VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM PODMÍNEK VZNIKU A ELIMINACE AKRYLAMIDU VZNIKAJÍCÍHO PŘI TEPELNÉM ZPRACOVÁNÍ POTRAVIN.

DIZERTAČNÍ PRÁCE
DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE Ing. LUCIE MARKOVÁ
AUTHOR

BRNO 2013

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM PODMÍNEK VZNIKU A ELIMINACE AKRYLAMIDU VZNIKAJÍCÍHO PŘI TEPELNÉM ZPRACOVÁNÍ POTRAVIN.

STUDY OF FORMATION AND ELIMINATION OF ACRYLAMIDE IN FOOD MATRIX DURING HEAT TREATMENT.

DIZERTAČNÍ PRÁCE
DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE — Ing. LUCIE MARKOVÁ
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE — prof. Ing. PETER ŠIMKO, DrSc.
SUPERVISOR

BRNO 2013

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

Zadání dizertační práce

Číslo dizertační práce:	**FCH-DIZ0073/2012**	Akademický rok:	**2012/2013**
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií		
Student(ka):	**Ing. Lucie Marková**		
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (P2901)		
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901V021)		
Vedoucí práce	**prof. Ing. Peter Šimko, DrSc.**		
Konzultanti:			

Název dizertační práce:

Studium podmínek vzniku a eliminace akrylamidu vznikajícího při tepelném zpracování potravin.

Zadání dizertační práce:

Rozšíření znalostní databáze o možnosti eliminace akrylamidu ve vybraných druzích tepelně opracovaných potravin a jejich aplikace v technologickém procesu výroby potravin spolu s charakterizací mechanismu eliminace, jakož i důsledků aplikací na kvalitu produktů, technologii výroby a expozici.

Termín odevzdání dizertační práce: 30.6.2013

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

Ing. Lucie Marková	prof. Ing. Peter Šimko, DrSc.	doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Student(ka)	Vedoucí práce	Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Akrylamid (AA), pravděpodobný lidský karcinogen, vzniká jako nežádoucí kontaminant reakcí redukujících sacharidů s asparaginem v potravinách rostlinného původu při jejich tepelném opracování nad 120 °C. AA je nejčastěji stanovován metodami GC/MS a LC/MS-MS po předchozí izolaci z matrixu v široké škále potravin. Zatížení spotřebitelů AA z potravin je podle našich zjištění vyšší u mladých lidí (1,8 – 3,8 μg/kg bw/den), což odpovídá odhadům JECFA FAO/WHO z roku 2006. V zájmu ochrany zdraví vedla hodnocení zdravotních rizik k doporučení snížit tvorbu AA již v procesu zpracování potravin uplatněním dostupných opatření vyplývajících z poznání mechanizmu jeho tvorby.

Hlavním cílem disertační práce bylo rozšíření znalostní databáze o možnosti eliminace AA ve vybraných druzích tepelně zpracovaných potravin. Studium bylo zaměřeno na cereální potraviny, které se významně podílí na expozici AA, zvláště pak na chléb a sladké sušenky. Veškerý obsah AA v chlebu se nachází v kůrce, která představuje 5 - 15 % celého chleba. Chleby připravené v domácí pekárně z chlebových směsí obsahují v kůrce přibližně 30 – 75 μg/kg, kdežto chleby z obchodní sítě 2 až 10x více, v závislosti od složení a podmínek přípravy a pečení chlebů. Pro udržení kvality chlebů z domácí pekárny po celou dobu trvanlivosti směsi byla navržena optimalizace chlebových směsí zvýšením obsahu droždí, což při dostatečně vysoké aktivitě kvasnic pozitivně působí také na redukci AA.

Monitoring obsahu AA v sortimentu pečivářských výrobků ukázal vyšší obsah AA v diabetických sušenkách, které obsahují namísto sacharózy fruktózu. U tří z nich dokonce překračoval směrnou hodnotu (500 μg/kg) pro komoditu „sušenky“ o více než 1,5násobek. Pro minimální zásah do technologie jejich výroby byla navržena eliminace AA aplikací enzymu asparagináza, kdy koncentrace enzymu a vhodný způsob jeho použití v průmyslových podmínkách byl předem testován na modelových systémech. Optimalizací podmínek aplikace enzymu bylo dosaženo snížení obsahu AA v diabetických sušenkách o více jak 40 % aniž by došlo k ovlivnění organoleptických vlastností finálních výrobků.

Součástí práce bylo i studium vlivu antioxidantů na vznik AA, kdy byl obsah AA v perníkách účinně snižován použitím fenyklu, anýzu, hřebíčku, vanilky či bílého pepře (o 9 – 21 %). Naopak koriandr a skořice jeho obsah výrazně zvyšovali (o 18 – 54 %). Jelikož mezi DPPH• radikál zhášející aktivitou extraktů koření a obsahem AA nebyla pozorována korelace, konečný obsah AA byl patrně ovlivněn chemickým složením koření a reaktivností jednotlivých složek v matrici.

V práci zkoumané metody se jeví jako vhodné způsoby eliminace AA ve vybraných potravinách, ale jejich konkrétní použití je nutné optimalizovat s ohledem na složení potravin, jejich zpracování a použitou technologii. Odhad dopadu aplikace navržených způsobů eliminace AA na celkovou expozici ukázal, že zatížení organismu AA u studentů středních škol z České a Slovenské republiky lze snížit v průměru o 10 %. Tento pokles je krokem vpřed pro snížení možného rizika vzniku rakovinného onemocnění konzumací potravin s vysokým obsahem AA. Zároveň je významnou informací pro výrobce potravinářských produktů v uplatňování dostupných a ověřených metod eliminace AA, které by hodnoty zatížení lidského organizmu AA z potravin pomohly ještě více snížit.

ABSTRACT

Acrylamide (AA) is a probable human carcinogen and undesirable contaminant which is produced by the reaction of reducing sugars with asparagine in plant foods during their thermal treatment above 120 °C. AA is most often determined by GC-MS and LC-MS/MS in isolates from the matrix in a wide range of foods. According to our observations, AA intake from food is higher among young people (from 1.8 to 3.8 μg/kg bw/day), which is consistent with the estimations of JECFA FAO/WHO from the year 2006. Considering the health risk, it is recommended to reduce AA formation in food during its processing, in particular exploiting the available experience.

The aim of this thesis was to extend the knowledge of the possibility of AA elimination in selected types of thermally processed foods. The study was focused on cereal foods that contribute significantly to AA exposure, especially bread and sweet biscuits. The whole AA content in the bread is in the crust, which represents 5-15% of the bread. Crust of home-made bread contains approximately 30-75 μg/kg, however the marketed bread contains 2 to 10 times more of AA. This is due to the composition of bread mix, preparation conditions and baking. For maintaining the quality of home-made bread during the dry mixture shelf-life, optimization of bread mixtures was designed by increasing of yeast content, which proved positive effect on the reduction of AA content at sufficiently high activity of the yeast.

Monitoring of AA content in assortment of sweet bakery products showed higher levels of AA in diabetic biscuits containing fructose instead of sucrose. Three of them even exceeded the reference value (500 μg/kg) more than 1.5 times for commodity "cookies". Elimination of AA by applications of the enzyme asparaginase has been designed for minimal interference in

technology of their production. The concentration of the enzyme and the appropriate method of its use in industrial environment have been tested previously in model systems. In optimized conditions of the enzyme application, AA content in diabetic biscuits was reduced by more than 40% without affecting the organoleptic properties of the final product.

Effect of the antioxidants on AA formation was also part of the study. AA content in gingerbread was reduced efficiently by the use of fennel, anise, cloves, vanilla and white pepper (by about 9-21%). Conversely, coriander and cinnamon significantly increased its content (by 18-54%). Since correlations between the DPPH• radical quenching activity of the spice extracts and AA content was not observed, the final content of AA was probably influenced by the chemical composition of spices and reactivity of the individual components in the matrix.

Investigated methods appear to be suitable ways of elimination AA in some foods; however their specific use must be optimized with regard to the composition of the food, processing and the technology used. Estimated impact of application of the above-mentioned methods to the overall elimination of AA exposure showed that its intake in high school students from the Czech and Slovak Republic can be reduced on average by 10%. This decrease is a success to reduce the possible risk of cancer disease by eating foods with a high AA content. It is also important piece of information for food producers for further development of relevant methods for AA elimination which would help to reduce the AA intake from foods even more.

KLÍČOVÁ SLOVA

akrylamid, antioxidanty, L-asparagináza, eliminace, expozice, tepelně opracované potraviny, cereální produkty

KEYWORDS

acrylamide, antioxidants, L-asparaginase, elimination, exposure, thermally treated foods, cereal based products

MARKOVÁ, L. *Studium podmínek vzniku a eliminace akrylamidu vznikajícího při tepelném zpracování potravin.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 162 s. Vedoucí dizertační práce prof. Ing. Peter Šimko, DrSc..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Dizertační práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího dizertační práce a děkana FCH VUT.

…….....
podpis studenta

Touto cestou bych chtěla poděkovat všem, kteří mi svými návrhy, radami a připomínkami přispěli k vypracování dizertační práce. Zejména děkuji vedoucímu mé práce prof. Ing. Petru Šimkovi, DrSc. za trpělivost, ochotu a snahu mi pomoci nejen při řešení mé dizertační práce, ale i po celou dobu doktorského studia. Dále bych ráda poděkovala Ing. Zuzaně Ciesarové, CSc. za její cenné odborné rady a podporu při psaní dizertační práce.

Mé velké díky za ochotu, vstřícný přístup a podporu patří i zaměstnancům Výzkumného ústavu potravinářského v Bratislavě a Ústavu chemie potravin a biotechnologií FCH VUT v Brně.

Nakonec bych chtěla poděkovat také rodičům za důvěru a poskytnuté zázemí a svému partnerovi a všem blízkým a přátelům za podporu.

OBSAH

1 ÚVOD 10
2 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY AKRYLAMIDU v potravinách 12
2.1 Charakteristika akrylamidu 12
2.2 Toxicita akrylamidu a jeho metabolismus 12
2.3 Výskyt akrylamidu 14
2.4 Expozice akrylamidem z potravin 16
2.5 Mechanizmus vzniku akrylamidu v tepelně upravených potravinách 16
2.5.1 Vznik akrylamidu reakcí asparaginu s karbonylovými sloučeninami 17
2.5.2 Alternativní dráhy pro vznik akrylamidu 18
2.6 Analytické metody stanovení obsahu akrylamidu v potravinách 20
2.6.1 Příprava vzorků 20
2.6.2 Stanovení obsahu akrylamidu metodou GC 21
2.6.3 Stanovení obsahu akrylamidu metodou LC 22
2.6.4 Detekce akrylamidu 22
2.6.5 Ostatní analytické metody 23
2.7 Způsoby eliminace akrylamidu 24
2.7.1 Minimalizace prekurzorů akrylamidu 24
2.7.2 Eliminace obsahu akrylamidu změnou receptury 26
2.7.3 Zpracování jako prevence vzniku akrylamidu 31
2.7.4 Finální úprava 35
2.8 Vliv antioxidantů na vznik a eliminaci akrylamidu v potravinách 37
3 CÍL PRÁCE 41
4 MATERIÁLY A METODY 42
4.1 Použité chemikálie 42
4.2 Použité přístroje 43
4.3 Stanovení expozice akrylamidem z potravin 43
4.4 Příprava chlebů v domácí pekárně 46
4.5 Příprava perníků s pohankovou moukou 48
4.6 Modelové sušenek připravené v laboratorních podmínkách 50
4.7 Průmyslově vyráběné sušenky s enzymem 51
4.8 Měření barvy a fotografování 52
4.9 Stanovení aktivity vody, pH a obsahu sušiny 53
4.10 Analýza texturních vlastností 53

4.11 Příprava extraktů koření a stanovení radikál zhášející aktivity DPPH testem 55
4.12 Stanovení obsahu akrylamidu pomocí GC/MS 55
4.13 Stanovení obsahu akrylamidu pomocí LC/ESI-MS-MS 56
4.14 Stanovení obsahu aminokyselin pomocí LC/ESI-MS-MS 57
4.15 Senzorické hodnocení 58
4.16 Statistické zhodnocení výsledků 58
5 VÝSLEDKY A DISKUZE 59
5.1 Vyhodnocení expozice akrylamidem z potravin 59
5.2 Optimalizace receptury chlebových směsí a technologického procesu 66
5.2.1 Distribuce akrylamidu v jednotlivých částech chleba 67
5.2.2 Vliv droždí na tvorbu akrylamidu v chlebech z chlebových směsí 71
5.3 Vliv aplikace antioxidantů na eliminaci akrylamidu v perníkách 86
5.3.1 Dopad nahrazení žitné mouky pohankovou moukou 86
5.3.2 Vliv koření na tvorbu akrylamidu v perníčkách z pohankové mouky 88
5.4 Eliminace akrylamidu v pečivářských produktech 94
5.4.1 Monitoring obsahu akrylamidu v pečivářských produktech 94
5.4.2 Aplikace enzymu L-asparagináza v modelových sušenkách 98
5.4.3 Aplikace enzymu L-asparagináza v průmyslově vyráběných sušenkách 112
5.5 Odhadem dopadu aplikace metod eliminace akrylamidu na expozici 125
6 ZÁVĚR 128
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ 132
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ 154
9 SEZNAM PŘÍLOH 156
10 PŘÍLOHY 157

1 ÚVOD

Stále více rostoucí požadavky spotřebitelů na zdravé, výživné a pestré potraviny vedou k neustálé inovaci potravinářských technologií a také k vývoji nových technologických postupů se zvláštním ohledem na kvalitu, bezpečnost a atraktivnost potravinářských produktů. Cílem potravinářské produkce je dodávat na trh mikrobiologicky i chemicky bezpečné potraviny se zachováním optimálních nutričních a senzorických vlastností a s minimálním obsahem škodlivých látek. Výživa je totiž jedním z faktorů poukazujících na vyspělost společnosti, ale také determinuje výskyt mnoha civilizačních onemocnění, ať už z nadbytku, či nedostatku výživy, nebo z nesprávné skladby výživy. S potravinami je taktéž spojen výskyt mnoha karcinogenních onemocnění, protože potraviny mohou mít jak karcinogenní tak i preventivní účinky [1, 2, 3].

Při výrobě potravin je po staletí používáno tepelné opracování potravin, které vede k lepší stravitelnosti potravin, zvyšuje jejich bezpečnost z hlediska výskytu mikrobiologické kontaminace, prodlužuje trvanlivost potravin a v neposlední řadě má vliv na chutnost a atraktivnost výrobků rozšířením škály barev, chutí, vůní a textur v potravinách vyrobených z podobných surovin. Tepelným opracováním dochází ke zničení enzymů a mikroorganismů a snižuje se aktivita vody potravin, čímž se prodlužuje trvanlivost potravin. Některé látky vznikající během tepelného opracování mohou mít také pozitivní vliv na lidské zdraví, kdy řada nově vytvořených sloučenin může mít antioxidační, antimikrobiální a antialergení vliv. Kromě pozitivních účinků vedou tepelné procesy i k negativním důsledkům, jako je ztráta tepelně labilních sloučenin (např. vitaminů, esenciálních aminokyselin), nebo vznik nežádoucích chutí a vůní, což způsobuje pokles nutriční hodnoty a senzorické kvality tepelně opracovaných potravin [4].

V posledních letech je tepelné opracování potravin spojeno především s obavami způsobenými sloučeninami, které se přirozeně nevyskytují v potravinách, ale mohou v nich vznikat během ohřevu nebo konzervačních procesů, a které mají negativní vliv na lidské zdraví, jako jsou mutagenní, karcinogenní a cytotoxické účinky [4]. Mezi nejznámější patří polycyklické aromatické uhlovodíky a heterocyklické aminy, biogenní aminy, furan, 3-monochlorpropan-1,2-diol [3, 5, 6, 7] a také polychlorované a polybromované bifenyly a brómované difenylétery [8, 9, 10]. Největší pozornost je v současnosti věnována lysinoalaninu a 5-hydroxymethylfurfuralu a zvláště pak akrylamidu [4, 11, 12], který je od

roku 1994 řazen Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC) mezi pravděpodobné lidské karcinogeny [13].

Národní úřad pro potraviny ve Švédsku vydal v roce 2002 prohlášení, že potraviny zpracované při vysokých teplotách obsahují značné úrovně akrylamidu [13], které mohou do jisté míry nepříznivě ovlivňovat lidské zdraví [14]. Prozatím však neexistuje žádná směrnice upravující hodnoty akrylamidu v potravinách. Vznik akrylamidu v průběhu tepelného zpracování potravin umožňují pochopit četné studie, nehledě na rozvoj analytických metod pro stanovení obsahu akrylamidu v potravinách. Výzkum je směřován na objasnění mechanismu vzniku a především snížení jeho obsahu v konečném produktu [15].

Cílem této dizertační práce je rozšíření znalostní databáze o možnosti eliminace akrylamidu ve vybraných druzích tepelně zpracovaných potravin a jejich aplikace v technologickém procesu výroby potravin spolu s charakterizací mechanismu eliminace, jakož i důsledků aplikací na kvalitu produktů, technologii výroby a expozici. Jednotlivé studie eliminace akrylamidu vychází ze zhodnocení denního příjmu akrylamidu studenty středních škol na základě posouzení výsledků získaných zpracováním údajů z dotazníku zaměřeného na běžně konzumované potraviny se zvýšeným obsahem akrylamidu. Tato práce se tak věnuje především studiu vzniku a eliminaci akrylamidu v chlebech připravených v domácí pekárně, dále vlivu antioxidantů na tvorbu akrylamidu v perníku a také možnosti eliminace akrylamidu aplikací enzymu L-asparagináza do pečivářských produktů. Na základě dosažených výsledků byly navrženy změny výrobních procesů, které zajistí produkci potravin se sníženým obsahem akrylamidu, čímž by došlo k redukci zatížení lidského organismu tímto potenciálním karcinogenem a k ochraně zdraví spotřebitele.

Práce je součástí několikaletého výzkumného projektu probíhajícího na Výzkumném ústavě potravinářském v Bratislavě, který je zaměřen na zvýšení bezpečnosti potravin eliminací tepelně vznikajících kontaminantů, podporovaného Agenturou na podporu výzkumu a vývoje SR na základě kontraktu APVV VMSP-0089-09, APVV LPP-0310-09, bilaterálních projektov, a také Agenturou Ministerstva školství, vedy, výskumu a športu SR pro strukturální fondy Evropské unie v rámci projektu ITMS 26240120024 Centrum excelentnosti pre kontaminujúce látky a mikroorganizmy v potravinách.

2 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY AKRYLAMIDU V POTRAVINÁCH

V současné době je značná pozornost věnována studiu teplem indukovaných toxických látek v potravinách, vzhledem k jejich potenciálně škodlivým účinkům na lidské zdraví [16]. Výzkum je soustředěn zvláště na lysinoalain, který je využíván především jako marker indikující tepelné ošetření potravin [12], a na 5-hydroxymethylfurfural, jehož množství detekovatelné v potravinách přímo souvisí s tepelným zatížením při zpracování potravin bohatých na sacharidy [4].

V posledních letech je ale nejvíce diskutovanou teplem indukovanou toxickou látkou v potravinách akrylamid, který vzniká v celé řadě běžně konzumovaných potravin [4].

2.1 Charakteristika akrylamidu

Akrylamid (2-propenamid) je bílá krystalická látka vznikající hydratací akroleinu. Jeho rozpustnost v polárních a nepolárních rozpouštědlech se značně liší, ale ve vodě je velmi dobře rozpustný [17, 18]. Akrylamid je používán k syntéze polymerů, které nejsou toxické, a které jsou využívány v papírenském a textilním průmyslu, při čištění odpadních vod, a dalších průmyslových odvětvích. Akrylamid má také široké uplatnění ve vědeckém výzkumu, nejčastěji jako polyakrylamidový gel používaný pro separaci proteinů a jiných sloučenin prostřednictvím elektroforézy [18, 19].

Akrylamid může být v životním prostředí přítomen nejen v důsledek antropogenních ale i přirozených procesů [20]. Některé mikroorganismy produkují enzymy, které katalyzují syntézu a biodegradaci akrylamidu. Akrylamid má vysokou mobilitu v půdě a podzemní vodě a je biologicky odbouratelný [18].

2.2 Toxicita akrylamidu a jeho metabolismus

Akrylamid je genotoxický a mutagenní a je klasifikován jako velmi toxický. Pravděpodobná orálně podaná smrtící dávka pro člověka je v rozmezí 50 - 500 mg/kg. Při krátkodobém vystavení dochází k dráždění očí, kůže a dýchací soustavy. Dlouhodobé expozice akrylamidem způsobují u zvířat rakovinu a mohou také způsobit rakovinu kůže a plic u lidí [19, 21]. První epidemiologické údaje zveřejněné ve studiích Hogervorst *et al.* [22,

23] naznačují, že příjem akrylamidu z potravin může zvyšovat riziko rakoviny u lidí. Byla totiž zjištěna souvislost mezi zvyšujícím se rizikem rakoviny endometria a vaječníků a stoupajícím příjmem akrylamidu z potravin, a také spojitost s rakovinou ledvinových buněk [22, 23]. Mechanismus, podle kterého akrylamid způsobuje rakovinu u laboratorních zvířat, a který může vyvolat rakovinu u lidí, není dosud úplně objasněn [23].

Akrylamid může být do těla vstřebán přes kůži, inhalací a gastrointestinálním traktem [24]. Při perorálním podání je velmi rychle absorbován především ve střevech, kde je transportován do buněk pasivní difúzí. Následně je rozdistribuován do tkání, především svalové tkáně, tkáně trávicího traktu, plic, kůže a kostní dřeně. Může procházet přes krev/placentární bariéru do lidské placenty a i do mateřského mléka kojících matek, což naznačuje, že orálním požitím může akrylamid dosáhnout jakékoli lidské tkáně [24, 25]. Přijatý akrylamidu je primárně metabolizován dvěma konkurenčními biotransformačními směry [26]:

I. genotoxický, kde vzniká prostřednictvím cytochromu P450 (CYP2E1) epoxidovaný derivát glycidamid, který vede k tvorbě hemoglobinových nebo DNA aduktů, nebo může podstoupit hydrolýzu katalyzovanou epoxihydrolázou [23, 24, 25, 26]
II. negenotoxický, kdy dochází k přímé konjugaci akrylamidu s glutathionem a může tak působit na redoxní stavy buněk a genové transkripce, nebo může narušit opravu DNA či hormonální rovnováhy [23, 24].

Akrylamid i glycidamid mají schopnost se kovalentně vázat na nukleofilní místa biologických makromolekul, zvláště proteinů a dusíkatých nukleových kyselin [25], což může vést ke změně bílkovinné funkčnosti a tím způsobovat rakovinu [27]. Ačkoli jsou akrylamid i glycidamid schopny tvořit DNA adukty, bylo zjištěno, že ke vzniku DNA aduktů dochází převážně s glycidamidem. To naznačuje, že prostředníkem toxického účinku akrylamidu je právě glycidamid, který je jako všechny epoxidy silně reaktivní a známý svou mutagenitou a karcinogenitou [25, 26]. Akrylamid a glycidamid se mohou vázat také na terminální dusík globinu za tvorby aduktů hemoglobinu, nebo produkovat konjugáty s glutathionem, které jsou převáděny do příslušných metabolitů merkapturové kyseliny, a následně vylučovány močí. Převážná část takto vyloučeného akrylamidu je právě v podobě konjugátu akrylamidu. Obsah konjugátu glycidamidu v moči je nepatrný [25, 26].

Fennell *et al.* [28] zjistili, že v průměru 34 % dávky akrylamidu je vyloučeno během prvního dne po konzumaci. Boettcher *et al.* [29] uvádí dokonce ~ 50 % za prvním den a 57 % dávky po 2 dnech. Z těchto studií vyplývá, že detoxikace spolu s eliminací nezměněného akrylamidu je efektivnější než vytváření více reaktivního epoxidového metabolitu glycidamidu [25, 28, 29].

2.3 Výskyt akrylamidu

Akrylamid není v žádné formě přidáván do potravin, proto může být jeho přítomnost způsobena kontaminací z vnějšího prostředí, nebo samotným vznikem akrylamidu v potravině během tepelné úpravy. Minimální obsah akrylamidu lze v potravinách zjistit po použití akrylamidových polymerů a kopolymerů během technologického zpracování potravin, nebo v důsledku jejich použití jako složky obalových materiálů potravin. Je ale nepravděpodobné, že by příčinou vysokého obsahu akrylamidu především v tepelně opracovaných produktech byl kontakt potravin s materiály, či vodou nebo půdou obsahující polyakrylamid [20].

Akrylamid je přítomen především v potravinách upravovaných při teplotách nad 120 °C, při jejichž tepelném opracování klesá obsah vody a zvyšuje se teplota potraviny. Přesto lze stopová množství akrylamidu nalézt i ve vařených potravinách a potravinách opracovaných mikrovlnným ohřevem [4, 20, 30]. Akrylamid se vyskytuje zejména v tepelně opracovaných potravinách rostlinného původu s vysokým obsahem redukujících sacharidů a nízkým obsahem proteinů, jako jsou brambory a obiloviny. Naopak potraviny živočišného původu vykazují pouze nízký nebo zanedbatelný obsah akrylamidu [18, 30].

Evropský úřad pro bezpečnost (EFSA) zveřejnil výsledky monitorování množství akrylamidu v potravinách [31] v reakci na žádost Evropské komise (doporučení komise 2007/331/ES) [32]. Souhrn výsledků je uveden v Tab. 1, z nichž je patrné, že nejvyšší obsah akrylamidu byl stanoven především ve smažených bramborových výrobcích. Akrylamid byl také zjištěn ve výrobcích, které v Tab. 1 uvedeny nejsou, jako lískové oříšky, mandle, olivy a sušené ovoce. Přestože hodnoty u těchto produktů mohou být velmi vysoké, jejich podíl na celkovém příjmu akrylamidu je pouze okrajový [4].

Na základě výsledků monitoringu obsahu akrylamidu v potravinách podle doporučení Komise 2007/331/ES [32] byly stanoveny směrné hodnoty akrylamidu (Tab. 2), které jsou uvedeny v příloze Doporučení komise ze dne 10. 1. 2011 o zkoumání množství akrylamidu v potravinách [33]. Účelem směrných hodnot je ale pouze poukázat na nutnost zkoumání v případě, že obsah akrylamidu v konkrétních potravinách tyto hodnoty překročí. Nejedná se o bezpečnostní limity a jejich překročením by se nemělo přistupovat k donucovacímu opatření a/nebo vydání rychlého varování bez řádného posouzení rizika pro každý případ zvlášť [33].

Tab. 1: Obsah akrylamidu (µg/kg)[a] v různých potravinových výrobcích [31]

Potravinové výrobky	N[b]	Medián	Průměrná hodnota	Maximální hodnota
Sušenky	227	169	317	4200
Chléb	272	50	136	2430
Snídaňové cereálie	128	100	156	1600
Dětské cereální potraviny	76	42	74	353
Káva	208	188	253	1158
Smažené bramborové hranolky	529	253	350	2668
Rozmixované dětské příkrmy	84	31	44	162
Ostatní produkty	854	169	313	4700
Smažené bramborové lupínky	216	490	628	4180
Doma připravované bramborové produkty	121	150	319	2175

[a] Hodnoty pod LOD a hodnoty mezi LOD a LOQ byly stanoveny na hodnotu LOD nebo LOQ

[b] Počet jednotlivých analyzovaných údajů pro každou kategorii potravin

Tab. 2: Směrné hodnoty akrylamidu na základě údajů EFSA z monitorování v letech 2007-2008 [33]

Potravina	Směrná hodnota (µg/kg)
Hranolky k přímé spotřebě	600
Bramborové lupínky	1000
Měkký chléb	150
Snídaňové cereálie (kromě müsli a ovesné kaše)	400
Sušenky, krekry, oplatky, křupavý chléb a podobné výrobky, kromě perníku	500
Pražená káva	450
Instantní (rozpustná) káva	900
Příkrmy pro kojence jiné než obilné příkrmy	80
Sušenky a suchary pro kojence a malé děti	250
Obilné příkrmy pro kojence a malé děti, kromě sušenek a sucharů	100

2.4 Expozice akrylamidem z potravin

K expozici akrylamidem u spotřebitelů dochází buď přímo, nebo nepřímo. Nepřímá expozice může být způsobena zbytkovými stopy monomeru při balení potravin, u nichž polyakrylamid slouží jako pojivo [34, 35], kdežto k přímé expozici akrylamidem může docházet požitím potravin s vysokým obsahem sacharidů, jako jsou bramborové chipsy a hranolky, pražené obiloviny a chléb [36].

Průměrný denní příjem akrylamidu u populace je JECFA odhadován v rozpětí od 0,3 do 2,0 μg/kg bw/den a u vysoce exponovaných spotřebitelů až od 0,6 do 3,5 μg/ kg bw/den [37]. Shettgen *et al.* [38, 39] zjistili, že expozice akrylamidem je u kuřáků 2x až 4x vyšší než u nekuřáků. Do vysoce zatížené skupiny jsou zahrnuty také děti a mládež, které mohou být akrylamidem z potravin zatíženy až 2x více než dospělá populace [40, 41]. To souvisí zejména s jejich nižší tělesnou hmotností a také s jejich stravovacími návyky, kdy konzumují více potravin bohatých na akrylamid, jako jsou bramborové hranolky a lupínky [4, 20].

Podle dosud získaných hodnot se na expozici akrylamidem u většiny populace významným způsobem podílí výrobky z brambor (až 50 %) a pekařské výrobky a chléb (přibližně 20 %) [36]. V nezanedbatelné míře přispívá k příjmu akrylamidu i káva [4, 20]. Odhad denního příjmu akrylamidu je ale zatížen určitou nejistotou vzhledem k široké změně obsahu akrylamidu nejen v různých potravinových kategoriích, ale i v různých značkách potravin ze stejné kategorie [4, 18], což závisí od složení daného výrobku, způsobu jeho zpracování apod. Dále je odhad denního příjmu ovlivněn i spotřebou těchto potravin, která kolísá jak regionálně tak i v rámci jednotlivých skupin obyvatelstva [4, 20], kdy byla zjištěna velká variabilita, vzhledem ke stravovacím návykům a způsob, jakým jsou potraviny zpracovávány a připravovány [4]. Patrné jsou i značné rozdíly mezi běžnou a akutní expozicí akrylamidu, které lze vysvětlit tím, že jednotlivci mohou konzumovat např. velké množství bramborových chipsů v libovolný den, ale není pravděpodobné, že k tomu dochází každodenně. To se následně projeví zvýšením dlouhodobého průměrného příjmu akrylamidu, i když běžná expozice akrylamidem je nižší než akutní [40].

2.5 Mechanizmus vzniku akrylamidu v tepelně upravených potravinách

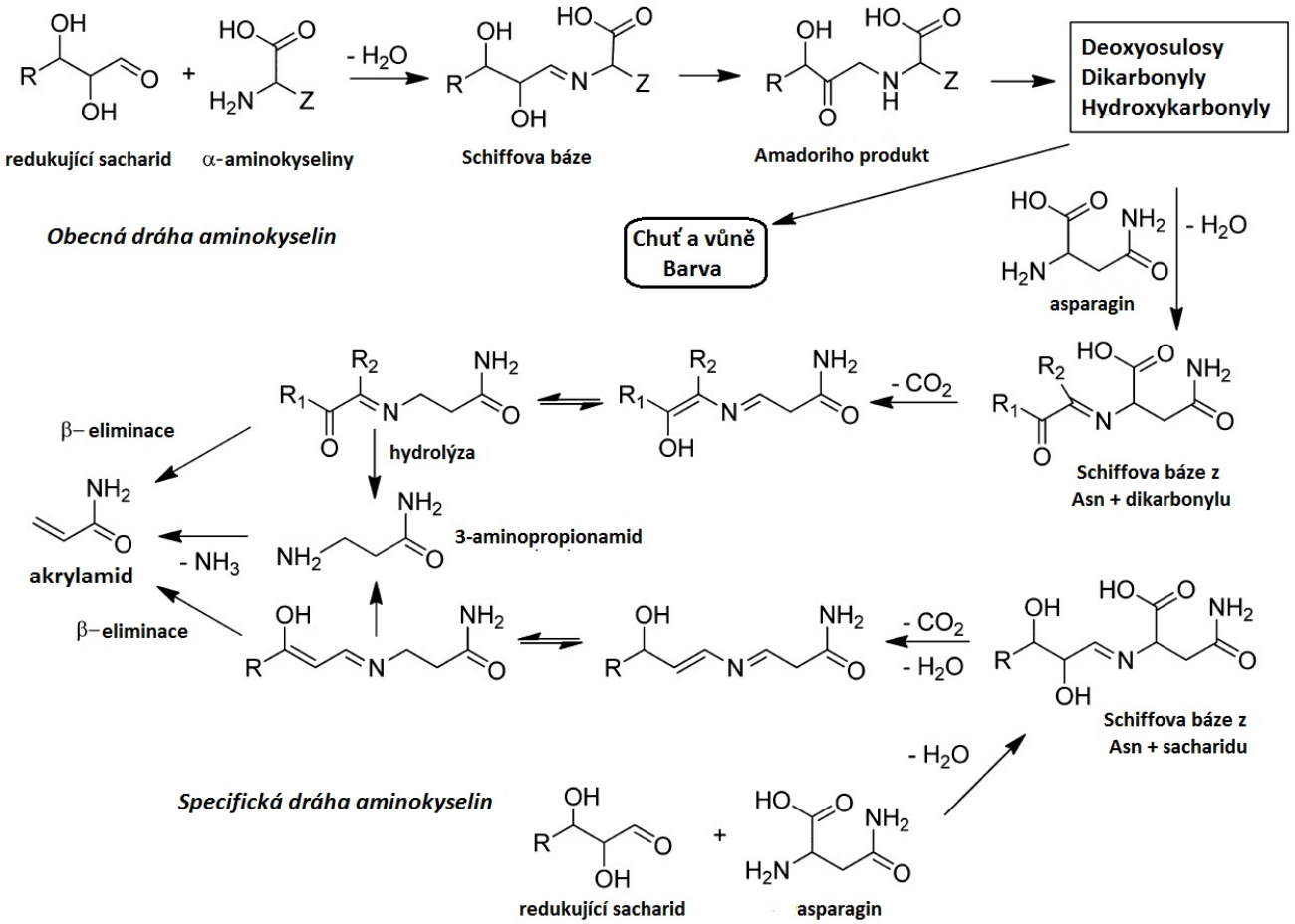
Hlavním reakčním mechanismem vedoucím ke vzniku akrylamidu v tepelně zpracovaných potravinách je Maillardova reakce [4], během nichž se tvoří celé řady žádoucích senzoricky aktivních látek, ale i některých toxických sloučenin s mutagenními a karcinogenními

vlastnostmi [20]. Akrylamid vzniká v průběhu Maillardovy reakce v potravinách bohatých na redukující sacharidy a volný asparagin, který je jeho hlavním prekurzorem, a který přímo poskytne páteř molekuly akrylamidu [42].

Kromě hlavního reakčního mechanismu v průběhu Maillardovy reakce byly zjištěny ještě další vedlejší reakce, které také umožňují vznik akrylamidu v potravinách [4].

2.5.1 Vznik akrylamidu reakcí asparaginu s karbonylovými sloučeninami

Mechanismus vzniku akrylamidu z asparaginu byl popsán celou řadou autorů, přičemž bylo prokázáno, že se na jeho tvorbě podílí dikarbonylové meziprodukty, které vznikají v průběhu Maillardovy reakce [43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51].



Obr. 1: Předpokládané mechanismy vzniku akrylamidu z redukujících sacharidů a asparaginu [52]

Prvním krokem dráhy (Obr. 1) je reakce mezi redukujícím sacharidem a libovolnou aminokyselinu, čímž se získá Schiffova báze, z které přesmykem vzniká Amadoriho produktu, nebo Heynsův produkt. Tyto dehydráty a fragmenty, regenerované volnými aminokyselinami, vytváří skupinu vysoce reaktivních deoxyosulos, dikarbonylů a

hydroxykarbonylových sloučenin (Obr. 1 - Obecná dráha aminokyselin). Tyto meziprodukty podstupují klasickou Streckerovu degradaci s libovolnou aminokyselinou a utváří tak chuť a barvu potravin. Pokud by byl aminokyselinou asparagin, vede sled reakcí k tvorbě akrylamidu [52]. Avšak Zyzak *et al.* [43] zjistili, že akrylamidu by mohl vznikat přímo z Schiffovy báze vytvořené z glukózy a asparaginu (Obr. 1 - Specifická dráha aminokyselin), čímž je přeskočena tvorba Amadoriho produktu a fragmentů sacharidů. Stadler *et al.* [42] prokázali, že v systémech s nízkou vlhkostí je tato dráha významně podporována hydroxykarbonylovými meziproduktů.

Je pravděpodobné, že všechny z těchto drah přispívají k tvorbě akrylamidu, a že dominantní dráha je určena konkrétním složením systému a podmínkami zpracování. Asparagin představuje pouze část z obsahu aminokyselin přítomných v potravinách, přičemž některé jsou více reaktivní než asparagin (např. glutamin, arginin a lysin) a mohou tak generovat prekurzory potřebné pro obecnou dráhu aminokyselin, čímž mohou hrát významnou roli v tvorbě akrylamidu [52].

2.5.2 Alternativní dráhy pro vznik akrylamidu

2.5.2.1 Vznik akrylamidu z 3-aminopropionamidu

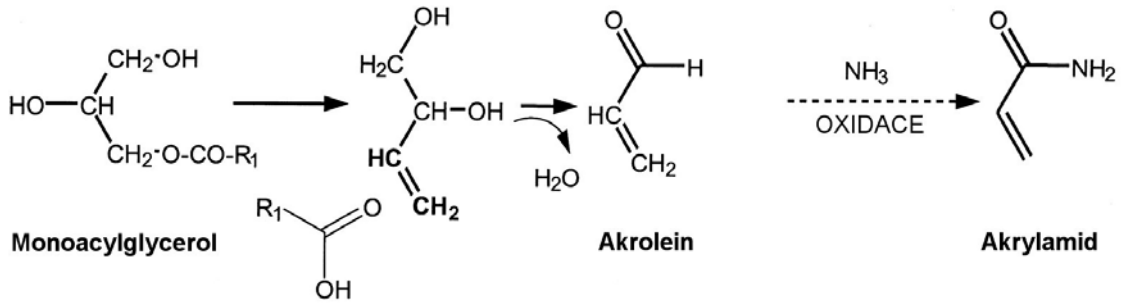
3-aminopropionamid byl poprvé identifikován jak důležitý meziprodukt vzniku akrylamidu z asparaginu [43, 53], ale může také v potravinách vznikat enzymatickou dekarboxylací asparaginu. Následnou termickou deaminací biogenního 3-aminopropionamidu dochází ke vzniku akrylamidu, čímž může být 3-aminopropionamid velmi významným prekurzorem akrylamidu za určitých reakčních podmínek. Přínos této dráhy k celkovému obsahu akrylamidu v potravinách je ale třeba ještě objasnit [53, 54, 55].

2.5.2.2 Vznik akrylamidu reakcí asparaginu s lipidy

Přestože sacharidy hrají významnou roli při tvorbě akrylamidu, mohou se na jeho tvorbě v potravinách podíl i lipidy. Za určitých podmínek může docházet k tvorbě akrylamidu z produktů oxidace lipidů, jako je akrolein a kyselina akrylová [20, 53, 56, 57]. Během této reakce je upřednostňována oxidace lipidů s α, β, γ, δ-dinenasycenou karbonylovou skupinou, přičemž se usuzuje, že dinenasycený aldehyd je více reaktivní než dinenasycený keton [57]. Ehling *et al*. [56] se domnívají, že čím vyšší je stupeň nenasycenosti lipidů, tím větší je tvorba akrylamidu.

Všeobecně se předpokládá, že akrylamid vzniká oxidací akroleinu na kyselinu akrylovou, která reaguje s amoniakem z dusíkaté sloučeniny, jako jsou aminokyseliny [58, 59, 60]. Akrolein může být tvořen odstraněním vody po zahřátí glycerolu vznikajícího hydrolytickou degradací triacylglycerolů, jako důsledku obsahu vody v potravinách. Nicméně, během smažení nedochází k hydrolýze triacylglycerolů nebo není důležitá, a to i v případě, že substrát má vysoký obsah vody. Z technologií tuků je ale známé, že smažením již při teplotě 150 °C může docházet k rozkladu monoacylglycerolů na mastné kyseliny a akrolein po cyklickém mechanismu, tzv. pyrolýze esterů (Obr. 2) [59].

Akrolein může pocházet také z methylglyoxalu vznikajícího při odbourávání škrobu za vzniku cukrů jako fruktóza a glukóza, který následnou reakcí s vodou poskytuje kyselinu mléčnou a ta je přímo přeměňována na kyselinu akrylovou [59].



Obr. 2: Vznik akroleinu cyklickým mechanismem z monoacylglycerolu [59]

2.5.2.3 Přímý vznik akrylamidu z aminokyselin

K tvorbě akrylamidu může docházet i přímo ze samotného asparaginu jeho termicky indukovanou dekarboxylací na 3-aminopropionamid s následnou deaminací [43]. Přesto hlavní podíl akrylamidu vzniká v přítomnosti redukujících sacharidů, protože vznik akrylamidu podporují všechny karbonylové sloučeniny, ale samotný asparagin upřednostňuje intramolekulární cyklizaci na 3-aminosukcínimid s následnou produkcí maleinimidu před tvorbou akrylamidu [20].

V přítomnosti asparaginu může akrylamid vznikat z methioninu (případně i jiných aminokyselin), přičemž tento mechanismus pravděpodobně zahrnuje dekarboxylaci a deaminace methioninu na methional, který se pak chová jako aldehyd a reaguje s -NH_2 skupinou asparaginu za vzniku Schiffovy báze, jež se následně mění na N-glykosid, z něhož poté vzniká akrylamid mechanismem analogickým pro N-glykosid z asparaginu a glukózy. Methionin v tomto případě není transformován na akrylamid přímo, ale je spíše zdrojem karbonylové sloučeniny podobně jako glukóza. Pokud není asparaginu přítomen, může být

methional přeměněn po odstranění H_2S na akrolein, který by pak mohl být transformována na akrylamid postupem uvedeným v předchozí kapitole [18].

Dalšími možnými aminokyselinami, z nichž může vznikat akrylamid, jsou β-alanin, serin nebo cystein. Pyrolýzou β-alaninu dochází k jeho tepelnému rozkladu na kyselinu akrylovou, která reakcí s dostupným amoniakem vytváří akrylamid. Naproti tomu, serin může být sám nebo v přítomnosti sacharidů dehydratován na kyselinu pyrohroznovou, která může vznikat i z cysteinu po odstranění sulfidové molekuly. Následně může docházet až k tvorbě kyseliny akrylové, která byla zjištěna spolu s kyselinou pyrohroznovou při pyrolýze serinu, což je pravděpodobně způsobeno převedením kyseliny pyrohroznové na kyselinu mléčnou a následnou dehydratací do kyseliny akrylové [61].

Akrylamid může také vznikat z dipeptidu karnozin při zahřívání masa [53], a to buď přes hydrolýzu peptidové vazby a uvolňování β-alaninu s následnou deaminací, nebo uvolněním 3-aminopropionamidu a deaminací. Nicméně, akrylamid není obsažen v masných výrobcích nebo jen minimálně, protože ochotně vytváří methyl deriváty s potenciálními toxickými účinky [53, 61].

2.6 Analytické metody stanovení obsahu akrylamidu v potravinách

Metody stanovení obsahu akrylamidu v tepelně opracovaných potravinách, včetně předúpravy vzorek, extrakce analytu, derivatizace, čištění a chromatografických podmínek, by měly být optimalizovány tak, aby byly splněny požadavky na rychlé stanovení obsahu akrylamidu [62]. Jako nejvhodnější a nejpoužívanější se jeví především GC/MS a LC/MS-MS metody stanovení obsahu akrylamidu [34, 63, 64, 65], které jsou použitelné pro širokou škálu potravin [66].

2.6.1 Příprava vzorků

Před samotnou extrakcí a přečišťováním je nutné tuhé potravinové matrice nejprve pečlivě zhomogenizovat, protože akrylamid vzniká především na povrchu potravinářských výrobků, ale jeho celkový obsah v konečném výrobku je udáván poměr mezi povrchem a objemem výrobku. Kapalné a práškové potravinářské výrobky mohou být vzorkovány přímo [66, 67].

Důležitým krokem při přípravě vzorků je extrakce, která ale zároveň bývá nejčastějším zdrojem chybných výsledků analýzy akrylamidu, proto by kromě výběru extrakčního rozpouštědla měly být brány v potaz i další faktory, jako je velikosti částic vzorku, odmaštění,

teplota nebo čas extrakce [63]. Akrylamid může být velmi účinně extrahován vodou, ale volba extrakčního činidla závisí především na potravinové matrici. Pro extrakci akrylamidu z potravin s vysokým obsahem lipidů je efektivnější použít organické rozpouštědlo [17, 63, 68, 69], nebo binární směsí vody a organického rozpouštědla [43]. Extrakci lze zrychlit použitím techniky ASE, kdy se pevné nebo polotuhé vzorky extrahují konvenčními kapalnými rozpouštědly za zvýšené teploty a tlaku, čímž se zvyšuje účinnost extrakce [63].

Pro kontrolu extrakce a sledování případných ztrát vznikajících v průběhu přípravy vzorku, se ke vzorku matrice přidává vnitřní standard. Ve většině publikovaných studií je jako vnitřní standard nejčastěji využíván $^{13}C_3$-akrylamid, ale kromě něj lze také použít $^{13}C_1$-akrylamid, D_3-akrylamid, *N,N*-dimethylakrylamid, methakrylamid nebo propionamid [63].

Před nebo v kombinaci s extrakcí lze provádět také odmaštění nebo deproteinizaci vzorků a to s ohledem na typ potravinové matrice. Před čištěním je vodná fáze odstředěna, případně se odstředění spojuje s filtrací [34, 63]. Velmi rozšířenou čistící technikou extraktů akrylamidu je SPE, která minimalizuje použití chemikálií a lze ji snadno automatizovat. SPE umožňuje použití kolon v různých kombinacích zvyšující znovuzískání akrylamidu [17, 34, 64]. Navržením vhodného a efektivního čistícího postupu lze dosáhnout velmi dobré přesnosti a validace chromatografické metody [34, 63].

Pro zlepšení srovnatelnosti, přesnosti, zajištění dohledatelnosti výsledků analýz a posouzení reprodukovatelnosti použitých metod stanovení obsahu akrylamidu lze využít certifikovaného referenčního materiálu akrylamidu v potravinové matrici [63, 65]. Systém hodnocení způsobilosti analýzy potravin (FAPAS) se používá pro srovnání kvantitativních výsledků s výsledky měření z jednotlivých laboratoří a přiřazení hodnoty [34, 63].

2.6.2 Stanovení obsahu akrylamidu metodou GC

GC metody většinou vyžadují derivatizaci akrylamidu, jejichž cílem je před chromatografickou analýzou redukovat polaritu akrylamidu, zlepšit retenční čas, získat symetrické píky a do jisté míry také optimalizovat příslušné ukazatele a parametry [34]. Kombinací derivatizace a vhodně volenými postupy přípravy vzorek lze u GC/MS výrazně zlepšit selektivitu, volatilita, citlivosti a odstraní se potenciálně rušivé koextrakty. Nevýhodou derivatizace je, že může být neúplná a časově náročná [63, 65, 66, 70].

Derivatizace se provádí převážně bromací za vzniku relativně více prchavé směsi [34, 65]. Akrylamid je tak nejčastěji pomocí kyseliny bromovodíkové a nasycených roztoků Br_2 přeměněn na 2,3-dibromopropionamid, případně následně převeden na více stabilní

2-bromopropenamid. [17, 63, 66, 70, 71]. Tato metoda derivatizace byla v posledních letech inovována a lze ji provést reakcí mezi bromičnanem draselným a bromidem draselným v kyselém prostředí, což je relativně pohodlné, bezpečné a reakce se provádí asi 30 minut při nízkých teplotách s vynikající reprodukovatelností [63]. Kromě bromace lze použít i jiné derivační metody, jako např. použitím SPME, kdy je akrylamid derivovaný silylací pomocí BSTFA na prchavější BTMSA, který je snadno extrahován použitím 10 μm poly(dimethylsyloxan) SPME vláken [72].

Pro použití GC bez derivatizace s detekcí hmotnostní spektrometrií s chemickou ionizací ve zvoleném režimu sledování iontů analytu jsou využívány zejména polární kolony, vzhledem k vyšší polaritě nederivované molekuly akrylamidu. Ovšem během GC/MS analýzy může koeluce některých nečistot ovlivňovat kvantitativní výsledky akrylamidu. Pro odstranění tohoto problému je vhodné volit kolony s vyšší polaritou nebo kolony s vysokou molekulovou hmotností v kombinaci s vyváženými separačními podmínkami [34, 63, 73].

2.6.3 Stanovení obsahu akrylamidu metodou LC

Současné studie analýzy akrylamidu věnují více pozornosti LC/MS-MS, protože použití LC pro stanovení akrylamidu je dáno jeho hydrofilními vlastnostmi a pro vysoký stupeň verifikace se LC používá ve spojení s MS [34, 74]. Výhodou je, že akrylamid může být analyzován bez předchozí derivatizace, což výrazně zrychluje a zjednodušuje analýzu [65]. LC/MS-MS metody jsou v zásadě založeny na metodě publikované Rosén & Hellenäs [75], ale jsou do značné míry inovovány [63, 65, 76]. Zlepšení hmotnostní spektrometrie bylo dosaženo působením různých rozhraní atmosférického tlaku na LC/MS-MS stanovení akrylamidu [63, 77, 78].

S rozvojem chromatografických technik existuje mnoho bezinterferenčních, obecných a stabilních LC/MS, nebo LC/MS-MS metod, které jsou validovány, a které by se mohly stát referenčními metodami pro kvantifikaci akrylamidu [63].

2.6.4 Detekce akrylamidu

Akrylamid vzhledem ke svým spektrálním vlastnostem je těžko detekovatelný běžnými detekčními systémy [80], proto je naléhavým požadavkem validace finančně dostupné a snadno a široce použitelné metody [63].

Pro analýzu LC lze použít pro detekci a kvantifikaci akrylamidu ultrafialovou detekci (UV) či detekci diodovým polem (DAD), i když tyto metody jsou pro stanovení nízkého

obsahu akrylamidu málo selektivní [63, 80]. Kromě nich může být pro stanovení akrylamidu použita i pulzní elektrochemická detekce [63, 81]. Pro analýzu GC má díky své vysoké citlivosti široké uplatnění detektor elektronového záchytu (ECD). V poslední době byl vyvinut headspace/SPME/GC vybavený dusíko-fosforovým detektorem (NPD) [63].

Vhodným systém pro detekci akrylamidu je MS [63, 81]. Spojení MS s LC a GC výrazně zvyšuje selektivitu a umožňuje provádět identifikaci komponent vzorku i ve složité matrici. MS zde vystupuje jako strukturně selektivní detektor umožňující kromě obvyklé detekce zón látek eluovaných z kolony provést i jejich identifikaci na základě zaznamenaného hmotnostního spektra [82]. Lepšího stanovení analytu a vyšší selektivity může být dosaženo použitím dvoustupňového MS, tedy dvojitým kvadrupólem při sledování více než jednoho charakteristického hmotnostního přechodu, nebo použitím trojitého kvadrupólu MS, který je sice drahý, ale levnější jednostupňové LC/MS nejsou dostatečně citlivé pro přímou analýzu akrylamidu [34, 64]. Obecně se tedy pro analýzu akrylamidu využívá jako hmotnostní analyzátor trojitý kvadrupól a jako iontový zdroj elektrosprejová ionizace nebo iontová past [64, 80]. LC/MS-MS je vysoce selektivní při práci v MRM módu, v němž je sledován přechod prekurzoru iontu na produkt. Pro kvantitativní stanovení akrylamidu je používán přechod 72 > 55, protože ukazuje vysoké relativní množství. Další přechody, jako 72 > 54, 72 > 44 a 72 > 27, bývají použity pro analytické potvrzení akrylamidu [34].

2.6.5 Ostatní analytické metody

V současnosti jsou k dispozici další analytické metody pro stanovení akrylamidu, jako je micelární eletrokinetická kapilární chromatografie (MEKCC). Ovšem lepších výsledků bylo dosaženo pro kapilární zónovou elektroforézu (CZE) po derivatizaci na iontovou sloučeninu 2-mercaptobenzoovou kyselinou. Pro další zvýšení detekčních limitů a rozšíření použitelnost této metody v širokém rozmezí vzorků, bylo navrhnuto spojení kapilární elektroforézy s nástřikem vzorků zesílením pole (FASI). Současně byla navržena kombinace bezvodé CE metody a zkoncentrování vzorku zesílením pole (FASS), která je považována za jednoduchou, rychlou a levnou metodu [63].

Vzhledem k rychlému rozvoji techniky TOF-MS byly metody LC nebo GC používané pro analýzu akrylamidu zkombinovány s TOF-MS s vysokým rozlišením a validovány použitím FAPAS. V porovnání s GC/MS a LC/MS-MS musí být využití TOF-MS pro kvantifikaci akrylamidu ještě optimalizováno [63]. Další oblastí výzkumu je odhad akrylamidu pomocí matematického modelu a algoritmu. Ve srovnání s experimentální metodou stanovení, je tato

modelová metoda rychlá a pohodlná, zejména co se týká předběžného odhadu a zjišťování obsahu akrylamidu. Nicméně, přesnost takových to odhadů je třeba pečlivě ověřit [63].

2.7 Způsoby eliminace akrylamidu

Neustálým úsilím zodpovědných orgánů v oblasti bezpečnosti potravin bylo v reakci na toxikologické studie naznačující, že akrylamid by mohl být skutečně lidským karcinogenem, identifikovány možné nástroje použitelné při zpracování potravin, které umožňují snížení obsahu akrylamidu v produktech jak jen je to možné a tím i expozici spotřebitelů [67, 83]. Při vývoji strategie pro snížení tvorby akrylamidu během tepelného opracování potravin je nezbytná možnost kontrolovat a předvídat akrylamid při zachování žádoucí barvy a chuti výrobku, proto má pochopení kinetiky reakcí vedoucích k akrylamidu značný význam v rozvoji těchto strategií [52].

Ve většině případů neexistuje jednotné řešení a každá ze strategií eliminace akrylamidu přináší i limitující faktory pro její použití v praxi v závislosti na druhu výrobku a výrobním prostředí. Nejvhodnější metoda by tedy měla být volena s ohledem na její kompatibilitu se stávajícím výrobním procesem a recepturou, na senzorické a nutriční vlastnosti konečného výrobku, na dodržování právních předpisů a na náklady [67, 83].

Vzhledem k tomu, že odstraňování akrylamidu z již připravených potravin je nepraktické, jsou možné metody eliminace zaměřeny na omezení vzniku akrylamidu [84]. V dokumentu CIAA akrylamid [67] je uvedeno 14 možných parametrů ovlivňující obsah akrylamidu v potravinách. Tyto parametry jsou rozděleny do 4 skupin podle toho, na které úrovni ji lze během procesu zpracování potraviny použít [67]:

a) agronomický (redukující sacharidy, asparagin)
b) receptura (kypřící látky, další vedlejší přísady, pH, zředění prekurzorů a velikost výrobku, přepracování meziproduktů, fermentace)
c) zpracování (asparagináza, teplota/čas a kontrola obsahu vody, předběžná úprava, konečná barva produktu, struktura/chuť)
d) finální úprava (rady spotřebitelům)

2.7.1 Minimalizace prekurzorů akrylamidu

Hlavními prekurzory vzniku akrylamidu jsou redukující sacharidy a asparagin [67, 85]. V případě brambor byl pozorován komplexní vztah mezi obsahem redukujících sacharidů a

volných aminokyselin a vznikem akrylamidu. Naopak u obilovin je nejvýznamnějším faktorem pro vznik akrylamidu obsah volného asparaginu [86].

Výběrem potraviny s nízkým obsahem prekurzorů lze obsah akrylamidu významně redukovat i při použití standardních průmyslových postupů a teploty 180 °C [87], přičemž změn obsahu redukující sacharidy a asparagin v kulturních rostlinách lze dosáhnout již na agronomické úrovni [67].

2.7.1.1 Snížení obsahu sacharidů

Vznik akrylamidu v potravinách z brambor významně koreluje s obsahem sacharidů, ovšem v závislosti na odrůdě byla potvrzena i korelace s obsahem asparaginu a i celkovým obsahem volných aminokyselin [86]. Hlavním bodem minimalizace obsahu akrylamidu ve smažených bramborových hranolkách a brambůrkách je v současné době kontrola hladiny sacharidů [67], a to:

- výběrem odrůd brambor s nižším obsahem redukujících sacharidů vhodných pro daný typ úpravy [67]
- výběrem odrůd vyhovujících místním podmínkám růstu, vhodnou volbou terénu a dodržování osvědčených agronomických postupů [67]
- sklízením pouze zralých hlíz, které mají nižší obsah redukujících sacharidů než hlízy nezralé [67]
- vhodným zvolením skladovacích podmínek (např. teplota >6 °C pro dlouhodobé skladování) [67]
- dobrou korelací mezi obsahem redukujících sacharidů a zbarvením konečného výrobku [88]

Do budoucna je snaha o vyšlechtění odrůd brambor s nízkým obsahem redukujících sacharidů a optimalizaci zemědělské praxe vedoucí k minimalizaci redukujících sacharidů i asparaginu [67], protože jak naznačuje studie De Wilde *et al.* [89], obsah redukujících sacharidů v hlízách by mohl být ovlivněn dusíkatým hnojivem. I když minimalizace obsahu redukujících sacharidů má pozitivní účinek na obsah akrylamidu v konečném výrobku, měla být vhodně volena s ohledem na metodu zpracování a charakteristiku finálního výrobku jako je barva, chuť, apod., protože vede také ke změně nutričních vlastnosti [67].

2.7.1.2 Snížení obsahu asparaginu

Asparagin je aminokyselina nezbytná pro rostlinný růst, ale je také klíčovým prekurzorem vedoucí ke vzniku akrylamidu v potravinách. Je proto vhodné volit odrůdy plodin s nízkým

obsahem této aminokyseliny [67]. Ovšem obsah volného asparaginu se mezi druhy obilovin velmi liší [90]. Například obsah volného asparaginu v žitné a celozrnné mouce je vyšší než u mouky pšeničné, i když i zde záleží na odrůdě a stupni vymletí mouky, což může vést k vysokému obsahu akrylamidu v pekařských výrobcích [91, 92].

Také studium dopadu agronomické praxe ukázalo, že obsah síry v půdě ovlivňuje obsah volného asparaginu v některých obilovinách a v bramborových hlízách [67, 93]. Nedostatek síry vedl k nárůstu obsahu volných aminokyselin a redukujících sacharidů v bramborových hlízách. To se projevilo snížením tvorby akrylamidu vzhledem k nárůstu počtu konkurenčních reakcí k reakci asparaginu se redukujícími sacharidy [94]. Stejně tak u obilovin dochází poklesem obsahu síry v půdě k nárůstu obsahu asparaginu, čímž ale vzrůstá riziko vzniku akrylamidu [67]. Problémem tudíž zůstává udržení složité rovnováhy mezi množstvím síry potřebným k dosažení kvalitní úrody a množství, které by vedlo ke snížení obsahu akrylamidu. Nevýhodou jsou také změny ve spektru aromatických složek ovlivňující i organoleptické vlastnosti [94, 95].

Pro prevenci vzniku akrylamidu byly také testovány geneticky modifikované brambory, u nichž byly potlačeny geny syntázy asparaginu, čímž obsahovaly 5x méně asparaginu. Tepelně opracované produkty z těchto hlíz si zachovávají srovnatelné senzorické vlastnosti s geneticky neupravenými brambory, ale podle očekávání mají také mnohem nižší obsah akrylamidu [67, 96].

2.7.2 Eliminace obsahu akrylamidu změnou receptury

2.7.2.1 Kypřící látky

Vznik akrylamidu lze ovlivnit použitím hydrogenuhličitanových a uhličitanových solí. Například přidání $NaHCO_3$ k modelovému systému těsta na sušenky vedlo k potlačení vzniku akrylamidu oproti systému bez přídavku $NaHCO_3$. Také použití $KHCO_3$ mělo podobný účinek. Naopak použití NH_4HCO_3 vedlo k významnému zvýšení obsahu akrylamidu v receptech obsahující přidaný sacharid [97]. NH_4HCO_3 zvyšuje tvorbu cukerných fragmentů (glyoxal a methylglyoxal), které velice rychle reagují s asparaginem a poskytují tak vyšší výnosy akrylamidu než přirozeně se vyskytující redukující sacharidy za mírných podmínek [98]. Ovšem snížení jeho obsahu nebo jeho nahrazení alternativními kypřící látky v recepturách může mít negativní dopad na senzorické vlastnosti konečného výrobku, proto je pro dosažení optimální rovnováhy používána kombinace NH_4HCO_3, $NaHCO_3$ a okyselovacího přípravku [67].

2.7.2.2 Použití vedlejších přísad

Formace akrylamidu může být do značné míry omezena některými přísadami [99]. Použitím volných aminokyselin jiných než asparagin lze ovlivnit tvorbu akrylamidu [67, 100, 86]. Akrylamid má dvě reaktivní místa, dvojnou vazbu a amidovou skupinu, a může tak být eliminován reakcí s četnými složkami potravin [101]. Poměr obsahu asparaginu k celkovému obsahu volných aminokyselin je tak důležitým faktorem, protože volný asparagin a další aminokyseliny mohou mezi sebou soutěžit v závěrečné fázi Maillardovy reakce [86]. Claeys *et al.* [101] pozorovali u glutaminu silný podpůrný účinek na tvorbu akrylamidu, který se zvyšoval s rostoucí teplotou. Naopak aplikací lysinu, který je v Maillardově reakci velmi reaktivní, lze dosáhnout snížení obsahu akrylamidu [101]. I v případě prolinu a tryptofanu byl prokázán silný inhibiční účinek na tvorbu akrylamidu v modelových systémech. Obsah akrylamidu také účinně snižuje glycin a cystein [100], kdy u cysteinu je vysoký pokles akrylamidu nespíše způsoben -SH skupinou. Navíc cystein může soutěžit s asparaginem o vazbu s glukózou nebo ovlivňovat samotnou reakci vedoucí ke vzniku akrylamidu [101, 102, 103]. Reaktivita aminokyselin v Maillardově reakci je dána počtu atomů uhlíků a bazicitou a polaritou molekuly, z čehož vyplývá, že zásadité aminokyseliny (př. lysin) jsou více reaktivní, než neutrální nebo kyselé aminokyseliny [101].

Další možností jak ovlivnit úrovně akrylamidu vytvořeného z asparaginu je různorodostí monosacharidů [67]. Glukóza, fruktóza a sacharóza jsou nejčastější sacharidy vedoucí k tvorbě akrylamidu v tepelně opracovaných potravinách. Celková reaktivita sacharidů při vzniku akrylamidu klesá s rostoucí teplotou od glukózy přes fruktózu k sacharóze, protože z chemického hlediska jsou aldohexózy více reaktivní než ketohexózy [104]. Přesto je tvorba akrylamidu v systémech s nižším obsahem vody efektivnější z fruktózy než z glukózy, což je způsobeno pohyblivostí molekul reakčního systému [105, 106, 107]. Zvýšená tvorbu akrylamidu při nízké vlhkosti je totiž dána nižším bodem tání fruktózy oproti glukóze, zatímco chemická reaktivity je důležitější v kapalných reakčních systémech [105].

V případě sacharózy mohou být nižší výnosy akrylamidu v porovnání s glukózou a fruktózou dány skutečnosti, že sacharóza je neredukující sacharid a nemůže s asparaginem reagovat přímo za vzniku akrylamidu, ale musí být převedena na reaktivní karbonylovou směs [104]. Při použití alternativ je nutné ověřit jejich vliv na obsah akrylamidu, a i na původní kvalitu a texturu konečného výrobku [67, 108, 109].

Řada autorů zjistila, že přítomnost NaCl snižuje obsah akrylamidu v modelových systémech i potravinářských výrobcích [97, 103, 110, 111, 112]. Pokles ale není s přídavkem NaCl lineární, závislost je hyperbolická [110, 113]. Claus *et al.* [103] zjistili, že NaCl nemá

jednoznačný vliv na obsah akrylamidu v reálných potravinových matricích. Nižší koncentrace NaCl (max. 3 %) vedly ke snížení obsahu amyláz v těstě po fermentaci, čímž klesl obsahu redukujících sacharidů, a tím i tvorba akrylamidu. Naopak zvýšení koncentrace soli zvyšovalo obsah redukujících sacharidů [103], kdy NaCl nejspíše inhibuje růst kvasinek a sacharidy jsou tak kvasinkami méně metabolizovány, což zvyšuje hladinu sacharidů v těstě [114]. Optimální koncentrace pro minimalizaci akrylamidu se pohybuje v rozmezí 1-2 % NaCl, což reprezentuje jeho běžný obsah v mnoha potravinářských výrobcích [103, 110, 113].

Gökmen & Şenyuva [111] zkoumáním role různých jedno- a dvojmocný kationtů během tvorby akrylamidu v modelových směsích zjistili, že dvojmocné kationty (jako je Ca^{2+}) vedli k úplné inhibici tvorby akrylamidu, přičemž tvorba hnědého zbarvení konečných produktů přes Maillardovy reakce pokračovala. Naopak monovalentní kation Na^{+} předcházel vzniku akrylamidu, ale byl méně efektivní než dvojmocných kation Ca^{2+}. Také účinek ostatních kationtů, zejména Mg^{2+} a K^{+}, vykazoval podobný vliv jako Ca^{2+} a Na^{+} [111]. Fortifikace mouky 0,3 % vápníku, která je ve Velké Británii stanovena z nutričního hlediska zákonem, vede ke snížení obsahu akrylamidu asi o 30 %. Zvýšením fortifikace lze dosáhnout dalšího snížení úrovně akrylamidu. Ideální možností je uvolňování vápenatých iontů z plechů na povrch chlebu při pečení, protože akrylamid se tvoří především v kůrce chlebu [67].

NaCl a Ca^{2+} kromě snižování konečného obsah akrylamidu mohou snižovat i absorpci oleje při smažení, což je optimální pro pokračující trend spotřebitelů přejít na zdravější a nízkotučné výrobky jako prevenci proti obezitě a srdečním chorobám. Nicméně mohou také podněcovat další reakce během smažení, které by mohly negativně ovlivnit bezpečnost výrobku [112]. Použití solí pro kontrolu tvorby akrylamidu v konkrétních výrobcích je ale omezeno vzhledem k jejich negativnímu působení na chuť při použití vyšších koncentrací. S ohledem na nutriční aspekty a senzorické vlastnosti konečného výrobku, které mohou být negativně ovlivněny, je tedy nutné vhodně volit použité soli a dávkování [67, 112, 115].

Tvorba akrylamidu by mohla být snížena i použitím $NaHSO_3$, který je v potravinářství používán jako aditivní látka pro prevenci oxidace a k ničení bakterií. Jeho přítomnost v průběhu Maillardovy reakce ale podporuje hnědnutí, a to patrně zvýšením pH reakčního systému [97, 116, 117, 118].

2.7.2.3 Změna pH

Snížením pH lze minimalizovat vznik akrylamidu, protože pH je důležitým faktorem působícím na poměr a rozsah vzniku reakčních produktů. Zvýšením obsahu H^{+} a tím zvýšení obsahu protonované aminoskupiny asparaginu dochází k blokování tvorby akrylamidu,

protože v prvním kroku vzniku akrylamidu Maillardovou reakcí je nezbytná nukleofilní neprotonová aminoskupina asparaginu [119, 120, 121, 122]. Kontrola pH potravin, které může kolísat je tedy velmi důležitá, zvláště pak u přísad modifikujících pH, které je tudíž vhodnější používat v neutrální formě [122].

Obsah akrylamidu lze snížit použitím kyseliny octové, kyseliny citrónové, kyseliny vinné nebo kyseliny askorbové (vitamín C). Laboratorní experimenty s meziprodukty výroby sladkých sušenek ukázaly, že snížení pH přidáním kyseliny citrónové vedlo k poklesu obsahu akrylamidu o 20-30 %. Účinek kyseliny je ale závislý na struktuře výrobku a ve většině případů vede k nežádoucím vlivům na organoleptické vlastnosti konečného výrobku, jako je kyselá chuť nebo nedostatečné hnědnutí [67, 123]. U některých pekárenských výrobků s nižším pH může v kombinaci s fermentací docházet také k dalším chemickým procesům za vzniku nežádoucích látek (např. 3-MCPD a jeho estery). Tyto negativní faktory vyplývající ze snižování pH výrobku je třeba brát v úvahu při dalším rozvíjení tohoto způsobu minimalizace obsahu akrylamidu v potravinách [67, 124].

2.7.2.4 Zřeďování prekurzorů akrylamidu a velikost výrobku

Intenzita tvorby akrylamidu může být též snížena částečným nahrazením komponent v receptuře potravin méně reaktivními složkami např. použitím obilovin s nižším obsahem asparaginu [67]. Vzhledem k tomu, že asparagin je soustředěn v otrubách, lze pro snížení akrylamidu použít i rafinované obiloviny. Tím ale dojde ke ztrátě vlákniny a další prospěšných látek, proto je třeba brát v úvahu vliv na nutriční hodnotu a organoleptické vlastnosti konečného výrobku, a současně i na označení výrobku, které se může změnit smícháním základních složek s jinými obilovinami [90, 125].

I u kávových náhražek lze redukovat obsah akrylamidu, a to buď snížením obsahu čekanky v receptuře o 3 %, nebo ji částečně nahradit (např. praženým ječmenem), čímž ale může dojít k negativnímu ovlivnění organoleptických vlastnosti konečného produktu [67]. Také některé sušené ovoce (např. švestky, hrušky) a pražené oříšky (např. mandle) mohou přispívat k expozici akrylamidem z potravin [98], protože tvoří asi 20 – 25 % hmotnosti müsli. Silně pražené mandle lze nahradit jemně praženými mandlemi, které obsahují 10x méně akrylamidu, nebo použitím arašídů a lískových oříšků, které v porovnání s mandlemi obsahují 1/5 asparaginu, takže dávají mnohem méně akrylamidu [67].

Další možností snížení obsahu akrylamidu v konečném výrobku je změnou jeho poměru mezi povrchem a objemem výrobku. Většina akrylamidu je v potravinářských produktech tvořena v jejich kůrce (tedy na povrchu) a poměr povrchu a objemu tak udává obsah

akrylamidu v celkovém výrobku. Zmenšením plochy povrchu k objemu výrobku při dosažení stejného koncového zbarvení lze tedy snížit obsah akrylamidu v konečném produktu [67].

2.7.2.5 Přepracování výrobku

Obsah akrylamidu v konečném výrobku může být ovlivněn i přepracovávání meziproduktů během přípravy pečiva. Bylo zjištěno, že více akrylamidu vzniká při pečení cukroví ze starších těst, protože během stárnutí těsta se zvyšuje obsah volného asparaginu, což vede k nárůstu obsahu akrylamidu. Je tedy žádoucí stárnutí těsta minimalizovat a staré těsto znovu nezpracovávat. Tento vliv ale dosud nebyl v průmyslovém měřítku prokazatelně potvrzen, přesto lze pro řadu potravin použít odlišné výrobní postupy i receptury a výrobci by tak měli testovat každý případ [67].

2.7.2.6 Fermentace

Fermentací lze snížit obsah prekurzorů akrylamidu a zároveň pH. Pro potraviny z brambor bylo navrženo použití bakterií rodu *Lactobacillus*, ale v současnosti nelze s ohledem na výrobní procesy tuto možnost v praxi využít. Naproti tomu u výrobků z obilovin může být fermentace využita jako účinný způsob snížení obsahu akrylamidu. Během fermentace jsou totiž kvasinkami spotřebovávány prekurzory akrylamidu, tedy sacharidy a asparagin i kyselina asparagová. Z počátku fermentace sice dochází k mírnému nárůstu fruktózy, ta je ale následně kvasinkami taktéž zpracována. Je tedy vhodné fermentační krok do výrobního procesu zařadit, případně dobu fermentace prodloužit. Pro tyto účely lze využít i aplikaci kvasnic se sníženou produkcí plynu. Nicméně pokles obsahu akrylamidu může být méně účinný u výrobků obsahujících přídavné látky a u tukového pečiva [67].

Přestože využitím fermentace lze snížit obsah akrylamidu v konečném výrobku, je nutné před jejím zařazením do výrobního procesu či prodloužením doby fermentace zohlednit její vliv na kvalitu konečného výrobku [67]. Současně je nutné vhodně zvolit i dobu fermentace, protože příliš dlouhá doba fermentace vede k degradaci sítě lepku a následnému zploštění chleba a pečiva. Avšak, maximální doba fermentace je také velmi závislá na individuálních vlastnostech použité mouky [103].

2.7.3 Zpracování jako prevence vzniku akrylamidu

2.7.3.1 Asparagináza

L-Asparagináza je efektivním prostředkem pro eliminaci tvorby akrylamidu v potravinách odbouráním jeho prekurzoru asparaginu [84]. Amidová skupina postranního řetězce asparaginu je začleněna do amidové vazby akrylamidu, proto je možné eliminovat akrylamid odbouráním této amidové vazby. Způsob jak vykonat toto specificky pro asparagin je použít enzym L-asparagináza, který katalyzuje konverzi L-asparaginu na kyselinu L-asparagovou a amoniak [126, 43].

V modelových systémech bylo aplikací asparaginázy dosaženo snížení obsahu akrylamidu o 85-90 % [43, 91, 127, 128], ale jejím použitím v potravinách byl pokles obsahu akrylamidu v rozmezí 27-70 % [84, 129]. Tyto rozdíly mohou být způsobeny nevyhnutelnou variabilitou šarží v průmyslové výrobě, stejně jako vlivem matrice. Variabilita šarže od šarže může být důsledkem porušení stálosti surovin a parametrů procesu, či nehomogenní distribuce enzymu v těstě, protože je značně obtížné dosáhnout rovnoměrného rozložené velmi malého množství enzymu v těstě. Vliv potravinové matrice na aktivitu enzymu je dán omezením jeho mobility, což vede k neúplné hydrolýze asparaginu a tím pouze k částečnému snížení akrylamidu. Vliv potravinové matrice je určen jejím složením a strukturou. Vysoký obsah vody podporuje účinnost enzymu, protože usnadňuje mobilitu reaktantů a tím kontakt mezi enzymem a substrátem. Naopak s narůstajícím obsahem tuků aktivita enzymu klesá [130].

V současnosti jsou některé výrobky, jako perníky nebo sladké sušenky, vyráběny s využitím asparaginázy, a u řady dalších probíhá hodnocení, přičemž lze očekávat jejich uvedení na trh v blízké budoucnosti. Ovšem samotný enzym není vhodný pro eliminaci akrylamidu v bramborových chipsech a hranolkách, protože není schopen do čerstvých brambor dostatečně proniknout, ale lze jej použít pro výrobky s obsahem brambor [67].

Velikou výhodou použití asparaginázy k redukci obsahu akrylamidu je její minimální vliv na chuť a barvu finálního produktu. Handicapem je ale její kompatibilnost s podmínkami při průmyslovém zpracování. Existuje totiž řada proměnných, které ovlivňují efektivnost enzymu, jako je dávka enzymu, doba působení, obsah vody v reakční prostředí, teplota a pH, při nichž reakce proběhne. Je tedy nutné při aplikaci L-asparaginázy v potravinářství brát tyto proměnné do úvahy [84, 130].

Vzhledem k tomu, že asparagináza je komerčně dostupný enzym, závisí její využití k eliminaci tvorby akrylamidu na ochotě výrobce upravit výrobní proces. Cena ošetření

asparaginázou je pak dána na optimalizaci poměru času/teploty/dávkování, přičemž náklady mohou být sníženy opětovným využitím enzymu [131].

2.7.3.2 Vliv poměru teplota/čas a kontrola obsahu vody

Rozhodujícím bodem ovlivňujícím vlastnosti výrobku je poměr teploty a času, proto je třeba brát do úvahy teplotu a dobu pečení a i použitou technologii. Snížení obsahu akrylamidu je možné dosáhnout tepelným upravováním potravin při nižší teplotě i za cenu prodloužení doby pečení nebo optimalizací teplotního profilu pece. Je však nutné brát v potaz hygienické a senzorické vlastnosti, kterých má být dosaženo. Redukci tvorby akrylamidu pomáhá i okamžité zchlazení po rychlém smažení za vysokých teplot [67, 130].

Pro eliminaci akrylamidu mohou být využity i alternativní technologie tepelného opracování při zachování senzorických vlastností výrobku. Například aplikace vodní páry v závěrečném kroku pečení umožňuje snížit obsah akrylamidu a podobných výsledků lze dosáhnout i infračerveným ohřevem, který je vhodný především pro ploché výrobky (např. koláč, chléb) [67]. Vhodnou metodou je i vakuové smažení, které probíhá za nižší teploty při dosažení stejného obsahu vody v konečném výrobku v porovnání s konvenčním pečením [132], nebo nahrazení klasické jednozónové pece dvouzónovou s chladící částí, což zároveň minimalizuje i spotřebu energie [67].

Obsah akrylamidu může být snížen i použitím dielektrického ohřevu (radiofrekvence, mikrovlnná trouba), který umožňuje rychlé a rovnoměrné zahřívání, protože teplo se vytváří důsledkem třecích interakcí polárních dielektrických molekul rotujících působením střídavého elektrického pole. Vzhledem k tomu, že cílovou molekulou je voda, vzniká teplo v kterékoli části potraviny, kde je voda přítomna, a potraviny zpracované radiofrekvenčním ohřevem jsou tak vystaveny nižší teplotě a času než při konvenčním opracovaní. Tato metoda je vhodným řešením pro udržení nízkého obsahu akrylamidu v pekařských výrobcích při zachování požadované barvy a chuti výrobku. Kombinací radiofrekvenčního a konvenční ohřevu lze totiž dosáhnout výrazného snížení obsahu akrylamidu v pekařských výrobcích v porovnání s výrobky opracovanými pouze konvenčním ohřevem, a to v důsledku selektivních účinků dielektrického ohřevu na molekuly vody, které jsou přítomny uvnitř výrobku. Výhodou použití dielektrického ohřevu samostatně nebo v kombinaci s konvenčním ohřevem pro zmírnění obsahu akrylamidu je, že nevyžaduje změny v receptuře. Navíc, kromě počátečních nákladů na investice, dielektrický ohřev umožňuje šetřit energii. Současně je také možné ho přizpůsobit jak automatizované výrobě šarží, tak i kontinuální výrobě [130].

Tvorba akrylamidu během pečení výrobků je také úzce spjata s kombinací obsahu vody a poměru teploty a doby pečení. Obsah vody má výrazný vliv na aktivační energii hnědnutí a vznik akrylamidu, protože při nízkém obsahu vody je aktivační energie pro tvorbu akrylamidu mnohem větší [67]. Malým zvýšením konečného obsahu vody (z 1 % na 2 %) je možné dosáhnout snížení obsahu akrylamidu v bramborových lupínkách [133], je tedy snaha o co nejvyšší, ještě přijatelný obsah vody v koncovém výrobku [67]. Také tloušťka výrobku je důležitým parametrem, který určuje rychlost sušení a tím i rychlost vzniku akrylamidu v průběhu pečení [134].

Na rozdíl od většiny potravinových kategorií, v kávě se obsah akrylamidu v průběhu pražení snižuje. Na počátku pražení kávových zrn dochází k rychlé tvorbě akrylamidu, ale po dosažení maxima obsah akrylamidu s pokračujícím pažením klesá. Finální výrobek tak obsahuje pouze 20 – 30 % maximální úrovně akrylamidu, a jeho konečný obsah je tedy dán stupněm a dobou pražení [65, 67, 135]. Na konci tepelného opracování patrně dochází k reakcím, které vedou ke spotřebě akrylamidu. Tyto reakce nejsou zcela známy, je možné, že dochází k polymerizaci akrylamidu nebo jeho reakci s dalším složkami potravin [136].

Také pražením při nižší teplotě a prodloužením doby pražení lze u kávy lze snížit obsah akrylamidu, ale oba parametry musí být nastaveny tak, aby bylo dosaženo požadovaného chuťovovonného profilu [67].

2.7.3.3 Předúprava

Redukující sacharidy se vyskytují především ve vyšší vrstvě slupky některých odrůd, zejména pak u dlouhodobě skladovaných brambor, proto při celkovém snížení obsahu redukujících sacharidů může pomoci peeling. Ovšem nejdůležitějším nástrojem pro kontrolu obsahu redukujících sacharidů (jejich odstraněním nebo přidáním) ve smažených bramborových hranolkách, která umožňuje dosáhnout požadované úrovně zbarvení konečného výrobku a tím i ovlivnit obsah akrylamidu, je blanšírování. [67]. Během blanšírování dochází ke změnám v mikrostruktuře brambor (např. bobtnání škrobu, degradace buněčné stěny), což může mít negativní vliv na senzorické vlastnosti konečného výrobku. Na druhou stranu, v případě aplikace enzymu L-asparaginázy usnadňuje jeho interakci s asparaginem [67, 131, 137]. V praxi se používají různé teploty blanšírovací vody a postupy s využitím jednoho, dvou nebo tří předvářečů [131]. Ihned po blanšírování lze přidat kyselý pyrofosforečnan sodný, který brání odbarvování neuvařených hranolků, jehož vedlejším účinkem je redukce obsahu akrylamidu snížením pH. U některých výrobků z brambor lze také použít di-a tri- valentní kationty pro redukci tvorby akrylamidu [67]. Pomocí vápenatých solí

lze ve smažených bramborových lupínkách snížit obsah akrylamidu, který není vyvoláno nižším pH, ale bylo zjištěno, že použití vápenatých solí způsobuje hořkou příchuť a křehkou texturu. Navíc vápník není kompatibilní s pyrofosforečnanem, který je obecně používá k prevenci šedého zbarvení [67, 138].

Také obsah akrylamidu v cereálních výrobcích je možné snížit předúpravou obilovin, kdy jsou zrna zahřívána při nízké teplotě po dlouhou dobu a následně pomlety na mouku. Sušenky připravené z předehřívané mouky měly následně nižší obsah akrylamidu než sušenky z mouky nezahřívané, aniž by došlo ke změně jejich senzorických vlastností. Předehřátím se v mouce nezměnil obsah sacharidů a asparaginu, pouze se snížil obsahu vody. Tím se při zachování stejné teploty zkrátila doba pečení v porovnání se sušenkami z nezahřívané mouky, což současně vedlo k nižšímu obsahu akrylamidu v sušenkách z předehřáté mouky. Výhodou této metody je její jednoduchost v uvedení do praxe, aniž by došlo ke změnám ve formulování a vlastnostech výrobního procesu s výjimkou zkrácení doby pečení [83].

Vzhledem k tomu, že významným zdrojem akrylamidu je i káva, byl zkoumán vliv předběžných úprav i při její výrobě. Bohužel během předsušení zelených kávových zrn pro snížení vlhkosti před pražením nebyl zjištěn žádný dopad na obsah akrylamidu v konečném výrobku. Stejný obsah akrylamidu byl také pozorován při pražení kávy bez kofeinu a klasické kávy za stejných podmínek [67].

2.7.3.4 Konečná barva produktu

K tvorbě chuťovovonných a barevných látek, které dávají tepelně opracovaným výrobkům jejich charakteristické vlastnosti, dochází v průběhu Maillardovy reakce, během níž vzniká také akrylamid. Vývoj barvy je dán především karamelizací cukrů a je významný koncovým bodem a atributem pro přijetí výrobku spotřebitelem [67]. Barva může být zároveň spolehlivým indikátorem obsahu akrylamidu v tepelně opracovaných potravinách [139]. Pokud je tedy výrobek tepelně opracováván bez zvýšení vlhkosti do světlého zbarvení, mělo by dojít k redukci vzniku akrylamidu v konečném výrobku. Všeobecně je tak spotřebitelům doporučováno opracovávat výrobek pouze do zlatavé barvy a výrobcům upravit pokyny pro spotřebitele uvedené na obalu tak, aby po tepelném opracování bylo dosaženo nižších úrovní akrylamidu ve finálním výrobku [67].

Vzhledem k tomu, že barva je důležitým faktorem pro přijetí výrobku na trhu, mohla by světlejší barva vést k odmítnutí výrobku spotřebitelem. Avšak na některé výrobky lze nanášet polevy, které výrobek pro spotřebitele zatraktivní [67]. V případě kávy je barva důležitým ukazatelem stupně pražení a přímo souvisí s organoleptickými a senzorickými vlastnostmi

produktu. Nicméně káva pražená do tmavšího zbarvení může obsahovat méně akrylamidu než světle pražená káva, jak bylo již zmíněno v kapitole 2.7.3.2. Pražení kávových zrn do tmavšího zbarvení ale nelze považovat za možnost snížení obsahu akrylamidu s ohledem na senzorické vlastnosti kávy, protože změna postupu pražení má dopad na procesy vedoucí k tvorbě žádoucích ale i nežádoucích látek [67].

2.7.3.5 Struktura a chuť

Látky utvářející zbarvení a chuť konečného výrobku vznikají v průběhu Maillardovy reakce, která je považována za hlavní mechanismus vzniku akrylamidu v potravinách. Pro dosažení požadované chuti i barvy jsou do některých výrobků záměrně přidávány redukující sacharidy (jako glukóza nebo fruktóza). To ale vede ke zvyšování obsahu akrylamidu. Pokud by redukující sacharidy přidány nebyly, došlo by k poklesu obsahu akrylamidu na úkor chuti. Také výrobky s nízkým obsahem vody pečené při vysoké teplotě pro dosažení křehkosti mají zvýšený obsah akrylamidu. Pro jeho redukci je vhodné snížit teplotu pečení za cenu prodloužení doby pečení. Další možností je zvětšit tloušťku těchto výrobků, což rovněž minimalizuje tvorbu akrylamidu, ale bohužel dojde k významné změně konečných vlastností výrobku [67].

Vysoký obsah akrylamidu byl zjištěn i u kávy a kávových směsí, jejichž senzorické vlastnosti jsou dány pečlivým výběrem zelených kávových zrn, podmínkami pražení a technologií zpracování. Jakékoliv i malé technologické změny by ale vedly ke změnám senzorických vlastností a tím i přijetí kávy a kávových směsí spotřebiteli [65, 67, 135].

2.7.4 Finální úprava

2.7.4.1 Post-procesní úprava

Perspektivní způsob snížení obsahu kontaminantů v potravinách představují post-procesní vakuové technologie. Molekuly kontaminantů mohou být z konečného výrobku odstranit využitím jejich chemických a fyzikálních vlastností při vhodně zvolené teplotě, času a tlakových podmínkách. Ovšem účinnost vakuování závisí na různých proměnných, jako je složení potravin, obsah vody či povaha molekul, které mají být odstraněny. Je nutné brát také do úvahy interakce mezi nežádoucími molekulami a jinými složkami potravin, nebo i přítomnost určitých složek potravin (např. lipidy), které mohou bránit odstranění nežádoucích molekul. Viskozita potraviny může omezovat difuzi molekul matricí, proto nelze odstranit akrylamid ze suchých potravin, jako je káva či sušenky, a to i přesto že byly vakuovány při

nízkých teplotách dlouhou dobu. Naopak velmi snadno lze akrylamid odstranit z hydratovaných produktů, z toho důvodu by bylo možné odstranění akrylamidu podpořit hydratací výrobku před jeho vakuováním [130, 140, 141, 142].

Nevýhodou vakuování je, že vede k odstranění chuťovovonných složek. Odstranění těchto molekul je pravděpodobně ovlivněno jejich molekulovou hmotností a především polaritou. Předpokládá se, že čím vyšší je molekulová hmotnost molekul, které mají být odstraněny, tím nižší je procento jejich snížení v důsledku pomalejší difuze molekuly v potravině. Kromě toho se také usuzuje, že molekuly s vyšší polaritou vytváří silnější interakce s vodou, čímž jsou náchylnější k odstranění z produktu [130].

Vakuová technologie představuje slibnou technologii pro odstranění akrylamidu, furanu a HMF z potravy. Z průmyslového hlediska může být produkt po tepelném opracování přesunut do hydratačního kroku, který lze provádět formou postřiku tlakové vody, a následně vstupuje do vakuové komory, kde jsou odstraněny nežádoucí molekuly. Vzhledem k tomu, že tato technologie může být použita na hotový výrobek, nejsou požadovány žádné změny receptury či parametrů procesu. Avšak pro využití vakuování v průmyslu, jsou zapotřebí další studie s cílem určit podmínky, které by minimalizovaly ztráty senzorických vlastností [130].

2.7.4.2 Rady spotřebitelům

Spotřebitelům se doporučuje pro předejití vzniku významnějšího obsahu akrylamidu:

- tepelně upravovat potraviny jen do zlatavého zbarvení
- znovu již potravinu tepelně neupravovat
- příprava menšího množství potraviny, čímž se sníží doba jejího tepelného opracování
- smažení provádět při maximální teplotě 175 °C a po dobu nezbytně nutnou
- případně postupovat přesně podle návodu pokynů na obalu výrovku [67]

Důležitý je také způsob skladování [67]. Dlouhodobé skladování brambor totiž ovlivňuje tvorbu akrylamidu, což ovšem závisí na odrůdě, protože některé odrůdy jsou mnohem náchylnější k výkyvům obsahu prekurzorů akrylamidu než ostatní. Ve většině odrůd vzrostl ke konci skladování obsah redukujících sacharidů, a to i přes skladování brambor za předepsaných podmínek [86, 143]. To může být způsobeno zbytkovou aktivitou enzymu α-amyláza, která pomalu uvolňuje sacharózu ze škrobu i během skladování při nízkých teplotách, a ta je následně štěpena invertázou na glukózu a fruktózu [144, 86]. Akumulace sacharidů během skladování má také vliv na finální barvu produktu. Higley *et al.* [143] zjistili, že prodloužení doby skladování brambor vedlo k tmavšímu zbarvení z nich připravených hranolků.

Zamora *et al.* [145] uvádí, že během skladování tepelně opracovaných potravin mohou mít na obsah akrylamidu vliv také přítomné aminosloučeniny, kdy akrylamid reaguje s nukleofilní amino skupinou na bočním řetězci aminokyselin. Reakce probíhá velmi rychle a snadno za vzniku odpovídajícího Michaelova aduktu, který je nestabilní a tepelným rozkladem se z něj zpět uvolňuje akrylamid. Akrylamid tak může být v potravinách skryt ve sloučenině N-alkylaminopropionamid [146].

Expozici akrylamidem z kávy lze snížit její vhodnou přípravou, protože při vaření kávy přechází akrylamid téměř úplně do nápoje [67]. Například příprava espressa vykazuje nižší přenosovou rychlost díky specifickým extrakčním podmínkám [135]. Expozice akrylamidu z kávy je závislá především na typu kávy (Arabica obsahuje asi o polovinu méně akrylamidu než Robusta) a jejím stupni pražení, čímž jsou možnosti snížení obsahu akrylamidu bez vlivu na kvalitu uvařené kávy, zejména na její senzorické vlastnosti, pouze omezené. Expozici akrylamidem tak lze snížit výběrem komerční směsi s vyšším obsahem kávy Arabica, tmavším stupněm pražení a upřednostňováním kratšího vaření na místo dlouhého [146].

2.8 Vliv antioxidantů na vznik a eliminaci akrylamidu v potravinách

Mezi řadu parametrů, které mohou ovlivnit výši obsahu akrylamidu v potravinách patří i antioxidanty, jejichž vliv nebyl ještě dostatečně popsán. Z dosud provedených studií vyplývá, že vliv antioxidantů a radikálů má nejednoznačný vliv na vznik akrylamidu [147].

Za jedny z nejvýznamnější antioxidanty jsou považovány především mono- a polyhydroxylové fenolické látky [148]. Antioxidační schopnosti fenolických sloučenin úzce souvisí s počtem a postavením jejich hydroxylových substituentů, ale i jejich aromatickou strukturou [149]. Standardní fenolické látky obsahující hydroxylové skupiny, které se ukázaly být účinné při snižování akrylamidu, by mohly být použity jako potravinářské přídatné látky snižující obsah akrylamidu. Na druhou stranu, fenolické látky obsahující aldehydové skupiny vznik akrylamidu podporovaly [147, 150, 151, 152].

Bassama *et al.* [148] ve své studii uvádí, že účinek fenolických látek na obsah akrylamidu se může měnit s jejich koncentrací, nicméně použitím fenolických sloučenin docházelo také ke zvyšování antioxidační aktivity systému [148]. Serpen & Gökmen [153] došli k závěru, že antioxidační látky a akrylamid vznikají v podobných fázích Maillardovy reakce, a podobnou rychlostí, což naznačuje, že antioxidanty nemají přímý vliv na vznik akrylamidu.

Kotsiou *et al.* [147] měřili antioxidační kapacitu vzorků před a po tepelném zpracování. Výsledky ukázaly, že před tepelným zpracováním se antioxidační kapacita vzorků zvyšovala s koncentrací použitých extraktů a byla tak zcela závislá na množství přidaných antioxidantů. Naopak po tepelném zpracování antioxidační kapacita vzorků závisela na tvorbě antioxidantů během Maillardovy reakce a zbývajících fenolických sloučeninách, tudíž antioxidační kapacita po tepelném opracování vzorků nebyla úměrná koncentraci původně přidaných extraktů [147].

Ou *et al.* [154] studovali vliv antioxidantů na eliminaci akrylamidu a inhibici jeho vzniku. Z experimentálních výsledků vyplynulo, že antioxidanty nesnižovali ani nezvyšovali obsah akrylamidu a ani nebránili jeho vzniku. Naproti tomu jejich produkty oxidace mohli být schopni přímo působit na akrylamid a jeho prekurzor asparagin, a tím zpomalit vznik akrylamidu. Volné radikály tak pravděpodobně potlačují tvorbu akrylamidu v Maillardově reakci a tím snižují jeho obsah v konečném produktu. Naproti tomu antioxidanty produkované Maillardovou reakcí bránili tvorbě volných radikálů a tím eliminaci akrylamidu volnými radikály, což vedlo k pozitivní korelaci mezi celkovou antioxidační kapacitou a vznikem akrylamidu [154].

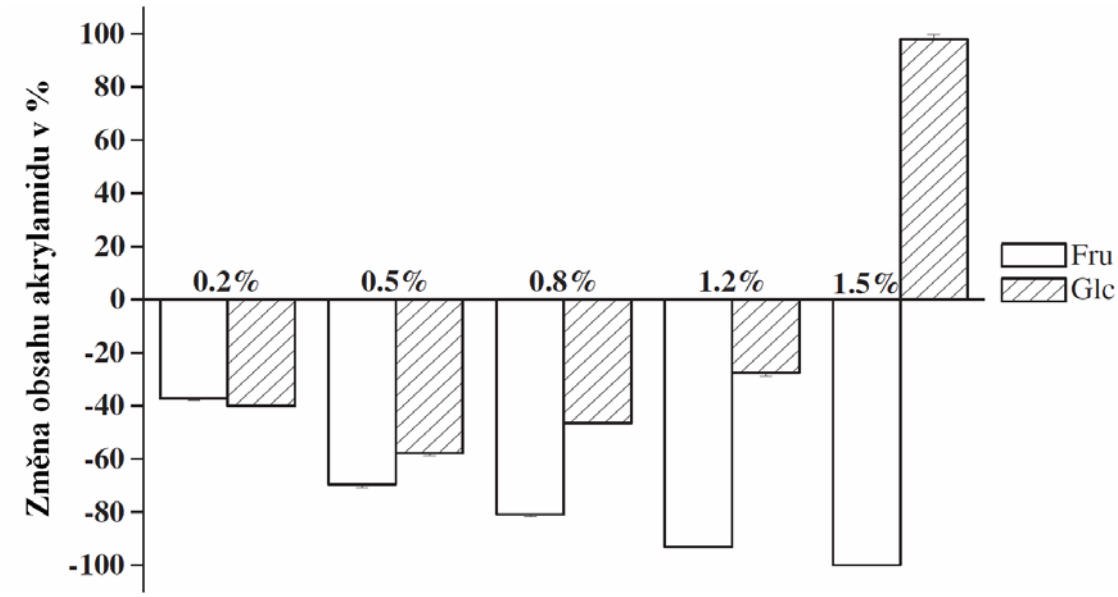
Mnohé studie zkoumaly účinnost nejen samotných přírodních antioxidantů ale i jejich extraktů na inhibici akrylamidu, nicméně mechanismus eliminace akrylamidu vzhledem k použití složitých extraktů tak zůstává nejasný [148]. Ovšem přírodní antioxidanty byly úspěšně použity nejen ke snížení tvorby akrylamidu v modelových systémech, ale i při zpracování potravin [147]. Obsah akrylamidu v modelovém systému výrazně snižovaly extrakty koření (nové koření, pepř černý, majoránka, oregano), přičemž jejich účinnost by mohla úzce souviset s antioxidační kapacitou použitého koření [155, 156]. Také přidávání prášku z vybraných rostlin a jejich vodných extraktů může omezit vznik akrylamidu v sušenkách a modelovém systému s bramborovým škrobem. V sušenkách byl nejúčinnější extrakt z hřebíčku (pokles obsahu akrylamidu o 50 %), zatímco v modelovém systému na bázi bramborového škrobu se jako neúčinnější jevili proanthokyanidiny ze semínek vinných hroznů, které snížili obsah akrylamidu o 62 % [157]. Naopak Açar & Gökmen [134] neprokázali eliminační vliv extraktu z hroznových jader na vznik akrylamidu v modelovém systému představující pekařské výrobky.

Zhang *et al.* [158] zjistili, že antioxidanty bambusových listů účinně snižují obsah akrylamidu v bramborových lupíncích a hranolkách, aniž by došlo k významnému ovlivnění křehkosti a chuti konečného výrobku. Významné snížení obsahu akrylamidu v modelovém systému Asn/Glc dosáhli Zhang & Ying [159] aplikací antioxidantů bambusových listů a

extraktů zeleného čaje, přičemž předpokládají, že tento pokles mohlo být způsoben zabráněním oxidace 3-aminopropionamidu, hlavního prekurzoru akrylamidu.

Becalski *et al.* [60] dosáhli snížení obsahu akrylamidu v bramborových chipsech přidáním rozmarýnu a Hedegaard *et al.* [160] snížil použitím rozmarýnu v těstě obsah akrylamidu v pšeničném pečivu až o 60 %. Fernández *et al.* [161] aplikací kapalné směsi koření bohaté na flavonoidy před smažením bramborových plátků snížili obsah akrylamidu až o 50%. Naproti tomu Vattem & Shetty [162] zjistil, že přítomností fenolových antioxidantů z brusinek a extrakty oregana nebyla tvorba akrylamidu v bramborových chipsech ovlivněna. Naopak obsah akrylamidu se zvyšoval v přítomnosti exogenních fenolů [162].

Také ve vodě rozpustné vitamíny by mohli být efektivními inhibitory akrylamidu, zatímco pro vitamíny rozpustné v tucích byly pozorovány jen slabé inhibiční účinky v chemických modelech a modelových systémech matrice brambor [152]. Levine & Smith [97] zaznamenali snížení akrylamidu použitím kyseliny askorbové a kyseliny ferulová v modelovém systému založeném na pšeničné mouce.



Obr. 3. Změna obsahu akrylamidu v závislosti na použité koncentraci kyseliny askorbové v modelovém systému Asn/Fru a Asn/Glc [123]

Zeng *et al.* [152] dosáhli použitím kyseliny askorbové v koncentraci 1,5% a 0,5% v chemickém modelu a modelovém systému potravinové matrice snížení obsahu akrylamidu o 50% a 42%. Yuan *et al.* [123] zjistili, že se zvyšující se koncentrací kyseliny askorbové klesá obsah akrylamidu v modelovém systému Asn/Fru (Obr. 3). Naopak v systému Asn/Glc byla účinnost kyseliny askorbové odlišná, kdy při nejvyšší koncentraci kyseliny askorbové

(1,5 %) došlo dokonce ke zvýšení obsahu akrylamidu (Obr. 3) [123], což by mohlo být způsobeno produkty tepelného rozkladu kyseliny askorbové, které dále reagují s amino skupinou a podporují tak Maillardovu reakci [163].

Hidalgo *et al.* [164] ve své studii zjistili, že merkaptany mohou snižovat obsah akrylamidu v potravinách tím, že v přítomnosti kyslíku jsou přeměňovány na odpovídající thiolový radikál, který podporuje polymeraci akrylamidu. Nicméně, v přítomnosti antioxidantů byla tvorba thiolových radikálů zastavena a obsah akrylamidu se nezměnil. Výsledky této studie tak naznačují novou možnou roli antioxidantů v eliminaci akrylamidu, a to působení proti inhibici akrylamidu, čímž lze vysvětlit, proč některé antioxidanty mají různý vliv na obsah akrylamidu v závislosti na složení potravy [164].

Použití antioxidantů pro snižování akrylamidu není tedy vzhledem k pozitivním i negativním výsledků zcela jasné [60, 122, 162, 165]. Obsah akrylamidu i aktivita antioxidantu se může zvyšovat současně vlivem kombinace různých podmínek včetně dlouhé doby pečení, vysokého obsahu bílkovin ve vzorkách a nízkém obsahu vody [166]. Zhang & Zhang [167] nebo i Kotsiou *et al.* [147] potvrdili, že existuje vztah mezi koncentrací antioxidantů a obsahem akrylamidu. Ovšem koncentraci antioxidantu je nutné volit tak, aby bylo dosaženo co největšího snížení obsahu akrylamidu v závislosti na druhu vzorku [158].

3 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem dizertační práce je rozšíření znalostní databáze o možnosti eliminace akrylamidu ve vybraných druzích tepelně opracovaných potravin a jejich aplikace v technologickém procesu výroby potravin spolu s charakterizací mechanismu eliminace, jakož i důsledků aplikací na kvalitu produktů, technologii výroby a expozici.

Tohoto hlavního cíle je možné dosáhnout prostřednictvím dílčích cílů:

- Zkoumáním obsahu akrylamidu v relevantních produktech nejvíce přispívajících k celkové expozici jídla
- Studiem mechanismu vzniku a eliminace akrylamidu v modelových systémech simulujících potravinové matrice
- Studiem působení droždí na eliminaci akrylamidu a senzorické vlastnosti ve vybraných potravinových matricích
- Studiem možností aplikace L-asparaginázy na vybrané potravinové matrice za účelem eliminace akrylamidu
- Studiem možností aplikace antioxidantů na eliminaci akrylamidu a senzorické vlastnosti ve vybraných potravinových matricích
- Odhadem dopadu aplikace metod eliminace akrylamidu na celkovou expozici

Dosažením těchto cílů by bylo možné navrhnout změny výrobních procesů, které zajistí produkci potravin se sníženým obsahem akrylamidu, čímž by došlo k redukci zatížení lidského organismu tímto potenciálním karcinogenem a přispělo by se tak k ochraně zdraví spotřebitelů.

4 MATERIÁLY A METODY

4.1 Použité chemikálie

Akrylamid (Serva, New York, USA); d_3–akrylamid (98 %) (Cambridge Isotope Laboratories, USA); L-asparagin monohydrát (>99,5 %) (Sigma – Aldrich, Německo); (S)–(+)–kyselina asparagová (>99 %) (Merck, Německo); roztok Carrez I. (ferrokyanid draselný p.a., 150 g/l) (Sigma – Aldrich, Německo); roztok Carrez II. (síran zinečnatý p.a., 300 g/l) (Merck, Darmstadt, Německo); cukr hnědý Sweet Family (Považský cukr a.s., Slovenská republika); cukr krupicový Sweet Family (Považský cukr a.s., Slovenská republika); cukr ovocný (Vaspres s.r.o., Slovenská republika); deionizovaná voda (device: Purite LTD, Thame Oxon., Velká Británie); demineralizovaná voda (demineralizační přístroj: Rodem 6, Ecotest s.r.o., Slovenská republika); enzym PreventASe® W (2500 ASPU/g ± 5 %), enzym PreventASe® W Extra (2500 ASPU/g ± 5 % (při pH 7,2)), enzym PreventASe® ASG (≥ 2500 NASPU/g) (DSM Food Specialties B.V., Nizozemsko); ethylacetát (99,7 %) (Sigma – Aldrich, Německo); absolutní etanol (Merck, Německo); di(fenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl)iminoazanium (DPPH) (Sigma Chemical, USA); (S)–(+)–glutamin (>99 %) (Merck, Německo); d_3-kyselina glutamová (97 –98 %) (Cambridge Isotope Laboratories, USA); (S)–(+)–kyselina glutamová (>99 %) (Merck, Německo); hydrogenuhličitan amonný p.a., hydrogenuhličitan sodný p.a. (Slavus, Slovenská republika); 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina (Trolox ®) (Sigma Chemical, USA); chlorid sodný, p.a. (Lachema, o.p., Česká republika); ISOSUGAR 111/glukózovo-fruktózový sirup/ (Amylum Slovakia spol. s r.o., Slovenská republika); koření: anýz, badyán, bílý pepř, fenykl, hřebíček, kardamom, koriandr, muškátový oříšek, nové koření, skořice, směs koření pro přípravu perníku (Mäspoma spol. s r.o., Slovenská republika) a vanilka (Johann Kotányi, Česká republika); methanol p.a. (Merck, Německo); ledová kyselina octová 100 %, bezvodá p.a. (Merck, Německo); mléko sušené odtučněné (Foodpack, spol. s r.o., Slovenská republika); mouka hladká 00 extra speciál, světlá (PENAM SLOVAKIA, a.s., Slovenská republika); mouka pšeničná celozrnná hladká Biomila (Ekotrend Myjava a.s., Slovenská republika); shortening Akobake Soft W (AarhusKarlshamn AB (publ.), Švédsko).

4.2 Použité přístroje

Analytické váhy SI-234A (Denver Instrument, Německo) a analytické váhy AP-110 S (Ohaus, Švýcarsko); analyzátor textury TA.XT*plus* (Stable Micro Systems Ltd., UK); a_w metr LabMaster-aw (Novasina AG, Švýcarsko); digitální posuvné měřidlo (Warenimport & Handels GmbH, Rakousko); digitální zrcadlovky Canon EOS 1000D s objektivem EFS 18-55 mm (Canon Inc., Japonsko); domácí pekárnička Moulinex Home Bread Inox (Moulinex, Čína); elektrická pec DC-32E (Sveba Dahlen, Švédsko); HPLC/MS/MS kapalinový chromatograf 1200 série (Agilent Technologies, USA) s hmotnostním detektorem Agilent 6410 Triple Quad s ESI iónovým zdrojem; kolorimetr Color i5D, X-Rite (Grand Rapid, MI, USA); kuchyňský robot KitchenAid model 5KSM150PS (KitchenAid Europa, Inc., Antwerp, Belgie); laboratorní centrifuga s možností chlazení 2 – 16 KC (Sigma, Německo); laboratorní pec KCW 100 (KCW, Česká republika); mlýnek Grindomix GM200 (Retsch GmbH, Německo); pec Miwe Condo (Miwe Michael Wenz GmbH, Německo); pHmetr inoLab pH 720 (WTW GmbH, Německo); plynový chromatograf Agilent 7890A s hmotnostným detektorem MSD 5975 Inert (Agilent Technologies, USA); přesné váhy Adventurer Pro AV 412 DM (Ohaus, Pine Brook, USA); přesné váhy KERN EG 2200-2NM (Kern&Sohn GmbH, Německo); rotační vakuový koncentrátor 2-33IR (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Německo); spektrofotometr UV-160 1PC (Shimadzu, Japonsko); UV/VIS/NIR Spectrophotometer UV-3600 (Shimadzu, Japonsko); sušinové váhy IR120 (Denver Instrument GmbH, Německo); třepačka Innova 2000 Platform Shaker (New Brunswick Scientific, USA); třepačka s kruhovým pohybem Unimax 2010 (Heidolph Instrument GmbH & Co. KG, Německo); ultrazvuková lázeň K-5LE (Kraintek s.r.o., Slovenská republika); vakuová rotační odparka VV 2000 (Heidolph, Německo); vortex mixer VM–300 (Gemmy Industrial Corp., Tchaj-wan).

4.3 Stanovení expozice akrylamidem z potravin

Pro stanovení předběžného průměrného denního příjmu akrylamidu byla použita metoda standardizovaného rozhovoru prostřednictvím dotazníku, který umožňuje sledovat stravovací návyky velkého počtu lidí, a výsledky mohou být propojeny s různými zdravotními parametry. Pro přehlednost a srozumitelnost byl dotazník rozdělen do tří částí: 1) Demografické údaje, 2) Spotřebitelské zvyklosti a 3) Informovanost o akrylamidu v potravinách.

Pro hlavní část dotazníku (Spotřebitelské zvyklosti) byla použita částečně otevřená forma otázek. Při použití této formy jsou odpovědi předem dány a dotazovaný je tak směrován na pro nás důležité odpovědi, ale zároveň má i možnost se ke své odpovědi vyjádřit a co nejvíce ji tak upřesnit. Tato forma otázek umožnila získat konkrétní fakta o frekvenci konzumace vybraných potravin.

Vzhledem na co nejkratší časovou náročnost vyplnění dotazníku, která zajišťuje udržení pozornosti dotazovaných respondentů a tím získání co nejpřesnější výsledky, byl dotazník zaměřen především na běžně konzumované potravinářské výrobky, u nichž se v průběhu tepelné přípravy předpokládá zvýšená tvorba akrylamidu. Seznam dotazovaných potravin je uveden v Tab. 7 v kapitole 5.1, kde jsou pro každý potravinářský výrobek uvedeny hodnoty obsahu akrylamidu. Informace o obsahu akrylamidu v potravinách na něž byl dotazník zaměřen, byly získány z Databáze údajů ŠVPS z let 2005-2008 [168], FAO/WHO [169], FDA [170], zprávy SZPI o výsledcích kontroly cizorodých látek z roku 2005 [171] a dostupných vědeckých studií [172, 173].

Výsledky získané z vyplněných dotazníků určených k vyhodnocení expozice akrylamidu byly zpracovány do elektronické formy pro snazší manipulaci a zpracování. Pomocí hodnot obsahu akrylamidu v dotazované potravině byl u každého respondenta proveden přepočet na příjem akrylamidu v μg za den z této jím konzumované potraviny. Následně byl stanoven předběžný průměrný příjem akrylamidu v μg/den z dotazované potraviny, nebo skupiny potravin. Také byla stanovena předběžná průměrná denní zátěž akrylamidem v μg na 1 kg tělesné hmotnosti za den (μg/kg bw/den) pro každého respondenta nebo skupinu respondentů.

Evropská komise vydala dne 2. června 2010 Doporučení o monitorování množství akrylamidu v potravinách 2010/307/EU [174], v němž jsou potravinářské výrobky rozčleněny do 10 základních skupin:

1) **Hranolky podávané k přímé spotřebě -** podkategorie: Hranolky z čerstvých brambor, Hranolky z bramborového těsta
2) **Bramborové lupínky -** podkategorie: Bramborové lupínky z čerstvých brambor, Bramborové lupínky z bramborového těsta
3) **Předsmažené hranolky/výrobky z brambor pro domácí přípravu -** podkategorie: Hranolky pečené v troubě, Hranolky smažené v tuku
4) **Měkký chléb**
5) **Snídaňové cereálie**
6) **Sušenky, krekry, křupavý chléb a podobné výrobky** (kromě cukrářských výrobků a koláčů) – podkategorie: Krekry, Křupavý chléb, Perník, Jiné

7) **Káva a náhražky kávy** - podkategorie: Pražená káva, Instantní (rozpustná) káva, Náhražky kávy
8) **Příkrmy pro kojence jiné než obilné příkrmy**
9) **Obilné příkrmy pro kojence a malé děti** - podkategorie: Sušenky a suchary pro kojence a malé děti, Jiné obilné příkrmy pro kojence a malé děti
10) **Jiné výrobky**

Na základě tohoto Doporučení komise 2010/307/EU [174] byly dle uvedených pokynů dotazované potravinářské výrobky roztříděny do v něm uvedených skupin pro jednodušší porovnávání získaných výsledků předběžného průzkumu expozice akrylamidem. Po zařazení výrobků do jednotlivých kategorií bylo získáno pouze 7 hlavních skupin:

1. **Hranolky/Výrobky z brambor:** Smažené bramborové hranolky, pečené brambory
2. **Bramborové lupínky:** Smažené bramborové chipsy
3. **Měkký chléb:** Chléb a běžné pečivo (př. rohlíky, bagety)
4. **Snídaňové cereálie:** Snídaňové cereálie
5. **Sušenky, krekry, křupavý chléb a podobné výrobky:** Extrudovaný chléb, topinky, pečené toasty, solené opékané suchary (chlebové), slané snacky (tyčinky atd.), perníky plněné, perníky s polevou, medovníky zdobené, oplatky plněné, piškoty, sladké sušenky neplněné
6. **Káva a náhražky kávy:** Pražená a instantní káva a náhražky kávy
7. **Jiné výrobky:** Sladké pečivo, smažené bramborové placky, kukuřičné křupky, müsli tyčinky, kakao, horká čokoláda, čokoláda, čokoládový/čokoládovo-oříškový krém.

Ze skupin uvedených v Doporučení komise 2010/307/EU [174] byla vyloučena skupina Příkrmy pro kojence jiné než obilné příkrmy a skupina Obilné příkrmy pro kojence a malé děti, neboť těmto dvěma skupinám neodpovídala žádná z dotazovaných potravin. Zároveň byly sloučeny skupiny: Hranolky prodávané k přímé spotřebě a Předsmažené hranolky/výrobky z brambor pro domácí přípravu do jediné, protože na základě informací získaných z vyplněných dotazníků nebylo možné tyto dvě skupiny odlišit.

4.4 Příprava chlebů v domácí pekárně

Pro stanovení obsahu akrylamidu a navržení vhodného způsobu eliminace akrylamidu v chlebech připravovaných z komerčně dostupných chlebových směsí určených pro domácí pekárně byly společností Mäspoma s.r.o. poskytnuty chlebové směsi Mäspomix pro přípravu bramborového, grahamového a slunečnicového chleba v domácí pekárně, jejichž složení je uvedeno v Tab. 3.

Tab. 3: Složení chlebových směsí Mäspomix

Chlebová směs	Složení
Bramborový chléb	pšeničná a žitná mouka, bramborová mouka (2 %), jedlá sůl, cukr, sušené droždí, kmín, suchý kvas (syrovátka, kukuřičná mouka, sojová mouka, regulátor kyselosti: kyselina citrónová, octan sodný), ječmenná sladová mouka, stabilizátor: guarová mouka, kyselina askorbová
Slunečnicový chléb	pšeničná a žitná mouka, slunečnice loupaná (6 %), jedlá sůl, cukr, sušené droždí, jablečná vláknina, suchý kvas (bramborový škrob, regulátor kyselosti: kyselina mléčná, protihrudkující látka: síran vápenatý), ječmenná sladová mouka, stabilizátor: guarová mouka, kyselina askorbová
Grahamový chléb	pšeničná a žitná mouka, grahamová mouka (20 %), jedlá sůl, cukr, sušené droždí, suchý kvas (syrovátka, kukuřičná mouka, sojová mouka, regulátor kyselosti: kyselina citrónová, octan sodný), ječmenná sladová mouka, stabilizátor: guarová mouka, kyselina askorbová
Základní směs	pšeničná mouka (65 %), žitná mouka (35 %), jedlá sůl (2 %), sušené droždí (0,8 %)

Vzorky chlebů byly z chlebových směsí připravovány podle pokynů uvedených na obalu, kde byl výrobcem uváděn objem vody potřebný pro přípravu chleba v domácí pekárně z 500 g chlebové směsi. Chléb byl připravován v domácí pekárně Moulinex Home Bread Inox (Moulinex, Čína), kde byly po vymíchání těsta a následně po jeho vykynutí odebírány vzorky těsta pro stanovení obsahu aminokyselin a zároveň bylo měřeno i pH a aw těst. Pro přípravu chleba v domácí pekárně Moulinex Home Bread Inox byl použit program č. 2 se stupněm vypečení 3, přičemž celková doba přípravy chleba zahrnující hnětení, kynutí a pečení trvala pro 750 g chléb 3,5 hodiny, z toho samotné pečení chlebu v domácí pekárně probíhalo po dobu 50 min při teplotě 150 – 170 °C.

Alternativou uváděnou výrobcem na obalu byla i možnost péct chleba z chlebové směsi v troubě. Chleby byly z chlebových směsí Mäspomix připravovány výrobcem v podmínkách klasické pekařské výroby, kdy byly chleby pečeny v peci MIWE CONDO 2.0608. Teplota horního ohřevu byla v prvních 10 minutách 260 °C a následně byla snížena na 225 °C. Teplota spodního ohřevu byla 210 °C po celou dobu pečení (40 minut). Zapařování bylo prováděno při otevřeném odtahu po dobu 5 minut.

Pro porovnání obsahu akrylamidu v chlebech byly zakoupeny hotové chleby zakoupených v obchodní síti, jejichž složení je uvedeno v Tab. 4.

Tab. 4: Složení chlebů zakoupených v obchodní síti

Druh	**Složení**
Bramborový chléb	pšeničná mouka (61 %), voda (26 %), žitná mouka, jedlá sůl, pekařské droždí, zlepšující přípravek (4,1 % bramborové vločky, ovesné vločky, lněná semínka, sezam, pšeničná sladová mouka, emulgátor E 472e, kyselina E 330, enzymy), pekařský kvas
Slunečnicový chléb	pšeničná mouka žitná mouka, voda, přírodní kvásek (žitná mouka, voda), slunečnicová semínka (7,5 %), droždí, jedlá sůl, extrakt z chlebového kvásku (žitné otruby, voda, žitná mouka, regulátory kyselosti: E 330, slad, kyselina mléčná, kyselina octová
Grahamový chléb	pšeničná mouka celozrnná (45 %), pšeničná mouka (29 %), voda pitná, rostlinný olej, pekařské droždí, jedlá sůl, pšeničný škrob, zlepšující přípravek (pšeničná mouka, pšeničná sladová mouka, emulgátor E 472e, mouku upravující látka kyselina askorbová, enzymy).
Pšenično-žitný chléb nebalený	pšeničná mouka, voda, žitná mouka, kvas, aroma, startér
Pšenično-žitný chléb venkovský balený	žitná mouka, voda, pšeničná mouka, jedlá sůl, droždí
Farmářský chléb	pšeničná mouka, voda, celozrnná pšeničná a žitná mouka, sůl s jódem, droždí, pražená sladová mouka, len, sója, slunečnicová semínka, sójová krupice, žitný zákvas, sezamová semínka, sladová mouka

Po vychladnutí (1,5 h po upečení) byly chleby připravené z chlebových směsí a současně i chleby zakoupené v obchodní zváženy s přesností na 0,1 g na přesných vahách Adventurer

Pro AV 412 DM (Ohaus, Pine Brook, USA). Následně byl podle metody uvedené v normě ČSN 56 0116 Metody zkoušení pekařských výrobků [178] stanovován měrný objem, což je objem vzorku přepočítaný na 100 g. Nádoba použitá pro stanovení měrného objemu byla nejprve naplněna semeny prosa a povrch byl zarovnán s okrajem nádoby. Přebytečná semena byla odstraněna a obsah nádoby byl použit pro stanovení objemu. Pro vlastní stanovení byla nádoba naplněna přibližně do 1/3 semeny, poté byl vložen chléb tak, aby mohl být celý semeny zasypán. Po vsypání zbytku semen do nádoby byl povrch zarovnán s okraji nádoby. Přebytečná semena byla zachycena ve sběrné nádobě a převedeny do odměrného válce. Krouživým pohybem se povrch urovnal do plochy a odečetl se objem na válci. Přesnost metody je 5 % ze zjištěné hodnoty [175]. Výška chleba byla měřena pomocí pravítka v prostřed chlebu po jeho překrojení na polovinu.

Pro stanovení obsahu akrylamidu v kůrce a střídce byla z chleba kůrka okrájena, přičemž tloušťka oddělované kůrky byla 2,5 ± 0,5 mm. Vzorky chleba byly sušeny v laboratorní peci KCW 100 (KCW, Česká republika) při teplotě 40 °C a zhomogenizovány pomocí mlýnku Grindomix GM200 (Retsch GmbH, Německo). U takto připravených vzorků chlebů byla následně stanovována vlhkost, barva a obsah akrylamidu.

Vlivu různého obsahu droždí v chlebové směsi na tvorbu akrylamidu v chlebu a jeho kvalitativní parametry byl sledován s použitím chlebových směsí s upraveným obsahem droždí, které byly připraveny přímo výrobcem (společnost Mäspoma s.r.o.). Obsah droždí v chlebové směsi byl snižován (na 0, 25, 50 a 75 %) nebo navyšován (na 125 a 150 %) oproti obsahu droždí v původní receptuře (100 %).

Během skladovacího pokusu byl sledován vliv doby skladování na aktivitu droždí v chlebové směsi a tím na obsah akrylamidu a kvalitativní parametry chlebů. Chlebové směsi byly skladovány v podmínkách simulujících domácí spižírny, při teplotě 17 ± 1 °C a ve tmě po dobu až 9 měsíců. Chleby z těchto směsí byly připravovány v intervalu 3 měsíců, přičemž první měření bylo provedeno po 3 měsících od výroby, což mělo simulovat dobu, za kterou se směs dostane od data výroby až ke zpracování spotřebitelem.

4.5 Příprava perníků s pohankovou moukou

Studium vlivu koření na tvorbu akrylamidu bylo prováděno na vzorkách perníků připravených v laboratorních podmínkách. Receptura pro přípravu perníčků se skládala ze světlé pohankové mouky nebo mouky z pražených pohankových zrn, žitné mouky,

pohankového medu, kypřícího prášku, cukru, másla a koření. Konkrétní receptura a přesné množství surovin pro jednotlivé typy perníků je uvedena v Tab. 5. Suroviny pro přípravu perníku byly nakoupeny v polském obchodě. Pohanková mouka byla vyrobená z neloupané pohanky obecné (*Fagopyrum esculentum Moench*) na ekologické farmě, přičemž mouky z pražených pohankových zrn byla získána pomletím pohankových krup po jejich opražení. Jako koření, které je součástí receptury perníčků, byl použit fenykl, anýz, hřebíček, nové koření, koriandr, skořice, bílý pepř, badyán, muškátový oříšek, kardamom, směs koření pro přípravu perníku (Mäspoma spol. s r.o., Slovenská republika) nebo vanilka (Johann Kotányi, Česká republika).

Všech surovin pro přípravu perníku byly smíchány v jednom kroku pomocí kuchyňského robota až do získání hladkého těsta. Z těsta byly následně vykrajovány 0,5 cm silná kolečka o průměru 5,5 cm, které byly pečené při 180 °C po dobu 18 min v elektrické troubě DC-32E (Sveba-Dahlen, Švédsko). Konstantní teplota uvnitř trouby byla řízena digitálním ovládacím panelem. Jako kontrola byly použity vzorky bez přídavku koření.

Perníky byly homogenizovány mlýnkem Grindomix GM200 (Retsch GmbH, Německo) při rychlosti 5000 rpm po dobu 15 s. U zhomogenizovaných vzorků byla následně stanovována aktivita vody, pH, obsah sušiny a akrylamidu.

Tab. 5: Receptura pro přípravu perníku

Ingredience	**Množství (g)**		
	Perníčky z žitné mouky	**Perníčky z pohankové mouky**	**Perníčky s kořením**
Světlá žitná mouka T-720	100	70	70
Světlá pohanková mouka/mouka z pražených pohankových zrn	-	30	30
Pohankový med	50	50	50
Cukr	20	20	20
Kypřící prášek	3	3	3
Máslo	25	25	25
Koření	-	-	2

4.6 Modelové sušenek připravené v laboratorních podmínkách

Eliminace akrylamidu aplikací enzymu asparagináza byla sledována ve vzorkách sušenek připravovaných podle standardizované receptury uvedené v normě AACC method 10-54 [176], která uvádí také postup přípravy a pečení sušenek. Složení bylo modifikováno z hlediska obsahu fruktózy pro simulaci sušenek určených pro diabetiky (viz kapitola 5.4.2.1).

Těsto pro výrobu sušenek bylo připravováno smícháním surovin ve 3 krocích pomocí kuchyňského robota KitchenAid (KitchenAid Europa, Inc., Belgie). V prvním kroku byl smíchán tuk se sypkými surovinami (cukr, sušené mléko, sůl a $NaHCO_3$) při rychlosti míchání 4 po dobu 3 minuty. V druhém kroku byla přidána k této směsi vodná fáze tvořená vodou, fruktózovým sirupem a NH_4HCO_3 a míchání probíhalo při rychlosti 4 po dobu 1 minuty. V posledním kroku byla vmíchána mouka při rychlosti 2 po dobu 30 s. Z takto připraveného těsta bylo vykrojeno 8 koleček o průměru 60 mm a výšce 8 mm. U zbytku těsta byla měřena aktivita vody a pH a stanovována tvrdost a lepivost těsta analyzátorem textury.

Sušenky byly pečeny v peci Miwe Condo (Miwe Michael Wenz GmbH, Německo) s nastavitelným ohřevem horní a spodní desky. Teplota horního ohřevu byla nastavena na 205 °C a spodní ohřev byl vypnutý, přičemž teplota v horní části byla 205 ± 4 °C a teplota ve spodní části pece byla 195 ± 4 °C. Pečení trvalo 11 minut a probíhalo při zavřené ventilační klapce. Každá sada sušenek byla vždy připravena ve 3 paralelních pečeních.

Po upečení sušenky půlhodinu chladly a následně byl změřen jejich průměr a výška pomocí digitálního posuvného měřidla. Dále byla sledována jejich hmotnost a barva. Po 1,5 hodině po upečení byla měřena tvrdost sušenek analyzátorem textury a sušenky byly homogenizovány mlýnkem Grindomix GM200 (Retsch GmbH, Německo) při rychlosti 5000 rpm po dobu 15 s. U zhomogenizovaných vzorků byla následně stanovována aktivita vody, pH, obsah sušiny a akrylamidu.

Pro eliminaci akrylamidu v sušenkách připravených za laboratorních podmínek byly použity 3 druhy komerčně dostupného enzymu asparagináza určené pro potravinářské účely (DSM Food Specialties B.V., Nizozemsko):

1. PreventASe® W (2500 ASPU/g ± 5 %) ve formě mikrogranulí navázaných na pšeničnou mouku
2. PreventASe® W Extra (2500 ASPU/g ± 5 % (při pH 7,2)) ve formě mikrogranulí navázaných na pšeničnou mouku
3. PreventASe® ASG (≥ 2500 NASPU/g), jehož nosičem je 50% glycerol.

Enzym byl aplikován do těsta na sušenky dvěma způsoby. Jedním způsobem bylo rozptýlení enzymu v polovičním množství vody uvedeným v receptuře, kdy první polovina vody byla společně s fruktózovým sirupem a NH_4HCO_3 smíchána se směsí tuku a sypkých surovin. Následně byla v míchána suspenze enzymu v druhé polovině vody. Poté byla v posledním kroku vmíchána mouka. Druhým způsobem byla aplikace enzymu společně s moukou, kdy homogenizace byla zajištěna pomocí mlýnku Grindomix GM200 (Retsch GmbH, Německo) při rychlosti 5000 rpm po dobu 15 s a byla provedena 3x.

Doba působení enzymu byla v obou částech experimentu pevně dána časovými údaji od vybrání těsta z mísy až po vložení do pece a trvala vždy 30 minut při teplotě 24,5 ± 0,5 °C. Pro stanovení aminokyselin v těstě po uplynutí doby působení enzymu byl enzym inaktivován vložením těsta do vroucí vodní lázně na 1 minutu.

4.7 Průmyslově vyráběné sušenky s enzymem

Pro stanovování účinnosti eliminaci akrylamidu v průmyslově připravených sušenkách použitím enzymu L-asparagináza byli ve spolupráci s Pečivárnami Liptovský Hrádok vybrány tři diabetické sušenky:

- **Produkt A:** Kakaovo-kokosové sušenky s fruktózou
- **Produkt B:** Kakaové sušenky s fruktózou polomáčené
- **Produkt C:** Celozrnné sušenky s fruktózou

Receptura výrobků je vlastnictvím firmy a byli poskytnuty pouze údaje přímo souvisící s tvorbou akrylamidu (podíl mouky a cukru) a i ty jsou předmětem utajení. Pečení probíhalo v elektrické peci s posuvným pečícím pásem při zapnutém horním pečení. Podrobnější údaje jsou uvedeny v kapitole 5.4.1.

Pro eliminaci akrylamidu v sušenkách připravených v pekárně byly použity komerčně dostupné enzymy asparagináza určené pro potravinářské účely (DSM Food Specialties B.V., Nizozemsko). Doba působení enzymu byla v závislosti od typu produktu v rozmezí 5 – 40 minut, protože výroba sušenek probíhala kontinuálně a těsto tak bylo z míchacího zařízení postupně posouváno po dopravních pásech do tvarovacího zařízení a následně do pece.

Vzorky těst pro další měření (aw a pH) byly odebírány těsně před vstupem do lisovacího zařízení a to jak na začátku výrobní šarže, tedy po 5 – 10 minutách od vyklopení těsta z míchacího zařízení, tak i na konci výrobní šarže (po 30 – 40 minutách od vyklopení těsta

z míchacího zařízení). Vzorky těst pro stanovení aminokyselin byly ihned po odebrání ponořeny do vroucí vodní lázně na 1 minutu, což zajistilo inaktivování přítomného enzymu.

Vzorky sušenek pro analýzy (např. stanovení akrylamidu, barvy, sušiny,…) a senzorické hodnocení byly odebrány po upečení a zchladnutí. Odebrány byly jak vzorky sušenek na počátku výrobní šarže, tak i vzorky z konce výrobní šarže.

4.8 Měření barvy a fotografování

Barva kůrky chleba po jejím zhomogenizování byla měřena jako reflektance na spektrometru UV/VIS/NIR Spectrophotometer UV-3600 (Shimadzu, Japonsko) při rozsahu vlnových délek 300–800 nm s intervalem 5,0. Každý vzorek byl změřen 2x, přičemž pro každou kůrku bylo toto měření následně 3x zopakováno. Z výsledků byla vypočítána průměrná hodnota. Výsledné hodnoty barvy byly vyjádřeny podle CIELab, což je $L^* a^* b^*$ barevný prostor, kde L^* představuje světlost (přechod od bílé po černou) a a^* a b^* jsou souřadnice barvy, přičemž a^* je přechod od červené po zelenou a b^* od žluté po modrou. U ostatních vzorek již byl pro měření barvy používán kolorimetr Color i5D, X-Rite (Grand Rapid, MI, USA). Barva vzorků byla také vyjadřována v $L^* a^* b^*$ barevný prostor. Jako zdrojem záření bylo umělé denní světlo D65/10°.

Pokud to vzorka umožnila, nebyla před měřením nijak upravována a byl změřen přímo její povrch 4x a z výsledků všech paralelních vzorků byla vypočítána průměrná hodnota. Jinak byla vzorka před měřením zhomogenizována mlýnkem Grindomix GM200 (Retsch GmbH, Německo) při rychlosti 5000 rpm po dobu 15 s a následně byla změřena 7x a z výsledků byla vypočítána průměrná hodnota.

Vzorky chlebů byly fotografovány klasickým kompaktním digitálním fotoaparátem. Ostatní vzorky již byly fotografovány poloprofesionální digitální zrcadlovkou Canon EOS 1000D s objektivem EFS 18-55 mm za použití fotostanu se 4 lampami, což zajistilo při focení stále stejné světelné podmínky. Na fotoaparátu bylo nastaveno uživatelské vyvážení bílé, citlivost ISO 200 a expoziční doba 1/6 s.

4.9 Stanovení aktivity vody, pH a obsahu sušiny

Aktivita vody byla stanovována přístrojem LabMaster-aw (Novasina AG, Švýcarsko) po vložení nádobky naplněné ze 2/3 homogenizovaným vzorkem do měřícího prostoru. Aktivita vody byla pro každý vzorek změřena 3x a z výsledků byla vypočítána průměrná hodnota.

pH bylo měřeno pomocí pH metru inoLab pH 720 (WTW GmbH, Německo). pH těst bylo stanovováno přímo vložením měřící elektrody do těsta. Ostatní vzorky byly připravovány podle normy AOAC International [177], kdy k 5 g zhomogenizované vzorky bylo přidáno 50 ml demineralizované vody, a směs byla protřepávána 30 minut na třepačce s kruhovým pohybem. Poté ztemperování vzorky při laboratorní teplotě (teplota místnosti 22 ± 1 °C) bylo měřeno pH výluhu pro každý vzorek 7x a z výsledků byla vypočítána průměrná hodnota.

Obsah sušiny vzorků byl stanovován pomocí sušinových váh IR120 (Denver Instrument GmbH, Německo) při teplotě 130 °C. Analýza byla ukončena po dosažení inflexního bodu na křivce analýzy. Obsah sušiny byl pro každý vzorek změřen 3x a z výsledků byla vypočítána průměrná hodnota. U chlebů bylo stanovení sušiny prováděno podle normy ČSN 56 0116 – část 3: Metody zkoušení pekařských výrobků – Stanovení vlhkosti [178]. Ze vzorky chleba rozdělené na malé kousky bylo odváženo 100 g s přesností 0,1 g a předsušeno při teplotě nejvýše 45 °C. Po vychladnutí byl vzorek s přesností 0,01 g opět zvážen a rozemlet na jemnou krupici. Následně byl vzorek sušen v sušárně předem vyhřáté na 130 °C. Sušení probíhalo přesně 60 minut, počítáno od okamžiku, kdy teplota po vložení vzorku do sušárny dosáhla opět 130 ± 2 °C. Po vychladnutí byl vzorek zvážen s přesností 0,001 g. Obsah celkové sušiny původní vzorky byl následně vypočítán podle pokynů uvedených v normě.

4.10 Analýza texturních vlastností

Analýza texturních vlastností těst a hotových sušenek byla prováděna pomocí analyzátoru textury TA.XT*plus* (Stable Micro Systems Ltd., Velká Británie), kdy byla sledována změna tvrdosti a lepivosti těst a tvrdost sušenek.

Pro stanovení tvrdosti těsta byl použit set pro přípravu těsta (A/DP) a válcová sonda z nerezové oceli s průměrem 6 mm (P/6). Těsto bylo vloženo do nerezové nádoby a byly z něj odvzdušňujícím pístem odstraněny bubliny vzduchu, které by mohli vést k variabilitě v měření, a který zároveň minimalizuje ruční manipulaci s těstem, která by mohla vést ke změknutí těsta. Plochým pístem byla následně vytvořena rovná testovací plocha. Tvrdost těsta byla měřena penetrací těsta válcovou sondou o průměru 6 mm. Parametry zkoušky tvrdosti

těsta jsou uvedeny v Tab. 6. Penetrace těsta byla vždy provedena 5x a následně byla vypočítána průměrná hodnota.

Lepivost těsta byla stanovována použitím akrylátové válcové sondy s průměrem 25 mm (P/25P) a SMS/Chen-Hoseneyova soupravou pro lepivost těsta (A/DSC). Malé množství těsta bylo umístěno do Chen-Hoseneyovy soupravy a otvory byl protlačen 1 mm vysoký vzorek těsta. Po 30 s, kdy vzorek odpočíval, aby se uvolnilo napětí vzniklé při vytlačování, byla stanovena lepivost těsta válcovou sondou o průměru 25 mm. Parametry této zkoušky jsou uvedeny v Tab. 6. Stanovení lepivosti bylo zopakováno pro každé těsto 5x a z výsledků byla vypočítána průměrná hodnota.

Stanovení tvrdosti sušenek bylo prováděno pomocí soupravy pro tříbodový ohyb (HDP/3PB). Dvě nastavitelné podpěry na desce základny byly od sebe vzdáleny 25,5 mm a horní čepel byla zavěšena do polohy nacházející se ve stejné vzdálenosti od obou podpěr. Sušenka byla umístěna centrálně přes podpěry a tvrdost sušenky byla stanovována působením horní čepele. Parametry zkoušky tvrdosti sušenek jsou uvedeny v Tab. 6. Tvrdost sušenek byla měřena 7x vždy s požitím nové sušenky a z výsledků byla vypočítána průměrná hodnota.

Tab. 6: Přehled parametrů zkoušek tvrdosti a lepivosti těsta a tvrdosti sušenek

	Zkouška		
Parametry	**Tvrdost těsta**	**Lepivost těsta**	**Tvrdost sušenek**
Režim	Měření síly v tlaku	-	Měření síly v tlaku
Typ	Návrat do výchozí polohy	Zkouška adheze	Návrat do výchozí polohy
Rychlost před zkouškou	2,0 mm/s	0,5 mm/s	2,5 mm/s
Rychlost měření	3,0 mm/s	0,5 mm/s	2,0 mm/s
Rychlost po zkoušce	10,0 mm/s	10,0 mm/s	10,0 mm/s
Vzdálenost	20 mm	4 mm	15 mm
Síla	-	0,39 N	-
Čas	-	0,1 s	-
Spouštěcí síla	Auto – 0,05 N	Auto – 0,05 N	Auto – 0,20 N
Rychlost sběru dat	200 pps	500 pps	200 pps

4.11 Příprava extraktů koření a stanovení radikál zhášející aktivity DPPH testem

Sušené a rozdrcené koření bylo extrahováno směsí ethanol/voda (φ_r = 1:1) působením ultrazvuku (ultrazvuková lázeň K-5LE, Slovenská republika). Před stanovení antioxidační kapacity pomocí testu DPPH byly extrakty uchovávány při teplotě -20 °C.

Stanovení antioxidační kapacity DPPH testem bylo prováděno podle modifikované metody Brand-Williams *et al.* [179]. V tomto testu antioxidanty přítomné ve vzorku zhášejí DPPH • radikály, které mají absorpční maximum při 515 nm. DPPH• roztok byl připraven rozpuštěním 10 mg DPPH v 25 ml methanolu. Pokles absorbance výsledného roztoku byl sledován při 517 nm pomocí spektrofotometru UV-160 1PC (Shimadzu, Japonsko). Za stejných podmínek byly připraveny a stanoveny standardní roztoky Trolox (0,1 - 2,5 mmol/l) v methanolu. DPPH• antioxidační aktivita byla vyjádřena na Trolox ekvivalenty po vyhodnocení procentického poklesu vzorku oproti standardu při absorbanci 515 nm.

4.12 Stanovení obsahu akrylamidu pomocí GC/MS

Stanovení obsahu akrylamidu v reálné matrici bylo prováděno podle postupu Kolek *et al.* [180] bez derivace akrylamidu. Ke 2 g homogenizovaného vzorku sušenek bylo přidáno 100 µl vnitřního standardu (d_3 – akrylamid, c = 20 µg/ml) a 18 ml demineralizované vody a vzorky byly následně promíchány na vortexu. Pro vyčeření byl přidán 1 ml roztoku Carrez I. ($K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$ 150 g/l) a 1 ml roztoku Carrez II. ($ZnSO_4.7\ H_2O$ 300 g/l) a vzorky byly opět promíchány. Poté byly vzorky vystaveny 5 minut ultrazvukovým vibracím a následně zcentrifugovány při rychlosti 8720 x *g* a teplotě -5 °C po dobu 10 minut. Z vodné vrstvy bylo po odstředění odebráno 5 ml a byla provedena 3x extrakce 5 ml ethylacetátu. Spojené ethyalcetátové extrakty byly odpařeny pomocí rotačního vakuového koncentrátoru při teplotě 30 °C a tlaku 130 mBar. Suchý extrakt byl před analýzou pomocí GC/MS rozpuštěn v 1 ml methanolu a zfiltrován přes nylonový filtr s velikostí pórů o průměru 0,22 µm.

Analýza byla prováděna bez derivace akrylamidu s využitím negativní chemické ionizace (NCI) pomocí plynového chromatografu Agilent 7890A (Agilent Technologies, USA) s hmotnostním detektorem MSD 5975 Inert. Separace analytu byla prováděna na koloně DB-FFAP (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) použitím hélia jako nosného plynu při konstantním průtoku 1,0 ml/min. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min při laboratorní teplotě (místnost byla kondiciována na 25°C). Další parametry používané pro analýzu akrylamidu pomocí GC: nástřik – split/splitless inlet, teplota nástřiku 250 °C, objem nástřiku 2 µl, pulzní splitless

mód, pulzní čas 0,40 min, pulzní tlak nástřiku 200 kPa, liner – single tapered; teplotní program 60 °C (1 min), 10 °C/min, 190 °C (0 min), 50 °C/min, 240 °C (2 min). Parametry hmotnostního detektoru MSD: Interface 250 °C, iontový zdroj 230 °C, kvadrupól 150 °C; SIM mód, napětí na fotonásobiči 2165 V, dwell time 150 ms, negativní chemická ionizace (NCI) s methanem jako reakčním plynem. Snímané fragmenty iontů byli pro akrylamid: *m/z* 70,1 a pro d_3-akrylamid: *m/z* 73,1.

Kalibrace byla připravena ze zásobního roztoku akrylamidu (0,02 g/100 ml) v rozsahu 50 - 2000 ng/10 ml methanolu s 50 µl vnitřního standardu (d_3-akrylamid, c = 20 µg/ml).

4.13 Stanovení obsahu akrylamidu pomocí LC/ESI-MS-MS

Stanovení obsahu akrylamidu v reálné matrici bylo prováděno podle metodiky publikované v článku Bednáriková *et al.* [181]. Ke 2 g homogenizovaného vzorku bylo přidáno 100 µl vnitřního standardu (d_3 – akrylamid, c = 20 µg/ml) a 18 ml 0,1 % CH_3COOH a vzorky byly následně promíchány na vortexu. Pro vyčeření byl přidán 1 ml roztoku Carrez I. ($K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$ 150 g/l) a 1 ml roztoku Carrez II. ($ZnSO_4.7\ H_2O$ 300 g/l) a vzorky byly opět promíchány na vortexu. Poté byly zhomogenizované vzorky vystaveny po dobu 5 minut ultrazvukovým vibracím a následně zcentrifugovány při rychlosti 8720 x *g* a teplotě -5 °C po dobu 10 minut. Z vodné vrstvy bylo po odstředění odebráno 5 ml a byla provedena 3x extrakce 5 ml ethylacetátu. Spojené ethyalcetátové extrakty byly odpařeny pomocí rotačního vakuového koncentrátoru při teplotě 30 °C a tlaku 130 mBar. Suchý extrakt byl rozpuštěn v 1 ml 0,1 % CH_3COOH a před analýzou pomocí LC/ESI-MS-MS zfiltrován přes nylonový filtr s velikostí pórů o průměru 0,22 µm.

LC/ESI-MS-MS analýza byla prováděna pomocí HPLC systému 1200 série (Agilent Technologies, USA) spolu s Agilent 6410 Triple Quad detektorem vybaveným ESI iontovým zdrojem. Separace analytu byla prováděna na chromatografické koloně Purospher® STAR RP-8ec (150 mm x 4,6 mm, 3 µm) použitím izokratické směsi složené z acetonitrilu a vodného roztoku perfluorooktanové kyseliny (0,05 mmol/l) v poměru 1:9. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min při laboratorní teplotě (místnost byla kondiciována na 25°C). Všechny parametry ESI-MS-MS systému byly založeny na tvorbě protonovaných molekulových iontů z akrylamidu a vnitřního standardu (d_3-akrylamid), a následnou indukovanou kolizí byly produkovány specifické fragmenty iontů. Tento typ experimentu se označuje jako MRM (multiple reaction monitoring, vícenásobné reakční monitorování) a sledovány byly

následující přechody: přechod pro akrylamid: 72 → 55, přechod pro d_3-akrylamid: 75 → 58. Další parametry používané pro analýzu akrylamidu v ESI+ módu: tok sušícího plynu (N_2) 11 l/min, teplota zplynění 350 °C, tlak rozprašování 345 kPa, napětí v kapiláře 2,5 kV, napětí fragmentoru 80 V, kolizní energie 5 V, zdržení (dwell) 50 ms.

Kalibrace byla připravena ředěním zásobního roztoku akrylamidu (0,02 g/100 ml methylalkoholu) v rozsahu 50 – 2000 ng/10 ml s 50 µl vnitřního standardu (d_3-akrylamid, c = 20 µg/ml).

4.14 Stanovení obsahu aminokyselin pomocí LC/ESI-MS-MS

Stanovení aminokyselin bylo prováděno podle postupu Ciesarová *et al.* [182]. Ke 2 g vzorku bylo přidáno 20 ml 0,1 % CH_3COOH a vzorky byly 30 min protřepávány na třepačce s kruhovým pohybem Unimax 2010 (Heidolph Instrument GmbH & Co. KG, Německo). Poté byly zcentrifugovány při rychlosti 8720 x *g* a teplotě 0 °C po dobu 10 minut. 1 ml čistého supernatantu byl odebrán do 10 ml odměrných baněk, přidalo se 50 µl vnitřního standardu (d_3-kyselina glutamová, c = 100 µg/ml) a baňky byly doplněny po rysku 0,1 % CH_3COOH. Před analýzou pomocí LC/MS byla provedena filtrace přes nylonové filtry s velikostí pórů o průměru 0,22 µm.

LC/ESI-MS-MS analýza pro kvantifikaci 4 volných aminokyselin (asparagin, kyselina asparagová, glutamin a kyselina glutamová) byla prováděna pomocí HPLC systému 1200 série (Agilent Technologies, USA) spolu s Agilent 6410 Triple Quad detektorem vybaveným ESI iontovým zdrojem. Separace analytu byla prováděna na chromatografické koloně Purospher® STAR RP-8ec (150 mm x 4,6 mm, 3 µm) použitím izokratické směsi acetonitrilu a vodného roztoku perfluorooktanové kyseliny (0,05 mmol/l) v poměru 1:9. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min při laboratorní teplotě (místnost byla kondiciována na 25°C). Všechny parametry ESI-MS-MS systému byly založeny na tvorbě protonovaných molekulových iontů z aminokyselin a vnitřního standardu (d_3-kyselina glutamová) a následnou indukovanou kolizí byly produkovány specifické fragmenty iontů. Při MRM experimentu byly sledovány následující přechody: přechod pro asparagin: 133 → 74, 87; přechod pro kyselinu asparagovou: 134 → 74, 87; přechod pro glutamin: 147 → 84, 102; přechod pro kyselinu glutamovou: 148 → 84, 130; přechod pro d_3-kyselinu glutamovou: 151 → 87, 105. Ostatní parametry používané pro LC/MS-MS analýzu aminokyselin v pozitivním ESI módu: tok

sušícího plynu (N_2) 8 l/min, teplota zplynění 320 °C, tlak rozprašování 345 kPa, napětí v kapiláře 3 kV, napětí na fragmentoru 40 V, kolizní energie 12 V, zdržení 50 ms.

Kalibrace byla připravena ředěním zásobních roztoků aminokyselin (c = 1 mg/ml) v rozsahu 20 – 2000 ng/ml s 50 µl vnitřního standardu (d_3-kyselinu glutamová, c = 100 µg/ml).

4.15 Senzorické hodnocení

Senzorické hodnocení chlebů bylo prováděno vždy 1,5 h po vypečení a účastnilo se ho vždy 7 nezávislých hodnotitelů. Byl sestaven protokol pro senzorické hodnocení pekařských výrobků zaměřený na pět základních deskriptorů (celkový vzhled, kůrka, střídka, pach a chuť), které byly hodnoceny bodovou stupnicí od 1 (nejhorší) až po 5 (nejlepší). Jednotlivým deskriptorům byly následně přiřazeny koeficienty významnosti, pomocí nichž byl vypočítán celkový počet bodů, které chléb v senzorickém hodnocení získal. Maximální počet bodů byl 100. U pachu i chuti byli hodnoceny také jejich vybrané atributy, které jsou pro chléb žádoucí a také ty, které pach nebo chuť negativně ovlivňují. Intenzita dílčích pachů a chutí byla určována lineární škálou, kdy levý konec úsečky znamenal nevýrazné (0 %) a pravý konec velmi intenzivní (100 %). K celkovému vyhodnocení všech atributů byl následně použit paprskový graf, který graficky vyjádřil senzorický profil pachu nebo chutě výrobku.

Senzorické hodnocení organoleptických vlastností (vzhledu, barvy, textury, pach a chuti) průmyslově vyráběných sušenek s přídavkem enzymu bylo prováděno pomocí trojúhelníkové zkoušky podle britské normy ISO 4120:2004 [183], kdy každému hodnotiteli byly postupně předloženy 3 série vzorků, přičemž každá série obsahovala 2 vzorky shodné a jeden odlišný. Hodnotitel musel u každé série označit vzorek, který byl podle jeho názoru odlišný. Hodnocení se uskutečnilo v senzorické laboratoři s využitím experimentálního softwaru upraveného pro sběr a statistické zpracovávání výsledků jednotlivých senzorických hodnocení. Senzorického hodnocení se zúčastnilo celkem 10 nezávislých hodnotitelů.

4.16 Statistické zhodnocení výsledků

Výsledky chemických analýz jsou uvedeny jako průměr a směrodatná odchylka z nezávislých měření. Pro statistické zhodnocení výsledků byla použita jednofaktorová analýza rozptylu - ANOVA: jeden faktor. Zhodnocení výsledků bylo prováděno na hladině významnosti 0,05.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Vyhodnocení expozice akrylamidem z potravin

Předběžný průzkum spotřebitelských zvyklostí byl realizován ve dvou etapách. V 1. etapě v roce 2009 byla účastníky průzkumu náhodná nereprezentativní skupina spotřebitelů. Celkově bylo osloveno 285 lidí s rozdílným vzděláním, zaměstnáním a také z různých okresů České a Slovenské republiky. Výsledky tohoto průzkumu uveřejněné v mé diplomové práci [184] ukázaly, že akrylamidem z potravin je nejvíce zatížena skupina respondentů ve věku do 20 let. Děti a mladí lidé do 20 let jsou nejvíce exponováni akrylamidem vzhledem k jejich nižší tělesné hmotnosti a jejich stravovacím návykům, kdy děti a mladí lidé konzumují ve větší míře sladkosti a slané snacky a vzhledem k rostoucí oblibě rychlého občerstvení i značné množství smažených bramborových produktů, které jsou také významným zdrojem akrylamidu.

S ohledem na tyto výsledky byla 2. etapa monitorování expozice akrylamidem zaměřena na průzkum spotřebitelských zvyklostí studentů středních škol a zároveň byli porovnávány stravovací návyky středoškolských studentů z České a Slovenské republiky. Osloveno bylo celkem 388 studentů, z nichž 85 chlapců a 109 dívek pocházelo z České republiky a 84 chlapců a 110 dívek ze Slovenské republiky.

Výsledky monitorování expozice akrylamidem u studentů středních škol z České a Slovenské republiky jsou uvedeny v Tab. 7, kde je pro každou dotazovanou potraviny uveden denní příjem akrylamidu z ní na základě jejího obsahu akrylamidu. Obsah akrylamidu je převážně uveden v rozsahu od minimálního obsahu po maximální úroveň přítomnou v potravinách vzhledem k široké změně obsahu akrylamidu nejen v různých potravinových kategoriích, ale i v různých značkách potravin ze stejné kategorie [4, 18]. Z toho vyplývá, že i denní příjem akrylamidu z jednotlivých potravin je uveden v rozsahu minimálních a maximálních hodnot, protože není možné propojit tyto hodnoty pouze na obsah akrylamidu v konkrétních značkách potravin, což může vést k méně přesnému odhadu skutečného denního příjmu akrylamidu.

Tab. 7:Přehled dotazovaných potravin, obsah akrylamidu a jeho denní příjem

Potraviny	**Obsah akrylamidu (µg/g)**		**Příjem akrylamidu (µg/den)**		Zdroj hodnot obsahu akrylamidu
	Min	**Max**	**Min**	**Max**	
Smažené bramborové hranolky	0,005	1,407	0,073	20,651	[168]
Pečené brambory	0,023		0,441		[170]
Smažené bramborové chipsy	0,005	4,108	0,062	50,769	[168]
Extrudovaný chléb	0,005	0,916	0,016	2,765	[168]
Topinka, pečený toast	0,030	3,200	0,412	43,913	[169]
Solené opékané suchary (chlebové)	0,030	3,200	0,089	9,537	[169]
Slané snacky (tyčinky, atd.)	0,005	0,896	0,052	9,307	[168]
Perník plněný	0,005	1,582	0,022	7,022	[168, 171]
Perníčky s polevou	0,005	0,698	0,036	4,958	[168, 171]
Medovník zdobený	0,401		0,176		[168]
Oplatky plněné	0,071	0,101	1,865	2,653	[168, 170]
Piškoty	0,005	0,024	0,023	0,112	[168]
Sladké sušenky neplněné	0,016	2,561	0,456	72,966	[170, 171]
Chléb konzumní	0,005	0,162	0,463	10,283	[168, 169]
Pečivo	0,018	0,500	2,012	55,896	[168,172]
Snídaňové cereálie	0,005	1,346	0,052	11,697	[168, 169, 170]
Káva	0,175	3,025	0,692	11,960	[168]
Kávoviny	0,050	0,070	0,038	0,054	[169]
Sladké pečivo	0,005	0,278	0,047	2,322	[168, 170, 171]
Smažené bramborové placky	0,531	0,692	1,629	2,123	[173]
Kukuřičné křupky	0,005	0,032	0,017	0,106	[168]
Müsli tyčinky	0,005	0,070	0,025	0,346	[168]
Kakao	1,203		3,865		[168]
Horká čokoláda	0,032		0,081		[170]
Čokoláda	0,017		0,334		[170]
Čokoládový/čoko.-oříškový krém	0,017		0,084		[170]

Z hodnot uvedených v Tab. 7 a z údajů o tělesné hmotnosti respondentů byla následně určena expozice akrylamidem z potravin studentů středních škol České a Slovenské republiky (Tab. 8). Střední (P50) expozice akrylamidem u studentů z České republiky byla vypočítána na 2,05 μg/kg bw/den (P90 = 3,83 μg/kg bw/den). To znamená, že u 50 % z celkového počtu studentů České republiky byl příjem akrylamidu nižší nebo roven 2,05 μg/kg bw/den a u 90 % studentů byl příjem nižší nebo roven 3,83 μg/kg bw/den. Střední expozice akrylamidem u studentů ze Slovenské republiky byla 1,87 μg/kg bw/den (P90 = 3,77 μg/kg bw/den).

Při porovnání zatížení organismu českých a slovenských studentů akrylamidem vyplývá, že slovenští studenti jsou vystaveni zhruba o 9 % nižší střední zátěži organismu akrylamidem (vysoká expozice akrylamidem je v obou zemích přibližně stejná). Tento rozdíl v expozici akrylamidem z potravin není příliš výrazný, což lze předpokládat s ohledem na výraznou geografickou a sociální podobnost obou zemí.

Tab. 8: Zatížení organismu českých a slovenských studentů akrylamidem (μg/kg bw/den) po rozčlenění do skupin dívky, chlapci a všichni respondent

	Česká republiky		**Slovenská republika**	
Studenti	Střední (P50)	Vysoká (P90)	Střední (P50)	Vysoká (P90)
Všichni	2,05	3,83	1,87	3,77
Chlapci	2,24	3,96	2,19	4,36
Dívky	1,94	3,33	1,62	3,60

Ze srovnání zatížení organismu českých a slovenských studentů akrylamidem vyplývá (Tab. 8), že expozice akrylamidem je u chlapců z České i Slovenské republiky porovnatelná (přibližně 2,2 μg/kg bw/den), kdežto dívky ze Slovenské republiky jsou akrylamidem zatíženy téměř o 17 % méně než dívky z České republiky. Při porovnání dívek a chlapců je patrné, že dívky z České republiky jsou zatíženy akrylamidem z potravin o 13 % méně než chlapci a u dívek ze Slovenska je tento rozdíl dokonce o 26 %. To, že jsou dívky zatíženy akrylamidem méně než chlapci, by mohlo být způsobeno konzumací menších porcí, což je ale částečně kompenzováno nižší tělesnou hmotností u dívek. Další z možností je i životní styl, kdy dívky jsou vlivem médií vedeny k neustálé kontrole své váhy a tím i ke konzumaci „zdravých“ nízkokalorických potravin.

JECFA odhaduje průměrný denní příjem u vysoce zatížené skupiny spotřebitelů v rozmezí od 0,6 do 3,5 μg/kg bw/den [37]. Při porovnání hodnot expozice akrylamidem z potravin u studentů z České a Slovenské republiky s těmito hodnotami, jsou hodnoty získané v této práci

v souladu s hodnotami odhadovanými JECFA. Zároveň tyto hodnoty nepřekračují tolerovatelný denní příjem z hlediska prevence vzniku rakoviny, který Tardiff *et al.* [185] ve své studii odhadli na 2,6 μg/kg bw/den.

*Tab. 9: Odhad expozice akrylamidem z potravin ve vybraných zemí [*40*, 186, 187]*

Země	**Věk**	**Expozice akrylamidu z potravin** (μg/kg bw/den)	
		Střední (P50)	**Vysoká** (P90; P95*; P97,5†)
Německo	15-18	1,1	3,2†
Norsko (muži)	-	0,49	1,04*
	13	0,52	1,35*
	18-79	0,43	1,02*
Francie	15+	0,5	0,98†
	3-17	0,69	1,80*
Švédsko	3-14	1,25	2,54†
	18-74	0,45	1,03†
Nizozemsko	1-97	0,5	1,2*
	1-6	1,1	2,0*
USA	2+	0,44	0,95*
	2-5	1,06	2,33*
Velká Británie	19-64	0,61	1,29
Irsko	18-64	0,59	1,75
Česká republika a Slovenská republika [a]	14-73	1,43	3,33
Česká republika [b]	15-20	2,05	3,83
Slovenská republika [b]	15-20	1,87	3,92

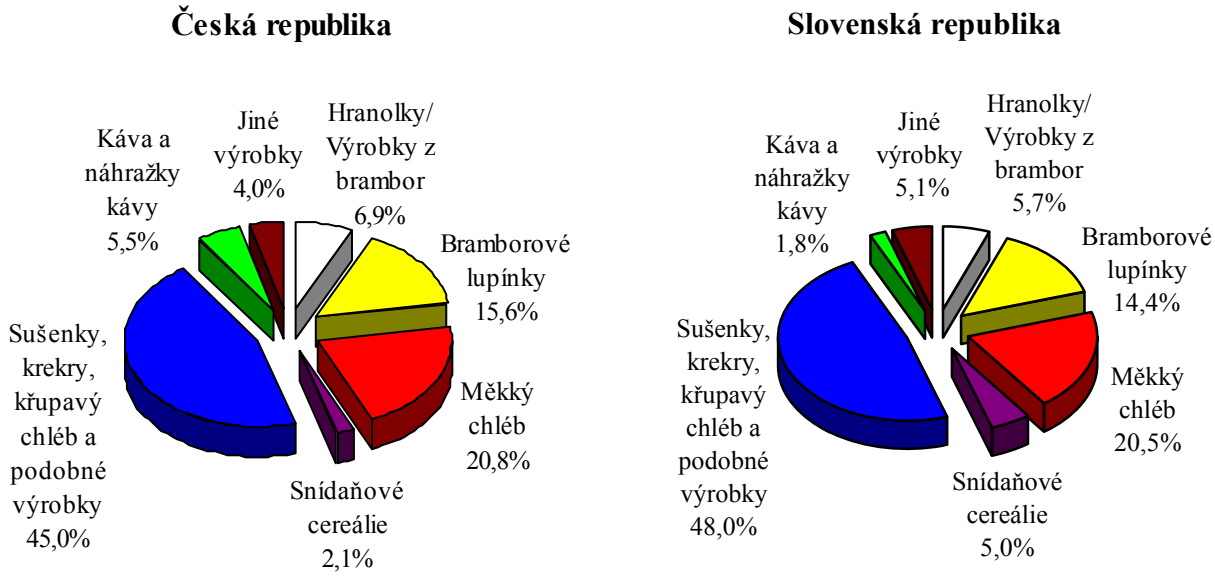
[a] Výsledky 1. etapy předběžného průzkumu z roku 2009

[b] Výsledky 2. etapy předběžného průzkumu z roku 2010, které jsou uvedeny v této práci

Hodnoty expozice akrylamidem z potravin u studentů z České a Slovenské republiky bylo možné na základě dostupných literárních zdrojů porovnat i s hodnotami zjištěnými v jiných zemí (Tab. 9). Nicméně je nutné při srovnávání postupovat opatrně, protože pro stanovení expozice mohli být použity rozdílné metody průzkumu, kategorizace potravin nebo se mohly

lišit stravovací návyky spotřebitelů. Jak je vidět z Tab. 9, hodnoty v jednotlivých zemích se mohou výrazně lišit, přesto je patrný vyšší příjem akrylamidu z potravin u dětí a mládeže v porovnání s dospělou populací, který může dosahovat až dvojnásobných hodnot, což ve svých studiích potvrdili například Boon *et al.* [40] nebo Heudorf *et al.* [41].

Podle doposud zveřejněných hodnot se na expozici akrylamidem u většiny populace významným způsobem podílí výrobky z brambor (až 50 %), pekařské výrobky a chléb (přibližně 20 %) a v nemalé míře i káva [4, 20, 36]. Z výsledků uvedených v této práci ale vyplývá (Obr. 4), že hlavními zdroji příjmu akrylamidu z potravin u studentů středních škol České i Slovenské republiky jsou především potraviny ze skupiny Sušenky, krekry, křupavý chléb a podobné výrobky, z nichž pochází až polovina přijatého akrylamidu během dne. Dále významně přispívají k expozici akrylamidem hranolky a bramborové chipsy (přibližně 1/5) a chléb a pečivo (také přibližně 1/5). Tento rozdíl může být vysvětlen rozdílnými stravovacími zvyklostmi v jednotlivých zemích, např. Brantsaeter *et al.* [188] ve své studii uvádí, že hlavním zdrojem příjmu akrylamidu je křupavý chléb (22 %) a podle čínské studie dokonce koření (13 %) [187].



Obr. 4: Příspěvek potravin na *denním příjmu akrylamidu u skupiny studentů z České a Slovenské republiky*

Dalším možným vysvětlením je, že tato studie je zaměřena na děti a mládež, z nichž většina se stravuje ve školních jídelnách, kde by měly být dodržovány požadavky na výživovou hodnotu podávaných jídel a tím by mohl být snížen příjem akrylamidu ze smažených bramborových produktů. U dětí a mládeže jsou také kromě hlavních denních jídel

důležité i svačiny, které se významnou měrou podílí na příjmu akrylamidu v průběhu dne a jejíž součástí je především chléb a různé druhy pečiva, ale i dnes stále více konzumované extrudované chleby a různé druhy sušenek výrobci uváděné jako zdravá a rychlá svačinka.

Při porovnání zastoupení potravin na denním příjmu akrylamidu v hlavním denním jídle (Tab. 10) jsou patrné rozdíly v příjmu akrylamidu v průběhu dne a zároveň i rozdíly ve stravovacích návycích českých a slovenských studentů. Například během snídaně je u slovenských studentů příjem akrylamidu ze snídaňových cereálií téměř o 9 % vyšší než u skupiny českých studentů. Také u skupiny Sušenky, krekry, suchary a jiné se příjem akrylamidu během snídaně o 6 % zvyšuje oproti českým studentům. Tento nárůst je způsoben zvýšenou konzumací topinek nebo pečených toastů slovenskými studenty k snídani a to v porovnání s českými studenty až o 15 %. Naproti tomu, čeští studenti preferují k snídani chléb a pečivo a tak je i příjem akrylamidu z skupiny měkký chléb o 12 % vyšší než v případě slovenských studentů.

Tab. 10: Příspěvek potravin (%) na *denním příjmu akrylamidu v hlavních denních jídlech*

Skupina potravin	**Snídaně**		**Oběd**		**Večeře**		**Jiné**	
	ČR	**SR**	**ČR**	**SR**	**ČR**	**SR**	**ČR**	**SR**
Hranolky/Výrobky z brambor	0,2	0,2	67,0	50,3	3,0	7,1	0,9	2,1
Bramborové lupínky	0,0	0,6	2,4	8,8	4,5	2,9	26,6	24,5
Měkký chléb	41,8	29,7	4,4	7,5	25,0	28,9	14,2	14,5
Snídaňové cereálie	6,6	15,2	0,2	0,1	1,1	3,5	1,1	1,6
Sušenky, krekry, křupavý chléb a podobné výrobky	39,5	45,7	12,9	16,8	58,0	51,4	48,5	52,1
Káva a náhražky kávy	4,8	1,8	5,1	1,1	3,9	0,7	6,3	2,2
Jiné výrobky	7,1	6,7	8,0	15,3	4,5	5,5	2,3	3,0

V případě oběda dominuje u studentů z České a Slovenské republiky jako zdroj akrylamidu skupina Hranolky/Výrobky z brambor. Tato skupina se u českých studentů podílí na příjmu akrylamidu během oběda téměř 70 %, kdežto u studentů ze Slovenské republiky je její podíl na příjmu akrylamidu nižší. Představuje zde asi ½ z celkově přijatého akrylamidu během oběda. Naproti tomu je u slovenských studentů v porovnání s českými vyšší příjem akrylamidu během oběda z jiných skupin, jako například ze skupiny Jiné výrobky, kde

zdrojem akrylamidu jsou především smažené bramborové placky a sladké pečivo, kdežto u českých studentů je tato skupina výlučně zastoupena smaženými bramborovými plackami.

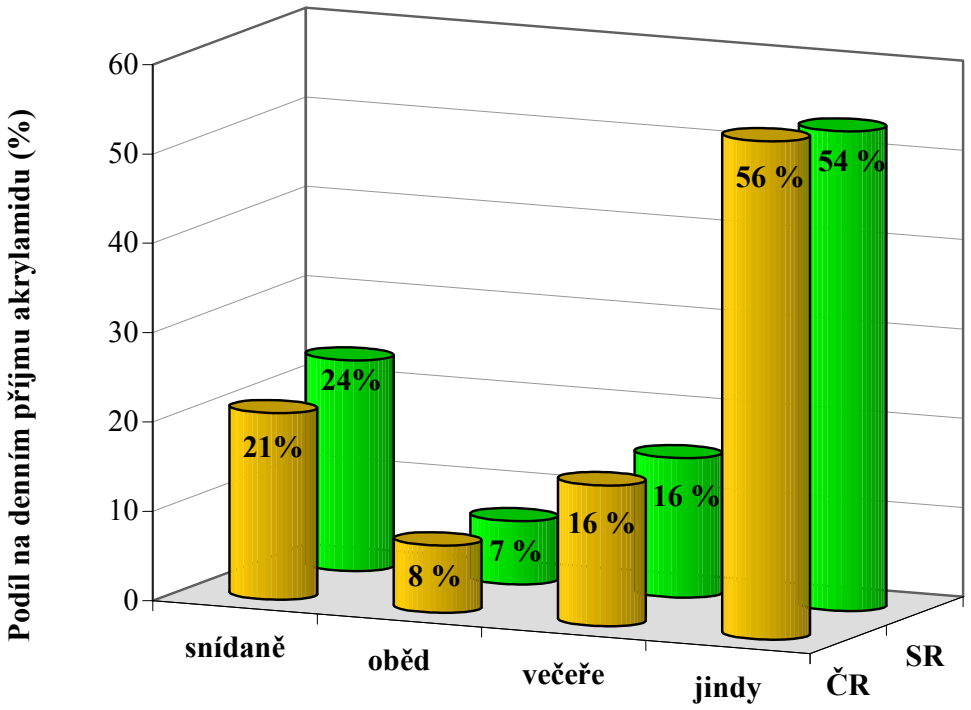
V průběhu večeře pochází přibližně 50 % přijatého akrylamidu ze skupiny Sušenky, krekry, křupavý chléb a podobné výrobky, a to jak u studentů České tak i Slovenské republiky. Nicméně, 90 % akrylamidu přijatého při večeři z této skupiny pochází z toastů a topinek. Další skupinou, která se významnou měrou podílí na příjmu akrylamidu během večeře u středoškolských studentů ať už z České nebo Slovenské republiky, je skupina Měkký chléb, z níž pochází 25 až 29 % akrylamidu přijatého v tuto dobu.

Mezi hlavními jídly je u středoškolských studentů z České a Slovenské republiky hlavním zdrojem akrylamidu skupina Sušenky, krekry, křupavý chléb a podobné výrobky, z nichž pochází téměř ½ akrylamidu přijatého mezi hlavními jídly. Hlavní podíl na akrylamidu přijatém z této skupiny mimo hlavní jídla mají zejména sladké sušenky neplněné, které tvoří u slovenských studentů přibližně 46 % této skupiny, kdežto u českých je to dokonce 66 %.

Významný zdrojem akrylamidu mezi hlavními jídly jsou i bramborové lupínky, které představují až ¼ akrylamidu přijatého mimo hlavní denní jídla. Vzhledem ke stravovacím zvyklostem dětí a mládeže do 20 let, u nichž kromě snídaně, obědu a večeře jsou velmi důležité i svačiny, se na množství přijatého akrylamidu mimo hlavní denní jídla v nezanedbatelné míře podílí skupina Měkký chléb, jehož různé druhy jsou jako součást svačiny nejčastěji konzumovány.

Zajímavý je i příjem akrylamidu ze skupiny Káva a náhražky kávy, který se v průběhu celého dne jak u českých tak i slovenských studentů nijak výrazně neměnil. Ale z porovnání studentů z České a Slovenské republiky v příjmu akrylamidu z této skupiny je patrné, že čeští středoškolští studenti konzumují kávu ve větší míře než studenti ze Slovenské republiky.

Porovnáním podílu hlavních denních jídel na celkovém denním příjmu akrylamidu u studentů z České a Slovenské republiky (viz Obr. 5) byly potvrzeny výsledky dřívější studie, z nichž vyplývá, že nejvíce dochází k zatížení organismu akrylamidem stranou hlavních denních jídel a to více než dvojnásobně. Ze srovnání podílu potravin na denním příjmu akrylamidu vyplynulo, že lidský organismus je mimo hlavní jídla zatížen především akrylamidem ze skupiny Sušenky, krekry, křupavý chléb a podobné výrobky, v níž nejvíce dominují sladké sušenky neplněné, a také ze skupiny Bramborové lupínky. Naproti tomu je organismus středoškolských studentů nejméně zatížen akrylamidem během oběda, a to i přes značnou oblibu smažených bramborových hranolků, protože většina studentů se stravuje ve školních jídelnách, které by měli splňovat požadavky na výživovou hodnotu podávaných jídel.



Obr. 5: Podíl hlavních denních jídel na denním příjmu akrylamidu u studentů z České a Slovenské republiky

V závěrečné části předběžného průzkumu expozice akrylamidem u studentů středních škol byla zjišťována i informovanost studentů o akrylamidu v potravinách. Téměř 80 % dotázaných studentů uvedlo, že nikdy předtím neslyšelo o výskytu akrylamidu v potravinách ani rizikách s ním spojené. Pouze 12 % dotázaných mělo povědomí o akrylamidu v potravinách, ostatní dotazovaní si na tuto skutečnost nemohli vzpomenout. Bylo by tedy vhodné zvýšit informovanost lidí o výskytu akrylamidu v potravinách, riziku spojeném s vysokou konzumací potravin se zvýšeným obsahem akrylamidu a možnostech, jak omezit jeho příjem ze stravy, ať už úpravou stravovacích návyků nebo optimalizací přípravy pokrmů vedoucí k minimalizaci tvorby akrylamidu.

5.2 Optimalizace receptury chlebových směsí a technologického procesu

Pekařské výrobky jsou jedním ze základních pilířů lidské stravy. Současně předběžný průzkum spotřebitelských zvyklostí potvrdil, že chléb a pečivo se nezanedbatelnou měrou podílí na expozici akrylamidem z potravin. Na základě těchto poznatků bylo studium

eliminace akrylamidu zaměřeno na chleby a ve spolupráci se společností Mäspoma s.r.o. pak na chleby připravované ze směsí v domácí pekárně.

Společnost Mäspoma s.r.o. vyvinula tři různé druhy směsí Mäspomix určené pro přípravu chleba (bramborový, slunečnicový a grahamový) v domácí pekárně s možností přípravy i v plynové nebo elektrické troubě. Chleby připravené z těchto směsí v domácí pekárně byly následně porovnávány s klasicky vyráběnými chleby a současně i s chleby připravenými z konkurenčních směsí dostupných v obchodní síti. Na základě získaných výsledků porovnávání chlebů bylo následně cílem optimalizovat složení receptury chlebových směsí Mäspomix společnosti Mäspoma s.r.o., případně technologického procesu přípravy chleba z nich tak, aby bylo dosaženo snížení obsahu akrylamidu v chlebech při zachování senzorické kvality finálního výrobku.

5.2.1 Distribuce akrylamidu v jednotlivých částech chleba

Studium distribuce akrylamidu v jednotlivých částech chleba (celý chléb, střídka, kůrka) bylo nezbytné pro nastavení vhodných podmínek přípravy vzorek pro stanovení obsahu akrylamidu v chlebu pro následné technologické úpravy, které by vedly k minimalizaci vzniku akrylamidu při domácí přípravě chleba.

Pro studium distribuce akrylamidu byli použity chleby (bramborový, slunečnicový a grahamový) připravené z chlebových směsí Mäspomix, které byli připravovány v domácí pekárně Moulinex Home Bread Inox (Moulinex, Čína) podle pokynů výrobce. Fotografie chlebů jsou uvedeny v Příloze 1.

Takto připravené chleby měli na spodní a boční straně drsnější povrch kůrky než na horní straně chleba, protože se zde kůrka během pečení dotýkala formy, v níž byl chléb připravován. Také zbarvení povrchu bylo odlišné, což bylo způsobeno především tím, že topná spirála se vinula po vnitřním obvodu pekárny a chléb byl tak po bokách propečenější.

Z porovnání obsahu akrylamidu mezi bramborovým, slunečnicovým a grahamovým chlebem stanoveném v kůrce (Tab. 11) vyplývá, že bramborový chléb obsahuje v kůrce nejvíce akrylamidu z těchto tří druhů chleba. To je pravděpodobně způsobeno přítomností bramborové mouky ve směsi pro přípravu tohoto chleba, protože brambory obsahují značné množství aminokyseliny asparagin jako hlavního prekurzoru akrylamidu [20]. Obsah akrylamidu ve slunečnicovém chlebu je v porovnání s bramborovým chlebem téměř poloviční a u grahamového je jeho obsah takřka třetinový, což je nejspíše dáno použitím surovin s nižším obsahem prekurzorů akrylamidu pro přípravu směsí na tyto chleby.

Tab. 11: Porovnání obsahu akrylamidu (μg/kg) v chlebech připravených z chlebových směsí Mäspomix v domácí pekárně nebo klasickým způsobem

	Příprava v domácí pekárně			**Klasický způsob přípravy**		
	Celý chléb	Střídka	Kůrka	Celý chléb	Střídka	Kůrka
Bramborový chléb	30 ± 11	29 ± 8	76 ± 6	69 ± 2	32 ± 2	173 ± 5
Slunečnicový chléb	20 ± 6	18 ± 2	48 ± 10	28 ± 1	15 ± 1	45 ± 2
Grahamový chléb	20 ± 8	14 ± 4	28 ± 4	18 ± 1	18 ± 2	37 ± 4

Současně byl porovnáván také obsah akrylamidu mezi jednotlivými chleby ve střídce a v chlebu celkově (Tab. 11). Hodnoty získané při stanovení obsahu akrylamidu ve střídce byli velmi nízké a blížily se limitu stanovení (LOQ = 10 ppb). Teplota střídky chlebu totiž není tak vysoká jako teplota na povrchu (obvykle dosahuje hodnot 94 – 98 °C [189, 190]), čímž vzniká méně akrylamidu. Je totiž známo, že k tvorbě akrylamidu dochází až při teplotách vyšších jak 120 °C s maximem tvorby mezi 180 až 200 °C [136]. Další vliv může mít i to, že kůrka, která se vytvoří na povrchu chleba během pečení, slouží jako bariéra bránící rychlému odpařování vody ze střídky během pečení. Vyšší obsah vody tak může vést k nižší tvorbě akrylamidu, jak uvedli ve svých studiích Elmore *et al.* [191], Taeymans *et al.* [65] nebo Ciesarová *et al.* [155]. Vlhkost chlebů připravených v domácí pekárně se po upečení pohybovala v rozmezí 40 – 50 %.

Obsah akrylamidu v celkovém chlebu byl také poměrně nízký (Tab. 11) a velice se blížil hodnotám střídky. To je dáno především tím, že střídka tvořila více jak 90 % celého chleba a tudíž byl obsah akrylamidu v celém chlebu dán především obsahem akrylamidu ve střídce.

Pro porovnání distribuce akrylamidu v chlebech byl proveden i monitoring obsahu akrylamidu v již hotových chlebech zakoupených v obchodní síti (Tab. 12). I v případě chlebů z obchodní sítě byl obsah akrylamidu nejvyšší v kůrce a nejnižší v střídce chleba. Díky tomu byl také celkový obsah akrylamidu v chlebech nízký, protože podíl střídky v chlebech z obchodní sítě se pohyboval v rozmezí 85 – 95 %.

Z výsledků obsahu akrylamidu v chlebech z obchodní sítě (Tab. 12) je též patrné, že nejvyšší obsah akrylamidu byl stanoven v bramborovém chlebě. To se shoduje i s výsledky obsahu akrylamidu v chlebech z domácí pekárny, kde byl také stanoven nejvyšší obsah akrylamidu v chlebě bramborovém, což je nejspíše způsobeno použitím surovin z brambor,

které jak již bylo řečeno, obsahují značné množství aminokyseliny [20]. Ovšem při porovnání obsahu akrylamidu v kůrce bramborového chlebu z obchodní sítě a připravovaného v domácí pekárně je vidět, že hodnoty akrylamidu jsou v bramborovém chlebu z obchodní sítě až 10x vyšší. Rozdíl je patrný i při porovnání jiných stejných druhů chlebů z obchodní sítě a chlebů připravených v domácí pekárně, kdy chleby z obchodní sítě mají celkový obsah akrylamidu sice jen o málo vyšší než chleby z domácí pekárny, ale obsah akrylamidu v kůrce už mají několikanásobně vyšší. Tento rozdíl v obsahu akrylamidu v chlebech z obchodní sítě a chlebech z domácí pekárny může být dán složením a podmínkami jejich přípravy a pečení.

Tab. 12: Porovnání obsahu akrylamidu (µg/kg) v jednotlivých částech chlebů zakoupených v obchodní síti (LOQ = 10 µg/kg)

	Celý chléb	**Střídka**	**Kůrka**
Bramborový chléb	168 ± 10	113 ± 20	756 ± 30
Slunečnicový chléb	35 ± 7	19 ± 3	160 ± 8
Grahamový chléb	27 ± 12	< LOQ	73 ± 8
Pšenično-žitný chléb	51 ± 5	36 ± 7	280 ± 13
Pšenično žitný chléb venkovský	73 ± 8	36 ± 7	251 ± 14
Farmářský chléb	< LOQ	< LOQ	69 ± 4

Příprava chlebů ze směsí určených pro domácí pekárnu byla tedy zopakována a provedena klasickým způsobem, přičemž chleby byly pečeny v pekařské peci se zapařováním. Při porovnání výsledků obsahu akrylamidu chlebů z pece s hodnotami akrylamidu v chlebech z domácí pekárny (Tab. 11) je zřejmé, že změnou technologického postupu nedošlo u slunečnicového a grahamového chleba k významné změně obsahu akrylamidu v jednotlivých částech chleba. V případě bramborového chleba došlo k výraznému nárůstu obsahu akrylamidu v kůrce (až 2,5x), což se projevilo i zvýšením hodnoty akrylamidu v celém chlebu. Získané výsledky tak naznačují, že pro obsah akrylamidu v konečném výrobku je rozhodující především jeho složení, i když technologický postup a podmínky přípravy a pečení nesmí být opomíjeny.

Na základě výsledných hodnot obsahu akrylamidu získaných během studia distribuce akrylamidu v jednotlivých částech chleba (celý chléb, střídka, kůrka) připraveného v domácí pekárně nebo v peci, či koupeného v obchodní síti byl pro optimalizace receptury chlebových směsí a technologického procesu uváděn pouze obsah akrylamidu v kůrce chlebů.

Kromě obsahu akrylamidu byl sledován i obsah asparaginu, jako hlavního prekurzoru akrylamidu, v chlebových směsích Mäspomix, kdy bylo provedeno stanovení čtyř vybraných aminokyselin (asparagin, kyselina asparagová, glutamin a kyselina glutamová). Výsledky jsou uvedeny v Tab. 13, přičemž nejvyšší hodnoty asparaginu (nad 300 mg/kg) byly stanoveny u směsí pro přípravu bramborového chleba.

Tab. 13: Obsah aminokyselin (mg/kg) v chlebových směsích

	Asn	**Asp**	**Gln**	**Glu**
Bramborový chléb	365 ± 13	201 ± 6	81 ± 2	287 ± 6
Slunečnicový chléb	121 ± 3	160 ± 3	34 ± 1	225 ± 4
Grahamový chléb	137 ± 1	153 ± 2	29 ± 1	242 ± 9

Avšak pro tvorbu akrylamidu je rozhodující obsah asparaginu v těstě před pečením, tedy po vykynutí těsta, protože v průběhu fermentace jsou kvasinkami spotřebovávány prekurzory akrylamidu (sacharidy, asparagin i kyselina asparagová) [67]. V Tab. 14 je uveden obsah 4 vybraných aminokyselin v chlebovém těstě po vykynutí.

Tab. 14: Obsah aminokyselin (mg/kg) v těstě chlebů z chlebových směsí po vykynutí

	Asn	**Asp**	**Gln**	**Glu**
Bramborový chléb	9 ± 1	52 ± 2	50 ± 1	92 ± 4
Slunečnicový chléb	6 ± 1	11 ± 1	42 ± 7	29 ± 3
Grahamový chléb	9 ± 2	18 ± 1	64 ± 7	65 ± 5

Z výsledků je patrné, že působením kvasinek došlo k významnému poklesu obsahu asparaginu. Avšak porovnáním obsahu asparaginu a obsahu akrylamidu nebyla pozorována korelace mezi obsahem akrylamidu v kůrce a obsahem asparaginu v těstě před pečením. Ze stanovení obsahu aminokyselin v hotových chlebech vyplývá, že v průběhu pečení dochází ke změně obsahu aminokyselin, jak je vidět v Tab. 15.

Na počátku pečení totiž dochází při teplotách do 35 – 40 °C ke zrychlování činnost kvasinek, což se projevuje maximální tvorbou kvasných plynů. Při teplotě 50 – 55 °C se činnost kvasinek zastavuje a zrychluje se aktivita bakterií, která se zastavuje při teplotě 60 °C [190]. Fermentující bakterie obsahují enzymy, jako jsou proteázy nebo peptidázy odštěpující z proteinů aminokyseliny a peptidy, které jsou následně v průběhu fermentace metabolizovány kvasinkami a mléčnými bakteriemi [192]. Během pečení tyto sloučeniny

vstupují do Maillardovy reakce a podílí se tak na neenzymatickém hnědnutí kůrky [193]. Pro tvorbu akrylamidu v chlebu je tedy důležitý nejen obsah asparaginu v těstě před pečením ale i aktivita fermentujících bakterií na začátku pečení.

Tab. 15: Obsah aminokyselin (mg/kg) v hotových chlebech připravených z chlebových směsí

	Asn	Asp	Gln	Glu
Bramborový chléb	35 ± 4	32 ± 2	14 ± 1	152 ± 2
Slunečnicový chléb	17 ± 1	22 ± 1	25 ± 1	75 ± 1
Grahamový chléb	72 ± 3	103 ± 6	23 ± 1	169 ± 8

Kromě obsahu aminokyselin bylo sledováno i pH těsta po fermentaci (Tab. 16), protože pH je důležitým faktorem, který významně ovlivňuje tvorbu akrylamidu [121, 122]. U chlebových směsí ale žádná korelace mezi obsahem akrylamidu a pH těsta před pečením zjištěna nebyla. Z výsledků v Tab. 11 a 16 je patrné, že nejnižší obsah akrylamidu byl stanoven v grahamovém chlebu, jehož pH těsta bylo před pečením nejvyšší. To může být způsobeno jak jeho složením, tak i činností kvasinek a fermentujících bakterií, protože jejich aktivita na začátku pečení může ještě výrazně ovlivnit obsah aminokyselin v těstě a jeho pH.

Tab. 16: pH chlebového těsta před pečením

	pH těsta po fermentaci
Bramborový chléb	5,11 ± 0,01
Slunečnicový chléb	4,74 ± 0,01
Grahamový chléb	5,21 ± 0,01

5.2.2 Vliv droždí na tvorbu akrylamidu v chlebech z chlebových směsí

Biologické kypření (přidání koncentrované mikrobiální masy) je při výrobě chleba rozhodující. Během zrání a kynutí výrobku před pečením kvasinky přeměňují pomocí glykolytických enzymů sacharidy přítomné v těstě na CO_2 a alkohol, ale i další chuťové a aromatické látky a zároveň získávají energii pro své životní pochody [189, 190].

Proces fermentace je zároveň významným faktorem ovlivňujícím tvorbu akrylamidu, protože kvasinky přednostně zpracovávají asparagin, což může vést až k 50 % snížení obsahu akrylamidu po 1 hodině fermentace. Nicméně u reálných výrobků, které obsahují přídavné látky, a u tukového pečiva byl pokles obsahu akrylamidu málo výrazný [67, 103] a současně

jak již bylo řečeno, mohly mít vliv fermentující bakterie, které se významnou měrou podílí na obsahu asparaginu v těstě.

Zařazení fermentace do výrobního procesu či prodloužením její doby je nutné vzít v potaz její vliv na kvalitu konečného výrobku [67]. Zároveň je nutné vhodně volit dobu fermentace nebo její prodloužení, protože příliš dlouhá doba fermentace vede k degradaci sítě lepku a následnému zploštění chleba a pečiva. Nicméně, maximální doba fermentace je také velmi závislá na individuálních vlastnostech použité mouky [103]. Vzhledem k tomu, že prodlužování doby fermentace je při přípravě chlebů v domácí pekárně, u níž už jsou výrobcem přednastavené pečící programy, komplikované, byla studie dále zaměřena na studium vlivu různého obsahu droždí na tvorbu chlebů z chlebových směsí v domácí pekárně a zároveň i na trvanlivost chlebových směsí s obsahem sušeného droždí.

5.2.2.1 Základní směs s různým obsahem droždí

V prvním kroku studie vlivu obsahu droždí na tvorbu chlebů z chlebových směsí v domácí pekárně byl sledován vliv droždí na tvorbu akrylamidu v základní chlebové směsi, která byla společností Mäspoma s.r.o. připravena pro tento experiment. Byla tvořena pouze 4 základními složkami směsi: pšeničná mouka, žitná mouka, sůl a droždí. Pro experiment tak byla použita základní směs, základní směs s poloviční obsahem droždí a základní směs bez droždí.

Z Tab. 17 je patrné, že se snižujícím se obsahem droždí narůstá obsah akrylamidu ve finálním výrobku. Při snížení obsahu droždí na polovinu se obsah akrylamidu ve výrobku zdvojnásobil, ale při úplném vynechání droždí se obsah akrylamidu zvýšil až 12x. Z tohoto důvodu bylo provedeno stanovení obsahu asparaginu v základní směsi s různým obsahem droždí (Tab. 18), v těstě po jeho vykynutí (Tab. 19).

Tab. 17: Obsah akrylamidu (µg/kg) v kůrce chlebů připravených ze základní směsi s různým obsahem droždí

	AA
Základní směs	12 ± 7
Základní směs s ½ obsahem droždí	29 ± 5
Základní směs bez droždí	151 ± 15

Z obsahu asparaginu v sypké směsi a následně v těstě po kynutí lze vidět, že působením kvasinek došlo ke spotřebě téměř veškerého asparaginu. Zajímavé je, že k poklesu obsahu

asparaginu došlo i v těstě základní směsi bez droždí, což mohlo být dáno pochody probíhajícími v těstě při jeho udržování v podmínkách pro kynutí.

Tab. 18: Obsah aminokyselin (mg/kg) v sypké směsi s různým obsahem droždí

	Asn	**Asp**	**Gln**	**Glu**
Základní směs	172 ± 6	220 ± 10	61 ± 2	225 ± 12
Základní směs s ½ obsahem droždí	185 ± 5	276 ± 14	82 ± 4	210 ± 11
Základní směs bez droždí	190 ± 4	283 ± 8	70 ± 3	159 ± 4

Hodnoty obsahu asparaginu v těstě po kynutí korelují s výsledky obsahu akrylamidu v hotovém výrobku (korelační koeficient 1,00). Lze tedy říci, že obsah akrylamidu ve fermentovaném výrobku je dán obsahem droždí.

Tab. 19: Obsah aminokyselin (mg/kg) v těstě připravených ze základní směsi s různým obsahem droždí po fermentaci

	Asn	**Asp**	**Gln**	**Glu**
Základní směs	4 ± 1	11 ± 1	33 ± 4	60 ± 6
Základní směs s ½ obsahem droždí	9 ± 1	64 ± 3	28 ± 1	33 ± 2
Základní směs bez droždí	83 ± 5	128 ± 9	49 ± 6	31 ± 2

Současně byly sledovány i kvalitativní parametry chlebů (Tab. 20) připravených ze základní směsi, které by mohly být ovlivněny různým obsahem droždí. U aktivity vody těst nedošlo k významné změně jejich hodnot vlivem obsahu droždí ve směsi. Naopak v případě pH je patrné, že se snižujícím se obsahem droždí ve směsi se hodnota pH těsta po fermentaci zvyšovala. Tyto hodnoty pH korelují i s obsahem akrylamidu v hotovém chlebu (korelační koeficient 1,00), což se shoduje s výsledky publikovaných studií, v nichž bylo zjištěno, že snížením pH lze minimalizovat tvorbu akrylamidu [121, 122].

Vlhkost hotového výrobku se s poklesem obsahu droždí lehce zvýšila. V případě měrného objemu došlo při nepoužití droždí ve směsi k předpokládanému snížení, protože v nepřítomnosti kvasinek nedošlo k produkci CO_2, čímž se v těstě tvoří plynné póry a nedochází tak ke kypření těst a zvětšování jeho objemu [189].

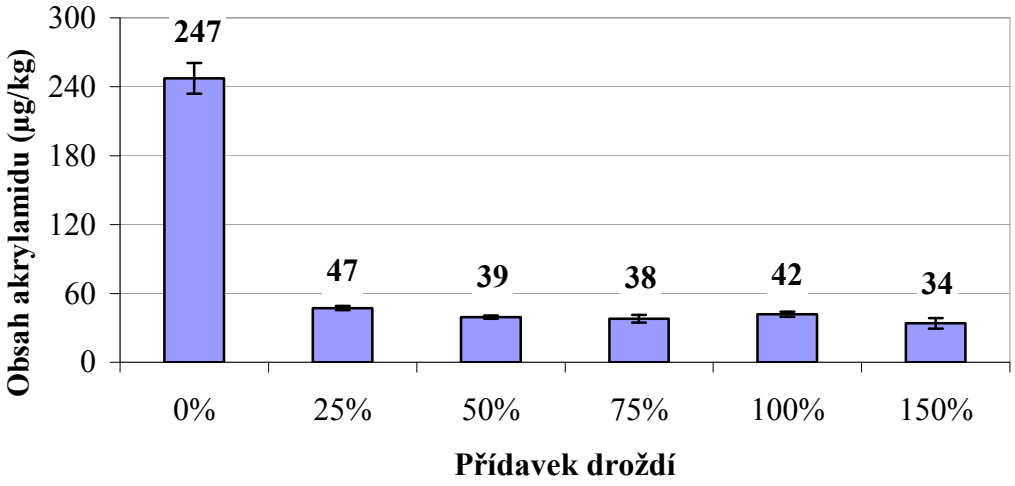
Tab. 20: Parametry chlebů připravených ze základní směsi s různým obsahem droždí

	Těsto		Chléb	
	pH po fermentaci	**aw po fermentaci**	**Měrný objem (cm^3/100 g)**	**Vlhkost (%)**
Základní směs	5,47 ± 0,01	0,969 ± 0,011	347	34
Základní směs s ½ obsahem droždí	5,53 ± 0,02	0,958 ± 0,002	340	37
Základní směs bez droždí	5,97 ± 0,01	0,960 ± 0,005	160	39

5.2.2.2 Bramborový chléb s různým obsahem droždí

Vzhledem k tomu, že aplikace droždí v různé koncentraci do základní směsi se jevila jako možný způsob eliminace akrylamidu v chlebu, byl tento experiment zopakován s reálnou chlebovou směsí Mäspomix. Pro přípravu chleba byla použita směs pro bramborový chléb, u něhož byl stanoven nejvyšší obsah akrylamidu v kůrce. Pro experiment byly použity chlebové směsi z jedné šarže, u nichž byl postupně upravován obsah droždí (0, 25, 50, 75, 100 a 150 % z obsahu droždí v původní receptuře).

Výsledky stanovení obsahu akrylamidu v kůrce bramborového chlebu s různým obsahem droždí (Obr. 6) ukázaly, že již při 25 % obsahu droždí došlo ke snížení obsahu akrylamidu o přibližně 80 %. Při aplikaci droždí v 50 % obsahu z původní receptury klesl obsah akrylamidu o dalších 5 %, ale dalším zvyšováním obsahu droždí už se obsah akrylamidu v kůrce chlebu neměnil, což mohlo být způsobeno úplným vyčerpáním asparaginu z těsta kvasinkami během fermentace.



Obr. 6: Obsah akrylamidu (µg/kg) v kůrce bramborového chlebu s různým obsahem droždí

Stanovení obsahu aminokyselin v těstě před kynutím a po kynutí (Tab. 21) ukázalo, že se zvyšujícím se obsahem droždí ve směsi klesá obsah aminokyselin v těstě po kynutí, protože během fermentace jsou aminokyseliny kvasinkami spotřebovávány. Zvláště asparagin je téměř úplně vyčerpán už při 50 % obsahu droždí a jeho obsah v těstě se se zvyšujícím se obsahem droždí už nijak výrazně neměnil. Tyto výsledky obsahu asparaginu tak odpovídají hodnotám obsahu akrylamidu v kůrce chlebu po upečení, na jehož obsahu se také mohly podílet svou činností fermentující bakterie, jak již bylo zmíněno dříve.

Tab. 21: Obsah aminokyselin (mg/kg) v těstě bramborového chleba s různým obsahem droždí

Obsah droždí		Asn	Asp	Gln	Glu
0 %	před kynutím	145 ± 15	76 ± 8	79 ± 7	46 ± 5
	po kynutí	170 ± 26	93 ± 13	100 ± 14	42 ± 7
25 %	před kynutím	119 ± 15	66 ± 10	84 ± 12	54 ± 6
	po kynutí	6 ± 1	48 ± 4	21 ± 3	51 ± 6
50 %	před kynutím	125 ± 13	70 ± 8	90 ± 12	66 ± 8
	po kynutí	5 ± 1	11 ± 3	29 ± 7	23 ± 5
75 %	před kynutím	133 ± 10	78 ± 4	110 ± 6	100 ± 9
	po kynutí	7 ± 1	8 ± 1	71 ± 4	32 ± 1
100 %	před kynutím	96 ± 8	69 ± 5	110 ± 11	107 ± 11
	po kynutí	5 ± 1	4 ± 1	41 ± 8	29 ± 2
150 %	před kynutím	131 ± 3	83 ± 2	113 ± 40	106 ± 21
	po kynutí	5 ± 1	4 ± 1	40 ± 1	21 ± 1

Použití různého obsahu droždí ve směsi bramborového chleba se také projevilo v hodnotách pH těsta (Tab. 22), kdy se již před kynutím pH těsta snižovalo se zvyšujícím se obsahem droždí a tento pokles je ještě výraznější u hodnot pH těsta po vykynutí. Z toho vyplývá, že obsah akrylamidu v hotovém chlebu mohl být snížen i poklesem pH těsta, což je také důležitý faktor ovlivňující tvorbu akrylamidu [121, 122].

Vliv různého obsahu droždí na kvalitativní parametry bramborového chleba (Tab. 22) byl pozorován u měrného objemu a výšky chleba, protože přítomností kvasinek dochází ke kypření těsta a narůstání jeho objemu, k čemuž v nepřítomnosti droždí nedošlo. Měrný objem

a výška chleba se s 25 % - 100 % obsahem droždí nijak významně nelišili, až při 150 % obsahu droždí došlo k jejich nárůstu.

Tab. 22: pH těst a parametry chlebů připravených ze směsi pro bramborový chléb s různým obsahem droždí

Obsah droždí	Těsto		Chléb	
	pH před kynutím	pH po kynutí	Měrný objem (cm^3/100 g)	Výška (cm)
0 %	5,37 ± 0,01	5,44 ± 0,01	134 ± 11	5,7 ± 0,4
25 %	5,28 ± 0,01	5,07 ± 0,01	354 ± 53	13,5 ± 0,5
50 %	5,24 ± 0,01	5,04 ± 0,01	384 ± 48	13,5 ± 1,3
75 %	5,18 ± 0,01	4,98 ± 0,01	380 ± 1	13,0 ± 0,4
100 %	5,13 ± 0,01	4,95 ± 0,01	367 ± 39	13,3 ± 0,4
150 %	5,12 ± 0,01	4,94 ± 0,01	429 ± 15	14,2 ± 1,7

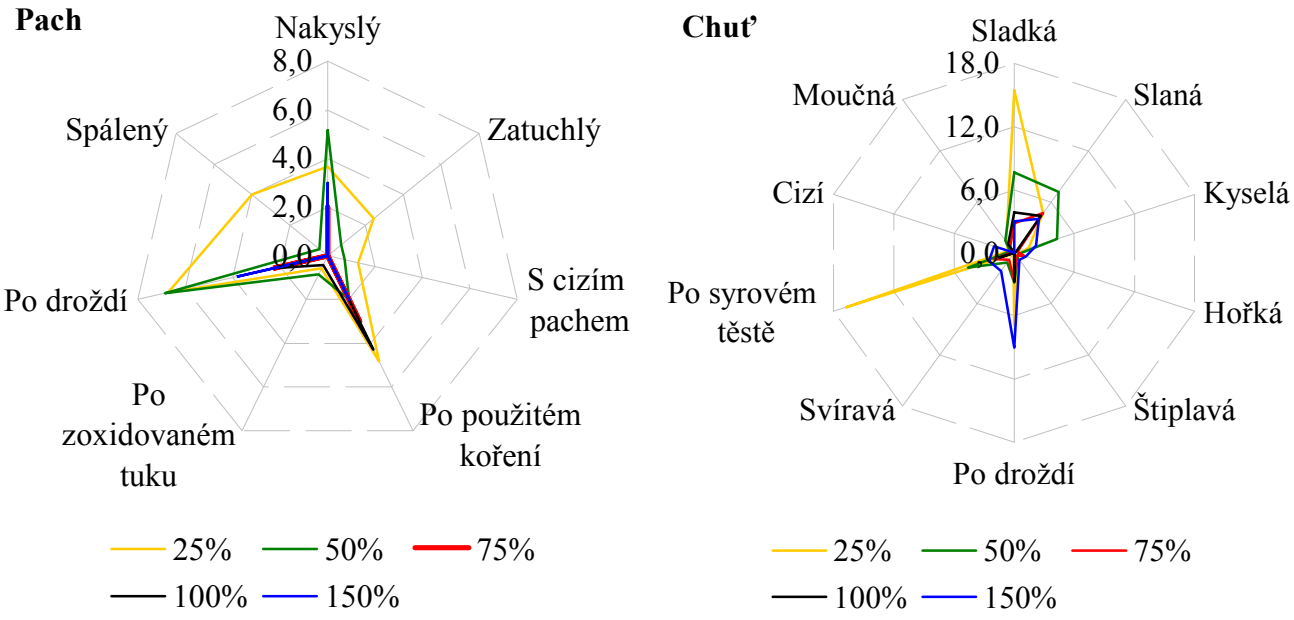
Přítomnost droždí v chlebu také mírně ovlivňuje barvu kůrky (Tab. 23). U barvy kůrky chlebu bez droždí byla naměřena nižší hodnota *a** (podíl žluté a modré barvy) a *b** (podíl červené a zelené barvy), což značí, že na barvě kůrky chlebu bez droždí se více podílela modrá a zelená barva. Rozdíly hodnot jasu (*L**) nebyly úplně jednoznačné, ale výsledky ukazují, že chleby s nižším obsahem droždí byly světlejší.

I když výsledky stanovení obsahu akrylamidu a kvalitativních parametrů chlebů ukázali, že použití 25 % obsahu droždí je dostačující pro dosažení požadovaných parametrů, senzorické hodnocení (Tab. 23) ukázalo, že senzorické kvality přijatelné spotřebitelem dosahují chleby až s obsahem droždí min 75 %. Chléb s 25 % obsahem droždí měl barevně nehomogenní a popraskanou kůrku. Jeho střídka byla vlhká až gumovitá, lepivá a málo pružná. Při 50 % obsahu droždí byl chléb charakterizován podobně jak chléb s 25 % obsahem, i když jeho tvar byl lépe vyklenutý. Chleby se 75, 100 a 150 % obsahem droždí byly při porovnání mezi sebou hodnoceny pozitivně a velmi podobně, kdy byl jim udělen prakticky stejný počet bodů (viz Tab. 23). Tyto chleby byly hodnotiteli popsány jako pěkně klenuté s rovnoměrně zbarvenou kůrkou a pružnou střídkou, avšak mírně lepivou a s nerovnoměrnou pórovitostí.

Tab. 23: Barva kůrky bramborového chleba s různým obsahem droždí vyjádřená v systému CIELab a počet bodů udělených při senzorickém hodnocení

Obsah droždí	*Barevné koordináty kůrky*			Počet bodů senzorického hodnocení
	L*	***a****	***b****	
0 %	68,5 ± 0,7	6,1 ± 0,2	20,6 ± 0,6	-
25 %	58,1 ± 2,8	9,9 ± 1,0	25,8 ± 0,8	69 ± 8
50 %	62,8 ± 1,9	9,3 ± 0,6	27,2 ± 0,4	72 ± 10
75 %	60,6 ± 1,1	9,5 ± 0,6	26,2 ± 0,8	88 ± 6
100 %	65,1 ± 4,0	8,5 ± 1,9	27,3 ± 2,4	88 ± 9
150 %	68,0 ± 1,6	7,2 ± 1,0	27,2 ± 2,2	87 ± 10

Celkový pach byl u všech chlebů vnímán hodnotiteli jako málo výrazný, ale příjemný, po použitém koření. U chlebů s obsahem droždí 25 % a 50 % byla intenzita typického pachu pro daný druh chleba nižší jak 90 %. Byl zde také zaznamenán výraznější nakyslý pach a pach po droždí (Obr. 7). Atributy pachu chlebů se 75 – 150 % obsahem droždí byly celkově hodnoceny jako příjemné, i když u chleba s obsahem droždí 150 % byl v pachu opět intenzivněji vnímán pach po droždí (Obr. 7). Typický chlebový pach chlebů s obsahem droždí 75 – 150 % dosahovala intenzity více jak 90 %.



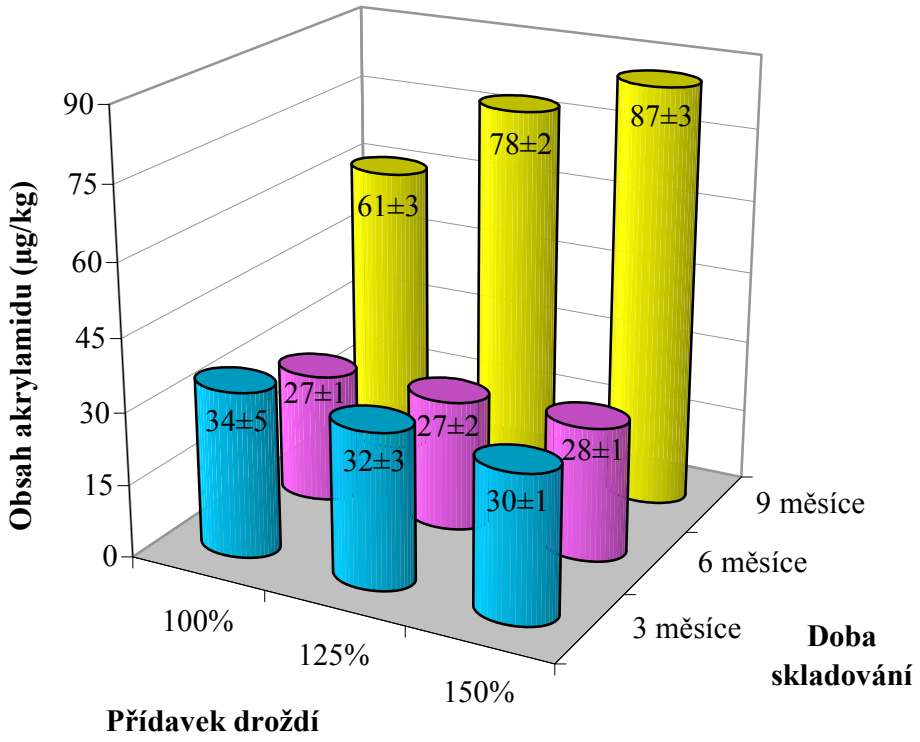
Obr. 7:Intenzita jednotlivých atributů pachu a chuti (%) bramborového chleba s různým obsahem droždí

Intenzity atributů chutě u jednotlivých chlebů byli více méně porovnatelné (Obr. 7), pouze u chleba s 25 % obsahem droždí byla zaznamenána výrazná sladká chuť a chuť po syrovém těstě. Také v případě chlebu se 150 % obsahem droždí byla podobně jako u pachu, vnímána hodnotiteli chuť po droždí, což bylo i zde hodnoceno negativně. Intenzita typické chlebové chuti rostla s rostoucím obsahem droždí, až dosáhla vrcholu (92 %) u chleba se 75 % obsahem droždí a pak začala klesat.

5.2.2.3 Změna aktivity droždí během skladování chlebové směsi

Výsledky předchozí kapitoly ukázaly, že zvýšením obsahu droždí (na 150 %) nedošlo k výrazným negativním změnám kvalitativních parametrů bramborového chleba, ale naopak byly zaznamenány pozitivní změny, například pokles obsahu akrylamidu nebo i větší měrný objem či výška bochníku. Na základě těchto výsledků a vzhledem k problematickému udržení aktivity sušeného droždí a jejímu klesání v průběhu doby trvanlivosti i přes přijatá opatření, což se nepříznivě projevuje na senzorických vlastnostech výrobku, navrhla společnost Mäspoma s.r.o. zvýšení obsahu droždí v chlebové směsi o 25 a 50 % a provedení skladovacího pokusu trvajícího po dobu minimální trvanlivosti směsi. Během tohoto pokusu byl sledován měnící se účinek různého obsahu droždí na obsah akrylamidu v chlebě a na jeho kvalitativní parametry s prodlužující se dobou skladování směsi. Cílem tohoto pokusu bylo vhodně zvolit navýšení obsahu droždí ve směsi, které by mohlo zajistit dostatečnou aktivitu droždí po celou dobu trvanlivosti a tím uchování kvalitativních parametrů hotových chlebů.

Výsledky obsahu akrylamidu v kůrce slunečnicového chleba měnící se s dobou skladování směsi s různým obsahem droždí je uveden na Obr. 8. Z hodnot vyplývá, že po 3 a 6 měsících od výroby chlebové směsi, byl obsah akrylamidu v kůrce hotových chlebů porovnatelný. Ovšem při skladování směsi 9 měsíců se obsah akrylamidu v kůrce slunečnicového chleba výrazně zvýšil (min. na dvojnásobek), přičemž jeho obsah se zvyšoval se zvyšujícím se obsahem droždí v chlebové směsi. Tyto výsledky tak naznačují, že asparagin nebyl kvasinkami v průběhu kynutí spotřebován.



Obr. 8: Změna obsahu akrylamidu v kůrce slunečnicového chlebu s různým obsahem droždí vlivem doby skladování směsi

Stanovení obsahu aminokyselin v směsích slunečnicového chleba s různým obsahem droždí (Tab. 24) ukázalo, že skladováním se obsah kyseliny asparagové ve směsi nijak neměnil a obsah asparaginu a glutaminu kles jen minimálně. Pouze v případě kyseliny glutamové dochází k postupnému nárůstu jejího obsahu, a to až o 1/3.

Stejně tak tomu je i při stanovení obsahu aminokyselin v těstě po jeho vymíchání a ještě před kynutím (Tab. 25). I zde se obsah kyseliny asparagové a asparaginu vlivem skladování směsi slunečnicového chleba s různým obsahem droždí nezměnil. Ani v případě kyseliny glutamové nebyly zaznamenány významné rozdíly v jejím obsahu v těstě vlivem dlouhodobého skladování směsi, i když její stanovení v samotné směsi ukázalo nárůst jejího obsahu s prodlužující se dobou skladování. Naopak u obsahu glutaminu je patrný jeho nárůst v těstě, který se po 9 měsících skladování navýšil přibližně na dvojnásobek oproti obsahu v těstech připravených po 3 a 6 měsících skladování.

Tab. 24: Změna obsahu aminokyselin (mg/kg) ve směsi slunečnicového chleba s různým obsahem droždí během skladování

Přídavek droždí	Doba skladování	Asn	Asp	Gln	Glu
100 %	3 měsíce	130 ± 3	174 ± 3	46 ± 1	274 ± 4
	6 měsíců	124 ± 3	166 ± 6	34 ± 1	313 ± 27
	9 měsíců	126 ± 4	175 ± 5	37 ± 3	356 ± 18
125 %	3 měsíce	131 ± 4	173 ± 6	45 ± 3	324 ± 25
	6 měsíců	127 ± 2	165 ± 2	37 ± 1	346 ± 18
	9 měsíců	121 ± 4	165 ± 1	36 ± 2	406 ± 36
150 %	3 měsíce	140 ± 2	186 ± 1	52 ± 1	397 ± 10
	6 měsíců	131 ± 5	169 ± 7	37 ± 2	396 ± 37
	9 měsíců	124 ± 2	172 ± 8	39 ± 1	490 ± 12

Tab. 25: Obsah aminokyselin (mg/kg) v těstě slunečnicového chleba s různým obsahem droždí před kynutím ovlivněný dobou skladování chlebové směsi

Přídavek droždí	Doba skladování	Asn	Asp	Gln	Glu
100 %	3 měsíce	49 ± 1	63 ± 1	24 ± 2	93 ± 3
	6 měsíců	40 ± 5	53 ± 6	18 ± 2	78 ± 9
	9 měsíců	47 ± 4	62 ± 7	52 ± 6	101 ± 12
125 %	3 měsíce	43 ± 3	53 ± 5	25 ± 2	115 ± 11
	6 měsíců	38 ± 1	50 ± 2	20 ± 2	85 ± 2
	9 měsíců	43 ± 1	58 ± 1	49 ± 2	108 ± 1
150 %	3 měsíce	44 ± 6	68 ± 8	21 ± 2	112 ± 16
	6 měsíců	50 ± 5	72 ± 5	37 ± 2	142 ± 15
	9 měsíců	48 ± 2	63 ± 4	60 ± 4	134 ± 7

Pro tvorbu akrylamidu je ale rozhodující obsah asparaginu v těstě po jeho kynutí. Jak je vidět z Tab. 26 po skladování směsí 3 a 6 měsíců byly během fermentace aminokyseliny kvasinkami spotřebovávány. Ovšem po skladování směsí s různým obsahem droždí 9 měsíců už se obsah aminokyselin v těstě po kynutí nezměnil. Pouze u těsta ze směsi s obsahem 150 %

droždí byl zaznamenán mírný úbytek obsahu aminokyselin po fermentaci v porovnání s těstem před jeho kynutím (Tab. 25). Výsledky tak ukazují, že skladováním směsi dochází k postupnému inaktivování kvasinek, které se nedaří odstranit ani zvýšením obsahu droždí ve směsi. Je tedy vhodné buď upravit minimální dobu trvanlivosti, nebo nalézt jiný způsob, který by zajistil udržení aktivity droždí po celou dobu trvanlivosti.

Tab. 26: Obsah aminokyselin (mg/kg) v těstě slunečnicového chleba s různým obsahem droždí po kynutí ovlivněný dobou skladování chlebové směsi

Přídavek droždí	Doba skladování	Asn	Asp	Gln	Glu
100 %	3 měsíce	2 ± 1	3 ± 1	19 ± 2	15 ± 1
	6 měsíců	2 ± 1	4 ± 1	24 ± 2	15 ± 2
	9 měsíců	40 ± 2	62 ± 2	48 ± 3	98 ± 8
125 %	3 měsíce	2 ± 1	2 ± 1	17 ± 2	13 ± 2
	6 měsíců	2 ± 1	3 ± 1	17 ± 3	15 ± 2
	9 měsíců	47 ± 1	67 ± 1	64 ± 6	121 ± 4
150 %	3 měsíce	3 ± 1	4 ± 1	16 ± 1	19 ± 1
	6 měsíců	4 ± 1	5 ± 1	22 ± 2	25 ± 2
	9 měsíců	36 ± 5	56 ± 5	32 ± 3	81 ± 11

Porovnání výsledků stanovení obsahu asparaginu v těstě po kynutí s obsahem akrylamidu v hotových chlebech ukázalo, že obsah akrylamidu v kůrce chlebů s různým obsahem droždí byl dán obsahem asparaginu v těstě před pečením (korelační koeficient 0,94), jehož obsah byl dán aktivitou kvasinek při fermentaci. Zajímavé je, že i přes inaktivaci kvasinek ve směsi skladované 9 měsíců a tím neměnnosti obsahu asparaginu v těstě po kynutí, se obsah akrylamidu v kůrce chlebů zvyšoval se zvyšujícím se obsahem droždí ve směsi, přičemž obsah asparaginu v těstě před pečením byl stejný bez ohledu na obsah droždí ve směsi. Nárůst obsahu akrylamidu se rostoucím obsahem droždí lze vysvětlit tím, že v průběhu pečení dochází k rozkladu kvasinek na látky, které mohou tvorbu akrylamidu v chlebech podpořit.

Kromě vlivu skladování na obsah aminokyselin ve směsích s různým obsahem droždí a tvorbu akrylamidu v chlebech z nich připravených, byly sledovány i změny pH těst a parametry hotových chlebů (Tab. 27). Hodnoty pH těst ukazují, že fermentací dochází k poklesu pH těst, ale zvyšováním obsahu droždí ve směsi nejsou hodnoty pH ovlivňovány.

Avšak s prodlužující se dobou skladování směsi se hodnoty pH těst zvyšují. Jak je vidět v Tab. 27, hodnoty pH těst připravených ze směsí s různým obsahem droždí skladovaných 3 a 6 měsíců se od sebe nijak významně neliší, kdežto u těst ze směsí skladovaných 9 měsíců byly stanoveny hodnoty pH vyšší. Výsledky poukazují na to, že poklesem aktivity kvasinek ve směsi nedochází k tak velkému poklesu pH před a po kynutí těsta, což může mít také vliv na tvorbu akrylamidu v hotovém chlebu.

Tab. 27: pH těst a parametry hotových slunečnicových chlebů s různým obsahem droždí ovlivněné dobou skladování chlebových směsí

Přídavek droždí	Doba skladování	Těsto		Chléb	
		pH před kynutím	pH po kynutí	Měrný objem (cm^3/100 g)	Výška (cm)
100 %	3 měsíce	4,87 ± 0,01	4,66 ± 0,01	360	13,3
	6 měsíců	4,85 ± 0,01	4,67 ± 0,01	372	13,3
	9 měsíců	4,91 ± 0,01	4,79 ± 0,01	318	10,7
125 %	3 měsíce	4,87 ± 0,01	4,61 ± 0,02	362	12,0
	6 měsíců	4,84 ± 0,01	4,66 ± 0,01	362	11,4
	9 měsíců	4,92 ± 0,01	4,75 ± 0,02	341	11,5
150 %	3 měsíce	4,88 ± 0,01	4,61 ± 0,02	359	12,5
	6 měsíců	4,80 ± 0,01	4,63 ± 0,01	351	12,0
	9 měsíců	4,93 ± 0,01	4,82 ± 0,01	346	12,3

Výška slunečnicových chlebů (Tab. 27) nebyla nijak významně ovlivněna různým obsahem droždí a dobou skladování směsí. Pouze u chleba připraveného ze směsi s obsahem droždí 100 % a skladované 9 měsíců byla zaznamenána nižší výška bochníku. Různý obsah droždí a doba skladování směsi také nijak významně neovlivnili měrný objem chlebů připravených ze směsí skladovaných 3 a 6 měsíců. Avšak v případě chlebů s různým obsahem droždí připravených po 9 měsících skladování směsi byl zaznamenán pokles měrného objemu. Tyto výsledky tak potvrzují, že dlouhodobým skladováním směsí klesá aktivita kvasinek, a to bez ohledu na zvýšení obsahu droždí ve směsi.

Na barvu kůrky slunečnicových chlebů neměl zvyšujícím se obsahem droždí ve směsi nijak výrazný vliv, ale byly zaznamenány její změny vlivem doby skladování směsí (Tab. 28). Tyto změny jsou velmi výrazné především u hodnot jasu (L^*), kdy s prodlužující se dobou skladování tyto hodnoty klesaly, což znamenalo, že chleby měly tmavší kůrku. U hodnot a^*

(podíl žluté a modré barvy) byl naopak s prodlužující se dobou skladování zaznamenán jejich mírný nárůst. Hodnoty *b** (podíl červené a zelené barvy) se vlivem skladování směsi nijak významně neměnily.

Tab. 28: Barva kůrky slunečnicových chlebů s různým obsahem droždí vyjádřená v systému CIELab ovlivněná dobou skladování chlebových směsí

Přídavek droždí	**Doba skladování**	***L****	***a****	***b****
100 %	3 měsíce	60,0 ± 1,7	10,0 ± 0,6	28,7 ± 0,3
	6 měsíců	58,1 ± 0,8	10,7 ± 0,3	29,8 ± 0,2
	9 měsíců	54,2 ± 0,5	11,9 ± 0,2	29,3 ± 0,2
125 %	3 měsíce	60,9 ± 2,4	9,4 ± 0,9	27,6 ± 0,5
	6 měsíců	59,8 ± 1,2	9,8 ± 0,4	28,8 ± 0,3
	9 měsíců	53,8 ± 0,7	11,9 ± 0,2	28,1 ± 0,3
150 %	3 měsíce	60,3 ± 1,5	9,6 ± 0,6	28,3 ± 0,6
	6 měsíců	59,5 ± 0,7	9,8 ± 0,3	29,1 ± 0,2
	9 měsíců	51,7 ± 0,4	12,7 ± 0,1	29,2 ± 0,2

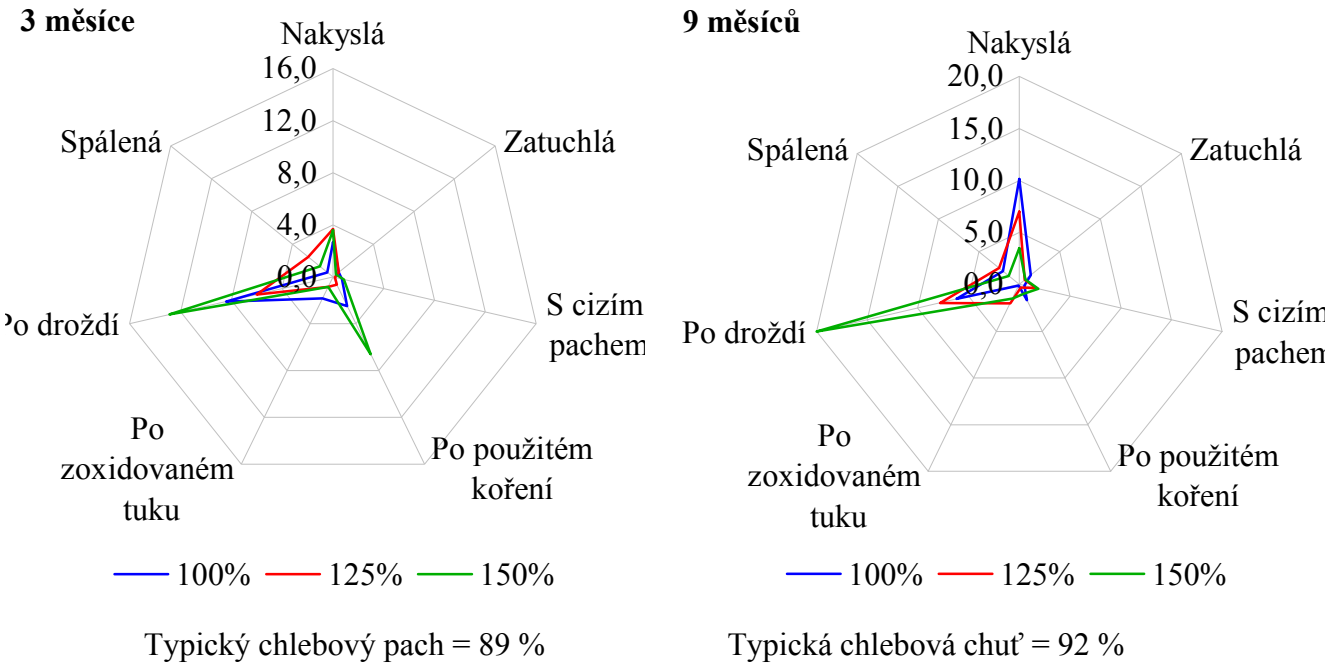
Kromě vlivu doby skladování a různého obsahu droždí ve směsi na kvalitativní parametry slunečnicových chlebů (barva, měrný objem,…) byla sledována i jejich senzorická kvalita na začátku a na konci skladovacího pokusu (Tab. 29).

Tab. 29: Vliv doby skladování na senzorickou kvalitu slunečnicového chleba s různým obsahem droždí

Přídavek droždí	**Doba skladování**	**Počet bodů senzorického hodnocení**
100 %	3 měsíce	88 ± 8
	9 měsíců	77 ± 10
125 %	3 měsíce	87 ± 6
	9 měsíců	72 ± 12
150 %	3 měsíce	90 ± 5
	9 měsíců	69 ± 8

Senzorické hodnocení ukázalo, že slunečnicové chleby připravené ze směsí skladovaných 9 měsíců byly hodnoceny hůře než chleby ze směsí skladovaných pouze 3 měsíce. Podle hodnotitelů měli chleby připravené ze směsí po 9 měsících skladování hutnou, vlhkou střídku a také tmavou kůrku. Současně výsledky senzorického hodnocení ukázaly, že různý obsah droždí nijak významně neovlivnil senzorické hodnocení slunečnicových chlebů.

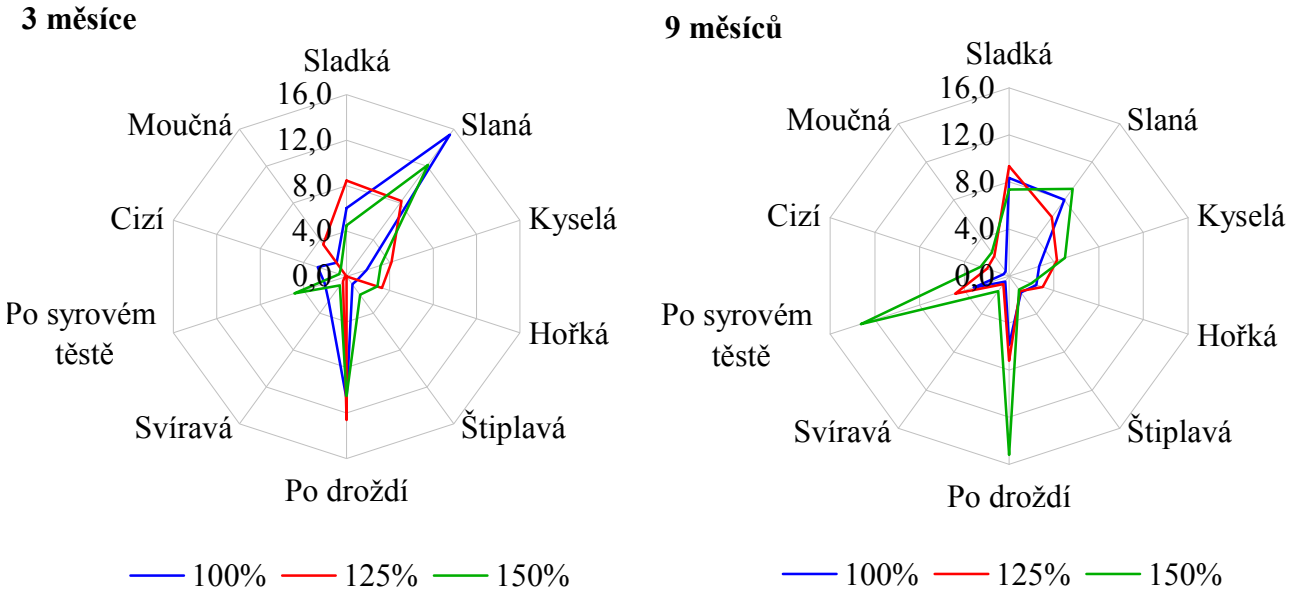
Typický chlebový pach slunečnicových chlebů s různým obsahem droždí po 3 měsících skladování směsi dosahovala intenzity 88 - 95 %. Avšak při skladování směsí 9 měsíců klesla její intenzita na 66 – 85 %, přičemž její intenzita po 9 měsících skladování klesala u chlebů se zvyšujícím se obsahem droždí. Při porovnání změn intenzity atributů pachu slunečnicových chlebů s různým obsahem droždí (Obr. 9) je zřejmé, že chleby připravené ze směsí až po 9 měsících měli výrazněji nakyslý pach. V případě chlebu se 150 % obsahem droždí z původní receptury byl také po 9 měsících skladování směsi výrazněji vnímán pach po droždí.



Obr. 9: Změna intenzity jednotlivých atributů pachu (%) slunečnicového chleba s různým obsahem droždí vlivem doby skladování

Intenzita typické chlebové chuti se u chlebů připravených ze směsí skladovaných 3 měsíce pohybovala okolo 85 – 90 %. Skladováním směsi 9 měsíců intenzita typické chlebové chuti hotového chleba klesla na 74 – 88 %. Podobně jako u pachu i zde intenzita typické chlebové chuti klesala s rostoucím obsahem droždí. Odlišnosti intenzity atributů chutě slunečnicových

chlebů připravených ze směsí skladovaných 3 a 9 měsíců (Obr. 10) byli patrné především u slané chuti, jejíž intenzita prodloužením doby skladování o 6 měsíců klesla přibližně na polovinu. Také intenzita chuti po droždí se skladováním směsi snížila. Naopak u chleba se 150 % obsahem droždí z původní receptury došlo k zintenzivnění chuti po droždí a současně narostla i intenzita chuti po syrovém těstě.



Obr. 10: Změna intenzity jednotlivých atributů chutě (%) slunečnicového chleba s různým obsahem droždí vlivem doby skladování

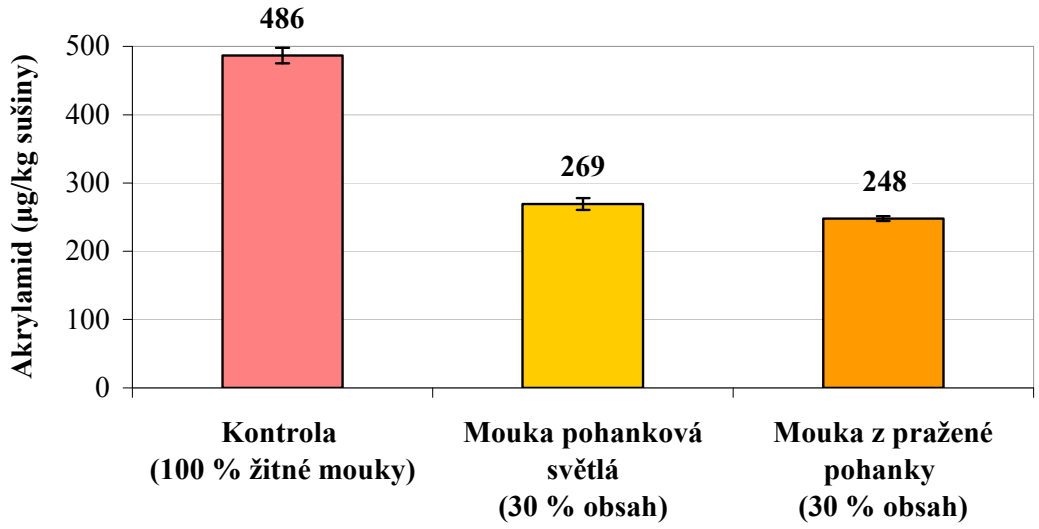
Jak ukazují výsledky stanovení obsahu akrylamidu v slunečnicovém chlebu s různým obsahem droždí a rozdílnou dobou skladování, zvyšování obsahu droždí v chlebové směsi se nejeví jako vhodný způsob zajištění kvality chleba. Nejenže zvýšení obsahu droždí nezajistilo požadovanou aktivitu droždí po celou dobu trvanlivosti, ale vedlo i ke zvyšování obsahu akrylamidu v chlebu po inaktivaci droždí. Vyšší obsah droždí v chlebové směsi se s prodloužením doby skladování projevil i na senzorické kvalitě z ní připravovaných chlebů, kdy vedl k poklesu intenzity typického chlebového pachu a chuti a zvýraznění dalších jejich spotřebitelem nežádoucích atributů v porovnání s chlebem s původním obsahem droždí.

5.3 Vliv aplikace antioxidantů na eliminaci akrylamidu v perníkách

Perníky jsou sladké cereální výrobky typické pro řadu evropských zemí, které představují významný zdroj expozice akrylamidem ze stravy kvůli jeho relativně vysokému obsahu. Jednou z hlavních výzev, které čelí potravinářský průmyslu, je ale požadavek vyvíjet výrobky s příznivým účinkem na zdraví spotřebitele.

5.3.1 Dopad nahrazení žitné mouky pohankovou moukou

V posledních letech se objevují nové potraviny s obsahem bioaktivních látek s antioxidačními vlastnostmi. V důsledku toho vzrostl zájem především o pohanku (*Fagopyrum esculentum*), díky vysokému obsahu antioxidantů (obzvláště rutinu), a o její produkty [194, 195, 196]. S ohledem na tyto požadavky byl v této kapitole sledován vliv náhrady 30 % podílu žitné mouky pohankovou moukou v receptuře perníku na tvorbu akrylamidu, přičemž byly použity dva různé druhy pohankové mouky. Prvním byla světlá pohanková mouka vyrobená z neloupané pohanky obecné (*Fagopyrum esculentum Moench*) na ekologické farmě, zatímco druhá byla získána pomletím pražených pohankových krup.



Obr. 11: Obsah akrylamidu v perníkách v závislosti na použité mouce

V perníkách, které obsahovaly pouze žitnou mouku, byl obsah akrylamidu 486 µg/kg sušiny (viz Obr. 11). Při nahrazení 30 % podílu žitné mouky v receptuře perníku pohankovou moukou došlo k poklesu obsahu akrylamidu téměř o polovinu. Při použití světlé pohankové mouky byl obsah akrylamidu v perníkách snížen o 45 % a při aplikaci mouky z pražené pohanky to bylo o 49 %. Tyto výsledky jsou ve shodě se studií Capuana *et al.* [91], kteří

uvádí, že druh mouky významně ovlivňuje produkty Maillardovy reakce. Autoři zjistili, že celozrnné a žitné mouky mohou přispět k tvorbě akrylamidu mnohem více než mouky pšeničné, vzhledem k jejich vyššímu obsahu volného asparaginu, jako klíčového prekurzoru akrylamidu, a také díky vyššímu obsahu vlákniny a popela [91].

Tab. 30: Obsah aminokyselin (mg/kg) v různých moukách

	Asn	**Asp**	**Gln**	**Glu**
Mouka pšeničná	135 ± 4	124 ± 5	60 ± 2	32 ± 2
Mouka žitná	383 ± 6	468 ± 13	73 ± 1	298 ± 5
Mouka pohanková světlá	39 ± 1	161 ± 6	37 ± 1	248 ± 4
Mouka z pražené pohanky	40 ± 1	181 ± 6	< 1	186 ± 5

Následně byl tedy stanovován obsah asparaginu a dalších důležitých aminokyselin v moukách (Tab. 30) a těstech (Tab. 31). Analýza aminokyselin ukázala, že pohankové mouky obsahují jen velmi málo asparaginu (přibližně 40 mg/kg) v porovnání s žitnou moukou (383 mg/kg). Navíc je z výsledků patrné, že pražení pohanky nijak významně neovlivňuje obsah asparaginu a ani vznik akrylamidu v perníkách.

Tab. 31: Obsah aminokyselin (mg/kg) v těstech připravených z různých muk

	Asn	**Asp**	**Gln**	**Glu**
Těsto se 100 % obsahem žitné mouky	160 ± 16	214 ± 19	29 ± 1	122 ± 11
Těsto s 30 % obsahem světlé pohankové mouky	126 ± 8	183 ± 19	39 ± 7	131 ± 3
Těsto s 30 % obsahem mouky z pražené pohanky	111 ± 11	165 ± 16	36 ± 4	117 ± 11

Pří nahrazení 30 % podílu žitné mouky v těstě pohankovou moukou klesl celkový obsah asparaginu v těstě v průměru o 25 % (Tab. 31), což vedlo k téměř 50 % snížení obsahu akrylamidu. Tento výrazný pokles obsahu akrylamidu v perníku mohl být kromě snížení obsahu asparaginu v těstě způsoben i látkami přítomnými v pohance, jako je rutin, kvercetin, isoorientin a další, které účinně snižují oxidační stres buněk [197]. Úloha antioxidantů v ochraně zdraví je velmi složitá a její mechanismus nebyl doposud uspokojivě vysvětlen a zůstává z části hypotetický, přesto by mechanismus působení antioxidantů při tvorbě

akrylamidu mohl být podobný jako při bránění oxidace, tj. úkolem antioxidantu je přerušit radikálové reakce vedoucí ke vzniku akrylamidu [198].

5.3.2 Vliv koření na tvorbu akrylamidu v perníčkách z pohankové mouky

Antioxidanty, jako jsou fenolické sloučeniny, flavonoidy, vitamíny a fenolické extrakty různých koření, mohou inhibovat tvorbu akrylamidu [122, 154, 150, 160, 161]. Podle studie Ciesarové *et al.* [156] antioxidační aktivita extraktů některých koření souvisí s tvorbou akrylamidu v modelové matrici potravin. Cílem této studie tak bylo posoudit vliv vybraných druhů koření na obsah akrylamidu v perníkách s přídavkem pohankové mouky s ohledem na jejich antioxidační aktivitu. Koření (hřebíček, skořice, nové koření, bílý pepř, koriandr, badyán, anýz, fenykl, muškátový oříšek, kardamom, vanilka, zázvor a komerční směs pro přípravu perníku), jako součást receptury perníků z pohankové mouky, byla hodnocena jako možné urychlovače nebo inhibitory tvorby akrylamidu.

Před aplikací koření do perníků s pohankou, byla nejprve u každého koření stanovena antioxidační aktivita vzhledem k předpokládanému vztahu k tvorbě akrylamidu. Antioxidační aktivita koření byla stanovována v extraktech ethanol/voda (φ_r = 1:1) DPPH• testem. Výsledky ukázaly (viz Tab. 32), že kořením s nejvyšší antioxidační aktivitou byla skořice (972 ± 1 μmolTrolox/g) a druhým badyán (260 ± 17 μmolTrolox/g). Nižší antioxidační kapacita byla pozorována u muškátového oříšku (92 ± 10 μmolTrolox/g) a nového koření (86 ± 8 μmolTrolox/g). U ostatních druhů koření byla stanovena antioxidační aktivita nižší jak 50 μmolTrolox/g.

V dalším kroku, byl sledován vliv koření na obsah akrylamidu v perníku se světlou pohankovou moukou nebo moukou z pražené pohanky. Účinky koření na obsah akrylamidu v perníku byly porovnány s perníkem bez přídavku koření. Jak je vidět z výsledků uvedených v Tab. 32, vliv jednotlivých druhů koření na obsah akrylamidu se v perníkách se světlou pohankovou moukou nebo moukou z pražené pohanky lišil. Při aplikaci fenyklu, anýzu nebo vanilky do perníku se světlou pohankovou moukou byla účinnost snížení obsahu akrylamidu (o 21 %, 17 % a 11 % v uvedeném pořadí) v nich porovnatelná se snížením obsahu akrylamidu v perníkách s moukou z pražené pohanky (o 18 %, 19 % a 9 % v uvedeném pořadí). Ani při použití badyánu nebyly zaznamenány změny v jeho vlivu na obsah akrylamidu u perníků se světlou pohankovou moukou nebo moukou z pražené pohanky.

Pozitivní změny v působení koření na obsah akrylamidu byly zaznamenány při přidání bílého pepře nebo nového koření do perníku s moukou z pražené pohanky. Aplikací bílého pepře nebo nového koření do perníku s moukou z pražené pohanky došlo ke zvýšení poklesu obsahu akrylamidu na 16 % a 11 % (v uvedeném pořadí) v porovnání s perníky se světlou pohankovou moukou, kde bylo aplikací bílého pepře dosaženo snížení pouze o 9 % a nové koření nemělo na obsah akrylamidu vliv. Naproti tomu u perníků s moukou z pražené pohanky s hřebíčkem nebyl pokles obsahu akrylamidu tak výrazný (pouze o 8 %) na rozdíl od perníku se světlou pohankovou moukou s hřebíčkem (pokles o 17 %) a dokonce u perníků s moukou z pražené pohanky s muškátovým oříškem nedošlo ke změně obsahu akrylamidu vůbec v porovnání s perníkem se světlou pohankovou moukou, kde aplikací muškátového oříšku bylo dosaženo nejvýraznějšího snížení obsahu akrylamidu (≈ 23 %).

Tab. 32: Vliv jednotlivých druhů koření na obsah akrylamidu v perníkách se světlou pohankovou moukou nebo s moukou z pražené pohanky

Koření	**Antioxidační aktivita (µmolTrolox/g)**	**Perníky se světlou pohankovou moukou**		**Perníky s moukou z pražené pohanky**	
		Akrylamid (µg/kg sušiny)	Změna (%)	Akrylamid (µg/kg sušiny)	Změna (%)
Kontrola (bez koření)	–	269 ± 9	–	248 ± 3	–
Muškátový oříšek	92 ± 10	208 ± 5	↓ **23**	261 ± 18	žádná
Fenykl	37 ± 1	212 ± 7	↓ **21**	293 ± 2	↓ **18**
Anýz	37 ± 3	222 ± 5	↓ **17**	200 ± 3	↓ **19**
Hřebíček	47 ± 1	223 ± 15	↓ **17**	228 ± 11	↓ **8**
Vanilka	25 ± 1	238 ± 15	↓ **11**	225 ± 2	↓ **9**
Kardamom	21 ± 1	245 ± 2	↓ **9**	316 ± 7	↑ **27**
Bílý pepř	18 ± 2	246 ± 7	↓ **9**	209 ± 3	↓ **16**
Zázvor	34 ± 1	255 ± 5	žádná	370 ± 13	↑ **49**
Badyán	260 ± 17	270 ± 5	žádná	239 ± 11	žádná
Nové koření	85 ± 8	277 ± 2	žádná	221 ± 8	↓ **11**
Koriandr	16 ± 1	318 ± 2	↑ **18**	382 ± 25	↑ **54**
Skořice	972 ± 1	346 ± 12	↑ **29**	296 ± 7	↑ **19**

Opačný účinek byl pozorován při aplikaci zázvoru, kdy v perníku se světlou pohankovou moukou nebyl zjištěn žádný vliv na obsah akrylamidu, ale jeho použitím do perníku s moukou z pražené pohanky došlo ke zvýšení obsahu akrylamidu téměř o 50 %. Také při použití skořice a koriandru, které v obou případech zvyšovali obsah akrylamidu, byl zaznamenán rozdíl. Obsah akrylamidu u perníků se světlou pohankovou moukou se skořicí vzrostl o 30 % v porovnání s kontrolou, kdežto u perníků s moukou z pražené pohanky se skořicí byl tento nárůst nižší (o 20 %). Naopak koriandru výrazně zvyšoval obsah akrylamidu u perníků s moukou z pražené pohanky a to až o 54 %, přičemž u perníků se světlou pohankovou moukou to bylo pouze o 18 %.

Patrně největší rozdíl v působení koření na obsah akrylamidu v perníku se světlou pohankovou moukou nebo s moukou z pražené pohanky byl pozorován při aplikaci kardamomu, kdy v perníku se světlou pohankovou moukou došlo v jeho přítomnosti ke snížení obsahu akrylamidu přibližně o 9 %, ale naopak při jeho aplikaci do perníku s moukou z pražené pohanky se obsah akrylamidu zvýšil o 27 %.

Na základě pozorování vlivu koření na obsah akrylamidu v perníku s pohankovou moukou byl sledován i vliv směsi perníkového koření, které se skládá ze skořice, nového koření, hřebíčku, anýzu, koriandru, fenyklu a muškátového květu. Výsledný vliv perníkového koření na tvorbu akrylamidu v produktu byl následně porovnáván s výsledky jednotlivých druhů koření v ní obsažené. Pro přehlednost jsou výsledky perníkového koření a jednotlivých druhů koření v ní obsažené uvedeny v Tab. 33.

Při aplikaci perníkového koření nebyly zjištěny žádné statisticky významné změny v obsahu akrylamidu v perníku se světlou pohankovou moukou v porovnání s perníkem bez přídavku koření. Naopak při použití perníkového koření do perníku s moukou z pražené pohanky došlo ke zvýšení obsahu akrylamidu až o 33 %. Z výsledků tak vyplynulo, že použití koření ve směsi patrně vede k vzájemnému rušení jejich pozitivního či negativního vlivu na obsah akrylamidu v perníčkách. Z těchto důvodu by bylo vhodné změnit poměr jednotlivých koření v perníkovém koření tak, aby se zvýšil obsah koření s účinkem potlačujícím vznik akrylamidu v perníčkách. Případně lze změnit složení perníkového koření pro přípravu perníku nahrazením koření podporujícího vznik akrylamidu kořením, které vznik akrylamidu potlačuje. Příkladem takového koření by mohla být vanilka, která v perníkách se světlou pohankovou mouku i v perníkách s moukou z pražené pohanky snižovala obsah akrylamidu přibližně o 10 %. Samozřejmě je nutné zohlednit dopad změny jednotlivých koření v perníkovém koření na konečné senzorické vlastnosti výrobku.

Tab. 33: Vliv perníkového koření a jednotlivých druhů koření v ní obsažené na obsah akrylamidu v perníkách se světlou pohankovou moukou nebo s moukou z pražené pohanky

Koření	Perníky se světlou pohankovou moukou		Perníky s moukou z pražené pohanky	
	Akrylamid (μg/kg sušiny)	Změna (%)	Akrylamid (μg/kg sušiny)	Změna (%)
Kontrola (bez koření)	269 ± 9	–	248 ± 3	–
Perníkové koření	256 ± 3	žádná	329 ± 7	↑ **33**
Fenykl	212 ± 7	↓ **21**	293 ± 2	↓ **18**
Anýz	222 ± 5	↓ **17**	200 ± 3	↓ **19**
Hřebíček	223 ± 15	↓ **17**	228 ± 11	↓ **8**
Nové koření	277 ± 2	žádná	221 ± 8	↓ **11**
Koriandr	318 ± 2	↑ **18**	382 ± 25	↑ **54**
Skořice	346 ± 12	↑ **29**	296 ± 7	↑ **19**

Mezi antioxidační aktivitou extraktů koření a obsahem akrylamidu v perníkách se světlou pohankovou moukou byla stanovena pouze slabá korelace (korelační koeficient 0,68) a mezi antioxidační aktivitou extraktů koření a obsahem akrylamidu v perníkách s moukou z pražené pohanky nebyla nalezena korelace žádná (korelační koeficient 0,15). Důvod této nízké korelace může být v komplexnosti procesů, které je třeba vzít v úvahu. Existuje mnoho parametrů, které mohou ovlivnit vznik akrylamidu a reaktivnost antioxidantů. Obecná reakční schéma tvorby akrylamidu je tvořeno základními kroky, přičemž každý krok závisí na přítomných reaktantech (tj. povaze karbonylových sloučenin) a na teplotě, obsahu vody a pH podmínek. [199]. V tomto velmi citlivém procesu může nejen přítomnost volných radikálů, ale také dalších reaktivních skupin jednotlivých složek koření ovlivnit směr reakcí vedoucích k tvorbě akrylamidu. Sloučeniny obecně považovány za antioxidanty mohou mít velmi rozdílné účinky, které jsou přičítány jejich struktuře, polaritě a reaktivnosti. Tyto protichůdné výsledky byly zjištěny také v přirozeně se vyskytujících látkách. Některé flavonoidy a fenolické extrakty oregana vedou k poklesu obsahu akrylamidu [150, 165], zatímco některé čisté antioxidační molekuly, jako skořicová kyselina a některé fenolické sloučeniny nemají buď žádný vliv na snížení obsahu akrylamidu, nebo dokonce jeho obsah zvyšují [148]. Z tohoto důvodu byly posouzeny hlavní složky koření a shrnuty v Tab. 34 [200, 201, 202, 203], kde jsou složky jednotlivých druhů koření řazeny od nejvíce zastoupené.

Tab. 34: Chemické složky koření s antioxidační aktivitou

Koření	**Složky**
Muškátový oříšek	sabinen (15 – 51 %), *α*-pinen (11 – 21 %), *β*-pinen (8 – 18 %), terpinen-4-ol, myristicin, *γ*-terpinen, campfen, myrcen, *α*-felandren, *α*-terpinen, limonen, 1,8-cineol, *p*-cymen, terpinolen, *trans*-sabinen-hydrát, copaen, linalool, c*is*-*p*-menth-2-en-ol, *cis*-sabinen-hydrát, *cis*-piperitol, safrol, methyleugenol, eugenol, elemicin [200]
Fenykl	*trans*-anethol (60 – 65 %), fenchon (2 – 20 %), estragol (5 – 9 %), limonen, kamfen, *α*-pinen, fenchylalkohol, anisaldehyd, myristicin, dillapiol [203]
Anýz	*trans*-anethol (75 – 98 %), estragol, anýzový keton, *β*-karyofylen, anisaldehyd, kyselina anýzová, linalool, limonen, *α*-pinen, acetaldehyd, *p*-kresol, kreosol, hydrochinin, *β*-farnasen, *γ*-himachalen, *ar*-kurkumen [200]
Hřebíček	eugenol (70 – 95 %), eugenolacetát (až 17 %), *β*-karyofylen (12 – 15 %), *α*-kububen, *α*-copaen, isoeugenol, nerolidol, farnesol [200]
Vanilka	vanilin (85 %), kyselina vanilinová, *p*-hydroxybenzaldehyd, kyselina *p*-hydroxybenzoová, kyselina linolová, kyselina octová, kyselina palmitová, *p*-hydroxybenzylalkohol, vanilylalkohol, acetovanilon, kyselina anýzová [203]
Kardamom	1,8-cineol (36 %), *α*-terpinylacetát (31 %), limonen (12 %), linalool, sabinen, *trans*-nerolidol, *α*-terpineol, linalylacetát, myrcen, *α*-pinen, terpinen-4-ol, *γ*-terpinen, terpinolen, nerd, geraniol, citronellol, *α*-felandren, methyleugenol, *β*-pinen, *p*-cymen [200]
Bílý pepř	*α*-pinen, linalool, *β*-damascenon, eugenol, skatol, *m*-kresol, guajakol, piperonal [202]
Zázvor	*α*-zingiberen (22 %), geranial (10 %), geraniol (9 %), *β*-bisabolen (8 %), nerol (7 %), 1,8-cineol (6 %), *α*-terpineol (6 %), borneol (5 %), *β*-felandren, linalool, methyl(nonyl)keton, kamfen a celá řada dalších minoritních složek s obsahem nižším jak 1 % [203]
Badyán	*trans*-anethol (80 – 90 %), estragol, limonen, linalool, *δ*-3-caren, *cis*-anethol, *α*-pinen, *γ*-terpineol, α-cubeben, karyfylen, trans-ocimen, 4-terpineol, *α*-terpineol, *p*-cymen, *α*-felandren, *Δ*-cardinen, *γ*-terpinen, *β*-pinen, terpinolen, myrcen, *α*-kadinol, *α*-terpinen, *β*-clemen, bergamoten, *cis*-*β*-ocimen [203]
Nové koření	eugenol (65 – 96 %), methyleugenol, *β*-karyofylen, *α*-humulen, 1,8-cineol, *α*-selinen, *δ*-kadinen, karyofylen oxid, *β*-selinen, terpinolen, limonen, *β*-felandren, selin-11-en-4-ol, terpinen-4-ol, *α*-felandren, *β*-elemen, a celá řada dalších minoritních složek [201]

Koření	Složky
Koriandr	linalool (68 %), *α*-pinen (11 %), *γ*-terpinen (9 %), geranylacetát, kafr, geraniol, *β*-pinen, kamfen, myrcen, limonen, *p*-cymol, dipenten, *α*-terpinen, decylaldehyd, borneol, estery kyseliny octové [201]
Skořice	cinnamaldehyd (80 – 90 %), eugenol, eugenolacetát, cinnamylacetát, cinnamylalkohol, methyleugenol, benzaldehyd, benzylbenzoát, linalool, monoterpen, uhlovodík, karyofylen, safrol, pinen, fylandren, cymen, cineol [200]

Přítomnost eugenolu, velmi silného antioxidantu, v některém z použitých koření jako hřebíček, nové koření, muškátový oříšek nebo bílý pepř stojí za zmínku, protože se jedná o koření, která snižovala obsah akrylamidu, nebo neměla na jeho obsah vliv. Ve své studii Ciesarová *et al.* [156] popisuje silnou korelaci mezi obsahem eugenolu přidaného do modelových vzorků a konečným obsahem akrylamidu. Mechanismus antioxidačního účinku eugenolu na tvorbu akrylamidu není doposud zcela znám, ale jeho principem je pravděpodobně přerušení radikálových reakcí vedoucích k tvorbě akrylamidu zhášením volných radikálů [156]. Na druhou stranu, existují i sloučeniny, které tvorbu akrylamidu podporují. To lze předpokládat v případě skořice, kdy promotory na bázi kyseliny skořicové určují konečný vliv tohoto koření, a to i bez ohledu na přítomnost eugenolu a jeho radikál zhášející aktivitě. Tento vliv nebyl zatím dostatečně vysvětlen, ale lze očekávat podobný účinek i v případě jiných koření.

Také fenolové hydroxy-deriváty mají antioxidační vlastnosti, kdy působí jako dárci vodíku v chinin-aminových interakcích mezi fenoly a 3-aminopropionamidem a blokují tak vznik akrylamidu. Naopak, karbonylové sloučeniny podporují vznik akrylamidu [43], proto mohou fenolické sloučeniny obsahující obě funkční skupiny působit v obou směrech, kdy brání tvorbě akrylamidu vzhledem k jejich fenolickým hydroxylovým skupinám a zároveň podporují vznik akrylamidu díky jejich dialdehydické formě [150]. Z výsledků Zhang *et al.* [158] vyplývá, že způsob, jakým antioxidanty ovlivňují tvorbu akrylamidu, závisí na jejich koncentraci. To může být dáno přirozenými vlastnostmi antioxidantů a antioxidační kapacitou potravinových matric, což se nazývá „antioxidační paradox“ [158]. Nicméně, přítomnost látek s deklarovanými antioxidačními vlastnostmi v potravinách je velmi cenná z hlediska zdravotních přínosů, a to i navzdory současným vyšším výskytům akrylamidu.

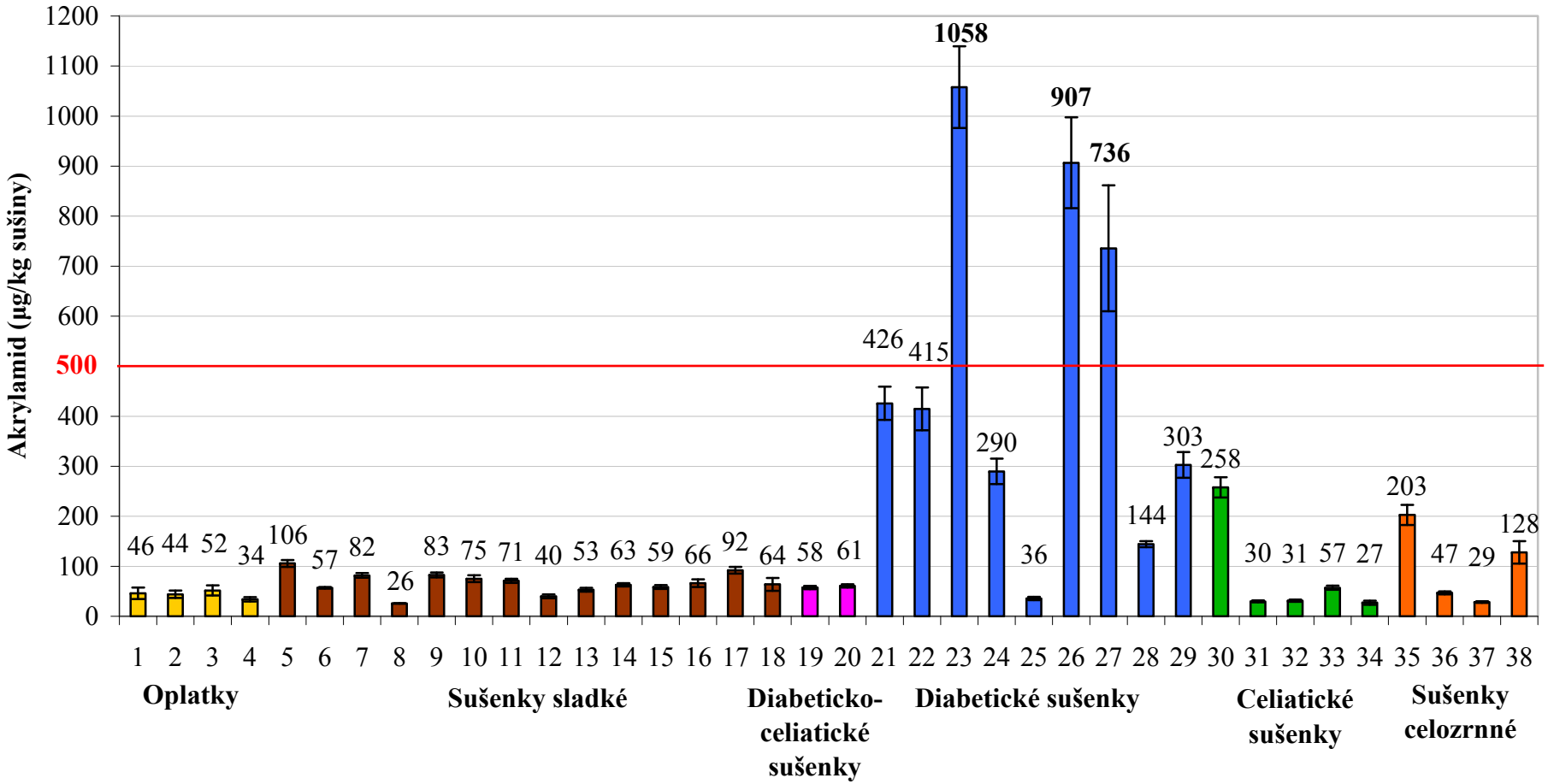
5.4 Eliminace akrylamidu v pečivářských produktech

Z výsledků předběžného průzkumu spotřebitelských zvyklostí (viz kapitola 5.1) vyplynulo, že nejvíce dochází k zatížení lidského organismu akrylamidem přijatým z potravin řazených podle Doporučení Evropské komise 2010/307/EU [174] do skupiny Sušenky, krekry, křupavý chléb a podobné výrobky, přičemž této skupině dominují jako hlavní zdroj akrylamidu sladké sušenky neplněné. Na základě těchto údajů byl ve spolupráci s Pečivárnami Liptovský Hrádok proveden vstupní monitoring výskytu akrylamidu v celém jejich sortimentu výrobků s úmyslem navrhnout a optimalizovat technologii výroby, případně složení výrobní receptury vybraných druhů trvanlivého pečiva s cílem minimalizovat obsah akrylamidu a tím zabezpečit zvýšení zdravotní bezpečnosti výrobků.

5.4.1 Monitoring obsahu akrylamidu v pečivářských produktech

Monitoring výskytu akrylamidu v cereálních produktech byl proveden v sortimentu 38 výrobků Pečivárny Liptovský Hrádek (Obr. 12), který tvoří 4 druhy oplatek, 14 druhů sladkých sušenek, 2 druhy diabeticko-celiatických sušenek, 9 druhů diabetických sušenek, 5 druhů celiatických sušenek a 4 druhy sušenek celozrnných.

Z výsledů monitoringu (Obr. 12) bylo zjištěno, že více než 70 % výrobků obsahovalo akrylamidu méně než 100 μg/kg sušiny. Pouze u 11 výrobků byl pozorován zvýšený obsah akrylamidu, a to především u výrobků určených pro speciální skupinu spotřebitelů – pro diabetiky. Tyto výrobky se od ostatních liší svou recepturou, protože namísto sacharózy je zde používána fruktóza, která je významným prekurzorem akrylamidu a vede k vyšší tvorbě akrylamidu než sacharóza [102]. Přesto byl obsah akrylamidu ve výrobcích pro diabetiky nižší než 500 μg/kg, což je směrná hodnota pro komoditu „sušenky“ uvedená v Doporučení komise ze dne 10.1.2011 o zkoumání množství akrylamidu v potravinách [33]. Výjimku představují pouze tři výrobky, u nichž byl zjištěn vysoký obsah akrylamidu a to v rozmezí 736 – 1058 μg/kg sušiny.



Obr. 12: Přehled obsahu akrylamidu v oplatkách a sušenkách

Na základě těchto výsledků a po dohodě s výrobcem byl hledán způsob snížení obsahu akrylamidu v těchto třech vybraných diabetických sušenkách bez nežádoucího vlivu na výsledné organoleptické vlastnosti a přijatelnost konzumentům. Jedná se o výrobky:

- **Produkt A:** Kakaovo-kokosové sušenky s fruktózou
- **Produkt B:** Kakaové sušenky s fruktózou polomáčené
- **Produkt C:** Celozrnné sušenky s fruktózou

Uvedené tři výrobky byly následně zkoumány z hlediska receptury, analýzy surovin, polotovarů a hotových produktů. Receptura výrobků je vlastnictvím firmy a byli poskytnuty pouze údaje přímo souvisící s tvorbou akrylamidu (podíl mouky a cukru) a i ty jsou předmětem utajení. Pečení probíhalo v elektrické peci s posuvným pečícím pásem při zapnutém horním pečení. Podrobnější údaje jsou uvedeny v Tab. 35.

Tab. 35: Přehled parametrů přípravy a zpracovávání těsta

Produkty	Vlhkost těsta (%)	Teplota těsta (°C)	Doba stání těsta (min)*	Teplota pečení (°C)	Rychlost pečení
Produkt A	15,0	25 - 26	37	190 - 260	62
Produkt B	15,3	27 – 28	60	90 - 180	26
Produkt C	12,7	24 – 25	31	190 - 260	62

* Čas od vyklopení těsta z míchače po zpracování celé dávky

Opětovnou analýzou byl potvrzen vysoký obsah akrylamidu ve zkoumaných výrobcích (Tab. 36), jež přesahuje směrnou hodnotu pro sušenky 500 μg/kg [33], proto byla provedena analýza vybraných druhů aminokyselin v těstech a vybraných složkách receptury. Rozdíly oproti předcházejícím hodnotám uvedeným na Obr. 12 byly způsobeny především variabilitou ve složení, zvláště pak mouky vzhledem na obsah asparaginu v ní a mírnými odchylkami v technologickém procesy, např. kolísání teploty pečení (± 5°C).

Obsah asparaginu jako hlavního prekurzoru akrylamidu v těstě (Tab. 36) poměrně dobře koreluje s výsledným obsahem akrylamidu v konečném výrobku. Mírné rozdíly v korelaci mohou být způsobeny rozdílným zastoupením jednotlivých surovin v závislosti od konkrétní receptury, přičemž každá ze surovin přispěla jiným podílem na celkovém obsahu dostupného asparaginu v sušence před pečením. V případě Produktu C je významným zdrojem asparaginu celozrnná mouka, která obsahovala 3x více asparaginu (332 ± 5 mg/kg) než mouka pšeničná (102 ± 3 mg/kg). Nezanedbatelný podíl mají také lněná semínka, která představují důležitý zdroj asparaginu (553 ± 40 mg/kg) v tomto výrobku.

Tab. 36: Obsah akrylamidu v produktech A, B a C a obsah aminokyselin v jejich těstech

	Akrylamid		Aminokyseliny (mg/kg)			
	(µg/kg)	**(µg/kg sušiny)**	**Asn**	**Asp**	**Gln**	**Glu**
Produkt A	849 ± 9	872 ± 9	57 ± 3	74 ± 2	33 ± 1	72 ± 3
Produkt B	1199 ± 21	1228 ± 22	42 ± 1	60 ± 2	26 ± 1	44 ± 2
Produkt C	1865 ± 60	1940 ± 62	152 ± 6	98 ± 2	41 ± 1	100 ± 5

Pro eliminaci akrylamidu byl zvolen jeden z dostupných nástrojů doporučovaných Food Drink Europe v dokumentu Acrylamide Toolbox 2011, a to aplikace enzymu asparagináza, který katalyzuje konverzi aminokyseliny L-asparagin na kyselinu asparagovou, čímž dojde k odstranění hlavního prekurzoru akrylamidu [67]. Enzym L-asparagináza je nejaktivnější v neutrálním pH a teplotě do 60 °C, stabilní je mezi pH 4 – 8 při 37 °C po dobu 2 hodin. Při vysokých teplotách dochází k inaktivaci enzymu denaturací a ve finálním výrobku se tak enzym nevyskytuje [84, 204]. Výhodou použití asparaginázy k redukci obsahu akrylamidu je její minimální vliv na chuť a barvu finálního produktu oproti jiným způsobům eliminace akrylamidu, jako je například změna kypřícího činidla, které představují podstatný zásah do výrobního procesu a kvality výrobku [67, 84]. Nevýhodou je kompatibilnost enzymu s podmínkami při průmyslovém zpracování. Efektivnost enzymem katalyzovaných reakcí je ovlivněna řadou proměnných, jako je efektivní koncentrace enzymu, doba působení, obsah vody v reakční prostředí, teplota a pH, při nichž reakce proběhne. Při aplikaci L-asparaginázy v potravinářství je nutné brát tyto proměnné v úvahu, přičemž nejdůležitějšími jsou především doba působení enzymu, která se často rovná době uložení těsta před pečením, a efektivní koncentrace enzymu [84]. Z ekonomického hlediska je důležitá minimální dávka enzymu postačující na účinnou eliminaci akrylamidu, protože cena enzymu se promítá do výrobních nákladů a tím i do výsledné ceny finálního produktu.

Pro zajištění efektivní eliminace obsahu akrylamidu ve třech vybraných druzích sušenek aplikací enzymu asparagináza byli sledovány podmínky při průmyslovém zpracování. Z Tab. 35 vyplývá, že teplota těsta v průběhu jeho zpracovávání se pohybuje v rozmezí 24 - 28 °C, což je optimální pro maximální účinnost asparaginázy. Také pH těsta v rozsahu 7,2 - 8,4 je postačující pro účinnou eliminaci asparaginu působením asparaginázy. Avšak z hlediska aplikace a mobility enzymu je v těstě poměrně nízký obsah vody (Tab. 35), nicméně aktivita vody v rozmezí 0,65 - 0,75 je pro průběh enzymových reakcí dostačující. Bude nutné zajistit důslednou homogenizaci enzymu v těstě, aby byla zabezpečena jeho účinnost ve všech reakčních místech.

5.4.2 Aplikace enzymu L-asparagináza v modelových sušenkách

Před samotnou aplikací enzymu ve výrobních podmínkách byla účinnost konverze asparaginu a její dopad na tvorbu akrylamidu a kvalitativní vlastnosti produktů ověřena v laboratorních podmínkách na modelových vzorkách. Cílem bylo optimalizovat podmínky aplikaci enzymu L-asparaginázy pro průmyslově vyráběné sušenky především nalezením vhodného způsobu aplikace enzymu, který zabezpečí homogenitu a dostupnost enzymu a zabrání jeho předčasné deaktivaci vlivem pH mimo rozsah jeho optimálního působení.

5.4.2.1 Vliv receptury na obsah akrylamidu v modelových sušenkách

Monitoringu výskytu akrylamidu v sortimentu pečivářských ukázal zvýšený obsah akrylamidu v sušenkách určených pro diabetiky, přičemž obsah akrylamidu byl v těchto sušenkách přibližně 5x – 40x vyšší než obsah akrylamidu v ostatních sušenkách. Kromě přítomnosti fruktózy mohl být obsah akrylamidu v některých sušenkách podpořen i celozrnnou moukou, která má vyšší obsah volného asparaginu, a která se vyskytuje v receptuře vybraných druhů sušenek z jednotlivých skupin sortimentu pečivárny.

Pro optimalizaci podmínek aplikaci enzymu L-asparaginázy byla pro přípravu sušenek v laboratorních podmínkách použita receptura uvedená v normě AACC method 10-54 [176] (Tab. 37), která byla modifikována k dosažení simulace sušenek určených pro diabetiky. Modifikace byla provedena nahrazením sacharózy uvedené v receptuře fruktózou (Tab. 37), přičemž nebyla brána v potaz vyšší sladivost fruktózy. Současně byl snížen i obsah soli o 1/3 vzhledem na přílišnou slanost sušenek. Obsah akrylamidu v sušenkách připravených podle takto modifikované receptury byl následně porovnáván s obsahem akrylamidu v sušenkách připravených podle receptury původní.

S ohledem na obsah celozrnné mouky ve vybraných sušenkách pečivárny Liptovský Hrádok, byl proveden také experiment zjišťování vlivu celozrnné mouky na tvorbu akrylamidu v modelovém systému, kdy byla hladká bílá mouka v receptuře úplně nahrazena moukou celozrnnou (Tab. 37). Zároveň byly připraveny i modelové sušenky, u nichž byl poměr fruktózy, bílé mouky a celozrnné mouky upraven na 0,9:3:1 (Tab. 37).

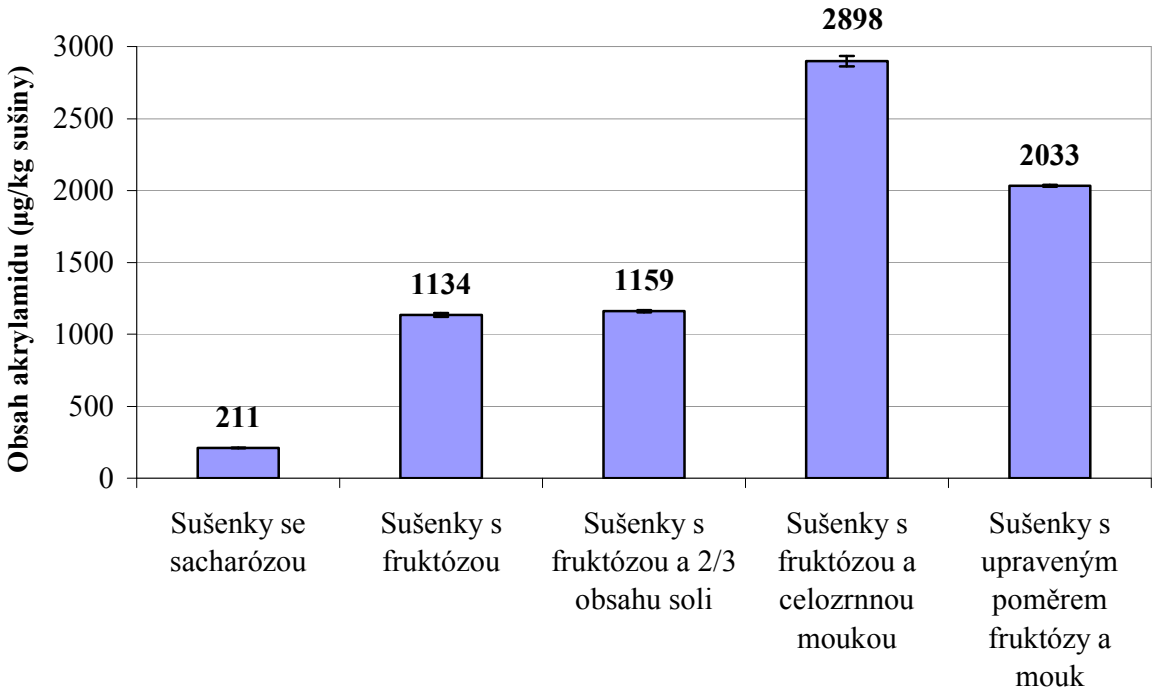
Tab. 37: Receptura pro přípravu jedné dávky sušenek

Ingredience	Receptura v normě AACC	Modifikovaná receptura	Receptura s celozrnnou moukou	Upravený poměr fruktózy a mouk
	Množství (g)			
Shortening	48,0	48,0	48,0	48,0
Jemně mletý cukr	38,4	-	-	-
Hnědý cukr	12,0	-	-	-
Fruktóza	-	50,4	50,4	28,7
Sušené mléko odtučněné	1,2	1,2	1,2	1,2
Sůl	1,5	1,0	1,0	1,0
$NaHCO_3$	1,2	1,2	1,2	1,2
Fruktózový sirup, 42 %	1,8	1,8	1,8	1,8
NH_4HCO_3	0,6	0,6	0,6	0,6
Demineralizovaná voda	27,0	27,0	27,0	27,0
Mouka pšeničná hladká	120,0	120,0	-	89,6
Mouka pšeničná celozrnná	-	-	120,0	30,4

Z porovnání obsahu akrylamidu v modelových sušenkách připravených buď se sacharózou (jak uvádí norma AACC) nebo s fruktózou (modifikovaná receptura) (Obr: 13) je patrné, že nahrazením sacharózy fruktózou dochází ke zvýšení obsahu akrylamidu přibližně 6x. To může být způsobeno tím, že sacharóza jako neredukující sacharid nemůže s asparaginem reagovat přímo za vzniku akrylamidu, ale musí být nejprve převedena na reaktivní karbonylovou směs [104]. V případě, že byl snížen obsah soli v receptuře s fruktózou o 1/3, nedošlo k žádné výrazné změně obsahu akrylamidu v modelových sušenkách.

Při změně mouky v receptuře sušenek s fruktózou, kdy byla bílá pšeničná mouka nahrazena celozrnnou (Obr. 13), došlo ke zvýšení obsahu akrylamidu 2,5x. Tyto poznatky jsou stejně jako výsledky uvádějící dopad nahrazení žitné mouky pohankovou moukou v perníkách v kapitole 5.3.1 v souladu se studií Capuana *et al.* [91] uvádějící, že celozrnné a žitné mouky mohou přispět k tvorbě akrylamidu mnohem více než mouky pšeničné, což je dáno jejich vyšším obsahem volného asparaginu, i vyšším obsahem vlákniny a popela [91]. Výsledky byly zároveň potvrzeny stanovením obsahu asparaginu v moukách, kdy bílá pšeničná mouka obsahovala 118 ± 19 mg/kg asparaginu a celozrnná pšeničná mouka

254 ± 9 mg/kg asparaginu, tedy 2,2krát více, což odpovídá zvýšení obsahu akrylamidu v modelových sušenkách.



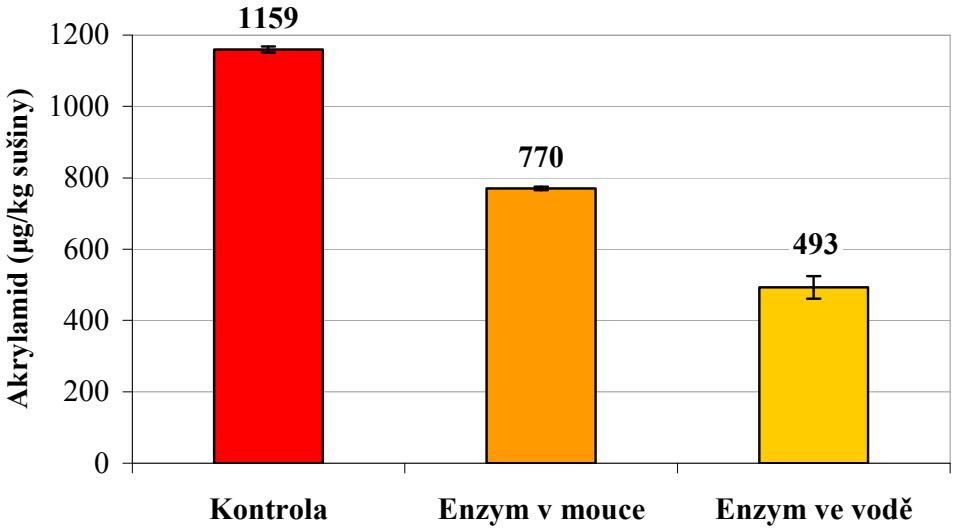
Obr. 13: Porovnání obsahu akrylamidu v modelových sušenkách se sacharózou, s fruktózou a s fruktózou a obsahem soli sníženým na 2/3

Z experimentu, kdy byl upraven poměr fruktózy, bílé mouky a celozrnné mouky (Obr. 13), vyplývá, že i přes snížení fruktózy v receptuře přibližně na polovinu a nahrazením 1/4 bílé mouky moukou celozrnnou dochází k téměř 2násobnému zvýšení obsahu akrylamidu v sušenkách v porovnání se sušenkami připravenými podle modifikované receptury. Tyto výsledky ukazují, že druh cukru použitý při výrobě sušenek je velmi důležitý. Významnějším se ale jeví druh použité mouky, tedy především obsah asparaginu v ní, který je hlavním prekurzorem akrylamidu a přímo poskytuje páteř jeho molekule [42]. Aplikace enzymu asparagináza tak představuje vhodný způsob eliminace akrylamidu v sušenkách, který katalyzuje konverzi aminokyseliny L-asparagin na kyselinu asparagovou, čímž dojde k odstranění hlavního prekurzoru akrylamidu [67].

5.4.2.2 Způsob aplikace enzymu v laboratorních podmínkách

Před porovnáváním účinnosti eliminace akrylamidu v modelových sušenkách s fruktózou použitím enzymu asparaginázy v různých koncentracích bylo nutné nejprve zvolit optimální způsob aplikace enzymu. Pro zjištění vhodného způsobu aplikace enzymu byla použita koncentrace enzymu 2075 ASPU/kg, což představuje přibližně 1,5násobek dávky

doporučované výrobcem pro podobný typ výrobku [205]. Enzym byl aplikován buď rozptýlený ve vodě, nebo jako součást mouky.



Obr. 14: Obsah akrylamidu v modelových sušenkách s rozdílnou aplikací enzymu PreventASe® W (2075 ASPU/kg mouky) během přípravy těsta

Z výsledků, které jsou uvedeny na Obr. 14, vyplývá, že obsah akrylamidu v modelových sušenkách byl aplikací enzymu v mouce snížen pouze o 34 % oproti aplikaci enzymu ve vodě, kdy došlo k poklesu obsahu akrylamidu dokonce o 57 %. Nižší pokles obsahu akrylamidu po aplikaci enzymu společně s moukou je pravděpodobně způsoben nedostatečnou aktivací enzymu. Při použití enzymu rozptýleného ve vodě je zajištěna nejen včasná aktivace enzymu, ale i jeho lepší distribuce v těstě a tím je usnadněn i kontakt enzymu s volným asparaginem přítomným v mouce. Jako nejvhodnější způsob aplikace enzymu do těsta modelových sušenek byla tedy zvolena aplikace enzymu asparaginázy společně s vodnou fází při přípravě těsta modelových sušenek.

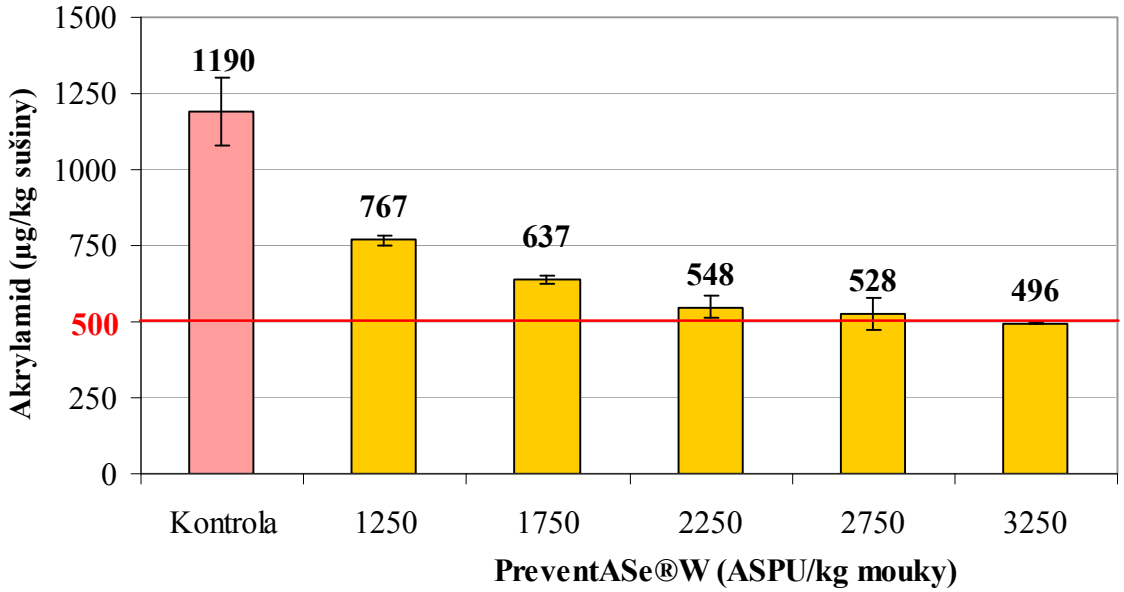
5.4.2.3 Porovnávání účinnosti eliminace akrylamidu v modelových sušenkách použitím enzymu L-asparagináza

Cílem porovnávání účinnosti eliminace akrylamidu v modelových sušenkách aplikací enzymu asparaginázy bylo stanovit vhodnou koncentraci enzymu zajišťující snížení obsahu akrylamidu v sušenkách pod hodnotu 500 µg/kg.

Na základě deklarované aktivity enzymu PreventASe® W (2500 ASPU/g ± 5 %) a s ohledem na matrici modelových sušenek použitou pro porovnání účinnosti eliminace akrylamidu, byla po konzultaci s výrobcem enzymu navržena aplikace enzymu ve třech

různých koncentracích (1250, 1750 a 2250 ASPU/kg mouky), z nichž měla být na základě získaných výsledků zvolena optimální koncentrace tohoto komerčně dostupného enzymu pro jeho aplikaci v potravinářském průmyslu při výrobě sušenek. Jako kontrola byly připravovány sušenky bez přídavku enzymu asparagináza.

Výsledné hodnoty stanovení obsahu akrylamidu v modelových sušenkách po aplikaci enzymu asparaginázy PreventASe® W jsou uvedeny na Obr. 15. Z výsledků vyplývá, že při aplikaci 3 různých rovnoměrně se zvyšujících koncentrací enzymu asparaginázy klesá rovnoměrně obsah akrylamidu v modelových sušenkách. Bohužel ale ani přes téměř 56 % snížení obsahu akrylamidu při nejvyšší navržené koncentraci enzymu PreventASe® W (2250 ASPU/kg mouky) nebylo dosaženo požadovaného snížení obsahu akrylamidu pod hodnotu 500 µg/kg.



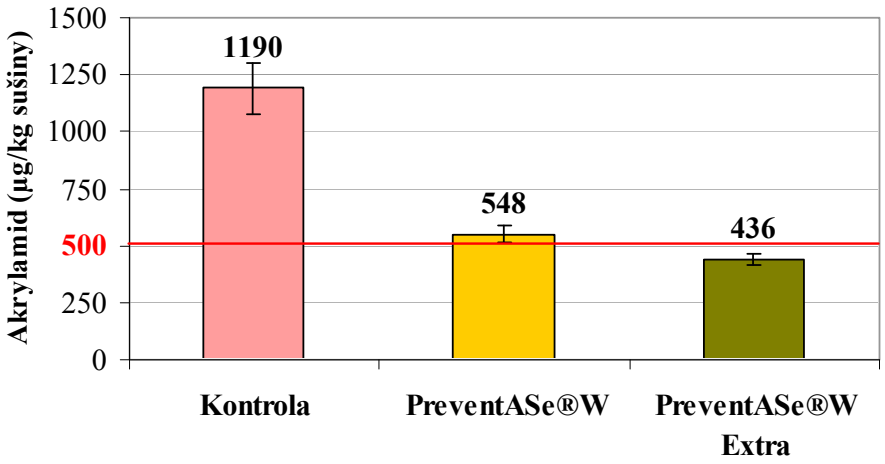
Obr. 15: Obsah akrylamidu v modelových sušenkách v závislosti na použité koncentraci enzymu PreventASe® W

Postup byl tedy zopakován s použitím dalších 2 vyšších koncentrací enzymu PreventASe® W (2750 a 3250 ASPU/kg mouky) (Obr. 15), ale bohužel ani aplikace těchto koncentrací spolehlivě nesnížila obsah akrylamidu v sušenkách pod směrnou hodnotu 500 µg/kg. Z výsledků na Obr. 15 je patrné, že při použití 2 vyšších koncentrací enzymu asparagináza (2750 a 3250 ASPU/kg mouky) se obsah akrylamidu v sušenkách v porovnání se sušenkami s koncentrací enzymu 2250 ASPU/kg mouky již výrazně neměnil a jeho pokles s dále rovnoměrně se zvyšující koncentrací enzymu byl jen velmi mírný. To bylo pravděpodobně způsobeno omezenou mobilitou enzymu, protože obsah vody v těstě byl

pouze 16,7 %, přičemž pro aplikaci enzymu asparagináza PreventASe® W (DSM Food Specialties B.V., Delft, Nizozemsko) ve formě mikrogranulí doporučuje výrobce obsah vody minimálně 20 %. To potvrzuje Hendriksen *et al.* [84], kteří ve své studii prokázali korelaci mezi úrovní akrylamidu v sušenkách a obsahem vody v enzymem ošetřeném těstě, kdy zvýšení obsahu vody v těstě z původních 15 % na 19 % vedlo ke snížení obsahu akrylamidu až o 90 % oproti původním 34 %. Naopak snížení obsahu vody na 11 % vedlo pouze k minimálnímu nebo vůbec žádnému snížení obsahu akrylamidu. Na účinnost enzymu mohlo mít kromě obsahu vody vliv i pH těsta, které je během působení enzymu v rozmezí 7,7-7,8, protože aktivita enzymu PreventASe® W je vyjádřena v jednotkách ASPU, kdy 1 ASPU je definován jako množství enzymu potřebné k uvolnění 1μmol amoniaku z L-asparaginu za 1 minutu při podmínkách testu (pH = 5,0; 37 °C).

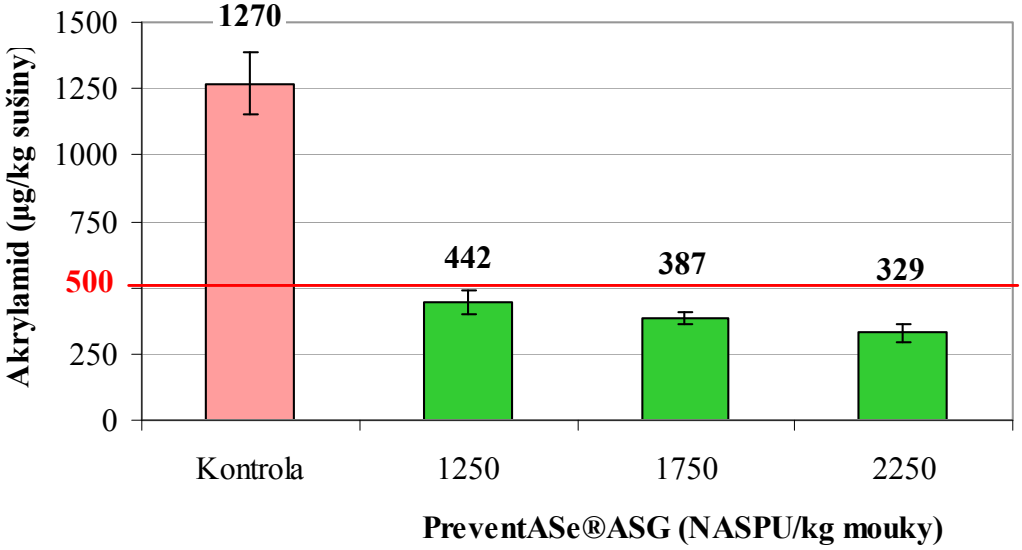
Vzhledem k tomu, že ani po zvýšení koncentrace enzymu PreventASe® W až na 3250 ASPU/kg mouky nedošlo k dostatečnému snížení obsahu akrylamidu v modelových sušenkách pod směrnou hodnotu, byl firmou DSM Food Specialties po konzultaci těchto výsledků poskytnut pro další měření enzym PreventASe® W Extra. Ten se parametry shodoval s enzymem PreventASe® W, ovšem jeho aktivita byla 2500 ASPU/g ± 5 % deklarována při pH hodnotě 7,2. Ze stanovení obsahu akrylamidu po aplikaci enzymu PreventASe® W Extra (Obr. 16) vyplynulo, že při aplikaci nejvyšší původně navržené koncentrace enzymu (2250 ASPU/kg mouky) došlo ke snížení obsahu akrylamidu pod směrnou hodnotu 500 μg/kg. Výsledky tak podporují teorii, že enzym PreventASe® W může být oproti enzymu PreventASe® W Extra méně účinný vlivem pH těsta, které se pohybuje v rozmezí 7,7-7,8, protože aktivita enzymu PreventASe® W Extra je uváděna při pH 7,2.

Jelikož snížení obsahu akrylamidu v modelových sušenkách aplikací enzymu PreventASe® W Extra nebylo v porovnání s použitím stejné koncentrace enzymu PreventASe® W až tak výrazné, jak se původně předpokládáno, vytvořila firma DSM Food Specialties testovací dávku enzymu PreventASe® ASG s aktivitou ≥ 2500 NASPU/g. Tento enzym se liší od PreventASe® W a PreventASe® W Extra tím, že jeho nosičem je na místo pšeničné mouky 50 % glycerol a také jednotkou aktivity enzymu NASPU, kdy 1 NASPU je definován jako množství enzymu potřebné k uvolnění 1μmol amoniaku z L-asparaginu za 1 minutu za podmínek testu (pH = 7,0; 37 °C). Podmínky pro aplikaci enzymu PreventASe® ASG do těst modelových sušenek zůstaly shodné s předchozími enzymy.



Obr. 16: Porovnání obsah akrylamidu v modelových sušenkách po aplikaci dvou typů enzymu asparagináza ve stejné koncentraci (2250 ASPU/kg mouky)

Experiment byl tedy znovu celý zopakován s enzymem PreventASe® ASG, kdy byla opětovně připravena i kontrola vzhledem k tomu, že byla použita nová šarže mouky, která měla odlišný obsah aminokyselin. Jak ukazují výsledné hodnoty stanovení obsahu akrylamidu v modelových sušenkách po aplikaci enzymu PreventASe® ASG na Obr. 17, podařilo se snížit obsah akrylamidu pod směrnou hodnotu 500 µg/kg již při nejnižší testované koncentraci enzymu. Účinnějšího snížení obsahu akrylamidu po aplikaci enzymu PreventASe® ASG je nejspíše dosaženo lepší aktivací enzymu, což je patrně způsobeno tím, že jeho nosičem je 50 % glycerol.



Obr. 17: Obsah akrylamidu v modelových sušenkách v závislosti na použité koncentraci enzymu PreventASe® ASG

5.4.2.4 Porovnávání účinnosti eliminace asparaginu v těstě modelových sušenek použitím enzymu L-asparagináza

L-asparagináza katalyzuje konverzi L-asparaginu na kyselinu L-asparagovou a amoniak [126]. Enzym ale není aktivní jen s L-asparaginem jako substrátem, např. z glutaminu také odštěpuje aminoskupinu i když pomaleji [206]. Během sledování účinnosti eliminace akrylamidu v modelových sušenkách aplikací enzymu asparaginázy byl stanovován obsah 4 vybraných aminokyselin (asparagin, kyselina asparagová, glutamin, kyselina glutamová) v těstě po aplikaci enzymu asparagináza. Výsledky uvedené v Tab. 38 a 39 ukazují, že aplikací enzymu PreventASe® W, W Extra a ASG dochází k poklesu obsahu asparaginu a nárůstu obsahu kyseliny asparagové. V případě obsahu glutaminu a kyseliny glutamové v těstě nedošlo působením enzymů k žádným významným změnám.

Tab. 38: Obsah aminokyselin (mg/kg) v těstě s enzymem PreventASe® W a W Extra

	Asn	**Asp**	**Gln**	**Glu**
Kontrola	28 ± 2	34 ± 3	55 ± 2	23 ± 2
PreventASe® W				
1250 ASPU/kg mouky	22 ± 1	47 ± 3	59 ± 4	24 ± 1
1750 ASPU/kg mouky	15 ± 1	51 ± 4	56 ± 4	24 ± 2
2250 ASPU/kg mouky	16 ± 1	48 ± 3	65 ± 4	25 ± 2
2750 ASPU/kg mouky	15 ± 1	49 ± 3	64 ± 5	24 ± 2
3250 ASPU/kg mouky	13 ± 1	47 ± 3	62 ± 6	23 ± 1
PreventASe® W Extra				
2250 ASPU/kg mouky	13 ± 1	47 ± 2	65 ± 2	24 ± 1

Tab. 39: Obsah aminokyselin (mg/kg) v těstě s enzymem PreventASe® ASG

	Asn	**Asp**	**Gln**	**Glu**
Kontrola	35 ± 3	51 ± 2	10 ± 1	28 ± 1
PreventASe® ASG				
1250 NASPU/kg mouky	18 ± 1	70 ± 5	11 ± 1	30 ± 2
1750 NASPU/kg mouky	15 ± 2	69 ± 5	10 ± 1	30 ± 2
2250 NASPU/kg mouky	14 ± 1	68 ± 2	10 ± 1	30 ± 1

Při porovnání poklesu obsahu akrylamidu v modelových sušenkách s poklesem obsahu asparaginu v těstě použitím různých koncentrací enzymu PreventASe® W a ASG byly získány

korelační koeficienty 0,96 a 1,00, z čehož vyplývá, že obsah akrylamidu v konečném výrobku je přímo úměrný účinnosti enzymů v odbourávání asparaginu v těstech modelových sušenek.

Výsledky stanovení obsahu aminokyselin v těstě kontrolních vzorek také dokládají, nakolik se mění obsah aminokyselin v mouce, která je hlavním zdrojem asparaginu v těstě. Při přípravě těst s enzymem byla totiž použita pšeničná mouka hladká ve dvou šaržích. Při porovnání kontrol z Tab. 38 a 39 je patrné, že obsah asparaginu byl v první šarži mouky (Tab. 38) přibližně o 20 % nižší. Současně první šarže mouky obsahovala až 5x více glutaminu, ale o 1/3 méně kyseliny asparagové v porovnání s druhou šarží mouky (Tab. 39). Tyto výsledky tak ukazují, jak se obsah asparaginu může lišit v rámci jednoho druhu mouky, což může být dáno odrůdou obiloviny nebo agronomickou praxí [67, 90, 93].

5.4.2.5 Vliv enzymu L-asparagináza na kvalitativní vlastnosti modelových sušenek

Kromě porovnávání účinnosti eliminace akrylamidu aplikací enzymu asparagináza, byl sledován i vliv enzymu na fyzikální a organoleptické vlastnosti modelových sušenek a jejich těst a výsledky byly porovnávány s výsledky sušenek bez aplikace enzymu.

U vzorků modelových sušenek a jejich těst byla sledována změna pH a aktivity vody působením enzymu asparagináza (viz Tab. 40 a 41). Statistickým vyhodnocením bylo zjištěno, že odbouráním asparaginu enzymem asparaginázou nedochází k statisticky významným změnám v hodnotách pH a aktivity vody modelových sušenek a jejich těst.

Tab. 40: Aktivita vody a pH těst a sušenek s enzymem PreventASe® W a W Extra

	Těsta		**Sušenky**	
	aw	**pH**	**aw**	**pH**
Kontrola	0,766 ± 0,011	7,71 ± 0,06	0,246 ± 0,074	6,88 ± 0,22
PreventASe® W				
1250 ASPU/kg mouky	0,756 ± 0,007	7,78 ± 0,05	0,289 ± 0,015	7,05 ± 0,04
1750 ASPU/kg mouky	0,755 ± 0,015	7,88 ± 0,09	0,226 ± 0,033	6,86 ± 0,12
2250 ASPU/kg mouky	0,758 ± 0,016	7,79 ± 0,07	0,199 ± 0,014	6,87 ± 0,05
2750 ASPU/kg mouky	0,764 ± 0,009	7,81 ± 0,06	0,215 ± 0,034	6,88 ± 0,13
3250 ASPU/kg mouky	0,763 ± 0,004	7,78 ± 0,05	0,217 ± 0,015	6,81 ± 0,11
PreventASe® W Extra				
2250 ASPU/kg mouky	0,742 ± 0,013	7,78 ± 0,04	0,191 ± 0,022	6,64 ± 0,05

Tab. 41: Aktivita vody a pH těst a sušenek s enzymem PreventASe® ASG

	Těsta		Sušenky	
	aw	**pH**	**aw**	**pH**
Kontrola	0,772 ± 0,002	7,65 ± 0,09	0,222 ± 0,041	6,68 ± 0,24
PreventASe® ASG				
1250 NASPU/kg mouky	0,766 ± 0,002	7,63 ± 0,02	0,216 ± 0,004	6,69 ± 0,13
1750 NASPU/kg mouky	0,770 ± 0,005	7,68 ± 0,03	0,198 ± 0,016	6,50 ± 0,18
2250 NASPU/kg mouky	0,770 ± 0,002	7,71 ± 0,06	0,207 ± 0,043	6,47 ± 0,23

Kromě aktivity vody a pH byl také u sušenek sledován obsah sušiny a byly měřeny jejich parametry (tloušťka *v*, průměr *ø* a hmotnost *m*) (viz Tab. 42 a 43). Ani u těchto hodnot nebylo zjištěno, že by působením enzymu asparagináza docházelo ke statisticky významným změnám obsahu sušiny a parametrů sušenek.

Tab. 42: Obsah sušiny a parametry sušenek s enzymem PreventASe® W a W Extra

	***v* (mm)**	***ø* (mm)**	***m* (g)**	**sušina (%)**
Kontrola	7,2 ± 0,2	66,3 ± 1,0	12,2 ± 1,0	97,6 ± 0,4
PreventASe® W				
1250 ASPU/kg mouky	7,6 ± 0,1	65,8 ± 0,7	13,0 ± 0,5	97,2 ± 0,5
1750 ASPU/kg mouky	7,1 ± 0,6	66,4 ± 0,3	12,6 ± 0,9	97,8 ± 0,6
2250 ASPU/kg mouky	7,3 ± 0,2	66,2 ± 0,5	12,3 ± 0,3	98,0 ± 0,2
2750 ASPU/kg mouky	7,2 ± 0,3	66,7 ± 0,5	12,5 ± 0,6	97,3 ± 0,4
3250 ASPU/kg mouky	7,5 ± 0,2	66,5 ± 0,1	12,9 ± 0,4	97,3 ± 0,1
PreventASe® W Extra				
2250 ASPU/kg mouky	7,4 ± 0,4	66,7 ± 0,9	12,7 ± 0,8	97,8 ± 0,3

Tab. 43: Obsah sušiny a parametry sušenek s enzymem PreventASe® ASG

	***v* (mm)**	***ø* (mm)**	***m* (g)**	**sušina (%)**
Kontrola	6,9 ± 0,2	65,9 ± 0,3	11,1 ± 0,2	97,3 ± 0,5
PreventASe® ASG				
1250 NASPU/kg mouky	7,3 ± 0,2	66,1 ± 0,2	11,8 ± 0,4	97,4 ± 0,2
1750 NASPU/kg mouky	6,9 ± 0,1	66,3 ± 0,1	11,3 ± 0,1	97,5 ± 0,4
2250 NASPU/kg mouky	7,0 ± 0,2	65,8 ± 0,3	11,0 ± 0,5	97,4 ± 0,7

Také porovnávání barvy modelových sušenek bez a s přídavkem enzymu asparaginázy v různých koncentracích mělo ukázat, zda aplikací asparaginázy nedochází ke změnám konečného zbarvení sušenek, které je jedním z klíčových faktorů pro přijetí spotřebitelem. Fotografie sušenek jsou uvedeny v Příloze 2 a 3.

Tab. 44: Barva sušenek s enzymem PreventASe® W a W Extra vyjádřená v systému CIELab

	Vrchní strana		
	L*	***a****	***b****
Kontrola	47,9 ± 1,4	17,0 ± 0,7	32,3 ± 0,9
PreventASe® W			
1250 ASPU/kg mouky	48,7 ± 1,0	16,5 ± 0,8	32,2 ± 1,0
1750 ASPU/kg mouky	47,5 ± 1,2	16,9 ± 0,2	32,0 ± 1,4
2250 ASPU/kg mouky	47,4 ± 0,7	17,0 ± 0,2	31,8 ± 0,6
2750 ASPU/kg mouky	48,5 ± 1,2	17,4 ± 0,2	32,9 ± 0,6
3250 ASPU/kg mouky	46,7 ± 0,7	17,7 ± 0,1	32,2 ± 0,5
PreventASe® W Extra			
2250 ASPU/kg mouky	44,1 ± 0,1	17,4± 0,2	29,7 ± 0,3

	Spodní strana		
	L*	***a****	***b****
Kontrola	39,2 ± 2,2	18,1 ± 0,5	29,5 ± 1,0
PreventASe® W			
1250 ASPU/kg mouky	39,6 ± 2,9	17,6 ± 0,7	29,2 ± 1,2
1750 ASPU/kg mouky	39,4 ± 1,9	17,9 ± 0,2	29,6 ± 2,0
2250 ASPU/kg mouky	38,6 ± 0,7	18,2 ± 0,3	29,4 ± 0,7
2750 ASPU/kg mouky	38,5 ± 1,7	18,6 ± 0,1	29,7 ± 1,2
3250 ASPU/kg mouky	38,1 ± 2,1	18,6 ± 0,2	28,4 ± 1,8
PreventASe® W Extra			
2250 ASPU/kg mouky	32,2 ± 0,1	17,6 ± 0,2	23,7 ± 0,2

Tab. 45: Barva sušenek s enzymem PreventASe® ASG vyjádřená v systému CIELab

	Vrchní strana		
	L*	***a****	***b****
Kontrola	47,6 ± 2,0	17,4 ± 0,3	32,8 ± 0,9
PreventASe® ASG			
1250 NASPU/kg mouky	45,2 ± 0,6	18,1 ± 0,1	31,9 ± 0,7
1750 NASPU/kg mouky	46,6 ± 0,7	17,8 ± 0,1	32,5 ± 0,4
2250 NASPU/kg mouky	46,7 ± 0,5	17,9 ± 0,2	32,8 ± 0,4

	Spodní strana		
	L*	***a****	***b****
Kontrola	38,5 ± 4,8	18,7 ± 0,3	30,3 ± 3,9
PreventASe® ASG			
1250 NASPU/kg mouky	38,9 ± 0,6	19,3 ± 0,1	31,6 ± 0,3
1750 NASPU/kg mouky	37,2 ± 1,8	19,1 ± 0,3	29,4 ± 1,4
2250 NASPU/kg mouky	37,8 ± 1,1	19,2 ± 0,1	30,7 ± 0,8

Barva sušenek byla měřena přímo na vrchní a spodní straně sušenek pomocí kolorimetru Color i5D, X-Rite (Grand Rapid, MI, USA) podle CIELAB (Tab. 44 a 45). Výsledky byly vyhodnocovány nastavením tolerančního limitu $\Delta L^* = +1{,}50/-1{,}50$, $\Delta a^* = +1{,}50/-1{,}50$ a $\Delta b^* = +1{,}50/-1{,}50$, při kterém je barevný rozdíl mezi jednotlivými vzorky pro lidské oko jen těžko postřehnutelný. Na základě tohoto tolerančního limitu bylo zjištěno, že odbouráním asparaginu enzymem PreventASe® W nedochází k ovlivnění výsledné barvy modelových sušenek a to ani při zvyšující se koncentraci enzymu. Podobné je to i s aplikací enzymu PreventASe® ASG, jehož zvyšující se koncentrace také neměla vliv na finální barvu sušenek. Pouze v případě nejnižší koncentrace enzymu PreventASe® ASG (1250 NASPU/kg mouky) měly sušenky vrchní stranu tmavší než kontrola, což mohl být způsobeno variabilitou teploty během pečení.

Po aplikaci enzymu PreventASe® W Extra byly sušenky na první pohled tmavší než sušenky kontrolní. Z naměřených hodnot barvy vrchní i spodní strany sušenek je patrné, že sušenky s enzymem PreventASe® W Extra měly v porovnání s kontrolou nižší hodnoty L^* a b^*, tedy byly tmavší a na finální barvě se více podílela modrá barva. Barva však nemusela být ovlivněna pouze enzymem PreventASe® W Extra, ale mohly na ní mít vliv i aktuální podmínky během přípravy těsta a pečení sušenek. Společně s každými sušenkami s enzymem

byly totiž vždy připravovány i sušenky kontrolní, přičemž mezi kontrolními sušenky připravenými současně se sušenkami s enzymem PreventASe® W Extra nebyl v barvě viditelný rozdíl, což bylo potvrzeno i měřením barvy pomocí kolorimetru.

Z texturních vlastností těst modelových sušenek byla stanovována tvrdost, lepivost a přilnavost těsta (Tab. 46 a 47), kdy tvrdost je definována jako síla potřebná k dosažení dané deformace, lepivost (adhezivnost) představuje sílu potřebnou k překonání síly přitažlivosti mezi povrchem potraviny a povrchem sondy, a přilnavost vyjadřuje práci potřebnou pro oddělení sondy od vzorku [207].

Tab. 46: Hodnoty tvrdosti, lepivosti a přilnavosti těsta s enzymem PreventASe® W a W Extra

	Tvrdost (N)	**Lepivost (N)**	**Přilnavost (N.sec)**
Kontrola	0,76 ± 0,13	0,26 ± 0,01	0,013 ± 0,002
PreventASe® W			
1250 ASPU/kg mouky	0,84 ± 0,39	0,25 ± 0,02	0,012 ± 0,002
1750 ASPU/kg mouky	0,73 ± 0,23	0,27 ± 0,01	0,013± 0,002
2250 ASPU/kg mouky	0,71 ± 0,10	0,25 ± 0,01	0,010 ± 0,001
2750 ASPU/kg mouky	0,71 ± 0,08	0,27 ± 0,02	0,013 ± 0,002
3250 ASPU/kg mouky	0,70 ± 0,16	0,28 ± 0,01	0,014 ± 0,001
PreventASe® W Extra			
2250 ASPU/kg mouky	0,73 ± 0,18	0,27 ± 0,02	0,012 ± 0,002

Tab. 47: Hodnoty tvrdosti, lepivosti a přilnavosti těsta s enzymem PreventASe® ASG

	Tvrdost (N)	**Lepivost (N)**	**Přilnavost (N.sec)**
Kontrola	0,59 ± 0,02	0,26 ± 0,01	0,012 ± 0,002
PreventASe® ASG			
1250 NASPU/kg mouky	0,61 ± 0,09	0,27 ± 0,01	0,014 ± 0,001
1750 NASPU/kg mouky	0,54 ± 0,02	0,26 ± 0,01	0,013 ± 0,001
2250 NASPU/kg mouky	0,54 ± 0,06	0,27 ± 0,01	0,013 ± 0,001

Současně byly sledovány možné změny těchto vlastností působením enzymu L-asparagináza a naměřené hodnoty byly porovnávány s hodnotami kontroly. Z porovnávání výsledků vyplynulo, že odbouráním asparaginu použitím enzymu PreventASe® W, W Extra nebo ASG nedochází k statisticky významným změnám texturních vlastností těst a to ani při zvyšujících se koncentracích enzymů. Značné odchylky tvrdosti těst mohly být způsobeny

kolísáním teploty během jejího stanovování, ale i teplotou surovin použitých při jejich přípravě, kdy zvláště na měkkost tuku ovlivnila i výslednou tvrdost těsta.

Kromě texturních vlastností těst byly sledovány i texturní vlastnosti finálních sušenek a to opět tvrdost (Tab. 48 a 49). Zároveň byly sledovány i případné změny vlastností sušenek, které by mohly být vyvolány působením enzymů PreventASe® W, PreventASe® W Extra nebo PreventASe® ASG. Na základě statistického zhodnocení bylo zjištěno, že aplikací enzymů a ani jejich zvyšující se koncentraci nedochází ke statisticky významným změnám texturních vlastností finálních sušenek v porovnání s kontrolními sušenkami bez enzymu, a to i přesto, že tvrdost sušenek se v průběhu celého experimentu výrazně měnila. Podobně jak bylo řečeno ke kolísání výsledků obsahu akrylamidu, mohly být i rozdíly v tvrdosti způsobeny změnou teploty v jednotlivých částech pece nebo i teplotou v místnosti, kde je pec umístěna.

Tab. 48: Hodnoty tvrdosti sušenek s enzymem PreventASe® W a PreventASe® W Extra

	Tvrdost (N)
Kontrola	25,47 ± 5,60
PreventASe® W	
1250 ASPU/kg mouky	31,49 ± 1,25
1750 ASPU/kg mouky	28,03 ± 7,56
2250 ASPU/kg mouky	25,20 ± 3,55
2750 ASPU/kg mouky	21,49 ± 2,37
3250 ASPU/kg mouky	24,82 ± 2,14
PreventASe® W Extra	
2250 ASPU/kg mouky	22,14 ± 3,31

Tab. 49: Hodnoty tvrdosti sušenek s enzymem PreventASe® ASG

	Tvrdost (N)
Kontrola	17,11 ± 1,16
PreventASe® ASG	
1250 NASPU/kg mouky	19,59 ± 3,23
1750 NASPU/kg mouky	14,86 ± 0,86
2250 NASPU/kg mouky	13,86 ± 1,61

5.4.3 Aplikace enzymu L-asparagináza v průmyslově vyráběných sušenkách

Záměrem práce uvedené v této kapitole bylo aplikovat v praxi poznatky získané z experimentů prováděných v modelových podmínkách, jejichž cílem bylo optimalizovat podmínky aplikaci enzymu L-asparaginázy za účelem snížit obsah akrylamidu v sušenkách pod směrnou hodnotu pro tuto komoditu (500 μg/kg) a současně sledovat případné změny kvalitativních parametrů výrobku.

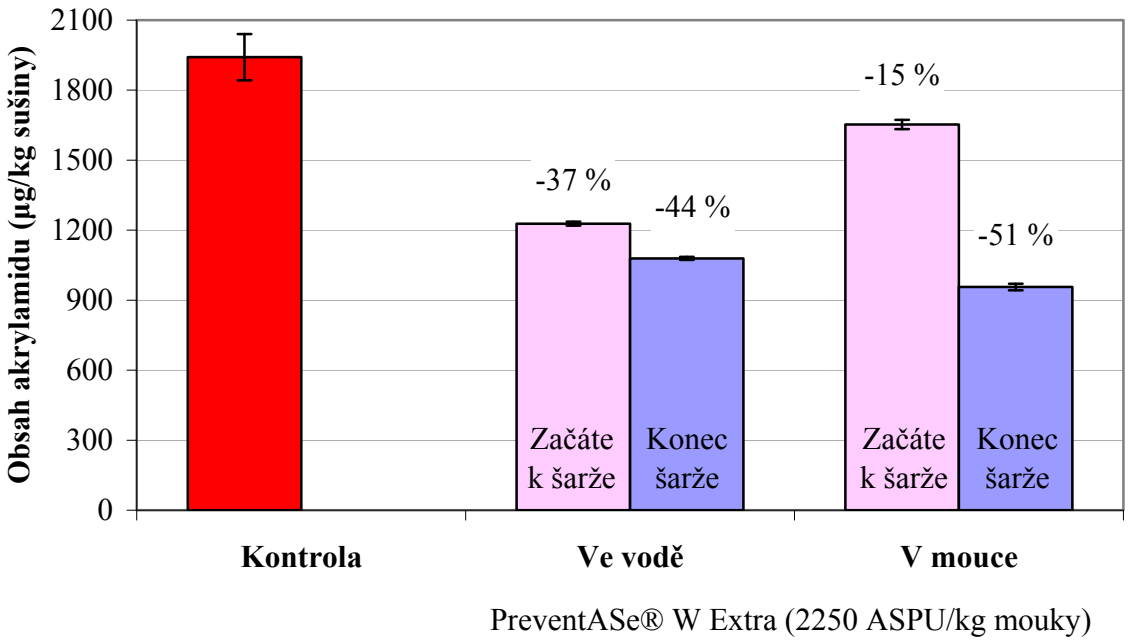
Testování účinnosti eliminaci akrylamidu použitím enzymu L-asparagináza v průmyslově vyráběných sušenkách bylo prováděno v Pečivárnách Liptovský Hrádok na produktech vybraných podle výsledků uvedených v kapitole 5.4.1. Pro ověření aplikace enzymu v průmyslových podmínkách byly na základě výsledků uváděných v kapitole 5.4.2 zvoleny komerčně dostupné enzymy: PreventASe® ASG (≥ 2500 NASPU/g), jehož nosičem je 50 % glycerol, a PreventASe® W Extra (2500 ASPU/g ± 5 % (při pH 7,2)) ve formě mikrogranulí navázaných na pšeničnou mouku.

5.4.3.1 Porovnávání způsobu aplikace enzymu PreventASe® W Extra v průmyslových podmínkách

Na základě poznatků získaných v kapitole 5.4.2.2 bylo jako nejvhodnější postup aplikace enzymu do těsta zvoleno přidávání enzymu společně s vodou používanou pro přípravu těsta. Pro enzym PreventASe® ASG, jehož nosičem je 50% glycerol, a který je za běžných podmínek v kapalném stavu, byl jeho aplikace společně s vodou ideální.

Vzhledem k tomu, že v případě enzymu PreventASe® W Extra, který je vyráběn ve formě mikrogranulí navázaných na pšeničnou mouku a je tak v sypkém stavu, nebylo možné zajistit rozptýlení enzymu ve vodě a tím ani jeho kvantitativní převedení z dávkovače do míchacího zařízení, bylo provedeno porovnání účinnost eliminace akrylamidu v sušenkách při aplikaci enzymu PreventASe® W Extra v koncentraci 2250 ASPU/kg mouky do těsta společně s vodou nebo moukou, které je uvedeno na Obr. 18.

Z grafu je patrné, že aplikací enzymu PreventASe® W Extra ve vodě došlo k rychlejší aktivaci enzymu a tudíž se jeho účinek na počátku výroby šarže projevil rychleji než při aplikaci enzymu s moukou. Naproti tomu byl ale obsah akrylamidu v sušenkách z konce výrobní šarže, do nichž byl enzym přidáván společně s moukou nižší než u sušenek s enzymem přidaným ve vodě. To mohlo být způsobeno tím, že i přes jeho pomalejší aktivování, byl v bližším kontaktu s hlavním prekurzorem akrylamidu asparaginem, jehož významným zdrojem v těstě je právě mouka.



Obr. 18: Porovnání účinnosti enzymu PreventASe® W Extra s rozdílnou aplikací během průmyslové výroby sušenek

I když se aplikace enzymu společně s vodou jeví jako vhodnější způsob, protože už na počátku výrobní šarže je zajištěno takové snížení obsahu akrylamidu, které je porovnatelné s hodnotami získanými u sušenek z konce výrobní šarže, musel být enzym PreventASe® W Extra do těsta přidáván společně s moukou. Problémem byl způsob dávkování surovin do míchacího zařízení, kdy nebylo možné zajistit rozptýlení enzymu ve vodě a tím ani jeho kvantitativní převedení z dávkovače do míchacího zařízení.

5.4.3.2 Účinnost eliminace akrylamidu v průmyslově vyráběných sušenkách použitím enzymu asparagináza

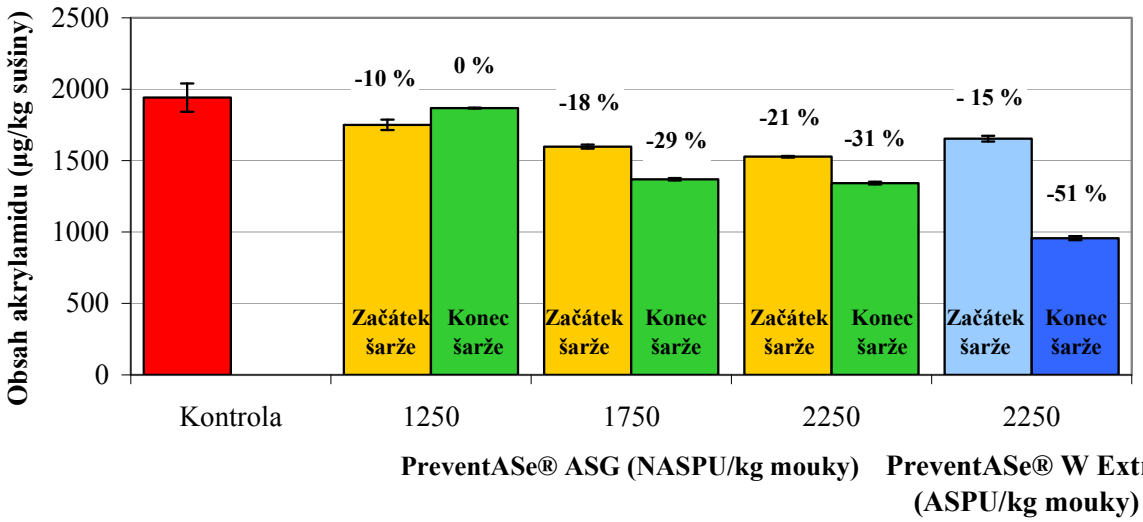
Pro sledování účinnost eliminace akrylamidu použitím enzymu L-asparagináza v průmyslově vyráběných sušenkách byla použity 3 druhy sušenek ze sortimentu Pečiváren Liptovský Hrádok, u nichž byl zjištěn nejvyšší obsah akrylamidu:

- Produkt A: Kakaovo-kokosové sušenky s fruktózou
- Produkt B: Kakaové sušenky s fruktózou polomáčené
- Produkt C: Celozrnné sušenky s fruktózou

Pro eliminace akrylamidu v sušenkách byl do těsta přidáván enzym PreventASe® ASG ve všech třech koncentracích (1250, 1750 a 2250 NASPU/kg mouky) testovaných v modelových podmínkách, při nichž bylo již aplikací nejnižší koncentrace enzymu PreventASe® ASG

dosaženo snížení obsahu akrylamidu pod směrnou hodnotu. Kromě enzymu PreventASe® ASG byl testován v průmyslových podmínkách i enzym PreventASe® W Extra, který byl do těsta aplikován v nejvyšší testované koncentraci (2250 ASPU/kg mouky).

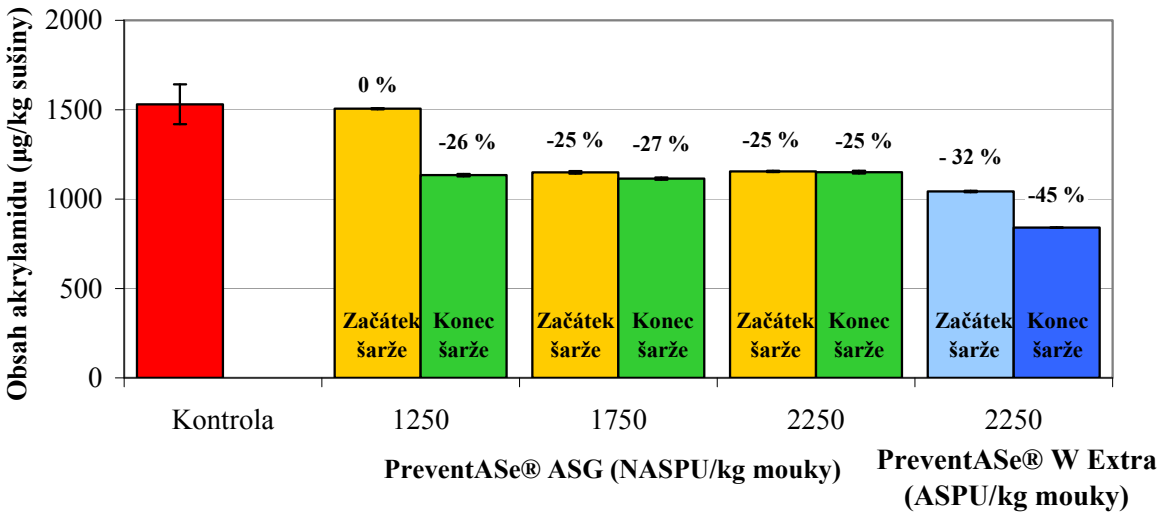
Z aplikace enzymu do Produktu B (Obr. 19) bylo patrné, že při nejnižší koncentraci enzymu PreventASe® ASG (1250 NASPU/kg mouky) nedošlo k výrazným změnám obsahu akrylamidu. Následným zvyšováním koncentrace enzymu se ale obsah akrylamidu snižoval, a při nejvyšší koncentraci enzymu (2250 NASPU/kg mouky) klesl přibližně o 20 – 30 %. Aplikací enzymu PreventASe® W Extra v nejvyšší koncentraci (2250 ASPU/kg mouky) bylo obsah akrylamidu ve finálních sušenkách vyrobených na konci výrobní šarže snížen dokonce až o 50 %. Z výsledků Produktu B také vyplývá, že prodloužením doby působení enzymu PreventASe® ASG lze snížit obsah akrylamidu o dalších 10 % a použitím enzymu PreventASe® W Extra byl zordíl v obsahu akrylamidu v sušenkách ze začátku a z konce výrobní šarže dokonce o 30 %.



Obr. 19: Obsah akrylamidu (µg/kg sušiny) v Produktu B po aplikaci enzymu PreventASe® ASG a PreventASe® W Extra

V porovnání účinnosti eliminace akrylamidu působením enzymu v Produktu C (Obr. 20) je vidět, že při aplikaci enzymu PreventASe® ASG klesl obsah akrylamidu v sušenkách asi o 25 % a se zvyšující se koncentrací enzymu již dále neklesal. Pokles obsahu akrylamidu se také nelišil mezi sušenkami získanými na začátku a na konci jedné výrobní šarže. To mohlo být způsobeno nedostatečnou mobilitou enzymu PreventASe® ASG, a také vyšším obsahem tuku, který negativně ovlivňuje aktivitu enzymu [130]. Tím byl omezen kontakt enzymu a substrátu a pokles obsahu akrylamidu působením enzymu se tak i přes zvyšující se

koncentraci enzymu zastavil. Také v případě aplikace enzymu PreventASe® W Extra na Produkt C nebyl patrný tak velký rozdíl v obsahu akrylamidu na začátku a na konci výrobní šarže v porovnání s působením tohoto enzymu u Produktu B. Přesto snižoval enzym PreventASe® W Extra obsah akrylamidu v Produktu C na konci výrobní šarže o 20 % více než enzym PreventASe® ASG aplikovaný ve stejné koncentraci, což se shoduje s výsledky obsahu akrylamidu po aplikaci enzymů PreventASe® ASG a PreventASe® W Extra do Produktu B.

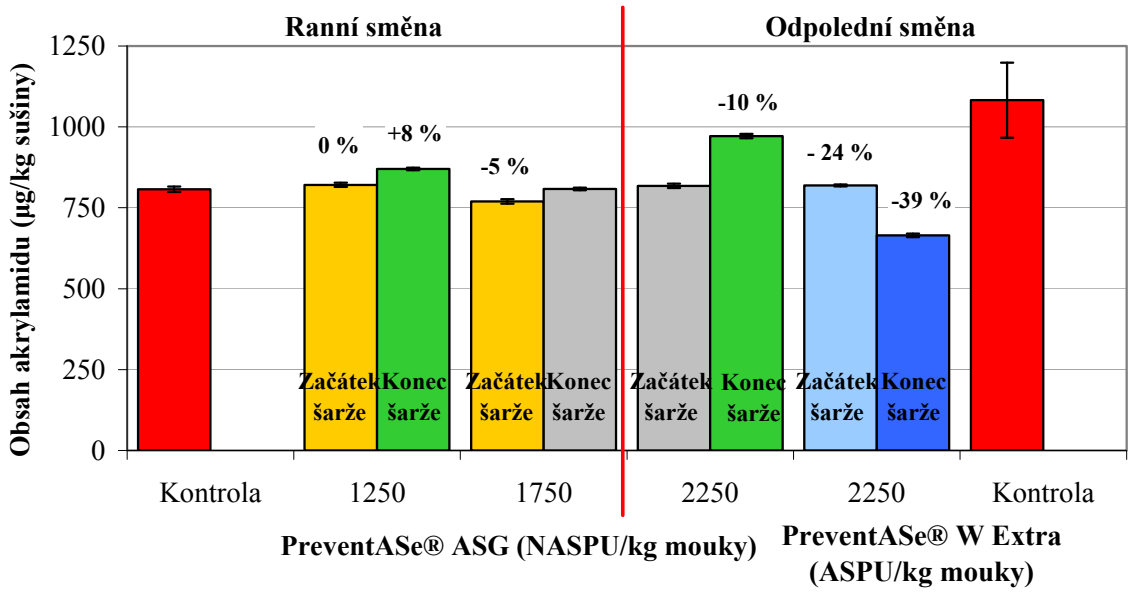


Obr. 20: Obsah akrylamidu (µg/kg sušiny) v Produktu C po aplikaci enzymu PreventASe® ASG a PreventASe® W Extra

Při aplikaci enzymu PreventASe® ASG do Produktu A došlo k výměně ranní a odpolední výrobní směny. Z kontrol na Obr. 21 je zřejmé, že výměnou pracovní směny se změnily i podmínky pečení, které jsou upravovány pekaři z každé směny podle jejich zvyklostí. Pekař odpolední směny totiž zvýšil teplotu a zkrátil tak dobu pečení, což se projevilo zvýšením obsahu akrylamidu v kontrolních sušenkách o 34 % v porovnání s obsahem akrylamidu v sušenkách připravených ranní směnou.

Vzhledem k tomu, že v průběhu enzymatického ošetřování těsta Produktu A byly upravovány podmínky pečení sušenek způsobené výměnou pekařů, nebylo možné přesně stanovit účinnost enzymu PreventASe® ASG. Na Obr. 21 je ale vidět, že aplikací enzymu PreventASe® ASG v nejnižší koncentraci (1250 NASPU/kg mouky) nedošlo na začátku výrobní šarže k statisticky významným změnám obsahu akrylamidu a na konci šarže se dokonce obsah akrylamidu lehce zvýšil. Při aplikaci enzymu PreventASe® ASG v koncentraci 1750 NASPU/kg mouky došlo k mírnému poklesu obsahu akrylamidu na začátku šarže, následně ale došlo k upravování podmínek pečení, tudíž nebylo možné správně stanovit

účinnost enzymu PreventASe® ASG na konci šarže a stejně tak ani na začátku šarže s enzymem v koncentraci 2250 NASPU/kg mouky. Na konci výrobní šarže ošetřené enzymem PreventASe® ASG 2250 NASPU/kg mouky bylo pozorováno snížení obsahu akrylamidu o 10 % o proti kontrole pečené již za podmínek nastavených pekařem z odpolední směny.



Obr. 21: Obsah akrylamidu (µg/kg sušiny) v Produktu A po aplikaci enzymu PreventASe® ASG a PreventASe® W Extra

Průběh působení enzymu PreventASe® W Extra (2250 ASPU/kg mouky) na Produkt A je velice podobný jeho účinku v Produktu C, i když účinnost toho to enzymu v Produktu A byla o trochu nižší, což může být dáno recepturou výrobku.

Jak je vidět z výsledků enzymatického ošetření průmyslově vyráběných sušenek pomocí enzymu L-asparagináza, účinnost enzymu je v průmyslových podmínkách nižší než v modelovém systému. Aplikací enzymu PreventASe® ASG (2250 NASPU/kg mouky) bylo v průmyslových podmínkách dosaženo snížení obsahu akrylamidu o max 30 %, kdežto v laboratorních podmínkách to bylo až o 75 %. Při aplikaci enzymu PreventASe® W Extra (2250 ASPU/kg mouky) v průmyslových podmínkách klesl obsah akrylamidu o max 50 %, přičemž v laboratorních podmínkách to bylo o více než 60 %. Tyto výsledky se shodují s řadou studií, kdy aplikací enzymu asparagináza lze v modelových systémech dosáhnout snížení obsahu akrylamidu až o 85-90 % [35, 91, 127, 128], ovšem v potravinách je to 27-70 % [106, 129]. Tyto rozdíly mohou být způsobeny nevyhnutelnou variabilitou šarží v průmyslové výrobě, či vlivem matrice, tedy jejím složením a strukturou [130].

Praxe ukázala, že enzym PreventASe® W Extra je pro eliminaci akrylamidu vhodnější než enzym PreventASe® ASG, který byl z testovaných 3 enzymů v modelových podmínkách nejúčinnější. Při jeho aplikaci v nejnižší koncentraci (1250 NASPU/kg mouky) byli výsledky snížení obsahu akrylamidu srovnatelné s účinky enzymu PreventASe® W Extra v koncentraci 2250 ASPU/kg mouky. Rozdílná účinnost enzymů mohla být dána způsobem jejich aplikace do těsta průmyslově vyráběných sušenek, kdy sypký enzym PreventASe® W Extra byl přidáván společně s moukou a mohl tak být pomaleji aktivován než kapalný enzym PreventASe® ASG, který byl přidáván s vodou. Na druhou stranu enzym PreventASe® W Extra, vzhledem k jeho aplikaci společně s moukou, byl v těsnějším kontaktu s asparaginem (hlavním prekurzorem akrylamidu), jehož hlavním zdrojem v těstě je mouka.

Kromě efektivnosti enzymu PreventASe® W Extra je jeho výhodou v porovnání s enzymem PreventASe® ASG i jeho konzistence. Enzym PreventASe® ASG je dodáván jako kapalina, protože jeho nosičem je 50 % glycerol, kdežto enzym PreventASe® W Extra je vyráběn ve formě mikrogranulí navázaných na pšeničnou mouku a je tedy v sypké formě, což usnadňuje manipulaci s ním, navažování a dávkování. I když při zavedení aplikace enzymu L-asparagináza do průmyslové výroby je vhodné vybavit výrobu automatickým zařízením pro dávkováním enzymu, pomocí kterého by bylo zajištěno jeho přesné dávkování a minimalizovány případné ztráty.

5.4.3.3 Porovnávání účinnosti eliminace asparaginu použitím enzymu asparagináza v průmyslových podmínkách

Kromě eliminace akrylamidu byl sledován i pokles obsahu asparaginu po ošetření těsta enzymem L-asparagináza a současně 3 dalších vybraných aminokyselin (kyselina asparagová, glutamin, kyselina glutamová). Výsledky uvedené v Tab. 50, 51 a 52 ukazují, že působením enzymu PreventASe® W Extra a PreventASe® ASG klesal obsah asparaginu, čímž došlo k mírnému nárůstu obsahu kyseliny asparagové. Obsah glutaminu a kyseliny glutamové se v těstě měnil pouze minimálně. Tyto výsledky jsou ve shodě s dalšími studiemi, kdy Hendriksen *et al.* [84] uvádí, že při porovnání výsledků řady studií byl pozorován pouze malý přímý vztah mezi procentuálním snížením obsahu asparaginu a obsahu akrylamidu v různých produktech. To je pravděpodobně způsobeno podmínkami zpracování a dalšími složkami receptury, které se liší produkt od produktu [84]. Dalším možným důvodem nejednoznačnosti výsledků stanovení obsahu aminokyselin by v tomto případě mohla být i nestabilita těst, která mohla vést ke změnám obsahu aminokyselin v těstech v době od jejich odebrání a inaktivace enzymu až po jejich stanovení.

Tab. 50: Obsah aminokyselin (mg/kg) v těstě Produktu A s enzymem

Produkt A	Asn		Asp	
	Začátek šarže	**Konec šarže**	**Začátek šarže**	**Konec šarže**
Kontrola	48 ± 5		65 ± 9	
PreventASe® ASG				
1250 NASPU/kg mouky	47 ± 6	44 ± 2	64 ± 7	69 ± 4
1750 NASPU/kg mouky	53 ± 5	44 ± 7	78 ± 6	73 ± 8
2250 NASPU/kg mouky	41 ± 5	48 ± 4	63 ± 6	77 ± 6
PreventASe® W Extra				
2250 ASPU/kg mouky	38 ± 2	33 ± 2	87 ± 3	85 ± 3

Produkt A	Gln		Glu	
	Začátek šarže	**Konec šarže**	**Začátek šarže**	**Konec šarže**
Kontrola	37 ± 6		60 ± 8	
PreventASe® ASG				
1250 NASPU/kg mouky	34 ± 4	35 ± 2	57 ± 6	58 ± 3
1750 NASPU/kg mouky	45 ± 4	40 ± 6	71 ± 6	63 ± 8
2250 NASPU/kg mouky	35 ± 4	44 ± 5	57 ± 4	67 ± 7
PreventASe® W Extra				
2250 ASPU/kg mouky	43 ± 2	41 ± 1	70 ± 3	67 ± 2

Tab. 51: Obsah aminokyselin (mg/kg) v těstě Produktu B s enzymem

Produkt B	Asn		Asp	
	Začátek šarže	**Konec šarže**	**Začátek šarže**	**Konec šarže**
Kontrola	53 ± 8		79 ± 10	
PreventASe® ASG				
1250 /kg mouky	64 ± 5	57 ± 3	100 ± 8	101 ± 5
1750 NASPU/kg mouky	45 ± 6	47 ± 1	79 ± 8	93 ± 3
2250 NASPU/kg mouky	46 ± 3	49 ± 4	88 ± 4	95 ± 3
PreventASe® W Extra				
2250 ASPU/kg mouky	37 ± 3	30 ± 4	100 ± 5	97 ± 12

Produkt B	Gln		Glu	
	Začátek šarže	Konec šarže	Začátek šarže	Konec šarže
Kontrola	33 ± 6		53 ± 7	
PreventASe® ASG				
1250 NASPU/kg mouky	45 ± 5	39 ± 3	68 ± 3	63 ± 3
1750 NASPU/kg mouky	35 ± 4	43 ± 1	53 ± 6	59 ± 2
2250 NASPU/kg mouky	38 ± 2	41 ± 3	57 ± 3	64 ± 3
PreventASe® W Extra				
2250 ASPU/kg mouky	37 ± 3	34 ± 4	54 ± 4	49 ± 6

Tab. 52: Obsah aminokyselin (mg/kg) v těstě Produktu C s enzymem

Produkt C	Asn		Asp	
	Začátek šarže	Konec šarže	Začátek šarže	Konec šarže
Kontrola	87 ± 6		67 ± 5	
PreventASe® ASG				
1250 NASPU/kg mouky	83 ± 5	82 ± 5	74 ± 6	80 ± 2
1750 NASPU/kg mouky	85 ± 5	73 ± 2	78 ± 3	83 ± 5
2250 NASPU/kg mouky	74 ± 5	70 ± 5	74 ± 5	83 ± 4
PreventASe® W Extra				
2250 ASPU/kg mouky	69 ± 3	65 ± 7	82 ± 2	93 ± 8

Produkt C	Gln		Glu	
	Začátek šarže	Konec šarže	Začátek šarže	Konec šarže
Kontrola	29 ± 3		69 ± 4	
PreventASe® ASG				
1250 NASPU/kg mouky	26 ± 1	29 ± 1	74 ± 6	75 ± 2
1750 NASPU/kg mouky	30 ± 2	30 ± 1	74 ± 3	72 ± 2
2250 NASPU/kg mouky	28 ± 2	29 ± 1	68 ± 5	71 ± 2
PreventASe® W Extra				
2250 ASPU/kg mouky	28 ± 1	31 ± 3	64 ± 3	70 ± 4

5.4.3.4 Vliv enzymu L-asparagináza na kvalitativní parametry sušenek vyráběných v průmyslových podmínkách

Také při porovnávání účinnosti eliminace akrylamidu v průmyslově vyráběných sušenkách aplikací enzymu asparagináza byly sledovány případné změny fyzikálních, texturních a organoleptických vlastností sušenek a jejich těst vyvolané použitím enzymu.

U vzorků průmyslově vyráběných sušenek a jejich těst byla působením enzymu asparagináza sledována změna pH a aktivity vody (viz Tab. 53, 54 a 55). Z porovnání hodnot aktivity vody a pH vzorků sušenek a jejich těst nebylo zjištěno, že by se tyto hodnoty na začátku a na konci výrobní šarže statisticky významně měnily, a to ani u Produktu A, kde během výroby došlo ke střídání směn, přičemž odpolední směna pekla sušenky při vyšší teplotě a kratší dobu. Hodnoty jsou tedy uváděny jako průměry hodnot vzorků odebraných na začátku a konci šarže.

Tab. 53: Aktivita vody a pH těst a sušenek Produktu A s a bez enzymu

Produkt A	aw těsta	pH těsta	aw sušenek	pH sušenek
Kontrola	0,690 ± 0,014	7,11 ± 0,19	0,166 ± 0,032	6,23 ± 0,21
PreventASe® ASG				
1250 NASPU/kg mouky	0,674 ± 0,003	7,00 ± 0,14	0,150 ± 0,009	6,28 ± 0,08
1750 NASPU/kg mouky	0,666 ± 0,002	6,96 ± 0,18	0,138 ± 0,007	6,19 ± 0,04
2250 NASPU/kg mouky	0,658 ± 0,001	7,07 ± 0,15	0,144 ± 0,041	6,08 ± 0,11
PreventASe® W Extra				
2250 ASPU/kg mouky	0,688 ± 0,003	6,89 ± 0,16	0,147 ± 0,003	6,07± 0,11

Tab. 54: Aktivita vody a pH těst a sušenek Produktu B s a bez enzymu

Produkt B	aw těsta	pH těsta	aw sušenek	pH sušenek
Kontrola	0,695 ± 0,003	8,03 ± 0,19	0,166 ± 0,008	6,91 ± 0,10
PreventASe® ASG				
1250 NASPU/kg mouky	0,688 ± 0,002	8,01 ± 0,14	0,139 ± 0,004	6,81 ± 0,05
1750 NASPU/kg mouky	0,691 ± 0,002	7,99 ± 0,17	0,140 ± 0,008	6,77 ± 0,01
2250 NASPU/kg mouky	0,691 ± 0,002	8,03 ± 0,13	0,141 ± 0,004	6,74 ± 0,04
PreventASe® W Extra				
2250 ASPU/kg mouky	0,698 ± 0,002	7,91 ± 0,08	0,155 ± 0,003	6,84 ± 0,07

Tab. 55: Aktivita vody a pH těst a sušenek Produktu C s a bez enzymu

Produkt C	aw těsta	pH těsta	aw sušenek	pH sušenek
Kontrola	0,750 ± 0,011	7,93 ± 0,20	0,238 ± 0,018	6,94 ± 0,04
PreventASe® ASG				
1250 NASPU/kg mouky	0,756 ± 0,001	7,75 ± 0,25	0,234 ± 0,024	6,92 ± 0,05
1750 NASPU/kg mouky	0,752 ± 0,001	7,65 ± 0,21	0,226 ± 0,002	6,93 ± 0,08
2250 NASPU/kg mouky	0,750 ± 0,002	7,84 ± 0,13	0,229 ± 0,021	6,93± 0,09
PreventASe® W Extra				
2250 ASPU/kg mouky	0,740 ± 0,002	7,78 ± 0,16	0,236 ± 0,007	6,94± 0,02

Výsledné pH a aktivita vody těst a sušenek s enzymem byly porovnávány s kontrolami (bez přídavku enzymu), což ukázalo, že eliminací akrylamidu aplikací enzymu asparagináza nedochází k statisticky významným změnám v těchto hodnotách.

U sušenek byl kromě aktivity vody a pH stanovován i obsah sušiny a měřeny jejich rozměry a hmotnost. Z rozměrů sušenek byla sledována jejich výška, šířka a délka. Vzhledem k tomu, že Produkty A a C byly vyráběny ve třech různých tvarech, byl pro sledování a porovnávání rozměrů vybrán jen jeden tvar. Naměřené hodnoty obsahu sušiny, rozměrů a hmotnosti jsou uvedeny pro jednotlivé produkty v Tab. 56, 57 a 58. I zde jsou výsledné hodnoty uváděny jako průměr hodnot naměřených u vzorků z počátku a konce výroby šarže, protože se tyto hodnoty v rámci šarže působením enzymu statisticky významně neměnily. Ani u těchto parametrů pro Produkt A (Tab. 56) nebyly zjištěny statisticky významné změny, které by mohly být důsledkem střídání ranní a odpolední směnou.

Tab. 56: Rozměry, hmotnost a obsahu sušiny v Produkt A s a bez enzymu

Produkt A	*v* (mm)	*š* (mm)	*d* (mm)	*m* (g)	sušina (%)
Kontrola	7,4 ± 0,3	26,9 ± 0,2	34,8 ± 0,4	2,8 ± 0,2	97,6 ± 0,4
PreventASe® ASG					
1250 NASPU/kg mouky	7,4 ± 0,2	26,8 ± 0,1	34,8 ± 0,4	2,9 ± 0,1	97,6 ± 0,2
1750 NASPU/kg mouky	7,3 ± 0,2	26,9 ± 0,3	34,6 ± 0,5	2,9 ± 0,1	97,7 ± 0,1
2250 NASPU/kg mouky	7,5 ± 0,2	27,0 ± 0,2	34,3 ± 0,4	2,8 ± 0,1	98,1 ± 0,2
PreventASe® W Extra					
2250 ASPU/kg mouky	7,5 ± 0,2	27,0 ± 0,1	34,8 ± 0,4	2,9 ± 0,1	97,9 ± 0,2

Tab. 57: Rozměry, hmotnost a obsahu sušiny v Produkt B s a bez enzymu

Produkt B	***v* (mm)**	***š* (mm)**	***d* (mm)**	***m* (g)**	**sušina (%)**
Kontrola	6,9 ± 0,2	45,7 ± 0,2	52,5 ± 0,4	9,2 ± 0,2	97,1 ± 0,2
PreventASe® ASG					
1250 NASPU/kg mouky	6,7 ± 0,1	45,7 ± 0,2	52,5 ± 0,3	9,0 ± 0,1	97,6 ± 0,1
1750 NASPU/kg mouky	6,6 ± 0,1	45,6 ± 0,2	52,0 ± 0,3	8,9 ± 0,1	97,6 ± 0,2
2250 NASPU/kg mouky	6,7 ± 0,1	45,6 ± 0,1	51,9 ± 0,3	8,9 ± 0,1	97,5 ± 0,1
PreventASe® W Extra					
2250 ASPU/kg mouky	6,7 ± 0,1	45,7 ± 0,2	52,3 ± 0,4	9,0 ± 0,1	97,2 ± 0,1

Tab. 58: Rozměry, hmotnost a obsahu sušiny v Produkt C s a bez enzymu

Produkt C	***v* (mm)**	***š* (mm)**	***d* (mm)**	***m* (g)**	**sušina (%)**
Kontrola	8,4 ± 0,4	27,4 ± 0,4	34,3 ± 0,8	3,2 ± 0,1	96,6 ± 0,2
PreventASe® ASG					
1250 NASPU/kg mouky	8,7 ± 0,3	27,6 ± 0,4	34,6 ± 0,7	3,3 ± 0,1	96,8 ± 0,3
1750 NASPU/kg mouky	8,1 ± 0,5	27,3 ± 0,4	34,2 ± 0,9	3,0 ± 0,2	96,9 ± 0,1
2250 NASPU/kg mouky	8,0 ± 0,4	27,2 ± 0,3	34,0 ± 0,8	3,0 ± 0,2	96,9 ± 0,4
PreventASe® W Extra					
2250 ASPU/kg mouky	8,2 ± 0,2	27,5 ± 0,3	34,2 ± 0,7	3,2 ± 0,1	96,7 ± 0,2

Při porovnání výsledných hodnot sušenek s enzymem (Tab. 56, 57 a 58) s kontrolními sušenkami nebylo zjištěno, že by působením enzymu asparagináza docházelo ke statisticky významným změnám obsahu sušiny, rozměrů a hmotnosti sušenek. To je důležité nejen pro přijetí spotřebitelem, ale také především pro efektivitu výroby a výrobce tak nemusí např. upravovat velikost obalu nebo údaje o gramáži balení výrobku.

Cílem porovnávání barvy průmyslově vyráběných sušenek bylo zjistit, zda aplikací enzymu neodchází ke změnám finální barvy sušenek, které je jedním z klíčových faktorů pro přijetí spotřebitelem. Před měřením barvy musely být sušenek zhomogenizovány a to kvůli tvaru jejich povrchu, který by ovlivnil výsledné hodnoty barvy při přímém měření. Barva jednotlivých produktů je vyjádřena v hodnotách *L* a* b** v Tab. 59, 60 a 61. *L* a* b** hodnoty barvy naměřené u vzorků Produktu B a Produktu C na začátku šarže se nijak statisticky významně nelišily od *L* a* b** hodnot barvy naměřených u vzorků Produktu B a Produktu C z konce šarže. Hodnoty *L* a* b** jsou tak v Tab. 60 a 61 uvedeny jako průměry se směrodatnou odchylkou vypočítané z výsledků naměřených u vzorků odebraných na začátku

a konci výroby šarže.. Také v případě Produktu A, u něhož došlo k výměně ranní a odpolední směny, jsou hodnoty *L* a* b** uvedeny v Tab. 59 jako průměry se směrodatnou odchylkou vypočítané z výsledků naměřených u vzorků odebraných na začátku a konci výroby šarže, protože ani zde nebyl zaznamenán statisticky významný barevný rozdíl mezi začátkem a koncem výrobní šarže. Pouze jsou zde výsledky rozděleny podle toho, zda byl produkt připravován ranní nebo odpolední směnou.

Naměřené hodnoty *L* a* b** sušenek s enzymem byly porovnávány s kontrolou nastavením tolerančního limitu ΔL^* = +1,00/-1,00, Δa^* = +1,00/-1,00 a Δb^* = +1,00/-1,00, při němž je barevný rozdíl mezi jednotlivými vzorky pro lidské oko ještě neviditelný. Na základě nastaveného tolerančního limitu bylo zjištěno, že při aplikaci enzymů PreventASe® ASG a PreventASe® W nedochází k významným pozorovatelným změnám finální barvy průmyslově vyráběných sušenek, a to ani při zvyšující se koncentraci enzymu.

Z výsledků barvy Produktu A uvedených v Tab. 59 je patrný barevný rozdíl sušenek připravovaných ranní a odpolední směnou, kdy pekař v odpolední směně pekl sušenky kratší dobu při vyšší teplotě, což se ve výsledku projevilo tmavším zbarvením sušenek (poklesem hodnoty *L**). Při porovnání hodnot barvy s obsahem akrylamidu sušenek bylo zjištěno, že *L** hodnota kontrolních sušenek koreluje s obsahem akrylamidu v nich (korelační koeficient je -0,92), kdy s tmavnutím sušenek (pokles hodnoty *L**) nárůstá obsahu akrylamidu. To se shoduje s výsledky studie Gökmena & Senyuva [139], v níž uvádí, že barva může být spolehlivým indikátorem obsahu akrylamidu v tepelně opracovaných potravinách.

Tab. 59: Hodnoty barvy Produktu A vyjádřené v systému CIELab

Produkt A	***L****	***a****	***b****
Ranní směna			
Kontrola	42,2 ± 0,8	10,9 ± 0,1	22,9 ± 0,3
PreventASe® ASG			
1250 NASPU/kg mouky	42,3 ± 0,4	11,0 ± 0,5	23,1 ± 1,2
1750 NASPU/kg mouky	42,4 ± 0,3	11,0 ± 0,1	23,3 ± 0,1
Odpolední směna			
Kontrola	36,5 ± 0,9	9,7 ± 0,1	19,3 ± 0,3
PreventASe® ASG			
2250 NASPU/kg mouky	36,9 ± 0,3	10,0 ± 0,1	20,2 ± 0,2
PreventASe® W Extra			
2250 ASPU/kg mouky	36,9 ± 0,6	9,7 ± 0,2	19,6 ± 0,4

Tab. 60: Hodnoty barvy Produktu B vyjádřené v systému CIELab

Produkt B	***L****	***a****	***b****
Kontrola	47,9 ± 0,6	10,6 ± 0,2	25,1 ± 0,3
PreventASe® ASG			
1250 NASPU/kg mouky	47,6 ± 0,3	10,7 ± 0,1	25,3 ± 0,1
1750 NASPU/kg mouky	47,2 ± 0,1	10,7 ± 0,1	25,2 ± 0,1
2250 NASPU/kg mouky	47,2 ± 0,3	10,8 ± 0,1	25,4 ± 0,1
PreventASe® W Extra			
2250 ASPU/kg mouky	47,6 ± 0,6	10,6 ± 0,3	25,2 ± 0,6

Tab. 61: Hodnoty barvy Produktu C vyjádřené v systému CIELab

Produkt C	***L****	***a****	***b****
Kontrola	62,2 ± 0,8	8,0 ± 0,4	29,5 ± 1,1
PreventASe® ASG			
1250 NASPU/kg mouky	62,1 ± 0,5	8,0 ± 0,2	29,2 ± 0,3
1750 NASPU/kg mouky	61,4 ± 0,1	8,4 ± 0,1	29,8 ± 0,1
2250 NASPU/kg mouky	61,3 ± 0,9	8,5 ± 0,3	30,0 ± 0,3
PreventASe® W Extra			
2250 ASPU/kg mouky	62,5 ± 0,1	7,8 ± 0,3	28,4 ± 0,6

Kvalitativní parametry průmyslových sušenek byly hodnoceny i senzoricky pomocí trojúhelníkové zkoušky, kdy byly hodnotitelům předloženy 3 trojice sušenek, v nichž dvě byly shodné a jedna odlišná, což představuje 6 možných kombinací, takže pravděpodobnost správného výsledku tipováním byla 33,3 %. Úkolem hodnotitelů bylo zjistit rozdíl v jedné nebo více organoleptických vlastností sušenek (vzhled, barva, textura, pach nebo chuť výrobku). Pro senzorické hodnocení byly zvoleny sušenky kontrolní a sušenky s přídavkem enzymu PreventASe® W Extra (2250 ASPU/kg mouky) odebrané na konci výrobní šarže.

U Produktu B a Produktu C nebyl statisticky prokázán vliv enzymu L-asparagináza na finální organoleptické vlastnosti sušenek se sníženým obsahem akrylamidu. Ovšem v případě Produktu A byly hodnotiteli zjištěny barevné a chuťové rozdíly mezi kontrolními sušenkami a sušenkami s enzymem. Barevné rozdíly na povrchu sušenek nebyly při měření barvy kolorimetrem zaznamenány, protože barva sušenek nemohla být měřena přímo, ale bylo nutné vzorky nejprve zhomogenizovat vzhledem k jejich nerovnoměrnému povrchu. Barevné a chuťové rozdíly na povrchu sušenek mohly být způsobeny především úpravou pečícího

režimu pekařem z odpolední směny po výměně směn, i přestože pro senzorické hodnocení byly použity sušenky připravované pouze odpolední směnou. Pekař z odpolední směny totiž během pečení jednotlivých šarží Produktu A neustále pečící režim upravoval.

5.5 Odhadem dopadu aplikace metod eliminace akrylamidu na expozici

Výsledky studia tvorby a eliminace akrylamidu v této práci ukázaly možné způsoby snížení obsahu akrylamidu ve vybraných cereálních potravinách. Na základě těchto poznatků byl zjišťován možný dopad aplikace těchto metod v praxi na expozici akrylamidem z potravin. Pro stanovení expozice akrylamidem u studentů středních škol z České a Slovenské republiky byly použity hodnoty obsahu akrylamidu v rozsahu od minimální po maximální úroveň přítomnou v potravinách vzhledem k široké změně obsahu akrylamidu nejen v různých potravinových kategoriích, ale i v různých značkách potravin ze stejné kategorie [4, 18].

Při odhadu dopadu opatření snižujících obsah akrylamidu v cereálních potravinách byly při výpočtu brány v úvahu maximální hodnoty akrylamidu, které byly sníženy na hodnoty získané z výsledků uvedených v předcházejících kapitolách (Tab. 62).

Tab. 62:Potraviny s původním a sníženým obsahem akrylamidu a jeho denní příjem z nich

		Obsah akrylamidu (µg/g)		**Příjem akrylamidu (µg/den)**	
		Min	**Max**	**Min**	**Max**
Perník plněný	původní	0,005	1,582	0,022	7,022
	snížený	0,005	0,791	0,022	3,511
Perníčky s polevou	původní	0,005	0,698	0,036	4,958
	snížený	0,005	0,349	0,036	2,479
Sladké sušenky neplněné	původní	0,016	2,561	0,456	72,966
	snížený	0,016	1,665	0,456	47,438
Chléb konzumní	původní	0,005	0,162	0,463	10,283
	snížený	0,005	0,040	0,463	2,974

Maximální obsah akrylamidu pro chléb konzumní byl snížen z 0,162 µg/g na 0,040 µg/g, což je přibližný obsah akrylamidu stanovený v chlebech připravených v domácí pekárně

uváděný v kapitole 5.2. Pro perníky byla maximální hodnota obsahu akrylamidu snížena na polovinu, protože z výsledků eliminace akrylamidu v perníkách v kapitole 5.3 vyplynulo, že 30 % nahrazením žitné mouky v receptuře moukou pohankovou a v kombinaci s vhodně zvoleným kořením lze dosáhnout snížení obsahu akrylamidu v perníkách až o 50 %. Podobně byl upraven i maximální obsah akrylamidu v sladkých sušenkách neplněných, kde byla tato hodnota snížena asi o 1/3, protože aplikací enzymu L-asparagináza v průmyslových podmínkách bylo dosaženo poklesu obsahu akrylamidu v diabetických sušenkách v průměru o 35 % (kapitola 5.4.3).

Použitím hodnot sníženého obsahu akrylamidu ve vybraných potravinách uvedených v Tab. 62 byla následně přepočítána expozice akrylamidem z potravin studentů středních škol České a Slovenské republiky. Z Tab. 63 je patrné, že snížením obsahu akrylamidu v sušenkách (o 35 %), chlebu (o 75 %) a perníkách (o 50 %) lze dosáhnout snížení expozice akrylamidem v průměru o 10 %.

Tab. 63: Zatížení organismu akrylamidem u českých a slovenských studentů (μg/kg bw/den) před a po snížení maximální hodnoty obsahu akrylamidu ve vybraných potravinách

Studenti	**Obsah akrylamidu**	**Česká republika**		**Slovenská republika**	
		Střední (P50)	Vysoká (P90)	Střední (P50)	Vysoká (P90)
Všichni	původní	2,05	3,83	1,87	3,77
	snížený	1,80	3,47	1,65	3,50
Chlapci	původní	2,24	3,96	2,19	4,36
	snížený	2,07	3,66	2,06	3,90
Dívky	původní	1,94	3,33	1,62	3,60
	snížený	1,78	3,12	1,36	3,24

Pokles střední (P50) i vysoké (P90) expozice akrylamidem u chlapců a dívek z České republiky je porovnatelný. V případě chlapců a dívek ze Slovenské republiky je pokles při vysoké (P90) expozici akrylamidem také porovnatelný, ale při střední (P50) expozici akrylamidem byl u chlapců a dívek pozorován výrazný rozdíl. Snížení maximálních hodnot obsahu akrylamidu ve vybraných potravinách se u chlapců Slovenské republiky projevilo pouze 6 % poklesem expozice akrylamidu, kdežto u dívek došlo až k 16 % snížení. Dívky ze Slovenské republiky konzumují totiž o 35 % více sladkých neplněných sušenek než chlapci,

čímž se u nich pokles maximálního obsahu akrylamidu v sušenkách výrazněji projeví na expozici akrylamidem.

Porovnání expozice akrylamidem z potravin u studentů z České a Slovenské republiky s hodnotami tolerovatelného denního příjmu (2,6 μg/kg bw/den) z hlediska prevence vzniku rakoviny [185] ukazuje, že aplikací metod snižujících tvorbu akrylamidu lze snížit možné riziko vzniku rakoviny konzumací potravin se zvýšeným obsahem akrylamidu.

Snížením maximálních hodnot obsahu akrylamidu ve vybraných potravinách vedlo také ke snížení podílu skupiny Sušenky, krekry, křupavý chléb a podobné výrobky na zdroji příjmu akrylamidu z potravin (asi o 4 %), čímž ale dochází k nárůstu podílu skupiny Bramborové lupínky. Při porovnání podílu hlavních denních jídel na celkovém denním příjmu akrylamidu u studentů z České a Slovenské republiky bylo zjištěno, že snížením maximální hodnoty obsahu akrylamidu ve vybraných potravinách nedošlo k významné změně a podíl hlavních denních jídel na celkovém denním příjmu akrylamidu zůstal stejný.

6 ZÁVĚR

Cílem dizertační práce bylo rozšíření znalostní databáze o možnosti eliminace akrylamidu ve vybraných druzích tepelně zpracovaných potravin a jejich aplikace v technologickém procesu výroby potravin spolu s charakterizací mechanismu eliminace, jakož i důsledků aplikací na kvalitu produktů, technologii výroby a expozici. Dosažením tohoto cíle by bylo možné navrhnout změny výrobních procesů, které zajistí produkci potravin se sníženým obsahem akrylamidu, čímž by došlo k výrazné redukci zatížení lidského organismu tímto potenciálním karcinogenem a přispělo by se tak k ochraně zdraví spotřebitelů.

V prvním kroku byl proveden předběžný průzkum expozice středoškolských studentů České a Slovenské republiky akrylamidem prostřednictvím dotazníku. Porovnáním zatížení organismu českých a slovenských studentů akrylamidem ukázalo, že čeští i slovenští studenti jsou vystaveni přibližně stejné zátěži organismu akrylamidem. Z výsledků také vyplynulo, že studenti jsou akrylamidem nejvíce zatíženi mimo hlavní jídla, zvláště ze sladkých neplněných sušenek, bramborových lupínků a v neopomenutelné míře i z chleba a pečiva.

Výsledky o expozici akrylamidem z potravin, který by v nadměrné míře mohl vést až ke vzniku rakovinného onemocnění, by měli být výzvou k odpovědnému postoji k vlastnímu zdraví. Na základě těchto poznatků je vhodné upravit své stravovací návyky tak, aby došlo k minimalizaci konzumace potravin s vysokým obsahem akrylamidu a tím i ke snížení denního příjmu akrylamidu ze stravy. Na druhé straně je důležité, aby iniciativa vedoucí ke snižování obsahu akrylamidu v potravinách aplikací dostupných a ověřených metod jeho eliminace vycházela především z řad výrobců předmětných potravinářských produktů v úzké spolupráci s výzkumnými institucemi.

Jedním ze základních pilířů stravy jsou pekařské výrobky, které se nezanedbatelnou měrou podílí na expozici akrylamidem z potravin. Studium distribuce akrylamidu v chlebech ukázalo, že téměř veškerý obsah akrylamidu stanovený v chlebu se nachází v jeho kůrce chleba, která tvoří asi 5 – 15 % celého chleba, přičemž střídka obsahuje pouze nízké hodnoty akrylamidu (někdy až pod LOQ). Během pečení totiž střídka dosahuje obvykle teploty 94 – 98 °C, kdežto povrch chleba je vystaven teplotám v rozmezí až 195 – 280 °C [189, 190]. Při porovnání obsahu akrylamidu v chlebech bylo zjištěno, že chleby z obchodní sítě mají celkový obsah akrylamidu jen o málo vyšší než chleby z domácí pekárny, ale obsah akrylamidu v kůrce byl až 10x vyšší. Tento rozdíl v obsahu akrylamidu v chlebech z obchodní sítě a chlebech z domácí pekárny může být dán složením a podmínkami jejich přípravy a pečení.

Optimalizace receptury chlebových směsí byla zaměřena na udržení kvality z nich připraveného chleba po celou dobu trvanlivosti chlebové směsi, kdy navrženým způsobem jak toho dosáhnout bylo zvýšení obsahu droždí v chlebové směsi, což pozitivně působí také na redukci akrylamidu, kdy během fermentace dochází činností kvasinek k odstranění prekurzorů akrylamidu a i poklesu pH. Avšak stanovením obsahu akrylamidu a senzorické hodnocení organoleptických vlastností slunečnicového chlebu s různým obsahem droždí a rozdílnou dobou skladování bylo zjištěno, že zvyšování obsahu droždí v chlebové směsi nezajistilo požadovanou kvalitu chleba po celou dobu trvanlivosti směsi, a dokonce vedlo ke zvyšování obsahu akrylamidu v chlebu po inaktivaci droždí. Vyšší obsah droždí v chlebové směsi se s prodloužením doby skladování vedl k poklesu intenzity typického chlebového pachu a chuti u chlebů připravených z těchto směsí a ke zvýraznění dalších jejich spotřebitelem nežádoucích atributů v porovnání s chlebem s původním obsahem droždí.

Složení receptury chlebových směsí a způsob přípravy chleba se sníženým obsahem akrylamidu z těchto směsí je předmětem ochrany užitného vzoru č. 25037 registrovaným Úřadem průmyslového vlastnictví ČR (Příloha 4) a užitných vzorů č. 6371 a č. 6420 registrované Úřadem průmyslového vlastnictví SR (Příloha 5 a 6).

Vzhledem k tomu, že v posledních letech vzrostl zájem o potraviny s obsahem biaktivních látek s antioxidačními vlastnostmi, byla další kapitola zaměřena na zkoumání dopadu aplikace antioxidantu na eliminaci akrylamidu v perníkách. Testování náhrady 30 % podílu žitné mouky v receptuře perníků pohankovou moukou bylo dosaženo snížení obsahu akrylamidu téměř o 50 %. To mohlo být dáno nižším obsahem asparaginu v pohankové mouce nebo i látkami, jako je rutin, kvercetin, isoorientin a další, které účinně snižují oxidační stres buněk, a které jsou přirozenou složkou pohanky [197].

Studium vlivu různých druhů koření na vznik akrylamidu v perníkách s pohankovou moukou a možné korelace k jejich radikál zhášející aktivitě ukázalo, že obsah akrylamidu může být snížen použitím fenyklu, anýzu, hřebíčku, vanilky nebo bílého pepře (o 9 - 21 %). Naopak koriandr a skořice obsah akrylamidu v perníkách výrazně zvyšovali (o 18 - 54 %). Při aplikaci badyánu nebyly zjištěny změny v tvorbě akrylamidu. Ovšem zajímavý byl účinek zázvoru, muškátového oříšku, kardamomu nebo nového koření, jejichž vliv na tvorbu akrylamidu v perníkách se lišil v závislosti na použité pohankové mouce. Z těchto koření byla největší rozporuplnost vlivu pozorována u kardamomu, který v přítomnosti světlé pohankové mouky mírně snižoval obsah akrylamidu (o 9 %), ale v perníkách s moukou z pražené pohanky naopak tvorbu akrylamidu podporoval (nárůst až o 27 %).

Mezi DPPH • radikál zhášející aktivitou koření a konečným obsahem akrylamidu nebyla pozorována prakticky žádná korelace, což by mohlo vést k závěru, že konečný obsah akrylamidu byl pravděpodobně ovlivněn nejen radikál zhášející aktivitou použitých koření, ale i jejich chemickým složením a reaktivností jednotlivých složek se synergickými nebo antagonistickými účinky v matrici. Z toho důvodu by bylo vhodné pokračovat ve studiu jednotlivých složek koření a jejich dopadu na tvorbu akrylamidu v modelovém systému.

Směs koření pro přípravu perníku obsahuje druhy koření s významným pozitivním (fenykl, anýz, hřebíček) ale i negativním (koriandr, skořice) dopadem na potlačení akrylamidu. Z tohoto důvodu by bylo vhodné změnit poměr jednotlivých koření ve směsi zvýšením obsahu koření potlačujícího vznik akrylamidu. Druhou možností by mohla být změna složení směsi koření nahrazením koření podporujícího vznik akrylamidu jinými vhodnými druhy koření, které vznik akrylamidu potlačují, jako je např. vanilka. Získaná směs koření pro přípravu perníčků by v obou případech měla snižovat obsah akrylamidu v konečném produktu a zároveň by měli být zachovány požadované senzorické vlastnosti tohoto produktu. Vytvoření směsi koření pro přípravu perníků, která by zajistila nižší obsah akrylamid v nich, je navrženo na předmět ochrany užitného vzoru.

Předběžný průzkum spotřebitelských zvyklostí ukázal, že nejvíce je lidský organismu zatěžován akrylamidem přijatým z potravin konzumovaných mimo hlavní denní jídla, přičemž v této době dominují jako hlavní zdroj akrylamidu sladké sušenky. Ve spolupráci s Pečivárnami Liptovský Hrádok tak byl proveden monitoring výskytu akrylamidu v celém jejich sortimentu výrobků s úmyslem navrhnout optimalizace technologie výroby, případně výrobní receptury vybraných druhů trvanlivého pečiva s cílem minimalizovat obsah akrylamidu a tím zabezpečit zvýšení zdravotní bezpečnosti výrobků. Zvýšený obsah akrylamidu byl pozorován u sušenek určených pro diabetiky, u nichž je v receptuře namísto sacharózy používána fruktóza, která je významným prekurzorem akrylamidu a vede k vyšší tvorbě akrylamidu než sacharóza [102]. V případě tří výrobků byl stanoven vysoký obsah akrylamidu (v rozmezí 736 – 1058 µg/kg sušiny), který překračoval směrnou hodnotu (500 µg/kg) pro komoditu „sušenky“ uvedenou v Doporučení komise ze dne 10.1.2011 o zkoumání množství akrylamidu v potravinách [33].

Pro eliminaci akrylamidu v sušenkách byla zvolena aplikace enzymu asparagináza, která je jedním z doporučovaných nástrojů Food Drink Europe uvedených v dokumentu Acrylamide Toolbox 2011 [67], s cílem snížit obsah akrylamidu v sušenkách pod směrnou hodnotu 500 µg/kg. Pro eliminaci akrylamidu v sušenkách byly firmou DSM Food Specialties poskytnuty 3 enzymy asparagináza uváděné na trh pod komerčním označením

PreventASe® W (aktivita 2500 ASPU/g ± 5 %), PreventASe® W Extra (aktivita 2500 ASPU/g ± 5 %) a PreventASe® ASG (aktivita ≥ 2500 NASPU/g), které se vzájemně liší především použitým nosičem. Na základě pokusů s modelovými systémy byl následně pro aplikaci v praxi zvolen enzym PreventASe® W Extra (v koncentraci 2250 ASPU/kg mouky) a PreventASe® ASG (v koncentraci 1250, 1750 a 2250 NASPU/kg mouky).

Aplikace enzymu PreventASe® ASG zajistila v průmyslových podmínkách eliminaci akrylamidu ve vybraných diabetických sušenkách v průměru o 25 % a v případě enzymu PreventASe® W Extra bylo dosaženo poklesu dokonce o více jak 40 %, přesto nebyl obsah akrylamidu použitím enzymů snížen pod indikativní hodnotu 500 μg/kg.

Kromě efektivnosti enzymu PreventASe® W Extra je ho výhodou oproti enzymu PreventASe® ASG i jeho konzistence, protože je vyráběn ve formě mikrogranulí navázaných na pšeničnou mouku a je tedy v sypké formě, což usnadňuje manipulaci s ním, navažování a dávkování. Avšak při zavedení aplikace enzymu asparagináza do průmyslové výroby je vhodné vybavit výrobu automatickým zařízením pro dávkováním enzymu zajišťující jeho přesné dávkování a minimalizující případné ztráty. Hlavní výhodou aplikace enzymu asparagináza pro dosažení eliminace akrylamidu ve vybraných potravinářských produktech je, že nemá vliv na fyzikální, texturní a organoleptické vlastností finálního výrobku, které by jinak mohli vést k odmítnutí takto ošetřeného výrobku spotřebitelem.

V závěru dizertační práce byl proveden odhad dopadu aplikace navržených způsobů eliminace akrylamidu na celkovou expozici. Maximální obsah akrylamidu ve vybraných potravinách byl snížen na základě výsledků získaných v průběhu dizertační práce. Výsledky ukázaly, že zatížení organismu studentů středních škol z České a Slovenské republiky akrylamidem lze snížit v průměru o 10 %. I když tento pokles není na první pohled tak výrazný jak by se očekávalo, je to i přesto krok vpřed pro snížení možného rizika vzniku rakovinného onemocnění konzumací potravin s vysokým obsahem akrylamidu a také výzvou k úpravě stravovacích návyků. Současně je i apelem pro výrobce potravinářských produktů v uplatňování dostupných a ověřených metod eliminace akrylamidu, které by hodnoty zatížení lidského organizmu akrylamidem z potravin pomohly ještě více snížit.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

[1] SUGIMURA, T. Food and cancer. *Toxicology*. 2002, 181-182, pp. 17-21.

[2] TRITSCHER, A. M. Human health risk assessment of processing-related compounds in food. *Toxicology Letters*. 2004, *149*, pp. 177-186.

[3] JÄGERSTAD, M. – SKOG, K. Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutation Research*. 2005, *574*, pp. 156-172.

[4] CAPUANO, E. – FOGLIANO, V. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *Food Science and Technology*. 2010, *44*, pp. 793-810.

[5] SILLA SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, 29, pp. 213-231.

[6] WEGENER, J.-W. – LÓPEZ-SÁNCHEZ, P. Furan levels in fruit and vegetables juices, nutrition drinks and bakery products. *Analytica Chimica Acta*. 2010, *672*, pp. 55-60.

[7] CHUNG, S. W. C. – KWONG, K. P. – YAU, J. C. W. – WONG, A. M. C. – XIAO, Y. Chloropropanols levels in foodstuffs marketed in Hong Kong. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2008, *21*, pp. 569-573.

[8] GIEROŃ, J. – GROCHOWALSKI, A. – CHRZĄSZCZ, R. PBB levels in fish from the Baltic and North seas and in selected food products from Poland. *Chemosphere*. 2010, *78*, pp. 1272-1278.

[9] HOLM, G. – NORRGREN, L. – ANDERSSON, T. – THURÉN, A. Effects of exposure to food contaminated with PBDE, PCN or PCB on reproduction, liver morphology and cytochrome P450 activity in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Aquatic Toxicology*. 1993, *27*, pp. 33-50.

[10] FROMME, H. – KÖRNER, W. – SHAHIN, N. – WANNER, A. – ALBRECHT, M. – BOEHMER, S. – PARLAR, H. – MAYER, R. – LIEBL, B. – BOLTE, G. Human exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDE), as evidenced by data from a duplicate diet study, indoor air, house dust, and biomonitoring in Germany. *Environment International*. 2009, *35*, pp. 1125-1135.

[11] FRIEDMAN, M. Chemistry, Biochemistry, Nutrition, and Microbiology of Lysinoalanine, Lanthionine, and Histidinoalanine in Food and Other Proteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1999, *47*, pp. 1295-1319.

[12] D' AGOSTINA, A. – BOSCHIN, G. – RINALDI, A. – ARNOLDI, A. Updating on the lysinoalanine content of commercial infant formulae and beicost products. *Food Chemistry*. 2003, *80*, pp. 483-488.

[13] DABRIO, M. – SEJERØE-OLSEN, B. – MUSSER, S. – EMTEBORG, H. – ULBERTH, F. – EMONS, H. Production of a certified reference material for the acrylamide content in toasted bread. *Food Chemistry*. 2008, *110*, pp. 504-511.

[14] JIAO, J. – ZHANG, Y. – REN, Y. – WU, X. – ZHANG, Y. Development of a quantitative method for determination of acrylamide in infant powdered milk and baby foods in jars using isotope dilution liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2005, *1099*, pp. 198-202.

[15] ROBERT, F. – VUATAZ, G. – POLLIEN, P. – SAUCY, F. – ALONSO, M.-I. – BAUWENS, I. – BLANK, I. Acrylamide Formation from Asparagine under Low-Moisture Maillard Reaction Conditions. 1. Physical and Chemical Aspects in Crystalline Model Systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2004, *52*, pp. 6837-6842.

[16] ALTAKI, M. S. – SANTOS, F. J. – GALCERAN, M. T. Occurrence of furan in coffee from Spanish market: contribution of brewing and roasting. *Food Chemistry*. 2010, *126*, pp. 1527-1532.

[17] ERIKSSON, S. *Acrylamide in food products: Identification, formation and analytical methodology*. Institutionen för miljökemi Stockholms universitet, 2005. 83 s. ISBN 91-7155-137-9.

[18] FRIEDMAN, M. Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide. A Review. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2003, *51*, pp. 4504-4526.

[19] POHANISH, R. P. Sittig's Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens: Acrylamide: Toxicity Data. *Knovel* [databáze online]. 2002 [cit. 2011-09-02]. Dostupné z: <http://www.knovel.com>.

[20] CIESAROVÁ, Z. Minimalizácia obsahu akrylamidu v potravinách. *Chemické Listy*. 2005, *99*, s. 483-491.

[21] PRESTON, A. – FODEY, T. – ELLIOTT, CH. Development of high-throughput enzyme-linked immunosorbent assay for the routine detection of the carcinogen acrylamide in food, via rapid derivatisation pre-analysis. *Analytica Chimica Acta*. 2008, *608*, pp. 178-185.

[22] HOGERVORST, J. G. – SCHOUTEN, L. J. – KONINGS, E. J. – GOLDBOHM, R. A. - VAN DEN BRANT. P. A. A Prospective Study of Dietary Acrylamide Intake and the Risk of Endometrial, Ovarian, Breast Cancer. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2008, *87*, pp. 1428-1438.

[23] HOGERVORST, J. G. – SCHOUTEN, L. J. – KONINGS, E. J. – GOLDBOHM, R. A. - VAN DEN BRANT. P. A. Dietary acrylamide intake and the risk of renal cell, bladder, and prostate cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2008, *16*, pp. 2304-2313.

[24] ZÖDL, B. – SCHMID, D. – WASSLER, G. – GUNDACKER, C. – LEIBETSEDER, V. – THALHAMMER, T. – EKMEKCIOGLU, C. Intestinal transport and metabolism of acrylamide. *Toxicology*. 2007, *232*, pp. 99-108.

[25] FUHR,U. – BOETTCHER, M. I. – KINZIG-SCHIPPERS, M. – WEYER, A. – JETTER, A. – LAZAR, A. –TAUBERT, D. – TOMALIK-SCHARTE, D. - POURNARA, P. – JAKOB, V. – HARLFINGER, S. – KLAASSEN, T. – BERKESSEL, A. – ANGERER, J. – SÖRGEL, F. – SCHÖMIG, E. Toxicokinetics of Acrylamide in Humans after Ingestion of a Defined Dose in a Test Meal to Improve Risk Assessment for Acrylamide Carcinogenicity. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2006, *15*, pp. 267-271.

[26] GHANAYEM, B. I. – MCDANIEL, L. P. – CHURCHWELL, M. I. –TWADDLE, N. C. – SNYDER, R. – FENNELL, T. R. – DOERGE D. R. Role of CYP2E1 in the Epoxidation of Acrylamide to Glycidamide and Formation of DNA and Hemoglobin Adducts. *Toxicological sciences*. 2005, *88*, pp. 311-318.

[27] OLESEN, P. T. – OLSEN, A. – FRANDSEN, H. – FREDERIKSEN, K. – OVERVAD, K. – TJØNNELAND, A. Acrylamide exposure and incidence of Breast cancer among postmenopausal women in the Danish Diet, Cancer and Health study. *International Journal of Cancer*. 2008, *122*, pp. 2094-2100.

[28] FENNELL, T. R. – SUMNER, S. C. – SNYDER, R. W. – BURGESS, J. – SPICER, R. – BRIDSON, W. E. – FRIEDMAN, M. A. Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans. *Toxicological sciences.* 2005, *85*, pp. 447-59.

[29] BOETTCHER, M. I. – BOLT, H. M. – DREXLER, H. – ANGERER, J. Excretion of mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine after single oral administration of deuterium-labelled acrylamide. *Archives of Toxicology*. 2006, *80*, pp. 55-61.

[30] Summary and conclusions from the 64 th meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). *World Health Organization, Rome, 8.-17. February 2005* [online]. 2005 [cit. 2011-09-11], pp. 1-47. Dostupné z: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/jecfa/jecfa64_summary.pdf>.

[31] Scientific report of EFSA prepared by data collection and exposure unit (DATEX) on "Monitoring of acrylamide levels in food". *The EFSA Scientific Report*. 2009, 285, 1-26.

[32] Doporučení komise ze dne 3. května 2007 o monitorování množství akrylamidu v potravinách. *Úřední věstník Evropské unie*. 2007, L123, s. 33-40.

[33] Doporučení komise ze dne 10.1.2011 o zkoumání množství akrylamidu v potravinách. Dostupné z: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/recommendation_10012011_acrylamide_food_cs.pdf

[34] ZHANG, Y. – ZHANG, G. – ZHANG, Y. Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods. *Journal of Chromatography A*. 2005, *1075*, pp. 1-21.

[35] SAMUELSON, G. (2003). Acrylamide in food - an update. *Scandinavian Journal of Nutrition.* 2003, *46*, pp. 157.

[36] KERAMAT, J. – LEBAIL, A. – PROST, C. – JAFARI, M. Acrylamide in Baking Products: A Review Article. *Food and Bioprocess Technology*. 2011, *4*, pp. 530–543.

[37] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of Certain Food Contaminants; FAO: Rome, Italy, 2006.

[38] SCHETTGEN, T. – WEISS, T. – DREXLER, H. – ANGERER, J. 2003. A first approach to estimate the internal exposure to acrylamide in smoking and non-smoking adults from Germany. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2003, *206*, pp. 9–14.

[39] SCHETTGEN, T. – ROSSBACH, B. – KÜTTING, B. – LETZEL, S. – DREXLER, H. – ANGERER, J. Determination of haemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide in smoking and non-smoking persons of the general population. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2004, *207*, pp. 531–539.

[40] BOON, P. E. – DE HUL, A. – VAN DER VOET, H. – VAN DONKERSGOED, G. – BRETTE, M. – VAN KLAVEREN, J. D. Calculations of dietary exposure to acrylamide. *Mutation Research*. 2005, *580*, pp. 143–155.

[41] HEUDORF, U. – HARTMANN, E. – ANGERER, J. Acrylamide in children – exposure assessment via urinary acrylamide metabolites as biomarkers. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2009, *212*, pp. 135–141.

[42] STADLER, R. H. – ROBERT, F. – RIEDIKER, S. – VARGA, N. – DAVIDEK, T. – DEVAUD, S. – GOLDMANN, T. – HAU, J. – BLANK, I. In-Depth Mechanistic Study on the Formation of Acrylamide and Other Vinylogous Compounds by the Maillard Reaction. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2004, *52*, pp. 5550-5558.

[43] ZYZAK, D. V. – SANDERS, R. A. – STOJANOVIC, M. – TALLMADGE, D. H. – EBERHART, B. L. – EWALD, D. K. – GRUBER, D. C. – MORSCH, T. R. – STROTHERS, M. A. – RIZZI, G. P. – VILLAGRAN, M. D. Acrylamide Formation Mechanism in Heated Foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2003, *51*, pp. 4782-4787.

[44] YAYLAYAN, V. A. – WNOROWSKI, A. – LOCAS, C. P. Why Asparagine Needs Carbohydrates To Generate Acrylamide. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2003, *51*, pp. 1753-1757.

[45] STADLER, R. H. – BLANK, I. – VARGA, N. – ROBERT, F. – HAU, J. – GUY, A. P. – ROBERT, M.-C. – RIEDIKER, S. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* 2002, *419*, pp.449-450.

[46] MOTTRAM, D. S. – WEDZICHA, B. L. – DODSON, A. T. Acrylamide is formed in the Maillard Reaction. *Nature* 2002, *419*, pp. 448-449.

[47] BLANK, I. – ROBERT, F. – GOLDMANN, T. – POLLIEN, P. – VARGA, N. – DEVAUD, S. – SAUCY, F. – HUYNH-BA, T. – STADLER, R. H. Mechanisms of acrylamide formation. Maillard-induced transformation of aspargine. *Chemistry and Safety of Acrylamide in Food*. Edited by Friedman M. and Mottram D. New York (USA): Springer Science+Business Media, Inc., 2005, pp. 171-189. ISBN 0-387-23920-0.

[48] YAYLAYAN, V. A. – STADLER, R. H. Acrylamide formation in food: a mechanistic perspective. *Journal of AOAC International*. 2005, *88*, pp. 262−267.

[49] WEDZICHA, B. L. – MOTTRAM, D. S. – ELMORE, J. S. – KOUTSIDIS, G. – DODSON, A. T. Kinetic models as a route to control acrylamide formation in food. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2005, *561*, pp. 235−253.

[50] GRANVOGL, M. – SCHIEBERLE, P. Thermally generated 3-aminopropionamide as a transient intermediate in the formation of acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, *54*, pp. 5933−5938.

[51] MOTTRAM, D. S. – LOW, M. Y. – ELMORE, J. S. The Maillard reaction and its role in the formation of acrylamide and other potentially hazardous compounds in foods. *Acrylamide and Other Hazardous Compounds in Heat-treated Foods*. Edited by Skog, K. and Alexander, J. Cambridge (UK): Woodhead Publishing, 2006, pp. 3−22.

[52] PARKER, J. K. – BALAGIANNIS, D. P. – HIGLEY, J. – SMITH, G. – WEDZICHA, B. L. – MOTTRAM, D. S. Kinetic Model for the Formation of Acrylamide during the Finish-Frying of Commercial French Fries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012, *60*, pp. 9321-9331.

[53] CLAUS, A. – CARLE, R. – SCHIEBER, A. Acrylamide in cereal products: A review. *Journal of Cereal Science*. 2008, *47*, pp. 118-133.

[54] GRANVOGL, M. – JEZUSSEK, M. – KOEHLER, P. – SHIEBERLE, P. Quantitation of 3-Aminopropionamide in Potatoes – A Minor but Potent Precursor in Acrylamide Formation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2004, *52*, pp. 4751-4757.

[55] GRANVOGL, M. – KOEHLER, P. – SHIEBERLE, P. Neue Entwicklungen in der Analytik von Acrylamid – Anwendung zu Nahweis von Bildungsmechanismen. *Getreidetechnologie*. 2005, *59*, pp. 85-90.

[56] EHLING, S. – HENGEL, M. – SHIBAMOTO, T. Formation of acrylamide from lipids. *Chemistry and Safety of Acrylamide in Food*. Edited by Friedman M. and Mottram D. New York (USA): Springer Science+Business Media, Inc., 2005, pp. 223-233. ISBN 0-387-23920-0.

[57] ZAMORA, R. – HIDALGO, F. J. Contribution of Lipid Oxidation Products to Acrylamide Formation in Model Systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2008, *56*, pp. 6075-6080.

[58] YASUHARA, A. – TANAKA, Y. – HENGEL, M. – SHIBAMOTO, T. Gas Chromatographic Investigation of Acrylamide Formation in Browning Model Systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2003, *51*, pp. 3999-4003.

[59] GERTZ, CH. – KLOSTERMANN, S. Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2002, *104*, pp. 762-771.

[60] BECALSKI, A. – LAU, B. P.-Y. – LEWIS, D. – SEAMEN, S. W. Acrylamide in Foods: Occurrence, Sources, and Modeling. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2003, *51*, pp. 802-808.

[61] YAYLAYAN, V. A. – LOCAS, C. P. – WNOROWSKI, A. – O'BRIEN, J. Mechanistic pathways of formation of acrylamide from different amino acids. *Chemistry and Safety of Acrylamide in Food*. Edited by Friedman M. and Mottram D. New York (USA): Springer Science+Business Media, Inc., 2005, pp. 191-203. ISBN 0-387-23920-0.

[62] ZHANG, Y. – JIAO, J. – CAI, Z. – ZHANG, Y. – REN, Y. An improved method validation for rapid determination of acrylamide in foods by ultra-performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2007, *1142*, pp. 194-198.

[63] ZHANG, Y. – REN, Y. – ZHANG, Y. New Research Developments on Acrylamide: Analytical Chemistry, Formation Mechanism, and Mitigation Recipes. *Chemical Reviews*. 2009, *109*, pp. 4375- 4397.

[64] MASTOVSKA, K. – LEHOTAY, S. J. Rapid Sample Preparation Method for LC-MS/MS or GC-MS Analysis of Acrylamide in Various Food Matrices. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2006, *54*, pp. 7001-7008.

[65] TAEYMANS, D. – WOOD, J. – ASHBY, P. – BLANK, I. - STUDER, A. – STADLER, R. H. – GOND´E, P. - VAN EIJCK, P. – LALLJIE, S. – LINGNERT, H. – LINDBLOM, M. – MATISSEK, R. - MÜLLER, D. – TALLMADGE, D. – O'BRIEN, J. – THOMPSON, S. – SILVANI, D. – WHITMORE, T. A Review of Acrylamide: An Industry Perspective on Research, Analysis, Formation, and Control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2004, *44*, pp. 323–347.

[66] ROACH, J. A. G. – ANDRZEJEWSKI, D. – GAY, M. L. – NORTRUP, D. – MUSSER, S. M. Rugged LC-MS/MS Survey Analysis for Acrylamide in Foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2003, *51*, pp. 7547-7554.

[67] Acrylamide Toolbox 2011. *Food Drink Europe* [online]. 30. 9. 2011 [cit. 2011-10-17], s. 1-47. Dostupné z: <http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/ciaa_acrylamide_toolbox09.pdf>.

[68] ERIKSSON, S. – KARLSSONB, P. Alternative extraction techniques for analysis of acrylamide in food: Influence of pH and digestive enzymes. *LWT - Food Science and Technology.* 2006, *39*, pp. 392-398.

[69] GOVAERT, Y. – ARISSETO, A. – VAN LOCO, J. – SCHEERS, E. – FRASELLE, S. – WEVERBERGH, E. – DEGROODT, J.M. – GOEYENS, L. Optimisation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the determination of acrylamide in foods. *Analytica Chimica Acta*. 2006, *556*, pp. 275-280.

[70] ANDRAWES, F. – GREENHOUSE, S. – DRANEY, D. Chemistry of acrylamide bromination for trace analysis by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 1987, *399*, pp. 269-275.

[71] HASHIMOTO, A. Improved method for the determination of acrylamide monomer in water by means of gas - Liquid chromatography with an electron-capture detector. *Analyst*. 1976, *101*, pp. 932-938.

[72] LAGALANTE, A. F. – FELTER, M. A. Silylation of acrylamide for analysis by solid-phase microextraction/gas chromatography/ion-trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, *52*, pp. 3744-3748.

[73] BIEDERMANN, M. – GROB, K. In GC-MS, acrylamide from heated foods may be coeluted with 3-hydroxy propionitrile. *European Food Research and Technology*. 2008, *227*, pp. 945-948.

[74] ZHANG, Y. – JIAO, J. – REN, Y. – WU, X. – ZHANG, Y. Determination of acrylamide in infant cereal-based foods by isotope dilution liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2005, *551*, pp. 150-158.

[75] ROSÉN, J. – HELLENÄS, K.-E. Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analyst.* 2002, *127*, pp. 880-882.

[76] BECALSKI, A. – LAU, B. P.-Y. – LEWIS, D. – SEAMAN, S. W. – SUN, W. F. Determination of acrylamide in various food matrices. Evaluation of LC and GC mass spectrometric methods. *Chemistry and Safety of Acrylamide in Food*. Edited by Friedman M. and Mottram D. New York (USA): Springer Science+Business Media, Inc., 2005, pp. 171-189. ISBN 0-387-23920-0.

[77] ROSÉN, J. – NYMAN, A. – HELLENÄS, K.-E. Retention Studies of Acrylamide for the Design of a Robust Liquid Chromatographic - Tandem Mass Spectrometry Method for Food Analysis. *Journal of Chromatography A*. 2007, *1172*, pp. 19-24.

[78] MARÍN, J. M. – POZO, O. J. – SANCHO, J. V. - PITARCH, E. – LÓPEZ, F. J. – HERMÁNDEZ, F. Study of different atmospheric-pressure interfaces for LC-MS/MS determination of acrylamide in water at sub-ppb levels. *Journal of mass spectrometry*. 2006, *41*, pp. 1041-1048.

[79] NIELSEN, N. J. – GRANBY, K. – HEDEGAARD, R.V. – SKIBSTED, L. H. Liquid chromatography- tandem mass spectrometry method for simultaneous analysis of acrylamide and the precursors, asparagine and reducing sugars in Bread. *Analytica Chimica Acta.* 2006, *557*, pp. 211-220.

[80] BERMUDO, E. – MOYANO, E. – PUIGNOU, L. – GALCERAN, M.T. Determination of acrylamide in foodstuffs by liquid chromatography ion-trap tandem mass-spectrometry using an improved clean-up procedure. *Analytica Chimica Acta*. 2006, *559*, pp. 207-214.

[81] LEE, M.-R. – CHANG, L.-Y. – DOU, J. Determination of acrylamide in food by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–positive chemical ionization tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2007, *582*, pp. 19-23.

[82] ŠTULÍK, K. A KOLEKTIV. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. 264 s. ISBN 80-246-0852-9.

[83] ANESE, M. – QUARTA,B. – FOSCHIA, M. – BORTOLOMEAZZI, R. Effect of low-temperature long-time pre-treatment of wheat on acrylamide concentration in short dough biscuits. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2009, *53*, pp. 1526-1531.

[84] HENDRIKSEN, H. V. – KORNBRUST, B. A. – ØSTERGAARD, P. R. – STRINGER, M. A. Evaluating the Potential for Enzymatic Acrylamide Mitigation in a Range of Food Products Using an Asparaginase from Aspergillus oryzae. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2009, *57*, pp. 4168–4176.

[85] AMREIN, T.M. – BACHMANN, S. - NOTI, A. – BIEDERMANN, M. – BARBOSA, M.F. – BIEDERMANN-BREM, S. – GROB, K. – KEISER, A. – REALINI, P. – ESCHER, F. – AMADO, R. Potential of Acrylamide Formation, Sugars, and Free Asparagine in Potatoes: A Comparison of Cultivars and Farming Systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2003, *51*, pp. 5556-5560.

[86] HALFORD, N. G. – MUTTUCUMARU, N. – POWERS, S. J. – GILLATT, P. N. – HARTLEY, L. – ELMORE, J. S. – MOTTRAM, D. S. Concentrations of Free Amino Acids and Sugars in Nine Potato Varieties: Effects of Storage and Relationship with Acrylamide Formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2012, *60*, pp. 12044-12055.

[87] BECALSKI, A. – LAU, B. P.-Y. – LEWIS, D. – SEAMAN, S. W. – HAYWARD, S. – SAHAGIAN, M. – RAMESH, M. – LECLERC, Y. Acrylamide in French Fries: Influence of Free Amino Acids and Sugars. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2004, *52*, pp. 3801-3806.

[88] MEDEIROS VINCI, R. – MESTDAGH, F. – DE MUER, N. – VAN PETEGHEM, C. – DE MEULENAER, B. Implementation of Acrylamide Mitigation Strategies on Industrial Production of French Fries: Challenges and Pitfalls. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2011, *59*, pp. 898-906.

[89] DE WILDE, T. – DE MEULENAER, B. – MESTDAGH, F. – GOVAERT, Y. – VANDEBURIE, S. – OGGHE, W. – FRASELLE, S. – DEMEULENEMEESTER, K. – VAN PETEGHEM, C. – CALUS, A. – DEGROODT, J.-M. – VERHÉ, R. Influence of Fertilization on Acrylamide Formation during Frying of Potatoes Harvested in 2003. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2006, *54*, pp. 404-408.

[90] HAMLET, C. G. – SADD, P. A. – LIANG, L. Correlations between the Amounts of Free Asparagine and Saccharides Present in Commercial Cereal Flours in the United Kingdom and the Generation of Acrylamide during Cookin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2008, *56*, pp. 6145-6153.

[91] CAPUANO, E. – FERRIGNO, A. – ACAMPA, I. – SERPEN, A. – AÇAR, Ö. Ç., GÖKMEN, V. – FOGLIANO, V. Effect of flour type on Maillard reaction and acrylamide formation during toasting of bread crisp model systems and mitigation strategies. *Food Research International.* 2009, *42*, pp. 1295-1302.

[92] SPRINGER, M. – FISCHER, T. – LEHRACK, A. – FREUND, W. Development of acrylamide in baked products. *Getride.* 2003, *57*, pp. 274-278.

[93] MUTTUCUMARU, N. – ELMORE, J. S. – CURTIS, T. – MOTTRAM, D. S. – PARRY, M. A. J. – HALFORD, N. G. Reducing Acrylamide Precursors in Raw Materials Derived from Wheat and Potato. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2008, *56*, pp. 6167-6172.

[94] ELMORE, J. S. – MOTTRAM, D. S. – MUTTUCUMARU, N. – DODSON, A. T. – PARRY, M. A. J. – HALFORD, N. G. Changes in Free Amino Acids and Sugars in Potatoes Due to Sulfate Fertilization and the Effect on Acrylamide Formation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2007, *55*, pp. 5363-5366.

[95] ELMORE, J. S. – PARKER, J. K. – HALFORD, N. G. – MUTTUCUMARU, N. – MOTTRAM, D. S. Effects of Plant Sulfur Nutrition on Acrylamide and Aroma Compounds in Cooked Wheat. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2008, *56*, pp. 6173-6179.

[96] ROMMENS, C.M. – YAN, H. – SWORDS, C. – RICHAEL, C. – YE, J. Low-acrylamide French fries and potato chips. *Plant Biotechnology Journal*. 2008, *6*, pp. 843-853.

[97] LEVINE, R. A. - SMITH, R. E. Sources of variability of acrylamide levels in a cracker model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, *53*, pp. 4410-4416.

[98] AMREIN, T. – ANDRES, L. – ESCHER, F. – AMADO, R. Occurrence of acrylamide in selected foods and mitigation options. *Food Additives and Contaminants.* 2007, *24*, pp. 13–25.

[99] KOLEK, E. – ŠIMKO, P. – ŠIMON, P. – GATIAL, A. Confirmation of polymerisation effects of sodium chloride and its additives on acrylamide by infrared spectrometry. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2007, *46*, pp. 39-44.

[100] KOUTSIDIS, G. – SIMONS, S. P. J. – THONG, Y. H. – HALDOUPIS, Y. – MOJICA-LAZARO, J. – WEDZICHA, B. L. – MOTTRAM, D. S. Investigations on the effect of amino acids on acrylamide, pyrazines, and Michael addition products in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, *57*, pp. 9011−9015.

[101] CLAEYS, W. L. – DE VLEESCHOUWER, K. – HENDRICKX, M. E. Effect of Amino Acids on Acrylamide Formation and Elimination Kinetics. *Biotechnology Progress*. 2005, *21*, pp. 1525-1530.

[102] DE VLEESCHOUWER, K. – VAN DER PLANCKEN, I. – VAN LOEY, A. – HENDRICKX, M. E. Role of precursors on the kinetics of acrylamide formation and elimination under low moisture conditions using a multiresponse approach – Part II: Competitive reactions. *Food Chemistry*. 2009, *114*, pp. 535-546.

[103] CLAUS, A. – MONGILI, M. – WEISZ, G. – SCHIEBER, A. – CARLE, R. Impact of formulation and technological factors on the acrylamide content of wheat bread and bread rolls. *Journal of Cereal Science*. 2008, *47*, pp. 546-554.

[104] CLAEYS, W. L. – DE VLEESCHOUWER, K. – HENDRICKX, M. E. Kinetics of Acrylamide Formation and Elimination during Heating of an Asparagine – Sugar Model System. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2005, *53*, pp. 9999-10005.

[105] DE VLEESCHOUWER, K. – VAN DER PLANCKEN, I. – VAN LOEY, A. – HENDRICKX, M. E. Role of precursors on the kinetics of acrylamide formation and elimination under low moisture conditions using a multiresponse approach – Part I: Effect of the type of sugar. *Food Chemistry*. 2009, *114*, pp. 116-126.

[106] ROBERT, F. – VUATAZ, G. – POLLIEN, P. – SAUCY, F. – ALONSO, M.-I. – BAUWENS, I. – BLANK, I. Acrylamide formation from asparagine under low-moisture maillard reaction conditions: 1. Physical and chemical aspects in crystalline model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, *52*, pp. 6837–6842.

[107] ZHANG, Y. – WANG, J. – ZHANG, Y. Study on formation of acrylamide under low-moisture asparagine–sugar reaction system. *Food Chemistry*. 2007, *104*, pp. 1127–1135.

[108] SADD, P. A. – HAMLET, C. G. – LIANG, L. Effectiveness of Methods for Reducing Acrylamide in Bakery Products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2008, *56*, pp. 6154-6161

[109] BRATHEN, E. – KITA, A. – KNUTSEN, S.H. – WICKLUND, T. Addition of Glycine Reduces the Content of Acrylamide in Cereal and Potato Products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2005, *5356*, pp. 3259-3264.

[110] KOLEK, E. – ŠIMKO, P. – ŠIMON, P. Inhibition of acrylamide formation in asparagine/D-glucose model system by NaCl addition. *European Food Research and Technology*. 2006, *224*, pp. 283-284.

[111] GÖKMEN, V. – ŞENYUVA, H. Z. Acrylamide formation is prevented by divalent cations during the Maillard reaction. *Food Chemistry*. 2007, *103*, pp. 196-203.

[112] MESTDAGH, F. – DE WILDE, T. – DELPORTE, K. – VAN PETEGHEN, C. – DE MEULENAER, B. Impact of chemical pre-treatments on the acrylamide formation and sensorial quality of potato crisps. *Food Chemistry.* 2008, *106*, pp. 914-922.

[113] KOLEK, E. – ŠIMKO, P. – ŠIMON, P. Effect of NaCl on the decrease of acrylamide content in a heat-treated model food matrix. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2006, *45*, pp. 17-20.

[114] VOELKER, L. Interactions of baker's yeast with dough substances. *Getreidetechnologie.* 2005, *59*, pp. 10-14.

[115] CASADO, F. J. – SÁNCHEZ, A. H. – MONTAÑO, A. Reduction of acrylamide content of ripe olives by selected additives. *Food Chemistry*. 2010, *119*, pp. 161-166.

[116] YUAN, Y. – CHEN, F. – ZHAO, G. H. – LIU, J. – ZHANG, H. X. – HU, X. S. A comparative study of acrylamide formation induced by microwave and conventional heating method. *Journal of Food Science*. 2007, *72*, pp. C212−C216.

[117] OU, S. – LIN, Q. – ZHANG, Y. – HUANG, C. – SUN, X. – FU, L. Reduction of acrylamide formation by selected agents in fried potato crisps on industrial scale. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*.2008, *9*, pp. 116–121.

[118] FRIEDMAN, M. Food browning and its prevention: An overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996, *44*, pp. 631−653.

[119] ELMORE, J. S. – KOUTSIDIS, G. – DODSON, A. T. – MOTTRAM, D. S. - WEDZICHA, B. L. The effect of cooking on acrylamide and its precursors in potato, wheat and rye. In *Chemistry and Safety of Acrylamide in Food*; Friedman, M., Mottram, D., Eds.; Springer: New York, 2005; pp 255-269.

[120] JUNG, M. Y. – CHOI, D. S. – JU, J. W. A novel technique for limitation of acrylamide formation in fried and baked corn chips and in french fries. *Journal of Food Science*. 2003, *68*, pp.1287-1290.

[121] DE VLEESCHOUWER, K. – VAN DER PLANCKEN, I. – VAN LOEY, A. – HENDRICKX, M. E. Impact of pH on the Kinetics of Acrylamide Formation/Elimination Reactions in Model Systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2006, *54*, pp. 7847-7855.

[122] RYDBERG, P. – ERIKSSON, S. – TAREKE, E. – KARLSSON, P. – EHRENBERG, L. – TORNQVIST, M. Investigations of Factors That Influence the Acrylamide Content of Heated Foodstuffs. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2003, *51*, pp. 7012-7018.

[123] YUAN, Y. – SHU, CH. – ZHOU, B. – QI, X. – XIANG, J. Impact of selected additives on acrylamide formation in asparagine/sugar Maillard model systems. *Food Research International*. 2011, *44*, pp. 449-455.

[124] HAMLET, C. G. – SADD, P. A. Effects of yeast stress and pH on 3-MCPD producing reactions in model dough systems. *Food Additives and Contaminants*. 2005, *22*, pp. 616-623.

[125] TAEYMANS, D. – ANDERSSON, A. – ASHBY, P. – BLANK, I. – GONDE, P. – VAN EIJCK, P. – FAIVRE, V. – LALLJIE, S.P. – LINGNERT, H. – LINDBLOM, M. – MATISSEK, R. – MULLER, D. – STADLER, R.H. – STUDER, A. – SILVANI, D. – TALLMADGE, D. – THOMPSON, G. – WHITMORE, T. – WOOD, J. – ZYZAK, D. Acrylamide: update on selected research activities conducted by the European food and drink industry. *Journal of AOAC International.* 2005, *88*, pp. 234-241.

[126] Asparaginase from Aspergillus oryzae expressed in A. oryzae. *FAO JECFA Monographs 4* [online]. 2007 [cit. 2013-04-30]. Dostupné z: <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/monograph4/additive-498-m4.pdf>.

[127] CIESAROVÁ, Z. – KISS, E. – BOEGL, P. Impact of L-asparaginase on acrylamide content in potato products. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2006, *45*, 141-146.

[128] ANESE, M. – QUARTA, B. – FRIAS, J. Modelling the effect of asparaginase in reducing acrylamide formation in biscuits. *Food Chemistry.* 2011*, 126*, 435-440.

[129] KUKUROVÁ, K. – MORALES, F.J. – BEDNÁRIKOVÁ, A. – CIESAROVÁ, Z. Effect of L-asparaginase on acrylamide mitigation in a fried-dough pastry model. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2009*, 53,* 1532-1539.

[130] ANESE, M. – MANZOCCO, L. – CALLIGARIS, S. – NICOLI, M. CH. Industrially Applicable Strategies for Mitigating Acrylamide, Furan and 5-Hydroxymethylfurfural in Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013, DOI: 10.1021/jf305085r.

[131] PEDRESCHI, F. – KAACK, K. – GRANBY, K. The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries. *Food Chemistry*. 2008, *109*, pp. 386-392.

[132] GRANDA, C. – MOREIRA, R. G. Kinetics of acrylamide formation during traditional and vacuum frying of potato chips. *Journal of Food Process Engineering*. 2005, *28*, pp. 478–493.

[133] DE VLEESCHOUWER, K. – VAN DER PLANCKEN, I. – VAN LOEY, A. – HENDRICKX, M. E. Kinetics of Acrylamide Formation/Elimination Reactions as Affected by Water Activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2007, *23*, pp. 722-728.

[134] AÇAR, Ö. Ç. – GÖKMEN, V. Investigation of acrylamide formation on bakery products using a crust-like model. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2009, *53*, pp. 1521-1525.

[135] LANTZ, I. – TERNITÉ, R. – WILKENS, J. – HOENICKE, K.- GUENTHER, H. – VAN DER STEGEN, G. Studies on acrylamide levels in roastings, storage and brewing of coffee. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2006, *50*, pp. 1039 1046.

[136] KNOL, J.J. – VAN LOON, W.A.M. – LINSSEN, J.P.H. – RUCK, A.-L. – VAN BOEKEL, M.A.J.S. – VORAGEN, A.G.J. Toward a Kinetic Model for Acrylamide Formation in a Glucose−Asparagine Reaction System. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2005, *53*, pp. 6133-6139.

[137] PEDRESCHI, P. – MARIOTTI, S. – GRANBY, K. – RISUM, J. Acrylamide reduction in potato chips by using commercial asparaginase in combination with conventional blanching. *Food Science and Technology*. 2011, *44*, pp. 1473-1476.

[138] CLAEVS, E. L. – DE VLEESHOUWER, K. – HENDRICKX, M. E. Effect of amino acids on acrylamide formation and elimination kinetics. *Biotechnology Progress.* 2005, *21*, pp. 1525-1530.

[139] GÖKMEN, V. – SENYUVA, H. Z. Study of colour and acrylamide formation in coffee, wheat flour and potato chips during heating. *Food Chemistry*. 2006, *99*, pp. 238-243.

[140] ANESE, M. – SUMAN, M. – NICOLI, M.C. Acrylamide removal from heated foods. *Food Chemistry*. 2010*, 119*, pp. 791-794.

[141] QUARTA, B. – ANESE, M. Furfurals removal from roasted coffee powder by vacuum treatment. *Food Chemistry*. 2012*, 130*, pp. 610-614.

[142] VAN LANCKER, F. – ADAMS, A. – OWCZAREK, A. – DE MEULENAER, B. – DE KIMPE, N. Impact of various food ingredients on the retention of furan in foods. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2009*, 53*, pp. 1505-1511.

[143] HIGLEY, J. – KIM, J.-Y. – HUBER, K. C. – SMITH, G. Added versus Accumulated Sugars on Color Development and Acrylamide Formation in French-Fried Potato Strips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012, *60*, pp. 8763-8771.

[144] FISELIER, K. – HARTMANN, A. – FISCALINI, A. – GROB, K. Higher acrylamide contents in French fries prepared from "fresh" prefabricates. *European Food Research and Technology*.2005, *221*, pp. 376-381.

[145] ZAMORA, R. – DELGADO, R. M. – HIDALGO, F. J. Model Reactions of Acrylamide with Selected Amino Compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2010, *58*, pp. 1708-1713.

[146] ALVES, R. C. – SOARES, C. – CASAL, S. – FERNANDES, J. O. – BEATRIZ, M. – OLIVEIRA, P. P. Acrylamide in espresso coffee: Influence of species, roast degree and brew length. *Food Chemistry*. 2010, *119*, pp. 929-934.

[147] KOTSIOU, K. – TASIOULA-MARGARI, M. – KUKUROVÁ, K. – CIESAROVÁ, Z. Impact of oregano and virgin olive oil phenolic compounds on acrylamide content in a model system and fresh potatoes. *Food Chemistry*. 2010, *123*, pp. 1149–1155.

[148] BASSAMA, J. – BRAT, P. – BOHUON, P. – BOULANGER, R. – GÜNATA, Z. Study of acrylamide mitigation in model system: Effect of pure phenolic compounds. *Food Chemistry*. 2010, *123*, pp. 558–562.

[149] RIGO, A. – VIANELLO, F. – CLEMENTI, G. – ROSSETTO, M. - SCARPA, M. – VRHOVŠEK, U. – MATTIVI, F. Contribution of proanthocyanidins to the peroxy radical scavenging capacity of some Italian red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, *48*, pp. 1996–2002.

[150] KOTSIOU, K. – TASIOULA-MARGARI, M. – CAPUANO, E. – FOGLIANO, V. Effect of standard phenolic compounds and olive oil phenolic extracts on acrylamide formation in an emulsion system. *Food Chemistry*. 2011, *124*, pp. 242-247.

[151] NAPOLITANO, A. – MORALES, F. – SACCHI, R. – FOGLIANO, V. Relationship between virgin olive oil phenolic compounds and acrylamide formation in fried crisps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, *56*, pp. 2034–2040.

[152] ZENG, X. – CHENG, K.-W. – JIANG, Y. – LIN, Z. X. – SHI, J. J. – OU, S.-Y. – CHEN, F. – WANG, M. Inhibition of acrylamide formation by vitamins in model reactions and fried potato strips. *Food Chemistry*. 2009, *116*, pp. 34–39.

[153] SERPEN, A. – GÖKMEN, V. Evaluation of the Maillard reaction in potato crisps by acrylamide, antioxidant capacity and color. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2009, *22*, pp. 589–595.

[154] OU, S. – SHI, J. – HUANG, C. – ZHANG, G. – TENG, J. – JIANG, Y. – YANG, B. Effect of antioxidants on elimination and formation of acrylamide in model reaction systems. *Journal of Hazardous Materials*. 2010, *182*, pp. 863–868.

[155] CIESAROVÁ, Z. – KISS, E. – KOLEK, E. Study of factors affecting acrylamide levels in model systems. *Czech Journal of Food Sciences*. 2006, *24*, pp. 133-137.

[156] CIESAROVÁ, Z. – SUHAJ, M. – HORVÁTHOVÁ, J. Correlation between acrylamide contents and antioxidant capacities of spice extracts in a model potato matrix. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2008, *47*, pp. 1-5.

[157] ZHU, F. – CAI, Y.-Z. – KE, J. – CORKE, H. Dietary plant materials reduce acrylamide formation in cookie and starch-based model systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2011, *91*, pp. 2477–2483.

[158] ZHANG, Y. – CHEN, J. – ZHANG, X. – WU, X. – ZHANG, Y. Addition of Antioxidant of Bamboo Leaves (AOB) Effectively Reduces Acrylamide Formation in potato Crisps and French Fries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, *55*, pp. 523–528.

[159] ZHANG, Y. – YING, T. J. Reduction of acrylamide and its kinetics by addition of antioxidant of bamboo leaves (AOB) and extract of green tea (EGT) in asparagine–glucose microwave heating system. *Journal of Food Science*. 2008, *73*, pp. 60–66.

[160] HEDEGAARD, R. V. – GRANBY, K. – FRANDSEN, H. – THYGESEN, J. – SKIBSTED, L. H. Acrylamide in bread. Effect of prooxidants and antioxidants. *European Food Research and Technology*. 2008, *227*, pp. 519-525.

[161] FERNÁNDEZ, S. – KURPPA, L. – HYVÖNEN, L. Content of acrylamide decreased in potato chips with addition of a proprietary flovoniod spice mix (Flavomare®) in frying. *Innovation Food Technology*. 2003, pp. 24-26.

[162] VATTEM, D. A. – SHETTY, K. Acrylamide in food: a model for mechanism of formation and its reduction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2003, *4*, pp. 331-338.

[163] VERNIN, G. – CHAKIB, S. – ROGACHEVA, S. M. – OBRETENOV, T. D. - PÁRKÁNYI, C. Thermal decomposition of ascorbic acid. *Carbohydrate Research*. 1998, *305*, pp. 1−15.

[164] HIDALGO, F. J. – DELGADO, R. M. – ZAMORA, R. Role of mercaptans on acrylamide elimination. *Food Chemistry*. 2010, *122*, pp. 596–601.

[165] CHENG, K.-W. – ZENG, X. – TANG, Y. S. – WU, J.-J. - LIU, Z. – SZE, K.-H. – CHU, I. K. – CHEN, F. – WANG, M. Inhibitory Mechanism of Naringenin against Carcinogenic Acrylamide Formation and Nonenzymatic Browning in Maillard Model Reactions. *Chemical Research in Toxicology*. 2009, *22*, pp. 1483-1489.

[166] SUMMA, C. – WENZL, T. – BROHEE, M. – DE LA CALLE, B. – ANKLAM, E. Investigation of the Correlation of the Acrylamide Content and the Antioxidant Activity of Model Cookies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, *54*, pp. 853-859.

[167] ZHANG, Y. - ZHANG, Y. Effect of natural antioxidants on kinetic behaviour of acrylamide formation and elimination in low-moisture asparagine–glucose model system. *Journal of Food Engineering*. 2008, *85*, pp. 105–115.

[168] Databáze údajů Státnej veterinárnej a potravinovej správy, Bratislava v letech 2005-2008.

[169] Health implications of acrylamide in food: report of a joint FAO/WHO consultation. *WHO Headquarters*. Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002, pp. 1-35

[170] Survey Data on Acrylamide in Food: Total Diet Study Results. *Center for Food Safety & Applied Nutrition* [online]. 2004, [cit. 2011-12-12]. Dostupné z: <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/ChemicalContaminants/ucm053566.htm#table4 >.

[171] SCHNEEWEISS, P. Zpráva o výsledcích plánované kontroly cizorodých látek v potravinách v roce 2005: březen 2005. *Státní zemědělská a potravinářská inspekce* [online]. 2005 [cit. 2011-12-12], s. 1-34. Dostupné z: <www.szpi.gov.cz>.

[172] CLAUS, A. – WEISZ, G. M. – KAMMERER, D. R. – CARLE, R. – SCHIEBER, A. A method for the determination of acrylamide in bakery products using ion trap LC-ESI-MS/MS. Molecular *Nutrition & Food Research*. 2005, *49*, pp. 918-925.

[173] CIESAROVÁ, Z. – KUKUROVÁ, K. – BEDNÁRIKOVÁ, A. – MACHÁČKOVÁ, K. Acrylamide mitigation in cereal-based products by L-asparaginase addition. In: *Proc. ICC International Conference Bosphorus 2008*, Istanbul 24 - 26. April 2008, pp. 197

[174] Česká republika. Doporučení komise 2010/307/EU ze dne 2. června 2010 o monitorování množství akrylamidu v potravinách. In: *Úřední věstník Evropské unie*. Dostupné z: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:137:0004:0010:CS:PDF.

[175] ČSN 56 0116. *Metody zkoušení pekařských výrobků*. Praha: Vydavatelství úřadu pro normalizaci a měření, 1975.

[176] *Approved Methods of Analysis*, 9th Ed. Method 10-54: Baking Quality of Cookie Flour—Micro Wire-Cut Formulation. AACC International, 1995.

[177] CUNNIF, P. (Ed.) *Official methods of analysis of AOAC International. Volume II*. 16th Ed. Arlington: AOAC International, 1995, p. 43. ISBN: 09-355-8454-4.

[178] ČSN 56 0116 - část 3. *Metody zkoušení pekařských výrobků: Stanovení vlhkosti*. Praha: Vydavatelství norem, 1990.

[179] BRAND-WILLIAMS, W. – CUVELIER, M. E. – BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie.* 1995, *28*, pp. 25–30. DOI: 10.1016/s0023-6438(95)80008-5.

[180] KOLEK, E. – ŠIMKO, P. – ŠIMON, P. – JORÍK, V. – ŠIMÚTH, T. Influence of D-glucose polymers on acrylamide elimination during heating in a model study. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2008, *47*, 200-204.

[181] BEDNÁRIKOVÁ A. – CIESAROVÁ Z. Validation of HPLC-ESI-MS-MS Method for Acrylamide Determination in Bakery Products (Comparison of Simple and Improved Electrospray ionization). *Chemické Listy.* 2012, *106*, pp. 252-256.

[182] CIESAROVÁ, Z. – KUKUROVÁ, K. – BEDNÁRIKOVÁ, A. – MORALES, F. J. Effect of heat treatment and dough formulation on the formation of Maillard reaction products in fine bakery products – benefits and weak points. *Journal of Food and Nutrition Research.* 2009, *48*, pp. 20–30.

[183] BS ISO 4120:2004. *Sensory analysis - Methodology - Triangle test*. Second edition. London: British Standards Institution, 2004.

[184] MARKOVÁ, L. *Vliv přídavných látek na obsah akrylamidu v tepelně opracovaných potravinách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 106 s. Vedoucí diplomové práce prof. Ing. Peter Šimko, DrSc.

[185] TARDIFF, R. G. – GARGAS, M. L. – KIRMAN, CH. R. – CARSON, M. L. – SWEENEY, L. M. Estimation of safedietaryintakelevels of acrylamide for humans. *Food and Chemical Toxicology*. 2010, *48*, pp. 658–667.

[186] MILLS, C. – TLUSTOS, CH. – EVANS, R. – MATTHEWS, W. Dietary Acrylamide Exposure Estimates for the United Kingdom and Ireland: Comparison between Semiprobabilistic and Probabilistic Exposure Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, *56*, pp. 6039–6045.

[187] SIROT, V. – HOMMET, F. – TARD, A. – LEBLANC, J.-CH. Dietary acrylamide exposure of the French population: Results of the second French Total Diet Study. *Food and Chemical Toxicology*. 2012, *50*, pp. 889–894.

[188] BRANTSAETER, A. L. – HAUGEN, M. – MUL, A. – BJELLAAS, T. – BECHER, G. – KLAVEREN, J. V. – ALEXANDER, J. – MELTZER, H. M. Exploration of different methods to assess dietary acrylamide exposure in pregnant women participating in the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa). *Food and Chemical Toxicology*. 2008, *46*, pp. 2808–2814.

[189] SZEMES, V. – MAINITZ, R. *Technológia pekárskej výroby*. 1. vyd. Bratislava: Cech pekárov a cukrárov regionu západného Slovenska, 1999. 159 s.

[190] MAINTZ, R. et al. *Technológia pekárskej výroby*. 2. uprav. vyd. Bratislava: PROMP, 2002. 239 s. ISBN 80-968366-4-1.

[191] ELMORE, J. S. – KOUTSIDIS, G. – DODSON, A. T. – MOTTRAM, D. S. – WEDZICHA, B. L. Measurement of Acrylamide and Its Precursors in Potato, Wheat, and Rye Model Systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2005, *53*, pp. 1286-1293.

[192] COLLAR, C. – MASCARÓS, A. – DE BARBER, C. – B. Biochemical evolution of nitrogen compounds during fermentation of wheat bread doughs containing pure cultures of lactic acid bacteria. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A*. 1990, 190, 397-400.

[193] CAUVAIN, S. – YOUNG, L. *Baking problems solved*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2001. 280 s. ISBN 1-85573-564-4.

[194] ZIELIŃSKA, D. – SZAWARA-NOWAK, D. – ZIELIŃSKI, H. Comparison of spectrophotometric and electrochemical methods for the evaluation of antioxidant capacity of buckwheat products after hydrothermal treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, *55*, pp. 6124–6131.

[195] ZIELIŃSKI, H. - AMIGO-BENAVENT, M. - DEL CASTILLO, M. D. – HORSZWALD, A. – ZIELIŃSKA, D. Formulation and baking process affect Maillard reaction development and antioxidant capacity of ginger cakes. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2010, *49*, pp. 140–148.

[196] ZIELIŃSKI, H. – CIESAROVA, Z. – TROSZYŃSKA, A. – CEGLIŃSKA, A. – ZIELIŃSKA, D. – AMAROWICZ, R. – PRZYGODZKA, M. – KUKUROVA, K. Antioxidant properties, acrylamide content and sensory quality of ginger cakes with different formulations. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences.* 2012, *62*, pp. 41–50. DOI: 10.2478/v10222-011-0038-0.

[197] LIU, CH.-L. – CHEN, Y.-S. – YANG, J.-H. – CHIANG, B.-H. Antioxidant Activity of Tartary (Fagopyrum tartaricum (L.) Gaertn.) and Common (Fagopyrum esculentum Moench) Buckwheat Sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2008, *56*, pp. 173-178.

[198] ŠIMON, P. *Možnosti zníženia obsahu akrylamidu v cereálnych produktoch s prídavkom pohánkovej múky a korenín.* Expertízna správa pre Výskumný ústav potravinársky. Bratislava, 2010.

[199] SCHIEBERLE, P. – KÖHLER, P. – GRANVOGL, M. New aspects on the formation and analysis of acrylamide. In M. Friedman, & D. S. Mottram (Eds.), *Chemistry and safety of acrylamide in food* (pp. 205–222). New York: Springer, 2005.

[200] PETER, K. V. *Handbook of herbs and spices (Vol. 1)*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2001. 319 p. ISBN: 978-1-85573-562-0.

[201] PETER, K. V. *Handbook of herbs and spices (Vol. 2)*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2004. 367 p. ISBN: 978-1-85573-721-1.

[202] STEINHAUS, M. – SCHIEBERLE, P. Characterization of odorants causing an atypical aroma in white pepper powder (*Piper nigrum* L.) based on quantitative measurements and orthonasal breakthrough thresholds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, *53*, pp. 6049–6055. DOI: 10.1021/jf0506030.

[203] PARTHASARATHY, V. A. – CHEMPAKAM, B. – ZACHARIAH, T. J. (Eds.). *Chemistry of spices.* Wallingford: CABI, 2008. 445 p. ISBN: 978-1-84593-405-7.

[204] OLEMPSKA-BEER, Z. Asparaginase from Aspergillus niger expressed in A. niger. *Chemical and Technical Assessment* [online]. 2008 [cit. 2013-05-22]. Dostupné z: <http://www.fao.org>.

[205] PreventASe®. The answer to Acrylamide-Cookies. *DSM Food Specialties* [online]. 26. 5. 2013 [cit. 2013-05-29], s. 1-47. Dostupné z: <http://www.dsm.com/en_US/foodandbeverages/public/home/downloads/0411020_DSMF_Preventase_leaflet_EN_cookies_LR.pdf>.

[206] GOODSELL, D. S. The molecular perspective: L-Asparaginase. *The oncologist 10*. 2005, pp. 238-239.

[207] ROSENTHAL, A. J. *Food texture: Measurement and perception*. Gaithersburg, Md.: Aspen Publishers, 1999, xiii, 311 p. ISBN 08-342-1238-2.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

3-MCPD	3-monochlorpropan-1,2-diol
AA	Akrylamid
AACC	Americká asociace cereálních chemiků
AOAC	Asociace analytických chemiků
ASE	Zrychlená extrakce rozpouštědlem
Asn	Asparagin
Asn/Glc	Směs asparaginu a glukózy
Asn/Fru	Směs asparaginu a fruktózy
Asp	Kyselina asparagová
ASPU	Jednotka aktivity asparaginázy: 1 ASPU je definována jako množství enzymu potřebné k uvolnění 1μmol amoniaku z L-asparaginu za 1 minutu za podmínek testu (pH = 5,0; 37 °C)
atd.	A tak dále...
BSTFA	N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
BTMSA	N,O-bis(trimethylsilyl)akrylamid
CE	Kapilární elektroforéza
CIAA	Konfederace evropského potravinářského a nápojového průmyslu EU
DPPH	di(fenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl)iminoazanium
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost
ESI	Elektrosprejová ionizace
FAO/WHO	Organizace pro výživu a zemědělství / Světová zdravotnická organizace
FAPAS	Systém hodnocení způsobilosti analýzy potravin
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GC	Plynová chromatografie
GC/MS	Plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
Gln	Glutamin
Glu	Kyselina glutamová
HMF	5-hydroxymethylfurfural
HPLC	Vysokotlaká kapalinová chromatografie
JECFA	Společný výbor expertů FAO/WHO pro potravinářská aditiva a kontaminanty

LC	Kapalinová chromatografie
LC/ESI-MS-MS	Kapalinová chromatografie s elektrosprejovou ionizací a tandemovou hmotnostní spektrometrii
LC/MS	Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
LC/MS-MS	Kapalinová chromatografie spojená s tandemové hmotnostní spektrometrii
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez kvantifikace
MRM	Sledování mnohonásobné reakce
MS	Hmotnostní spektrometrie
např.	Například
NASPU	Neutrální jednotka aktivity asparaginázy: 1 NASPU je definována jako množství enzymu potřebné k uvolnění 1µmol amoniaku z L-asparaginu za 1 minutu za podmínek testu (pH = 7,0; 37 °C)
SPE	Extrakce tuhou fází
SPME	Mikroextrakce tuhou fází
SZPI	Státní zemědělská a potravinářská inspekce
ŠVPS	Štátná veterinárna a potravinová správa SR
tj.	To jest
TOF-MS	Hmotnostní spektrometr s analyzátorem doby letu iontů
UV	Ultrafialový detektor
UV/VIS/NIR	Spektrometrie v ultrafialové-viditelné-blízké infračervené oblasti

9 SEZNAM PŘÍLOH

1. Fotografie chlebů připravených z chlebových směsí Mäspomix v domácí pekárničce
2. Fotografie modelových sušenek s enzym PreventASe® W a PreventASe® W Extra
3. Fotografie modelových sušenek s enzym PreventASe® ASG
4. Užitný vzor č. 25037 registrovaný Úřadem průmyslového vlastnictví ČR
5. Užikový vzor č. 6371 registrovaný Úřadem průmyslového vlastnictví SR
6. Užikový vzor č. 6420 registrovaný Úřadem průmyslového vlastnictví SR

10 PŘÍLOHY

Příloha 1: Fotografie chlebů připravených z chlebových směsí Mäspomix v domácí pekárničce

  	  	  
Bramborový chléb	Slunečnicový chléb	Grahamový chléb

Příloha 2: Fotografie modelových sušenek s enzym PreventASe® W a PreventASe® W Extra

<table>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td rowspan="2">Kontrola</td><td></td><td>1250 ASPU/kg mouky</td><td>1750 ASPU/kg mouky</td><td>2250 ASPU/kg mouky</td></tr>
<tr><td></td><td colspan="3">PreventASe® W</td></tr>
</table>

<table>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>2750 ASPU/kg mouky</td><td>3250 ASPU/kg mouky</td><td></td><td>2250 ASPU/kg mouky</td></tr>
<tr><td colspan="2">PreventASe® W</td><td></td><td>PreventASe® W Extra</td></tr>
</table>

Příloha 3: Fotografie modelových sušenek s enzym PreventASe® ASG

				
				
Kontrola		1250 NASPU/kg mouky	1750 NASPU/kg mouky	2250 NASPU/kg mouky
		PreventASe® ASG		

Příloha 4: Užitný vzor č. 25037 registrovaný Úřadem průmyslového vlastnictví ČR

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

25037

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A21D 13/00 (2006.01)
A23L 1/00 (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01)

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2012 - 27113**
(22) Přihlášeno: **05.12.2012**
(30) Právo přednosti: **22.12.2011 SK 50119-2011**
19.06.2012 SK 50055-2012
(47) Zapsáno: **07.03.2013**

(73) Majitel:
Výskumný ústav potravinársky, Bratislava, SK
Mäspomix, s. r. o., Zvolen, SK

(72) Původce:
Ciesarová Zuzana Ing. CSc., Bratislava, SK
Behan Tomáš Ing., Trenčín, SK
Sádecká Jana Ing. PhD., Bratislava, SK
Kukurová Kristína Ing. PhD., Bratislava, SK
Marková Lucie Ing., Telč, CZ
Kravec Ján Ing., Levice, SK

(74) Zástupce:
Hák Janeček & Švestka, Patentová a známková kancelář, Ing. Pavel Janeček, U Průhonu 5, Praha 7, 17000

(54) Název užitného vzoru:
Směs pro přípravu chleba se sníženým obsahem akrylamidu

CZ 25037 U1

Úřad průmyslového vlastnictví v zápisném řízení nezjišťuje, zda předmět užitného vzoru splňuje podmínky způsobilosti k ochraně podle § 1 zák. č. 478/1992 Sb.

Příloha 5: Užitkový vzor č. 6371 registrovaný Úřadem průmyslového vlastnictví SR

SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ÚŽITKOVÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

6371

(21) Číslo prihlášky: **50119-2011**
(22) Dátum podania prihlášky: **22. 12. 2011**
(31) Číslo prioritnej prihlášky:
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky:
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority:
(43) Dátum zverejnenia prihlášky: **3. 9. 2012**
Vestník ÚPV SR č.: **9/2012**
(45) Dátum oznámenia o zápise úžitkového vzoru: **4. 2. 2013**
Vestník ÚPV SR č.: **2/2013**
(47) Dátum zápisu a sprístupnenia úžitkového vzoru verejnosti: **21. 12. 2012**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(67) Číslo pôvodnej patentovej prihlášky v prípade odbočenia:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT:
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT:
(96) Číslo podania európskej patentovej prihlášky:

(13) Druh dokumentu: **Y1**

(51) Int. Cl. (2013.01):

A21D 13/00
A23L 1/00
C12N 1/00

(73) Majiteľ: **Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava, SK;**
Mäspomix, s. r. o., T. G. Masaryka 8/955, 960 01 Zvolen, SK;

(72) Pôvodca: **Ciesarová Zuzana, Ing., CSc., Trebišovská 5, 821 02 Bratislava, SK;**
Behan Tomáš, Ing., Východná 6689/27, 911 08 Trenčín, SK;
Sádecká Jana, Ing., PhD., Beniakova 24, 841 05 Bratislava, SK;
Kukurová Kristína, Ing., PhD., Trenčianska 38, 821 09 Bratislava, SK;
Marková Lucie, Ing., Dobrá Voda 18, 588 56 Telč, CZ;
Kravec Ján, Ing., Okružná 2, 934 01 Levice, SK;

(74) Zástupca: **Litváková Edita, Ing., Litváková a spol., Patentová, známková a znalecká kancelária, Pluhová 78, 831 03 Bratislava, SK;**

(54) Názov **Zmes na prípravu chleba so zníženým obsahom akrylamidu a spôsob prípravy chleba z takejto zmesi**

(57) Anotácia:
Zmes na prípravu chleba so zníženým obsahom akrylamidu, ktorý obsahuje chlorid vápenatý v množstve od 0,1 g do 3,0 g na 100 g zmesi a sušené vitálne droždie v množstve najmenej 1 g a najviac 100 g na 100 g zmesi alebo obsahuje iba sušené vitálne droždie v množstve najmenej 1 g a najviac 10 g na 100 g zmesi. Spôsob prípravy chleba zo zmesi obsahujúcej chlorid vápenatý a sušené vitálne droždie alebo iba sušené vitálne droždie, pri ktorom sa chlieb nechá kysnúť pri teplote 25 až 30 °C 130 minút a potom sa pečie pri teplote 150 až 170 °C 50 minút.

Příloha 6: Užitkový vzor č. 6420 registrovaný Úřadem průmyslového vlastnictví SR

SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ÚŽITKOVÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

6420

(21) Číslo prihlášky: **50055-2012**
(22) Dátum podania prihlášky: **19. 6. 2012**
(31) Číslo prioritnej prihlášky:
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky:
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority:
(43) Dátum zverejnenia prihlášky: **5. 11. 2012**
Vestník ÚPV SR č.: **11/2012**
(45) Dátum oznámenia o zápise úžitkového vzoru: **3. 4. 2013**
Vestník ÚPV SR č.: **4/2013**
(47) Dátum zápisu a sprístupnenia úžitkového vzoru verejnosti: **21. 2. 2013**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(67) Číslo pôvodnej patentovej prihlášky v prípade odbočenia:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT:
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT:
(96) Číslo podania európskej patentovej prihlášky:

(13) Druh dokumentu: **Y1**

(51) Int. Cl. (2013.01):

A23L 1/00
A21D 13/00
C12N 1/00

(73) Majiteľ: **Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava, SK;**
Mäspomix, s. r. o., T. G. Masaryka 8/955, 960 01 Zvolen, SK;

(72) Pôvodca: **Ciesarová Zuzana, Ing., CSc., Trebišovská 5, 821 02 Bratislava, SK;**
Behan Tomáš, Ing., Východná 6689/27, 911 08 Trenčín, SK;
Sádecká Jana, Ing., PhD., Beniakova 24, 841 05 Bratislava, SK;
Kukurová Kristína, Ing., PhD., Trenčianska 38, 821 09 Bratislava, SK;
Marková Lucie, Ing., Dobrá Voda 18, 588 56 Telč, CZ;
Kravec Ján, Ing., Okružná 2, 934 01 Levice, SK;

(74) Zástupca: **Litváková Edita, Ing., Litváková a spol., Patentová, známková a znalecká kancelária, Pluhová 78, 831 03 Bratislava, SK;**

(54) Názov **Zmes na prípravu chleba so zníženým obsahom akrylamidu**

(57) Anotácia:
Zmes na prípravu chleba so zníženým obsahom akrylamidu obsahujúci chlorid vápenatý v množstve od 0,1 g do 3,0 g na 100 g zmesi a sušené vitálne droždie je v množstve od 0,4 g do 1,0 g na 100 g zmesi.