

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Rezistentní škrob v českém pečivu**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Karolína Konopásková**

**Vedoucí práce: doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.**

© 2015 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Rezistentní škrob v českém pečivu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12. dubna 2015

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Jaroslavovi Havlíkovi, Ph.D. za odborné vedení, poskytnutí mnoha cenných rad a času, který mi věnoval. Dále bych ráda poděkovala Ing. Zuzaně Hroncové, Ing. Tereze Volšátové a Ing. Ivovi Doskočilovi, kteří mě svými zkušenostmi připravili na experimentální práci v laboratoři. Poděkování patří i mé rodině za jejich podporu při mém studiu.

# Rezistentní škrob v českém pečivu

## Souhrn

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo určit množství rezistentního škrobu (RS) v českém pečivu a zjistit, zda existuje rozdíl v jeho obsahu v konvenčním a rozpékaném pečivu ze zamrazeného polotovaru. RS je z pohledu lidské výživy považován za prospěšný, je substrátem pro střevní mikroflóru, snižuje množství střevních patogenů, váže toxické metabolity a přispívá k celkové rovnováze bakteriálních druhů rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* spp. RS snižuje postprandiální glukosovou a insulinovou odezvu, což zlepšuje kontrolu glykémie u diabetiků.

V rámci naší studie byl stanoven obsah rezistentního škrobu dvaceti oblíbených druhů pečiva běžně dostupných na našem trhu, které byly podrobeny měření obsahu RS s pomocí enzymatického kitu Megazyme (AOAC Method 2002.2 a AACC Method 32-40.01). Tato metoda využívá princip hydrolýzy škrobu na glukózu blízky fyziologickým podmínkám pomocí pankreatické  $\alpha$ -amylasy, amyloglukosidasy a pH, s následným kolorimetrickým stanovením glukosy.

První den obsahovalo konvenční pečivo méně rezistentního škrobu, celkového škrobu a sušiny než pečivo rozpékané ze zamrazeného polotovaru, a to o 37,1 % méně RS, výsledek ovšem nebyl průkazný ( $P=0,05$ ). Při sledování trendu vývoje rezistentního škrobu v průběhu 4 dnů stárnutí pečiva nebyl mezi oběma druhy rozdíl, přestože i 4. den obsahovalo konvenční pečivo škrobu neprůkazně méně ( $P>0,05$ ). Nárůst rezistentního škrobu v českém pečivu vlivem stárnutí pečiva není velmi vysoký, u obou druhů pečiva se v průběhu 4 dnů stárnutí zvýšil o 15,9 %, resp. o 10,0 % u konvenčního a o 28,6 % u rozpékaného pečiva.

Neprůkazný vyšší podíl mezi oběma druhy pečiva je způsoben velkou variabilitou a heterogenitou skupiny, obsahu semen, ořechů a jiných zdrojů RS, dále používáním emulgátorů, přísad RS jako pomocné látky a cyklu zmrazení a rozmrazení, který má na obsah vliv.

**Klíčová slova:** rezistentní škrob, pekárenské produkty, zamrazené pekárenské produkty, dietní vláknina.

# Resistant starch in Czech Bakery Products

## Summary

The aim of this thesis was to analyse the resistant starch content (RS) in Czech bakery products and to determine major difference between conventional and pre-baked bread. The RS has the fibre fraction of the food has many benefits in healthy diet. It is a substrate for the colonic microflora, it is reducing intestinal pathogens, binds toxic metabolites and elevates their excretion and supports balanced content of bifidobacteria and lactobacilli. The RS improves glycaemic control in diabetics diet because it reduces postprandial glucose and insulin response.

Within this study, we analysed twenty selected bakery products available on the Czech market and determined the RS content at day of purchase and for other three days of aging. The RS was detected with Megazyme kit (AOAC Method 2002.2 and AACC Method 32-40.01). Principle of this method is a starch hydrolysis to glucose using pancreatic  $\alpha$ -amylase, amyloglucosidase and pH with follow-up colorimetric determination. This method is thus very close to physiological conditions.

At the time of purchase, samples of conventional bakery goods differed insignificantly from the samples of pre-baked goods, in resistant starch, total starch and dry matter. Conventional breads contained approx. 37,1 % less RS compared to pre-baked breads, but this was not significant. During the aging for four days RS content in pre-baked rise by approx. 28.6 %, while only 10,0 % increase was seen for conventional breads. Mean RS rise for all breads was 15.9 %. However, difference for both breads was not significant due to very high variation between replicates.

High variations in the samples was partially caused by the method selected whereas the pre-baked goods were rich in seeds, nuts and other sources of RS possibly leading to unequal sample distribution. The non-significant differences in both bakery goods groups might be due to cycles of freezing and thawing or use of emulsifiers.

**Keywords:** resistant starch, bakery goods, frozen bakery goods, dietary fibre.

# Obsah

|   |    |
|---|----|
| 1 Úvod.....   | 7  |
| 2 Literární rešerše.....  | 9  |
| 2.1 Rezistentní škrob a souvislosti jeho vzniku .....                       | 9  |
| 2.2 Rezistentní škrob ve výživě člověka .....                               | 11 |
| 2.3 Pekárenské suroviny a jejich vliv na vznik rezistentního škrobu.....    | 13 |
| 2.4 Pekárenské technologie a jejich vliv na vznik rezistentního škrobu..... | 15 |
| 2.5 Metody stanovení rezistentního škrobu .....                             | 17 |
| 3 Hypotéza a cíl práce .....  | 19 |
| 4 Materiál a metody .....   | 20 |
| 4.1 Materiál .....  | 20 |
| 4.2 Metody .....  | 24 |
| 4.2.1 Odběr vzorků a jejich příprava .....                                  | 24 |
| 4.2.2 Stanovení obsahu rezistentního škrobu.....                            | 24 |
| 4.2.3 Stanovení obsahu nerezistentního škrobu.....                          | 25 |
| 4.2.4 Stanovení celkového obsahu škrobu.....                                | 25 |
| 4.2.5 Principy použité metody .....   | 25 |
| 4.2.6 Statistické zpracování .....  | 26 |
| 5 Výsledky a diskuze .....  | 27 |
| 5.1 Rozpékané pečivo ze zamrazeného polotovaru .....                        | 28 |
| 5.2 Konvenční pečivo.....   | 28 |
| 5.3 Srovnání konvenčního a rozpékaného pečiva .....                         | 29 |
| 5.4 Zhodnocení obsahu rezistentního škrobu v průběhu stárnutí pečiva .....  | 30 |
| 6 Závěr .....   | 33 |
| 7 Seznam literatury .....   | 34 |
| 8 Samostatné přílohy.....   | 39 |
| 8.1 Protokol.....   | 39 |

# 1 Úvod

Oblíbenost pečiva je nejen u české populace vysoká. Dnešní trh je nasycen pekárenskými produkty různých odlišností, zákazník si proto vybírá dle vlastních preferencí. Je obecně známo, že pečivo je rychlým zdrojem energie a jeho nadbytek v jídelníčku může být příčinou obezity. Na základě tohoto mínění v poslední době zesiluje trend vyhledávání zdravějších druhů pečiva, jako je například pečivo celozrnné či vícezrnné, a stoupá zájem o pečivo s podílem žitné mouky (Kopáčová, 2007). Druhým trendem je tendence omezování konzumace pečiva (ČSÚ, 2013). Faktorem navádějícím populaci ke změně životního stylu je hlavně informovanost o vysokých výskytech civilizačních chorob.

Česká republika je na předních místech evropských i celosvětových statistik v počtu onemocnění kolorektálním karcinomem. Obezita v naší zemi postihuje 21 % obyvatel, 34 % obyvatel se pohybuje nad hranicí normální váhy a počet lidí trpících diabetem stále roste (VZP, 2011). Těmto chorobám lze ve většině případech předejít stravovacími a pohybovými návyky. Má proto smysl informovat o složení potravin, jejich nutričních hodnotách a podpořit tak prevenci těchto chorob.

U potravin, které se konzumují v hojné míře, je tato potřeba ještě vyšší. Zaměřili jsme se na pekárenské produkty z běžné obchodní sítě supermarketů, které se v naší zemi běžně konzumují. Majoritní složkou pečiva jsou škroby. Mimo rychle a pomalu stravitelného škrobu však pečivo obsahuje i retrogradovaný škrob, který je rezistentní vůči enzymatickému štěpení, díky čemuž přechází až do tlustého střeva, kde má podobnou funkci jako vláknina.

Při fermentaci rezistentního škrobu (RS) v tlustém střevě vzniká velké množství kyseliny máselné a jejích solí. *In-vitro* testy ukazují, že RS stimuluje bakterie produkující tuto kyselinu. Kyselina máselná je energetický substrát pro buňky střevního epitelu a inhibuje tvorbu zhoubných buněk. RS proto hraje preventivní roli v incidenci nádorů tlustého střeva, ale i obezitě a dalších onemocnění, díky jeho přeměně při trávení. RS je metabolizován po 5–7 hodinách po konzumaci, na rozdíl od běžného tepelně upraveného škrobu, který je štěpen téměř okamžitě po konzumaci. Dlouhý proces trávení RS zvyšuje pocit sytosti a snižuje inzulinémii a postprandiální glykémii, čehož lze pozitivně využít v jídelníčku diabetika (Pereira et al., 2002).

V roce 1982 byla vůbec poprvé při měření neškrobových polysacharidů zjištěna přítomnost frakce škrobu, která je rezistentní vůči enzymatickému trávení (Englyst et al., 1982). Jejich práci rozšířil Berry Colin S., zaměstnaný Englystem, který rozvinul postup měření obsahu RS využitím  $\alpha$ -amylasy, ovšem s vynecháním počátečního zahřátí na 100 °C,

čímž se více přiblížil fyziologickým podmínkám (Berry, 1986). Za těchto podmínek byl změřen vyšší obsah RS ve vzorcích. Zjištění bylo následně potvrzeno Englystem et al., pomocí studie s využitím ileostomie (Englyst and Cummings, 1985, 1986, 1987).

Počátkem 90. let minulého století byl fyziologický význam RS plně objasněn. Během evropského výzkumného programu EURESTA bylo vyvinuto několik nových či upravených metod stanovení RS. Příkladem může být stanovení, při kterém jsou vzorky žvýkány a po přidavku pepsinu se smísí s pankreatickou  $\alpha$ -amylasou a amyloglukosidasou za stálého třepání ve vodní lázni při 37 °C, pH 5 a po dobu 15 hodin. Centrifugací se získá sraženina obsahující RS, která se promyje octanovým pufrům a znovu centrifuguje, RS je zde štěpen kombinací účinku dimethylsulfoxidu, tepla a termostabilní  $\alpha$ -amylasy (Muir and O'Dea, 1992). Další metody se odlišují koncentrací použitých enzymů, pH inkubace a využitím či nevyužitím ethanolu po inkubaci s  $\alpha$ -amylasou.

Obecně v naší zemi stoupá nabídka pečiva rozpečeného ze zamrazených polotovarů. Cílem naší práce bylo zjistit, zda v důsledku zmrazování je obsah retrogradovaného škrobu RS3 vyšší než u konvenčního pečiva.



## 2 Literární rešerše

### 2.1 Rezistentní škrob a souvislosti jeho vzniku

Jednu z hlavních složek lidské potravy tvoří škroby, polysacharidy zásobního charakteru vyskytující se v rostlinách a jejich částech. Škrob se skládá z lineární amylosy, která je tvořená  $\alpha$ -D(1-4) glukosovými jednotkami, a z větveného amylopektinu obsahující  $\alpha$ -D(1-4) a  $\alpha$ -D(1-6) vazby. Poměr těchto dvou polysacharidů ovlivňuje fyzikální vlastnosti daného škrobu (Sajilata et al., 2006).

Podle stravitelnosti škrob rozdělujeme na několik skupin: rychle stravitelný škrob, pomalu stravitelný škrob a škrob rezistentní. Rychle stravitelný a pomalu stravitelný škrob jsou druhy škrobu, které jsou zcela tráveny enzymy v trávicím traktu, kdežto škrob rezistentní není přístupný pro trávicí enzymy (Šárka et al., 2013).

RS je klasifikován do čtyř hlavních skupin s označením RS1–RS4. Tyto druhy RS se odlišují v rezistenci trávení v tenkém střevě a ve výskytu v potravinových zdrojích. RS1 je trávení nepřístupný škrob, jelikož je zachycen v celých nebo částečně umletých zrnech nebo semenech, a to v buněčné stěně nebo v proteinové matici. Kromě výskytu v zrnech a semenech ho nacházíme ještě v luštěninách a těstovinách. Mezi RS2 patří škrobové granule s typem krystalinity B nebo C obsažené v syrových bramborách, zelených banánech a ve vysoce-amylosovém kukuřičném škrobu. RS3 je retrogradovaný škrob vyskytující se v uvařených a následně zchlazených bramborách, pečivu, kukuřičných lupíncích a potravinových produktech, které byly dlouhodobě a opakovaně ošetřovány vlhkým teplem. RS4 je chemicky upravený škrob k rezistenci enzymatickému trávení. Tímto škrobem se fortifikují potraviny a nápoje (Fuentes-Zaragoza et al., 2010).

Hlavním zdrojem škrobů v potravě člověka jsou obilniny. Obilné škroby pocházející z pšenice, žita, ječmene a tritikale mají ve srovnání s hlízkovými škroby dva typy škrobových zrn - větší škrobová zrna typu A a menší škrobová zrna typu B (Šárka et al., 2013).

Škrobová zrna typu A obsahují více amylosy, mají nižší teplotu želatinizace a vyšší přechod k entalpii oproti škrobovým zrnům typu B (Van Hung and Morita, 2005).

Tato škrobová zrna jsou nerozpustná ve studené vodě, ale mohou absorbovat molekuly vody, a tím bobtnat. Bobtnání se zvyšuje při zahřívání vodné suspenze, a tím dochází k procesu želatinizace, neboli mazovatění. Želatinizace vždy předchází retrogradaci a je prvním krokem ke vzniku RS. Při želatinizaci přechází škrobová zrna z uspořádaného stavu

do neuspořádaného díky působení intenzivních vibrací molekul, které štěpí původní intermolekulární a intramolekulární vodíkové vazby, takže se škrob stává amorfním. Při pronikání molekuly vody dovnitř zrna současně pronikají molekuly amylosy ze zrna do vodného prostředí. Vzniklá disperze obsahuje molekulárně dispergované částice (hlavně amylosu) a zbytky nabobtnalých skeletů škrobových zrn, což se projeví v tokovém chování (Šárka et al., 2013).

Amylosa je v roztoku v podobě nahodile uspořádaných šroubovic, které po ochlazení reasociují za vzniku dvojitých šroubovic, které jsou stabilizovány vodíkovými vazbami. Proces, při kterém tyto dvojšroubovice vznikají, se nazývá retrogradace. Retrogradace je tedy pomalá rekrystalizace škrobových zrn zchlazením či dehydratací a je konečným krokem, díky kterému vzniká RS. Dvojšroubovice vzniklé procesem retrogradace vytvářejí hexagonální krystalickou strukturu, jejíž glykosidické vazby nejsou přístupné pro  $\alpha$ -amylosu (Haralampu, 2000).

Ani běžná tepelná úprava potravin obsahující RS typu RS3 nezpůsobuje disociaci amylosové krystalinity, což činí krystalinickou amylosu velmi rezistentní vůči enzymatické hydrolýze v trávicím traktu (Šárka et al., 2013). První dva typy rezistentního škrobu RS1 a RS2 jsou po vhodné tepelné úpravě potravy pomalu, ale plně stravitelné, kdežto RS typu RS3 brání trávení zcela (Fuentes-Zaragoza et al., 2010).

Obsah RS2 můžeme zvýšit zahříváním vodné suspenze obsahující vysoceamylosové škrobové granule za současné přítomnosti inhibitorů želatiny, zahříváním v kyselých vodných roztocích alkoholu či zahříváním s minimálním množstvím vody (Šárka et al., 2013). Množství rezistentního škrobu typu RS3 zvýšíme opakovaným zahřátím suspenze v autoklávu a následným zchlazením (Sajilata et al., 2006).

K tomuto kroku se využívá škrob s vysokým obsahem amylosy, jako je například vysoce-amylosový kukuřičný škrob, u něhož se uvádí výtěžek až 48 %, nebo se v amylopektinu enzymaticky rozštěpí vazby  $\alpha$ -D-(1-6), kdy po ukončení hydrolýzy v roztoku zůstávají lineární řetězce amylosy, u kterých se výtěžnost uvádí až 47 %. Obsah RS3 lze zvýšit i využitím želatiny škrobu za velmi vysokého tlaku s předchozím využitím extruze škrobu či kyselé hydrolýzy. Obsah chemicky modifikovaného škrobu typu RS4 je možné zvýšit například kyselou hydrolýzou škrobu z amyloječmene opakovaným zahřátím a zchlazením (Šárka et al., 2013).

Vysoký obsah RS nalzáme v luštěninách a škrobech z nich izolovaných, po tepelném upravení však RS u luštěnin s vysokým obsahem RS klesá. Naopak luštěniny s nízkým obsahem RS po tepelném upravení prokazují vysoký nárůst obsahu RS, tento jev souvisí

s retrogradací amylosy luštěninového škrobu. Nejvyšší zvýšení obsahu RS po tepelné úpravě bylo zjištěno u izolovaného škrobu a to proto, že byl škrob vyčleněn z proteinové matrice. Ale údaje pro izolované škroby si žádají ověření, jelikož se údaje od různých autorů liší ve škrobech podobného typu (Šárka et al., 2013).

U obilných produktů po tepelné úpravě dochází ke zvýšení obsahu RS opět kvůli retrogradaci amylosy. Rezistenci škrobu při digesci může tedy ovlivňovat příprava a skladování potravin (Sajilata et al., 2006).

## 2.2 Rezistentní škrob ve výživě člověka

Škroby jsou významným zdrojem energie v lidské stravě, je proto jasné, že mají specifický vliv na zdraví člověka. Jejich nutriční hodnotu ovlivňuje struktura jejich molekuly, která se po tepelné, mechanické či chemické úpravě stává biologicky přístupnější. Rychle stravitelný škrob je spjatý s vysokým glykemickým indexem, což má negativní vliv na civilizační onemocnění jako je diabetes, kardiovaskulární onemocnění a obezita (Šárka et al., 2013). Rychle i pomalu stravitelné škroby jsou při trávení zcela hydrolyzovány. RS hydrolyzován není, proto se zařazuje mezi nevyužitelné polysacharidy či vlákninu, se kterou ho spojuje podobná funkce (Sajilata et al., 2006).

K dietní vláknině řadíme rostlinné polysacharidy, oligosacharidy a lignin, jejichž společnou vlastností je odolnost vůči enzymatickému štěpení v tenkém střevě. Vlákninu dále dělíme na rozpustnou, která je fermentována bakteriemi v tlustém střevě, a vlákninu nerozpustnou, která není rozložitelná. Fyziologické chování RS se podobá hlavně rozpustné vláknině, jako je například guma guar. RS má stejně jako rozpustná vláknina pozitivní vliv na zdraví tlustého střeva. Snižuje atrofii střevního epitelu a zvyšuje množství produkce buněk střevních krypt. Jako rozpustná vláknina i RS snižuje cholesterol a triglyceridy v krvi (Fuentes-Zaragoza et al., 2010).

Další společnou vlastností je, že RS je také substrátem pro mikroorganismy tlustého střeva, které ho metabolizují na mastné kyseliny s krátkým řetězcem. Mikroflóra tlustého střeva díky RS vytváří kyselinu octovou, propionovou a máselnou. Řada vědeckých studií došla k názoru, že retrogradovaný RS je hlavním a největším zdrojem pro tvorbu kyseliny máselné, která je důležitým zdrojem energie pro buňky střevního epitelu (Brouns et al., 2002). Kyselina máselná a propionová má také potenciální vliv na snížení rizika kolorektálního karcinomu (Topping and Clifton, 2001).

Studie provedená na prasatech naznačuje, že butyrát produkovaný RS typu RS3 je více distálně fermentován v kolonu a je více prospěšný pro zdraví tlustého střeva než RS2 pocházející ze syrových brambor. Jelikož prasata mají velmi podobnou trávicí soustavu jako člověk, dá se předpokládat stejný efekt (Martin et al., 2000).

Příjem RS také snižuje střevní pH, snižuje množství plynu vyprodukované během fermentace, snižuje množství střevních patogenů, množství toxických metabolitů ve střevě a sekundární žlučové kyseliny, zlepšuje absorpci hořčíku a vápníku a má pozitivní vliv na rovnováhu bakteriálních druhů rodu *Bifidobacterium* spp. a *Lactobacillus* spp. Příjem RS zvyšuje objem stolice, snižuje symptomy průjmových onemocnění, ale při zvýšeném příjmu může mít mírné projímavé účinky. Mezi další zdravotní přínosy RS patří stimulace imunitního systému a snížení postprandiální glukosové a insulinové odezvy, což může vést ke zlepšení kontroly glykémie u diabetiků (Brouns et al., 2002).

Konzumace RS v posledních letech však klesá, a to pravděpodobně kvůli změně stravovacích návyků rychle se rozvíjející průmyslové společnosti, kdy se snížila především konzumace chleba. Jedna studie zaznamenala snížení příjmu RS ve Francii z 7–9 g/den na 3–7 g/den během 40 let (Brouns et al., 2002).

Spotřeba ve světě se v různých zemích liší. V Evropské unii činí asi 3 až 6 g/den. V USA je denní příjem mírně vyšší 3–8 g, v Austrálii 5 až 7 g a nejvyšší je v Indii a Číně, kde činí 10–18 g/den. K denní spotřebě nejvíce přispívá chléb, těstoviny a zelenina. V České republice je denní příjem RS asi 3,2 g, což v porovnání s doporučenou dávkou 5 g/den a ve srovnání s ostatními zeměmi, není mnoho (Šárka et al., 2013).

RS snižuje energetickou hodnotu potravy, proto může být náhradou za běžné škroby či vlákninu, a tím obohatit potravinu, která se stane tzv. funkční. Hodnota energie RS je přibližně 8 kJ/g (2 kcal/g), což je mnohem nižší než hodnota energie stravitelných škrobů, která činí 15 kJ/g (4,2 kcal/g) (Liversey, 1994).

Dalším pozitivem k fortifikaci potravin jsou lepší senzorické vlastnosti, kdy RS na rozdíl od vlákniny nepůsobí tak hrubým chuťovým vjemem. Obohacování potravin RS může díky jeho příznivým účinkům na zdraví zlepšit zdravotní stav populace. V potravinářském průmyslu RS můžeme také využít jako synbiotikum v jogurtech, díky jeho podpoře růstu příznivých mikroorganismů. Na rozdíl od želírujících látek na bázi polysacharidů jako je psyllium a guma guar, může být RS přijímán jako podstatná složka potravy. Ve farmaceutickém průmyslu může být využit jako filmotvorná látka či plnivo tablet, a tím umožnit uvolnění léčiva až v tlustém střevě (Šárka et al., 2013).

## 2.3 Pekárenské suroviny a jejich vliv na vznik rezistentního škrobu v pečivu

První zmínky o pečení chleba se datují okolo 11 000 let př. n. l. v období neolitu. Archeologické důkazy z Itálie, Ruska a České republiky však ukazují, že mletí rostlin pro vytvoření mouky a následná výroba chleba započala již 28 000 let př. n. l. (Bobrow-Strain, 2012). Zpočátku se chléb konzumoval v podobě placek, později se začalo využívat kvásku nebo-li fermentace, což dalo vznik kynutému pečivu. K oblíbenému kváskovému chlebu se postupem času začalo vyrábět mnoho alternativ menšího pečiva, jako jsou housky, žemle, bagety, rohlíky apod. (Sicard and Legras, 2011).

Dnešní trh je nasycený mnoha druhy pečiva různých velikostí, tvarů a barev, které jsou odlišné nejen svou chutí a vzhledem, ale i složením. Jejich složení se obvykle liší ve složkách obohacující daný produkt jako například mák, slunečnicová semínka, dýňová semínka, sezamová a jiná semena, která tvoří posyp pečiva či jsou součástí těsta. Oblíbenost pečiva je velmi vysoká, v České republice v roce 2012 činila spotřeba chleba na obyvatele za rok 41,3 kg a spotřeba pšeničného a trvanlivého pečiva 65,4 kg (ČSÚ, 2013).

Základní složky, které jsou podstatné pro vznik pečiva, jsou však stejné. Mezi hlavní suroviny k výrobě pečiva patří mouka, voda, kvasinky a tuk. Mouka vzniká rozemletím zrn obilovin různých druhů. Využívá se mouky kukuřičné, žitné, ječné, ovesné, rýžové a nejčastěji pšeničné. Důležité je uvědomit si, že každá přísada použitá k pečení má funkční vliv na pečivo a může ovlivnit jeho kvalitu (Cauvain, 2012).

Pšenice setá (*Triticum aestivum*) je nejdůležitější pěstovanou plodinou pro pekárenské účely, jelikož má nejlepší vlastnosti pro pečení v porovnání s ostatními druhy plodin. Obilné zrna je tvořeno z 50–80 % sacharidy, proto jsou obilniny považovány za hlavní zdroje energie pro člověka (Dewettinck et al., 2008).

Přídavek sacharidů jako glukózy, maltózy, ribózy a sacharózy snižuje stupeň krystalizace a tak i množství RS. Při interakci molekul sacharidů s řetězcem škrobu dochází ke změně matice želatinizovaného škrobu, což je příčinou inhibice retrogradace, a tím i redukce RS. Přídavek sacharidů, který hraje roli při tvorbě rezistentní frakce škrobu při jeho gelovatění, musí však být ve vyšší koncentraci, a to v poměru 1 : 10 : 5 (konečný škrob : voda : sacharidy). Při gelovatění pšeničného škrobu se obsah RS snížil ze 3,4 % na 2,8 % v přítomnosti sacharózy nebo glukózy a snížení jeho obsahu na 2,5 % způsobila interakce s ribózou či maltózou (Sajilata et al., 2006).

Proteiny tvoří 8–12 % obsahu pšeničného zrna. Hlavními bílkovinami pšeničného zrna jsou gliadin a glutenin, které mají vysoký obsah prolinu a glutaminu (Dewettinck et al., 2008). Gliadin a glutenin ovlivňují vlastnosti těsta, a to hlavně tažnost a pružnost. Jsou to proteiny s nízkou nutriční hodnotou, dráždí imunitní systém, což způsobuje především glutenovou intoleranci. V běžném pšeničném pečivu však díky svým vlastnostem hrají důležitou roli.

Při testech s autoklavováním bramborového škrobu s přidáním albuminu a jejich následného zchlazení, byla zjištěna redukce RS, proto se předpokládá, že i doprovodný protein má vliv na snížení obsahu RS (Sajilata et al., 2006).

V pšeničném zrně je pouze 1,5–7 % lipidů zahrnující esenciální mastné kyseliny. Na lipidy jsou navázány vitaminy v nich rozpustné a fytoosteroly (Ruibal-Mendieta et al., 2004). Obsah mastných kyselin pšenice je podobný obsahu žita a ječmene, pšeničné lipidy jsou bohaté na kyselinu palmitovou a linolovou, žito však navíc obsahuje vyšší množství linolenové kyseliny (Chung and Ohm, 2000).

Dominantními polárními lipidy v membránách buňky jsou fosfolipidy, glykolipidy a galaktolipidy. Příjem těchto polárních lipidů může mít vliv na redukci absorpce cholesterolu (Sugawara and Miyazawa, 2001). Zvýšený obsah amylosy v amyloso-lipidovém komplexu snižuje množství RS. Avšak existují studie, které amyloso-lipidový komplex považují za jednu z forem RS (Sajilata et al., 2006).

Pšeničné zrno dále obsahuje další aktivní látky jako minerály, vitaminy, antioxidanty a fytochemikálie (Pereira et al., 2002). Mezi vitaminy obsažené v pšenici patří vitaminy rozpustné ve vodě, skupiny B jako thiamin, riboflavin, niacin a pyridoxin. Pšenice je také zdrojem kyseliny listové a biotinu. Obilniny obsahují okolo 1,5–2,5 % minerálů. Nejvyšší obsah mají fosforu, dále jsou také zdrojem draslíku, sodíku, vápníku, hořčíku, železa, zinku, mědi a selenu (Dewettinck et al., 2008).

Přídavek vápníku a draslíku ke zgelovatěnému bramborovému škrobu působil na snížení obsahu RS. Pravděpodobně proto, že tyto dva prvky zamezují tvorbě vodíkových můstků mezi amylosou a amylopektinem (Sajilata et al., 2006).

Obsah vody je důležitý pro proces gelatinizace, který činí molekuly plně přístupné trávicím enzymům. Hydratace se proto využívá při přípravě škrobových pokrmů, které mají být rychle stráveny. Podle zdroje škrobu a obsahu amylosy se používá teplota v rozmezí 40–120 °C. Voda hraje roli i při zmrazení těsta či chleba. Ve zmrazených produktech ledové krystaly vody neustále mění svou velikost i tvar, a to hlavně důsledkem kolísání teploty. Krystaly vody pocházející z lepku, fáze škrobu či volná voda znovu krystalizují, čímž se neustále zvětšují. Krystalizace volné vody ovlivňuje kvasinky, které reagují ztrátou vody

důsledkem osmotického tlaku, což má nepříznivý vliv na buňku kvasinky. V pečeném chlebu želatinizovaný a částečně retrogradovaný škrob také ztrácí vodu, což podporuje růst ledových krystalů, které poškozují strukturu těsta (Eckardt et al., 2013).

## 2.4 Pekárenské technologie a jejich vliv na vznik rezistentního škrobu

Podmínky zpracování mohou ovlivňovat proces želatinizace a retrogradace škrobu, což má dopad na obsah RS (Thompson, 2000). Je možné aplikovat fyzikální procesy pro korekci obsahu RS ve škrobové suspenzi (Augustin et al., 2008). Využití úpravy podmínek pH, teploty a času pečení, počtem cyklů zahřátí a zchlazení, sušení a mražení, lze technicky zvýšit obsah RS v potravinách (Sajilata et al., 2006).

Výrobě pečiva předchází zpracování obilného zrna, tedy jeho čištění a mletí. Základní anatomická stavba zrna obilovin je stejná. Tvoří ji čtyři hlavní části: endosperm, aleuronová vrstva, otruby a klíček. Klíček obsahuje převážně lipidy, které vyživují embryo. Pšeničné otruby jsou bohaté na obsah neškrobových polysacharidů jako jsou arabinoxylany, celulosa a  $\beta$ -glukany. Pod vrstvami otrub se nachází endosperm, který je tvořen škrobem. Endosperm pokrývá ještě aleuronová vrstva, která je bohatá na bílkoviny, minerály a vitamíny. Mletím se oddělují otruby a klíček od endospermu, který je výsledným produktem mletí. Při procesu mletí je s klíčkem a otruby obvykle odstraněna i aleuronová vrstva. Namletý produkt proto obsahuje méně vitamínu B, minerálu, lipidů a proteinů, než nenamleté pšeničné zrna. Pro biologickou dostupnost živin je kromě mletí důležitý i proces výroby a skladování produktů z obilovin (Dewettinck et al., 2008).

Proces výroby pečiva je primárně založen na třech hlavních krocích: smíchání surovin, fermentaci a pečení (Dewettinck et al., 2008). Techniky zpracování ovlivňují želatinizaci a proces retrogradace, čímž mají vliv na vznik RS. Možnosti zvýšení obsahu RS je průmyslově využíváno, a to při pečení, výrobě těstovin, využitím extruze či použitím autoklávů (Sajilata et al., 2006).

Pro vývoj správné textury při pečení a extruzi je důležitá schopnost expanze vzduchových komor. Vlákna má tendenci zesilovat fyzikální strukturu potravin, což omezuje schopnost expanze. Příklad RS pro zvýšení obsahu celkové vlákniny však nemá negativní vliv na vývoj struktury produktu. V extrudovaných výrobcích RS naopak zachovává strukturu produktu a nejenže zvyšuje obsah vlákniny, ale také snižuje spotřebu energie procesu (Haralampu, 2000).

Extruze je v pekárenském průmyslu využíváno zejména k výrobě produktů s vysokým obsahem vlákniny, jako jsou například kukuřičné lupínky a další sníadaňové cereálie. Využití nativního škrobu k výrobě rezistentního či pomalu stravitelného škrobu extruzí, vyžaduje nepříliš vysoký tlak a teploty  $< 100\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Šárka et al., 2013).

Proces pečení zvyšuje obsah RS, přičemž nejvyšší obsah RS byl zaznamenán u pečiva pečeného dlouze při nižší teplotě, oproti chlebu pečenému při nižších podmínkách než je běžné (Sajilata et al., 2006). Rentgenová krystalografie ukazuje, že během retrogradace pšeničného škrobu při  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  vznikají dva druhy krystalů. Při vyšší teplotě se tvoří krystaly s větším počtem lamel ve své struktuře, které zvyšují rezistenci vůči pankreatické  $\alpha$ -amylase (Perera et al., 2010). RS je schopen odolávat i vysokým teplotám, při ošetření UHT ( $137\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 5 sekund) jsou zachovány dvě třetiny retrogradovaného škrobu (Brouns et al., 2002).

Skladování chleba či sladkého pečiva za normálních podmínek zvyšuje obsah RS (Kale et al., 2002). Úschova pečiva za nízkých teplot zvyšuje obsah RS ještě více (Sajilata et al., 2006). Zmrazení částečně upečeného produktu neodstraňuje proces, ke kterému dochází po úplném upečení. Interakce mezi složkami pečiva není zmražením přerušena, což je zřejmé v průběhu stárnutí při skladování výsledného pekárenského produktu (Bárcenas et al., 2003).

Při zmražení syrového těsta na  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  se však upravují vlastnosti škrobu. Tato modifikace vlastností škrobu se jen mírně odráží na želatinizaci škrobu, ale má významný vliv na rychlost retrogradace a množství retrogradovaného amylopektinu (Ribotta et al., 2003).

Diferenciální skenovací kalorimetrie chování amylopektinu během předpečení, zmražení, skladování, rozmražení, dopečení a stárnutí během skladování ukázala, že doba skladování zmraženého produktu zvyšuje rozsah teplot retrogradace a také zvyšuje celkovou entalpii pro roztavení amylopektinu. Doba skladování zmraženého produktu také určuje rychlost tvrdnutí výsledného produktu během stárnutí (Bárcenas et al., 2003).

RS v pečivu má několik funkčních znaků, zlepšuje křehkost a má lepší barvu i chuť oproti tradiční vláknině (Sajilata et al., 2006). Jeho dobré sensorické vlastnosti jsou výhodou pro zvýšení oblíbenosti a příjmu vlákniny konzumenty (Buttriss and Stokes, 2008). Nejenže přídavek RS obohacuje produkt o vlákninu, ale také dodává charakteristiku, které není u výrobků s vysokým obsahem vlákniny jinak dosaženo (Tharanathan and Mahadevamma, 2003).

Ačkoli výrobci RS tvrdí, že fortifikace RS nemění sensorické vlastnosti produktu, ukázalo se, že přídavek RS při výrobě muffinů mění vnímaní vlhkosti, sladkosti a jako jeho



nová vlastnost se objevila zrnitost. Tyto vlastnosti však neměly vliv na celkové přijatelnosti produktu konzumenty (Baixauli et al., 2008).

## 2.5 Metody stanovení rezistentního škrobu

Metody *in-vitro* pro stanovení RS v potravinách jsou založené na napodobení trávení v trávicím traktu člověka. Hlavním bodem metod je proto enzymatická hydrolýza, která se dále kombinuje s chemickou hydrolýzou nebo gravimetrickou izolací. Velký význam v používání těchto metod má příprava vzorku a mechanické procedury jako je mletí či homogenizace vzorku, které nahrazují žvýkání (Perera et al., 2010). Při měření obsahu RS v potravinách *in-vitro* je nejdůležitější odstranění stravitelného škrobu z měřeného vzorku. Všechny stravitelné škroby se odstraňují pomocí termostabilní  $\alpha$ -amylasy (Sajilata et al., 2006).

Principem těchto stanovení je sled dějů, kdy nejprve při enzymatické digesci při 37 °C po dobu 20 minut lze ve vzorku stanovit rychle stravitelné škroby pomocí glukosy. Po druhém enzymatickém štěpení při 37 °C po dobu 100 minut je možné analyzovat ve vzorku pomalu stravitelné škroby. V dalším kroku se RS rozpustí pomocí koncentrovaného roztoku KOH při 0 °C po dobu 15 minut, a poté po štěpení škrobu amyloglukosidasou při 70 °C po dobu 30 minut již můžeme determinovat obsah RS v daném vzorku (Haralampu, 2000).

Jednou možností fyziologického měření metod *in-vivo* je determinovat nestrávený škrob obsažený v ileu. Vzorky ilea mohou být nahrazeny intubací. Klasická metoda však využívá měření glykemického indexu, tedy měření koncentrace glukosy v krvi pod křivkou po prvních 2 hodinách po užití škrobu. Tento výsledek dále dělíme sérem glukosy ekvivalentním k množství zkonsumované glukosy. Dalším způsobem je dechový test, kdy měříme vodík v dechu, který se vylučuje kvůli zvýšené fermentaci způsobené RS (Sajilata et al., 2006).

Znalost množství RS je důležitá nejen pro konzumenta, ale i z hlediska dalšího využití RS v potravinách. Škroby tvoří základní složku široké škály obilných pekárenských produktů na světovém trhu, a tím pokrývají i většinu energetického příjmu populace. Jejich velkou výhodou je nízká cena a dostupnost, na druhé straně jejich velký příjem může být pro část dnešní populace, která příliš nedodrhuje zdravý životní styl, rizikovým faktorem. Z hlediska preventivních opatření je možné díky unikátním vlastnostem RS zlepšit nedostatky (vysoký glykemický index, nízké množství vlákniny) pečiva. RS pro své dobré sensorické (jemná

chuť, bílá barva) a technologické vlastnosti může být s využitím poznatků o jeho chemickém, mechanickém a fyzikálním chování cenným doplňkem při výrobě pekárenských produktů a ještě cennější složkou díky nutričnímu obohacení produktu. RS je přirozenou složkou naší stravy, jelikož pochází z přírodních zdrojů, je jeho užití jako přídatné látky hodnoceno kladně (Homayouni et al., 2014).

### **3 Hypotéza a cíl práce**




V současné době roste nabídka rozpékaného pečiva ze zmrazených polotovarů a těší se oblibě jak konzumentů, tak i prodejců. Vzhledem k odlišné technologii výroby a kroku zmrazení se domníváme, že obsah RS je u těchto výrobků vyšší než u konvenčního čerstvého pečiva a jejich konzumace tedy může být z tohoto úzkého pohledu výhodnější. Pečivo je vedle luštěnin jedním z nejvýznamnějších zdrojů RS vy výživě člověka. Existují jen kusé informace o tom, kolik RS obsahuje pečivo běžně dostupné v maloobchodní síti v ČR tato práce má za cíl přispět analýzou obsahu RS v českém pečivu ke zpřesnění tohoto odhadu.

## 4 Materiál a metody



### 4.1 Materiál






K analýze bylo použito 10 vzorků běžného konvenčního pečiva a 10 vzorků rozpečeného pečiva ze zamrazených polotovarů. Vzorky (Tab. 1) byly zakoupeny v obchodní síti Kaufland a Mr. Baker. Analýza vzorků probíhala odděleně, nejprve byly analyzovány vzorky konvenčního pečiva a poté následovala analýza vzorků rozpečeného pečiva ze zamrazených polotovarů pomocí Resistant assay kit (Megazyme International Ireland, Wicklow, IE) dle manuálu výrobce. Kit obsahoval následující enzymy a sloučeniny: amyloglukosidasu, pankreatickou  $\alpha$ -amylasu, reakční pufr a reakční enzymy GOPOD, standardní roztok D-glukosy a kontrolu. K měření obsahu RS sloužily i další chemické látky: malát sodný (100 mM, pH 6), octan sodný (1,2 M, pH 3,8), octan sodný (100 mM, pH 4,5), hydroxid draselný (2 M), denaturovaný ethanol (50 % v/v). Podrobný seznam, příprava reakčních činidel a postup při práci je popsán v protokolu v samostatné příloze této bakalářské práce. K experimentální činnosti sloužilo běžné laboratorní vybavení a moderní technologie: elektrický mlýnek Fex IKA A 11 (IKA® Werke GMBH&Co.KG, Staufen, DE), spektrometr SPEKOL® 1300 (Analytik Jena AG, Jena, DE) a program IBM SPSS ver. 20 (IBM Inc, New York, US).

Tab. 1: Charakteristika a původ analyzovaných vzorků

| Vzorek                  | Prodejce |   |
|-------------------------|----------|---|
| Kaiserka maková         | Kaufland |  |
| Kaiserka multi-cereální | Kaufland |  |
| Bageta světlá           | Kaufland |  |

| Vzorek                         | Prodejce |   |
|--------------------------------|----------|---|
| Bageta fitness                 | Kaufland |    |
| Ciabatta s rajčaty             | Kaufland |    |
| Dalamánek pistoliet s posypem  | Kaufland |    |
| Fitness bulka vícezrná         | Kaufland |   |
| Houska dýňová                  | Kaufland |  |
| Houska wiking vícezrná         | Kaufland |  |
| Chléb slunečnicový - speciální | Kaufland |  |

| Vzorek                      | Prodejce  |   |
|-----------------------------|-----------|---|
| Chléb konzumní              | Kaufland  |    |
| Chléb kladenský klas kulatý | Kaufland  |    |
| Houska raženka              | Kaufland  |   |
| Rohlík tukový               | Kaufland  |  |
| Karlovarský rohlík          | Mr. Baker |  |

| Vzorek           | Prodejce  |   |
|------------------|-----------|---|
| Pivní rohlík     | Mr. Baker |    |
| Žitánek          | Mr. Baker |    |
| Celozrnný rohlík | Mr. Baker |   |
| Cereální houska  | Mr. Baker |  |
| Dalamánek sypaný | Kaufland  |  |

## 4.2 Metody

Škrob a jeho frakce byly stanoveny prostřednictvím kitu. Použitý kit Megazyme využívá AOAC Method 2002.2 a AACC Method 32-40.01. Tato metoda zahrnuje stanovení RS, rozpustného škrobu a celkového škrobu obsaženého ve vzorcích.

V průběhu 24 hodin může být analyzováno 24 vzorků. Při vývoji této metody bylo hlavním cílem co nejvíce se přiblížit podmínkám *in-vivo* pro vytvoření co nejspolehlivější metody. Pod tímto záměrem byl zkoumán efekt koncentrace pankreatické  $\alpha$ -amylasy, pH inkubace, význam inhibice maltosy pankreatickou  $\alpha$ -amylasou, efekt zahrnutí amyloglukosidasy, vliv míchání a třepání, a také samotná analýza RS v usazenině.

### 4.2.1 Odběr vzorků a jejich příprava

Pro odběr vzorku byla vždy použita jedna čtvrtina pečiva, která byla rozemleta pomocí elektrického mixéru a následně použitím elektrického mlýnku Fex IKA A 11 proběhlo její namletí na jemnější částice. Poté bylo odebráno množství  $100 \pm 5$  mg, které bylo převedeno do zkumavky. Ve zkumavce proběhla 16 hodin inkubace vzorků s pankreatickou  $\alpha$ -amylasou a amyloglukosidasou při  $37^\circ\text{C}$ .

Po inkubaci vzorků s pankreatickou  $\alpha$ -amylasou a amyloglukosidasou a následné centrifugaci ve zkumavce vznikl sediment obsahující RS, nerezistentní škrob a supernatant obsahující nerezistentní škrob. Pro oddělení nerezistentního škrobu od RS byla usazenina několikrát promyta ethanolem, čímž byl nerezistentní škrob uvolněn do tekutiny. Tekutina, která byla získána promýváním, byla sbírána jako tzv. sběrný supernatant, ze kterého bylo později určeno množství nerezistentního škrobu.

### 4.2.2 Stanovení obsahu rezistentního škrobu

K získání RS bylo nutné jeho uvolnění z usazeniny. RS byl v usazenině rozpuštěn hydroxidem draselným a pomocí dalších pufrů a podmínek stanovení byl uvolněn do roztoku. K měření RS bylo 0,1 ml tekutiny vzorku převedeno do zkumavky, a to pro každý vzorek v duplikátu. Před vlastním měřením byly vzorky inkubovány s reakčním činidlem GOPOD a následně převedeny do testovacích zkumavek. Poté byla u vzorků měřena absorbance při vlnové délce 510 nm spektrometrem SPEKOL® 1300. Absorbance vzorků byla měřena vůči blanku a při každé analýze byla měřena i absorbance glukosy, vzorky blanku i glukosy byly připraveny dle manuálu výrobce.



Dosazením do vzorce pro výpočet RS byl po změření absorbance vzorku vypočten obsah RS. K výpočtu byla použita průměrná absorbance vzorku a glukosy, hmotnost vzorku a další veličiny.

#### 4.2.3 Stanovení obsahu nerezistentního škrobu

Ke stanovení obsahu nerezistentního škrobu byl použit sběrný roztok, který vznikl již popsanou dekantací. Sběrný roztok byl doplněn na obsah 100 ml octanem sodným. Ze vzniklého roztoku bylo odebráno 0,1 ml vzorku v duplikátu a převedeno do zkumavek, ve kterých byl vzorek inkubován s reakčním činidlem GOPOD. Po inkubaci byl vzorek převeden do testovacích zkumavek v nichž probíhalo měření absorbance vzorků při vlnové délce 510 nm za pomoci spektrometru SPEKOL® 1300 vůči blanku. Ke zjištění obsahu nerezistentního škrobu byla použita průměrná hodnota absorbance vzorku a glukosy, hmotnost vzorku a další parametry, které byly dosazeny do vzorce pro výpočet nerezistentního škrobu.

#### 4.2.4 Stanovení celkového obsahu škrobu

Pro zjištění celkového množství škrobu ve vzorku byl sečten obsah škrobu rezistentního a obsah škrobu nerezistentního. Obsah rezistentního i nerezistentního škrobu byl vypočten dosazením do vzorců pro výpočet dle manuálu výrobce.

#### 4.2.5 Principy použité metody

Inkubování vzorků v třepací vodní lázni s pankreatickou  $\alpha$ -amylasou a amyloglukosidasou po dobu 16 hodin při 37 °C. Během této inkubace je nerezistentní škrob rozpuštěn a hydrolyzován na D-glukosu účinkem pankreatické  $\alpha$ -amylasy a amyloglukosidasy. Reakci ukončuje přidání ethanolu nebo průmyslově denaturovaného lihu. Centrifugací RS zůstane uchycen v usazenině. Usazenina se následně promývá 50 % ethanolom a odstředí. Tento krok se provádí dvakrát, přičemž roztok je vždy dekantací převáděn do sběrných zkumavek. RS je z usazeniny rozpuštěn 2 M KOH při míchání v ledové vodní lázni. Roztok je následně neutralizován octanovým puforem a škrob je kvantitativně hydrolyzován na glukosu účinkem amyloglukosidasy. Stanovení obsahu RS se provede změřením D-glukosy pomocí glukoso-oxidase/peroxidase reakčního činidla

(GOPOD). Nerezistentní škrob je stanoven ze sběrného roztoku získaného dekantací, pomocí měření D-glukosy obsahující reakční činidlo GOPOD po doplnění roztoku na 100 ml.

#### 4.2.6 **Statistické zpracování**

Pro deskriptivní statistiku, výpočet průměru a směrodatné odchylky byl použit MS Excel, Box-Plot graf pro vizualizaci celkových výsledků v konvenčním a rozpékaném pečivu byl vytvořen v programu IBM SPSS ver. 20. Rozdíly v průměrech obou souborů byly porovnávány t-testem funkcí customtables ve stejném programu a statistické rozdíly byly sledovány na hladině  $P < 0.05$ .

## 5 Výsledky a diskuze

Obsah RS byl analyzován u 20 druhů nejčastěji prodávaného pečiva dostupného v maloobchodní síti České republiky. V Tab. 2 je přehled analyzovaného pečiva a obsah RS, který pečivo obsahovalo v den nákupu. Jelikož jsme nakoupili pečivo čerstvé, předpokládáme, že zjištěné množství RS odpovídá prvnímu dni stáří pečiva.

**Tab. 2.** Obsahy škrobových frakcí v pečivu v den zakoupení

| Typ  | Vzorek                        | Sušina      | Škrob celkem | RS (g/100 g) v den zakoupení |
|--|-------------------------------|-------------|--------------|------------------------------|
| Rozpékané pečivo ze zamrazeného polotovaru | Kaiserka maková               | 77,1        | 64,36        | 0,63                         |
|  | Kaiserka multi-cereální       | 81,6        | 54,57        | 0,98                         |
|  | Bageta světlá                 | 72,5        | 52,83        | 0,40                         |
|  | Bageta fitness                | 75,9        | 49,04        | 0,85                         |
|  | Ciabatta s rajčaty            | 66,2        | 44,69        | 0,71                         |
|  | Dalamánek pistollet s posypem | 76,1        | 55,15        | 0,63                         |
|  | Fitness bulka vícezrná        | 72,2        | 50,25        | 0,68                         |
|  | Houska dýňová                 | 72,8        | 45,16        | 0,51                         |
|  | Houska wiking vícezrná        | 75,7        | 51,35        | 0,90                         |
|  | Chléb slunečnicový-speciální  | 58,4        | 33,71        | 0,72                         |
| <b>Průměr</b>                              |                               | <b>72,9</b> | <b>50,11</b> | <b>0,70</b>                  |
| Konvenční pečivo                           | Chléb konzumní                | 56,6        | 41,3         | 1,09                         |
|  | Chléb kladenský klas kulatý   | 61,8        | 49,4         | 0,57                         |
|  | Houska raženka                | 71,6        | 61,5         | 0,22                         |
|  | Rohlík tukový                 | 73,3        | 46,3         | 0,16                         |
|  | Karlovarský rohlík            | 77,4        | 51,0         | 0,34                         |
|  | Pivní rohlík                  | 75,8        | 50,2         | 0,22                         |
|  | Žitánek                       | 72,1        | 43,3         | 0,37                         |
|  | Celozrnný rohlík              | 72,6        | 41,4         | 0,42                         |
|  | Cereální houska               | 74,6        | 38,4         | 0,39                         |
|  | Dalamánek sypaný              | 66,0        | 39,0         | 0,64                         |
| <b>Průměr</b>                              |                               | <b>70,2</b> | <b>46,2</b>  | <b>0,44</b>                  |

## 5.1 Rozpékané pečivo ze zamrazeného polotovaru

U rozpékaného pečiva ze zamrazeného polotovaru byl nejvyšší obsah RS zjištěn u kaiserky multi-cereální, která ve 100 g čerstvého vzorku obsahovala 0,98 g RS. Houska wiking vícezrná obsahovala 0,90 g RS a bageta fitness 0,85 g RS ve 100 g své hmotnosti. Nerezistentní škrob se u těchto tří vzorků pohyboval v rozmezí 49–55 g na 100 g vzorku. Obsah RS v kaseirce multi-cereální jež je 1,22 % sušiny a obsah RS u housky wiking vícezrné, který činí 1,23 % sušiny je v souladu s uvedeným obsahem RS jinými autory v bagetách, rohlících či houskách, který je 1,2–1,8 % sušiny (Šárka et al., 2013).

S ohledem na souvislost obsahu nerezistentního škrobu se škrobem rezistentním obsahoval vzorek slunečnicového chlebu speciálního relativně vysoký obsah RS 0,72 g/100 g při nízkém obsahu škrobu nerezistentního 33,71 g/100 g v porovnání s ostatními vzorky. Obsah RS ve slunečnicovém chlebu speciálním může být ovlivněn obsahem inulinu, který se nachází v semínech slunečnice a tvoří posyp chlebu, či přídavkem slunečnicové mouky při výrobě toho druhu chleba. Při srovnání sušiny všech vzorků rozpečeného pečiva ze zamrazeného polotovaru měl slunečnicový chléb speciální sušinu nejnižší, tím pádem obsahoval nejvyšší množství RS na sušinu (1,27 % sušiny). Nejnižší obsah RS u rozpékaného pečiva ze zamrazeného polotovaru byl změřen u bagety světlé, a to 0,40 g/100 g.

## 5.2 Konvenční pečivo

Mezi konvenčními druhy pečiva byl nejvyšší obsah RS zjištěn u chlebu konzumního, jeho vzorek obsahoval 1,09 g/100 g RS. Jiná *in-vitro* studie k určení RS, která je založená na žvýkání, uvádí obsah RS v bílém pšeničném chlebu  $\leq 1,5$  g/100 g (Åkerberg et al., 1998).

V České republice se pro výrobu tradičního chleba používá směs pšeničné a žitné mouky. Poměr těchto dvou mouk se v průběhu let měnil a dnes při výrobě převládá mouka pšeničná, což souvisí s celkovým poklesem spotřeby žitné mouky. V roce 1995 byla spotřeba žitné mouky 20 kg na osobu/rok a spotřeba mouky pšeničné 88,1 kg na osobu/rok, o patnáct let později spotřeba žitné mouky činila 8,5 kg na osobu/rok a spotřeba mouky pšeničné 93,6 kg na osobu/rok (ČSÚ, 2012).

Obecně obsahuje žitná mouka o něco více vlákniny než mouka pšeničná. Obsah dietní vlákniny v žitném zrně je průměrně 15,5 mg/100 mg sušiny a zrně pšeničném průměrně 12,4 mg/100 mg sušiny (Johansson et al., 1984).

Druhé nejvyšší množství obsahoval dalaťánek sypaný se 0,64 g RS ve 100 g čerstvého vzorku. Chléb kladenský klas kulatý obsahoval RS 0,57 g/100 g. Pro výrobu těchto tří vzorků konvenčního pečiva s nejvyšším obsahem RS se používá chlebové těsto. Obsah RS v žitno-pšeničném chlebu se uvádí v rozmezí 2,6–4,2 % sušiny (Šárka et al., 2013).

Při analýze našich vzorků konzumní chléb obsahoval RS 2,01 % sušiny, dalaťánek sypaný 0,98 % sušiny a kladenský klas kulatý 0,90 % sušiny. Nižší množství RS v našich vzorcích může souviset s odlišným poměrem mouk při jejich výrobě, tedy nižším obsahem žitné mouky v těstě. Nejnižší obsah RS byl u konvenčního pečiva změřen u rohlíku tukového, který obsahoval ve 100 g čerstvého vzorku pouze 0,16 g RS.

### 5.3 Srovnání konvenčního a rozpékaného pečiva

Celkově konvenční pečivo obsahovalo průměrně o 37,1 % RS méně než rozpékané pečivo ze zamrazeného polotovaru. Průměr sušiny rozpékaného pečiva ve srovnání s konvenčním pečivem byl o 3,7 % vyšší. Rozpékané pečivo ze zamrazeného polotovaru obsahovalo také v průměru o 7,8 % více nerezistentního škrobu než pečivo konvenční. Celkově vyšší obsah nerezistentních škrobů v sušině rozpékaného pečiva vedl k vyššímu obsahu RS.

Mezi analyzovanými vzorky konvenčního pečiva bylo méně cereálních či celozrnných forem pečiva oproti vzorkům pečiva ze zamrazeného polotovaru, což může být příčinou zjištěného nižšího průměru množství RS v čerstvém konvenčním pečivu. U vzorků pečiva byla velká variabilita a většina vzorků pečiva ze zamrazeného polotovaru na svém povrchu obsahovala posyp, který mohl množství RS v nich také zvýšit.

Nejčastěji používanými druhy posypu při výrobě zamrazených polotovarů jsou semínka máku a slunečnice, dýňová semínka, sezamová semínka, lněná semínka, ovesné vločky či sójová drť. Tato semena či jejich části mohou výrazně ovlivnit množství RS v pečivu, jelikož RS samy přirozeně obsahují. U rozpékaného pečiva se často semeny, pohankou či pšeničnými otrubami obohacuje i těsto, což má také vliv na zvýšení množství RS u tohoto druhu pečiva. Ovesné otruby například ve 100 g obsahují 1 g RS, mimo pekárenské účely se využívají jako snídaňové cereálie (Alsaffar, 2011). Navíc dle studie vlivu velikosti otrub na retrogradaci při výrobě celozrnného pečiva z pšeničné mouky je pravděpodobné, že jemně namleté pšeničné otruby odvádějí více vody během želetanizace škrobu oproti hrubě namletým otrubám, čímž zvyšují množství retrogradovaného škrobu během skladování pečiva

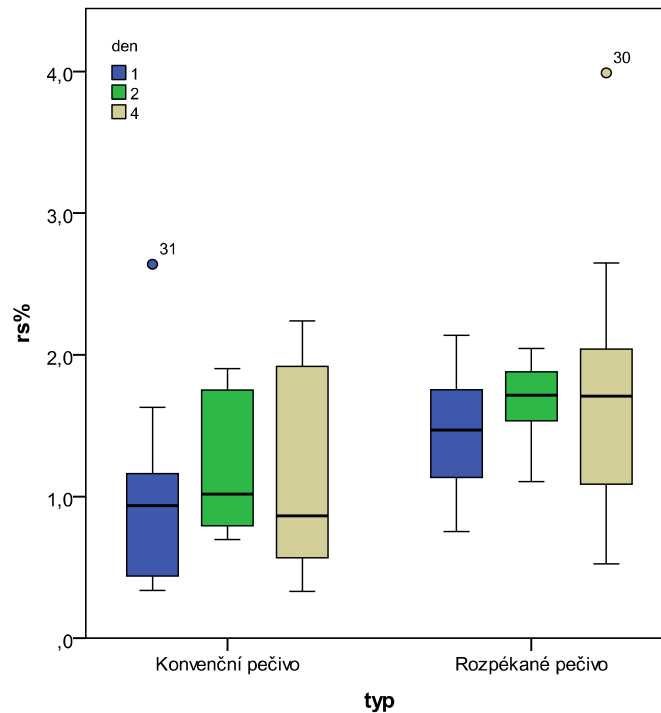
či gelů (Cai et al., 2014). Obsah RS v pšeničných vločkách, které mohou být také využity k posypu pečiva, je 1 % v sušině (Šárka et al., 2013).

K porovnávání rozdílů mezi obsahem RS v rozpékaném pečivu a pečivu konvenčním nás vedl trend vzrůstající nabídky pečiva ze zamrazeného polotovaru v obchodních sítích. Nejen v České republice, ale i v ostatních členských zemích Evropské unie, totiž ubývá podíl ruční práce při výrobě pečiva a přibývá podíl rozpékaného pečiva dopečeného v provozovnách či v domácnostech. Nejvyšší spotřeba čerstvého konvenčního pečiva je v Portugalsku, Itálii a Nizozemí (nad 90 %) a naopak nejnižší v Estonsku, Irsku a Švédsku (do 20 %). Nejběžnějším konvenčně upečeným, nebo-li čerstvým druhem pečiva, je chléb (Agronavigator, 2009).

Spotřeba chleba v naší zemi však klesá, v našem jídelníčku ho nahrazuje pšeničné pečivo. V roce 1995 byla spotřeba chleba 58,5 kg na osobu a pšeničného pečiva 42 kg na osobu. O patnáct let později spotřeba chleba za celý rok činila 40,9 kg na osobu a spotřeba pšeničného pečiva byla 51,5 kg na osobu (ČSÚ, 2012).

#### **5.4 Zhodnocení obsahu rezistentního škrobu v průběhu stárnutí pečiva**

Pro celkové zhodnocení rozdílů obsahu RS v konvenčním a rozpékaném pečivu byl u obou skupin RS porovnáván v průběhu všech tří časových odběrů t-testem. RS byl při běžném skladování pečiva měřen první, druhý a čtvrtý den. Vývoj průměrného obsahu RS je uveden v Obr. 1. Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi konvenčním a rozpékaným pečivem ze zamrazeného polotovaru ( $P=0,05$ ), vzhledem k veliké variabilitě obsahů škrobu mezi jednotlivými výrobky a zřejmě i heterogenitě skupiny. Byl zjištěn neprůkazný vyšší podíl RS u rozpékaného pečiva.



Obr. 1. Boxplot obsahu RS mezi oběma skupinami pečiva, n=10 v každé skupině

Na začátku měření byl obsah RS u čerstvě nakoupeného pečiva konvenčního typu průměrně  $0,44 \pm 0,26$  g/100 g. Pečivo ze zamrazeného polotovaru tentýž den obsahovalo  $0,70 \pm 0,17$  g/100 g RS. Rozptyl hodnot u vzorků konvenčního typu pečiva byl vyšší než u pečiva ze zamrazeného polotovaru.

Druhý den bylo množství RS u konvenčního pečiva  $0,59 \pm 0,17$  g/100 g a  $0,76 \pm 0,16$  g/100 g u pečiva rozpékaného. Čtvrtý den byl obsah RS u konvenčního pečiva  $0,49 \pm 0,27$  g/100 g a  $0,78 \pm 0,31$  g/100 g u pečiva rozpékaného.

Velký rozptyl RS mezi vzorky je zřejmě způsoben jejich odlišností nejen mezi skupinami, ale i v rámci druhu. Tyto odlišnosti způsobily fakt, že u některých vzorků RS lineárně nevzrůstal s dobou stárnutí. Pokles množství RS zaznamenaný u některých vzorků druhý den může být způsoben nerovnoměrně rozloženým posypem, a tedy nehomogenitou vzorku, dále také používáním přísad zabraňujících stárnutí pečiva, které úzce souvisí s retrogradací škrobových zrn, a tím i se vznikem RS. Například přídavek aditiva hypromelosity, kterou řadíme mezi hydrokoloidy, snižuje rychlost tvrdnutí střídky pečiva a zpomaluje retrogradaci amylopektinu (Bárcenas and Rosell, 2005). U rozpékaného pečiva ze zamrazeného polotovaru přídavek hypromelosity významně zpomaluje stárnutí pečiva snížením retrogradace hlavně během skladování pečiva za nízkých teplot (Bárcenas and Rosell, 2007).

Mezi používaná aditiva zabraňující stárnutí pšeničného pečiva patří SSL/CSL (stearoyl-laktylát sodný/vápenatý), mono/diglyceridy (Stampfli and Nersten, 1995; Twillman

and White, 1988) a hydrokoloidy, mezi které řadíme karboxymethylcelulosu, gumu guar, alginát a xanthan (Armero and Collar, 1996; Davidou et al., 1996; Rosell et al., 2001). Ve studii provedené Nunes et al. (2009) přídavek emulgátorů neměl během pěti dnů stárnutí pečiva vliv na retrogradaci škrobu. Tato studie se ale zabývala pouze bezlepkovým chlebem. Studie vlivu lepku na retrogradaci pšeničného škrobu při skladování za konstantního obsahu vody a teplotě 25 °C, pomocí rentgenové krystalografie, diferenciální skenovací kalorimetrie a nukleární magnetické rezonance, však nezaznamenala odlišný vliv přítomnosti lepku na kinetiku či rozsah retrogradace amylopektinu (Ottenhof and Farhat, 2004).

K tvrdnutí vlivem stárnutí má mnohem vyšší sklony rozpékané pečivo oproti pečivu konvenčnímu. Rozpékané pečivo je produkt s nízkou dobou trvanlivosti, který vyžaduje teplotu pod nulou pro její prodloužení (Bárcenas and Rosell, 2007). Tvrdnutí rozpékaného pečiva ovlivňuje doba jeho skladování v zamrazeném stavu, delší doba skladování snižuje kvalitu výsledného výrobku ztrátou jeho vlhkosti a zrychluje dobu stárnutí, čímž se zvyšuje tvrdost pečiva (Bárcenas and Rosell, 2006).

Studie zabývající se dlouhodobým zamražením pšeničného pečiva a těsta ukázala jako výhodnější mražení těsta nežli pečiva, při zamražení těsta má výsledný produkt lepší senzoričké vlastnosti, které se nejvíce podobají čerstvému pečivu. Pro dlouhodobé zmrazení je také lepší teplota -19 °C nežli teplota -8 °C, skladováním při vyšší teplotě v mikrostruktuře těsta totiž vznikají větší mezery mezi fázemi škrobu a lepku vlivem retrogradace škrobu, dehydratace lepku a migraci vody (Eckardt et al., 2013).

Tvrdnutí pečiva ze zamrazeného polotovaru způsobené ztrátou jeho vlhkosti je možné ovlivnit přídavkem dietní vlákniny k upravení technologických vlastností rozpékaného pečiva. Přídavek RS jako dietní vlákniny pomáhá v rozpékaném pečivu udržovat vlhkost během jeho skladování po finálním dopečení (Almeida et al., 2013).



## 6 Závěr

První den při zakoupení obsahovalo rozpékané pečivo o 37,1 % více RS než pečivo konvenční. Zjištěné vyšší množství je zřejmě způsobeno vyšším podílem vícezrnných surovin v rozpékaném pečivu a procesem zmrazení.

V průběhu stárnutí se obsah u obou druhů pečiva zvyšoval jen mírně, v rozporu s obecným povědomím. Růst RS jeho retrogradací během stárnutí pečiva není z dietetického pohledu v současném pečivu významný a neměl by být zmiňován jako součást výživových doporučení. Je možné, že obsah RS narůstá u současného pečiva méně v důsledku používání emulgátorů, které ovlivňují přirozené stárnutí pečiva, jelikož zabraňují retrogradaci škrobových zrn, nebo byl v minulosti tento význam neúměrně zveličován.

## 7 Seznam literatury

- Agro navigátor. 2009. Rozdíly na evropském trhu s pečivem. [cit. 2015-03-16].  
Dostupné z: <http://www.agronavigator.cz/service.asp?act=print&val=95538>
- Almeida, E. L., Chang, Y. K., Steel C. J. 2013. Dietary fibre sources in frozen part-baked bread: Influence on technological quality. *LWT - Food Science and Technology*. 53. 262-270.
- Alsaffar, A. A. 2011. Effect of food processing on the resistant starch content of cereals and cereal products - a review. *International Journal of Food Science and Technology*. 46. 455-462.
- Armero, E., Collar C. 1996. Antistaling additives, flour type and sourdough process effects on functionality of wheat doughs. *Journal of Food Science*. 61. 299-303.
- Augustin, M. A., Sanguansri P., A. Htoon A. 2008. Functional performance of a resistant starch ingredient modified using a microfluidiser. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 9. 224-231.
- Åkerberg, A. K. E., Liljeberg H. G. M., Granfeldt Y. E., Drews A. W., Björck I. M. E. 1998. An *in vitro* method, based on chewing, to predict resistant starch content in foods allows parallel determination of potentially available starch and dietary fiber. *The Journal of nutrition*. 128. 651-660.
- Baixauli, R., Salvador A., Martínez-Cervera S., Fiszman S. M. 2008. Distinctive sensory features introduced by resistant starch in baked products. *LWT - Food Science and Technology*. 41. 1927-1933.
- Berry, C. S. 1986. Resistant starch: Formation and measurement of starch that survives exhaustive digestion with amylolytic enzymes during the determination of dietary fibre. *Journal of Cereal Science*. 4. 301-314.
- Bobrow-Strain, A. 2012. *White bread: a social history of the store-bought loaf*, Beacon Press. E-ISBN: 978-0-8070-4468-1.
- Brouns, F., Kettlitz B., Arrigoni E. 2002. Resistant starch and "the butyrate revolution". *Trends in Food Science and Technology*. 13. 251-261.
- Buttriss, J. L., Stokes C. S. 2008. Dietary fibre and health: An overview. *Nutrition Bulletin*. 33. 186-200.
- Bárcenas, M. E., Haros M., Benedito C., Rosell C. M. 2003. Effect of freezing and frozen storage on the staling of part-baked bread. *Food Research International*. 36. 863-869.

- Bárcenas, M. E., Rosell C. M. 2005. Effect of HPMC addition on the microstructure, quality and aging of wheat bread. *Food Hydrocolloids*. 19. 1037-1043.
- Bárcenas, M. E., Rosell C. M. 2006. Effect of frozen storage time on the bread crumb and aging of par-baked bread. *Food Chemistry*. 95. 438-445.
- Bárcenas, M. E., Rosell C. M. 2007. Different approaches for increasing the shelf life of partially baked bread: Low temperatures and hydrocolloid addition. *Food Chemistry*. 100. 1594-1601.
- Cai, L., Choi I., Hyun J. N., Jeong Y. K., Baik B. K. 2014. Influence of bran particle size on bread-baking quality of whole grain wheat flour and starch retrogradation. *Cereal Chemistry*. 91. 65-71.
- Cauvain, S. P. 2012. *Breadmaking: improving quality*. Elsevier. E-ISBN: 9781855737129.
- Chung, O. K., Ohm J. B. 2000. *Cereal lipids*. Food Science and Technology-New York-Marcel Dekker. 417-478.
- Český statistický úřad. 2012. Analýza spotřeby potravin v roce 2010. [cit. 2015-04-07].  
Dostupné z:  
<https://www.czso.cz/documents/10180/20534296/cpotr041012analyza.pdf/9209106d-0b3a-4f3d-9ead-28f8e07f4d5a?version=1.0>
- Český statistický úřad. 2012. Spotřeba potravin v Česku (2010). [cit. 2015-04-07].  
Dostupné z: [https://www.czso.cz/csu/czso/spotreba\\_potravin\\_v\\_cesku\\_2010\\_20120410](https://www.czso.cz/csu/czso/spotreba_potravin_v_cesku_2010_20120410)
- Český statistický úřad. 2013. Spotřeba potravin klesá. [cit. 2015-04-07].  
Dostupné z: [https://www.czso.cz/csu/czso/spotreba\\_potravin\\_klesa\\_20131205](https://www.czso.cz/csu/czso/spotreba_potravin_klesa_20131205)
- Český statistický úřad. 2013. Spotřeba potravin a nealkoholických nápojů (na obyvatele za rok). [cit. 2015-04-11].  
Dostupné z: <https://www.czso.cz/documents/10180/20561999/21391301.pdf/b3ac25d2-a905-4b64-9aa6-26099e73ee94?version=1.0>
- Davidou, S., Le Meste M., Debever E., Bekaert D. 1996. A contribution to the study of staling of white bread: effect of water and hydrocolloid. *Food hydrocolloids*. 10. 375-383.
- Dewettinck, K., Van Bockstaele F., Kühne B., Van de Walle D., Courtens T. M., Gellynck X. 2008. Nutritional value of bread: Influence of processing, food interaction and consumer perception. *Journal of Cereal Science*. 48. 243-257.
- Eckardt, J., Öhgren C., Alp A., Ekman S., Åström A., Chen G., Swenson J., Johansson D., Langton M. 2013. Long-term frozen storage of wheat bread and dough - Effect of time, temperature and fibre on sensory quality, microstructure and state of water. *Journal of Cereal Science*. 57. 125-133.

- Englyst, H., Wiggins H. S., Cummings J. H. 1982. Determination of the non-starch polysaccharides in plant foods by gas - Liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *The Analyst*. 107. 307-318.
- Englyst, H. N., Cummings J. H. 1985. Digestion of the polysaccharides of some cereal foods in the human small intestine. *American Journal of Clinical Nutrition*. 42. 778-787.
- Englyst, H. N., Cummings J. H. 1986. Digestion of the carbohydrates of banana (*Musa paradisiaca sapientum*) in the human small intestine. *American Journal of Clinical Nutrition*. 44. 42-50.
- Englyst, H. N., Cummings J. H. 1987. Digestion of polysaccharides of potato in the small intestine of man. *American Journal of Clinical Nutrition*. 45. 423-431.
- Fuentes-Zaragoza, E., Riquelme-Navarrete M. J., Sánchez-Zapata E., Pérez-Álvarez J. A. 2010. Resistant starch as functional ingredient: A review. *Food Research International*. 43. 931-942.
- Haralampu, S. G. 2000. Resistant starch—a review of the physical properties and biological impact of RS3. *Carbohydrate Polymers*. 41. 285-292.
- Homayouni, A., Amini A., Keshtiban A. K., Mortazavian A. M., Esazadeh K., Pourmoradian S. 2014. Resistant starch in food industry: A changing outlook for consumer and producer. *Starch-Stärke*. 66. 102-114.
- Johansson, C. G., Siljeström M., Asp N. G. 1984. Dietary fibre in bread and corresponding flours - Formation of resistant starch during baking. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*. 179. 24-28.
- Kale, C. K., Kotecha P. M., Chavan J. K., Kadam S. S. 2002. Effect of processing conditions of bakery products on formation of resistant starch. *Journal of Food Science and Technology*. 39. 520-524.
- Kopáčová, O. 2007. Trendy ve zpracování cereálií s přihlédnutím zejména k celozrnným výrobkům, ÚZPI.
- Liversey, G. 1994. Energy value of resistant starch, *Proceedings of the Concluding Plenary Meeting of EURESTA*, 56-62.
- Martin, L. J. M., Dumon H. J. W., Lecannu G., Champ M. M. J. 2000. Potato and high-amylose maize starches are not equivalent producers of butyrate for the colonic mucosa. *British Journal of Nutrition*. 84. 689-696.
- Muir, J. G., O'Dea K. 1992. Measurement of resistant starch: Factors affecting the amount of starch escaping digestion *in vitro*. *American Journal of Clinical Nutrition*. 56. 123-127.

- Nunes, M. H. B., Moore M. M., Ryan L. A. M., Arendt E. K. 2009. Impact of emulsifiers on the quality and rheological properties of gluten-free breads and batters. *European Food Research and Technology*. 228. 633-642.
- Ottenhof, M. A., Farhat I. A. 2004. The effect of gluten on the retrogradation of wheat starch. *Journal of Cereal Science*. 40. 269-274.
- Pereira, M. A., Jacobs D. R., Pins J. J., Raatz S. K., Gross M. D., Slavin J. L., Seaquist E. R. 2002. Effect of whole grains on insulin sensitivity in overweight hyperinsulinemic adults. *American Journal of Clinical Nutrition*. 75. 848-855.
- Perera, A., Meda V., Tyler R. T. 2010. Resistant starch: A review of analytical protocols for determining resistant starch and of factors affecting the resistant starch content of foods. *Food Research International*. 43. 1959-1974.
- Ribotta, P. D., León A. E., Cristina Añón M. 2003. Effect of freezing and frozen storage on the gelatinization and retrogradation of amylopectin in dough baked in a differential scanning calorimeter. *Food Research International*. 36. 357-363.
- Rosell, C. M., Rojas J. A., De Barber C. B. 2001. Influence of hydrocolloids on dough rheology and bread quality. *Food hydrocolloids*. 15. 75-81.
- Ruibal-Mendieta, N. L., Rozenberg R., Delacroix D. L., Petitjean G., Dekeyser A., Baccelli C., Marques C., Delzenne N. M., Meurens M., Habib-Jiwan J. L., Quetin-Leclercq J. 2004. Spelt (*Triticum spelta* L.) and winter wheat (*Triticum aestivum* L.) wholemeals have similar sterol profiles, as determined by quantitative liquid chromatography and mass spectrometry analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52. 4802-4807.
- Sajilata, M. G., Singhal R. S., Kulkarni P. R. 2006. Resistant starch - A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 5. 1-17.
- Sicard, D., Legras J. L. 2011. Bread, beer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Comptes Rendus Biologies*. 334. 229-236.
- Stampfli, L., Nersten B. 1995. Emulsifiers in bread making. *Food Chemistry*. 52. 353-360.
- Sugawara, T., Miyazawa T. 2001. Beneficial effect of dietary wheat glycolipids on cecum short-chain fatty acid and secondary bile acid profiles in mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 47. 299-305.
- Šárka, E., Smrčková P., Seilerová L. 2013. Resistant and slowly digestible starch. *Chemické Listy*. 107. 929-935.
- Tharanathan, R. N., Mahadevamma S. 2003. Grain legumes - A boon to human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*. 14. 507-518.

- Thompson, D. B. 2000. On the non-random nature of amylopectin branching. *Carbohydrate Polymers*. 43. 223-239.
- Topping, D. L., Clifton P. M. 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews*. 81. 1031-1064.
- Twillman, T. J., White P. J. 1988. Influence of monoglycerides on the textural shelf life and dough rheology of corn tortillas. *Cereal chemistry (USA)*.
- Van Hung, P., Morita N. 2005. Physicochemical properties of hydroxypropylated and cross-linked starches from A-type and B-type wheat starch granules. *Carbohydrate Polymers*. 59. 239-246.
- Všeobecná zdravotní pojišťovna České republiky. 2011. V České republice je 55 % lidí s nadváhou a obezitou. [cit. 2015-03-16].  
Dostupné z: <http://www.vzp.cz/klienti/aktuality/v-ceske-republice-je-55-lidi-s-nadvahou-a-bezitou>

## 8 Samostatné přílohy

### 8.1 Protokol

Seznam sloučenin obsažených v Resistant assay kit - Megazyme:

1. Amyloglukosidasa (3300 U/ml)
2. Pankreatická  $\alpha$ -amylasa
3. Reakční pufr GOPOD
4. Reakční enzymy GOPOD
5. Standardní roztok D-glukosy
6. Kontrola

Postup při přípravě reakčních roztoků a suspenzí z kitu:

1. Příprava zředěného roztoku AMG (300 U/ml)
  - 1.1. zředit 2 ml amyloglukosidasy (3300 U/ml) ve 2 ml 0,1 M malátu sodného
  - 1.2. převést vzniklý roztok do 5 ml zkumavek
  - 1.3. skladovat v mrazničce
2. Příprava roztoku A
  - 2.1. rozpustit 1 g pankreatické  $\alpha$ -amylasy ve 100 ml 100 mM malátu sodného
  - 2.2. míchat 5 minut
  - 2.3. přidat 1 ml zředěného roztoku AMG (300 U/ml) a dobře promíchat
  - 2.4. centrifugovat (1500 otáček) 10 minut
  - 2.5. převést supernatant do zkumavky a použít v den přípravy jako roztok A
3. Příprava reakčního činidla GOPOD
  - 3.1. rozpustit reakční pufr GOPOD v 1 l destilované vody
  - 3.2. odměřit 20 ml ze vzniklého roztoku
  - 3.3. rozpustit reakční enzymy GOPOD ve 20 ml roztoku
  - 3.4. po rozpuštění enzymů roztok převést zpět k původnímu roztoku destilované vody a reakčního pufru
  - 3.5. vzniklé reakční činidlo GOPOD skladovat v lahvi, která je obalena hliníkovou fólií

Seznam sloučenin neobsažených v Resistant assay kit - Megazyme:

1. Malát sodný (100 mM, pH 6)
2. Octan sodný (1,2 M, pH 3,8)
3. Octan sodný (100 mM, pH 4,5)

4. Hydroxid draselný (2 M)
5. Denaturovaný ethanol (50 % v/v)

Postup při přípravě roztoků, které neobsahuje kit:

1. Příprava malátu sodného (100 mM, pH 6)
  - 1.1. rozpustit 23,2 g kyseliny jablečné ve 1600 ml destilované vody
  - 1.2. upravit pH 4 M hydroxidem sodným na hodnotu pH 6
  - 1.3. v roztoku s upraveným pH rozpustit 0,74 g dihydrátu chloridu vápenatého a 0,4 g azidu sodného
  - 1.4. doplnit objem na 2 l
2. Příprava octanu sodného (1,2 M, pH 3,8)
  - 2.1. přidat 69,6 ml ledové kyseliny octové k 800 ml destilované vody
  - 2.2. upravit pH 4 M hydroxidem sodným na hodnotu pH 3,8
  - 2.3. doplnit objem na 1 l destilovanou vodou
3. Příprava octanu sodného (100 mM, pH 4,5)
  - 3.1. přidat 5,8 ml ledové kyseliny octové k 900 ml destilované vody
  - 3.2. upravit pH 4 M hydroxidem sodným na hodnotu pH 4,5
  - 3.3. doplnit objem na 1 l destilovanou vodou
4. Příprava hydroxidu draselného (2 M)
  - 4.1. přidat 112,2 g hydroxidu draselného k 900 ml deionizované vody
  - 4.2. rozpustit hydroxid draselný mícháním
  - 4.3. doplnit objem na 1 l
5. Ethanol 50 %
  - 5.1. přidat 500 ml 95 % či 99 % ethanolu k 500 ml destilované vody

#### 1. Příprava vzorku

- 1) namletí asi 50 g vzorku elektrickým mlýnkem na velikost částic cca 1 mm

#### 2. Hydrolýza a rozpuštění nerezistentního škrobu

- 1) převést  $100 \pm 5$  mg vzorku do zkumavky
- 2) přidat 4 ml pankreatické  $\alpha$ -amylasy (10 mg/ml) obsahující AMG (3 U/ml) do zkumavky (roztok A)
- 3) promíchat zkumavku s pomocí vortexu a umístit ji horizontálně do třepací vodní lázně
- 4) inkubovat vzorek při 37 °C s neustálým třepáním (200 úderů/min) 16 hodin



- 5) vyjmutí zkumavky z vodní lázně
- 6) k roztoku přidat 4 ml 99 % ethanolu a promíchat na vortexu
- 7) centrifugovat (1500 otáček) 10 min
- 8) převést supernatant do sběrné zkumavky, rozpustit usazeninu 2 ml 50 % ethanolu a promíchat na vortexu, přidat 6 ml 50 % ethanolu a centrifugovat (1500 otáček) 10 min
- 9) převést supernatant do sběrné zkumavky a opakovat znovu předešlý krok
- 10) převést supernatant a zkumavky s usazeninou na absorpční papír

### 3. Měření rezistentního škrobu

- 1) do každé zkumavky s usazeninou přidat 2 ml 2 M KOH (dojde k rozpuštění RS) a míchat 20 minut v ledové vodní lázni
- 2) přidat 8 ml 1,2 M octanu sodného a okamžitě promíchat
- 3) přidat 0,1 ml amyloglukosidasy a dobře promíchat
- 4) inkubovat 30 minut ve vodní lázni při 50 °C s občasným promícháním na vortex mixéru
- 5) centrifugovat (1500 otáček) 10 minut
- 6) převést 0,1 ml roztoku v duplikátu do testovacích zkumavek
- 7) přidat 3 ml reakčního činidla GOPOD ke každé testovací zkumavce
- 8) inkubovat 20 minut při 50 °C
- 9) změřit absorbanci každého roztoku při vlnové délce 510 nm oproti blanku

### 4. Měření nerezistentního škrobu

- 1) slít supernatantů ze sběrných zkumavek do 100 ml odměrné baňky
- 2) doplnění objemu na 100 ml 100 mM octanem sodným
- 3) dobře promíchat
- 4) převést 0,1 ml roztoku v duplikátu do testovacích zkumavek
- 5) přidat 10 µl zředěného roztoku AMG (300 U/ml)
- 6) inkubovat 20 minut při 50 °C
- 7) přidat 3 ml reakčního činidla GOPOD a inkubovat dalších 20 minut při 50 °C
- 8) změřit absorbanci každého roztoku při vlnové délce 510 nm oproti blanku

Postup při přípravě blanku:

- smíchat 0,1 ml 100 mM octanu sodného (pH 4,5) se 3 ml reakčního činidla GOPOD

Postup při přípravě standardní D-glukosy:

- smíchat 0,1 ml D-glukosy se 3 ml reakčního činidla GOPOD

5. Vypočtení obsahu rezistentního škrobu podle vzorce:

$$\text{Rezistentní škrob (g/100 g vzorku)} = \Delta E * F * 10,3/0,1 * 1/1000 * 100/W * 162/180$$

kde:

$\Delta E$  = průměrná absorbance vzorku vůči blanku

F = absorbance D-glukosy

1/1000 = převod z mikrogramů na miligramy

W = počáteční hmotnost vzorku (navážka)

162/180 = faktor pro převod D-glukosy na anhydro-D-glukosu, která se vyskytuje ve škrobu

10,3/0,1 = korekce objemu (0,1 ml odebraných z 10,3 ml)

6. Vypočtení obsahu nerezistentního škrobu podle vzorce:

$$\text{Nerezistentní škrob (g/100 g vzorku)} = \Delta E * F * 100/0,1 * 1/1000 * 100/W * 162/180$$

kde:

$\Delta E$  = průměrná absorbance vzorku vůči blanku

F = absorbance D-glukosy

100/0,1 = korekce objemu (0,1 ml odebraných ze 100 ml)

1/1000 = převod z mikrogramů na miligramy

W = počáteční hmotnost vzorku (navážka)

162/180 = faktor pro převod D-glukosy na anhydro-D-glukosu, která se vyskytuje ve škrobu

7. Vypočtení celkového obsahu škrobu:

$$\text{Celkový obsah škrobu} = \text{rezistentní škrob} + \text{nerezistentní škrob}$$