, vol. 150, p. 721-729.
- [43] WARREN, F. J., ZHANG, B., WALTZER, G., GIDLEY, M. J., DHITAL, S. The interplay of alpha-amylase and amyloglucosidase activities on the digestion of starch in in vitro enzymic systems. *Carbohydrate Polymers*. 2015, vol. 117, p. 192-200.
- [44] RODRIGUÉZ, S. D., BERNIK, D. L. Flavor release by enzymatic hydrolysis of starch samples containing vanillin-amylose inclusion complexes. *LWT – Food Science and Technology*. 2014, vol. 59, issue 2, p. 635-640.
- [45] HERNANDEZ-JAIMES, C., LOBATO-CALLEROS, C., SOSA, E., BELLO-PÉREZ, L. A., VERNON-CARTER, E. J., ALVAREZ-RAMIREZ, J. Electrochemical characterization of gelatinized starch dispersions: Voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy on platinum surface. *Carbohydrate Polymers*. 2015, vol. 124, p. 8-16.
- [46] TAWIL, G., VIKSO-NIELSEN, A., ROLLAND-SABATÉ, A., COLONNA, P., BULÉON, A. Hydrolysis of concentrated raw starch: A new very efficient alpha amylase from *Anoxybacillus flavothermus*. *Carbohydrate Polymers*. 2012, vol. 87, p. 46-52.
- [47] DURA, A., BLASZCZAK, W., ROSELL, C.M. Functionality of porous starch obtained by amylase or amyloglucosidase treatments. *Carbohydrate Polymers*. 2014, vol. 101, p. 837-845.

- [48] BELL, L. N., HAGEMAN, M. J., MURAOKA, L. M. Thermally induced denaturation of lyophilized bovine somatotropin and lysozyme as impacted by moisture and excipients. *Journal of Pharmaceutical Science*. 1995, vol. 84, issue 6, p. 707-712.
- [49] GRAUSGRUBER H., SCHEIBLAUER J., SCHÖNLECHNER R., RUCKENBAUER P., BERGHOFER E. Variability in chemical composition and biologically active constituents of cereals. *Vollmann Journal*. 2004, p. 23-26.
- [50] BIEL, W., BOBKO, K., MACIOROWSKY, R. Chemical composition and nutritive value of husked and naked oats grain. *Journal of Cereal Science*. 2009, vol. 49, p. 413-418.
- [51] WANG, H., CHEN, H., HAO, G., YANG, B., FENG, Y., WANG, Y., FENG, L., ZHAO, J., SONG, Y., ZHANG, H., CHEN, YQ., CHEN, W. Role of the phenylalanine-hydroxylating system in aromatic substance degradation and lipid metabolism in the oleaginous fungus *Mortierella alpina*. *Application Environment Microbiology*. 2013, vol. 79, issue 10, p. 3225-3233.
- [52] STUPER-SZABLEWSKA, K., BUŠKO, M., GÓRAL, T., PERKOWSKI, J. The fatty acid profile in different wheat cultivars depending on the level of contamination with microscopic fungi. *Food Chemistry*. 2014, vol. 153, p. 216-223.
- [53] DODOK L., SZEMES V. Laboratórne kontrolné metódy pre pekársku a cukrársku prax. Gomini. 1998, p. 80.
- [54] ŽITNÝ, B. Optimalizácia režimu prípravy pšeničných ciest miesením. Autoreferát dizertačnej práce. Slovenská poľnohospodárska univerzita, Nitra, 2010.
- [55] WHISTLER, R. L., BEMILLER, J. N., PASCHALL, E.F. Starch: Chemistry and Technology (Second Edition). 1984, ISBN: 978-0-12-746270-7.
- [56] ŠTEIN, I. Scukrovací proces a jeho vplyv na aktivitu amylázy. *Chemické zvesti*. 1950, č. 5, s. 225-230.
- [57] CALDERON SANTOYO, M., LOISEAU, G., RODRIGUEZ SANOJA, R., GUYOT, J.P. Study of starch fermentation at low pH by *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 reveals uncoupling between growth and alpha-amylase production at pH 4.0. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, vol. 80, p. 77-87.
- [58] HASHEMI, M., MOUSAVI, S. M., RAZAVI, S. H., SHOJAOSADATI, S. A. Comparison of submerged and solid state fermentation systems effects on the catalytic activity of *Bacillus* sp. KR-8104 alpha-amylase at different pH and temperatures. *Industrial Crops and Products*. 2013, vol. 43, p. 661-667.
- [59] HANES, CH. S. Studies on plant amylases. *Biochem Journal*. 1932, vol. 26, issue 5, p. 1406-1421.

- [60] SONI, S. K., KAUR, A., GUPTA, J. K. A solid state fermentation based bacterial alpha-amylase and fungal glucoamylase system and its suitability for the hydrolysis of wheat starch. *Process Biochemistry*. 2003, vol. 39, issue 2, p. 185-192.
- [61] CIAN, R. E., VIOQUE, J., DRAGO, S. R. Structure-mechanism relationship of antioxidant and ACE I inhibitory peptides from wheat gluten hydrolysate fractionated by pH. *Food Research International*. 2015, vol. 69, p. 216-223.
- [62] YANG, F., RUSTAD, T., XU, Y., JIANG, Q., XIA, W. Endogenous proteolytic enzymes – A study of their impact on cod (*Gadus morhua*) muscle proteins and textural properties in a fermented product. *Food Chemistry*. 2015, vol. 172, p. 551-558.
- [63] GEANEY, F., FITZGERALD, S., HARRINGTON, J. M., KELLY, C., GREINER, B. A., PERRY, I. J. Nutrition knowledge, diet quality and hypertension in a working population. *Preventive Medicine Reports*. 2015, vol. 2, p. 105-113.
- [64] LUOTO, S., JIANG, Z., BRINCK, O., SONTAG-STROHM, T., KANERVA, P., BRUINS, M., EDENS, L., SALOVAARA, H., LOPONEN, J. Malt hydrolysates for gluten-free applications: Autolytic and proline endopeptidase assisted removal of prolamins from wheat, barley and rye. *Journal of Cereal Science*. 2012, vol. 56, p. 504-509.
- [65] VERHOECKX, K. C. M., VISSERS Y. M., BAUMERT, J. L., FALUDI, R., FEYS, M., FLANAGAN, S., HEROUET-GUICHENEY, C., HOLZHAUSER, T., SHIMOJO, R., WICHERS, H., KIMBER, I. Food processing and allergenicity. *Food and Chemical Toxicology*. 2015, vol. 80, p. 223-240.
- [66] KONG, X., ZHOU, H., QIAN, H. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. *Food Chemistry*. 2007, vol. 102, p. 759-763.
- [67] BERENDS, P., APPEL, D., EISEL, T., RABE, S., FISCHER, L. Performance of enzymatic wheat gluten hydrolysis in batch and continuous processes using Flavourzyme. *LWT – Food Science and Technology*. 2014, vol. 58, p. 534-540.

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

8.1 Použité skratky

Skratka	Význam skratky
AJ	amylografická jednotka
AFM	mikroskopia atomárnych síl
AM	amyláza
AMG	amyloglukozidáza
AP	amylopektín
BZL	bezlepkový
CD	celiakia
FUNG	komerčný preparát fungálnej proteázy
GF	bezgluténový
GLUAMK	komerčný enzymatický preparát glukoamylázy
HMW	vysoká molekulová hmotnosť
HLA	ľudský leukocitový antigén
MT3K	komerčný enzymatický preparát amylázy
LMW	nízka molekulová hmotnosť
SD	smerodajná odchýlka
TG	transglutamináza

9 ZOZNAM POUŽITÝCH PRÍLOH

9.1 Použité prílohy

Príloha č. 1.

