

VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE

HABILITAČNÍ PRÁCE

Praha 2019

Ing. Marcela Sluková, Ph.D.

VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE

Fakulta potravinářské a biochemické technologie

Ústav sacharidů a cereálií

HABILITAČNÍ PRÁCE

POLYSACHARIDY OBILOVIN VE VÝŽIVĚ A TECHNOLOGII

Praha 2019

Ing. Marcela Sluková, Ph.D.

Předkládám tuto práci na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze jako práci habilitační.

Předkládaná práce s názvem „Polysacharidy obilovin ve výživě a technologii“ je členěna na kapitoly uvádějící přehled a vlastnosti potravinářsky významných polysacharidů a oligosacharidů. Na základě vlastností polysacharidů a oligosacharidů jsou voleny postupy jejich identifikace a stanovení. V řadě případů je třeba před vlastním stanovením polysacharidů a oligosacharidů využít extrakční a purifikační postupy. Dále je v práci uveden význam polysacharidů a oligosacharidů ve výživě a jejich vliv na lidské zdraví. V další části práce jsou shrnuty výživové aspekty obilovin se zaměřením na obsah škrobu, neškrobových polysacharidů a oligosacharidů v souvislosti s postupy jejich primárního a sekundárního zpracování. Jsou uvedeny významné technologické kroky, které mohou vést k výrobě potravin s vyšší technologickou, výživovou a senzorickou kvalitou.

Obiloviny jsou významným zdrojem škrobu, jako významné energetické živiny, ale také vlákniny. Díky zásadní změně životního stylu v posledních desetiletích se změnil tradiční pohled na obiloviny a jejich roli ve výživě. Je kladen důraz na snížení energetické hodnoty produktů, která byla v minulosti základním přínosem obilovin v lidské výživě. Současně je věnována pozornost zvýšení obsahu a biologické využitelnosti výživově významných složek obalových a podobalových vrstev, které byly z obilovin ve standardních postupech zpracování odstraňovány z valné části jako vedlejší produkt ve formě otrub. Při zpracování obilovin se uplatňují jak moderní a zcela netradiční technologické postupy primárního i sekundárního zpracování obilovin, tak i postupy velmi staré. Tyto staro-nové postupy jsou ale vedeny se současnou znalostí biochemické a fyzikálně-chemické podstaty obilovin.

V předkládané práci uvádím význam vybraných polysacharidů a oligosacharidů ve výživě, konkrétní postupy jejich stanovení a izolace z různých potravinářských materiálů za účelem ověření jejich kvality nebo jejich dalšího využití v potravinářství. Navrhla jsem a ověřila možnosti, jak docílit zvýšení výživové zpracovávaných obilovin a jejich výrobků, jak uplatnit (aplikovat) nové technologické postupy vedoucí k vývoji výrobků s přijatelnými vlastnostmi po stránce senzorické, výživové i mikrobiologické.

V habilitační práci jsem vycházela z poznatků z literatury, z vlastních experimentálních zkušeností, z příspěvků na konferencích a publikovaných článků, u kterých jsem autorkou nebo spoluautorkou. Dále jsem využila informace z bakalářských a diplomových prací, kde jsem byla vedena jako vedoucí práce a jedné disertační práce, kde jsem působila jako školitel specialista. Odkazy na články, které jsou zpracovány v textu, jsou uvedeny v seznamu citované literatury. V příloze jsou moje vybrané publikace související s tematikou habilitační práce.

OBSAH

1	Polysacharidy a oligosacharidy v potravinách.....	5
1.1	Charakteristika sacharidů v potravinách	5
1.2	Fyzikálně chemické vlastnosti polysacharidů potravin	6
1.3	Přehled potravinářsky významných polysacharidů	8
1.3.1	Příspěvek k identifikaci polysacharidů v potravinách metodou FT-IR.....	15
1.4	Fyzikálně chemické vlastnosti oligosacharidů	16
1.5	Přehled potravinářsky významných oligosacharidů	17
1.6	Význam polysacharidů a oligosacharidů v lidské výživě.....	19
1.6.1	Vláknina	20
1.6.2	Škrob.....	21
1.6.3	Fyziologické účinky vlákniny	23
1.6.4	Metody stanovení vlákniny	24
1.7	Polysacharidy a oligosacharidy obilovin.....	27
1.7.1	Tvorba škrobových zrn a vlastnosti škrobu	27
1.7.2	Stupeň poškození škrobu a jeho výživový význam	29
1.7.3	Vláknina, její složky a látky doprovázející vlákninu v obilovinách	30
1.7.4	Příspěvek ke stanovení β -glukanů hub a kvasinek	37
1.8	Vliv technologických postupů zpracování obilovin na škrob a neškrobové polysacharidy ...	38
1.8.1	Využití ječmene	39
1.8.2	Hydro(termická) úprava	40
1.8.3	Proces mletí.....	41
1.8.4	Využití otrub	43
1.8.5	Využití fermentace - tvorba kvasů.....	43
1.8.6	Procesy při tvorbě těsta (mísení, hnětení, zrání a kynutí).....	47
1.8.7	Procesy pečení, pražení a extruze	49
1.8.8	Procesy provázející chlazení pečiva.....	51
1.8.9	Podstata stárnutí pekařských výrobků	51
1.8.10	Vývoj a hodnocení bezpečnostních výrobků	52
1.8.11	Příspěvek ke studiu oligosacharidů mimo rámec cereální chemie: Vliv teploty a skladování na oligosacharidy mateřského mléka.....	55
2	Seznam použitých symbolů a zkratk.....	57
3	Citovaná literatura.....	58
4	Přílohy.....	66

1 POLYSACHARIDY A OLIGOSACHARIDY V POTRAVINÁCH

1.1 Charakteristika sacharidů v potravinách

Sacharidy patří společně s proteiny a lipidy mezi základní energetické živiny (Stone a Morell, 2009; Pánek *et al.*, 2002; Velíšek a Hajšlová, 1999). Z hlediska výživy jsou jedním ze tří hlavních zdrojů energie přijímaných v potravě a na rozdíl od proteinů a lipidů nemají z tohoto hlediska jiné významné funkce (neobsahují esenciální výživové faktory). V potravinách ale také významně ovlivňují jejich vzhled, texturu, barvu, chuť, nebo trvanlivost. V poslední době stále více narůstá zájem o neškrobové polysacharidy, vlákninu a její složky, a jejich význam ve výživě a dopad na lidské zdraví zejména v souvislosti se střevní mikrobiotou (Lam a Cheung, 2013; Champ, 2008; Venema *et al.*, 2007).

Sacharidy můžeme stručně definovat jako polyhydroxyaldehydy, polyhydroxyketony, alkoholy, kyseliny a jejich deriváty. Díky funkčním skupinám (-OH hydroxylové, -CHO aldehydické nebo C=O ketonické) jsou sacharidy značně reaktivní (reakce neenzymového hnědnutí).

V přírodě se sacharidy tvoří v buňkách autotrofních organismů fotosyntézou. Pletiva rostlinných buněk jsou složena převážně ze sacharidů (80-95 % sušiny), živočišně buňky obsahují sacharidy v nízkém množství. Vedle rostlinných a živočišných sacharidů jsou významné i fungální sacharidy (vyšší a nižší houby) a mikrobiální sacharidy (sacharidy jako součást buněčných stěn kvasinek a bakterií nebo jako produkty mikrobiální činnosti - exopolysacharidy). Sacharidy potravy lze rozdělit podle zdroje, podle funkce (zásobní nebo stavební) a podle vlastností/účinků (využitelné, nevyužitelné, biologicky aktivní - působící jako imunomodulátory, prebiotika, ovlivňující glykemii, tvořící část funkčních složek nukleových kyselin, vitaminů, hormonů, glykoproteinů, koenzymů apod.).

Sacharidy je možné klasifikovat podle různých kritérií, podle délky polymerního řetězce, podle technologických vlastností, podle fyziologických vlastností apod. Sacharidy mohou být klasifikovány podle jejich molekulové hmotnosti nebo stupně polymerizace (DP), tj. podle počtu spojených monosacharidových jednotek, na monosacharidy, oligosacharidy nebo polysacharidy. Další možné dělení sacharidů podle počtu jednotek je rozdělení na cukry jednoduché (monosacharidy a disacharidy) a sacharidy složité (vyšší oligosacharidy a polysacharidy). Zvláštní skupinu sacharidů tvoří sacharidy komplexní neboli konjugované, kde jsou molekuly sacharidů navázány na další molekuly, jako jsou lipidy, proteiny nebo peptidy.

Předkládaná práce je zaměřena na vlastnosti a přehled potravinářsky významných polysacharidů a oligosacharidů, jejich identifikaci a stanovení. Detailněji budou zmíněny polysacharidy obilovin, jejich funkce a význam ve výživě a bude posouzen vliv technologického zpracování na obsah a vlastnosti vybraných polysacharidů potravin.

1.2 Fyzikálně chemické vlastnosti polysacharidů potravin

Polysacharidy jsou složeny z desítek až tisíců stejných (homopolysacharidy – škrob, celulósa, dextran) nebo různých monosacharidů (heteropolysacharidy – hemicelulosa, pektin), ale přesný počet jejich stavebních jednotek nemusí být vždy určen (Stone a Morell, 2009; Velíšek a Hajšlová, 1999). Polysacharidy se mezi sebou liší svojí strukturou (monosacharidovým složením, typem glykosidové vazby, molekulovou hmotností, stupněm polymerizace, délkou řetězce a stupněm větvení, přítomností funkčních skupin) a fyziologickými účinky (škrob a neškrbové polysacharidy, škrob a vláknina).

Ze struktury polysacharidů vyplývají jejich fyzikální vlastnosti, jako je rozpustnost ve vodě, viskozita, schopnost tvořit suspenze, gely, komplexy apod. V přítomnosti hydrolytických enzymů nebo kyselin dochází ke štěpení polysacharidů na molekuly s kratším řetězcem.

Rozlišujeme polysacharidy kyselé obsahující karboxylové skupiny (pektin, algináty) nebo sulfonové skupiny (karagenany) a polysacharidy neutrální (celulósa, galaktomannany). Polysacharidy mohou být lineární (celulósa) nebo větvené (arabinoxylany). Nejrozšířenější jsou v přírodě homopolymery D-glukosy (glukany). Polysacharidy jsou většinou nerozpustné ve studené vodě, z některých lze v horké vodě připravit koloidní roztoky nebo gely. Ve vodě rozpustné polysacharidy zvyšují viskozitu potravin, některé vytváří gely a mohou být tedy použity jako přídatné látky potravin (gelotvorné prostředky, plnidla, zahušťovadla a stabilizátory pěn a emulzí apod.).

Rozpustnost polysacharidů závisí na jejich chemické struktuře (složení, stupeň polymerizace, typ glykosidové vazby, povaha funkčních skupin, typ postranního řetězce), koncentraci a vzájemných interakcích s ostatními složkami, a na podmínkách prostředí (teplota, tlak, pH, doba, typ a poměr rozpouštědla, způsob míchání apod.) (Whistler a BeMiller, 1997). Významnými vlastnostmi ve vodě rozpustných nebo bobtnavých polysacharidů (hydrokoloidů) je schopnost vázat a zadržovat vodu, v tomto případě závisí vazebné schopnosti na poměru hydrofilních a hydrofobních částí molekuly polysacharidu, poměru amorfní a (semi)krystalické formy polysacharidu, velikosti částic (distribuci velikosti částic) a mikroporozitě materiálu. Reologické vlastnosti polysacharidů jsou dány jejich chemickou strukturou, stupněm polymerizace, koncentrací, obsahem vody, inter- a intramolekulárními interakcemi s ostatními složkami (ionty, proteiny, sacharosa). Vliv mají samozřejmě také teplota, doba a pH.

Primární strukturu polysacharidů určuje konfigurace monosacharidů a jejich pořadí v sacharidovém řetězci (Čopíková, 1997). Typ glykosidové vazby a jejich vzájemné vazebné úhly určují sekundární strukturu polysacharidu. Sekundární struktura určuje terciární struktury polysacharidů. Nadmolekulární entity typu škrobových zrn popisujeme na úrovni kvarterních struktur.

Prvním krokem při studiu polysacharidů je jejich izolace z homogenizovaného materiálu. Extrakční podmínky se liší podle rozpustnosti polysacharidů a pevnosti vazeb v jejich struktuře.

K extrakci se používají vodné roztoky s hodnotou pH v širokém rozsahu, s různou iontovou silou. Extrakce může probíhat za laboratorní teploty nebo při vyšších teplotách, extrakce obvykle bývá opakovaná, může probíhat pod zpětným chladičem apod.

Vhodným způsobem (srážením nebo enzymovou úpravou) je třeba odstranit jiné vysokomolekulární látky (například proteiny) z extraktu. Z extraktů mohou být poté odstraňovány nízkomolekulární látky různými způsoby, například gelovou permeační chromatografií nebo dialýzou. Z purifikovaného extraktu mohou být poté polysacharidy separovány například odstředováním, filtrací nebo srážením, nejčastěji etanolem. Pro ověření čistoty extraktu polysacharidu se používají spektrální metody (FT-IR, infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací; NMR, nukleární magnetická rezonance).

Škrob je možno extrahovat vodou při zvýšené teplotě, pektin je extrahován obvykle zředěnou kyselinou chlorovodíkovou při pH 1,5 nebo v mírně alkalickém prostředí nebo také za přídavku kyseliny etylendiamintetraoctové. Hemicelulosa a celulóza se extrahují v silně kyselém nebo alkalickém prostředí, což vlastně vede k jejich částečné hydrolýze. Při extrakci polysacharidů se také používá částečná enzymová hydrolýza. Kombinovaná extrakce kyselými a alkalickými roztoky nebo enzymová hydrolýza se používají při stanovení rozpustné a nerozpustné vlákniny (viz kapitola Metody stanovení vlákniny).

Důležitým krokem bývá při studiu polysacharidů stanovení jejich molekulové hmotnosti, určuje se buď hmotnostní střed nebo číselný střed pomocí gelové permeační chromatografie nebo viskozitním měřením. Gelová permeační chromatografie musí být k tomu účelu vybavena speciálními detektory, jako je například viskozitní detektor nebo detektor pracující na principu rozptylu světla.

Složení polysacharidů se stanovuje po jejich totální kyselé, enzymové nebo kombinované hydrolýze. Jednotlivé uvolněné cukry jsou pak stanoveny kapalinovou nebo plynovou chromatografií, nebo spektrofotometricky. Ke stanovení typu vazby nebo poměru vazeb v molekule polysacharidu se používá zejména tzv. metylační analýza. Při studiu struktury sacharidů nachází uplatnění NMR spektroskopie jak ^1H tak ^{13}C uspořádání. Z posunů signálů NMR spekter je možné identifikovat jednotlivé monosacharidové jednotky, typy glykosidových vazeb a jejich polohu, konformaci jednotek a způsob větvení polysacharidu.

Při analýze polysacharidů (ke sledování fyzikálně-chemických vlastností nebo k pozorování mikrostruktury) lze využít i metody termické analýzy mikroskopické pozorování (optický nebo elektronový mikroskop) a další.

1.3 Přehled potravinářsky významných polysacharidů

Polysacharidy v rostlinách mají stavební funkci (celulosa, hemicelulosa, pektin, karagenany, galaktomannany) nebo slouží rostlinám jako zásobárna energie (škrob, fruktany) (Whistler a BeMiller, 1997). Živočišné polysacharidy slouží také jako zásoba energie (glykogen), mají významné biologické funkce (hyaluronová kyselina, heparin, chondroitin a chondroitinsulfát), nebo jsou součástí živočišných skeletů (chitin) (Kurita, 1998). Mikrobiální polysacharidy mohou být součástí buněčných stěn kvasinek [β -glukany s vazbami (1,3) a (1,6)] nebo bakterií [cyklické β -glukany s vazbami (1,2)] nebo jsou uvolňovány do vnějšího prostředí (polysacharidy xanthan, dextran a bakteriální levan). Buněčné stěny vyšších hub a mořských řas jsou zdrojem například β -(1,3),(1,6)-D-glukanů nebo tzv. laminaranů nebo fukoidanů [jedná se většinou o lineární β -glukany spojené vazbami (1,3)] (Ponce *et al.*, 2003; Grün, 2003). Polysacharidy s biologickými funkcemi se nachází zejména v cytoplazmě, zásobní polysacharidy jsou uloženy v plastidech, zatímco neškrobové polysacharidy ve vakuolách buňky.

Škrob

Škrob je z hlediska lidské výživy nejvýznamnějším polysacharidem a nejvíce zastoupenou složkou všech obilovin, pseudoobilovin, brambor a dalších více či méně významných rostlinných surovin (luštěniny, batáty apod.) (Velíšek a Hajšlová, 1999). Tvoří zásobu chemické energie, kterou lze uvolnit jeho odbouráváním.

V přírodě se vyskytuje ve formě škrobových zrn uložených v cytoplazmě buněk semen, kořenů, hlíz a listů (Velíšek, 1999). Většina nativních škrobů je směsí amylosy a amylopektinu, dvou makromolekulárních složek tvořených molekulami α -D-glukopyranosy. Vyskytují se obvykle v hmotnostním poměru 1:3. Poměrné zastoupení obou polysacharidů však může u škrobů z různých druhů rostlin značně kolísat.

Většina nativních obilných škrobů obsahuje 20-25 % amylosy a 75-80 % amylopektinu. Jsou však známy speciálně vyšlechtěné odrůdy s vysokým obsahem amylosy nebo amylopektinu. U ječmene nebo kukuřice jsou známy a v potravinářství používané odrůdy s *waxy* typem škroby (převažuje frakce amylopektinu, obsah amylosy se pohybuje 0-5 %) nebo odrůdy s vysokoamylosovým typem škrobu (obsah amylosy bývá 60-70 %). Tyto škroby vykazují odlišné fyzikální vlastnosti a reologické chování.

Amylosa se skládá z nevětveného řetězce molekul glukosy, které jsou spojeny vazbami α -(1,4). Díky těmto vazbám vytváří molekula amylosy levotočivou nebo pravotočivou jednochodou nebo dvojchodou šroubovici. Amylosa je rozpustná ve vodě. Molekulová hmotnost amylosy se pohybuje v rozmezí 10^5 - 10^6 g/mol. Amylopektin má větvenou strukturu, kromě vazeb α -1,4 obsahuje i vazby α -(1,6). Amylopektin se ve vodě nerozpouští a jeho molekulová hmotnost může dosahovat až 10^7 - 10^8 g/mol. Je potřeba zmínit, že přechod mezi oběma složkami škrobu je pozvolný a striktní vymezení obou frakcí je zjednodušené.

Modifikované škroby

Na trhu je široká nabídka modifikovaných škrobů (chemická, termická, enzymová modifikace nativního škrobu) speciálně vyráběných podle požadovaných funkčních vlastností (Whistler a BeMiller, 1997). Přídavek modifikovaných škrobů může významně ovlivňovat reologické vlastnosti těsta a výslednou strukturu a stárnutí nejen pekařských výrobků.

Hlavními zástupci modifikovaných škrobů používaných v cereální technologii jako přídatné látky nebo složky bezlepkových výrobků jsou oxidovaný škrob používaný jako zahušťovadlo a stabilizátor (zlepšení vaznosti těsta) a substituované škroby (etery, estery, zesíťené škroby) (oktenylsukcinát, hydroxypropyl škrob a další).

Celulosa

Celulosa je nejvýznamnější a nejrozšířenější organickou sloučeninou biosféry (Whistler a BeMiller, 1997). Řadí se mezi stavební polysacharidy, spolu s ligninem, hemicelulosami a pektinem vyztužuje a zpevňuje pletiva rostlin, buněčné stěny řas, hub a mnohých mikroorganismů a i tkáně některých živočichů (například pláštěnců). Dodává jim pevnost a elasticitu, chrání buňky před mechanickým poškozením a zároveň brání pronikání vlhkosti a nežádoucích mikroorganismů (Vodrážka *et al.*, 1996). Její vláknité (celulosová vlákna - mikrofibrily), lineární, ve vodě nerozpustné řetězce jsou tvořeny 1400 až 10000 jednotkami D-glukosy spojenými vazbou β -(1,4).

Modifikované celulosy

Nejčastěji využívané deriváty celulosy jsou metylcelulosa (MC), karboxymethylcelulosa (CMC) a hydroxypropylmethylcelulosa (HPMC) (Hoefer, 2004). Slouží jako významné přídatné látky pekařských a cukrářských výrobků a jako náhrada lepku v bezlepkových výrobcích. Často jsou používány v technologii kombinace hydrokoloidů, například HPMC a xanthan nebo tara guma apod. s účinností při velmi nízkých množstvích. Zdravotní účinky konzumace HPMC jsou uvedeny v Nařízení Komise EU č. 432/2012. „Konzumace (hydroxypropyl)methylcelulosy s jídlem přispívá k omezení nárůstu hladiny glukosy v krvi po tomto jídle. Tvrzení smí být použito pouze u potravin, které obsahují 4 g HPMC v kvantifikované porci jakožto součásti jídla. Aby bylo možné tvrzení použít, musí být spotřebitel informován, že příznivého účinku se dosáhne konzumací 4 g HPMC jakožto součásti jídla. Je třeba varovat před udušením, které hrozí osobám s polykacími obtížemi nebo při zapití neodpovídajícím množstvím tekutin“. „(Hydroxypropyl)methylcelulosa přispívá k udržení normální hladiny cholesterolu v krvi. Tvrzení smí být použito pouze u potravin, které poskytují přívod 5 g HPMC denně. Aby bylo možné tvrzení použít, musí být spotřebitel informován, že příznivého účinku se dosáhne při přívodu 5 g HPMC denně“.

Hemicelulosa

Stavební materiál rostlin vzniká spojením několika paralelně uspořádaných celulosových řetězců stabilizovaných vodíkovými vazbami, přičemž tmel mezi nimi vytvářejí hemicelulosy. Obsahují jako stavební jednotky různé monosacharidy (D-xylosu, D-galaktosu, L-arabinosu, D-

glukosu) a uronové kyseliny. Příkladem hemicelulos jsou xylany, xyloglukany, β -glukany, arabinoxylany, mannany a galaktany (Velíšek a Hajšlová, 1999).

Xylany jsou obsažené hlavně ve dřevě a ve slámě. Xyloglukany jsou dominantními hemicelulosami buněčných stěn ovoce, většiny zelenin, okopanin a luštěnin. Polysacharidy nazývané β -glukany se nacházejí v buněčných stěnách vyšších rostlin, mořských řas, hub i mikroorganismů. Ve větším množství jsou β -glukany se smíšenými vazbami v semenech některých obilovin (ječmen a oves). Mannany jsou rozšířené v četných druzích dřev a skořápkách některých ořechů, arabinomannany se vyskytují v obilovinách a galaktany jsou v obalových vrstvách zrn a semen. Arabinoxylany, starší název pentosany, jsou důležitými složkami některých obilovin, například pšenice a zejména žita.

Fruktany

Fruktany jsou nevyužitelné zásobní sacharidy s vazbami β -(1,2) (Stone a Morell, 2009). Zdrojem fruktanů jsou cibule, česnek, pórek, artyčoky, chřest, hlízy topinamburu, kořen čekanky, obiloviny, luštěniny, zelí, brokolice, pistácie a další ořechy, některé druhy ovoce (meruňky, švestky) apod. Fruktany se od sebe liší strukturou a molekulovou hmotností a mohou být rozděleny do tří skupin na inuliny, levany a fruktany s větvenou strukturou. V některých literárních zdrojích jsou klasifikovány fruktany (inuliny a fruktooligosacharidy, FOS) jako oligosacharidy, zatímco v jiné literatuře se řadí mezi polysacharidy.

Fruktany působí jako prebiotika, podporují růst bifidobakterií v tlustém střevě. Bifidobakterie fermentují fruktany na mastné kyseliny s krátkým řetězcem (octová, propionová a máselná kyselina), které mají pozitivní vliv například na metabolismus lipidů, snižují pH v tlustém střevě apod.

Fruktany s krátkým řetězcem mají sladkou chuť, tvoří složky přírodních nízkokalorických sladidel. Fruktany s dlouhým řetězcem jsou chuťově neutrální a vytvářejí emulze se strukturou podobnou tukům (mohou sloužit jako tzv. *fat mimetics*, neboli náhrady tuků).

Guarová a lokustová guma

Vedle škrobu a fruktanů jsou zásobními polysacharidy některých semen heteromannany (Velíšek a Hajšlová, 1999). Jejich řetězec je tvořen jednotkami D-mannosy spojenými vazbami β -(1,4) a na některé z mannosových jednotek je vázána α -D-galaktosa. Tyto heteromannany se nazývají galaktomannany a významnými zástupci jsou guarová a lokustová guma, které našly použití jako potravinářské hydrokoloidy (látky upravující texturu potravin, látky s funkcí zahušťovadel a stabilizátorů disperzí). Jsou to neutrální polysacharidy, které vytváří viskózní roztoky. Samotné gummy gely netvoří, ale lze je kombinovat s xanthanem, karagenany, škroby apod. za tvorby stabilních a pevných gelů. Poměr galaktosy k mannose je u guarové mouky 1:2, zatímco u lokustové gummy je poměr 1:4.

Guarová guma (guar) je mouka z endospermu semen bobovité rostliny *Cyamopsis tetragonolobus* pěstované v teplých oblastech (hlavně Indie a USA). Guar patří mezi nejčastěji

používané hydrokoloidy v bezlepkovém pečivu (jako náhrada lepkové struktury). Při označování potravin s obsahem guarové gumy je možné využít zdravotní tvrzení a podmínky jeho používání (Nařízení Komise EU č. 432/2012): „Guarová guma přispívá k udržení normální hladiny cholesterolu v krvi. Tvrzení smí být použito pouze u potravin, které poskytují přívod 10 g guarové gumy denně. Je třeba varovat před udušením, které hrozí osobám s polykacími obtížemi nebo při zapití neodpovídajícím množstvím tekutin“.

Lokustová guma se získává ze semen bobovité rostliny, stromu rohovníku obecného (*Ceratonia siliqua*), jehož plody s názvem svatojánský chléb nebo karob slouží také jako náhrada kakaa. Pochází ze Středomoří a v dnešní době se pěstuje hlavně ve Španělsku, USA a Austrálii. Je to poměrně drahý hydrokoloid, proto bývá často falšován levnější guarovou gumou.

Pektin

Ve střední buněčné lamelle ovoce a v jiných rostlinných pletivech jsou přítomny částečně metylované poly-D-galakturonové kyseliny s vazbami α -(1,4), zvané pektiny (Whistler a BeMiller, 1997). Pektinové látky se používají zejména v potravinářském průmyslu k přípravě ovocných pomazánek (džemů, marmelád), želé cukrovinek apod. Vyrábí se extrakcí vhodného materiálu, jako tzv. jablečný, citrusový nebo řepný pektin. Molekula citrusového pektinu tvoří podle podmínek jednochodou nebo dvojchodou šroubovici (Čopíková, 1997). U řepného pektinu jsou na hlavní řetězec navázány boční řetězce neutrálních cukrů, arabinosy, xylosy, galaktosy a L-ramnosy. Řepný pektin navíc obsahuje kyselinu ferulovou (4-hydroxy-3-metoxyskořicovou).

Karboxylové skupiny pektinu jsou částečně metylovány. Relativní obsah metylesterových skupin se nazývá stupeň metylesterifikace pektinu DM (%). Pektin se stupněm esterifikace vyšším než 50 % se označuje jako vysokoesterifikovaný pektin (vysokometylovaný) a pektin s nižším obsahem metylesterových skupin se nazývá nízkoesterifikovaný (nízkometylovaný). Demetylovaný pektin se nazývá pektinová kyselina. Nevětvený polymer obsahující pouze D-galakturonovou kyselinu se nazývá polygalakturonová kyselina.

Pektin má vliv na metabolismus glukosy a může snižovat obsah cholesterolu v krvi (Velíšek a Hajšlová, 1999). Nejúčinněji se jeví pektiny ovocného původu, které jsou téměř úplně metylovány. Nařízení Komise č. 432/2012 uvádí 2 zdravotní tvrzení: „Pektiny přispívají k udržení normální hladiny cholesterolu v krvi; konzumace pektinů s jídlem přispívá k omezení nárůstu hladiny glukosy v krvi po tomto jídle“.

Karagenany

Karagenany jsou významnými zástupci skupiny potravinářsky důležitých polysacharidů mořských řas. Karagenany se získávají z červených mořských řas rostoucích v teplých mořích (Whistler a BeMiller, 1997; Čopíková, 1997). Karagenany jsou lineární polysacharidy, jejichž stavební jednotkou je galaktosa. Jedná se o částečně sulfonované galaktany s vazbami α -(1,3) a β -(1,4). Podle stupně esterifikace se dělí na frakce ι -karagenan, λ -karagenan a κ -karagenan,

z nichž želírující vlastnosti mají pouze frakce κ a ι . Karagenan typu λ je natolik sulfonovaný, že není schopen vytvářet gely.

Komerční karagenan je směsí všech tří typů karagenanů (Velíšek a Hajšlová, 1999). Většinou převládá κ -karagenan nad λ -karagenanem v poměru asi 3:2. Používá se jako zahušťovadlo, gelotvorná látka, stabilizátor a emulgátor při výrobě mléčných dezertů, mléčných nápojů, zmrzlin a při výrobě masových konzerv.

Rostlinné gummy

Exudáty rostlin nazývané rostlinné gummy nebo také klovatiny jsou zpravidla lepivé šťávy vytékající samovolně z rostlinných pletiv v důsledku působení různých stresových faktorů nebo při poranění (Whistler a BeMiller, 1997; Čopíková, 1997). Na vzduchu časem tuhnou v pevné gumovité hmoty. Rostlinné gummy jsou vysoce hydrofilní (hydrokoloidy) a ve vodě dobře rozpustné polysacharidy. Mezi rostlinné gummy se řadí arabská guma, guma tragant, guma karaja, guma ghatti a další.

Z rostlinných gum má v potravinářství největší význam arabská guma. Arabská guma je výron stromu akácie, která roste v Africe na pobřeží Rudého moře. Arabská guma je substituovaný kyselý arabinogalaktan, který se skládá z D-galaktosy, kyseliny glukuronové, L-rhamnosy a L-arabinosy. Na arabskou gumu jsou prostřednictvím arabinosy v bočních řetězcích navázány kovalentními vazbami proteiny. Navázané proteiny, jejichž obsah se pohybuje kolem 2 %, obsahují zejména aminokyseliny hydroxyprolin, serin a prolin.

Arabská guma se používá jako stabilizátor a pomocný prostředek při dražování cukrovinek. Arabskou gumu lze kombinovat s ostatními gumami, škroby, želatinou a sacharidy. Na rozdíl od ostatních polysacharidů je možno připravit až 50% vodný roztok.

Xanthan

Xanthanová guma čili xanthan je nejvýznamnějším extracelulárním bakteriálním hydrokoloidem používaným pro potravinářské účely (Whistler a BeMiller, 1999; Velíšek a Hajšlová, 1997). Xanthan vzniká fermentací glukosy nebo fruktosy a jeho producentem jsou aerobní bakterie rodu *Xanthomonas*. Hlavní řetězec xanthanu je tvořen β -D-(1,4) glukosovými jednotkami stejně jako u celulosy. Jednoduché nebo dvojité šroubovice molekuly xanthanu jsou stabilizovány postranními řetězci. Postranní řetězce, obvykle trisacharidy, jsou tvořeny zbytkem D-glukuronové kyseliny a dvěma zbytky D-mannosy. Vnitřní mannosová jednotka v postranním řetězci může být v poloze C₆ acetylována, zatímco skupiny na C₄ a C₆ koncové mannosy jsou spojeny pyruvátem. Molekulová hmotnost xanthanu bývá kolem 15 · 10⁶ g/mol. Xanthan je dobře rozpustný ve vodě a vzniklé disperze jsou vysoce viskózní. Samotný xanthan netvoří gely, avšak ve směsích s galaktomannany (lokustovou gumou) nebo κ -karagenanem vznikají termoreverzibilní gely. Xanthan slouží především jako zahušťovadlo a stabilizátor emulzí a také jako významná složka bezlepkového pečiva.

Glukany kvasinek, plísní a vyšších hub

Řada mikroorganismů produkuje množství extra- a intracelulárních polysacharidů. Jedinečné vlastnosti vykazují strukturní polysacharidy buněčných stěn kvasinek a vyšších hub. Jedná se o β -glukany s kombinovanými vazbami β -(1,3) a β -(1,6), které vykazují antibakteriální, antivirové a antikancerogenní účinky. Aktivita a schopnost posilovat imunitní systém souvisí se stupněm substituce, četností větvení, počtem glukosových jednotek, molekulovou hmotností a konformací molekuly glukanu (Synytsya a Novák, 2013; Novák, 2007).

Beta-glukany mohou být nevětvené (lineární), nebo větvené polysacharidy. Podle typu glykosidové vazby rozlišujeme vedle β -glukanů také α -glukany. Jedná se zejména o skupinu glukanů z hub, kde jsou glukosové jednotky spojeny vazbami α -(1,3), α -(1,4) nebo α -(1,6), nebo jejich kombinacemi.

Novější studie uvádí, že buněčné stěny kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* obsahují i glukany spojené vazbami α -(1,3). β -glukany s vazbami β -(1,3) a β -(1,6) izolované z buněčné stěny kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jsou nejintenzivněji studovanými β -glukany, které vykazují nejsilnější biologické účinky v porovnání s ostatními druhy kvasinek (Sugawara *et al.*, 2014). Řetězec β -glukanů hub je nejčastěji tvořen jednotkami β -(1,3)-D-glukanu s místem větvení β -(1,6). β -glukany lišejníku a mechu (někdy nazývané také lichenany) jsou naopak lineární molekuly spojené glykosidovými vazbami β -(1,3) a β -(1,4) s podobným uspořádáním jako obilné beta-glukany (Olafsdottir a Ingólfssdottir, 2001).

Ve zralých houbách jsou hlavní řetězce β -glukanů stočeny do trojitě šroubovice stabilizované postranními řetězci s molekulovou hmotností vyšší než 90 kg/mol. Díky těmto vlastnostem je podpořena funkce fagocytózy a s tím související očekávaný zdravotní účinek β -glukanů. β -glukany vybraných jedlých hub (například hlíva ústříčná, pečárka dvouvýtrusná, penízovka sametonohá aj.) mohou mít pozitivní vliv na snižování hladiny cholesterolu a lipoproteinu s nízkou hustotou (LDL cholesterolu), což může vést ke snížení rizika vzniku srdečně-cévních onemocnění (Khan *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2015). Pro dané typy β -glukanů zatím nejsou schválena žádná zdravotní tvrzení.

β -glukany mohou být izolovány různými postupy z rostlinných nebo mikrobiálních zdrojů. β -glukany z rozdílných zdrojů se liší svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, jako jsou struktura molekuly, větvení řetězce, typ a počet vazeb v molekule, molekulová hmotnost, rozpustnost, vaznost vody, viskozita apod. S těmito vlastnostmi, s původem a čistotou izolovaných β -glukanů souvisí také odlišná biologická aktivita a jejich potenciální zdravotní účinky. Izolované frakce β -glukanů jsou významnými doplňky stravy a tvoří součást řady farmaceutických a kosmetických přípravků. Některé β -glukany mají zřejmě schopnost podporovat imunitní reakce v organismu, a proto se řadí mezi tzv. imunostimulátory (biostimulátory). Jiné β -glukany se podílejí na udržení normální hladiny cholesterolu a glukosy v krvi po jídle apod.

O většině β -glukanů a zejména o jejich skutečném fyziologickém účinku v lidském těle však nemáme stále dostatečné informace.

Glykogen

Glykogen je zásobním polysacharidem a hlavním zdrojem energie přítomným ve všech živočišných buňkách (Velíšek a Hajšlová, 1999). Z hlediska struktury se podobá glykogen amylopektinu (složce škrobu). Glykogen je také α -glukan (glukosové jednotky spojené vazbami 1,4 a 1,6), je však více větvený a více rozpustný než amylopektin, a jeho výživový význam je malý. Nejvíce glykogenu je uloženo v játrech živočichů. Vyskytuje se ve formě granulí v buněčné cytoplazmě. Glykogen je také obsažen ve vyšších houbách, kvasinkách a bakteriích.

Chitin a chitosan

Chitin je živočišný polysacharid složený z molekul *N*-acetyl- β -D-glukosaminu a β -D-glukosaminu, v němž jsou oba monomery vzájemně vázány β -(1,4) glykosidovými vazbami (Kurita, 1998). Vedle celulosy je chitin nejrozšířenějším polysacharidem v přírodě. Chitin je hlavní složkou kutikuly členovců, která je u některých (například u hmyzu, krabů, raků apod.) pomocí minerálních látek zpevněna a přeměněna v exoskelet (pevnou vnější kostru). Chitin v spojení s proteiny je součástí buněčných stěn některých řas, hub, kvasinek a bakterií. Přirozeně přítomný chitin konzumují lidé (zatím) velmi málo. Existují však různé stravovací zvyklosti a styly a chitin může být tak přijímán ve stravě ve vyšším množství (smažení a opékání brouci, upravení šneci a krabi se skořápkami, novel food apod.). Preparáty s obsahem chitinu jsou žádané doplňky stravy.

Z chitinu se parciální alkalickou hydrolýzou acetylových skupin získává ve vodě rozpustný chitosan. Na základě schválených zdravotních tvrzení (Nařízení Komise EU č. 432/2012) je možné na obale výrobku uvést: „Chitosan přispívá k udržení normální hladiny cholesterolu v krvi. Tvrzení smí být použito pouze u potravin, které poskytují přívod 3 g chitosanu denně. Aby bylo možné tvrzení použít, musí být spotřebitel informován, že příznivého účinku se dosáhne při přívodu 3 g chitosanu denně“.

1.3.1 Příspěvek k identifikaci polysacharidů v potravinách metodou FT-IR

Pro screening a ověření kvality polysacharidů v potravinách lze využít spektrální data (FT-IR, infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací) (**Příloha 1: Čopíková *et al.*, 2001**) zpracovaná některou z metod multivariační analýzy (PCA, *Principal Component Analysis*, analýza hlavních složek) (Ferreira *et al.*, 2001; Coimbra *et al.*, 1998). Podle charakteristických vlnočtů v oblasti spektra 1200-800 cm⁻¹ bylo možné identifikovat a rozřadit jednotlivé skupiny izolovaných polysacharidů a jejich standardů (škrob, karagenany, pektin), dále monomery glukosy a galaktosy od jejich polymerů. Bylo možné separovat standardy sacharosy, fruktosy, mannosy a arabinosy, a dokonce i rozlišit jednotlivé typy karagenanů (κ-, λ-, ι-karagenany). Výsledky ukázaly, že FT-IR spektrometrie v oblasti 1200-800 cm⁻¹ je vhodnou technikou pro ověření autenticity potravinářsky významných polysacharidů a může být použita jako rychlý screening polysacharidů používaných jako přídatné látky v potravinách (**Příloha 2: Černá *et al.*, 2003**).

1.4 Fyzikálně chemické vlastnosti oligosacharidů

Oligosacharidy se sestávají ze dvou až deseti vzájemně vázaných monosacharidů spojených glykosidovou vazbou (Whistler a BeMiller, 1999). Molekuly monosacharidů se vyskytují v cyklické formě, přičemž ke vzniku glykosidové vazby dochází kondenzací mezi -OH skupinou prvního uhlíku jedné monosacharidové jednotky a jednou -OH skupinou jiné monosacharidové jednotky. Takto vzniklá glykosidová vazba může být rozrušena hydrolýzou (kyselá, alkalická, enzymová hydrolýza). Pro výslednou strukturu a vlastnosti oligosacharidu je důležité, mezi kterými -OH skupinami zúčastněných monosacharidů glykosidová vazba vzniká a jaká je konfigurace uhlíku nesoucím hydroxylovou skupinu, která tvoří glykosidovou vazbu.

Jak monosacharidy, tak disacharidy jsou charakterizovány svými vlastnostmi, jako je sladivost, rozpustnost ve vodě, případně, zda jsou fermentovatelné různými mikroorganismy. Některé tri-, tetra- a pentasacharidy vykazují prebiotické účinky. Jedná se o galaktooligosacharidy mléka nebo luštěnin a fruktooligosacharidy obilovin, ovoce a zeleniny. Galaktooligosacharidy luštěnin a řady zeleniny (česnek, cibule) jsou řazeny do skupiny flatulentních oligosacharidů a mohou způsobovat zažívací potíže (nadýmání, plynatost) (Pánek *et al.*, 2002).

Extrakce oligosacharidů se nejčastěji provádí vodou nebo za použití vodných roztoků pufrů o optimálním pH (Čopíková, 1997). Může následovat inkubace s příslušnými enzymy, filtrace suspenze a kvalitativní a kvantitativní analýza (chromatografická nebo spektrofotometrická koncovka; ověření čistoty spektrálními metodami apod.).

Stanovení molekulové hmotnosti oligosacharidů, jejich složení, určení poměru vazeb v molekule apod. jsou podobná postupům stanovení jako u polysacharidů.

1.5 Přehled potravinářsky významných oligosacharidů

Oligosacharidy slouží v lidské výživě jako zdroj energie a řada z nich vykazuje biologickou aktivitu (prebiotické nebo imunologické účinky, složka vlákniny apod.) (Whistler a BeMiller, 1999). Mezi nejběžnější oligosacharidy v potravinách patří sacharosa, maltosa, laktosa, galaktooligosacharidy a rafinosa.

Maltosa

Maltosa zvaná také jako sladový cukr je tvořena ze dvou jednotek glukosy spojených α -(1,4) glykosidovou vazbou. Díky volné aldehydické skupině patří maltosa mezi redukující sacharidy. S nízkou sladivostí (30-60 % sladivosti sacharosy). Maltosa vzniká jako předposlední produkt hydrolýzy škrobu (posledním produktem hydrolýzy škrobu je glukosa) a u obilného zrna s vyšším podílem narušeného škrobu se vyskytuje ve větším množství. Vyšší obsah maltosy (stanovuje se titračně jako redukující cukry) se nachází v například porostlém obilí (tj. předčasně naklíčeném zrně, nejčastěji v žitě, k čemuž dochází při deštivém počasí v období sklizně nebo při nevhodném skladování obilí).

Laktosa

Laktosa neboli mléčný cukr je redukující disacharid obsažený v mléce. Laktosa je méně rozpustná ve vodě než ostatní cukry, glykemický index má 45 a nízkou sladivost (16 % sladivosti sacharosy). Laktosa je využitelná po hydrolýze jako zdroj energie. Při nedostatečné aktivitě enzymu laktasy (β -galaktosidasy) se nerozštěpená laktosa dostává do tlustého střeva. Zde je fermentována přítomnými bakteriemi na organické kyseliny, které způsobují zvýšenou zádrž vody, a na plynné produkty - vodík a oxid uhličitý. To může vést k projevům laktosové intolerance, které se projevují nadýmáním, křečemi, plynatostí a v extrémních případech i průjmami, žaludeční nevolností a zvracením. Laktosa slouží jako surovina pro výrobu vyšších galaktooligosacharidů, laktulose a laktitolu. Aminocukry odvozené od galaktooligosacharidů mateřského mléka jsou růstovým faktorem mikroorganismů *Bifidobacterium bifidum*.

Sacharosa

Sacharosa neboli řepný či třtinový cukr je disacharid, jehož molekula je tvořena glukosou a fruktosou spojených α -(1,2) glykosidovou vazbou. Sacharosa je neredukující cukr, s glykemickým indexem 65. Její sladivost (hodnota 100 %) byla stanovena jako standard pro sladkou chuť. Sacharosa a maltosa vykazují kariogenní účinky, relativně slabší kariogenní účinky má laktosa.

Rafinosa

Rafinosa je kvasitelný, ve vodě rozpustný trisacharid, sestávající z galaktosy, fruktosy a glukosy. Sladivost raffinose se udává kolem 20 % sladivosti sacharosy. Rafinosa se ve vyšším množství vyskytuje v luštěninách, cibuli, zelí a obilovinách. Od raffinose jsou odvozeny další oligosacharidy, mezi které patří tetrasacharid stachyosa, pentasacharid verbaskosa a hexasacharid ajugosa. Přítomné oligosacharidy, α -galaktosidy (nazývané galaktooligosacharidy a tzv. flatulentní oligosacharidy) nejsou štěpeny trávicími enzymy

lidského těla a dostávají se do tlustého střeva, kde jsou rozkládány mikroorganismy za tvorby značného množství plynů (oxid uhličitý, vodík a metan) způsobující nadýmání. Částečně lze tyto α -galaktosidy odstranit klíčením a namáčením semen, enzymovou hydrolýzou nebo různými tepelnými postupy. Tyto sacharidy však mohou stimulovat růst bifidobakterií a mohou být využitelné i jinými bakteriemi tlustého střeva.

Další oligosacharidy

Z pšeničných otrub jako vedlejšího produktu mlýnského zpracování se v průmyslovém měřítku získávají enzymovou hydrolýzou arabinoxylanů (působením enzymu endo-1,4-xylanasa) xylooligosacharidy s vazbou β -(1,4) prokazující významnou prebiotickou aktivitu (Gullón *et al.*, 2014).

Galaktooligosacharidy jsou živočišného původu (kravské mléko) a průmyslově se vyrábí z laktosy transgalaktosylací účinkem β -galaktosidasy (Rudolfová a Čurda, 2005). Podobně jako FOS působí jako složka rozpustné vlákniny. GOS mají kromě fyziologických účinků také významné fyzikálně-chemické vlastnosti. Zvyšují viskozitu výrobků, jsou schopny zadržovat vlhkost ve výrobku, snižovat tak jeho aktivitu, a tím významně omezit projevy mikrobiální kontaminace výrobků. V cereálních výrobcích mohou být využívány jako inhibitory retrogradace škrobu.

1.6 Význam polysacharidů a oligosacharidů v lidské výživě

Z hlediska funkce sacharidů ve výživě jsou sacharidy děleny na tři skupiny, na využitelné, špatně využitelné a nevyužitelné (Pánek *et al.*, 2002). Využitelnými sacharidy jsou glukosa, fruktosa, galaktosa, sacharosa, maltosa, laktosa, škrob a glykogen. Mezi špatně využitelné patří xylosa, arabinosa, rafinosa, stachyosa, verbaskosa a ajugosa. Nevyužitelnými sacharidy jsou polyoly, mannosy, galaktooligosacharidy (GOS), fruktany, celulóza, hemicelulózy, pektin, rezistentní škrob, modifikované škroby, modifikované celulózy, polysacharidy mořských řas, mikrobiální polysacharidy, rostlinné gumy a slizy a chitin.

Využitelné oligo- nebo polysacharidy jsou v gastrointestinálním traktu rozštěpeny hydrolasami na fragmenty, které jsou po resorpci z tenkého střeva využity ve tkáních jako zdroj energie nebo jako stavební jednotka (Venn a Green, 2007). Využitelné sacharidy mají přímý vliv na hladinu glukosy v krvi (glykemie) a na udržení acidobazické rovnováhy v buňkách lidského těla.

Polysacharidy se postupně štěpí hydrolasami na oligosacharidy a ty se hydrolyzují na monosacharidy (Pánek *et al.*, 2002). V tenkém střevě se řada cukrů vstřebává (resorbuje) aktivně (glukosa a galaktosa ve formě fosforečných esterů), nebo difúzí (ostatní monosacharidy) do tělních tekutin. Jsou transportovány do jater, kde se přeměňují na glukosu (alditoly se oxidují, sorbitol na fruktosu, xylitol na xylulosu), která je klíčovou sloučeninou metabolismu a zdrojem energie u živočichů a rostlin. Oxidací glukosy vznikají jednoduché organické sloučeniny a konečnými produkty oxidace jsou CO_2 a H_2O . Přbytek glukosy se skladuje v játrech jako glykogen. Důsledkem příjmu glukosy a galaktosy potravou je výrazné zvýšení hladiny glukosy v krvi (zvýšení glykemie). Hladinu krevní glukosy reguluje kromě dalších látek inzulin vylučovaný slinivkou břišní.

Špatně využitelné a nevyužitelné sacharidy jsou enzymy lidského gastrointestinálního traktu štěpeny jen částečně nebo nejsou vůbec štěpeny. Tyto sloučeniny jsou zahrnovány pod sumární název vláknina (vláknina potravy).

Prebiotika fruktooligosacharidy, xylooligosacharidy a galaktooligosacharidy spadají do skupiny nevyužitelných oligosacharidů, přitom podle klasifikace na základě délky řetězce by patřily do různých skupin. Nejsou hydrolyzovány ani resorbovány v tenkém střevě a působí podobně jako složky rozpustné vlákniny.

FODMAP vymezuje skupinu fermentovatelných sacharidů s krátkým řetězcem. Jedná se o zkratku počátečních písmen slov: fermentovatelné oligosacharidy, disacharidy, monosacharidy a polyoly (Ooi *et al.*, 2019; Zannini a Arendt, 2018). Společným znakem těchto sacharidů je jejich obtížná vstřebatelnost v tenkém střevě a přechod do tlustého střeva v nezměněném stavu. V tlustém střevě jsou tyto sacharidy fermentovány příslušnými bakteriemi a vedlejším produktem této činnosti je velké množství střevní plynů (CO_2 , H_2 , CH_4). Napětí ve střevech a následná aktivace mechanoreceptorů jsou pravděpodobně hlavními faktory, které vedou ke spuštění řady střevních obtíží (nadýmání, vzedmuté břicho, křečovitě

bolesti břicha, nevolnost apod.). FODMAP jsou běžnou součástí stravy, specifické je pouze tolerované množství u jednotlivých citlivějších osob.

1.6.1 Vlákna

Charakteristika vlákniny podle *CODEX Alimentarius: Guidelines on nutrition labelling (Rev. 2011, Amendment 2013)* a nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011, Příloha I (citace): "Vlákninou se rozumějí uhlovodíkové polymery s třemi nebo více monomerními jednotkami, které nejsou tráveny ani vstřebávány v tenkém střevě lidského organismu a náleží do těchto kategorií: jedlé uhlovodíkové polymery přirozeně se vyskytující v přijímané potravě, jedlé uhlovodíkové polymery, které byly získány z potravinových surovin fyzikálními, enzymatickými nebo chemickými prostředky a které mají prospěšný fyziologický účinek prokázáný obecně uznávanými vědeckými poznatky, jedlé syntetické uhlovodíkové polymery, které mají prospěšný fyziologický účinek prokázáný obecně uznávanými vědeckými poznatky". Stručnější definici vlákniny uvádí Americká asociace cereálních chemiků (AACC, 2001): Vlákninu potravy tvoří jedlé části rostlin nebo analogické sacharidy, které jsou odolné vůči trávení a absorpci v lidském tenkém střevě a jsou zcela nebo částečně fermentovány mikroorganismy v tlustém střevě. Vlákna potravy zahrnuje polysacharidy, oligosacharidy, lignin a přidružené rostlinné složky. Vlákna potravy vykazuje prospěšné fyziologické účinky: laxativní a/nebo upravující hladinu cholesterolu v krvi a/nebo upravující hladinu glukosy v krvi, a další vlastnosti.

Z chemického hlediska lze složky vlákniny rozdělit do následujících skupin: (a) nestravitelné polysacharidy a oligosacharidy: celulóza, hemicelulózy, fruktany (inulin, fruktooligosacharidy), pektin, gumy a slizy; (b) složky příbuzné sacharidům, zejména rezistentní škroby, modifikované škroby a modifikované celulózy, polydextrosa; (c) lignin a doprovodné látky jako kutin, taniny, třísloviny aj.

Přibližně od roku 1980 se dělí vlákna podle rozpustnosti ve vodě na nerozpustnou, omezeně bobtnavou, kam patří hlavně celulóza a část hemicelulos (například xylany) vyskytující se v povrchových vrstvách obilných zrn, luštěnin a zeleniny. Dále na vlákninu rozpustnou, bobtnavou, tvořící viskózní gely a slizy (část β -glukanů a část arabinoxylanů, pektin, glukomannany, galaktomannany, mikrobiální polysacharidy, polysacharidy mořských řas apod.) vyskytující se v podobalových vrstvách obilného zrna, luštěnin, v dužnině ovoce, v buněčné stěně řas, hub apod. Ve stravě se obecně doporučuje poměr rozpustné : nerozpustné vlákniny kolem 3:1.

Tyto nevyužitelné polysacharidy byly dříve též nazývány balastní polysacharidy, neboť díky své schopnosti vázat na sebe vodu a bobtnat zvětšují objem stravy, ale samy o sobě jsou přímo nestravitelné. Přesto se ukázalo, že mají jistou, avšak nízkou energetickou hodnotu (až 8,4 kJ/g), za kterou jsou odpovědné produkty činnosti střevní mikroflóry (organické kyseliny

octová, propionová, máselná), které se vstřebávají do organismu. Pro porovnání energetická hodnota využitelných sacharidů je 17,2 kJ/g.

1.6.2 Škrob

Škrob patří mezi využitelné polysacharidy, které jsou snadno štěpeny v horní části zažívacího traktu (Pánek *et al.*, 2002; Venn a Green, 2007). Při trávení škrobu se uplatňuje slinná a pankreatická α -amylasa a isomaltasa. Většina škrobů je zcela strávena v tenkém střevě, jen některé škroby mohou být částečně rezistentní a řadí se pak mezi nevyužitelné polysacharidy. V tomto případě se jedná o fyzikálně nedostupné škroby (syrová obilná zrna), rezistentní škroby (syrové brambory) nebo retrogradované škroby (starší chléb, staré vařené brambory).

Škrob je postupně štěpen sacharidasami na oligosacharidy a ty se hydrolyzují na monosacharidy. V tenkém střevě se monosacharid glukosa aktivně vstřebává do tělních tekutin. Důsledkem příjmu škrobu potravou je výrazné zvýšení glykemie. Glykemie je koncentrace glukosy v krvi, jejíž hodnota na lačno by podle současného přístupu neměla překračovat 5,5 mol/l (v žilní krvi).

Resorpce škrobu je rychlá a její rychlost stoupá se stupněm poškození nativní struktury škrobu. K poškození škrobu může docházet biochemicky (enzymovou hydrolyzou), chemicky (kyselou hydrolyzou), mechanicky a termicky. Čím vyšší je rychlost resorpce škrobu, tím vyšší je glykemický index (GI) příslušné potraviny. Současně platí, že GI stoupá s obsahem čistého škrobu v příslušné surovině. Zvýšený obsah vlákniny naopak způsobuje pokles relativního obsahu škrobu, a tím i pokles GI.

Glykemický index je bezrozměrná veličina, která kvantifikuje vliv jednotlivých potravin na zvýšení glykemie po jídle (postprandiální glykemie). Stanovuje se jako poměr plochy pod glykemickou křivkou v průběhu dvou hodin po konzumaci dané potraviny a plochy pod křivkou po konzumaci 50 g čisté glukosy, přičemž glykemický index samotné glukosy je uzančně roven 100. Množství konzumované testované potraviny by mělo být stanoveno tak, aby obsah využitelných sacharidů činil 50 g (Venn a Green, 2007). Podle hodnoty glykemického indexu rozlišujeme potraviny na ty s nízkým GI (GI < 55), se středním GI (GI 56 - 69) a s vysokým GI (GI > 70) (Brand-Miller *et al.*, 2009).

Glykemickému indexu se dostává stále větší pozornosti úměrně s nárůstem cukrovky 2. typu v populaci vyspělých zemí světa ve všech věkových kategoriích, tedy i u dětí a mládeže. Narůst výskytu cukrovky v populaci bývá nezdědka označován jako pandemie. Problém nespočívá primárně v samotném škrobu, ale v přemíře jeho denního příjmu (jako i dalších sacharidů a energetických živin), a tím v přebytkové energetické bilanci výživy. Přirozený výdej energie, jejíž deficit provázel fyzicky pracujícího člověka (většinu populace) po stovky generací, se ve vyspělém světě v posledních desetiletích rapidně snížil. Potřeba fyzické práce u značné části populace takřka vymizela a s tím se změnila zásadním způsobem i energetická bilance výživy.

Potíž při posuzování hodnot GI podle různých pramenů bývá často v tom, že za standard je místo glukosy vzat bílý chléb. To je zvykem v německy mluvících zemích, kde je na obalech uváděna hodnota BE (*Broteinheit*) (Turek *et al.*, 2003). Hodnota GI běžného „bílého“ pšeničného pečiva (chleba), tj. pečivo ze světle pšeničné mouky, dosahuje hodnot kolem 70. Lze tedy říci, že běžné pšeničné pečivo (housky, rohlíky, veky, bagety) se pohybuje na spodní hranici skupiny potravin s vysokým GI. Často se mylně předpokládá, že jemné pečivo s podstatně vyšším obsahem cukru má GI vyšší, to však neplatí, protože GI samotné sacharosy je roven 70. Pokud se použije BE, pak jsou jeho hodnoty pro bílé pečivo logicky rovny 100.

Glykemický index potravin lze stanovit testy *in vivo* nebo *in vitro*. Řada studií uvádí zjištění nižší hodnoty GI potravin s přísadami různého množství β -glukanů, pšeničných otrub, vlákniny z chia semen, guarové gumy apod. V rámci experimentu (Pourová, 2018) byly přidány různé druhy vlákniny (komerční preparáty, jablečná, ječná, ovesná a pšeničná vláknina) do receptury formového pšeničného chleba a provedena senzorická analýza. Jako nejpříjemnější se jevil chléb s přísadou 15 % vlákniny (7,5 % pšeničné vlákniny a 7,5 % ovesné vlákniny). Tento chléb byl zařazen do *in vivo* testu u skupiny 6 dobrovolníků (4 ženy, 2 muži, ve věku 27-75 let) s diabetes mellitus 2. typu bez farmakoterapie. Testy proběhly celkově 2x. Glykemie byla proměřena po 0, 60, 90 a 120 min po konzumaci chleba. Porce obsahovala 50 g sacharidů. Jako srovnávací chléb byl použit stejným způsobem připravený světlý pšeničný formový chléb bez přísady vlákniny. Z naměřené glykemické křivky by patrný relativně menší nárůst glykemie u chleba s vlákninou a po 120 min došlo k pomalejšímu poklesu glykemie u chleba s vlákninou. Stanovení glykemie bylo opakováno se stejným trendem. Je však jasné, že pro prokázání vlivu přidané vlákniny na glykemii, je třeba větší počet dobrovolníků a opakovaná měření. Pomocí *in vitro* metodiky na odhad GI (Englyst *et al.*, 1999), kdy se využívá postupné enzymové hydrolýzy vzorku a obsah uvolněných cukrů je stanoven pomocí kapalinové chromatografie. Některé studie potvrzují korelaci obsahu rychle a pomalu dostupných sacharidů s hodnotou GI potravin, naopak jiné studie označují metodu odhadu GI za nepřesnou pro její vysokou variabilitu a nízkou opakovatelnost.

In vitro test glykemického indexu (Bradová *et al.*, 2015) vychází z postupu simulace trávení dle Englysta (Englyst *et al.*, 2003; Englyst a Englyst, 2005), stanovuje se obsah volné glukosy a volné fruktosy, obsah glukosy uvolněné po 20 a 120 min a obsah celkové glukosy. Hodnota glykemického indexu se poté vypočítá podle vzorce s experimentálně stanovenými koeficienty ($GI = -21.28 \times FSF + 53.91 \times FSG + 0.49 \times RDS + 1.04 \times SDS - 0.87 \times RS$) (kde FSF je obsah volné fruktosy, FSG je obsah volné glukosy, RDS je obsah rychle stravitelného škrobu, SDS je obsah pomalu stravitelného škrobu a RS je obsah rezistentního škrobu).

Obsah glukosy uvolněné po 20 i 120 min byl nižší u chleba s vlákninou, což bylo očekáváno (Pourová, 2018). Byla však zjištěna příliš vysoká směrodatná odchylka u obsahu celkové glukosy. Hodnoty výpočtem získaného obsahu rezistentního škrobu byly nereálné. Na závěr lze uvést, že sice byl vypočítán nižší GI u chleba s vlákninou (GI=48,4) v porovnání s GI kontrolního chleba (GI=62), avšak uvedený vzorec nelze doporučit pro správný a reálný odhad

GI. Vysoké koeficienty u obsahu volné fruktosy a volné glukosy způsobují (poskytují) při velmi malé změně obsahu těchto cukrů nereálné hodnoty GI.

Ke zvýšení přesnosti a spolehlivosti metodiky odhadu GI je nutná úprava metodiky (vzorce, koeficientů) pro výpočet jednotlivých frakcí (škrobových frakcí), možnost snížit počet na sebe navazujících analytických kroků a zajistit tak lepší opakovatelnosti a reprodukovatelnost měření. Englyst *et al.* (2003) sám upozorňuje na problematičnost použití metodiky k odhadu GI, kdy je třeba zohlednit obsah ostatních živin, obsah sušiny, fyziologické faktory trávení a další.

In vivo metoda je tedy zatím jediná vhodná metoda pro stanovení GI potravin. Pro správné a efektivní stanovení GI pomocí *in vivo* testu je třeba zajistit dostatečný počet spolehlivých dobrovolníků, finance a čas pro opakovaná měření a vyhodnocení.

1.6.3 Fyziologické účinky vlákniny

Účinky různých složek vlákniny potravy jsou úzce spjaté s typem daného polymeru/oligomeru, který vstupuje do tlustého střeva, molekulovou hmotností polymeru/oligomeru, jeho viskozitou, rozpustností a rozsahem větvení molekuly (Andersson *et al.*, 2014; Salovaara *et al.*, 2007).

Fruktany působí v tlustém střevě jako prebiotika a jsou zcela fermentovány na mastné kyseliny s krátkým řetězcem (kyselina octová – zdroj energie pro svalové a mozkové buňky, kyselina propionová – zdroj energie pro jaterní buňky, kyselina máselná – obnova kolonocytů) (Meyer, 2007). Tvorbou kyselin dojde v tlustém střevě ke snížení pH, což může preventivně působit proti rakovinovému bujení (prevence rakoviny tlustého střeva a konečníku). Nižší hodnota pH ve střevě díky produkováným mastným kyselinám snižuje riziko rakoviny a dochází také ke změně mikrobioty ve prospěch bifidobakterií. Vedle tvorby prospěšných kyselin je zaznamenána také produkce většího množství plynů. U některých osob trpících syndromem dráždivého tračníku (IBS) mohou fruktany způsobovat trávicí problémy. IBS se projevuje bolestmi břicha, nadýmáním, průjmem, nebo naopak zácpou. Může být ale spojen také s bolestmi hlavy, svalů a výkyvy nálad. Odborníci diskutují o tom, co přesně tento syndrom způsobuje (stres, hormonální změny, nedostatek pohybu, změny stravy apod.). Zatím se shodují na tom, že se projevuje podobně jako běžné trávicí potíže. Syndrom dráždivého střeva (IBS) je jedna z nejčastějších střevních poruch tenkého a tlustého střeva.

Fruktooligosacharidy a galaktooligosacharidy ve funkci prebiotika podporují růst a aktivitu probiotických bakterií (Lam a Cheung, 2013; Lamsal, 2012; Rudolfová a Čurda, 2005). Jako prebiotika působí také mikrobiálně vytvořené polysacharidy dextrany a levany (Čopíková, 1997).

Ve vodě rozpustná (bobtnavá, viskózní) vláknina, kam lze zařadit část arabinoxylanů, β -glukany nebo glukomannany, tvoří v žaludku viskózní, gelovitou hmotu (Salovaara *et al.*, 2007). Bobtnáním složek dochází ke zvýšení viskozity tráveniny v kontaktu s vodou, přichází pocit nasycení, a tím je možné předejít přejídání se a rozvoji nadváhy a obezity (zajištění a udržení optimální tělesné hmotnosti). Pro efektivní využití sorpčních vlastností vlákniny je důležité konzumovat dostatečné množství vody (tekutin) v průběhu dne. Dalšími efekty rozpustné vlákniny je vliv na udržení normální hladiny glukosy a inzulínu v krvi a udržení normální hladiny krevního cholesterolu, což může vést ke snížení rizika srdečně-cévních onemocnění.

Ve vodě nerozpustná vláknina, kam se řadí celulóza, část hemicelulos zejména xyloglukany a arabinoxylany, má vliv na zlepšení střevní peristaltiky, urychluje průchod tráveniny tlustým stěvem a může vést ke snížení rizika chronické zácpy, rakoviny tlustého střeva a konečníku (Goff *et al.*, 2018; McRorie a McKeown, 2017). Degradované složky nerozpustné vlákniny jsou zdrojem výživy pro bakterie tlustého střeva, což může vést k posílení imunitního systému. Bylo však prokázáno, že pouze malé množství bakteriálních druhů sídlících v tlustém střevě dokáže zužitkovat nerozpustné nebo komplexní arabinoxylany. Současně například arabinoxyloligosacharidy stimulují růst jen malé skupiny bakterií mléčného kvašení (Gullón *et al.*, 2014).

Zdravotní tvrzení o prokázaných účincích vlákniny a jejích složek jsou uvedeny v kapitole 1.7.3 Vláknina, její složky a látky doprovázející vlákninu v obilovinách.

1.6.4 Metody stanovení vlákniny

Pro běžná stanovení vlákniny a jejích složek v potravinách byly vypracovány tři základní skupiny metod: neenzymaticko-gravimetrické, enzymaticko-chemické a enzymaticko-gravimetrické.

Pomocí neenzymaticko-gravimetrických metod (kombinace kyselé a alkalické hydrolýzy, spojené s oxidací složek vlákniny, s následnou extrakcí, filtrací, sušením a finálním vážením) lze stanovit tzv. hrubou vlákninu (toto stanovení je využíváno většinou pro stanovení nestrávitelných složek v krmivech). Hrubá vláknina je tvořena zejména celulosou, ligninem a částí hemicelulos. Množství vlákniny stanovené tímto způsobem se určí zvážením zbytku, který zůstane po extrakci příslušnými činidly. Tento způsob stanovení zahrnuje řadu metod, které byly pojmenovány po příslušných vědcích (metoda podle Henneberga a Stohmanna, metoda podle Van Soesta apod.). Van Soest *et al.* (1963) zavedli do analýzy vlákniny použití detergentních činidel a podle způsobu hydrolýzy a typu použitého detergentu (cetyltrimetylamonium bromid, laurylsulfátu sodný) rozlišujeme neutrálně-detergentní vlákninu (NDF) (celulóza, lignin, část hemicelulos), acido-detergentní vlákninu (ADF) (celulóza, lignin, pektin, taniny) a acido-detergentní lignin (ADL). Rozdíl mezi NDF a ADF udává předběžný odhad obsahu hemicelulos.

Do kategorie enzymaticko-chemických reakcí spadají metody enzymaticko-kolorimetrické a enzymaticko-chromatografické. Kolorimetrické metody využívají barevné reakce cukrů (cukry uvolněné hydrolýzou polysacharidů) s příslušnými činidly a proměření absorbance roztoku při daných vlnových délkách. Kapalinovou nebo plynovou chromatografií se stanovují jednotlivé monomerní složky vlákniny (zejména glukosa, galaktosa, manna, xyloza, arabinosa a uronové kyseliny). Theander a Åman (1982) jako první provedli stanovení monosacharidů plynovou chromatografií po hydrolýze polysacharidů vlákniny.

Enzymaticko-gravimetrickou metodou lze stanovit celkové množství rozpustných a nerozpustných polysacharidů, jako jsou celulóza, hemicelulózy, pektin, jiné neškrobové polysacharidy, část rezistentního škrobu a lignin. Tímto způsobem lze získat obsah celkové vlákniny potravy (nerozpustná a rozpustná část vlákniny). Základ této metody spočívá ve využití tří trávicích enzymů - termostabilní amylasy, proteasy a amyloglukosidasy, jejichž působením dojde k odstranění škrobu a proteinů z analyzovaného vzorku. Zbytek po hydrolýze a filtraci tvoří vláknina a minerální látky (popel). Prosky *et al.* (1984) provedli jako první vědecká skupina enzymaticko-gravimetrické stanovení vlákniny vyjádřené jako celková vláknina (TDF). Stanovení zahrnovalo použití α -amylasy, amyloglukosidasy a proteasy a odstranění jednoduchých sacharidů použitím 78 % etanolu. V modifikaci této metody pokračoval Asp *et al.* (Asp, 2004; Asp *et al.*, 1992) a McCleary *et al.* (McCleary *et al.*, 2011; McCleary *et al.*, 2007).

Nejpoužívanější metodikou stanovení vlákniny a jejích složek v potravinách je enzymaticko-gravimetrická metoda (využívající komerční enzymové sady a validované postupy AOAC 991.43, AOAC 985.29, AACC 32-07.01 a AACC 32-05.01). Jedná se o určení obsahu vlákniny potravy v cereálních surovinách a zpracovaných produktech. Principem stanovení vlákniny je odstranění všech látek, které nejsou definovány jako vláknina. V první fázi stanovení se provádí hydrolýza škrobu působením α -amylasy při teplotě 96°C a amyloglukosidasy při teplotě 60°C. Vzniklé nízkomolekulární cukry, jsou převedeny do roztoku a odstraněny filtrací. Proteiny jsou hydrolyzovány proteasou při teplotě 60°C na rozpustné a depolymerizované proteiny a peptidy, a ty jsou následně odstraněny filtrací. Po filtraci se získá pevný podíl (obsahující nerozpustnou vlákninu, IDF) a filtrát. Následuje srážení získaného filtrátu 96% etanolem (v/v) a po filtraci směsi se získá pevný podíl obsahující části rozpustné vlákniny (SDF). Rezidua vlákniny jsou promyta 78% etanolem (v/v), 96% etanolem (v/v) a acetonem. Poté jsou promytá rezidua sušena a zvážena. V jednom duplikátu rezidua vlákniny je stanoven obsah zbytkových proteinů a druhý duplikát rezidua vlákniny slouží ke stanovení obsahu popela. Podobným způsobem (srážením a filtrací) se stanoví celková vláknina (TDF).

Nejnovějším způsobem stanovení širšího spektra složek vlákniny je kombinovaná metoda (integrovaný postup stanovení celkové vlákniny; *Integrated Total Dietary Fibre Assay Procedure*, AOAC Method 2009.01 & 2011.25 a AACC Method 32-45.01 & 32-50.01). Kombinovaná metoda byla navržena a schválena v roce 2011. Pomocí předkládané metody je možné stanovit obsah nerozpustné vlákniny, podíl nízkomolekulární a vysokomolekulární

složky rozpustné vlákniny, zastoupení rezistentního škrobu, větvených rezistentních maltodextrinů a nestravitelných oligosacharidů se stupněm polymerizace vyšším než 3. Tato metoda rozšiřuje možnosti použití již dříve schválených metod stanovení vlákniny a kombinuje enzymaticko-gravimetrickou metodu s chromatografickou koncovkou. V porovnání s předchozí metodou se navíc využívá trávení pankreatickou amylasou při teplotě 37°C (simulace trávení v lidském trávicím traktu). Provádí se řada izolačních kroků s následnou možností stanovení obsahu rezistentního škrobu a nestravitelných oligosacharidů, inulinu, FOS, GOS, polydextrosy, pektinu a arabinogalaktanu. Pomocí kapalinové chromatografie jsou kvantifikovány hydrolýzou uvolněné a extrahované monosacharidy a disacharidy a vyšší oligosacharidy. Uvedená kombinovaná metoda by tedy měla zajistit přesnější výsledky (zastoupení frakcí rozpustné vlákniny), než metoda využívající pouze enzymaticko-gravimetrické stanovení (AOAC 991.43, AOAC 985.29). V praxi se však kombinovaná metoda nevyužívá, protože je náročnější na přístrojové vybavení, čas a finance.

V rámci našeho experimentu byl oběma výše uvedenými metodami stanovení vlákniny (enzymaticko-gravimetricky a kombinovanou metodou) potvrzen deklarovaný obsah celkové vlákniny u 10 komerčních cereálních výrobků s vysokým obsahem vlákniny (Mázárová, 2016). Hodnoty obsahu celkové vlákniny získané oběma metodami byly relativně srovnatelné. V případě kombinované metody byl však stanoven nižší obsah nerozpustné vlákniny a vyšší obsah rozpustné vlákniny (vyjádřený jako součet části podílu nízkomolekulární a vysokomolekulární složky rozpustné vlákniny) v porovnání s výsledky získané enzymaticko-gravimetricky. K analýze oligosacharidů, včetně maltodextrinů a fruktanů byla využita citlivá technika HPAEC-PAD. Obsah sledovaných oligosacharidů byl velmi nízký a u některých vzorků cereálních výrobků se pohyboval na hranici meze detekovatelnosti. Nebyla tedy potvrzena původní očekávání, že nově zavedená integrovaná metoda poskytne informaci o detailnějším profilu složek rozpustné vlákniny včetně oligosacharidů v porovnání se standardní enzymaticko-gravimetrickou metodou.

1.7 Polysacharidy a oligosacharidy obilovin

Obiloviny a pseudoobiloviny a výrobky z nich jsou významným zdrojem sacharidů (Delcour a Hoseneý, 2010; Stone a Morell, 2009). Sacharidy se vyskytují téměř ve všech částech obilného zrna. Nejvrchnější vrstvy obilného zrna (obalové vrstvy, oplodí) obsahují nerozpustné polysacharidy celulosu, nerozpustné β -glukany a hemicelulosy (konkrétně xyloglukany, xylany a arabinogalaktany). Podobalové vrstvy zrna (osemení) obsahují ve vodě částečně rozpustné hemicelulosy (konkrétně arabinoxylany-někdy také nazývané pentosany a β -glukany). Další část zrna, aleuronová vrstva, měkká, jednoduchá vrstva s velkými buňkami, je charakteristická vysokým obsahem rozpustných β -glukanů, arabinoxylanů, glukomannanů a fruktanů. Endosperm obsahuje hlavně škrob (většinou okolo 80 %), z ostatních sacharidů také β -glukany, arabinoxylany a fruktany. Blok klíčku má vysoký obsah redukujících cukrů (glukosa, fruktosa, maltosa, rafinosa), mohou být také přítomny arabinoxylany a glykoproteiny.

Hlavními skupinami polysacharidů obilovin je škrob a skupina neškrbových polysacharidů. Škrob je obsažen v endospermu obilovin jako zásobní polysacharid, přičemž jeho podíl činí 60-75 % sušiny obilek a až 80 % sušiny samotného endospermu. Škrob se vyskytuje ve formě škrobových zrn, což jsou útvary různé velikosti a tvaru (tvar je charakteristický pro jednotlivé druhy obilovin), které popisujeme na úrovni kvartérní struktury (škrobová zrna). Obsah škrobu záleží na druhu a odrůdě obiloviny a pseudoobiloviny. Ve světlé mouce, která je tvořena převážně endospermem, je obsah škrobu kolem 85 % v sušině mouky.

Škrob se vyskytuje pouze v endospermu (moučné jádro, vnitřní části obilného zrna), složky vlákniny se nacházejí zejména v obalových částech, podobalových částech obilného zrna a v aleuronové vrstvě, ale v některých případech (beta-glukany u ovsa a ječmene, arabinoxylany a fruktany u pšenice a arabinoxylany u žita) i v endospermu zrna.

Obsahy polysacharidů se mohou v jednotlivých odrůdách obilovin významně lišit v závislosti na lokálních klimatických a půdních podmínkách a na dodržování agrotechnických opatření. Jsou šlechtěny speciální odrůdy *waxy* pšenice a kukuřice, a odrůdy potravinářského ječmene s diferenciovanými vlastnostmi (*waxy* odrůdy ječmene s vyšším obsahem beta-glukanů, vyšším obsahem vlákniny a doprovodných bioaktivních složek).

1.7.1 Tvorba škrobových zrn a vlastnosti škrobu

Pšeničný škrob (ale také žitný, ječný i ovesný škrob) se vyskytuje ve dvou charakteristických velikostních frakcích (většinou označované jako A a B) (Delcour a Hoseneý, 2010; Stone a Morell, 2009; Whistler a BeMiller, 1999). Granulační rozložení jednotlivých typů obilných škrobů a teplotní rozsahy mazovatění jsou odlišné.

Škrobová zrna se vytváří během postupu zrání obilky. S postupným vyzráváním se jednak zvětšují makromolekuly amylosy a amylopektinu, jednak se dotváří jejich struktura. Přestože uspořádání struktury škrobového zrna je odlišné od krystalové mřížky anorganických látek, metody studia krystalové struktury prokazují, že ve škrobovém zrně jde o obdobu krystalického uspořádání. Toto krystalické (resp. semikrystalické) uspořádání ovšem představuje jen 30 % škrobového zrna, zbytek je neuspořádaný, nekystalický. Krystalické uspořádání se předpokládá jen u části amylopektinu.

Škrob je hlavní složkou obilného zrna a mouky a vedle pšeničného lepku je pro cereální technologii zcela zásadní. Z fyzikálních vlastností škrobu jsou nejvýznamnější schopnost bobtnání, mazovatění a retrogradace.

Škrobová zrna jsou ve vodě nerozpustná, ve studené vodě bobtnají pouze mírně a pozvolna, ale rychlost a míra bobtnání rychle narůstá s teplotou. Po dosažení určité teploty (počáteční teplota mazovatění) začíná docházet k mazovatění škrobových zrn (vždy se jedná o určité rozmezí teplot mezi počátkem mazovatění a ukončením procesu, rozdíl mezi teplotami na počátku a na konci se pohybuje mezi 10-15°C). U obilných škrobů se rozsah mazovatění uvádí v teplotním rozmezí kolem 50 až 70°C.

Rozsahy teplot mazovatění jsou u různých škrobů rozdílné. Mezi škroby s nejnižšími teplotami mazovatění patří žitný škrob. Vytvořený škrobový maz má charakter viskózní, téměř čiré kapaliny. V pekařském těstě však nikdy nedojde v průběhu pečení k úplnému mazovatění všech škrobových zrn. Dochází především k bobtnání zrn a pouze jejich povrch může zmazovatět. K úplnému zmazovatění škrobových zrn není v těstě dostatek vody.

Chování škrobu během mazovatění je možné sledovat například na amylografu, viskozimetru, RVA (*Rapid Visco Analyser*) apod. Škrobová zrna postupně přijímají vodu a začnou ztrácet původní, celistvou strukturu. Průběh mazovatění, změny viskozity, vzhledu a uspořádání škrobových zrn lze pozorovat na amylografické křivce. Na počátku zahřívání zrna jen bobtnají a tím zvětšují svůj objem. Intenzivně se rozrušují mezimolekulární vodíkové můstky, zrna začínají prudce zvětšovat svůj objem a uvolněná amylosa difunduje do roztoku. V důsledku toho stoupá viskozita suspenze. Při dalším zahřívání hydratace pokračuje a rozrušují se nabobtnalé části zbylého amylopektinu, nabobtnalá zrna ztrácí svoji integritu (pod mikroskopem lze pozorovat praskání a roztrhání zrna, což je spojeno se ztrátou polarizačního kříže v polarizovaném světle). Uvolňováním amylosy a později i malého množství amylopektinu do roztoku vzrůstá viskozita systému a vzniká škrobový maz, kde jsou přítomny rozrušeného zrna škrobu s amylopektem a zbytkem amylosy. Dalším zahříváním nad teplotu mazovatění pokračuje rozrušování vodíkových můstků a dezintegrace škrobového zrna.

Když zmazovatel veškerý škrob, začíná viskozita při neustálém míchání směsi klesat. Pokud se vzniklý maz nechá chladnout, dochází ke zpětné tvorbě vodíkových vazeb mezi molekulami amylosy a amylopektinu. Viskozita směsi se opět zvyšuje. V případě dostatečné koncentrace

škrobu vzniká spojitá, pevná trojrozměrná síť s velkým množstvím vody, vzniká tzv. škrobový gel. Pokud je koncentrace škrobu nižší, vznikají viskózní pasty nebo viskózní koloidní roztoky.

Bobtnání a mazovatění škrobu je jedním z klíčových procesů během tvorby a zrání těst a pečení. Po zchladnutí pečiva dochází k procesu retrogradace vzniklého škrobového gelu. Jak již bylo zmíněno, v těstě není dostatek vody, aby bobtnání a následné zmazovatění škrobu proběhlo v plném rozsahu. Přesto jsou tyto procesy určující pro tvorbu střídy pečiva a dosažení její optimální struktury střídy a textury pečiva. Retrogradace škrobu (zejména rekrystalizace amylopektinu) se pak zásadní měrou podílí na stárnutí pečiva.

Pro technologické zpracování mouky je velmi podstatné v jakém stavu se škrob v mouce nachází. Po dozrání obilného zrna a v průběhu skladování a přípravy k mletí jsou vždy do jisté míry aktivovány enzymy amylasy, které škrob částečně hydrolyzují.

1.7.2 Stupeň poškození škrobu a jeho výživový význam

Stupeň poškození škrobu v moukách má vedle obsahu vlákniny jistý vliv na hodnotu glykemického indexu. K poškození škrobu dochází biochemickou cestou při dozrávání obilí, jeho skladování a částečně i při přípravě zrna k mletí. Uplatňuje se zde aktivita amylolytických enzymů, která se v obilnářské, mlýnské a pekárenské praxi hodnotí pomocí jednoduchého měření zdánlivé viskozity zmazovatělé moučné suspenze, která odpovídá aktivitě α -amylasy. Získává se tak hodnota zvaná Hagbergovo číslo (číslo poklesu, pádové číslo, *Falling Number*, FN), která se pohybuje v rozmezí 60-400 i více sekund. Čím nižší je hodnota FN, tím vyšší je aktivita α -amylasy. Hodnoty pod 200 s signalizují u pšeničných mouk již poměrně hluboké poškození škrobu, za optimální se považují hodnoty 250-300 s (Příhoda *et al.*, 2012).

K významnému poškození škrobových zrn však může také docházet při vlastním mlecím procesu, a to jak mechanicky, tak tepelně, díky vysoké teplotě v mlecí spáře válcové stolice. Mouky s vyšším stupněm vymletí a mouky vyráběné intenzivnějším mletím (při vyšším měrném zatížení válcových stolic) tak vykazují značné deformace škrobových zrn. Míru poškození při mletí také do značné míry předurčuje charakter zrna – tvrdost, míra ukotvení škrobových zrn v proteinové matici a také distribuce velikosti škrobových zrn. To vše lze sledovat a stupeň poškození škrobu nastavením parametrů mlecího procesu účinně ovlivňovat (Gordon a William, 1994).

Nepoškozená škrobová zrna bobtnají omezeně, zatímco poškozený škrob váže vodu intenzivně a podílí se na nosné struktuře těsta. Škrob je zdrojem zkvasitelných cukrů při fermentaci (zrání a kynutí) těsta. Po upečení se částečně zmazovatělý škrob podílí na struktuře střídy pečiva, má vliv na udržení vláčnosti a měkkosti střídy pečiva.

1.7.3 Vlákna, její složky a látky doprovázející vlákninu v obilovinách

Celulosa

Celulosa jako hlavní složka nerozpustné obilné vlákniny je přítomna zejména v obalových vrstvách (ve vazbě s ligninem a hemicelulosami) (Delcour a Hoskeny, 2010; Stone a Morell, 2009). Celulosa tvoří pevná vlákna, brání pronikání vlhkosti a nežádoucích mikroorganismů do obilného zrna a chrání zrno před mechanickým poškozením. Celulosa je ve vodě nerozpustná a za normálních teplot ani výrazně nebobtná. Funkce nerozpustné vlákniny v lidském těle spočívá v urychlení střevního tranzitu, zlepšení střevní peristaltiky a ve zvětšení objemu stolice.

β -glukany

Obilné β -glukany, β -(1,3),(1,4)-D-glukany neboli β -glukany se smíšenými vazbami, jsou strukturní polysacharidy složené z molekul β -D-glukosy (Trafford a Fincher, 2014). Nacházejí se ve všech semenech obilovin, a ve větším množství v ječmeni a ovsu. β -glukany obilovin jsou zčásti rozpustnou vlákninou, částečně i nerozpustnou vlákninou potravy. Na rozdíl od celulosy [v řetězci celulosy jsou pouze vazby β -(1,4)] obsahují β -glukany obvykle kolem 70 % glukosových jednotek spojených vazbou β -(1,4) a kolem 30 % jednotek spojených vazbou β -(1,3).

Na struktuře a původu závisí rozpustnost β -glukanů, která klesá v pořadí oves (nejvíce ve vodě rozpustné β -glukany), ječmen, pšenice (nejméně ve vodě rozpustné β -glukany). Rozpustnost β -glukanů také závisí na počtu (1,4) vazeb v molekule β -glukanů, s vyšším počtem těchto vazeb klesá rozpustnost β -glukanů. Molekulová hmotnost β -glukanů se pohybuje v širokém rozsahu od desítek do tisíců kg/mol podle zdroje.

Obilné β -glukany se liší poměrem triosylových (DP3) a tetraosylových (DP4) glukopyranosových jednotek v molekule β -glukanu. Úseky jednotek glukosy (většinou 2-3 jednotky) s vazbou β -(1,4) jsou propojeny jednou glukosovou jednotkou s vazbou β -(1,3) (Izydorczyk a Dexter, 2008). Pro β -glukany ječmene se tak udává poměr jednotek přibližně 1:3 [poměr 1:3 v ječném β -glukanu znamená téměř trojnásobnou převahu jednotek s vazbami β -(1,4) nad jednotkami spojených vazbami β -(1,3)] a pro β -glukany ovsa přibližně 1:2. V případě pšeničných β -glukanů je poměr jednotek 1:4. Z toho vyplývá, že pšeničný β -glukan má nižší počet vazeb β -(1 $\rightarrow$ 3), má pravidelnější strukturu, nižší rozpustnost a odlišné chování (viskozita, tvorba gelu apod.) než ječné a ovesné β -glukany (**Příloha 11: Wiese et al., 2018**).

Jak již bylo uvedeno, bohatým zdrojem β -glukanů je hlavně ječmen (2-6 %). Sladovnické ječmeny mají obvykle nižší obsahy β -glukanů (kolem 2-4 %). Nové šlechtěné odrůdy potravinářského ječmene mohou vykazovat obsah β -glukanů až 10 % (například německá odrůda betaBarley®) (Vaculová, 2014; Vaculová, 2012; Dieckmann, 2011). České odrůdy ječmene AF Lucius® a AF Cesar® mohou mít obsah β -glukanů až kolem 7 %. Dalšími zdroji β -glukanů jsou oves a pšenice. V případě ovsa a částečně také ječmene se β -glukany většinou nachází rovnoměrně rozložené ve všech vrstvách obilky, zatímco u pšenice (obsah β -glukanů

0,2-2,0 % hmotnosti zrna pšenice) je nejvyšší obsah β -glukanů v aleuronové vrstvě a podobalových vrstvách (Izydorczyk a Dexter, 2008). V žitném zrně se β -glukany nachází nejvíce v aleuronové vrstvě (Rakha *et al.*, 2010; Andersson *et al.*, 2009).

β -glukany s vysokou viskozitou a vysokou molekulovou hmotností zvyšují viskozitu obsahu lidského střeva (vliv na pocit sytosti a nasycenosti, snížená resorpce některých živin a enzymů), což je žádoucí pro zvýšenou fyziologickou aktivitu β -glukanů (Collins *et al.*, 2010; Byung-Kee a Ullrich, 2008). Některé studie naopak uvádějí, že β -glukany s nižší viskozitou a nižší molekulovou hmotností jsou výhodnější z důvodu snadnějšího a pohodovějšího využití bakteriemi přítomnými v tlustém střevě člověka. Tyto nízkomolekulární β -glukany tak vykazují funkci prebiotika.

Molekulová hmotnost, obsah a rozpustnost β -glukanů je ovlivněna genotypem obiloviny, klimatickými podmínkami, agronomickými vstupy, posklizňovými změnami a samozřejmě procesem zpracování obilovin.

V kapitole *Fyzikálně chemické vlastnosti polysacharidů potravin* jsou zmíněny obecné postupy izolace a identifikace polysacharidů. V případě extrakce a charakterizace obilných β -glukanů lze využít různé přístupy a postupy.

Jedna z jednodušších metod extrakce ve vodě rozpustných β -glukanů je metoda extrakce podle Temelli (1997). Tato metoda je často využívána při studiu β -glukanů pro svoji rychlost a menší náročnost. Metoda byla modifikována a použita k extrakci β -glukanů z vybraných mlýnských frakcí waxy ječmenů (KM 2460-2 a Waxyma), a z nativních a extruzí upravených celozrnných mouk ječmenů se standardním složením škrobu (AF Lucius, AF Cesar, KM 2624, KM 2460-1, KM 2460-2) (Wiege, 2017). Postup extrakce byl následující: k 50 g nativní ječné mouky, nebo 25 g extrudované ječné mouky bylo přidáno 500 ml destilované vody. Extrakce probíhala při 55°C/2 h/pH 7 za použití laboratorního hřídelového míchadla v kombinaci s magnetickou míchačkou s ohřevem. Po extrakci následovalo odstředění při 4400 rpm/4°C/30 min, pH bylo upraveno na 4,5 a následovalo další odstředění při 4 400 rpm/4°C/30 min. K supernatantu byl přidán 95% etanol a srážení β -glukanů probíhalo přes noc při teplotě 4°C. Poté následovalo odstředění suspenze při 3 300 rpm/20°C/15 min, pevný podíl obsahující β -glukany byl poté znovu rozpuštěn v etanolu a homogenizován. Po filtraci a promytí etanolem byly extrakty sušeny při 45°C po dobu 6 h. Sušené extrakty byly namlety na velikost částic 200 μ m, byla u nich stanovena vlhkost, čistota (enzymaticko-spektrofotometricky obsah β -glukanů) a molekulová hmotnost.

Molekulová hmotnost β -glukanu v extraktech byla stanovena pomocí GPC. Byly použity kolony s polyhydroxymethylmetakrylátovým gelem. Detekce byla zajištěna RI detektorem. Pro kalibraci byly použity standardy pullulanu. Průměrné molekulové hmotnosti β -glukanů extrahovaných z odrůdy Waxyma byly mírně vyšší ($1,9 \times 10^5$ - $1,0 \times 10^6$ g/mol), než molekulové hmotnosti β -glukanů extrahovaných z odrůdy KM 2460-2 ($0,9$ - $2,3 \times 10^5$ g/mol). Nejvyšší průměrné molekulové hmotnosti měly β -glukany extrahované z mouk separovaných z otrub

všech sledovaných ječmenů. Výše uvedené hodnoty a rozsahy hodnot molekulových hmotností β -glukanů jsou v souladu s hodnotami molekulových hmotností ve vodě extrahovaných β -glukanů uváděných v literárních zdrojích [například Mikkelsen *et al.* (2010) a Papageorgiou *et al.* (2005) a další]. Rozdíl v hodnotách molekulové hmotnosti může být dán genetickými odlišnostmi mezi studovanými odrůdami. Molekulová hmotnost polysacharidu silně závisí na předchozích technologických operacích, extrakci a jejích podmínkách (pH, teplota, doba extrakce atd.) a vlastním postupu stanovení (GPC nebo HP-SEC, typ kolony, standardu, detektoru apod.). Papageorgiou *et al.* (2005) uvádí, že při nižších teplotách (kolem 50°C) se extrahují převážně nízkomolekulární frakce β -glukanů. Kritickými parametry ovlivňujícími proces extrakce a tím vlastnosti extraktu patří teplota, pH, doba extrakce, velikost částic, rychlost míchání a poměr rozpouštědlo : mouka (materiál).

Pro zvýšení čistoty extraktu β -glukanu z celozrnných mouk byl využit kombinovaný (modifikovaný) postup extrakce a purifikace podle Mikkelsen *et al.* (2017), Agbenorhevi *et al.* (2011) a Ahmad *et al.* (2010). Ve vodě rozpustné β -glukany byly extrahovány z celozrnných jemně mletých ječných mouk bezpluchých *waxy* odrůd ječmenů. Byla zvolena optimální velikost částic mouky 500 μm (**Příloha 10: Kumberova *et al.*, 2018**). Po odtučnění mouky, opakovaných extrakcích vodním roztokem etanolu a horkou vodou byl získán 1. extrakt β -glukanu. K purifikaci tohoto extraktu byly využity postupy srážení 96% etanolem a enzymové hydrolýzy, a řada filtrací a odstředování. Finální extrakt β -glukanu byl analyzován v pevném stavu pomocí spektrálních metod (FT-IR spektroskopie, ^{13}C a ^1H NMR spektroskopie) a byla ověřena jeho čistota (čistota extraktu 85 %). Pomocí GPC byla stanovena průměrná molekulová hmotnost (MW) extrahovaného β -glukanu (hodnoty MW u jednotlivých ječmenů se pohybovaly od 630 do 680 kg/mol). Po hydrolýze a následném stanovení monosacharidového složení byla potvrzena čistota extraktu β -glukanu (98% přítomnost monosacharidu D-glukosy, minoritní přítomnost D-arabiny, D-xylozy a D-galaktosy).

U hydrolyzátu extraktu β -glukanu byla provedena metylační analýza a pomocí GC/MS vyhodnocen poměr glukosových jednotek spojených vazbami $\beta(1,3)/\beta(1,4)$. Poměry se pohybovaly 20 : 80 do 22 : 78. Na základě těchto výsledků (MW a poměry vazeb v molekule) se dají se očekávat specifické funkční vlastnosti a zdravotní účinky při využití těchto bezpluchých *waxy* potravinářských ječmenů k vývoji potravin pro výživu lidí.

Arabinoxylany (pentosany)

Arabinoxylany jsou stejně jako β -glukany strukturní neškrobové polysacharidy obilovin, které se však řadí do skupiny heteroxylanů (Andersson *et al.*, 2014; Rakha *et al.*, 2010). Často jsou arabinoxylany nazývány starším názvem pentosany. Tvoří je β -(1,4) xylosová kostra s arabinosou různě navázanou buď na druhém, nebo třetím uhlíku. Vedle xylozy a arabiny mohou obsahovat arabinoxylany také D-glukosu a někdy další minoritní stavební jednotky (D-galaktosu, D-glukuronovou kyselinu apod.). Jde o pestrou skupinu látek, kterou lze rozdělit na arabinoxylany nerozpustné ve vodě, které doprovázejí celulosu v buněčných stěnách, a na ve vodě rozpustné arabinoxylany tvořící gely a viskózní roztoky.

Arabinoxylany různých obilovin se liší ve způsobu substituce xylanového řetězce a obsahem arabinosy, resp. poměrem obou cukrů, xylosy a arabinosy. Arabinoxylany jsou složkou vlákniny ovlivňující nutriční hodnotu potravin, technologickou kvalitu (viskozitu těsta a kvalitu chleba a pečiva) a vykazují pozitivní zdravotní účinky (zdravotní tvrzení). Nejvíce arabinoxylanů se nachází v zrna žita (kolem 3-10 %). Arabinoxylany tvoří hlavní složku vlákniny žita a vyskytují se zejména v aleuronové vrstvě žitné obilky. Žitné mouky obsahují přibližně 4-7 % arabinoxylanů, zatímco pšeničné mouky jen 1-3 % (samozřejmě záleží na stupni vymletí a typu mouky). Rozdíly v obsahu jednotlivých složek vlákniny v mlýnských výrobcích souvisí se stupněm opracování obilného zrna (*peeling* nebo broušení, odstranění obalových a podobalových vrstev) a obsahy narůstají se stupněm vymletí mouk (světlá, polosvětlá, chlebová mouka). Nejvyšší obsah arabinoxylanů vykazují tmavé chlebové a celozrnné mouky.

Arabinoxylany lze rozdělit na vodou extrahovatelné a vodou neextrahovatelné a extrahovatelné v alkalických roztocích. Vodou a alkáliemi extrahovatelné arabinoxylany mají rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti. Průměrná molekulová hmotnost arabinoxylanů pšenice se pohybuje zhruba od 220 kg/mol do 260 kg/mol, arabinoxylanů žita od 520 kg/mol do 770 kg/mol.

Pšeničné otruby (a nejen pšeničné) jsou bohatým zdrojem arabinoxylanů (Hell *et al.*, 2015; Apprich *et al.*, 2014; Prückler *et al.*, 2014). Díky významné produkci otrub (výtěžnost 18-22 %) jako vedlejšího produktu mlýnského zpracování by bylo výhodné AX extrahovat a využít jejich funkční vlastnosti při výrobě potravin a fyziologické účinky ve výživě. Arabinoxylany byly izolovány z pšeničných otrub (otruby byly zbaveny škrobu) spojením alkalické extrakce a oxidačního působení peroxidu vodíku při teplotě 60°C, tlaku 101 kPa po dobu 3 h (Wiege *et al.*, 2014). Využita byla také opakovaná vodná extrakce při teplotě 160°C, při tlaku 101 kPa a 650 kPa po dobu 0,5 h nebo 1 h nebo 2 h. Následovaly kroky odstředování, dialýzy, a membránové filtrace a sušení. Podmínky extrakce měly významný vliv na molekulovou hmotnost získaných arabinoxylanů (rozmezí MW 11 kg/mol až 220 kg/mol), na výtěžek (9,5 a 25,7 %) a čistotu výsledného produktu (45,1 % a 69,8 %). Jako výhody použití alkalické extrakce při izolaci pšeničných arabinoxylanů lze uvést práci za nižší teploty a tlaku, vyšší výtěžnost a čistotu získaného produktu. Nevýhodou alkalické extrakce bylo dlouhá doba extrakce, použití řady chemikálií a nutnost opakování filtračních postupů.

Rozpustné arabinoxylany mají vysokou schopnost vázat vodu (Rakha *et al.*, 2010). Rozdíly v rozpustnosti závisí na stupni větvení molekuly. Čím jsou molekuly arabinoxylanů více větvené, tím se zvyšuje jejich rozpustnost. Většina arabinoxylanů pocházející z endospermu žitné i pšeničné obilky jsou rozpustné ve vodě, zatímco arabinoxylany z aleuronové vrstvy a oplodí jsou ve vodě nerozpustné.

V řadě studií bylo potvrzeno, že arabinoxylany ve vodě extrahovatelné mají pozitivní vliv na pekařskou kvalitu žitné mouky, zatímco ve vodě neextrahovatelné arabinoxylany kvalitu mouky ovlivňují spíše negativně (Andersson *et al.*, 2009). Žitné arabinoxylany hrají významnou

roli při stárnutí pekařských výrobků (AX zpomalují retrogradaci škrobu díky tomu, že vážou vodu a dlouho ji udrží ve své struktuře).

Arabinoxylany obsahují malé množství derivátů ferulové kyseliny (1-2 %) (Kamal-Eldin a Åman, 2008). Rezidua ferulové kyseliny tvoří vazbu mezi arabinoxylany a proteiny (zejména s aminokyselinou tyrosinem) a spolu se škrobem tak vytváří nosnou strukturu žitného těsta a pečiva. Vzniklý žitný gel je fyzikální obdobou pšeničného lepku s odlišnými vlastnostmi, žitný gel vzniká za studena a je schopen absorbovat až 200 násobné množství vody (vaznost arabinoxylanů je vyšší než vaznost škrobu nebo lepku). Žitný gel je méně pružný než pšeničná lepková struktura těsta, a proto jsou čistě žitné výrobky vždy hutnější, méně nadýchané a tužší.

I v pšeničném těstě, založeném na tvorbě lepkové struktury mají arabinoxylany (i přes jejich nízký obsah) významný podíl při vázání vody.

V porovnání s β -glukany, které snáze podléhají změnám při technologických procesech (například fermentace těsta, pečení, extruze), jsou arabinoxylany při fermentaci nebo tepelných úpravách stabilnější.

Obecný vliv vlákniny na kvalitu pekařského výrobku lze uvést v několika bodech: zvýšení výživové hodnoty výrobků, snížení energetické hodnoty výrobku, snížení glykemického indexu, zvýšení vaznosti vody. Problematický je ale její vliv na zpracovatelnost a strukturu těsta, na objem výrobku, pružnost a vláčnost střídy, na sensorické vlastnosti střídy. Nejednoznačný je i často uváděný vliv na prodloužení životnosti výrobku.

Samotné rozpustné arabinoxylany však působí v pekárenské technologii pozitivně. Pružnost a vláčnost střídy zvyšují, vysokou schopností vázat vodu a zadržovat ji ve střídě hotového výrobku se podílejí na prodloužení jeho čerstvosti.

Při porovnání fyziologických účinků arabinoxylanů a β -glukanů bylo zjištěno, že například žitné arabinoxylany vykazují vyšší viskozitu ve střevě, než ječné nebo ovesné β -glukany (Salovaara *et al.*, 2007). Navíc bylo zjištěno, že žitné arabinoxylany o průměrné molekulové hmotnosti kolem 200 kg/mol a určitém poměru xylos a arabinos v řetězcích arabinoxylanů, výrazně zvyšovaly při pravidelné konzumaci žitného pečiva viskozitu střevního obsahu.

Další složky vlákniny

Další nestrávené a neabsorbované složky potravy, jako je například kyselina fytová, se řadí mezi vlákninu (Delcour a Hoskeney, 2010). Kyselina fytová tvoří s vápníkem, železem, hořčíkem, mědí nebo zinkem nerozpustné komplexy a snižuje tak využitelnost uvedených dvojmocných kovů.

Popsány však byly také pozitivní efekty kyseliny fytové na lidské zdraví (Kumar *et al.*, 2010). Takové účinky spočívají například v potlačení tvorby reaktivních hydroxylových radikálů katalyzované železem (antioxidační účinek – zabránění peroxidace lipidů). Nejnovější studie

dokonce uvádí souvislost mezi příjmem kyseliny fytové a snížením tvorby ledvinových kamenů (zabránění krystalizace vápenatých solí v moči) apod.

Doprovodnými nutričně a zdravotně významnými látkami spojenými s vlákninou, které se však v běžných v obilovinách vyskytují v nižším množství, jsou polyfenoly (Singh a Sharma, 2017; Croft, 2016; Inglett *et al.*, 2011; Saura-Calixto, 2011). Uvedené bioaktivní látky působí zejména jako antioxidanty, tj. chrání buňky před účinkem volných radikálů a dalších reaktivních oxidačních činidel. Mohou vykazovat ale řadu dalších aktivit (protizánětlivá aktivita, antiproliferační účinky proti nádorové linii, prebiotické účinky a další), které je však potřeba důkladně ověřit. Jsou šlechtěny speciální odrůdy pšenice nebo ječmene s barevným zrnem, které vykazují vyšší obsahy aktivních karotenoidů, anthokyanů nebo xanthofylů (Siebenhandl *et al.*, 2007).

Zdravotní tvrzení o prokázaných účincích vlákniny obilovin a jejích složek

Na základě výsledků řady klinických studií byla v zemích EU schválena zdravotní tvrzení týkající se prospěšných účinků vlákniny potravy u jednotlivých obilovin. Povolena zdravotní tvrzení a podmínky jejich používání podle Nařízení komise EU č. 432/2012, platné od 14. 12. 2012 jsou následně uvedeny (citace): „Vláknina ječného nebo pšeničného zrna nebo pšeničných otrub přispívá ke zvýšení množství stolice. Tvrzení smí být použito pouze u potravin s vysokým obsahem této vlákniny podle vymezení v tvrzení S VYSOKÝM OBSAHEM VLÁKNINY na seznamu v příloze nařízení (ES) č. 1924/2006“. (poznámka: podle nařízení EU č. 1924/2006, vysoký obsah vlákniny, potravinu obsahuje alespoň 6 g vlákniny na 100 g nebo alespoň 3 g na 100 kcal neboli 420 kJ).

„Žitná vláknina přispívá k normální činnosti střev. Tvrzení smí být použito pouze u potravin s vysokým obsahem této vlákniny podle vymezení v tvrzení S VYSOKÝM OBSAHEM VLÁKNINY na seznamu v příloze nařízení (ES) č. 1924/2006“.

„Vláknina pšeničného zrna přispívá k urychlení střevního tranzitu. Tvrzení smí být použito pouze u potravin s vysokým obsahem této vlákniny podle vymezení v tvrzení S VYSOKÝM OBSAHEM VLÁKNINY na seznamu v příloze nařízení (ES) č. 1924/2006. Aby bylo možné tvrzení použít, musí být spotřebitel informován, že příznivého účinku se dosáhne při přívodu nejméně 10 g vlákniny pšeničného zrna denně“.

„β-glukany přispívají k udržení normální hladiny cholesterolu v krvi. Toto tvrzení může být použito pouze u potravin, které obsahují nejméně 1 g β-glukanů z ova, ovesných otrub, ječmene, ječných otrub nebo ze směsi těchto zdrojů v kvantifikované porci. Aby bylo možné tvrzení použít, musí být spotřebitel informován, že příznivého účinku se dosáhne při přívodu 3 g β-glukanů z ova, ovesných otrub, ječmene, ječných otrub nebo ze směsi těchto zdrojů denně“.

„Konzumace β-glukanů z ova nebo ječmene jakožto součástí jídla přispívá k omezení nárůstu hladiny glukosy v krvi po tomto jídle. Tvrzení smí být použito pouze u potravin, které obsahují nejméně 4 g β-glukanů z ova nebo ječmene na každých 30 g využitelných sacharidů v kvantifikované porci jakožto součástí jídla. Aby bylo možné tvrzení použít, musí být spotřebitel informován, že příznivého účinku se dosáhne konzumací β-glukanů z ova nebo ječmene jakožto součástí jídla“.

„Konzumace arabinoxylanů z pšeničného endospermu přispívá ke snížení zvýšené hladiny glukosy v krvi po jídle. Toto tvrzení může být použito pro potraviny, které obsahují nejméně 8 g vlákniny z pšeničného endospermu bohaté na arabinoxylany na 100 g využitelných sacharidů v kvantifikované porci tvořící součást jídla. Na obale výrobku musí být uvedeno, že prospěšný efekt arabinoxylanů z pšeničného endospermu je zaručen konzumací vlákniny z pšeničného endospermu bohatého na arabinoxylany jako součást jídla“.

1.7.4 Příspěvek ke stanovení β -glukanů hub a kvasinek

Při stanovení obsahu celkové vlákniny a jejích složek v houbách nebo kvasinkách se využívá enzymaticko-gravimetrická metoda (AOAC 991.43, AOAC 985.29), tak jako v případě stanovení vlákniny v obilovinách, luštěninách apod. Zatímco při stanovení houbových β -glukanů je třeba postupovat odlišným způsobem než v případě stanovení obilných β -glukanů. Jak již bylo zmíněno, struktury houbových a kvasničných β -glukanů se liší. A odlišný je také způsob extrakce glukanů, v případě hub se jedná o stanovení α - i β -glukanů. Princip stanovení β -glukanů s vazbou β -(1,3) nebo β -(1,3)(1,6) přítomnými v kvasinkách, houbách a dalších materiálech a přípravcích podobného charakteru spočívá v postupné kyselé hydrolýze a depolymerizaci glukanu pomocí H_2SO_4 , následuje enzymová hydrolýza (působení α -1,3- β -glukanasy a β -glukosidasy v případě molekuly β -glukanu nebo působení amyloglukosidasy v případě přítomnosti α -glukanu) za vzniku glukosy. Hydrolyticky uvolněné glukosy jsou vzdušným kyslíkem za katalýzy glukosaoxidasou převedeny na kyselinu glukonovou (γ -glukonolakton) a peroxid vodíku. Vzniklý peroxid vodíku se stanoví chromogenním činidlem za katalýzy peroxidasou. Množství vzniklého barviva je při dodržení podmínek úměrné množství glukosy. Obsah glukosy je poté spektrofotometricky proměřen při vlnové délce záření 510 nm.

Plodnice (klobouky a třeně) hub *Pleurotus ostreatus* a *Pleurotus eryngii* byly studovány jako potenciální zdroje glukanů pro výrobu potravinových doplňků (**Příloha 3: Synytsya et al., 2008**). Enzymová analýza potvrdila významné rozdíly v obsahu glukanů a vlákniny u sledovaných druhů hub. Ve většině případů třeně obsahovaly více β -glukanů a nerozpustné vlákniny než klobouky, avšak mohlo dojít k navýšení vypočtených hodnot obsahu β -glukanů v následku rezistence α -1,3-glukanů vůči enzymům v komerčním analytickém setu [*β -Glucan (Yeast & Mushroom) Assay Kit*]).

1.8 Vliv technologických postupů zpracování obilovin na škrob a neškrobové polysacharidy

Mlýnské zpracování obilovin (úprava zrna před mletím a vlastní dezintegrace), fermentační technologie (příprava kvasu, a zrání a kynutí těsta), pečení, extruze a technologické postupy skladování polotovarů a hotových výrobků jsou významné procesy cereální technologie, které mohou v různém rozsahu ovlivnit obsah, složení a vlastnosti vlákniny a škrobu (Sluková a kolektiv, 2016). Během jednotlivých technologických operací může docházet ke snížení nebo naopak zvýšení obsahu vlákniny nebo jejích složek, ke změně poměru rozpustné a nerozpustné složky vlákniny, fyzikálních vlastností, změně stupně polymerace polysacharidů, vazeb a struktury molekuly, tvorbě rezistentního škrobu apod. Dochází také, což je z nutričního hlediska velmi významné, ke změně biologické dostupnosti některých hlavních i doprovodných složek vlákniny.

Primárním zpracováním se rozumí zpracování obilného zrna (obilky) do formy, ze které je v následném – sekundárním kroku připraveno k přímému konzumu (Gordon a William, 1994). Nejčastějším primárním zpracováním je mlýnské zpracování obilovin na mouky a krupice, které zahrnuje skladování zrna, jeho přípravu k mletí, vlastní mlecí proces a finální úpravu (včetně balení) mlýnských produktů a jejich skladování. Primárním zpracováním může být také vločkování, povrchová úprava zrna (loupání, broušení, leštění), hydrotermické opracování celých zrn (zápara, závačka apod.).

Nejběžnějším typem sekundárního zpracování obilovin je pekárenské zpracování mouk, které zahrnuje skladování a přípravu mouk a dalších surovin na výrobu chleba, běžného, jemného a trvanlivého pečiva, finální úpravu pekařských produktů a jejich bezpečné skladování. Sekundárním zpracováním může být také vaření, pražení a kulinářská úprava.

Z pšenice se primárně vyrábějí převážně mouky a krupice, sekundárně chléb, běžné a jemné pečivo, cukrářské a pečivářské hmoty a těstoviny. Druhá obilovina v globálním měřítku po pšenici nejčastěji užívaná pro lidskou výživu – rýže se primárně většinou pouze povrchově upravuje a sekundárně zpracovává kulinářsky (vařením) pro přímou konzumaci.

V první fázi sekundárního zpracování jde zpravidla o smíchání surovin (mouky a dalších recepturních složek), hnětení a vytvoření těsta (suspenze, hmoty) (Delcour a Hoseneý, 2010; Příhoda *et al.*, 2003). Ve většině případů mají na strukturu tohoto meziproduktu rozhodující vliv hydrokoloidní biopolymery mouky a voda, často za účasti lipidů a dalších recepturních složek. Ve druhé fázi sekundárního zpracování dochází ke kypření kvasným plynem CO₂ vznikajícím při fermentačních dějích (etanolové a heterofermentativní mléčné kvašení), nebo CO₂ uvolňovaným chemickým kypřidlem. Dále následuje tvarování, formování a povrchová úprava těstového kusu, jedná se vesměs o mechanické procesy. A poslední fázi představuje tepelné zpracování (pečení, smažení, sušení, vaření). Tepelných procesů, které se využívají pro sekundární zpracování obilovin, je značné množství a dochází zde k rozvoji a inovacím, které

směřují k vyšší efektivitě a současně také vyšší bezpečnosti – tepelné procesy jsou zdrojem procesní kontaminace (akrylamid, furan a další).

1.8.1 Využití ječmene

Pšenice a žito jsou základní chlebové obiloviny naší oblasti (Sluková a kolektiv, 2016). Pšenice je světově nejvýznamnější surovinou pro cereální účely. Pozornost je třeba věnovat i dalším obilovinám (pšenice špalda, ječmen, čirok), a pseudoobilovinám (pohanka). Použitím těchto netradičních obilovin vede k rozšíření sortimentu cereálních výrobků, výrobků, které mohou vykazovat vyšší výživovou hodnotu (vyšší obsah vlákniny, vyšší obsah bioaktivních látek, nižší obsah škrobu) a v případě pseudoobilovin zvážit význam bezpečnostních výrobků.

Ječmen, je tradiční euroasijská plodina, která u nás byla historicky využívána v cereální technologii pro výrobu mouk a pečiva. Toto její použití prakticky upadlo a ječmen byl donedávna v našem potravinářství chápán téměř výhradně jako sladovnická surovina. Díky vyššímu obsahu vlákniny ve srovnání s pšenicí a zejména její složky β -glukanů zájem o zpracování ječmene při výrobě chleba v posledních letech stoupá (Baik *et al.*, 2008).

Skupina „Renesance ječmene v lidské výživě“ (pracovní skupina v rámci České technologické platformy pro potraviny, ČTPP PK ČR) měla za cíl informovat producenty a spotřebitele o ječmeni a jeho zdravotních účincích, zvýšit zájem a rozšířit povědomí o zdravotně prospěšných složkách ječmene, o možnosti pěstování nových odrůd ječmene vhodných pro potravinářské účely (mimo sladovnictví), a o moderních postupech zpracování a vývoji nových výrobků z ječmene.

Větší rozsah využití ječmene mohou nabízet nové, šlechtěné odrůdy bezpluchého (nahého) ječmene, u kterého odpadá problém s odstraňováním pluch, což vede k výraznému snížení výrobních nákladů (Vaculová, 2014). Výsledkem dlouhodobého šlechtění (společnost Agrotest fyto, s.r.o., Kroměříž) jsou k dispozici speciální bezpluché odrůdy ječmene (většinou jarního) s vyšším obsahem β -glukanů nebo s waxy typem škrobu. Tyto odrůdy potravinářského ječmene byly použity k přípravě kaší, müsli směsí, vloček a lupínků do snídaňových směsí, celé nebo lehce obroušené ječné zrna bylo použito k přípravě záparů, fermentovaných ječných perliček (jako přídavek do masných výrobků a sýrů), k zpracování na mouky nebo výběr mlýnských frakcí k výrobě chleba a pečiva (vícezrnný chléb a běžné a jemné pečivo s ječmenem), včetně kulinární úpravy, speciálních ječných kvasů, k výrobě extrudovaných ječných mouk (slouží jako polotovary v gastronomii), extrudovaných tyčinek a chlebů, nebo ve formě extrudovaných drobných tvarů (jako přídavek do jogurtů), ječných těstovin apod. (Sluková *et al.*, 2014; Sluková *et al.*, 2013).

Uvedená problematika analýzy a využití nových odrůd ječmene byla řešena v rámci projektů „Nové postupy pro využití zemědělských surovin a produkci hlavních druhů potravin zvyšujících jejich kvalitu, bezpečnost, konkurenceschopnost a výživový benefit spotřebitelů

(QI111B053) a „Vývoj nových plodin s cílem produkce potravinářských výrobků s vyšší výživovou hodnotou (QJ1610202).

1.8.2 Hydro(termická) úprava

Při standardním zpracování pšenice a žita se používá pouze přidavku vody a času (nakropení a odležení), bez záhřevu (Sluková et al., 2017). Při výrobě vloček (nejen ovesných) je naopak řízená temperace (kondicionování), spolupůsobení vlhkosti a tepla, nezbytné. Vždy se jedná o procesy založené na hydrokoloidních vlastnostech biopolymerů (polysacharidů a proteinů). Při správním vedení hydrotermických procesů dochází k významným mechanickým změnám ve struktuře zrna (zejména porušení soudržnosti endospermu s obalovými vrstvami i klíčkem), intenzivnímu bobtnání škrobových zrn, oslabení soudržnosti kvarterních struktur hydrokoloidů vedoucí ke změně textury zrna. Uvedené změny zásadně ovlivňují efektivitu primárního, zejména mlýnského zpracování, a určují jakost produktů (například aktivace amylolytických enzymů a proteas s následným vlivem na fermentační procesy při zrání a kynutí těst).

Novými postupy práce s obilím před dalším zpracováním je využití různých typů hydrotermické úpravy zrna. Jedná se o procesy řízeného vlhčení a máčení zrna, jeho temperaci, ohřev a vaření. Dochází ke zlepšení senzorických vlastností zrna a možnému zvýšení využitelnosti některých bioaktivních látek.

Intenzivním ohřevem zrna ve vodě po dobu několika hodin se získá produkt zápara (při teplotě 50°C) nebo závařka (při teplotě 65°C) (Sluková a Smrž, 2012). Během úpravy dochází k bobtnání a hydrataci složek zrna, textura zrna se stává měkčí a lehce žvýkatelná, aktivují se enzymy a produkty hydrolýzy polymerů přispívají k tvorbě aromatických látek. Takto upravená zrna mohou být přidávána do receptury vícezrnných chlebů a k dalším účelům sekundárního zpracování.

Řízené postupy hydrotermické úpravy, máčení a klíčení obilných zrn vedou ke změně obsahu a struktury oligosacharidů, škrobu a neškrobových polysacharidů. Vedle biochemických procesů (aktivace a působení enzymů, tvorba nízkomolekulárních fermentovatelných látek a jejich zapojení do dalších reakcí, uvolnění substrátů pro vznik senzoricky významných látek, vznik exopolysacharidy a oligosacharidů) hrají roli i fyzikální projevy (hydratace, bobtnání a mazovatění, tvorba nízkomolekulárních ve vodě rozpustných látek). Biologická dostupnost látky je ovlivněna její vstřebatelností, což souvisí s fyzikálně-chemickými vlastnostmi dané látky (struktura, molekulová hmotnost, rozpustnost, schopnost vazby na proteiny nebo peptidy).

Během máčení ječmene došlo k aktivaci a nárůst aktivity α -amylasy i β -amylasy. Potravinářské odrůdy ječmene (AF Lucius a AF Cesar) vykazovaly nejnižší klíčivost (Pančíková, 2014). Během máčení došlo k poklesu obsahu škrobu i bílkovin. Pomocí SEM byly pozorovány změny ve struktuře škrobových granulí. Máčené a naklíčené ječmeny, resp. jejich upravené suspenze by

byly vhodnou alternativou ke komerčním enzymovým preparátům využívaných v pekárenské technologii.

1.8.3 Proces mletí

Vlastní proces mletí obilí je založen na drcení meliva a třídění vzniklého produktu (Sluková *et al.*, 2017). Tyto dvě operace tvoří základní jednotku celého výrobního procesu, která se nazývá mlecí chod neboli pasáž. Drcení meliva probíhá v převážné míře na válcových stolicích, které většinou sestávají ze dvou dvojic mlecích válců. Téměř každá dvojice válců se liší svými parametry (úpravou povrchu aj.), tzn., že drcení na každé ze dvojic válců probíhá poněkud jinak. Počet těchto dvojic odpovídá počtu mlecích chodů. Na první dvojici válců se vede samotné zrno a tento mlecí chod nazýváme první šrot. Po průchodu válci vzniká heterogenní sypká směs, která je tříděna do několika frakcí na rovinném vysévači nebo čističce krupic. Část frakcí se vede přímo do produktů, většina však postupuje jako melivo na další mlecí chody. V pšeničném mlýně jich bývá cca 15-20 a dělíme je na šrotové, lušticí a vymílací. Žitné linky sestávají většinou ze 7-8 chodů.

Z původního zrna se tak získávají krupičné a moučné (jedlé) produkty a otruby (složené především z obalových vrstev) a klíčky, což jsou produkty tradičně označované jako krmné, což ovšem zcela neodpovídá skutečnosti a modernímu pohledu na jejich nutriční význam. Chemické složení meliva i směsi po drcení je totožné, výrazně je odlišná jejich struktura neboli granulace.

Výživová hodnota mlýnských frakcí se liší podle tzv. stupně vymletí, který je dán mírou vytěžení požadovaného produktu z obilného zrna. Stupeň vymletí se nejčastěji pozná podle obsahu popela, proteinů a stupně poškozeného škrobu, přičemž s vyšším stupněm vymletí se zvyšuje obsah popela, obsah proteinů i podíl poškozeného škrobu. To je dáno vyšším zastoupením obalových a podobalových vrstev v produktu (mouce) a delší expozici meliva mechanickému namáhání.

Dezintegrací obilného zrna dochází k mechanickému poškození škrobových zrn, která jsou poté snadněji enzymově narušována. Poškození škrobu může nastat také v důsledku záhřevu mezi válci válcové stolice (teplota zde dosahuje běžně přes 80°C), přesto, že je mu melivo vystaveno jen na několik sekund. Škrobová zrna mohou být pomačkaná a potrhaná, částečně i zmazovatělá. Stupeň poškození škrobu má dvojí význam. Z hlediska pekárenské technologie je do jisté míry žádoucí pro dostatečně rychlou a hlubokou fermentaci kvasů a těst. Z nutričního hlediska však vyšší stupeň poškození znamená také jeho rychlejší resorpci v organismu a tudíž vyšší glykemický index mouk a výrobků z nich.

Jedním z výzkumných úkolů pracovní skupiny „Renesance ječmene“ bylo posouzení kvality moučných frakcí z ječmene a nalezení frakcí s vyšší výtěžností, vhodnými pekařskými vlastnostmi a zároveň i vyváženou nutriční skladbou (**Příloha 4: Velebna *et al.*, 2012; Sluková**

et al., 2012). Porovnávány byly frakce z odrůdy bezpluchého potravinářského ječmene s vyšším obsahem β -glukanů s frakcemi z pluchaté sladovnické ječmene pěstované v ČR. Mletí ječmene probíhalo na žitném mlýně s předstihem válců 1:3, po čištění, loupání a jednom obroušení ječného zrna. Vybranými analytickými metodami byl v ječných frakcích stanoven obsah celkové vlákniny, β -glukanů a celkového škrobu. Dále byla proměřena FT-IR spektra mlýnských frakcí (KBr tableta, střední IR oblast, počet skenů 64), která byla zpracována metodou multivariační analýzy. Byly vybrány nutričně a technologicky zajímavé frakce (frakce s vysokým obsahem β -glukanů a celkové vlákniny a s vyšší výtěžností) pro využití v pekárenském průmyslu. Spojením infračervené spektrometrie a statistické analýzy byly frakce roztříděny do příslušných shluků podle jejich odlišného chemického složení (zejména podle rozdílného obsahu celkové vlákniny potravy, β -glukanů a celkového škrobu).

Jak již bylo zmíněno, pro potravinářské účely jsou šlechtěny v zahraničí i v ČR speciální odrůdy ječmene s vyšším obsahem β -glukanů. Nové zdroje jarního bezpluchého i pluchatého ječmene s *waxy* i standardním složením škrobu pěstované v ČR byly porovnávány se zahraničními odrůdami (**Příloha 7: Wiese *et al.*, 2016**). Byla získána řada mlýnských frakcí a otruby, které se lišily mezi sebou výtěžností a chemickým složením. Nejvyšší obsahy arabinoxylanů, celkové, nerozpustné i rozpustné vlákniny byly stanoveny v otrubách, přičemž hodnoty nalezené v celozrnné ječné mouce odpovídaly zhruba hodnotám nalezeným v mouce z vymílacích otrub. Potěšující zprávou bylo, že česká odrůda ječmene se standardním složením škrobu (označení KM 1057) měla nejvyšší obsah arabinoxylanů (11,4 %), celkové vlákniny (44,5 %) a nerozpustné vlákniny (36,4 %). Tato odrůda byla doporučena pro průmyslové testování.

U souboru 34 vzorků pšeničných, žitných, ječných mouk a jejich směsí byly stanoveny výživové a technologicky významné parametry určující kvalitu mouky (vlhkost, popel, sorpční kapacity-SRC, obsah a kvalita proteinů, zastoupení jednotlivých frakcionací proteinů dle Osborna, obsah celkového a poškozeného škrobu, obsah vlákniny a β -glukanů) (**Příloha 5: Sluková *et al.*, 2012; Velebná, 2011**). Spojením výsledků kvalitativní analýzy a spektrálních dat (FT-IR spektra ve střední oblasti, transmisní spektra, KBr tableta, oblasti absorpce charakteristických funkčních skupin škrobu, vlákniny a proteinů) vyhodnocených multivariační PCA analýzou byly možné roztřídit jednotlivé typy mouk a jejich směsí do 3 skupin (pšenice, směsí, a žito a ječmen). Skupiny vykazovaly navzájem rozdílné výživové a zpracovatelské vlastnosti. Zároveň byly potvrzeny statisticky významné pozitivní korelace mezi obsahem β -glukanů a obsahem rozpustné vlákniny (Holtekjølen *et al.*, 2006), mezi obsahem TDF a hodnotou sorpční kapacity ve vodě a obsahem β -glukanů a hodnotou sorpční kapacity v roztoku sacharosy. Negativní korelace byly zjištěny mezi obsahem vlákniny a škrobu. Závěrem lze shrnout, že spojení spektrální analýzy a vybrané statistické metody zpracování dat se osvědčilo jako metoda vhodná pro screening kvality mouk a posouzení jejich funkčnosti.

1.8.4 Využití otrub

Otruby jsou významným zdrojem vlákniny a dalších bioaktivních látek (Stevenson *et al.*, 2012; Prückler *et al.*, 2014). Pro zajištění stability a zlepšení sensorických vlastností pšeničných otrub bylo využito jejich tepelné zpracování mikrovlnným zářením (Galušková, 2016). V laboratorních podmínkách byly připraveny chleby s přidavky otrub 0 až 20 % (vztaženo na mouku). U skupiny dobrovolníků byla sledována glykemie po konzumaci chleba s 20% přidavkem tepelně upravených otrub. Bylo potvrzeno, že se zvyšujícím se přidavkem otrub do těsta dochází k postupnému snižování objemu chleba, snižovala se velikost a distribuce pórů ve střídě, ale naopak se zlepšovala homogenita střídy. Výsledky chemické analýzy nativních otrub a otrub tepelně opracovaných ukázaly, že působením mikrovlnného záření nedochází k výrazným změnám ve složení otrub. Došlo ke snížení vlhkosti a nepatrnému navýšení obsahu volných cukrů u tepelně upravených otrub. Z hlediska sensorických vlastností a technologického zpracování byl pro další analýzy a klinické testování vybrán chléb s 20% přidavkem tepelně upravených otrub. Chléb sice vykazoval drsnější a sušší pocit při žvýkání, byl drobivější, s nepatrně tužší střídou, ale chuťově vykazoval příjemné vjemy v porovnání s kontrolním chlebem.

U sledované skupiny zdravých dobrovolníků (8 žen, 1 muž, ve věku 18-36 let) se neprokázal pozitivní vliv vlákniny pšeničných otrub v chlebu na postprandiální resorpci glukosy. Glykemické křivky byly měřeny dva dny (pro každý chleba jeden den) a dávka, která by měla obsahovat 50 g sacharidů, byla vypočtena na 120 g testovaného chleba. Vzorky krve na stanovení glykemie byly odebírány v následujících intervalech: –15 min, 0, 15, 30, 45, 60, 90 a 120 min. Dobrovolníci, kteří byli ráno nalačno, konzumovali od času 0 během 5 min sledovanou potravinu. Glykemie byly vyšetřovány pomocí kalibrovaného glukometru, který udává hodnotu glykemie v kapilární krvi. Je třeba uvést, že počet testovaných konzumentů byl velmi nízký a že by bylo vhodné testy provést na podstatně početnějším vzorku.

1.8.5 Využití fermentace - tvorba kvasů

V cereální technologii jsou fermentační technologie zpracování obilovin (zejména žita a pšenice) na kvasy nebo kvasné stupně tradiční záležitostí jak v ČR tak i v zahraničí (Ua-Arak *et al.*, 2016; Katina *et al.*, 2005). Přídavek kvasu nebo kvasného stupně ovlivňuje výživovou kvalitu, sensorické vlastnosti a trvanlivost pekařských výrobků. V současné době lze pozorovat návrat k fermentačním procesům. Začínají se zpracovávat i doposud méně tradiční plodiny (ječmen, pohanka, čirok).

Během fermentace mlýnských produktů dochází vlivem sníženého pH (produkcí organických kyselin) ke změně vlastností biopolymerů (vaznost, hydrolýza, rozpustnost) a tvorbě nových sloučenin s prebiotickou a antifungální aktivitou (Zannini *et al.*, 2009; Poutanen *et al.*, 2009; Tieking a Gänzle, 2005). Vybrané kmeny laktobacilů mohou za specifických podmínek produkovat exopolysacharidy, které mohou sloužit jako hydrokoloidy a zlepšovat procesy

tvorby těsta a kvalitu výrobku. To se odráží na zvýšení senzorické, výživové kvality a prodloužení trvanlivosti finálního pekařského výrobku.

Domníváme se, že v případě řízené fermentace mouk s vyšším obsahem vlákniny (celozrnných jemně mletých mouk) dochází k lepší dostupnosti a využitelnosti složek vlákniny, složek doprovázejících vlákninu, včetně bioaktivních látek. Řízená fermentace má tak vliv na zvýšení výživové a biologické hodnoty zpracovávané potraviny.

Vedle spontánně vedených kvasů se pro iniciaci fermentačních procesů v běžné pekárenské technologii používají startovací kultury (Siepmann *et al.*, 2018; Brandt, 2014; Morrini *et al.*, 2010; Gobbetti, 1998). Nejstarší a nejrozšířenější je droždí, tvořené čistou kulturou kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, které startuje a nese etanolové kvašení v běžném pečivu. Droždí se používá jak v přímém vedení těsta, kde se všechny suroviny včetně droždí smísí naráz (tzv. vedení „na záraz“), tak pro přípravu kvasných stupňů, jako jsou omládek nebo poliš. Preparované kultury (čisté i směsné kultury mléčných bakterií) se používají i pro moderní a zkrácené technologie vedení kvasů s dominantní mléčnou fermentací.

Pšeničné kvasy nebo kvasné stupně vedené za různých podmínek mohou sloužit jako zcela zásadní nebo přinejmenším významná recepturní složka běžného pečiva, toustového nebo sendvičového chleba apod. Výhoda využití těchto kvasných produktů spočívá ve zlepšení vláčnosti a měkkosti středy pečiva a prodloužení trvanlivosti pečiva (jak z hlediska mikrobiálního tak senzorického) (Urešová, 2018).

Novým trendem cereální technologie je vedení kvasů z celozrnných mouk (Adebo *et al.*, 2018; Gobbetti *et al.*, 2019; de Angelis *et al.*, 2019). Celozrnné mouky jsou hodnotnější z výživového hlediska v porovnání se světlou nebo chlebovou moukou. Při využití celozrnné mouky je třeba dbát na zajištění hygienické (zdravotní) nezávadnosti, celozrnné mouky z podstaty své výroby mohou vykazovat určitá rizika týkající se kontaminace (přímá mikrobiální kontaminace, kontaminace mykotoxiny a rezidui pesticidů). Na druhou stranu celozrnné mouky mívají vyšší podíl mikroorganismů účastnících se fermentačních procesů v kvasech (kvasinek a laktobacilů), což může být pozitivně využito při spontánním vedení kvasů. U kvasů z celozrnných mouk byly potvrzeny vyšší hodnoty titračních kyselostí, vyšší podíl fermentací vzniklých organických kyselin (vedle kyseliny mléčné a octové byla kvantifikována kyselina šťavelová a propionová) a vyšší antifungální aktivita (kvasy z celozrnné žitné a pohankové mouky) v porovnání se standardními kvasy (Tobolová, 2018). Také profil těkavých a netěkavých látek v kvasech z celozrnných mouk byl pestřejší.

V rámci výzkumu byly z žitné a pohankové mouky vyváděny kvasy s použitím dvou typů startovacích kultur (žitná a pšeničná startovací kultura) (Sadílková, 2018). Žitný kvas byl vyváděn dvoustupňově s přidavkem žitné startovací kultury, pro pohankový kvas byla použita jednostupňová metoda a tento kvas byl připravován s oběma typy startovacích kultur. U druhého stupně žitných kvasů bylo naměřeno pH 4,2, pohankové kvasy měly pH vyšší (4,4). Nicméně titrační kyselost byla v případě pohankových kvasů připravených z pšeničné

startovací kultury srovnatelná s žitnými kvasy a pohankové kvasy připravené z žitné startovací kultury měly vyšší titrační kyselost než žitné kvasy. Uvedená skutečnost souvisí s rozdíly v obsahu organických kyselin stanovených v kvasech. Pohankové kvasy obsahovaly 1,49-1,51 g kyseliny mléčné/100 g, což bylo více než dvakrát vyšší obsah než v případě žitných kvasů (0,63 g/100 g). Žitné kvasy už mimo kyseliny mléčné obsahovaly pouze kyselinu octovou, pohankové kvasy obsahovaly rovněž kyselinu octovou a dále i kyselinu šťavelovou a propionovou.

Vedení kvasů z bezlepkových mouk je velkou výzvou a předmětem současného výzkumu a vývoje v cereální technologii. Při výrobě bezlepkového chleba a pečiva je třeba jako substrát kvasných procesů použít jiné druhy mouk než pšeničnou, žitnou či ječnou, které se uplatňují v běžné technologii. Vhodné je používat speciálně přizpůsobené startovací kultury schopné růstu v podmínkách surovin odlišných od běžné pšeničné nebo žitné mouky.

Jednou z možností je zárodečný kvas vyvést z žitné nebo pšeničné mouky a opakovat jej přidavkem mouky bezlepkové. Po několika cyklech koncentrace lepku z prvotního kvasu klesne i hluboko pod povolenou hranici 20 mg/kg. Vedle vyvádění bezlepkových kvasů z kultur žitné nebo pšeničné mouky je další možností vyvádět kvasy i přímo z bezlepkových mouk, pracuje se zejména s pohankovým kvasem, ale také například s kvasem amarantovým nebo čirokovým (Rózylo *et al.*, 2015; Ogunsakin *et al.* 2015; Sekwati-Monang *et al.*, 2012; Sekwati-Monang a Gänzle, 2011; Moroni *et al.*, 2010; Vogelmann *et al.*, 2009).

Dalším inovativním využitím ječmene v potravinářství je biotechnologické (fermentační) zpracování ječných surovin (obroušeného zrna a mouky) za účasti potravinářsky významných mikroorganismů (Mariotti *et al.*, 2014). Kvasy lze připravit různými způsoby. Smícháním hladké nebo celozrnné ječné mouky nebo jemně mletých ječných otrub s vodou a vybranými kvasinkami a bakteriemi mléčného a propionové kvašení byly připraveny tekuté, pastovité i práškové ječné kvasy (**Příloha 8: Sluková *et al.*, 2016**). Během fermentačního procesu vznikly v ječných kvasech organické kyseliny s krátkým řetězcem (kvantifikovány byly kyselina mléčná, octová a propionová), které působí jako přírodní konzervační látky. Mají vliv na inhibici růstu nežádoucích mikroorganismů v potravine a prodloužují tak trvanlivost potraviny. Během fermentace se tvoří řada dalších látek s antifungální aktivitou (kyselina fenylactová, cyklické dipeptidy, reuterin, bakteriociny a řada dalších) (Horáčková *et al.*, 2018).

Hygienický (mikrobiologický) stabilizační účinek kvasů spočívá v tvorbě dostatečného množství antifungálních látek (prodloužení trvanlivosti výrobku). Produkty fermentace působí příznivě i na zpomalení stárnutí pekařských výrobků (prodloužení čerstvosti).

Někteří spotřebitelé mají v dnešní době výhrady k používání přídatných látek v potravinách (značených kódem E), kam patří i konzervační látky (v cereální technologii jsou používány kyselina propionová E 280, propionát vápenatý E 282, kyselina sorbová E 200 a další). Je proto tendence nejen v pekárenské výrobě obsah konzervačních látek při výrobě potravin snižovat. Díky možnosti využít přirozeně vzniklé konzervační látky v cereálních kvasech se vytváří

potenciál pro významné snížení nebo úplné vyloučení přídavku konzervačního činidla ve formě přídatných látek. Přídavkem odpovídajícího množství kvasu lze docílit přijatelné senzorické i mikrobiální (hygienické) kvality finálního pekařského výrobku (Sluková *et al.*, 2016).

U ječných kvasů byly sledovány jejich fyzikálně-chemické vlastnosti a vliv přídavku těchto kvasů na kvalitu a prodloužení trvanlivosti pšeničných toastových chlebů. Obsah vlákniny potravy se v ječných kvasech pohyboval kolem 8 % a obsah β -glukanů mezi 4,5 až 6,5 %. Obsah kyseliny mléčné byl kolem 5 %, obsah kyseliny octové kolem 0,6 % a obsah kyseliny propionové kolem 0,4 %. Sledované ječné kvasy vykazovaly výborné sorpční vlastnosti (zvýšená vaznost vody vedla ke zvýšení výtěžnosti těsta a pečiva). Při zpracování těsta zajistily ječné kvasy rovnoměrnou distribuci vody a její pevné navázání ve struktuře těsta. Při přídavku ječného kvasu (10 % na mouku v receptuře chleba) byla prodloužena trvanlivost pšeničného toustového chleba až na 12 dnů. Delší trvanlivost chleba byla zajištěna přirozeně vzniklými organickými kyselinami, jejichž celkový obsah se ve střídě čerstvého upečeného toustového chleba pohyboval kolem 0,5 %. Zpomalení stárnutí chleba bylo způsobeno zadržením vody ve struktuře střídý chleba díky přítomnosti významného množství rozpustné vlákniny.

Při přípravě ječných kvasů bylo také velmi přínosné zpracování syrovátky (vedlejší produkt mlékárenského průmyslu) (Horáčková *et al.*, 2014). Sladká syrovátka díky svému složení sloužila jako vhodné prostředí k fermentaci. Před vlastní fermentací byla syrovátka zakonzentrována a upravena pomocí reverzní osmózy (Sluková *et al.*, 2016). Retentát syrovátky byl vystaven působení *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sanfranciscensis* a *Propionibacterium freudenreichii subsp. Freudenreichii* (podmínky fermentace 35°C, 72 h). Působením bakterií mléčného a propionového kvašení vzniklo v substrátu syrovátky významné množství organických kyselin. Tímto způsobem upravená syrovátka byla podrobena nanofiltraci, vybrané retentáty a permeáty byly zahuštěny ječnou moukou nebo ječnými otrubami a výsledná suspenze byla vystavena šetrnému sušení ve fluidní vrstvě (podmínky sušení 10°C, 30 min). Výsledné práškové ječné kvasy (s obsahem kyseliny mléčné 2,47 %, kyseliny octové 2,06 % a kyseliny propionové 3,59 %, vyjádřeno v hm % v sušině kvasu) byly dávkovány do chlebového těsta. Trvanlivost toustových chlebů s přídavkem ječného kvasu byla 14 dní.

Uvedené nové postupy byly testovány a ověřeny v poloprovozu a jsou momentálně využívány společnostmi MILCOM, a.s., Tábor a Zeelandia, spol. s r.o., Malšice.

Ověřená technologie „Testování nově navržené technologie na výrobu fermentací upravených ječných polotovarů“ spočívala v návrhu a ověření procesu výroby a analýzy ječných kvasů (inaktivní, tekuté nebo zahuštěné kvasy) (Sluková a Smrž, 2014a). Konkrétně se jednalo o úpravu varné technologie ječných zápar, výběr specifických druhů mikroorganismů k fermentaci ječných surovin a optimalizaci podmínek fermentace. Dále bylo provedeno hodnocení složení a reologické vlastnosti připravených suchých ječných kvasů a sledován vliv přídavků suchých kvasů na finální pekařské vlastnosti mouk. Ječný kvas a ječná zápara byly využity jako základ k výrobě kvasového vícezrnného chleba s hlavním cílem navýšit přídavek

ječmene do chleba. Chléb s ječnými polotovary měl vyšší obsah vlákniny a rozpustných beta-glukanů, po přidavku fermentací upraveného ječmene ve formě kvasu a zápary došlo k vylepšení senzorického profilu chleba a k prodloužení jeho trvanlivosti v porovnání s chlebem s přidavkem samotné neupravené ječné mouky. Suchá směs ječného kvasu a směs se záparou byly nabídnuty na trh jako pekařské směsi s vyšším podílem ječmene.

Poloprovoz „Ověření technologického postupu výroby nových ječných produktů s přidavkem ovoce a zeleniny“ spočíval v uplatnění a využití biotechnologického zpracování ječmene (ječných surovin) a ovoce nebo zeleniny (mrkev), konkrétně ve využití odpadů při zpracování ovoce (jablka-jablečná pasírka, višň-višňová pasírka, pasírka z hrušky) (Sluková a Smrž, 2012; Sluková a Smrž, 2014b). K ječné surovině byl přidán vybraný druh zeleniny nebo části ovoce, proběhla fermentace směsi, a následovalo sušení finálního produktu (forma plátků nebo jemné drtě). Jednalo se o vývoj nového ječno-ovocného (resp. ječno-zeleninového) produktu se zvýšenou výživovou hodnotou a řešilo se uplatnění tohoto produktu v mlékárenském průmyslu (součást sloužící k dochucení jogurtů a tvarohů) a v cereální oblasti (součást müsli, müsli tyčinek, snídaňových směsí).

Vývoj a testování ječných fermentovaných produktů probíhalo nejen ve vlastních laboratorních a výrobních prostorech společnosti MILCOM, a.s. Tábor a Zeelandia, spol. s r.o. Malšice, ale také na pracovištích v zahraničí (Holandsko, Německo, Francie). Uvedená pracoviště disponují a pronajímají příslušné poloprovozní zařízení. Do poloprovozu byly zařazeny unikátní technologické a strojní prvky, které nebyly doposud v takovém měřítku využívány. Konkrétně se jednalo o sušení horkým vzduchem ve fluidní vrstvě a sušení pomocí indukčního ohřevu.

Poloprovozní zařízení jsou připravena na výrobu o různé kapacitě a aplikace jsou přenositelné do většího provozu.

1.8.6 Procesy při tvorbě těsta (mísení, hnětení, zrání a kynutí)

Pekařská těsta mohou být vytvořena několika způsoby, jako příklad budou uvedeny dva hlavní způsoby vedení těsta. Přímé vedení těsta (tzv. „na záraz“), jedná se zejména o výrobu běžného pečiva a chleba kypřeného droždím. Všechny suroviny jsou v tomto případě dávkovány naráz do hnětacího stroje (Příhoda *et al.*, 2003).

Nepřímé vedení těsta, tj. výroba chleba nebo pečiva s kvasným předstupněm - buď s přirozeným kvasem, nebo, v případě, výroby běžného pečiva s tzv. vedením „na rozkvas“ nebo „na omládek“. V tomto případě přinejmenším část mouky prochází nejprve kvasným (před)stupněm a teprve poté jsou dákovány další suroviny.

Těsto je velmi složitý heterogenní systém s obsahem hydrofilních i hydrofobních složek. Zásadní je postupné bobtnání proteinů, škrobu a rozpustné vlákniny s vodou. V oxidačním

prostředí (díky vzdušnému kyslíku nebo vlivem dalších oxidantů) dochází k vzájemnému propojování řetězců makromolekul pšeničných proteinů a tvoří se pružná a pevná nosná trojrozměrná síť pšeničného lepku.

U žitné mouky se těsto tvoří propojováním řetězců proteinů a pentosanů a i dalších polysacharidů, oxidační prostředí (vzdušný kyslík) podporuje tvorbu typické struktury žitného těsta. Významnou roli zde hrají také molekuly ferulové kyseliny navázané na pentosany, které se oxidačních dějů účastní. Žitná mouka také váže větší množství vody ve srovnání s moukou pšeničnou. To je dáno, mimo jiné, i technologií mletí v žitných mlýnech. Žitné těsto je pastovité a nevykazuje tažnost a pružnost pšeničných těst a žitný chléb a pečivo mají mnohem hutnější strukturu.

Při zrání a kynutí těsta probíhají významné biochemické změny. Jak již bylo stručně zmíněno, během fermentace těsta dochází k hydrolýze škrobu, přičemž maltosa se stává substrátem pro mikroorganismy. Jde o mikroorganismy preexistující v mouce, které se množí při vyvádění spontánního kvasu, nebo dodané ve formě droždí či speciálních živých kvasů. Produkty fermentace jsou plyn oxid uhličitý, etanol a další alkoholy, organické kyseliny (zejména kyselina mléčná a octová), aldehydy, ketony a řada dalších aromatických látek. Fermentací vytvořené organické kyseliny snižují pH těsta, což vede k lepší vyšší využitelnosti některých minerálních látek, ke zlepšení využitelnosti proteinů a zlepšení kvality lepkové sítě. Zároveň tyto kyseliny působí jako přirozené stabilizátory a konzervační látky. Navíc byl v těstě detekován mikrobiálně vytvořený lysin, z vitaminů kyselina listová a pyridoxin. Můžeme tedy usuzovat, že proces fermentace těsta má nejen zásadní technologický efekt, ale může také zvyšovat nutriční hodnotu. Působením endogenní β -glukanasy dochází při delší fermentaci těsta ke snížení molekulové hmotnosti β -glukanů.

Funkční význam obilných sacharidů při tvorbě těsta a ve výrobku

Bobtnání a mazovatění škrobu je jedním z klíčových procesů během tvorby a zrání těst a při pečení (Sluková a kolektiv, 2016). Po zchladnutí pečiva dochází k retrogradaci škrobu. Přestože v těstě není dostatek vody, aby bobtnání a následné zmazovatění proběhlo v plném rozsahu, jsou tyto procesy určující pro tvorbu střídý pečiva a dosažení její optimální struktury a textury. Retrogradace škrobu se pak zásadní měrou podílí na stárnutí pečiva.

Role škrobu při tvorbě těsta je významná. Škrob jako majoritní složka mouky a těsta, je schopen navázat určité množství vody (za studena ale relativně méně, významněji vodu vážou zejména poškozená škrobová zrna). Amylosa, díky hydrofobnímu charakteru vnitřku šroubovice, která je základem sekundární struktury její molekuly, umožňuje tvořit velmi stabilní inkluze s mastnými kyselinami (s lipidy a emulgátory). Bohatě rozvětvené molekuly amylopektinu mají tuto schopnost v menší míře. (Amylosa proto například také méně snadno podléhá enzymové hydrolýze).

Při fermentaci těsta je škrob pro mikroorganismy (kvasinky a bakterie) zdrojem zkvasitelných cukrů (zejména ve formě maltosy a glukosy). Pro tvorbu jednoduchých cukrů ze škrobu je tudíž

významná aktivita amylolytických enzymů. Ta musí dosahovat určité úrovně. Pokud je příliš nízká, zrání a kynutí je pomalé, někdy nedostatečné pro dosažení objemu pečiva. V takovém případě se amylasy dodávají ve formě zlepšujících přípravků. Pokud je ale aktivita příliš vysoká (porostlé obilí, nebo předávkování přípravků s amylolytickou aktivitou), těsto zraje příliš rychle, roztéká se, lepí a může se stát prakticky nezpracovatelným.

Při pečení a chladnutí pekařského výrobku hraje škrob opět významnou roli. Při pečení dochází k částečnému mazovatění nabobtnalých škrobových zrn (velká část škrobových granulí však zůstane při pečení nezmazovatělá) a tvorbě škrobového gelu. V těstě však není dostatek vody potřebné k rozsáhlejšímu mazovatění škrobu, k mazovatění dochází jen na povrchu poškozených škrobových zrn. Voda je ve struktuře zmazovatělého škrobu pevně vázána, což má za následek udržení vláčnosti středy hotového pekařského výrobku.

Během chladnutí a skladování pekařského výrobku dochází k postupnému houstnutí trojrozměrné sítě vzniklého škrobového gelu, k vytlačování molekul vody ze škrobového gelu do okolí a k povrchu výrobku, ve struktuře škrobu se vytvářejí semikrystalické struktury. Tento proces nazýváme retrogradace a je hlavním činitelem v procesu stárnutí chleba a pečiva. Retrogradace způsobuje vytlačování molekul vody z vnitřní struktury škrobového gelu a její migraci ze středy výrobku. Během tohoto procesu ztrácí střída vláčnost a pružnost a tuhne, povrch kůrky vlhne a ztrácí křehkost.

1.8.7 Procesy pečení, pražení a extruze

Během tepelné úpravy suroviny/potraviny dochází ke změně struktury a složení většiny polysacharidů včetně vlákniny. Potravinářsky významnými procesy probíhající za vysoké teploty jsou pečení, pražení a extruze (Příhoda *et al.*, 2003).

Proces pečení má zcela zásadní vliv na výživovou i senzorickou hodnotu finálního pekařského výrobku. V počáteční fázi pečení nastává vlivem tepla denaturace proteinů (což vede částečně ke zlepšení jejich stravitelnosti), zvyšuje se intenzita bobtnání a začíná probíhat mazovatění škrobu (rychleji u poškozeného škrobu) a začínají probíhat také reakce neenzymového hnědnutí. V dalších fázích pečení probíhá další mazovatění a zejména na povrchu výrobku vystaveném vysokým teplotám (teplota povrchu pečeného kusu se pohybuje mezi 150-200°C v závislosti na způsobu pečení) probíhají reakce neenzymového hnědnutí velmi intenzivně.

U potravin s vysokým obsahem škrobu, kam pekařské výrobky patří, dochází při Maillardově reakci při vysokých teplotách také k tvorbě akrylamidu. V pekařských výrobcích se akrylamid tvoří pouze v kůrce, kde teplota dosahuje vysokých hodnot, a proto jeho koncentrace v celém výrobku bývá zanedbatelná.

U některých typů pekařských výrobků se může během pečení (ale i během extruze a i při skladování výrobků) tvořit rezistentní škrob, který vykazuje vlastnosti vlákniny. Resistentní

škrob je definován jako suma škrobu a produktů degradace škrobu, které se netráví v tenkém střevě člověka, ale může být fermentována mikrobiotou v tlustém střevě.

Pražení je jedním z výrazných tepelných procesů, které mají významný vliv na změnu složek příslušné potraviny (Regnerová, 2006). V rámci jednoho z našich experimentů byla oloupaná semena lupiny bílé podrobena pražení v průmyslovém měřítku (teploty 120°C nebo 140°C, doba 1, 2 nebo 3 h) a poté rozdrobena na mouku. Poté byly sledovány změny v obsahu rozpustné, nerozpustné a celkové vlákniny během těchto tepelných úprav. Pokusy byly opakovány a výsledky statisticky zhodnoceny. Při teplotách 140°C a 160°C došlo k významnému téměř dvojnásobnému zvýšení obsahu rozpustné vlákniny, k snížení obsahu nerozpustné vlákniny (10% snížení) a mírnému zvýšení obsahu celkové vlákniny v pražených moukách (8% zvýšení) v porovnání s tepelně neupravenou moukou. Nejvýraznější změny obsahu složek vlákniny byly zaznamenány mezi 1. a 2. h pražení. Mouka z pražené lupiny byla přidána do receptury běžného pečiva (přídavek mouky z pražené lupiny 10 % vztaženo na mouku) a byla provedena senzorická analýza pečiva s přídavkem mouky z pražené lupiny a pečiva bez přídavku. Pečivo s přídavkem mouky z pražené lupiny vykazovalo matnější kůrku žlutohnědé barvy, střída měla nepatrný žlutavý nádech a rovnoměrnou porozitu, chuť pečiva byla výraznější, plnější, zároveň jemnější, sladší s mléčným nádechem v porovnání s pečivem bez přídavku.

Fyzikálně-chemické reakce probíhající během extruze (termomechanický proces, působení tlaku, teploty a střihových sil na zpracovávanou surovinu po velmi krátkou dobu) závisí zejména na vlastnostech vstupního materiálu, procesních podmínkách (typ extrudéru, rychlost plnění extrudéru, rychlost otáčení, tvar a konfigurace šneku extrudéru, poměr vody a suroviny, a další parametry). Extruze způsobuje nevratné změny v obsahu a struktuře složek mouky, dochází k mazování a depolymerizaci škrobu, částečné depolymerizaci vlákniny a hluboké denaturaci a destrukci proteinů, což vede ke snížení jejich molekulové hmotnosti složek, k poklesu viskozity škrobu a vlákniny, ztrátě původních fyziologických účinků a biologické aktivity, zároveň se tvoří nové komplexy škrob-lipid, protein-lipid a protein-protein, pozorováno bylo také zvýšení rozpustnosti vlákniny a škrobu (Sozer a Poutanen, 2013).

Autoři (Comino *et al.*, 2016; Sozer a Poutanen, 2013; Gajula *et al.*, 2008; Vasanthan *et al.*, 2002 a další) zjistili, že během extruze obilných mouk nastávají změny v rozpustnosti složek, snížení obsahu nerozpustné vlákniny (IDF) a celkové vlákniny (TDF) a navýšení obsahu rozpustné vlákniny (SDF). V extrudované potravíně na bázi obilovin byl opakovaně zjištěn vyšší úbytek IDF, než bylo zvýšení hodnoty SDF, což bylo vysvětleno částečnou přeměnou celulosy na frakce SDF s nižší molekulovou hmotností. Tyto frakce mohly být dále degradovány na nízkomolekulární složky a až na deriváty cukrů, které již nebyly jako vláknina stanoveny (Gajula *et al.*, 2008). Někdy může také během extruze dojít k navýšení TDF vznikem rezistentního škrobu (RS) nebo nestravitelných produktů Maillardovy reakce. Comino *et al.* (2016) uvádí, že během extruze došlo ke zvýšení vodou extrahovatelných arabinoxylanů (AX) v pšeničném a žitném extrudátu a zvýšení vodou extrahovatelných β -glukanů (BG) u extrudátů z ječmene, pšenice i žita. V této studii uvádí, že během extruze nedošlo k výrazným změnám ve struktuře

ani obsahu AX a BG. Zvýšenou extrahovatelnost BG po extruzi a pražení potvrdila rovněž skupina autorů Gujral *et al.* (2011) a Sharma a Gujral (2013).

V rámci práce (**Příloha 9: Honců *et al.*, 2016**) bylo ověřeno, že se během extruze za daných podmínek zvýšil obsah ve vodě rozpustných β -glukanů u mlýnských produktů z ječmene. Během extruze došlo k výrazným změnám, jak v obsahu, tak ve struktuře vlákniny. Po extruzi byl v mouce ječmenů se standardním složením škrobu (AF Lucius, AF Cesar) naměřen a statisticky prokázán významně vyšší obsah β -glukanů (5,13 %) a SDF (6,81 %) v odrůdě AF Lucius, a 6,33 % β -glukanů a 8,17 % SDF v odrůdě AF Cesar. Obsah arabinoxylanů se po extruzi mírně zvýšil, ale významně se lišil pouze u linií KM 2460-1 a AF Cesar. Po extruzi byl zjištěn významný pokles v obsahu celkové vlákniny u odrůdy AF Cesar a nerozpustné vlákniny v liniích KM 2624 a KM 2460-1.

1.8.8 Procesy provázející chladnutí pečiva

Během chladnutí pečiva se zpomaluje odpar vody a částečně vzniklý škrobový maz, který tvoří značnou část střídy, postupně želíruje. Vzniká pružný gel, který ve své struktuře zadržuje molekuly vody (Příhoda *et al.*, 2003). Podobný proces – ustavení rovnováhy mezi volnou a vázanou vodou probíhá i v ostatních biopolymerních strukturách. Zároveň se začínají rozvíjet první procesy, které doprovázejí stárnutí pečiva. Mají-li být omezeny na minimum, nesmí být chladnoucí chléb/pečivo vystaven(o) kolísání okolní teploty. Průběh chlazení musí být velmi stabilní.

Teplota skladování pečiva významně ovlivňuje proces retrogradace amylopektinu. Při nižší teplotě skladování probíhá rekrystalizace škrobu v pečivu rychleji, a tím se urychluje i proces stárnutí pečiva. Při teplotě 4°C probíhá proces retrogradace škrobu (zejména frakce amylopektinu) nejrychleji.

1.8.9 Podstata stárnutí pekařských výrobků

Stárnutí pekařských výrobků je komplexní proces, který probíhá po upečení během jejich skladování (Gray a BeMiller, 2003; Bechtel *et al.*, 1953). Stárnutím se rozumí souhrn fyzikálních, chemických a senzorických změn, které negativně ovlivňují jakost pekařského výrobku. Obecně se stárnutí definuje jako pokles spotřebitelské přijatelnosti pekárenských výrobků způsobený změnami ve střídě, přičemž nejde o změny mikrobiálního původu. Jedná se o postupné zhoršení texturních a organoleptických vlastností pečiva. Během stárnutí se střída pekařského výrobku stává tužší a kůrka měkkou až kožovitou. Termín stárnutí se vztahuje zejména ke změnám ve střídě pekařského výrobku. Ačkoliv je proces stárnutí zkoumán od konce 19. století, jeho mechanismus nebyl doposud zcela přesně vysvětlen. Stárnutí pečiva nebude nikdy možné zcela eliminovat, ale je reálné ho výrazně zpomalit.

Proces stárnutí je zodpovědný za významné ekonomické ztráty jak v oblasti pekárenské, tak v oblasti spotřebitelské.

Změknutí kůrky je důsledkem migrace vody ze střídy do kůrky, dané vyšší aktivitou vody ve střídě vzhledem ke kůrce. Proces retrogradace škrobu, při kterém je voda vytlačována ze struktury gelu, její aktivitu ve střídě zvyšuje. Houstnutí trojrozměrné sítě škrobového gelu a jeho částečná rekrytalizace je příčinou tuhnutí střídy.

Ke stárnutí pekařského výrobku dochází již krátce po jeho upečení. Rychlost, s jakou ztrácí výrobek své původní vlastnosti, závisí na podmínkách skladování, teplotě a relativní vlhkosti a způsobu balení pekařského výrobku. Jak již bylo uvedeno výše, retrogradace a tudíž stárnutí probíhají nejrychleji při teplotách těsně nad 0°C.

Proces stárnutí je možné studovat řadou metod (Ribotta *et al.*, 2004; Karim *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 1991). Ke sledování retrogradace amylopektinu je možné využít diferenciální skenovací kalorimetrii nebo rentgenovou strukturní analýzu, popřípadě mikroskopické techniky. Změny ve struktuře a vlastnostech střídy jsou obvykle posuzovány na základě různých kompresních měření, například na texturometru, penetrometru a řadě dalších.

Přídavek vlákniny do receptury pečiva je jednou z možností, jak zpomalit proces stárnutí pečiva (Mandová, 2016). V rámci jednoho z řady experimentů bylo potvrzeno, že 15% přídavek celozrnné ovesné mouky do receptury pšeničného chleba významně zpomalil proces stárnutí pečiva. Pro pozorování průběhu stárnutí střídy pečiva byla využita penetrometrie a skenovací elektronová mikroskopie.

Ve spolupráci se společností MILLBA-CZECH a.s. byla provedena praktická studie, která se týkala použití nových zlepšujících přípravků k prodloužení trvanlivosti a zpomalení stárnutí vybraných pekařských výrobků (běžné a jemné pečivo) (**Příloha 6: Sluková *et al.*, 2015; Sluková *et al.*, 2014; Sluková *et al.*, 2013**). Ke sledování a vyhodnocení změn probíhajících během stárnutí pečiva byla využita senzorická analýza, viskozimetrické a penetrometrické měření tuhosti střídy pečiva v čase, rentgenová difrakční analýza a skenovací elektronová mikroskopie. Skenovací elektronová mikroskopie a rentgenová difrakční analýza potvrdily změny v krystalinitě amylopektinu během stárnutí pečiva. Rentgenová difrakční analýza byla schopna postihnout i změny v receptuře pečiva, kontrolní pečivo bez přídavku zlepšujících přípravků vykazovalo rychlejší stárnutí v porovnání s pečivem s přídavkem zlepšujícího přípravku.

1.8.10 Vývoj a hodnocení bezlepkových výrobků

Další významnou oblastí, které je třeba se věnovat, je vývoj atraktivních bezlepkových potravin (Alvarez-Jubete *et al.*, 2010; Arendt a Dal Bello, 2008). Celiakie je chronické autoimunitní onemocnění sliznice tenkého střeva vyvolané požíváním lepku, konkrétně části obsahující

zásobní protein gliadin (Gabrovská *et al.*, 2015). V současnosti je jediná známá léčba správné dodržování bezlepkové diety. Na trhu proto vznikla celá řada bezlepkových výrobků, přesto sortiment není dostačující, celiaci se často musí rozhodovat mezi kvalitou a vysokou cenou nebo mezi nižší cenou, ale i nízkou kvalitou.

Bezlepkové výrobky jsou potřebné pro osoby s celiakií a také pro osoby s alergií na obiloviny obsahující lepek či pro osoby citlivé na obiloviny obsahující lepek. Většina receptur bezlepkových chlebů má jako základ rýžovou a kukuřičnou mouku v kombinaci s kukuřičným, bramborovým a tapiakovým škrobem, jelikož se jedná o dostupné, levné suroviny bez výrazné chutě či vůně. Receptury bezlepkových chlebů se dále doplňují proteiny a hydrokoloidy z důvodu přijatelnější struktury a prodloužení trvanlivosti výrobků.

Na rozdíl od pšeničných výrobků, nejsou bezlepkové mouky a škroby obohacovány a fortifikovány, a proto konzumace bezlepkových výrobků může vést k deficienci řady mikronutrientů, ale i proteinů a vlákniny. Výzkum a vývoj se proto zaměřuje na zvýšení nutriční hodnoty bezlepkových pekařských výrobků spolu se zvýšením senzorické a technologické kvality těchto výrobků.

Mezi tradiční suroviny používané k výrobě bezlepkového chleba patří rýžová, kukuřičná a pohanková mouka, sójová mouka, pšeničný deproteinovaný škrob, rýžový nebo kukuřičný škrob a hydrokoloidy guarová guma, tarra guma, xanthan, modifikované škroby nebo modifikované celulosy. Hydrokoloidy slouží v receptuře bezlepkového pečiva jako náhrada lepku, mají vliv na vaznost a zvyšují viskozita těsta. Experimentuje se taky s přísadami méně obvyklých surovin jako je tapikový škrob, mouky z quinoi, amarantu, konopí, kaštanu, teffu apod.

Ze čtyř druhů zkoumaných komerčních preparátů vlákniny (vláknina bramborová, Iněná, psyllium a inulin) byl na základě výsledků senzorické analýzy a pekařské kvality bezlepkového chleba zvolen optimální druh a přísadka této vlákniny (2 % bramborové vlákniny vztaženo na množství použitých mouk) (Levková, 2016). Bylo ověřeno, že preparát bramborové vlákniny obsahuje 65 g celkové vlákniny ve 100 g preparátu. Dobře hodnoceny byly také chleby s přísadkou inulinu. Nevýhodou použití inulinu byla písčité pocity při žvýkání.

Očekávalo se, že 2% přísadka bramborové vlákniny do receptury bezlepkového chleba sníží hladinu glykemie v krvi. Výsledky *in vivo* testování hladiny glykemie po konzumaci bezlepkového chleba bez přísadky vlákniny a s přísadkou vlákniny byly u testovaných osob rozdílné. Hodnocení se účastnilo 6 žen a 2 muži, zdraví jedinci, ve věku 18-45 let. U více než poloviny osob došlo po konzumaci bezlepkového chleba s přísadkou vlákniny ke zvýšení glykemie v porovnání s odezvou na konzumaci bezlepkového chleba bez vlákniny. U ostatních osob se glykemie snížila. Předpokládalo se, že požadovaný přísadka a typ vlákniny mohl mít vliv na snížení hladiny glukosy v krvi dobrovolníků. Bylo sice potvrzeno, že testované bezlepkové chleby patří k potravinám s nižším GI (hodnoty glykemie se u obou chlebů pohybovaly okolo 7 mmol/l a glykemie stoupala pozvolně). Ale očekávaný pokles glykemie po

konzumaci chleba s přídavkem vlákniny se neprojevil u všech osob. Je zde však stejná situace (počet osob, možnost opakování) jako v případě testování účinku konzumace chleba s otrubami na hladinu glukosy v krvi (viz kapitola 1.8.4.).

Vzhledem k tomu, že přídavek vlákniny představuje další náklad při výrobě bezlepkové směsi a nebyl spolehlivě prokázán vliv na snížení glykemie v krvi, nebylo doporučeno vlákninu do bezlepkové směsi přidávat. Bezlepkový chléb bez přídavku vlákniny měl sám o sobě velmi dobrý průběh glykemie, byl nejlépe sensoricky hodnocen a také jeho pekařská jakost byla nejvyšší. Z těchto důvodů bylo doporučeno pro zvýšení výživové hodnoty bezlepkového chleba prozkoumat přídavek jiného typu vlákniny nebo jiných složek (nutričně vyvážené proteiny – například syrovátkové frakce proteinů, vaječný albumin, anebo jiné bezlepkové mouky – luštěninové mouky apod.).

Další část naší práce byla zaměřena na technologický vývoj nových bezlepkových výrobků, konkrétně slaných krekrů (slaných sušenek) (Venzhöferová, 2014). U bezlepkového těsta je obecně problém s jeho tažností, těsto bývá velmi krátké. Byly testovány kombinace různých bezlepkových mouk, tuků, zahušťovadel a dalších látek, aby se vlastnosti těsta a příprava bezlepkových výrobků optimalizovala. Po prvotní analýze surovin použitých pro bezlepkovou výrobu následoval vývoj receptury a sensorické hodnocení výrobků. Optimalizace technologického procesu výroby krekrů se týkala zejména zvolení poměru recepturních složek, aby se zajistila vyhovující tažnost a zpracovatelnost (zejména nelepivost) bezlepkového těsta. Dalšími významnými procesními parametry bylo stanovení optimální doby a teploty pečení a vyhovující tloušťka vyvalovaných plátků. Cílem bylo vyrobit sensoricky atraktivní a chutné (ochucené), křupavé (ne gumovité, ne tvrdé, ne měkké) kekry. V rámci spolupráce s partnerem LYCKE BY CULINAR, a.s. se podařilo vyvinout sypkou směs (bez tuku a vody) na domácí výrobu bezlepkových krekrů s různými příchutěmi (česnek, sýr, Taco koření, kmín, pepř). Hotové výrobky vykazovaly dobré sensorické vlastnosti, trvanlivost až 6 týdnů a ceny těchto směsí (cca 52 Kč za 1 kg) byly výrazně nižší v porovnání s cenami obdobných bezlepkových směsí, které byly v dané době dostupné na českém trhu.

1.8.11 Příspěvek ke studiu oligosacharidů mimo rámec cereální chemie: Vliv teploty a skladování na oligosacharidy mateřského mléka

Oligosacharidy s prebiotickými účinky jsou součástí mateřského mléka a hrají významnou roli v posílení imunity a správném vývoji kojence (Boehm a Stahl, 2007 a další). Mateřské mléko se často skladuje (chlazení, mrazení) a následně tepelně zpracovává (ohřev) a je třeba zajistit jeho zdravotní nezávadnost a zachovat jeho výživové vlastnosti (Yu-Chuan *et al.*, 2012 a další). Práce byla zaměřena na sledování složení mateřského mléka z výživového hlediska a posouzení změn složek mléka při jeho skladování a dalším zpracování (Lukschová, 2014). Cílem práce bylo zjistit, které běžně v domácnosti používané procesy mohou ovlivňovat složení mateřského mléka. V rámci experimentu byly pomocí kapalinové chromatografie sledovány změny v obsahu sacharidů mateřského mléka za různých podmínek ohřevu. Podmínky získání a skladování mléka byly přesně dodržovány. Čerstvé mléko bylo po odebrání ihned zamrazeno (-18°C, sterilní plastové lahvičky), během týdne byly nasbírány příslušné objemy mléka a v mrazicím boxu převezeny na VŠCHT. Před vlastní analýzou byly vzorky mléka uskladněny při teplotě -40°C. V dalším týdnu byl proveden ohřev a analýzy.

Sledoval se vliv typ ohřevu a vliv teploty a doby ohřevu (mikrovlnný ohřev: doba 10 s, teplota mléka 27°C; mikrovlnný ohřev po dobu 30 s, teplota mléka 61°C a následné ochlazení; ohřev ve vodní lázni při teplotě 62,5°C) na složení mléka.

Vzorky mateřského mléka byly rozmrazeny v lednici při teplotě 5°C. První květa s mlékem byla použita jako kontrolní vzorek, u kterého nebyl proveden žádný tepelný ohřev. Všechny vzorky byly po tepelném ošetření rychle zchlazeny na teplotu 4°C a následně odstředěny (odstranění tuku). Po přidání etanolu a odstředění byly odstraněny proteiny. Po filtraci byl dávkován ředěný a neředěný filtrát na analytickou předkolonu a kolonu.

V mléku byla identifikována laktosa, *N*-acetylglukosamin, glukosa, galaktosa, stopy fukosy, trisacharid na bázi galaktosy a stopy vyšších galaktooligosacharidů. Ve spektru byly zachyceny další látky (deriváty cukrů a oligosacharidy), které však nebyly určeny z důvodu jejich velmi nízké koncentrace nebo nebyl k dispozici příslušný standard. V rámci stanovení byly optimalizovány podmínky úpravy vzorku před analýzou a metodika chromatografické analýzy, kdy byla ověřována izokratická i gradientová eluce složek. Snaha byla identifikovat vybrané sacharidy během jedné analýzy. Byla zvolena gradientová eluce ve směsi mobilní fáze hydroxidu sodného a octanu sodného s celkovou dobou analýzy 65 min.

Obsah laktosy byl ve vzorcích mléka proměnlivý, avšak žádný typ ohřevu nezpůsobil výrazné změny v obsahu laktosy. Volná glukosa i galaktosa se jevily jako stálé při všech typech ohřevu. Obsah glukosy se měnil v závislosti na délce kojení (celková doba příjmu mléka po dobu 4 měsíců plného kojení). Obsah *N*-acetylglukosaminu se zvyšoval s prodlužující se dobou kojení. Obsah trisacharidu (retenčním časem odpovídal eluci trisacharidu rafinosy, ta se však v mateřském mléku nevyskytuje), se snižoval s prodlužující se dobou kojení. Nebyl prokázán rozdíl při ohřevu ve vodní lázni a pomocí mikrovlnného záření. Na základě zkušeností při

prováděných měřeních doporučuji ohřev mléka ve vodní lázni, mléko bylo ohříváno postupně a v celém objemu. Snadno mohla být také monitorována teplota ohřívaného mléka. Na rozdíl od působení mikrovlnného ohřevu, kdy bylo mléko sice ohřáto velmi rychle, ale ohřev byl nerovnoměrný.

2 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

Poznámka: V celém textu habilitační práce je vyjádření složek uvedeno v % (v hmotnostních procentech).

FT-IR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
NMR	nukleární magnetická rezonance
PCA	analýza hlavních složek (komponent) (<i>Principal Component Analysis</i>)
BG	beta-glukany
AX	arabinoxylany
GPC	gelová chromatografie
HP-SEC	vysokoúčinná rozlišovací chromatografie
GI	glykemický index

3 CITOVANÁ LITERATURA

- Adebo O.A., Njobeh P.B., Kayitesi E. (2018): Fermentation by *Lactobacillus fermentum* strains (singly and in combination) enhances the properties of ting from two whole grain sorghum types. *Journal of Cereal Science*, **82**: 49-56.
- Agbenorhevi J.K., Kontogiorgos V., Kirby A.R., Morris V.J., et al. (2011): Rheological and microstructural investigation of oat β -glucan isolates varying in molecular weight. *International Journal of Biological Macromolecules*, **49**: 369-377.
- Ahmad A., Anjum F.M., Zahoor T., Nawaz H., et al. (2010): Extraction and characterization of β -D-glucan from oat for industrial utilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, **46**: 304-309.
- Alvarez-Jubete L., Arendt E.K., Gallagher E. (2010): Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, **21**: 106-113.
- Andersson R., Fransson G., Tietjen M., Åman P. (2009): Content and molecular-weight distribution of dietary fiber components in whole-grain rye flour and bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**: 2004-2008.
- Andersson A.A.M., Rakha A., Andersson R., Åman P. (2014): Rye Dietary Fibre. V knize: *Rye and health* (K. Poutanen K., P. Åman, eds.), str. 24-36. AACC International, Inc., USA.
- Apprich S., Tirpanalan Ö., Hell J., Reisinger M., et al. (2014): Wheat bran-based biorefinery 2: Valorization of products. *LWT - Food Science and Technology*, **56**: 222-231.
- Arendt E.K., Dal Bello F. (2008): Functional cereal products for those with gluten intolerance. V knize: *Technology of Functional Cereal Products* (B.R. Hamaker, ed.), str. 446-475. Woodhead Publishing Limited, UK.
- Asp N.G. (2004): Definitions, health claims and new challenges-Definition and analysis of dietary fibre in the context of food carbohydrates. V knize: *Dietary fibre bio-active carbohydrates for food and feed* (W.J. van der Kamp, N-G. Asp, J.M. Jones, G. Schaafsma, eds.), str. 21-26. Wageningen Academic Publishers, NL.
- Asp N-G., Schweizer T.F., Southgate T.A.D., Theander O. (1992): Dietary Fibre Analysis. V knize: *Dietary Fibre - a component of food: Nutritional function in health and disease* (T.F., Schweizer, a C.A. Edwards, eds.), str. 57-101. Springer-Verlag London Ltd., UK.
- Aura A.M. (2014): Phenolic Acids in rye. V knize *Rye and health* (K. Poutanen K., P. Åman, eds.), str. 109-110. AACC International, Inc., USA.
- Baik B.K., Ullrich S.E. (2008): Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest. *Journal of Cereal Science*, **48**: 233-242.
- Bechtel D.B., Meisner D.F., Bradley W.B. (1953): The effect of the crust on the staling of bread. *Cereal Chemistry*, **30**: 160-168.
- Boehm G., Stahl B. (2007): Oligosaccharides from milk. *The Journal of Nutrition*, **137**: 8475-8495.
- Bradová J., Štěrbová L., Smrčková P. (2015): Laboratorní hodnocení stravitelnosti sacharidů v potravinách a krmivech s možností predikce glykemického indexu. VÚRV, v.v.i., Praha.
- Brand-Miller J.C., Stockmann K., Atkinson F., Petocz P., Denyer G. (2009): Glycemic index, postprandial glycemia, and the shape of the curve in healthy subjects: analysis of a database of more than 1,000 foods. *American Journal of Clinical Nutrition*, **89**: 97-105.
- Brandt M.J. (2014): Starter cultures for cereal based foods. *Food Microbiology*, **37**: 41-43.
- Brouns F., Hemery Y., Price R., Anson N.M. (2012): Wheat aleurone: separation, composition, health aspects, and potential food use. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **52**: 553-568.

- Byung-Kee B., Ullrich S.E. (2008): Barley for food: Characteristics, improvement and renewed interest. *Journal of Cereal Science*, **48**: 233-242.
- Coimbra M.A., Delgadillo I., Waldron K.W., Selvendran R.R. (1996): Isolation and analysis of cell wall polymers from olive pulp. V knize: *Modern methods of plant analysis, Plant cell wall analysis* (H.F. Linskens a J.F. Jackson, eds.), str. 19-43. Springer-Verlag, Berlin, SRN.
- Coimbra M.A., Barros A., Barros M., Rutledge D.N., Delgadillo I. (1998): Multivariate analysis of uronic acid and neutral sugars in whole pectic samples by FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, **37**: 241-248.
- Collins H., Burton R., Topping D. (2010): Variability in fine structures of noncellulosic cell wall polysaccharides from cereal grains: potential importance in human health and nutrition. *Cereal Chemistry*, **87**: 272-282.
- Comino P., Collins H., Lahnstein J., Gidley M.J. (2016): Effects of diverse food processing conditions on the structure and solubility of wheat, barley and rye endosperm dietary fibre. *Journal of Food Engineering*, **169**: 228-237.
- Croft K.D. (2016): Dietary polyphenols: Antioxidants or not? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **595**: 120-124.
- Čopíková J. (1997): Chemie a analytika sacharidů. Skripta, str. 7, 61, 64, 66, 68, 81, 82, 84. VŠCHT Praha.
- De Angelis M., Minervini F., Siragusa S., Rizzello C.G., et al. (2019): Wholemeal wheat flours drive the microbiome and functional features of wheat sourdoughs, *International Journal of Food Microbiology*, *In Press, Corrected Proof*. (<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.009>)
- Delcour J.A., Hosney R.C. (2010): *Principles of Cereal Science and Technology*, str. 23-40, 46, 71-76, 78. AACC International, Inc., St. Paul, Minnesota, USA.
- Dieckmann K. (2011): betaBARLEY-the new beta-glucan-rich barley for baking and more. *BAKING+BISCUIT INTERNATIONAL*, **1**: 58-63.
- Englyst K.N., Englyst H.N., Hudson G.J., Cole T.J., et al. (1999): Rapidly available glucose in foods: an in vitro measurement that reflects the glycemic response. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **69**: 448-454.
- Englyst K.N., Vinoy S., Englyst H.N., Lang V. (2003): Glycaemic index of cereal products explained by their content of rapidly and slowly available glucose. *British Journal of Nutrition*, **89**: 329-340.
- Englyst K.N., Englyst H.N. (2005): Carbohydrate bioavailability. *British Journal of Nutrition*, **94**: 1-11.
- Ferreira D., Barros A., Coimbra M.A., Delgadillo I. (2001): Use of FT-IR spectroscopy to follow the effect of processing in cell wall polysaccharide extracts of a sun-dried pear. *Carbohydrate Polymers*, **45**: 175-182.
- Gabrovská D., Hálová I., Chrpová D., Ouhračková J., Sluková M., Vavreinová S., Faměra O., Kohout P., Pánek J., Skřivan P. (2015): Nutričně významné složky obilovin. V publikaci: Obiloviny v lidské výživě: Stručné shrnutí poznatků se zvýšeným zaměřením na problematiku lepku (P. Skřivan P., M. Sluková, eds.), str. 17-24. FORSAPI s.r.o.
- Gajula H., Alavi S., Adhikari K., Herald T. (2008): Precooked bran-enriched wheat flour using extrusion: Dietary fiber profile and sensory characteristics. *Journal of Food Science*, **73**: 173-179.
- Galušková S. (2016): Využití tepelně upravených pšeničných otrub k výrobě potravin s vyšší výživovou a senzorickou kvalitou. Bakalářská práce. VŠCHT Praha.
- Gobbetti M. (1998): The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends in Food Science & Technology*, **9**: 267-274.
- Gobetti M., De Angelis M., Di Cagno R., Calasso M., et al. (2019): Novel insights on the functional/nutritional features of the sourdough fermentation, *International Journal of Food Microbiology*, *In Press, Corrected Proof*. (<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.018>)

- Goff H.D., Repin N., Fabek H., El Khoury D., *et al.* (2018): Dietary fibre for glycaemia control: Towards a mechanistic understanding. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, **14**: 39-53.
- Gordon B., William C. (1994): Primary Cereal Processing (a comprehensive sourcebook), str. 269-318. VCH Publishers, Inc., SRN.
- Grün Ch. (2003): Structure and biosynthesis of fungal α -glucans. Dissertation work, pp. 55-57. Utrecht University, NL.
- Gullón B., Gullón P., Tavaría F., Pintado M., *et al.* (2014): Structural features and assessment of prebiotic activity of refined arabinoxyloligosaccharides from wheat bran. *Journal of Functional Foods*, **6**: 438-449.
- Champ M. (2008): Determining the functional properties of food components in the gastrointestinal tract. V knize: *Technology of functional cereal products* (B.R. Hamaker, ed.), str. 145-148. Woodhead Publishing Limited, UK.
- Gray J.A., BeMiller J.N. (2003): Bread staling: Molecular basis and control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2**: 1-21.
- Gujral H.S., Sharma P., Rachna S. (2011): Effect of sand roasting on beta-glucan extractability, physicochemical and antioxidant properties of oats. *LWT - Food Science and Technology*, **44**: 2223-2230.
- Hell J., Donaldson L., Michlmayr H., Kraler M., *et al.* (2015): Effect of pretreatment on arabinoxylan distribution in wheat bran. *Carbohydrate Polymers*, **121**: 18-26.
- Hoefler A. (2004): Hydrocolloids: Practical Guides for the Food Industry, str. 7-9, 14-24. Eagan Press, USA.
- Holtekjølen A.K., Uhlen A.K., Bråthen E., Sahlstrøm S., *et al.* (2006): Content of starch and non-starch polysaccharides in barley varieties of different origin. *Food Chemistry*, **94**: 348-358.
- Horáčková Š., Sedláčková P., Sluková M., Plocková M. (2014): The influence of whey, whey component and malt on the growth and acids production of lactobacilli in milk. *Czech Journal of Food Sciences*, **32**: 526-531.
- Horáčková Š., Nováková T., Sluková M., Bialasová K., *et al.* (2018): Antifungal activity of selected lactobacilli intended for sourdough production. *Applied Food Biotechnology*, **5**: 213-220.
- Inglett G.E., Chen D., Berhow M., Lee S. (2011): Antioxidant activity of commercial buckwheat flours and their free and bound phenolic compositions. *Food Chemistry*, **125**: 923-929.
- Izydorczyk S.M., Dexter E.J. (2008): Barley β -glucans and arabinoxylans: Molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products – a Review. *Food Research International*, **41**: 850-868.
- Kamal-Eldin A., Åman P. (2008): Rye bread and other rye products. V knize: *Technology of functional cereal products* (B.R. Hamaker, ed.), str. 242-245. Woodhead Publishing Limited, UK.
- Karim A.A., Norziah M.H., Seow C.C. (2000): Methods for study of starch retrogradation. *Food Chemistry*, **71**: 9-36.
- Katina K., Arendt E., Liukkonen K.H., Autio K., *et al.* (2005): Potential of sourdough for healthier cereal products. *Trends in Food Science & Technology*, **16**: 104-112.
- Khan A.A., Gani A., Khanday F.A., Masoodi F.A. (2018): Biological and pharmaceutical activities of mushroom β -glucan discussed as a potential functional food ingredient. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, **16**: 1-13.
- Kumar V., Sinha A.K., Makkar H.P., Becker K. (2010): Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chemistry*, **120**: 945-959.
- Kurita K. (1998): Chemistry and application of chitin and chitosan. *Polymer Degradation and Stability*, **59**: 117-120.

- Lam K.L., Cheung P.Ch.K. (2013): Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* **2**: 45-64.
- Lamsal P.B. (2012): Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **92**: 2020-2028.
- Levková J. (2016): Vliv surovin na kvalitu bezlepkových pekařských výrobků a jejich výživové a zdravotní posouzení. Diplomová práce. VŠCHT Praha.
- Lukschová K. (2014): Vliv teploty a skladování na výživovou hodnotu mateřského mléka. Bakalářská práce. VŠCHT Praha.
- Mandová A. (2016): Využití fyzikálně-chemických metod ke sledování stárnutí pekařských výrobků. Bakalářská práce. VŠCHT Praha.
- Mariotti M., Garofalo C., Aquilanti L., Osimani A., et al. (2014): Barley flour exploitation in sourdough bread-making: A technological, nutritional and sensory evaluation. *LWT - Food Science and Technology*, **59**: 973-980.
- Mázárová K. (2016): Metody stanovení rozpustné a nerozpustné vlákniny ve vybraných potravinách. Bakalářská práce. VŠCHT Praha.
- McCleary B.V. (2007): An integrated procedure for the measurement of total dietary fibre (including resistant starch), non-digestible oligosaccharides and available carbohydrates. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **389**: 291-308.
- McCleary B.V., DeVries J.W., Rader J.I., Cohen G., et al. (2011): Collaborative Study Report: Determination of Insoluble, Soluble, and Total Dietary Fiber (Codes Definition) by an Enzymatic-Gravimetric Method and Liquid Chromatography. *Journal of AOAC International*, **95**: 824-844.
- McRorie J.W., Jr., McKeown N.M. (2017): Understanding the Physics of Functional Fibers in the Gastrointestinal Tract: An Evidence-Based Approach to Resolving Enduring Misconceptions about Insoluble and Soluble Fiber. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, **117**: 251-264.
- Meyer D. (2007): Inulin for product development of low GI products to support weight management. V knize: *Dietary fibre components and functions* (H. Salovaara, F. Gates, M. Tenkanen, eds.), str. 257-269. Wageningen Academic Publishers, NL.
- Mikkelsen M.S., Jespersen B.M., Møller B.L., Lærke H.N., et al. (2010): Comparative spectroscopic and rheological studies on crude and purified soluble barley and oat β -glucan preparations. *Food Research International*, **4**: 2417-2424.
- Mikkelsen M.S., Meier S., Jensen M.G., Qin F., et al. (2017): Barley genotypic β -glucan variation combined with enzymatic modifications direct its potential as a natural ingredient in a high fiber extract. *Journal of Cereal Science*, **75**: 45.
- Moroni A.V., Arendt E.K., Morrissey J.P., et al. (2010): Development of buckwheat and teff sourdoughs with the use of commercial starters. *International Journal of Food Microbiology*, **142**: 142-148.
- Nařízení komise (EU) č. 432/2012 ze dne 16. května 2012, kterým se zřizuje seznam schválených zdravotních tvrzení při označování potravin jiných než tvrzení o snížení rizika onemocnění a o vývoji a zdraví dětí (v konsolidovaném znění platném od 17.1.2014).
- Novák M. (2007): β -glukany, historie a současnost. *Chemické listy*, **101**: 872-880.
- Ogunsakin O.A., Banwo K., Ogunremi O.R., et al. (2015): Microbiological and physicochemical properties of sourdough bread from sorghum flour. *International Food Research Journal*, **22**: 2610-2618.
- Olafsdottir E.S., Ingólfssdottir K. (2001): Polysaccharides from lichens: structural characteristics and biological activity. *Planta Medica*, **67**: 199-208.

- Ooi S.L., Correa D., Pak S.Ch. (2019): Probiotics, prebiotics, and low FODMAP diet for irritable bowel syndrome – What is the current evidence? *Complementary Therapies in Medicine*, **43**: 73-80.
- Pančíková B. (2014): Studium podmínek klíčení ječmene pro získání nutričně a technologicky významných látek. Diplomová práce. VŠCHT Praha.
- Pánek J., Pokorný J., Dostálová J., Kohout P. (2002): Základy výživy. Svoboda servis, Praha.
- Papageorgiou M., Lakhdara N., Lazaridou A., Biliaderis C.G., et al. (2005): Water extractable (1→3, 1→4)-β-D-glucans from barley and oats: An intervarietal study on their structure features and rheological behaviour. *Journal of Cereal Science*, **42**: 213-224.
- Ponce N.M.A. et al. (2003): Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*. *Carbohydrate Research*, **338**: 153-165.
- Pourová V. (2018): Posouzení zdravotního účinku pekařských výrobků s přidavkem vlákniny. Diplomová práce. VŠCHT Praha.
- Poutanen K., Flander L., Katina K. (2009): Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiology*, **26**: 693-699.
- Prückler M., Siebenhandl-Ehn S., Apprich S., Höltinger S., et al. (2014): Wheat bran-based biorefinery 1: Composition of wheat bran and strategies of functionalization. *LWT - Food Science and Technology*, **56**: 211-221.
- Příhoda J. (2012): Cereální technologie. V knize: P. Kadlec, K. Melzoch, M. Voldřich (eds.) a kol.: Přehled tradičních potravinářských výrob, str. 476, 478, 480. KEY Publishing, Ostrava.
- Příhoda J., Humpolíková P., Novotná D. (2003): Základy pekárenské technologie, str. 217-219, 231-243, 311-324. Vydavatelství Pekař cukrář, Praha.
- Rakha A., Åman P., Andersson R. (2010): Characterization of barley dietary fibre components in rye products. *Food Chemistry*, **119**: 859-867.
- Regnerová J. (2006): Stanovení rozpustné a nerozpustné vlákniny v nových odrůdách lupiny. Diplomová práce. VŠCHT Praha.
- Ribotta P.D., Cuffini S., León A.E., Anón M.C. (2004): The staling of bread: an X-ray diffraction study. *European Food Research and Technology*, **218**: 219-223.
- Rózylo R., Rudy S., Krzykowski A., Dziki D. (2015): Novel Application of Freeze-Dried Amaranth Sourdough in Gluten-Free Bread Production. *Journal of Food Process and Engineering*, **38**: 135-143.
- Rudolfová J., Čurda L. (2005): Prebiotický účinek galaktooligosacharidů a využití laktosy pro jejich produkci. *Chemické Listy*, **99**: 168-174.
- Sadílková M. (2018): Analýza produktů fermentace v modelových žitných a pohankových kvasech. Bakalářská práce. VŠCHT Praha.
- Salovaara H., Sontag-Strohm T., Antilla H. (2007): Physical state of soluble oat fibre and health claims. V knize: *Dietary fibre-components and functions* (H. Salovaara, F. Gates, M. Tenkanen, eds.), str. 91-112. Wageningen Academic Publishers, NL.
- Saura-Calixto F. (2011): Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: an essential physiological function. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **59**: 43-49.
- Sekwati-Monang B., Gänzle M.G. (2011): Microbiological and chemical characterisation of ting, a sorghum-based sourdough product from Botswana. *International Journal of Food Microbiology*, **150**: 115-121.
- Sekwati-Monang B., Valcheva R., Gänzle M.G. (2012): Microbial ecology of sorghum sourdoughs: Effect of substrate supply and phenolic compounds on composition of fermentation microbiota. *International Journal of Food Microbiology*, **159**: 240-246.

- Siebenhandl S., Grausgruber H., Pellegrini N., Del Rio D., et al. (2007): Phytochemical profile of main antioxidants in different fractions of purple and blue wheat, and black barley. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **55**: 8541-8547.
- Siepmann F.B., Ripari V., Waszczynskyj N., Spier M.R. (2018): Overview of Sourdough Technology: from Production to Marketing. *Food and Bioprocess Technology*, **11**: 242-270.
- Singh A., Sharma S. (2017). Bioactive components and functional properties of biologically activated cereal grains: A bibliographic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **57**: 3051-3071.
- Sharma P., Gujral H.S. (2013): Extrusion of Hulled Barley Affecting β -Glucan and Properties of Extrudates. *Food and Bioprocess Technology*, **6**: 1374-1389.
- Sluková M., Honců I., Krejčířová L., Příhoda J. (2012): Produkce nutričně a technologicky významných pasáží z bezpluchého a pluchatého ječmene. *Mlynářská ročenka 2012*, str. 96-111.
- Sluková M., Smrž F. (2012): Poloprovozní zařízení na výrobu fermentovaných obilných produktů. Poloprovoz. Realizace: Zeelandia spol. s r.o., Malšice, ČR.
- Sluková M., Smrž F., Švehlová D. (2013): Ječmen, tak jak ho (možná) neznáte - inovace a netradiční využití ječmene v potravinářství. *Potravinářská revue*, **6**: 26-29.
- Sluková M., Kubín M., Příhoda J. (2013): Vliv zlepšujících přípravků na stárnutí pekařských výrobků. *Ročenka pekaře a cukráře 2013*: 46-52.
- Sluková M., Honců I., Příhoda J., Horáčková Š., et al. (2014): Barley sourdough and fermented whey – development and application in food industry. Biotech 2014, příspěvek P092. Praha, ČR, 11.-13.6. 2014.
- Sluková M., Smrž F. (2014a): Testování nově navržené technologie na výrobu fermentací upravených ječných polotovarů. Ověřená technologie. Realizace: Zeelandia spol. s r.o., Malšice, ČR.
- Sluková M., Smrž F. (2014b): Ověření technologického postupu výroby nových ječných produktů s přídavkem ovoce a zeleniny. Poloprovoz. Realizace: Zeelandia spol. s r.o., Malšice, ČR.
- Sluková M., Kubín M., Michalcová A., Maixner J. (2014): Sledování stárnutí pečiva pomocí skenovací elektronové mikroskopie a rentgenové difrakční analýzy. *Strojírenská technologie XIX* (3, 4): 240-244.
- Sluková M., Kubín M., Horáčková Š., Příhoda J. (2015): Application of amylographic method for determination of staling of bakery products. *Czech Journal of Food Sciences*, **33**: 507-512.
- Sluková M. a kolektiv (2016): Výroba potravin a nutriční hodnota. Skripta, str. 105-108, 113. VŠCHT Praha.
- Sluková M., Skřivan P., Hrušková M. (2017). CEREÁLNÍ CHEMIE A TECHNOLOGIE Zpracování obilovin - mlýnská a těstářenská výroba. Skripta, str. 122-124, 130-135. VŠCHT Praha.
- Sozer N., Poutanen K. (2013): Fibre in extruded products. V knize: *Fibre-Rich and Wholegrain Foods: Improving Quality*. (J.A. Delcour, K. Poutanen, eds.), str. 256-272. Woodhead Publishing Limited, UK.
- Stevenson L., Phillips F., O'Sullivan K., Walton J. (2012): Wheat bran: its composition and benefits to health, a European perspective. *International Journal of Food Science and Nutrition*, **63**: 1001-1013.
- Stone B., Morell M.K. (2009): Carbohydrates. V knize: *WHEAT Chemistry and Technology* (K. Khan a P.R. Shewry, eds.), str. 299-362. AACC International, Inc., USA.
- Sugawara T., Takahashi S., Osumi M., Ohno N. (2004): Refinement of the structures of cell-wall glucans of *Schizosaccharomyces pombe* by chemical modification and NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, **339**: 2255-2265.
- Synytsya A., Novák M. (2013): Structural diversity of fungal glucans. *Carbohydrate Polymers*, **92**: 792-809.

- Temelli F. (1997): Extraction and functional properties of barley β -glucan as affected by temperature and pH. *Journal of Food Science*, **62**: 1194-1201.
- Tieking M., Gänzle M.G. (2005): Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli. *Trends in Food Science & Technology*, **16**: 79-84.
- Tobolová B. (2018): Porovnání chemického a mikrobiologického složení různých cereálních kvasů. Diplomová práce. VŠCHT Praha.
- Traffard K., Fincher G.B. (2014): Barley Grain Carbohydrates: Starch and Cell Walls. V knize: *BARLEY Chemistry and Technology* (P.R. Shewry a S.E. Ullrich, eds.), str. 80-87. AACC International, Inc., USA.
- Turek B., Ježková D., Procházková R. (2003): Glykemický index. SZU Praha. (<http://www.szu.cz/publikace/letaky-v-pdf?lang=1>)
- Ua-Arak T., Jakob F., Vogel R.F. (2016): Characterization of growth and exopolysaccharide production of selected acetic acid bacteria in buckwheat sourdoughs. *International Journal of Food Microbiology*, **239**: 103-112.
- Urešová A. (2018): Vliv modelového pšeničného kvasu na strukturu střídy a údržnost pokusného pečiva. Bakalářská práce. VŠCHT Praha.
- Vaculová K. (2014): Bezpluchý ječmen a perspektivy jeho využití v potravinářství. Publikace České technologické platformy pro potraviny, 2015 Renesance ječmene, str. 8-15. Potravinářská komora České republiky.
- Vaculová K. (2012): Odrůdy ječmene pro přímé potravinářské využití. Publikace České technologické platformy pro potraviny, 2012 Renesance ječmene, str. 7-9. Potravinářská komora České republiky.
- Vasantan T., Gaosong J., Yeung J., Li J. (2002): Dietary fiber profile of barley flour as affected by extrusion cooking. *Food Chemistry*, **77**: 35-40.
- Velebná N. (2011): Frakcionace obilných bílkovin. Diplomová práce. VŠCHT Praha.
- Velíšek J., Hajšlová J. (1999): Chemie potravin I., str. 163, 170, 172, 188, 189, 192, 196-200, 217, 218, 242, 243, 245, 246, 251, 252. Osis, Tábor.
- Venema K., de Graaf A.A., Deutz N.E.P. (2007): Metabolic conversions of dietary fibre carbohydrates by gut microbes. V knize: *Dietary fibre components and functions* (H. Salovaara, F. Gates a M. Tenkanen, eds.), str. 145-150. Wageningen Academic Publishers, NL.
- Venn B.J., Green T.J. (2007): Glycemic index and glycemic load: measurement issues and their effect on diet-disease relationships. *European Journal of Clinical Nutrition*, **61**: 122-131.
- Venzhöferová M. (2014): Vývoj nových bezlepkových potravin. Bakalářská práce. VŠCHT Praha.
- Vogelmann S.A., Seitter M., Singer U., Brandt M.J., et al. (2009): Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters. *International Journal of Food Microbiology* **130**: 205-212.
- Whistler R.L., BeMiller J.N. (1997): Carbohydrate Chemistry for Food Scientists, str. 43-46, 72-74, 117, 142-143, 153-154, 179-182, 187-190, 203-206, 211-215. AACC International, Inc., USA.
- Wiege B., Sluková M., Hollmann J., Radosta S., et al. (2014): Semitechnical methods for the isolation of arabinoxylans from wheat bran. 21th International Congress of Chemical and Process Engineering, příspěvek P1.14. Praha, ČR, 23.-27.8. 2014.
- Wiege I. (2017): Změny obsahu a kvality vlákniny potravy u obilovin během zpracování. Disertační práce. VŠCHT Praha.
- Wilson R.H., Goodfellow B.J., Belton P.S., Osborne B.G., et al. (1991): Comparison of Fourier transform mid infrared spectroscopy and near infrared reflectance spectroscopy with differential scanning calorimetry for study of the staling bread. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **54**: 471- 483.

- Yu-Chuan Ch., Chao-Huei Ch., Ming-Chih L. (2012): The macronutrients in human milk change after storage in various containers. *Pediatrics and Neonatology*, **53**: 205-209.
- Zannini E., Garofalo C., Aquilanti L., et al. (2009): Microbiological and technological characterization of sourdoughs destined for bread-making with barley flour. *Food Microbiology*, 26: 744-753.
- Zannini E., Arendt E.K. (2018): Low FODMAPs and gluten-free foods for irritable bowel syndrome treatment: Lights and shadows. *Food Research International*, **110**: 33-41.
- Zhu F., Du B., Bian Z., Xu B. (2015): Beta-glucans from edible and medicinal mushrooms: Characteristics, physicochemical and biological activities, *Journal of Food Composition and Analysis*, **41**: 165-173.

4 PŘÍLOHY

V této kapitole jsou uvedeny vybrané autorské nebo spoluautorské vědecké práce přímo související s tematikou „Polysacharidy obilovin ve výživě a technologii“, které byly publikované v mezinárodních a národních časopisech s recenzním řízením. Práce jsou seřazeny chronologicky:

1. Čopíková J., Černá M., Novotná M., Kaasová J., Synytsya A. (2001): Application of FT-IR spectroscopy in detection of food hydrocolloids in confectionery jellies and food supplements. *Czech Journal of Food Sciences*, **19**: 51-56.
2. Černá M., Barros A. S., Nunes A., Rocha S. M., Delgadillo I., Čopíková J., Coimbra M. A. (2003): Use of FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of polysaccharide food additives, *Carbohydrate Polymers*, **51**: 383-389.
3. Synytsya A., Míčková K., Jablonský I., Sluková M., Čopíková J. (2008): Mushrooms of genus *Pleurotus* as a source of dietary fibres and glucans for food supplements. *Czech Journal of Food Sciences*, **26**: 441-446.
4. Velebna N., Slukova M., Honcu I., Prihoda J. (2012): The choice of nutritionally lucrative flour streams from barley milling flow. *Procedia Engineering*, **42**: 2035-2043.
5. Slukova M., Velebna N., Krejcirova L., Honcu I., Budilova E. (2012): The advanced approaches to nutritional and breadmaking quality of wheat, barley and rye flour. *Journal of Food Science and Engineering*, **2**: 218-226.
6. Sluková M., Kubín M., Horáčková Š., Příhoda J. (2015): Application of amylographic method for determination of staling of bakery products. *Czech Journal of Food Sciences*, **33**: 507-512.
7. Wiege I., Sluková M., Vaculová K., Pančíková B., Wiege B. (2016): Characterization of milling fractions from new sources of barley for use in food industry. *Starch/Stärke*, **68**: 321-328.
8. Sluková M., Hinková A., Henke S., Smrž F., Lukačíková M., Pour V., Bubník Z. (2016): Cheese whey treated by membrane separation as a valuable ingredient for barley sourdough preparation. *Journal of Food Engineering*, **172**: 38-47.
9. Honců I., Sluková M., Vaculová K., Sedláčková I., Wiege B., Fehling E. (2016): The effects of extrusion on the content and properties of dietary fibre components in various barley cultivars. *Journal of Cereal Science*, **68**: 132-139.
10. Kumbarova L., Bleha R., Slukova M., Vaculova K., Skřivan P. (2018): Extraction and characterization of β -glucans from new Czech barley varieties. Proceeding of the 14th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience 2018, str. 248-251. ISBN 978-80-86238-80-7. ISSN 2336-6796. Praha, ČR, 7.-9.11. 2018.
11. Wiege I., Sluková M., Vaculová K., Skřivan P. (2018): Není beta-glukan jako beta-glukan *Výživa a potraviny*, **1**: 22-26.

Application of FT-IR Spectroscopy in Detection of Food Hydrocolloids in Confectionery Jellies and Food Supplements

JANA ČOPÍKOVÁ¹, ANDRIY SYNYTSYA¹, MARCELA ČERNÁ¹, JITKA KAASOVÁ¹
and MIROSLAVA NOVOTNÁ²

*Institute of Chemical Technology – ¹Department of Carbohydrate Chemistry and Technology
and ²Central Laboratory, Prague, Czech Republic*

Abstract

ČOPÍKOVÁ J., SYNYTSYA A., ČERNÁ M., KAASOVÁ J., NOVOTNÁ M. (2001): **Application of FT-IR spectroscopy in detection of food hydrocolloids in confectionery jellies and food supplements.** Czech J. Food Sci., **19**: 51–56.

FT-IR spectra of isolated high molecule fractions were measured and used for identification of food hydrocolloids in confectionery jellies and food supplements. The simple comparison of spectra of standards and samples proved that this technique is useful for the monitoring of food hydrocolloids in particular food products.

Keywords: FT-IR spectroscopy; polysaccharides; jelly; food supplements

The polysaccharides are widely used in food processing technologies as gelling agents, thickeners or replacers of fat and saccharose. Food product surveillance requires simple and rapid methods to identify all food components. This analytical problem is very significant in the case of polysaccharides, which frequently react as fat mimetics or have bulking properties. In the present study infrared spectroscopy was applied in the analysis of food supplements and various kinds of confectionery jellies, with the aim to recognize the type of polysaccharides or gelling agents.

At present FT-IR spectroscopy is very often applied in the analysis of plant cell wall polysaccharides. The different techniques of FT-IR spectroscopy allow the identification of particular polysaccharides present in the intricate network of the cell wall (CHIOVITTI 1997; COIMBRA *et al.* 1998, 1999; KAČURÁKOVÁ *et al.* 2000), or the monitoring of developmental and compositional changes in the cell wall (DOWREY & MARCOTT 1999). The effects of technological processing of fruit can also be observed by FT-IR spectroscopy (FEMENIA *et al.* 1998). The results published in a thesis (SYNYTSYA 2000) prove that FT-IR and FT Raman spectroscopic methods are useful in the structural characterization of natural and

modified pectins as well as other plant cell wall polysaccharides. The content of feruloyl groups, the degree of methylation and amidation are estimated by these spectroscopic methods (SYNYTSYA 2000, SINITSYA *et al.* 2000).

The objective of the present study is to determine the type of polysaccharide in confectionery jelly or food supplements according to its FT-IR spectra.

MATERIAL AND METHODS

List of samples

- No 1: high molecule fraction of starch confectionery jelly
- No 2: high molecule fraction of pectin fruit jelly
- No 3: high molecule fraction of gelatine-pectin fruit jelly
- No 4: food supplement, mixture of carragenan and saccharose, suitable for stabilisation of cocoa milk UHT drinks
- No 5: food supplement, guar gum, suitable for sausages
- No 6: food supplement, mixture of guar gum, carragenan and saccharose, suitable for stabilization of neutral cocoa UHT drinks

Instruments

Samples Nos. 1–3: Infrared spectra were measured using the FT-IR spectrometer Nicolet 740 (Nicolet Instruments Co., USA) with DTGS detector, beam splitter: KBr and OMNIC 3.1 software. Number of scans 256 at resolution 4 cm^{-1} was averaged. The spectra were recorded within the $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ range and the analytical spectral range was $2010\text{--}910\text{ cm}^{-1}$. Standards of polysaccharides were measured by the method of KBr pellets and samples were measured as films on an ATR accessory, ZnSe, 45. Apodization: Happ-Genzel.

Samples Nos. 4–6: The FT-IR spectra of standard polysaccharides and samples were obtained using the Perkin-Elmer 2000 spectrometer equipped with the microscope AutoIMAGE with a MCT detector and software Spectrum for Windows 1.5. Number of scans 16 at resolution 4 cm^{-1} was averaged. The spectra were recorded within the $4000\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ range and the analytical spectral range was $2010\text{--}910\text{ cm}^{-1}$ in the transmittance mode at attenuance 2. The samples as films were measured on a BaF₂ window.

Preparation of samples Nos. 1–3: Samples (2 g) of confectionery jelly were dissolved in 100 ml of distilled water and the high molecule fraction was precipitated with threefold volume of absolute ethanol at 5°C for 24 hrs. The precipitate was removed by centrifugation at 6000 RPM and washed with the mixture of ethanol and water (70:30 % v/v) up to negative reaction for carbohydrates. The amount of 0.2 g of precipitate was dissolved in 50 ml of distilled water and about 1.5 ml of solution was placed on an aluminium plate and water was evaporated at ambient temperature until a smooth film was obtained.

Preparation of samples Nos. 4–6 and hydrocolloid standards: The polysaccharide standards and food supplements were dissolved in distilled water and 1 ml was pipetted into a cuvette equipped with an X-ray film Mylar (800-4-Chemplex, Chemplex Industries Inc., USA). The cuvettes were placed into an oven at 40°C for 12 hours. The film was removed from the Mylar foil, transferred on a BaF₂ glass and recorded by the microscope of the FT-IR spectrometer.

RESULTS AND DISCUSSION

The study of hydrocolloids usually focuses on chemical composition, linkage between the monosaccharide units, and the size and shape of the molecule. A complete analysis of hydrocolloids or polysaccharides is unsuitable for their rapid identification in food or raw materials because the whole procedure is rather costly and time consuming. It seems to us that there are two possibilities how to solve the problem. One of them is the identification of saccharides or amino acids in a mixture resulting from the hydrolytic breakdown of a hydrocolloid by chromatography. The other alternative is the application of spectroscopic techniques, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy (SYNYTSYA 2000).

In order to identify a specific gelling agent in confectionery jelly we used the infrared data of model compounds compared with the FT-IR spectra of the macromolecular part of the sample. The spectra of substances with high molecular mass isolated from confectionery jelly show general similarity to standards (Figs. 1–3). The samples No. 1 and No. 2 contained starch and pectin as a major macromolecular component, respectively. The IR band at $1152\text{--}1149\text{ cm}^{-1}$ is dominated by stretching of the glycosidic

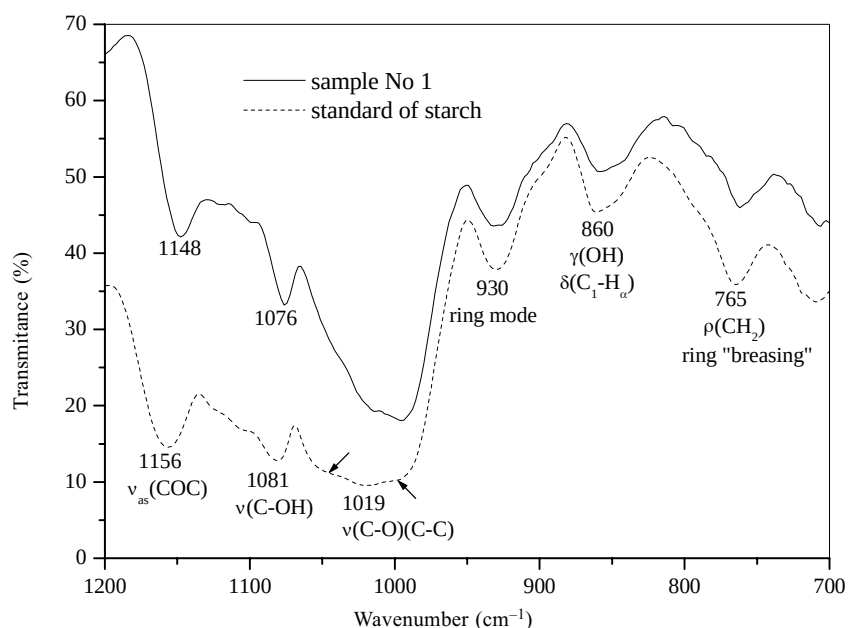


Fig. 1. FT-IR spectra of sample No 1 (starch confectionery jelly) and standard of starch

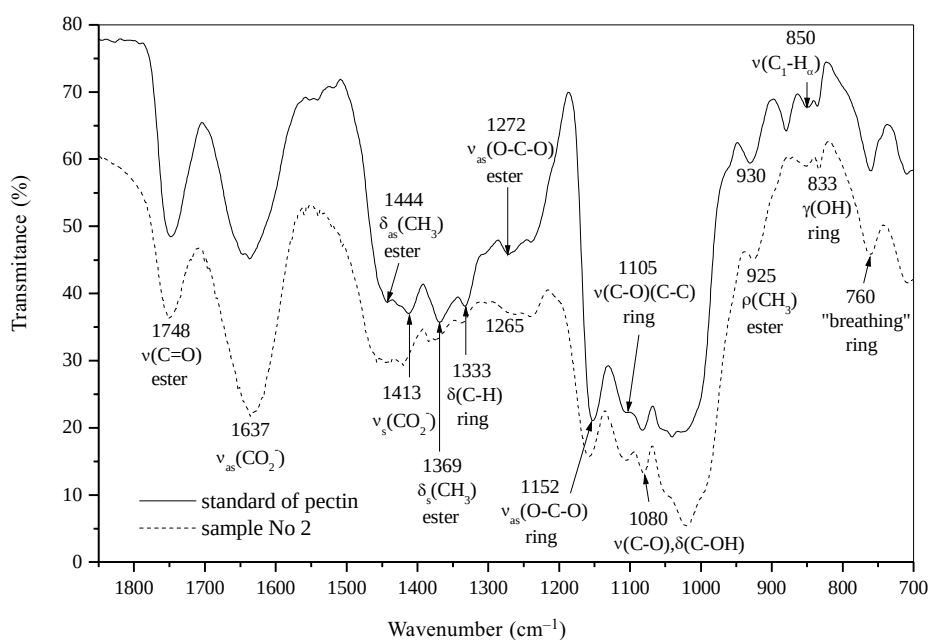


Fig. 2. FT-IR spectra sample No 2 and of pectin (fruit pectin jelly)

linkage C-O-C (KAMNEV *et al.* 1998; KAČURÁKOVÁ *et al.* 2000; WILSON *et al.* 2000). The highly coupled and conformational specific region between 1100 and 700 cm^{-1} belongs to non-localised, highly coupled vibrations of polysaccharide backbones (ENGELSEN & NØRGAARD 1996). In the case of starch standard and sample No. 1, the spectra have several significant bands of starch in the region of 1200–700 cm^{-1} (Fig. 1).

In the case of pectin standard and sample No. 2, the spectra had two intense pectin bands at 1748 cm^{-1} and 1637 cm^{-1} assigned to stretching C=O vibration of esters

and bending of water $\delta(\text{H}_2\text{O})$ overlapped with the asymmetric stretching vibration of carboxylate anion $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$, respectively (Fig. 2). Both spectra of pectin and sample No. 2 have additional bands at 1444, 1413 (1420), 1369 (1374), 1272 (1266) and 930 (925) cm^{-1} , which may be ascribed to ester and carboxylate groups (FILIPPOV 1978; ENGELSEN & NØRGAARD 1996; WELLNER *et al.* 1998). The band at 1333 (1338) cm^{-1} was assigned to C-H bending vibration of pyranic ring. This band is very resistant to any changes of C-6 carboxyls (FILIPPOV 1978). In the region of 1200–950 cm^{-1} of both spectra, several intense

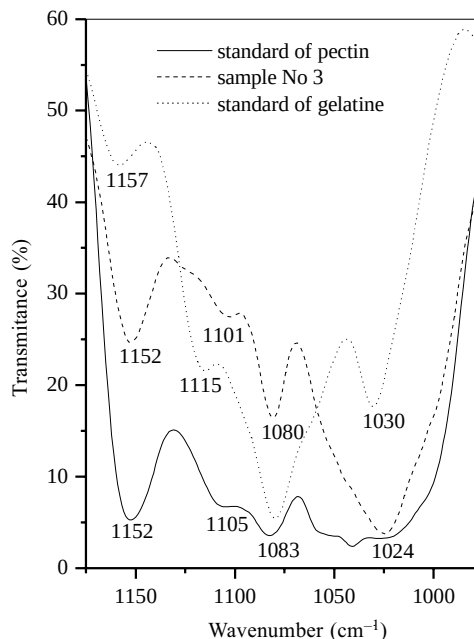
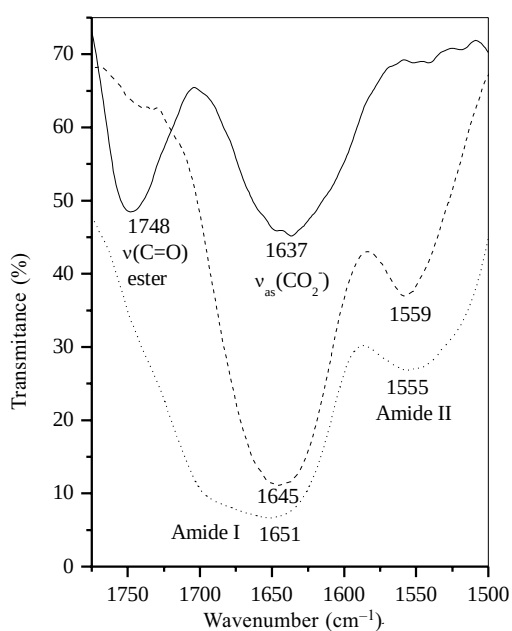


Fig. 3. FT-IR spectra of sample No 3 (fruit gelatin-pectin jelly) and standards of pectin and gelatin

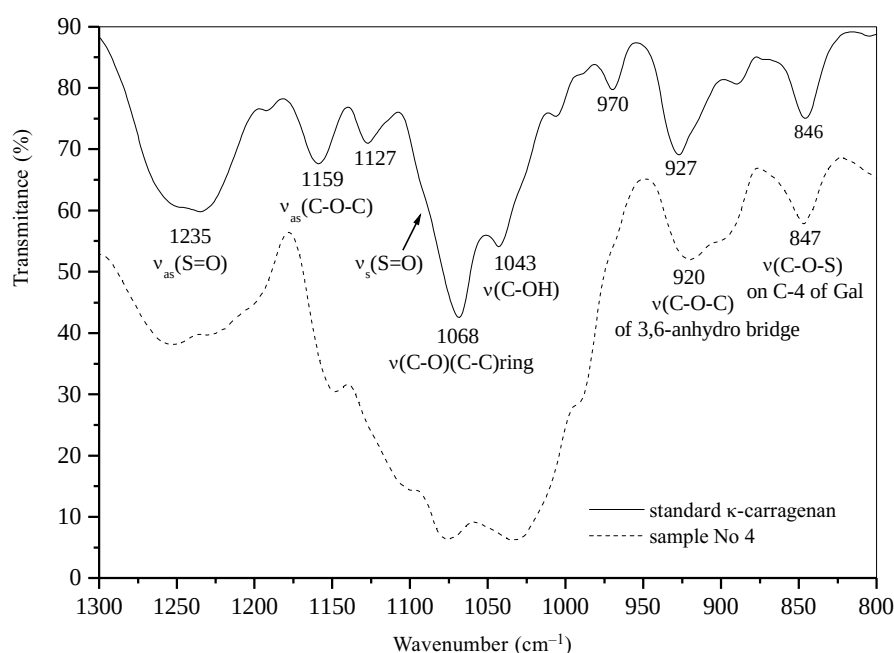


Fig. 4. FT-IR spectra of sample No 4 and standard of κ -carragenan

bands at 1152 (1158), 1105 and 1083 (1080) cm^{-1} contributed to vibrations of glycosidic bonds and pyranoid rings (Fig. 2). In addition, two weak bands at 850 and 833 cm^{-1} also confirm that pectin is the major component of sample No. 2.

Sample No. 3 contained confectionery jelly prepared from a mixture of gelatine and pectin. The isolated portion of high molecule substances has significant bands of pectin (1742, 1152, and 1105 cm^{-1}) and two intense bands at 1641 and 1557 cm^{-1} assigned to amide bonds of ge-

latine (amide I and amide II modes, respectively). The intense band at 1080 cm^{-1} is present in both pectin and gelatine, thus it cannot be used for the identification of these gelling agents in a mixture. The fact that all pectin bands, especially that of ester C=O stretching vibration at 1742 cm^{-1} , are relatively weak confirm that pectin, in contrast to gelatine, could be present in sample No. 3. only in small amount.

The food supplement sample No. 4. was a mixture of algae polysaccharide carragenan and saccharose. Carra-

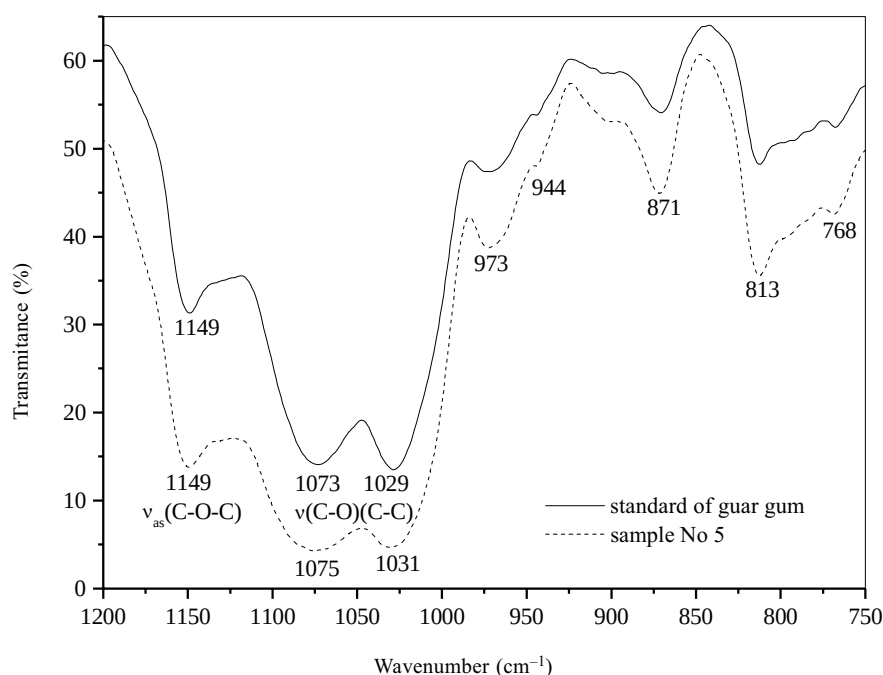


Fig. 5. FT-IR spectra of sample No 5 and standard of guar gum

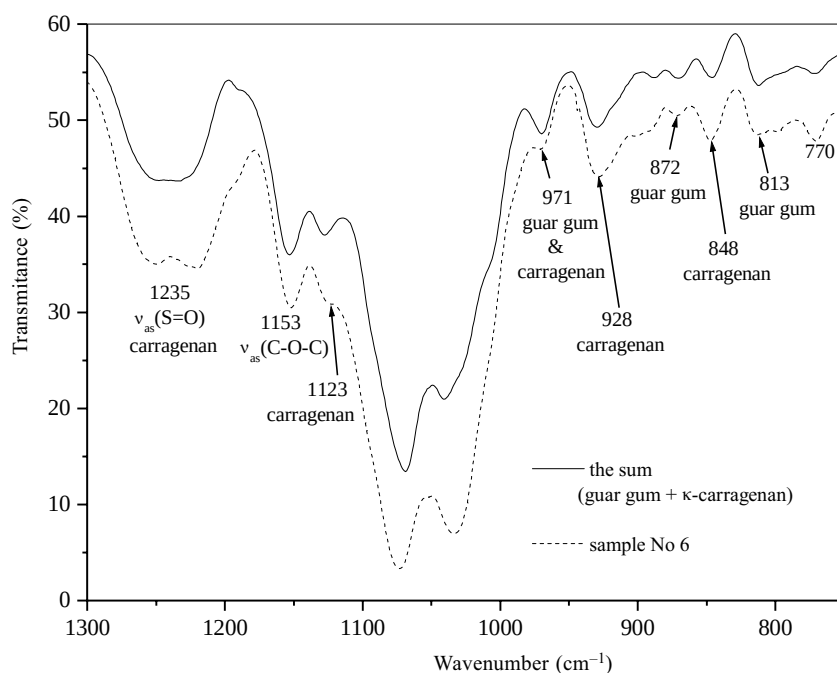


Fig. 6. FT-IR spectra of sample No 6 (mixture of two polysaccharides) and of the sum of κ -carragenan and guar gum

genan molecules are linear chains of D-galactopyranosyl units with most sugar units having one or two sulphate groups esterified to carbon atoms C-2 or C-6 (WHISTLER & BEMILLER 1997). The infrared spectra of both the standard and the sample have an intense broad band at 1235 cm^{-1} contributed to asymmetric stretching vibration of S=O bonds (SILVERSTEIN *et al.* 1991) of carragenans (Fig. 4). The corresponding symmetric stretching mode of S=O is present in the spectra as a small shoulder near 1090 cm^{-1} (WILSON *et al.* 1988). In addition, both these spectra have two bands at 927 and 846 cm^{-1} , which were assigned to the coupling of the C-O stretching vibrations of the 3,6-anhydro bridge and to the coupling of C-O and O-S vibrations of D-galactose-4-sulphate, respectively (SEKKAL & LEGRAND 1993). The presence of these bands confirmed the κ -type of carragenan (CHOPIN & WHALEN 1993).

The food supplement sample No 5, was declared as pure guar gum, i.e. galactomannan from a leguminous plant, *Cyanopsis teragonolobus*. The simple comparison of the standard and the sample spectra shows a very similar profile (Fig. 5). The spectrum has two bands, at 1149 cm^{-1} contributed to glycosidic bonds and several bands at 1075, 1029, 973 and 944 cm^{-1} contributed to sugars region. The two bands at 871 and 813 cm^{-1} are also characteristic of guar gum.

The food supplement No. 6 contained two polysaccharides, i.e. a mixture of guar gum and carragenan. The spectrum of sample No. 6 was nearly identical to the spectrum of the arithmetic sum of the spectra of pure standards (Fig. 6). The spectrum contains the band at 1151 cm^{-1} contributed to glycosidic bonds of both polysaccharides, 1235 cm^{-1} contributed to asymmetric stretching vibration

of S=O bonds in carragenan, and two weak bands at 872 and 813 cm^{-1} , which are present in the guar gum spectrum. The bands of sample No. 6 at 1123, 928 and 848 cm^{-1} strongly indicates the presence of α -carragenan, whereas the characteristic band at 971 cm^{-1} is present in both studied polysaccharides and cannot be used in the analysis of carragenan – guar gum mixtures.

CONCLUSIONS

The results show that FT-IR spectra of food hydrocolloids (starch, pectin, carragenan, guar gum and gelatine) isolated from fruit jellies and food supplements contain information that enables the identification of respective food hydrocolloids in food samples. The procedure based on mid-infrared absorption spectroscopy is comfortable, compared with chromatography. There is no need of the hydrolysis of isolated hydrocolloids and the subsequent identification of resulting products by chromatography. Nevertheless, quantitative evaluation still remains to be worked out.

Acknowledgement: We thank to Ing. ZRCKOVÁ (Central Technical Laboratory, Prague) for the help in the measuring of FT-IR spectra.

References

- COIMBRA M.A., BARROS A., RUTLEDGE D.N., DELGADILLO I. (1999): FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of olive pulp cell-wall polysaccharide extracts. *Carbohydr. Res.*, **317**: 145–154.
- COIMBRA M.A., BARROS A., BARROS M., RUTLEDGE D.A., DELGADILLO I. (1998): Multivariate analysis of uronic acid

- and neutral sugars in whole pectic samples by FT-IR spectroscopy. *Carbohydr. Hydrocolloids*, **37**: 241–248.
- ENGELSEN S.B., NORGAARD L. (1996): Comparative vibrational spectroscopy for determination of quality parameters in amidated pectins as evaluated by chemometrics. *Carbohydr. Hydrocolloids*, **30**: 9–24.
- FEMENIA A., SÁNCHEZ E.S., SIMAL S., ROSSELLÓ C. (1998): Effect of drying pretreatments on the cell wall composition of grape tissues. *J. Agr. Food Chem.*, **46**: 271–276.
- FILIPPOV M.P. (1978): Infrared spectra of pectic compounds – Shtiints. Kishinev: 14–21.
- CHIOVITTI A., BACIC A., CRAIK D.J., MUNRO S.L.A., KRAFT G.T., LIAO M.-L. (1997): Cell-wall polysaccharides from Australian red algae of the family *Solieriaceae* (*Gigartinales*, *Rhodophyta*): novel, highly pyruvated carrageenans from the genus *Callophycus*. *Carbohydr. Res.*, **299**: 229–243.
- CHOPIN T., WHALEN E. (1993): A new and rapid method for carragenan identification by FT-IR diffuse reflectance spectroscopy directly on dried, ground algal material. *Carbohydr. Res.*, **246**: 51–59.
- KAČURÁKOVÁ M., CAPEK P., SASINKOVÁ V., WELLNER N., EBRINGEROVÁ A. (2000): FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydr. Hydrocolloids*, **43**: 195–203.
- KAMNEV A.A., COLINA M., RODRIGUEZ J., PITCHKINA N.M., IGNATOV V.V. (1998): Comparative spectroscopic characterization of different pectins and their sources. *Food Hydrocolloids*, **12**: 263–271.
- SEKKAL M., LEGRAND P. (1993): A spectroscopic investigation of the carragenans and agar in the 1500–100 cm⁻¹ spectral range. *Spectrochim. Acta*, **49A**: 205–221.
- SILVERSTEIN R.M., CLAYTON B.G., MORRILL T.C. (1991): *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 5th Ed. John Wiley & Sons Inc.: 129.
- SYNYTSYA A. (2000): Biological role of acid polysaccharides. [Dissertation.] Inst. Chem. Technol., Prague.
- SINITSYA A., ČOPÍKOVÁ J., PRUTYANOV V., SKOBLA S., MACHOVIČ V. (2000): Amidation of highly methoxylated citrus pectin with primary amines. *Carbohydr. Polymers*, **42**: 359–368.
- WELLNER N., KAČURÁKOVÁ M., MALOVÍKOVÁ A., WILSON R.H., BELTON P. (1998): FT-IR study of pectate and pectinate gels formed by divalent cations. *Carbohydr. Res.*, **308**: 123–131.
- WHISTLER R.L., BEMILLER J.N. (1997): *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists*. Eagan Press: 188.
- WILSON R.H., GOODFELLOW B.J., BELTON P.S. (1988): Fourier transform infrared spectroscopy for the study of food biocolloids. *Food Hydrocolloids*, **2**: 169–178.
- WILSON R.H., SMITH A.C., KAČURÁKOVÁ M., SAUNDERS P.K., WELLNER N., WALDRON K.W. (2000): The mechanical properties and molecular dynamics of plant cell wall polysaccharides studied by FTIR spectroscopy. *Plant Physiol.*, **124**: 397–405.

Received for publication December 15, 2000

Accepted for publication February 6, 2001

Souhrn

ČOPÍKOVÁ J., SINITSYA A., ČERNÁ M., KAASOVÁ J., NOVOTNÁ M. (2001): **Využití FT-IR spektroskopie k detekci potravinářských hydrokoloidů v cukrovinkářském želé a potravinových doplňcích.** *Czech J. Food Sci.*, **19**: 51–56.

V této práci byla naměřena FT-IR spektra frakce vysokomolekulárních látek izolovaných ze tří vzorků cukrovinkářského želé (vzorky 1–3) a potravinářských doplňků (vzorky 4–6) a porovnána se spektry standardů (škrob, pektin, želatina, karragenan a guarová guma). Analýza FT-IR spektrálních dat potvrdila, že vzorky 1 a 2 obsahovaly škrob a pektin jako želírující látku a vzorek 3 obsahoval směs želatiny a pektin, přičemž převažovala želatina. Přítomnost spektrálních pásů 1235, 927 a 876 cm⁻¹ potvrdila, že vzorek 4 obsahoval κ-karragenan. Profil spekter vzorku 5 a standardu guarové gumy měl stejný průběh, což bylo důkazem, že vzorek obsahoval guarovou gumu. Spektrum vzorku 6, který byl směsí dvou polysacharidů a sacharosy, bylo téměř identické s aritmetickým součtem spekter čistých standardů, guarové gumy a karragenanu. Získané výsledky potvrdily užitečnost FT-IR spektroskopie při identifikaci potravinářských hydrokoloidů ve vybraných potravinářských vzorcích.

Klíčová slova: FT-IR spektroskopie; polysacharidy; želé; potravinový doplněk

Corresponding author:

Ing. JANA ČOPÍKOVÁ, Vysoká škola chemicko-technologická, Ústav technologie a chemie sacharidů, Technická 3, 161 05 Praha 6, Česká republika, tel.: + 420 2 24 35 31 14, fax: + 420 2 311 99 90, e-mail: jana.copikova@vscht.cz

Use of FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of polysaccharide food additives

Marcela Černá^a, António S. Barros^b, Alexandra Nunes^b, Sílvia M. Rocha^b, Ivonne Delgadillo^b, Jana Čopíková^a, Manuel A. Coimbra^{b,*}

^aDepartment of Carbohydrate Chemistry and Technology, Institute of Chemical Technology, Technická 5, 166 28, Prague, Czech Republic

^bDepartment of Chemistry, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

Received 7 June 2002; accepted 13 June 2002

Abstract

This work purposes the characterisation of food additive polysaccharides such as starch, glucomannan and carrageenan by the use of the information of the principal components of the FT-IR spectra in the 1200–800 cm⁻¹ wavenumber region. The application of a PCA to this spectral region showed that several features could be obtained: (a) Separation between Glc and Gal, both monomeric and polymeric, and identification of their characteristic wavenumbers. (b) Identification of the specific absorbance wavenumbers for sucrose, Fru, Ara, and Man. (c) Distinction of pectic polysaccharides from the remaining carbohydrate samples. (d) Separation within κ-, ι-, and λ-carrageenans. These results show that the FT-IR spectroscopy in the 1200–800 cm⁻¹ wavenumber region can be a very reliable technique for food authentication of polysaccharide-based additives and be used for a quick screening of polysaccharides used as additives in foodstuffs.

© 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: FT-IR spectroscopy; Additives; Glucan; Carrageenan; Pectin; Additives; Guican; Carrageenan; Pectin

1. Introduction

Polysaccharides and their derivatives are widely used in food processing technologies as gelling agents and thickeners. Starch, carrageenan and pectin are examples of the most used polysaccharides in food industry. Starch is an important thickening and binding agent used in the production of puddings, soups, sauces, etc.; carrageenan utilisation in food processing is based on its ability to gel, to increase the solution viscosity and to stabilise emulsions and various dispersions, such as chocolate milk; pectin with a high ester content can set into a gel in the presence of sucrose and is widely used in marmalade and jelly production and low ester pectin can set into a gel in the presence of Ca²⁺ (Belitz & Grosch, 1999).

The authentication of food is a major concern for the consumer and for the food industry at all levels of the food processing chain, from raw materials to final products. Among the complex food constituents, the

identification of the added polysaccharides could be a key factor if a rapid and reliable method is attainable. Wet classical chemical methods of polysaccharide determination are time consuming, and not always straight forward, hence not suitable for a widespread routine application in the food industry.

The vibrational spectra have been found important applications in the analysis and identification of sugars in food industries (Mathlouthi & Koenig, 1986). Mid infrared spectroscopy, is a rapid, versatile, and sensitive tool that have been used, by simple spectra analysis, for elucidating the structure, physical properties and interactions of carbohydrates (Kačuráková & Wilson, 2001), to study pectic polysaccharides and hemicelluloses extracted from plants (Kačuráková, Capek, Sasinková, Wellner, & Ebringerová, 2000), and to detect structural and compositional changes occurring in the cell walls of grapes during processing (Femenia, Sánchez, Simal, & Rosselló, 1998). The carbohydrates show high absorbencies in the region 1200–950 cm⁻¹, that is within the so-called fingerprint region, where the position and intensity of the bands are specific for every polysaccharide, allowing its possible identification (Filippov, 1992). Due to absorbance

* Corresponding author. Tel.: +351-234-370-706; fax: +351-234-370-084.

E-mail address: mac@dq.ua.pt (M.A. Coimbra).

overlapping in this region, it has been very difficult to assign the absorbencies at specific wavenumbers to specific bonds or functional groups.

Pectins, polysaccharides composed by a linear backbone of (1 → 4)- α -D-Galp interspersed by α -(1 → 2)-Rhap residues and with side chains constituted mainly by β -D-Galp and α -L-Araf residues, have been the most extensively studied polysaccharide by IR spectroscopy (Kačuráková & Wilson, 2001). Mid infrared spectroscopy has also been applied successfully in the studies on the conformation and structure of starch (Gaľat, 1980). The gelation and retrogradation of the two main constituents of starch, amylose (linear (1 → 4)- α -D-glucan) and amylopectin (branched (1 → 4)- and (1 → 4,6)- α -D-glucan), have been studied by infrared spectroscopy (Wilson & Belton, 1988; Wilson, Goodfellow, & Belton, 1988; Wilson, Kalichevsky, Ring, & Belton, 1987), where characteristic bands for starch gels have been found at 1046 and 1019 cm^{-1} . The carrageenans are characterised by an alternating repeating (1 → 4)-linked disaccharide structure consisting of 3,6-anhydro- α -D-galactopyranosyl-(1 → 3)- β -D-galactopyranosyl. A sulphate group at positions C2, C4 or C6 can substitute each residue. The carrageenans, depending on the sulphate substitutions, can be defined as: kappa (κ) (β -D-Galp-4-sulphate and 3,6-anhydro- α -D-Galp), iota (ι) (β -D-Galp-4-sulphate and 3,6-anhydro- α -D-Galp-2-sulphate), lambda (λ) (non-gelling agent consisting of β -D-Galp-2-sulphate and α -D-Galp-2,6-disulphate). FT-IR spectra, exhibiting characteristic bands in the region 930–805 cm^{-1} , have also been employed for their identification and discrimination (Chopin & Whalen, 1993; Sekkal & Legrand, 1993). Glucomannans (linear polymers composed of β -D-Manp and β -D-Glcp) and β -glucans (polymers composed of variously linked β -D-Glcp residues) are also polysaccharides utilized in special nutrition foods as bulk substances.

The application of chemometrics to the FT-IR spectra was established as a reliable and fast method for the determination of important gel-forming parameters in amidated pectins (Engelsen & Norgaard, 1996), and allowed the classification of corn starches (Dupuy, Wojciechowski, Huvenne, & Legrand, 1997) and commercial carrageenans (Jurasek & Phillips, 1998). It was also proved to be useful for a quick evaluation of cell wall monosaccharide composition of polysaccharides of pectic (Coimbra, Barros, Barros, Rutledge, & Delgadillo, 1998) and hemicellulosic origin (Coimbra, Barros, Rutledge, & Delgadillo, 1999). Moreover, it was applied as a rapid method to screen cell wall mutants of *Arabidopsis* (Chen et al., 1998), to detect structural and compositional changes occurring in the cell walls of pears after processing (Ferreira, Barros, Coimbra, & Delgadillo, 2001), and to determine the degree of methylesterification of pectic polysaccharides in plant cell wall extracts (Barros et al., 2002).

Following the work carried out on the detection of hydrocolloids in confectionery jellies and food supplements

(Čopíková, Synytsya, Černá, Kaasová, & Novotná, 2001) by FT-IR spectroscopy, this paper proposes, with the use of a PCA, the identification of the specific wavenumbers that contribute for the discrimination of the different polysaccharides constituent of carbohydrate-based additives according to their FT-IR spectra within the 1200–800 cm^{-1} region.

2. Materials and methods

2.1. Samples origin

Standards. Twenty seven carbohydrate standards, mono-, di- and polysaccharide standard compounds, were used to build a FT-IR model based in their absorbencies in the region 1200–800 cm^{-1} : D-arabinose (Sigma), D-fructose (Sigma), D-glucose (Sigma), D-mannose (Sigma), D-galactose (Sigma), D-galacturonic acid (Sigma), sucrose (Lachema), maltose (Sigma), lactose (Sigma), amylose (Sigma), amylopectin (Sigma), starch (Sigma), β -glucan of barley (Megazyme), κ -carrageenan (Fluka), ι -carrageenan (Fluka), λ -carrageenan (Fluka), commercial carrageenan, mixture of commercial carrageenan and HM pectin, HM pectin 1 (Sigma), HM pectin 2 (Sigma), potassium pectinan [DE = 89.7%] (Sigma), potassium pectinan [DE = 64.3%] (Sigma), potassium pectinan [DE = 21.6%] (Sigma), potassium polygalacturonan (Sigma), galactan of arabic gum (Sigma), galactan (Koch-Light Laboratories), and arabinogalactan (Sigma).

Confectionery jellies and food supplements. Eight samples were analysed using the FT-IR model: five polysaccharide samples isolated from confectionery jellies (samples 1–5 in Tables 1–3), and three food supplement polysaccharide samples: yeast wall glucomannan *Saccharomyces cerevisiae* (sample 6), yeast extracellular glucomannan *Saccharomyces cerevisiae* (sample 7), and a β -glucan mixture, resultant from *Saccharomyces cerevisiae* (sample 8a), and *Lactobacillus* species (sample 8b). According to the manufacturers, the confectionery jellies contain pectin, in addition to other sugars (Table 1). The carbohydrate relative composition of confectionery jellies is specified in Table 2. The food supplement polysaccharides were analysed directly from the raw material. The confectionery jelly polysaccharides were previously isolated before analysis: the confectionery jellies were dissolved in distilled water to form of a 10% solution (w/v). To 100 ml of this solution, 300 ml of 96% ethanol was added, the solution (72% ethanol) was stirred for 1 day at 5 °C and the high molecular weight polysaccharides were recovered by centrifugation and washed with 80% ethanol up to negative reaction (phenol–sulphuric acid test) for carbohydrates. The polysaccharides were then dissolved in distilled water to form a 2% aqueous solution (w/v) and the produced solution was freeze-dried.

Table 1
Characteristics of studied samples, according to the manufacturer labels

Sample No.	Sample specification	Sample components
1	Pectin jelly with fruit flavour	Sugar, glucose syrup, water, pectin, citric acid, acidity regulator (sodium citrate), flavours, colours
2	Peach flavoured jellies	Sugar, glucose syrup, water, pectin, citric acid, sodium citrate, natural peach flavour, colour
3	Fruit flavoured gums with real fruit juices	Sugar, glucose syrup, water, pectin, acids (citric acid, lactic acid), acidity regulators (potassium sodium tartrate, trisodium citrate, calcium lactate, sodium polyphosphate), fruit juices
4	Fruit jelly	Sugar, glucose syrup, water, pectin, citric acid, sodium citrate, natural flavours, natural colours
5	Pectin jelly with fruit flavour	Sugar, glucose syrup, water, pectin, citric acid, acidity regulator (sodium citrate), moisturiser (sorbitol), flavour, colours

2.2. Carbohydrate analysis

The monosaccharides and disaccharides present in original jelly samples were analysed by HPLC, equipped with a pump (DeltaChrom SDS 030) and connected to a RI detector (RefractoMonitor IV). The confectionery jelly was dissolved in distilled water to form a 10% solution (w/v) and injected in a 20 µl loop using a valve. The separation was performed with a Separon SGX NH₂ column (4 × 250 mm) protected with a precolumn (3.3 × 30 mm). The conditions of analysis were as follows: column temperature at 25 °C, using deionised water–acetonitrile (25:75, v/v) as eluent, with a flow of 1.0 ml/min. Data acquisition and peak processing were performed with DATA Apex software.

Neutral sugars were released from the isolated confectionery jelly polysaccharides and from the food supplements by Saeman hydrolysis (Selvendran, March, & Ring, 1979) and analysed as their alditol acetates by gas chromatography (Blakeney, Harris, Henry, & Stone, 1983; Harris, Blakeney, Henry & Stone, 1988) using a Hewlett-Packard 5890 gas chromatograph with a split injector (split ratio 1:60) and a FID detector. A DB-225 capillary column (30 m length, 0.25 mm internal diameter and 0.15 µm film thickness) was used. With the injector and detector

operating at 220 and 230 °C, respectively, the following temperature program was used: 220 °C for 4 min and 230 °C for 7.5 min with a rate of 25 °C/min. Hydrogen was used as the carrier gas. Uronic acid was determined colorimetrically by a modification (Coimbra, Delgadillo, Waldron, & Selvendran, 1996) of the Blumenkrantz and Asboe-Hansen (1973) method. The absorbencies were measured at 520 nm on a Shimadzu UV/Vis spectrophotometer. The absence of monosaccharides in the isolated polysaccharide extracts was confirmed using the same procedure but without the acid hydrolysis step.

2.3. FT-IR spectroscopy and chemometric analysis

The FT-IR spectra of the isolated polysaccharides and standards were obtained using a Golden Gate single reflection diamond ATR system in a Brucker IFS-55 spectrometer. The spectra were recorded at the absorbance mode from 4000 to 400 cm⁻¹ (mid infrared region) at the resolution of 8 cm⁻¹. Five replicate spectra (128 co-added

Table 2
The content of dry matter ($s = 0.02$) and sugars in confectionery jelly samples ($s = 0.1$)

Sample No.	Content (%)				
	Dry matter	Fructose	Glucose	Sucrose	Maltose
1	80.50	4.65	5.68	55.13	7.23
2	81.20	1.87	8.64	40.16	6.91
3	80.34	4.96	13.71	34.97	6.62
4	81.05	6.46	12.19	43.17	5.53
5	80.38	3.70	6.11	55.50	11.23

s : standard deviation.

Table 3
Sugar composition of polysaccharides isolated from confectionery jellies and food supplement polysaccharide samples (expressed as mol%)

Isolated polysaccharide	Ara	Man	Gal	Glc	Ur. Ac.
<i>Confectionery jellies</i>					
1	1	1	2	75	19
2	0	0	2	97	0
3	0	0	1	97	1
4	1	0	1	98	0
5	1	0	2	94	2
<i>Food supplements</i>					
6	0	67	0	33	0
7	0	81	0	19	0
8a	0	22	17	60	0
8b	0	3	49	48	0

scans) were collected for each sample. The measured spectra were transferred via a JCAMP.DX format into the data analysis software package for PCA and each spectrum, within the $1200\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ region, was auto-scaled (centred and divided by the standard deviation). The PCA analysis could allow the characterisation of the sample relationships (scores plans or axis) and, at the same time, the recover of their sub-spectral profiles (loadings).

3. Results and discussion

3.1. PC1

Twenty seven carbohydrate standards were used to build a FT-IR model based in their absorbencies in the region $1200\text{--}800\text{ cm}^{-1}$: six monosaccharides (Ara, Fru, Gal, GalA, Glc, and Man), three disaccharides (lactose, maltose, and sucrose), four glucans (amylose, amylopectin, barley β -glucan, and starch), five carrageenans (ι -, λ -, κ -carrageenan, commercial carrageenan, and commercial carrageenan–pectin mixture), three galactans (arabic gum, arabinogalactan, and galactan), and six pectins having different degrees of methylesterification.

The scores scatter plot of PC1 vs. PC2 (Fig. 1a) indicates that the distribution of the samples in the PC1 axis was done according to their composition in Glc (PC1 negative) and Gal (PC1 positive). Glc-rich compounds like, starch, amylose, amylopectin, β -glucan, maltose, sucrose, and Glc, were all placed in the negative side of PC1, independently of their monomeric or polymeric nature. On the other side, polysaccharides such as the carrageenans (except λ -carrageenan) and galactans, and the monosaccharides Fru and GalA, were placed in the positive side of PC1. Lactose (β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp) was placed near the origin, i.e. had no influence concerning this axis. Based on the scores scatter plot sample distribution, the positive absorption band in the range $1100\text{--}1030\text{ cm}^{-1}$, with maximum at 1068 cm^{-1} in PC1 loadings plot (Fig. 2) can be attributed to Gal, and the band in the range $1030\text{--}944\text{ cm}^{-1}$, with minimum at 998 cm^{-1} can be attributed to Glc, as previously defined by Kačuráková et al. (2000) and Kačuráková and Mathlouthi (1996).

3.2. PC2

According to the scores scatter plots of PC1 vs. PC2 and PC2 vs. PC3 (Fig. 1a and b) PC2 distinguish the spectra of the pectin samples and GalA (PC2 negative), from all the others, especially the carrageenans (PC2 positive). Pectins with different degree of methylesterification were observed together in the same region, not significantly separated. Carrageenans (PC1 and PC2 positive) were placed differently from Gal (PC1 positive and PC2 negative) in the scores plan, except λ -carrageenan, that was located on PC1 negative and

PC2 positive. This may be due to the higher content in sulphate and absence of 3,6-anhydro-Gal in this carrageenan when compared to the others. Commercial carrageenan is probably κ -carrageenan. This distinction of the pectic samples can be also seen in the loadings plot of PC2 by the absorbencies at the negative side at 1145, 1100, 1018, and 960 cm^{-1} and by the absorbencies at the positive side at 1064 and 1045 cm^{-1} , as previously described for pectic polysaccharides (Coimbra et al., 1998, 1999).

3.3. PC3 and PC5

The scores scatter plots of PC2 vs. PC3 and PC3 vs. PC5 (Fig. 1b and c) allowed to see in PC3 a distinction of the spectra ι - and κ -carrageenans (PC3 positive) from the monosaccharides Ara, Fru, and Gal, and the disaccharide sucrose (PC3 negative). GalA and Glc were in the centre and Man was slightly PC3 positive. PC5 separate Man and λ -carrageenan (PC5 positive) from Ara and sucrose (PC5 negative). The separation of the ι - and κ -carrageenans (PC1, PC2 and PC3 positive and PC5 negative) were due to the absorbencies at 929 and 848 cm^{-1} , which are in accordance with Chopin and Whalen (1993). Sucrose (PC1, PC3 and PC5 negative and PC2 positive) was related to the wavenumber 995 cm^{-1} and Fru (PC1 and PC5 positive and PC3 negative) was related to the wavenumbers 1064 and 1045 cm^{-1} (Kačuráková & Mathlouthi, 1996). Ara (PC3 and PC5 negative) was related to the wavenumbers 1052 and 979 cm^{-1} (Coimbra et al., 1998) and Man (PC3 and PC5 positive) was related to the wavenumbers 1072 and 1033 cm^{-1} (Kačuráková et al., 2000).

3.4. Identification of isolated polysaccharides from confectionery jellies and food supplements (glucomannans and β -glucan mixture)

Isolated polysaccharides from confectionery jellies (1–5) were placed in the PC1 negative side (Fig. 1a), near starch. In PC2, PC3 and PC5 they were placed near the origin, always near starch. According to these results, the polysaccharides isolated from confectionery jellies should be considered starch-based materials, in accordance with the positive I_2/KI test for starch and with the sugar analysis (Table 3). According to the sugar analysis, confectionery jelly polysaccharides were rich in polymeric Glc. These results contrasted with the information of pectin as jellifying agent, labelled by the manufacturer. Exception was sample 1, which showed uronic acids, however in very low quantity. The polysaccharides isolated from sample 1 contained 19% Ur.Ac, leading to the assumption that it could be a mixture of starch and pectin. According to the scores scatter plot (Fig. 1a and b) sample 1 was placed between starch and pectin, which allowed confirming its polysaccharide composition.

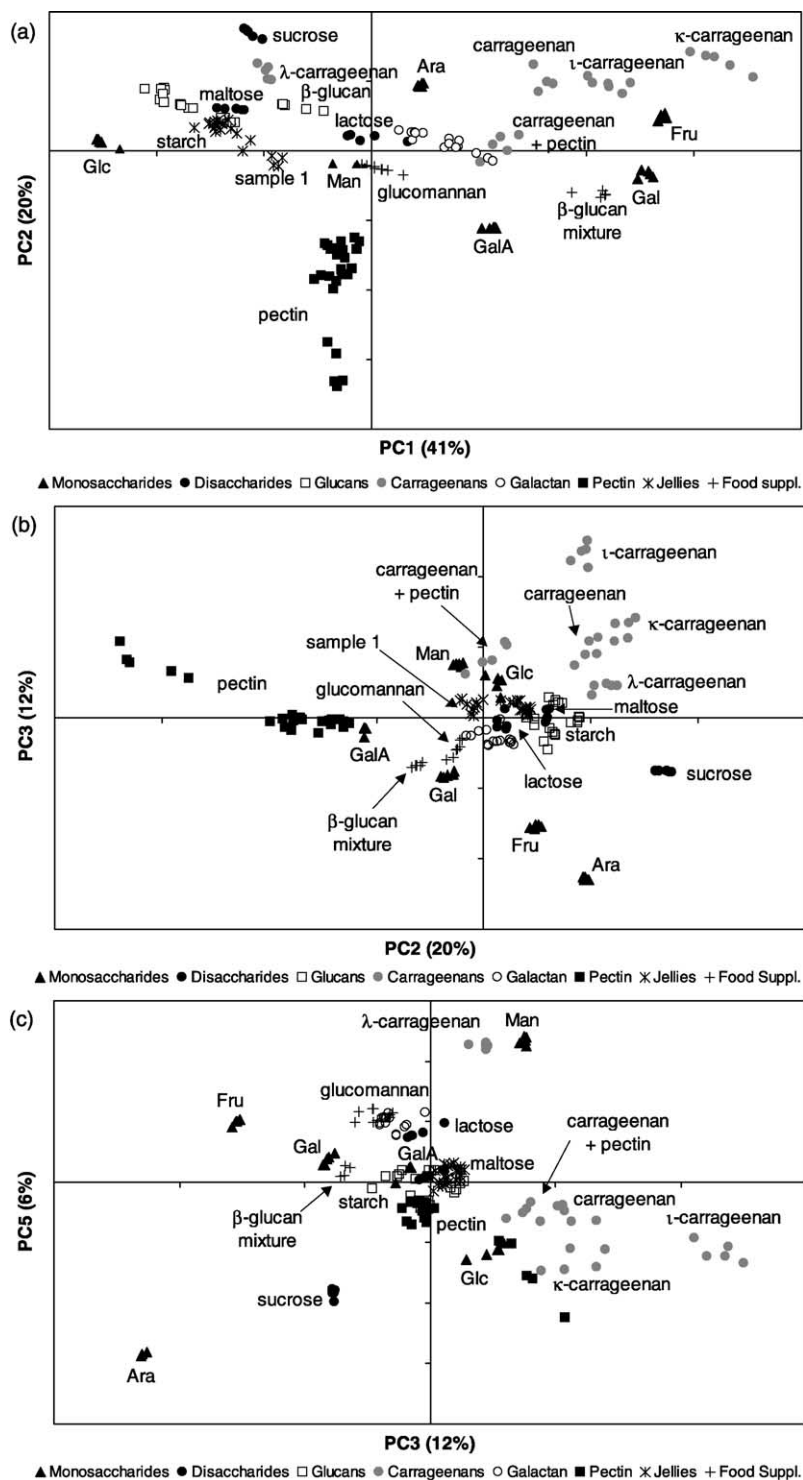


Fig. 1. PCA scores scatter plot of the FT-IR spectra of mono-, di-, and polysaccharide standards, confectionery jelly polysaccharides and food supplements (glucomannan and β -glucan mixture) in the $1200\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ wavenumber region. (a) PC1 vs. PC2; (b) PC2 vs. PC3; (c) PC3 vs. PC5 (axes cross each other at the origin).

The glucomannans had a ratio Glc/Man of 1:2 and 1:4 for the wall and extra-cellular glucomannans, respectively (Table 3). No distinction was possible to achieve between them by the FT-IR spectra. They were placed always near the origin in the PC1 and PC2 scores scatter plots, near Man. In PC3, the glucomannans were in opposite direction of

Man and in PC5, where Man is more separated from the other samples in the PC5 positive, the glucomannans were also placed in PC5 positive.

The bacterial β -glucan mixture was the result of a blend of samples 8a and 8b. According to the sugars composition shown in Table 3, one polysaccharide was composed of

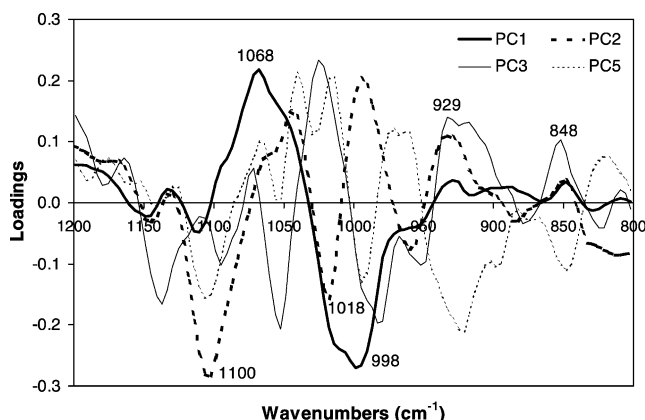


Fig. 2. PCA loadings plot (PC1, PC2, PC3, and PC5) of the FT-IR spectra of mono-, di-, and polysaccharide standards, confectionery jelly polysaccharides and food supplements (glucomannan and β -glucan mixture) in the 1200–800 cm^{-1} wavenumber region.

equimolar amounts of Gal and Glc, and the other one was composed of Glc, Man and Gal in a ratio of 3:1:1. This mixture of polysaccharides was placed in the PC1 positive side in the opposite direction of the β -glucan of barley, near Gal. Also in PC2, PC3 and PC5 it was placed near Gal. According to the relative position of the β -glucan mixture in relation to the lactose in the score scatter plots, the equimolar amounts of Glc and Gal cannot be attributed to the presence of lactose.

3.5. Concluding remarks

The application of a PCA to the FT-IR spectra in the 1200–800 cm^{-1} region of carbohydrate food additives showed that a distinction was possible. The major variability (41%) was explained by PC1, that separate Glc (negative band at 998 cm^{-1}) from Gal (positive band at 1068 cm^{-1}) based carbohydrates. No distinction was obtained from monosaccharides, disaccharides and polysaccharides. In this axis, pectin and glucomannan do not interfere. Pectin was separated in PC2, by the absorbencies located at it negative side: 1145, 1100, 1018, and 960 cm^{-1} ; and by the absorbencies located at the positive side: 1064 and 1045 cm^{-1} . The ν - and κ -carrageenans were distinguished from all other carbohydrates, including λ -carrageenan, due to the absorbencies at 929 and 848 cm^{-1} . Absorption at specific wavenumbers were also observed for sucrose (995 cm^{-1}), Fru (1064 and 1045 cm^{-1}), Ara (1052 and 979 cm^{-1}), and Man (1072 and 1033 cm^{-1}). These results show that the FT-IR spectroscopy in the 1200–800 cm^{-1} wavenumber region can be used as a very reliable and quick tool for food authentication of carbohydrate-based additives.

Acknowledgements

The authors acknowledge Pedro Vasco (University of Aveiro) and Andriy Synytsya (ICT Prague) for their

assistance, Program SOCRATES—Action ERASMUS for mobility of Marcela Černá, and the University of Aveiro for funding the Research Unit 62/94 ‘Química Orgânica, Produtos Naturais e Agro-Alimentares’. António Barros was supported by a Post-Doctoral grant FCT BPD/18824/98 and Alexandra Nunes was supported by a PhD grant FCT SFRH/BD/1071/2000.

References

- Barros, A. S., Mafra, I., Ferreira, D., Cardoso, S., Reis, A., Lopes da Silva, J. A., Delgadillo, I., Rutledge, D. N., & Coimbra, M. A. (2002). Determination of the degree of methylesterification of pectic polysaccharides by FT-IR using an outer product PLS1 regression. *Carbohydrate Polymers*, 50, 85–94.
- Belitz, H.-D., & Grosch, W. (1999). *Food chemistry*. Berlin: Springer.
- Blakeney, A. B., Harris, P. J., Henry, R. J., & Stone, B. A. (1983). A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research*, 113, 291–299.
- Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acid. *Analytical Biochemistry*, 54, 484–489.
- Chen, L. M., Carpita, N. C., Reiter, W. D., Wilson, R. H., Jeffries, C., & McCann, M. C. (1998). A rapid method to screen for cell wall-mutants using discriminant analysis of Fourier transform infrared spectra. *Plant Journal*, 16, 385–392.
- Chopin, T., & Whalen, E. (1993). A new rapid method for carrageenan identification by FT IR diffuse reflectance spectroscopy directly on dried, ground algal material. *Carbohydrate Research*, 246, 51–59.
- Coimbra, M. A., Barros, A., Barros, M., Rutledge, D. N., & Delgadillo, I. (1998). Multivariate analysis of uronic acid and neutral sugars in whole pectic samples by FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 37, 241–248.
- Coimbra, M. A., Barros, A., Rutledge, D. N., & Delgadillo, I. (1999). FTIR spectroscopy as a tool for the analysis of olive pulp cell-wall polysaccharide extracts. *Carbohydrate Research*, 317, 145–154.
- Coimbra, M. A., Delgadillo, I., Waldron, K. W., & Selvendran, R. R. (1996). Isolation and analysis of cell wall polymers from olive pulp. In H.-F. Linskens, & J. F. Jackson (Eds.), (Vol. 17) (pp. 34–35). *Modern methods of plant analysis*, Berlin: Springer.
- Čopíková, J., Synytsya, A., Černá, M., Kaasová, J., & Novotná, M. (2001). Application of FT-IR spectroscopy in detection of food hydrocolloids in confectionery jellies and food supplements. *Czech Journal of Food Science*, 19, 51–56.
- Dupuy, N., Wojciechowski, C., Huvenne, J. P., & Legrand, P. (1997). Mid-infrared spectroscopy and chemometrics in corn starch classification. *Journal of Molecular Structure*, 410–411, 551–554.
- Engelsen, S. B., & Norgaard, L. (1996). Comparative vibrational spectroscopy for determination of quality parameters in amidated pectins as evaluated by chemometrics. *Carbohydrate Polymers*, 30, 9–24.
- Femenia, A., Sánchez, E. S., Simal, S., & Rosselló, C. (1998). Effects of drying pretreatments on the cell wall composition of grape tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 271–276.
- Ferreira, D., Barros, A., Coimbra, M. A., & Delgadillo, I. (2001). Use of FT-IR spectroscopy to follow the effect of processing in cell wall polysaccharide extracts of a sun-dried pear. *Carbohydrate Polymers*, 45, 175–182.
- Filippov, M. P. (1992). Practical infrared spectroscopy of pectic substances. *Food Hydrocolloids*, 6, 115–142.
- Galat, A. (1980). Study of the Raman scattering and infrared absorption spectra of branched polysaccharides. *Acta Biochimica Polonica*, 27, 135–141.

- Harris, P. J., Blakeney, A. B., Henry, R. J., & Stone, B. A. (1998). Gas chromatographic determination of the monosaccharide composition of plant cell wall preparations. *Journal of AOAC International*, 71, 272–275.
- Jurasek, P., & Phillips, G. O. (1998). The classification of natural gums. Part IX. A method to distinguish between two types of commercial carrageenan. *Food Hydrocolloids*, 12, 389–392.
- Kačuráková, M., Capek, P., Sasinková, V., Wellner, N., & Ebringerová, A. (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: Pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 43, 195–203.
- Kačuráková, M., & Mathlouthi, M. (1996). FTIR and laser-Raman spectra of oligosaccharides in water: Characterization of the glycosidic bond. *Carbohydrate Research*, 284, 145–157.
- Kačuráková, M., & Wilson, R. H. (2001). Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. *Carbohydrate Polymers*, 44, 291–303.
- Mathlouthi, M., & Koenig, J. L. (1986). Vibrational spectra of carbohydrates. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 44, 7–89.
- Sekkal, M., & Legrand, P. (1993). A spectroscopic investigation of the carrageenans and agar in the 1500–100 cm⁻¹ spectral range. *Spectrochimica Acta*, 49A, 209–221.
- Selvendran, R. R., March, J. F., & Ring, S. G. (1979). Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fibre. *Analytical Biochemistry*, 96, 282–292.
- Wilson, R. H., & Belton, P. S. (1988). A Fourier-transform infrared study of wheat starch gels. *Carbohydrate Research*, 180, 339–344.
- Wilson, R. H., Goodfellow, B. J., & Belton, P. S. (1988). Fourier-transform infrared spectroscopy for the study of food biopolymers. *Food Hydrocolloids*, 2, 169–178.
- Wilson, R. H., Kalichevsky, M. T., Ring, S. T., & Belton, P. S. (1987). A Fourier-transform infrared study of the gelation and retrogradation of waxy-maize starch. *Carbohydrate Research*, 166, 162–165.

Mushrooms of Genus *Pleurotus* as a Source of Dietary Fibres and Glucans for Food Supplements

ANDRIY SYNYTSYA, KATEŘINA MÍČKOVÁ, IVAN JABLONSKÝ, MARCELA SLUKOVÁ
and JANA ČOPÍKOVÁ

*Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, Faculty of Food and
Biochemical Technology, Institute of Chemical Technology in Prague, Prague,
Czech Republic*

Abstract

SYNYTSYA A., MÍČKOVÁ K., JABLONSKÝ I., SLUKOVÁ M., ČOPÍKOVÁ J. (2008): **Mushrooms of genus *Pleurotus* as a source of dietary fibres and glucans for food supplements.** Czech J. Food Sci., **26**: 441–446.

Fruit bodies (separately pilei and stems) of mushrooms *Pleurotus ostreatus* (four strains) and *Pleurotus eryngii* were characterised as a source of polysaccharides. The contents of glucans and dietary fibres were determined with using the respective Megazyme enzymatic kits. Enzymatic analysis of the fruit bodies confirmed significant differences in the contents of these components among the species and strains. The stems contained more insoluble dietary fibres than the pilei in all the cases and more β -glucans in most cases. However, relatively high contents of β -glucan (20–50% of dry matter) could be a result of incomplete enzymatic hydrolysis of insoluble α -1,3-glucans. Nevertheless, low food quality stems of mushrooms *Pleurotus* sp. could be a valuable source of cell wall glucans for the preparation of food supplements.

Keywords: mushrooms *Pleurotus*; glucans; dietary fibres; food supplements

For millennia, humankind has been valued mushrooms as an important edible and medical resource (CHANG 1980; BREENE 1990; WASSER 2002). The dry matter of mushroom fruit bodies is about 5–15%, they have a very low fat content and contain 19–35% proteins. Mushroom fruit bodies are rich in vitamins, mainly B₁, B₂, C, and D₂ (MANZI *et al.* 1999; 2004; MATTILA *et al.* 2000), and contain some important elements such as K and P (VETTER 2007). The content of carbohydrates, which are mainly present as polysaccharides or glycoproteins, ranges 50–90%; the most abundant polysaccharides are chitin, α - and β -glucans

and other hemicelluloses (e.g. mannans, xylans and galactans). Mushroom polysaccharides are present mostly as glucans with different types of glycosidic linkages, such as branched (1→3),(1→6)- β -glucans and linear (1→3)- α -glucans, but some are true heteroglycans (WASSER 2002).

Mushrooms are a potential source of dietary fibres due to the presence of non-starch polysaccharides. Total dietary fibre (TDF) in mushrooms is the sum of intrinsic non-digestible carbohydrates, mainly chitin (VETTER 2007). Mushroom glucans are also components of soluble (SDF) or insoluble (IDF) dietary fibres (PROSKY *et al.*

Supported by the Czech Science Foundation (Grant No. 525/05/0273) and by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Project No. MSM 6046137305).

1988). Their solubility in water strongly depends on the molecular structure and conformation. Glucans bound to proteins or to chitin are usually insoluble in water.

Mushroom-derived substances with antitumour, immunomodulating, and antioxidative properties are currently used as dietary supplements. Mushroom polysaccharides with antitumour action differ greatly in their chemical compositions and configurations, as well as in their physical properties. Immunomodulatory and antitumour activities are exhibited by a wide range of glycans extending from homopolymers to highly complex heteropolymers; the differences in their activities can be correlated with the solubility in water, molecular size, branching rate and form (AUGUSTÍN 1998; OOI & LUI 1999; WASSER 2002; NOVÁK & VETVICKÁ 2008). Besides the well-known antitumour β -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-glucans (KUNIAK *et al.* 1992, 1998), a wide range of biologically active glucans of different structures have been described. Linear or branched polysaccharides chains occur with a backbone composed of α - or β -linked glucose units, and their various side chains can be attached in different ways. The main source of biologically active polysaccharides appears to be fungal cell walls consisting mainly of chitin-glucan complexes. However, fungal chitin has no antitumour activity (MIZUNO *et al.* 1995).

Commercial importance of fungal polysaccharides has attracted much attention in the field of functional foods, especially, commonly cultivated mushrooms of the genus *Pleurotus* are interesting because of their β -glucans demonstrating significant immunomodulative properties. Pleuran, a specific glucan isolated from *Pleurotus* sp., has a suppressive effect on tumours (KUNIAK *et al.* 1992; KARÁCSONYI & KUNIAK 1994). Mushrooms of genus *Pleurotus* are cultivated in several countries because of their high adaptability. Annual production of these mushrooms is more than 900 000 tons. There are a lot of different species in the genus *Pleurotus* that have pharmacological properties, for example *P. florida*, *P. tuber-regium*, *P. sajor-caju*, *P. pulmonarius*, *P. ostreatus*, and *P. eryngii* (RAGUNATHAN *et al.* 1996). It has been reported earlier that the fruit bodies and sclerotia of these species contain specific glucans (KARÁCSONYI & KUNIAK 1994; CHEUNG & LEE 1998; CHENGHUA *et al.* 2000; MANZI & PIZZOFRERATO 2000; ROUT *et al.* 2005). Biologically active glucans themselves or their complexes with proteins and other polysac-

charides isolated from the fruit bodies of these species are interesting for the preparation of novel food supplements.

The aim of this study was to characterise different parts of the fruit-bodies of the mushrooms *P. ostreatus* (four strains) and *P. eryngii* cultivated in the Czech Republic as a raw material for the preparation of food supplements and functional foods. The contents of glucans and dietary fibres in the pilei and stems were determined by enzymatic methods.

MATERIALS AND METHODS

Materials. The mushrooms *P. ostreatus* (strains 70, 77, L22, 137) and *P. eryngii* (non-specified strain) were cultivated under controlled conditions by the mushrooms grower Rudolf Ryzner in the region South Moravia, the Czech Republic. The fruit bodies (Figure 1) were subdivided into stems and pilei and homogenised with the laboratory dispenser DI 25 basic equipped with the dispersing element S25 N-25 G (IKA-Werke GmbH, Germany). The homogenised samples were kept at -20°C .

Analytical methods. The contents of total and α -glucans were determined in raw fruit bodies according to the Mushroom and Yeast β -glucan Assay Procedure K-YBGL 10/2005 (Megazyme, Ireland). Here, the estimation of non-starch glucans was based on the difference between glucose contents after total acidic hydrolysis of glucans and specific enzymatic hydrolysis of α -1,4-glucans. The samples were previously dried under a stream of nitrogen to ensure the correct acid concentration required for the hydrolysis. The glucan contents were calculated in dry matter. Total dietary fibres were determined as soluble and insoluble fractions according to the enzymatic method AOAC 991.43 combined with Total Dietary Fibre, K-TDFR 06/0 (Megazyme, Ireland). Relative standard deviations of the methods used were 6.1% (total and α -glucans) and 7.2% (total dietary fibres).

RESULTS AND DISCUSSION

Dietary fibres

Figure 2 shows the dietary fibre contents in dry matter (TDF – total dietary fibres, IDF – insoluble dietary fibres, SDF – soluble dietary fibres) in the fruit bodies (pilei and stems separately)

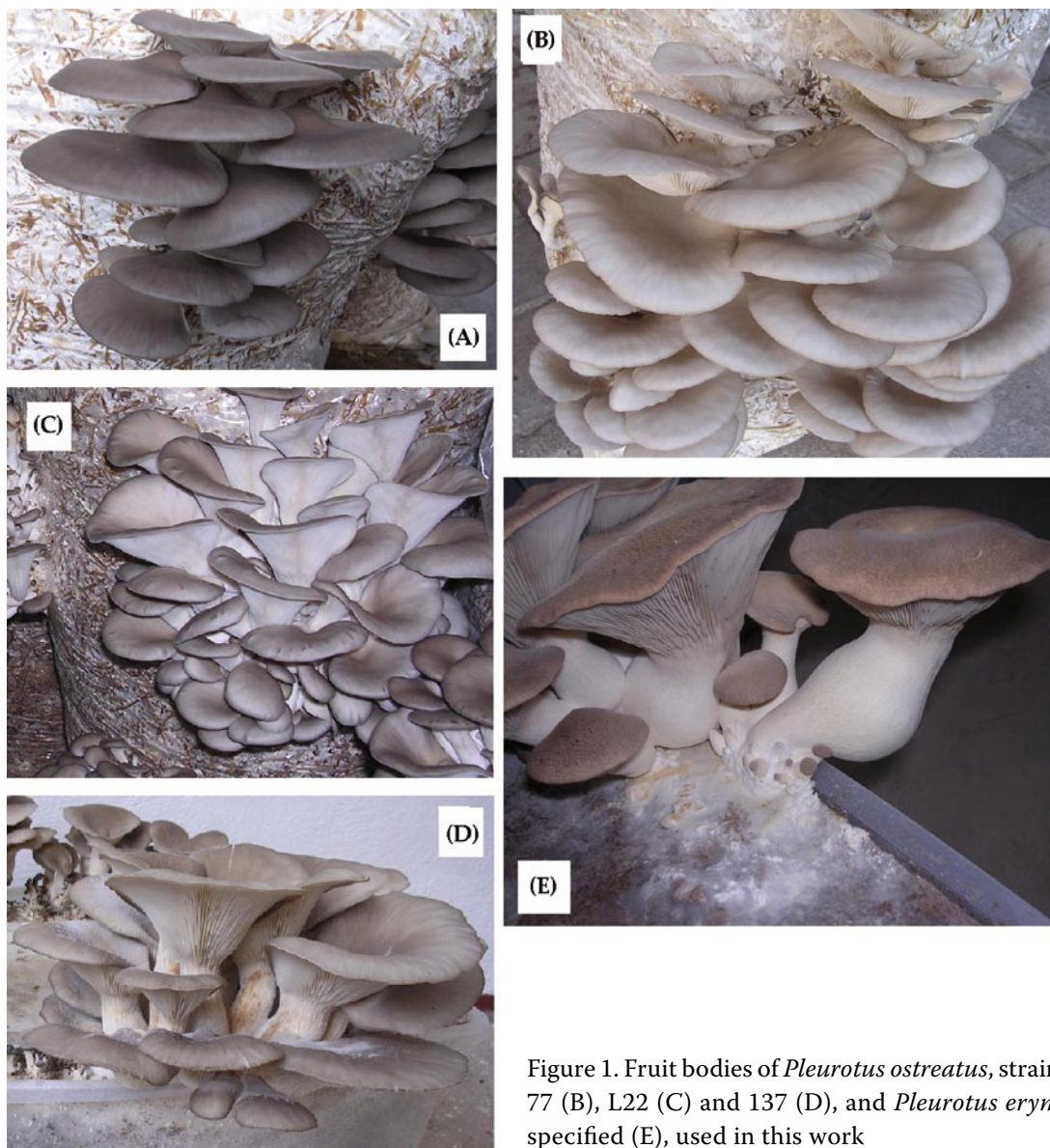


Figure 1. Fruit bodies of *Pleurotus ostreatus*, strains 70 (A), 77 (B), L22 (C) and 137 (D), and *Pleurotus eryngii*, non-specified (E), used in this work

of both *Pleurotus* species. The dry matter values of the fruit bodies (pilei and stems) ranged from 9.0% to 14.3%, confirming the high moisture content of these samples (BREENE 1990; MANZI *et al.* 1999). The TDF contents were 34.5–63.1% in pilei and 38.9–64.8% in stems. The highest TDF level (64.8%) was observed in the stems of strain 77, the lowest TDF level (34.5 %) in the pilei of strain L22 *P. ostreatus*. The TDF values of the latter strain are close to the earlier reported TDF values of *P. sajor-caju*: 33.1% for pilei and 35.5% for stems (CHEUNG 1996). In all the samples, the IDF contents (29.2–61.4%) were significantly higher than those of SDF (2.0–4.9%). The stems contained higher amounts of IDF (36.7–61.4%)

than, the pilei (29.2–51.4%). The SDF contents in the pilei (2.0–4.7%) and stems (3.3–4.9%) were comparable but showed evident specificity as to the strains and species. As a rule, the stems contained more TDF and IDF than the pilei; an exception was strain 77 of *P. ostreatus* showing reciprocal relations. For comparison, MANZI *et al.* (2001, 2004) reported dietary fibre values in fresh fruit bodies of *P. ostreatus* (47.3% TDF, 42.4% IDF and 5.0% SDF) and *P. eryngii* (34.6% TDF, 30.7% IDF and 4.0% SDF) related to dry matter like in the present work. Thus, our results are comparable with the literature data, although strains 77 and 70 showed significantly higher values of TDF and IDF which could be explained by the strain specificity.

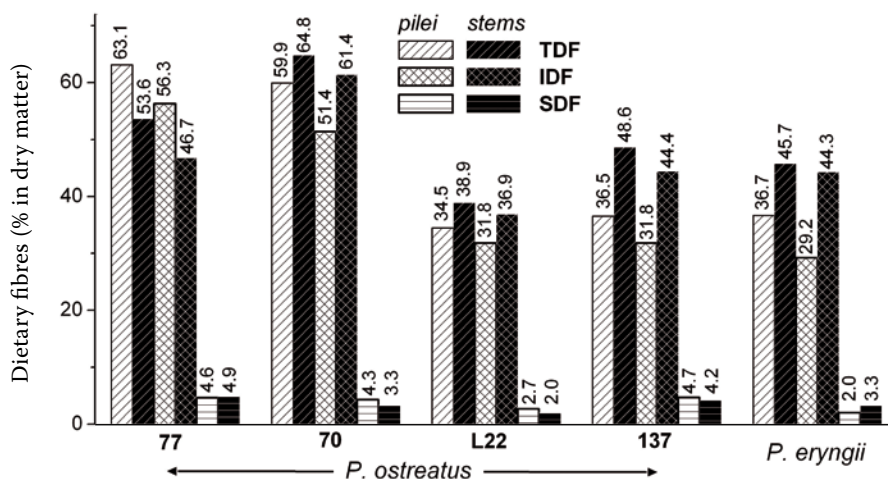


Figure 2. Contents of dietary fibres (TDF – total dietary fibres, SDF – soluble dietary fibres, IDF – insoluble dietary fibres) in pilei and stems of *P. ostreatus* (strains 77, 70, L22 and 137) and *P. eryngii* (non-specified)

Contents of glucans

The α - and β -glucan contents in the pilei and stems of *P. ostreatus* and *P. eryngii* are summarised in Figure 3. Total glucans were obtained by complete acidic hydrolysis of the samples, α -glucans by enzymatic hydrolysis with α -amylase and α -glucosidase. The fruit bodies contained small amounts of α -glucans: 3.4–7.9% in pilei and 3.0–7.6% in stems (*P. ostreatus*), and 3.6% in pilei and 4.3% in stems (*P. eryngii*). The contents of β -glucans, which were calculated as a difference between the total and α -glucans, were 27.4–39.2% in the pilei and 35.5–50.0 in the stems (*P. ostreatus*), and 20.4% in the pilei and 39.1% in the stems (*P. eryngii*). It is evident that the glucan contents showed topological specificity in the fruit bodies and significantly differed between the species of *Pleurotus* as well as between the individual strains of *P. ostreatus*. The fruit bodies of *P. eryngii* contained a lower amount of glucans than were those found in most

strains of *P. ostreatus*. In all the cases, the stems contained more β -glucans than the pilei. The highest level of β -glucans was found in the stems of strain 77 of *P. ostreatus* (50.0% in stems, 39.2% in pilei), while strain L22 showed the lowest level of β -glucans in the case of this species (35.5% in stems, 27.4% in pilei).

In contrast, according to enzymatic analysis based on direct hydrolysis by lichenase and β -glucanase, MANZI *et al.* (2000, 2001, 2004) reported about 1–2 order lower contents of β -glucan in fresh fruit bodies of *P. ostreatus* (0.24–0.38% and 1.6%) and *P. eryngii* (0.22–0.38% and 3.1%) related to dry matter. We suggest that out of the possible reasons for the low β -glucan content mentioned by the authors (MANZI & PIZZO FERRATO 2000), the most probable appears to be the presence of inert material in the fibre residue, maybe an insoluble chitin-glucan complex, that prevents the diffusion of enzymes during the β -glucan determination. This assumption is supported by the evident

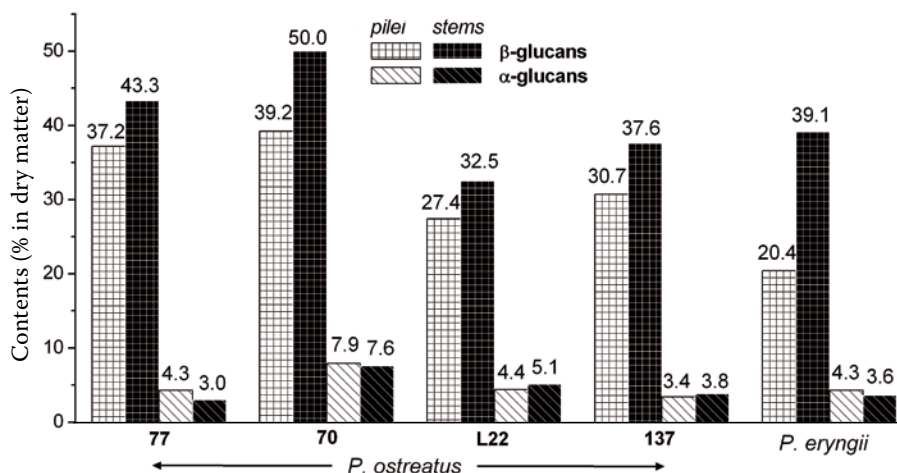


Figure 3. Contents of α - and β -glucans in pilei and stems of *P. ostreatus* (strains 77, 70, L22 and 137) and *P. eryngii* (non-specified)

increase of β -glucan content in the fruit bodies after cooking (partial degradation of insoluble chitin-glucan complex) or in the samples without previous washing with aqueous ethanol that may lead to removal of the low molecular fraction of β -glucan (MANZI & PIZZOFERRATO 2000; MANZI *et al.* 2001).

On the other hand, following the assumption mentioned, we cannot exclude that the relatively high contents of β -glucan obtained in this work (Figure 3) resulted from incomplete enzymatic hydrolysis of some cell wall α -glucans integrated into insoluble chitin-glucan complexes. Such α -glucans, which are not available for the enzymes commonly used in the set, can be structurally different from amylose or phytoglycogen. Linear α -1,3-glucan (pseudonigeran) as well as more complex polysaccharides including mixed α , β -glucans have been isolated from various mushrooms and microscopic fungi (HORISBERGER *et al.* 1972; KIHIO *et al.* 1989; CHEN *et al.* 1998; ZHANG *et al.* 1999; JIN *et al.* 2004; WANG *et al.* 2007); and our preliminary investigation confirmed their presence in the fruit bodies of *Pleurotus*. The susceptibility of specific fungal α -glucans to enzymatic hydrolysis by α -amylase and α -glucosidase has not yet been studied, so we cannot be fully confident that the method of β -glucan assay used in this work is more effective than that used by MANZI *et al.* (2000, 2001, 2004). To clarify this problem, we will report on further investigation devoted to the spectroscopic characterisation and enzymatic analysis of polysaccharide fractions isolated from the fruit bodies of *P. ostreatus* and *P. eryngii* (SYNYTSYA *et al.* 2009).

CONCLUSION

It can be concluded that the fruit bodies of *P. ostreatus* and *P. eryngii* contain significant amounts of β -glucans, which are components of both insoluble and soluble dietary fibres. The contents of these polysaccharides in the fruit bodies vary with the strains and species. The stems are a better source of IDF and glucans than are the gastronomically attractive pilei, and, therefore, the stems can be used for the preparation of biologically active polysaccharide complexes utilisable as food supplements. In relation to the significant difference between β -glucan contents obtained in this work and those reported earlier, further work is now in progress with the aim to evaluate the possible influence of non-starch

α -glucans on the enzymatic analysis for β -glucan in the fruit bodies of *Pleurotus*.

Acknowledgement: The authors thank to Ms JANA ČERNÁ and Ms RADKA ŠTOPLOVÁ for help with experiments.

References

- Application list: Mushroom and Yeast β -glucan Assay Procedure, K-YBGL 10/2005, Megazyme, Ireland. Available at: <http://secure.megazyme.com/downloads/en/performance/K-YBGL.pdf> (25.11.2008).
- Application list: Total dietary fibre, K-TDFR 06/01. Megazyme, Ireland. Available at: <http://secure.megazyme.com/downloads/en/data/K-TDFR.pdf> (25.11.2008).
- AUGUSTÍN J. (1998): Glucans as modulating polysaccharides: their characteristics and isolation from microbiological sources. *Biologia*, **53**: 277–282.
- BREENE W.F. (1990): Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. *Journal of Food Protection*, **53**: 883–894.
- CHANG S.T. (1980): Mushrooms as human food. *Bio-science*, **30**: 399–401.
- CHEN J., ZHOU J., ZHANG L., NAKAMURA Y., NORISUYE T. (1998): Chemical structure of the water-insoluble polysaccharide isolated from the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. *Polymer Journal*, **30**: 838–842.
- CHENGHUA D., XIANGLIANG Y., XIAOMAN G., YAN W., JINGYAN Z., HUIBI X. (2000): A β -D-glucan from the sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing. *Carbohydrate Research*, **328**: 629–633.
- CHEUNG P.C.K. (1996): Dietary fibre content and composition of some cultivated edible mushroom fruiting bodies and mycelia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**: 468–471.
- CHEUNG P.C.K., LEE M.Y. (1998): Comparative chemical analysis of fiber material prepared by enzymatic and chemical methods from two mushrooms (*Pleurotus sajor-caju* and *Pleurotus tuber-regium*). *Journal Agriculture Food Chemistry*, **46**: 4854–4857.
- HORISBERGER M., LEWIS B.A., SMITH F. (1972): Structure of a (1, 3)- α -D-glucan (pseudonigeran) of *Aspergillus niger* NNRL 326 cell wall. *Carbohydrate Research*, **23**: 183–188.
- JIN Y., ZHANG L., TAO Y., ZENG C., CHEN Y., CHEUNG P.C.K. (2004): Solution properties of a water-insoluble (1 $\rightarrow$ 3)- α -D-glucan isolated from *Poria cocos* mycelia. *Carbohydrate Polymers*, **57**: 205–209.
- KARÁCSONYI Š., KUNIAK L. (1994): Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus*: isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble β -D-glucan. *Carbohydrate Polymers*, **24**: 307–312.

- KIHO T., YOSHIDA I., NAGAI K., UKAI S., HARA C. (1989): (1→3)- α -D-glucan from an alkaline extract of *Agrocybe cylindracea*, and antitumor activity of its O-(carboxymethyl)ated derivatives. *Carbohydrate Research*, **189**: 273–279.
- KUNIAK L., AUGUSTÍN J., KARACSONYI K. (1992): Spôsob izolácie a adjustácie fungálneho β -1,3 glukánu. Patent Cs. 2761192.
- KUNIAK L., ZEMEK J., AUGUSTÍN J. (1998): Solution and purification of lichenan from Iceland moss. Patent Cs. 260347.
- MANZI P., PIZZO FERRATO L. (2000): Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry*, **68**: 315–318.
- MANZI P., GAMBELLI L., MARCONI S., VIVANTI V., PIZZO FERRATO L. (1999): Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. *Food Chemistry*, **65**: 477–482.
- MANZI P., AGUZZI A., PIZZO FERRATO L. (2001): Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chemistry*, **73**: 321–325.
- MANZI P., MARCONI S., AGUZZI A., PIZZO FERRATO L. (2004): Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. *Food Chemistry*, **84**: 201–206.
- MATILTA P., SUONPÄÄ K., PIIRONEN V. (2000): Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition*, **16**: 694–696.
- MIZUNO T., SAKAI T., CHIGARA G. (1995): Health foods and medicinal usage of mushrooms. *Food Review International*, **11**: 69–81.
- NOVAK M., VETVICKÁ V. (2008): β -Glucans, history, and present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action. *Journal of Immunotoxicology*, **5**: 47–57.
- OOI V.E.C., LIU F. (1999): A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, **1**: 195–206.
- PROSKY L., ASP N.G., SCHWEIZER T.F., DEVREIS J.W., FURDA I. (1988): Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry*, **71**: 1017–1023.
- RAGUNATHAN R., GURUSAMY R., PALANISWAMY M., SWAMINATHAN K. (1996): Cultivation of *Pleurotus* spp. on various agro-residues. *Food Chemistry*, **55**: 139–144.
- ROUT D., MONDAL S., CHAKRABORTY I., PRAMANIK M., ISLAM S.S. (2005): Chemical analysis of a new (1→3), (1→6)-branched glucan from an edible mushroom, *Pleurotus florida*. *Carbohydrate Research*, **340**: 2533–2539.
- SYNYTSYA A., MÍČKOVÁ K., SYNYTSYA A., JABLONSKÝ I., SPĚVÁČEK J., ERBAN V., KOVÁŘÍKOVÁ E., ČOPÍKOVÁ J. (2009): Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers*, in press.
- VETTER J. (2007): Chitin content of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*. *Food Chemistry*, **102**: 6–9.
- WANG T., DENG L., LI S., TAN T. (2007): Structural characterization of a water-insoluble (1→3)- α -D-glucan isolated from the *Penicillium chrysogenum*. *Carbohydrate Polymers*, **67**: 133–137.
- WASSER S.P. (2002): Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Application of Microbiological Biotechnology*, **60**: 258–274.
- ZHANG P., ZHANG L., CHEN S. (1999): Chemical structure and molecular weights of α -(1→3)-D-glucan, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **63**: 1197–1202.

Received for publication October 27, 2007

Accepted after corrections November 26, 2008

Corresponding author:

Mgr. ANDRIY SYNYTSYA, Ph.D., Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav chemie a technologie sacharidů, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika
tel.: + 420 220 443 114, fax: + 420 220 445 130, e-mail: sinicaa@vscht.cz

20th International Congress of Chemical and Process Engineering CHISA 2012
25 – 29 August 2012, Prague, Czech Republic

The choice of nutritionally lucrative flour streams from barley milling flow

N. Velebna, M. Slukova a*, I. Honcu, J. Prihoda

Institute of Chemical Technology in Prague, Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, 166 28 Prague

Abstract

The scheme of flour milling in mill can be expressed in diagram as a milling flow. There can be described a weight part or percentage of flour from every stage of breaking, scratch and reduction. The similar flow diagram can be drawn expressing the ash content in every of flour streams of a whole milling flow. A milling flow of barley is considerably different from that of wheat and to some part also from rye mill flow. Currently, high-yielding naked barley cultivars are preferred in the Western world, and they can be used in products where outstanding starch or non-starch polysaccharide properties are required. The aim of this work was to assess the milling results with regard to the yield of single streams in connection with their chemical composition, especially β -glucans (fiber) content. Barley sample was naked barley of Czech origin of crop 2010. The balance tables showing the yield of β -glucans and ash in single streams were compiled. Resulting data were judged in comparison to the milling flow with the purpose to recommend the parameters and best streams of milling flow as a source of special nutritionally lucrative products.

© 2012 Published by Elsevier Ltd. Selection under responsibility of the Congress Scientific Committee (Petr Kluson) Open access under [CC BY-NC-ND license](#).

Keywords: barley; milling; streams; β -glucans

1. Introduction

Barley (*Hordeum vulgare*) is one of the oldest agricultural crops worldwide and is one of the economically most important plants. Until recently, the majority of barley grown in Czech Republic consumed as feed, in malting and brewing, and as barley pearls and flakes. Recently we have observed a

* Corresponding author. Tel.: +420-220-443-120; fax: +420-220-445-130.
E-mail address: Marcela.Slukova@vscht.cz

renewed interest in barley bread, bakery and pasta production.

The major components of barley grain are starch (source of energy), non-starch polysaccharides call dietary fiber (effect on the activity of human body) and protein (nutritional value and technological quality). Barley is a source of the range of bioactive ingredients (dietary fiber, phytate, phenolic compounds) and the consumption of barley products is associated with positive health effects and benefits. The considerable amount of nutritionally important fiber has focused a lot of attention on the matter of designing new foods containing barley, mainly barley flour, barley milling fractions, and pearl. The dominating soluble fibers components in barley are the β -glucans and the arabinoxylanes, located mainly in the cell walls of the endosperm and the aleurone layer.

Barley genotypes have been classified as hull-less or naked and hulled. Naked cultivars have better nutritional value than hulled ones as they contain more proteins, lipids and soluble dietary fiber. Naked barley flour was incorporated into white and wholegrain wheat bread and the bread showed acceptable and desirable nutritional and sensory properties [1]. Milling fractions of naked barley, and dough and bread with naked barley flour were analyzed with regard to properties of β -glucans (viscosity and molecular weight distribution), dough formation and bread making [2]. The distribution of nutrients and functional constituents in the barley kernel is not uniform. Barley fractions rich in β -glucans have been obtained by various combinations of pearling, grinding, sieving and air classification. Physicochemical properties of naked barley fiber-rich fractions varying in particle size were investigated [3]. Izydorczyk *et al.* (2003) [4] reported a simplified roller milling procedure that gives a high yield of a fiber-rich fraction from naked barley.

Barley flour is generally produced by roller milling. A milling flow of barley is considerably different from that of wheat and to some part also from rye mill flow. The milling of barley is more simply. The rye mill with modified setting of passing is often used for barley milling fractions and flours. Barley bran is brittle and shatters regardless of kernel conditioning, which makes milling of barley into sifted flour difficult and yields are low compared with wheat milling [5]. The milling performance of North European naked barleys was studied. Four samples of barley were milled in a laboratory mill and individual and combined milling fractions were characterized [6]. The chemical composition (ash, protein, starch, β -glucan and arabinoxylan) of the milling fractions varied depending on barley type. Fractions with higher contents of β -glucan can be obtained by air classification [7]. Bran has been produced from hull-less barley at a yield of about 30% and with a β -glucan content of 6.5% [5].

Barley flour showed variations in water absorption capacity and baking performance with different polysaccharide content and composition [8].

The aim of this work was to assess the milling results with regard to the yield of single milling streams in connection with their chemical composition, especially β -glucans content. Barley sample was a naked (hull-less) barley of Czech origin of crop 2010. Resulting data were judged in comparison to the milling flow with the purpose to recommend the parameters and best streams of milling flow as a source of special nutritionally lucrative products.

2. Experimental

2.1 Milling

A naked barley variety (2-rowed, spring, 2010 crop, grown in the Czech Republic) was processed on twenty four milling fractions (passages) in the industrial mill in Křesín (Czech Republic). The milling of whole barley grain took place according to the diagram of a milling flow (Fig. 1). This milling procedure involved fourteen flour passages (the letter F in the text) and nine break passages (the letter B in the text) and bran. There was described a weight part or percentage of flour and break from every stage of breaking, scratch and reduction (Table 1). The similar flow diagram was drawn expressing the ash content in every of flour and break streams of a whole milling flow (Table 1).

2.2 Characterization of milling fractions

Fourteen flour fractions, nine break fractions and a sample of bran were analyzed. Moisture content was determined by drying the samples at 105 °C to constant weight (ICC 110/1, 1996) [9]. Ash content was determined by burning at 925 °C to constant weight (ICC 104/1, 1996). Nitrogen content was measured by using the Kjeldahl method and multiplied by a factor 5.7 to determine the protein content (ICC 105/2, 1996). The soluble, insoluble and total dietary fiber content was determined in analyzed samples according to the method AOAC 985.29 (AOAC, 1990) [10] combined with Total dietary fiber assay kit K-TDFR 01/04 (Megazyme International Ireland Ltd., Wicklow, Ireland). The content of mixed linkage (1→3)(1→4)-β-D-glucans was determined according to the AACC Method 32-23 [11] combined with McCleary method assay procedure K-BGLU (Megazyme International Ireland Ltd., Wicklow, Ireland). Sedimentation test of SRC (solvent retention capacity profile) (AACC 56-11) was based on the reaction of individual components (gluten, damaged starch, arabinoxylans-pentosans) of flours with water and aqueous solvents of sucrose, sodium carbonate or lactic acid.

All the determinations were carried out in duplicate and were expressed on dry weight basis. The relationships among the different analytical parameters of analyzed milling fractions were tested by a simple correlation (Pearson correlation). Significant differences were declared at $P < 0.05$.

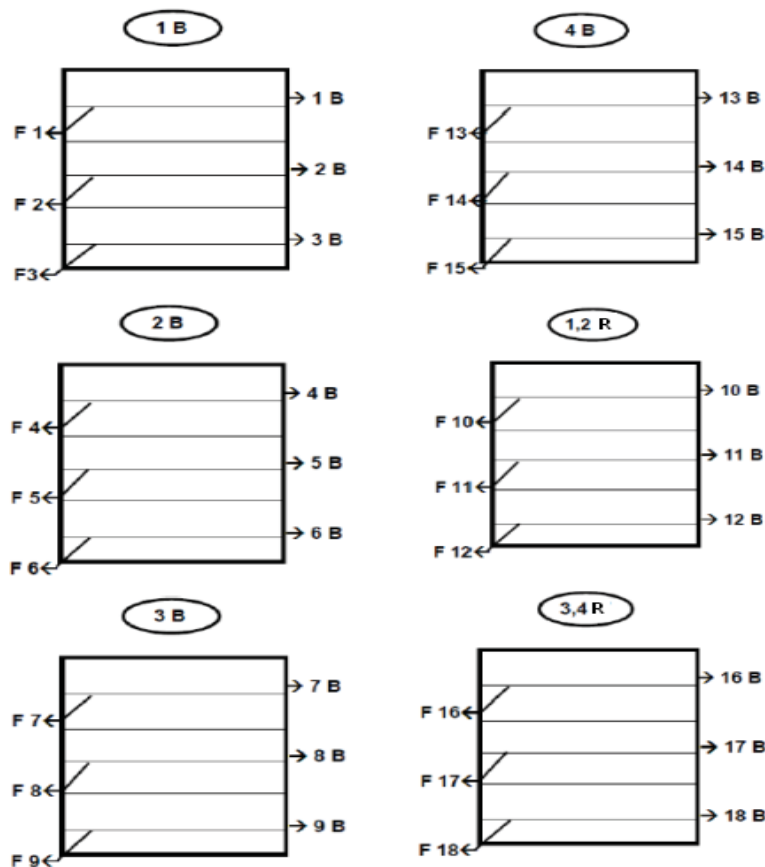


Fig. 1. Milling scheme of a barley (B ... breaks passage, breaking procedure, R ... reduction procedure)

Table 1. The yield of single barley streams and balance of ash and β -glucan

Passages	Yield (kg/h)	Portion of passages (%)	Ash (%)	Ash balance	β -glucan (%)	β -glucan balance
F1	72.31	8.51	1.05	0.0891	2.2	0.1914
F2	3.20	0.38	1.19	0.0045	2.1	0.0078
F3	1.71	0.20	2.11	0.0042	6.4	0.0127
F4	22.06	2.59	1.91	0.0494	5.4	0.1386
F7	8.39	0.99	1.32	0.0131	3.0	0.0296
F8	1.12	0.13	1.58	0.0020	3.2	0.0042
F9	0.60	0.07	1.95	0.0014	5.1	0.0036
F10	43.36	5.10	3.11	0.1584	5.6	0.2840
F11	88.23	10.38	2.02	0.2095	4.7	0.4828
F12	9.00	1.06	2.77	0.0294	5.8	0.0619
F14	0.97	0.11	1.71	0.0019	4.5	0.0050
F16	31.21	3.67	1.38	0.0508	2.7	0.0995
F17	35.77	4.21	5.10	0.2148	3.1	0.1293
F18	19.35	2.28	1.93	0.0440	4.8	0.1088
B1	40.96	4.82	2.27	0.1096	3.7	0.1760
B4	31.70	3.73	1.53	0.0569	4.6	0.1703
B6	21.27	2.50	2.65	0.0662	4.6	0.1138
B7	2.03	0.24	3.84	0.0092	5.8	0.0140
B11	316.42	37.22	4.29	1.5964	4.4	1.6454
B12	7.17	0.84	3.11	0.0261	6.3	0.0530
B15	0.37	0.04	2.62	0.0010	6.4	0.0026
B17	51.31	6.03	2.92	0.1763	6.5	0.3903
B18	41.70	4.90	4.22	0.2066	6.2	0.3049
bran	127.53	13.04	4.67	0.6091	6.0	0.7774

3. Results and discussion

The yield and portion of single barley streams is showed in Table 1. Passages F1, F10, F11, B1, B17 and B18 were high-yielding passages. The highest yield showed the break passage B11 (319.42 kg/h) and bran (127.53 kg/h). The lowest yield was 0.37 kg/h (B15) and 0.60 kg/h (F9).

The higher content of ash had flour fraction F17 (5.10%), break fractions B11 (4.29%) and B18 (4.22%) and barley bran (4.67%) (all values are related to dry matter) (Table 1). Ash balance was compiled with regard to portion of passage and its ash content.

Content of β -glucans ranged from 3.7% to 6.5% in break fractions and from 2.1% to 6.4% in flour fractions. The highest level of β -glucans was found in fraction F3 (6.4%) and F12 (5.8%) and in break fractions B12, B15, B17 and B18 (over 6%).

Starch was the major component of all observed fractions of flour (47.5 to 66.8%) and break (48.0 to 56.5%). The protein content ranged from 6.7% (F4) to 12.2% (F16) and from 9.1% (B1) to 14.3% (B9).

The comparison of β -glucans and protein content in studied fractions is showed in Fig. 2. Statistically significant strong positive correlations were observed between β -glucan and protein ($r=0.86$, $P<0.05$).

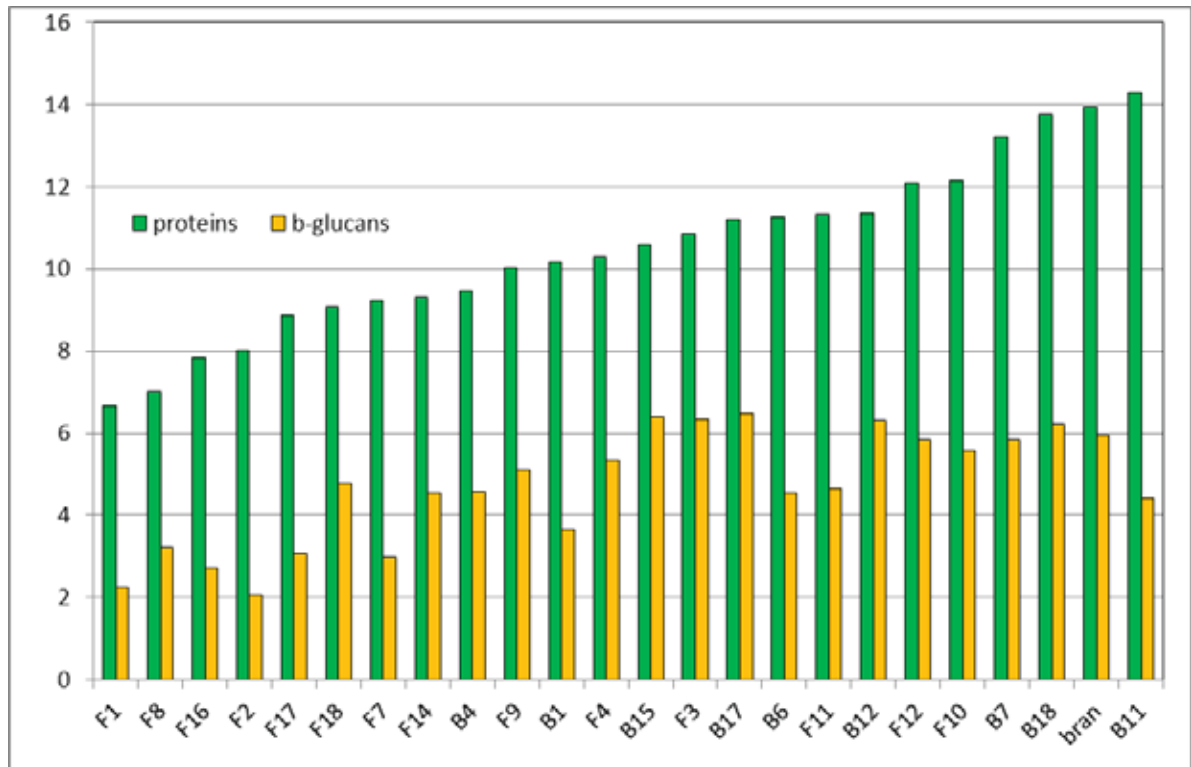


Fig. 2. Comparison of the content of β -glucans and proteins in barley fractions

Passages F9, F10, F11, F12, F14, F16, F17, F18, B7 and B12 were rich in dietary fiber. The content of total dietary fiber ranged from 5.1% (F1) to 22.7% (F16) and in selected break fractions from 15.0% (B12) to 25.5 % (B7) (Fig. 3). The insoluble dietary fiber involved a predominant part of total fiber (except for a fraction F7).

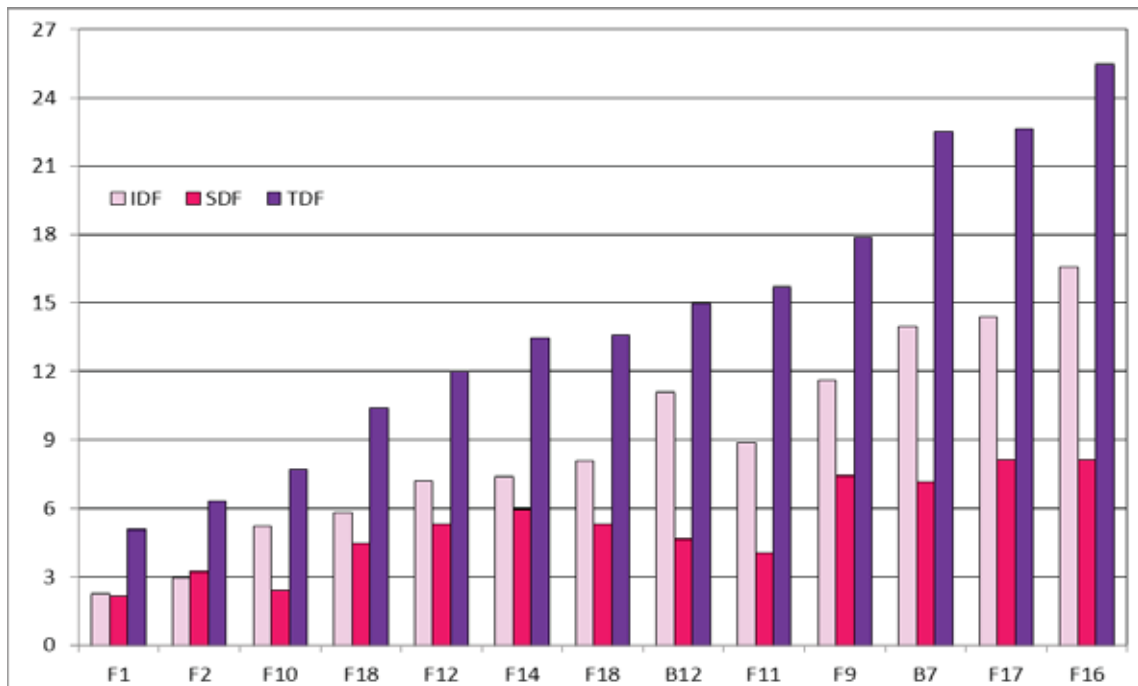


Fig. 3. The content of dietary fiber in selected samples of flours and breaks (IDF - insoluble dietary fiber, SDF - soluble dietary fiber, TDF - total dietary fiber)

Solvent retention profile (SRC) of milling barley fractions is showed in Fig. 4. The value of SRC of lactic acid (SRC 4) characterized the high content of glutelins (high molecular protein fraction) in flour fractions F12, F16 and F18 (value about 160%) and in break fractions B7 to B18 (values from 173% to 213 %). It corresponded to the increase of protein content determined by Kjeldahl. The highest content of glutelin was found in break fraction B9 (219 %). It is very interesting to find such a high content of glutelin in break fractions.

The retention capacity of sodium carbonate (SRC 3), which is related to the content of damaged starch, is more evident in flour fraction F9 (170%) and in break fraction B18 (273%). The results show that higher value of SRC 3 in compared with the values of SRC 3 of flour fraction was found in the break fractions (especially from B7 to B18).

The increased value of SRC of sucrose (SRC 2) indicated higher content of arabinoxylans in fractions F16 (213%) and F18 (188%). The highest amount of arabinoxylans was found in break fractions from B7 to B18 (values from 231 to 317%).

The highest of water absorption was caused by the present of water-soluble components (β -glucans and arabinoxylans). The highest weight of retained water was observed in fraction F16 (155%) and F18 fraction (160%), and in break fraction B9 (213%) and B18 (190%).

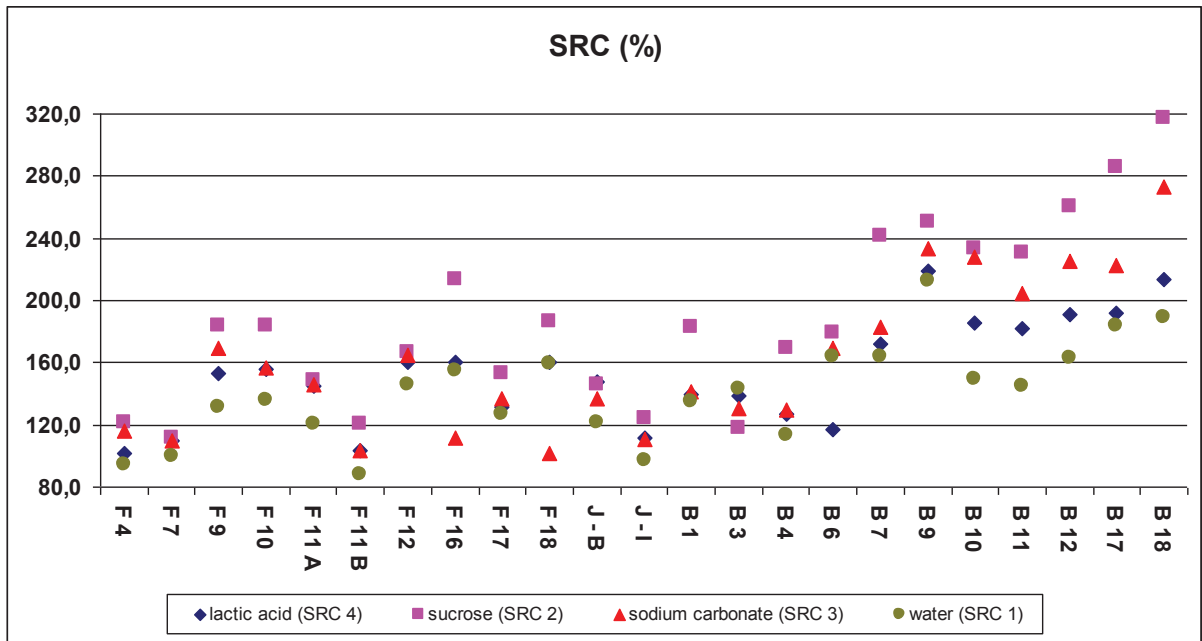


Fig. 4. Solvent retention capacity profile of analyzed barley milling passages

Statistically significant strong positive correlations were observed between β -glucan and soluble dietary fiber ($r=0.88$, $P<0.05$) and between β -glucan and SRC of sucrose ($r=0.93$, $P<0.05$). A strong positive correlation between the content of β -glucan and protein and between β -glucan and soluble fiber was confirmed with the results obtained by Holtekjølén *et al.* (2006) [12]. Positive correlations were found between soluble dietary fiber and SRC of water ($r=0.95$, $P<0.05$), between proteins and total dietary fiber ($r=0.88$, $P<0.05$). Significant negative correlations were observed between protein and starch ($r=-0.83$, $P<0.05$) and between content of β -glucan and starch ($r=-0.69$, $P<0.05$).

4. Conclusions

The single milling barley fractions were characterized by different composition and physicochemical properties. It was possible to select lucrative flour and break milling fractions with desired composition from the set of fractions. Optimal fractions F4, F10, F11, F17, F18, B11 and B17 were chosen according to their yield, nutrition and technology.

Acknowledgments

This work was supported by the project New Food No QI111B053 and No 6046137305. The authors are grateful for the technical support from the Zeelandia Company (Malšice, Czech Republic) and Automatic Mills Company (Dr. Klíma, Křesín, Czech Republic).

References

- [1] Škrbić B, Milovac S, Dodig D, Filipčev B. Effects of hull-less barley flour and flakes on bread nutritional composition and sensory properties. *Food Chem* 2009;**115**:982-988.
- [2] Andersson AAM, Armö E, Grangeon E, Fredriksson H, Andersson R, Åman P. Molecular weight and structure units of (1→3,1→4)- β -glucans in dough and bread made from hull-less barley milling fractions. *J Cereal Sci* 2004;**40**:195-204.
- [3] Izydorczyk MS, Chornick TL, Paulley FG, Edwards NM, Dexter JE. Physicochemical properties of hull-less barley fibre-rich fractions varying in particle size and their potential as functional ingredients in two-layer flat bread. *Food Chem* 2008;**108**:561-570.
- [4] Izydorczyk MS, Dexter JE, Desjardins RG, Rossnagel BG, Lagassee SL, Hatcher DW. Roller milling of Canadian hull-less barley: Optimization of roller milling conditions and composition of mill streams. *Cereal Chem* 2003;**80**:637-644.
- [5] Bhatti RS. β -glucan content and viscosities of barleys and their roller-milled flour and bran products. *Cereal Chem* 1992;**69**:469-471.
- [6] Andersson AAM, Courtin CM, Delcour J, Fredriksson H, Schofield JD, Trough I, Tsiami AA, Åman P. Milling performance of North European hull-less barleys and characterization of resultants millstreams. *Cereal Chem* 2003;**80**:667-673.
- [7] Andersson AAM, Andersson R, Åman P. Air classification of barley flours. *Cereal Chem* 2000;**77**:463-467.
- [8] Holtekjølén KA, Olsen RHH, Færgest ME, Uhlen KA, Knutsen HS. Variations in water absorption capacity and baking performance of barley varieties with different polysaccharide content and composition. *Food Sci Technol* 2008;**41**:2085-2091.
- [9] ICC, Standards Methods, International Association for Cereal Science and Technology, 6th ed., Vienna, Austria, 1996.
- [10] AOAC, Official Methods of analysis, Association of Official Analytical Chemists, 15th ed., Washington, USA, 1990.
- [11] AACC, Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 10th ed., St.Paul, Minnesota, USA, 2000.
- [12] Holtekjølén AK, Uhlen AK, Bråthen E, Sahlstrøm S, Knutsen SH Contents of starch and nonstarch polysaccharides in barley varieties of different origin. *Food Chem* 2006;**94**:348-358.

The Advanced Approaches to Nutritional and Breadmaking Quality of Wheat, Barley and Rye Flour

Marcela Slukova, Nikoleta Velebna, Lucie Krejcirova, Iva Honcu and Eva Budilova

Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, Institute of Chemical Technology Prague, Technicka 5, Prague 6, 166 28, Czech Republic

Received: February 29, 2012 / Published: April 20, 2012.

Abstract: This work is focused on the characterization and rapid analytical determination of cereal flour quality with regard to nutritional and breadmaking quality. Starch, protein and non-starch polysaccharides are the main components of cereals. The content and quality of proteins and content of damaged starch is important because of the technological quality of flours. The high content of high molecular weight proteins is substantial for bread technology especially, while soluble protein fractions and non-starch polysaccharides are important for nutrition. The set of wheat, barley and rye flours and their blends were analyzed and their properties and their qualitative parameters were determined. Principal component analysis (PCA) was used on Fourier transform-infrared (FT-IR) spectra in the 1,200-800 cm^{-1} wavenumber region and significant correlations of various nutritional and breadmaking parameters were observed. Results showed that the FT-IR spectroscopy and PCA can serve for rapid screening and classification of cereal flour quality.

Key words: Cereals, flour, quality, FT-IR spectroscopy, PCA.

1. Introduction

Cereals play the main role in the agricultural production of the majority of countries. This fact is connected first of all with the importance of cereals in nutrition. The greatest part of wheat and rye is used for bread and bakery products in Northern, Central and Eastern Europe and they contribute to an important source of protein and dietary fiber in the diet as well as in the Czech Republic. Wheat is the most important crop for breadmaking because of its supreme baking performance in comparison with all other cereals. Only wheat proteins can make the three-dimensional network (gluten structure) of wheat dough during mixing and kneading of dough. However, wheat is lower in dietary fiber content and the nutritive value of bread could be increased by a supplementation of rye and barley or an addition of isolated dietary fiber into

the bread formula [1-3]. However, Hung [4] presented a new kind of whole waxy wheat with higher dietary fiber content than regular whole wheat flour. Among commonly grown cereals, whole grain rye has the highest dietary fiber content [5]. Rye is considered to be a healthy cereal with regard to a number of bioactive compounds such as phenolic acids, lignans and also alkylresorcinols [6]. Recently we have observed a renewed interest in barley for food production [7]. As the latest investigations were accomplished in barley breeding, the new beta-glucan-rich barley for baking was developed [8]. Hull-less cultivars of barley have better nutritional value than hulled ones with regards to higher protein and soluble dietary fiber content. A hull-less barley flour was incorporated into white and wholegrain wheat bread and the bread showed acceptable and desirable nutritional and sensory properties [9].

The main components of cereals are carbohydrates (unavailable: non-starch polysaccharides, dietary fiber

Corresponding author: Marcela Slukova, Ph.D., researcher, research field: cereal science and technology. E-mail: Marcela.Slukova@vscht.cz.

and available: starch) and proteins. Starch is a major food reserve providing a bulk nutrient and energy source with high glycemic response in the human diet [10]. The content of starch in a cereal grain varies but generally it is between 60% and 75% of the weight of the grain. During cereal processing and grain milling in particular, the content of damaged starch is raised in the flour and can influence the technological quality of flour and handling of dough. Starch granule size distribution is an important factor that affects the quality of final cereal products. The effects of wheat starch granules size distribution were observed on mixing and breadmaking quality [11]. The determination of total or damaged starch can be carried out by chemical end group analysis or modern enzymatic methods. Determination of starch content by hydrochloric acid dissolution consists of break-down of starch in acid and measuring of the optical rotation of formed products in solution. The determination is more exacting and Carrez solutions (one of them contains cyanide) are necessary to protein precipitate. Measurement of total or damaged starch by enzymatic kit is rapid, easy but expensive.

The content of proteins in the fully-grown grains varies from 8% to 15% in dry matter. Dominant part of proteins is stored in endosperm and aleuronic layer of cereal grain. Cereal proteins have a high content of glutamine and proline and a very low content of essential amino acids as lysine and threonine. The earliest classification of cereal storage proteins is based on their solubility properties and it is often called Osborne fractionation [12]. Albumins and globulins belong to water-soluble fractions with low molecular weight and especially have the nutritive importance. Gliadins (prolamins) and glutelins have higher molecular weight (from 30 kDa to 20 MDa) and they are extracted in alcohol-water mixture and alkaline-water mixture, respectively. The ratio between high and low molecular weight gluten fractions is predominant for baking performance. Therefore, it seems that the greater the content of large

molecular weight glutenin subunits, the larger the glutenin polymers and the stronger the flour [13]. Tatham [14] published the up-to-date review of wheat, barley and rye prolamins structure, physical chemistry and their functional properties. Protein in flour can be determined chemically by the Kjeldahl method, but the procedure is very complex. The indirect test by near-infrared spectroscopy (NIR) is very widely used in the milling industry but calibration should be carrying out carefully. The particular protein fractions can be separated by liquid chromatography with reverse phase and UV detection. The baking quality of gluten can be expressed by degree of sedimentation (according to Zeleny) of flour suspended in a lactic acid solution during standard time interval.

Dietary fiber is the edible part of the plants or analogous carbohydrates that are resistant to digestion and absorption in the human small intestine with complete or partial fermentation in the large intestine [15]. Detailed medical experiments indicated [16, 17] that dietary fiber can stimulate weakening of hunger, stimulating peristaltic movements, reducing the level of blood glucose, regulating the activity of microbial flora, lowering of cholesterol blood serum level and decreasing of the risk of civilization diseases [18].

Dietary fiber can be classified into water-soluble (SDF) and water-insoluble dietary fiber (IDF) according to their water solubility. The significant components of cereal water-soluble fiber are β -glucans, arabinoxylans, galactomannans, fructans and arabinomannans which can form viscous solutions. Water-insoluble dietary fiber consists of cellulose, hemicelluloses and lignin primarily. Lignin is a lipophilic phenolic polymer that can absorb bile acid [3]. The content of β -glucans and fiber is determined mostly enzymatically. Determination of fibre content is time consuming and expensive (enzyme assay kit, reagents).

Original gravimetric, enzymatic and chemical methods of analysis were not capable to determine reproducibly and quickly the properties and constituents of grain mixtures. On the other hand,

vibrational spectra have recently found their importance in qualitative food analysis [19]. Mid infrared spectroscopy in the wavenumber range 4,000–400 cm^{-1} is a rapid, sensitive and versatile tool for elucidating the structure and physical properties of starch [20] and other carbohydrates [21]. The most important strong absorptions for starch are at 1,150, 1,075 and 1,015 cm^{-1} assigning the bending vibration of (CO) groups, and medium absorptions at 845 cm^{-1} assigning the bending vibration (C₁-H) of β -anomer [20, 22].

Proteins have several strong absorptions in infrared region due to the presence of peptide bond CO-NH. The strongest are stretching vibration of (N-H) groups at wavenumber 3,300–3,200 cm^{-1} (Amide A), stretching vibration of (C = O) at 1,690–1,620 cm^{-1} (Amide I), bending vibration of (N-H) (Amide II) at 1,550–1,500 cm^{-1} and bending vibration of (N-H)/(C-H) at 1,300–1,200 cm^{-1} (Amide III) [23].

Absorbance of specific peaks in the mid infrared spectrum can be correlated with particular cell wall molecules: cellulose 1,162, 1,120, 1,059, 1,033, 930 and 898 cm^{-1} ; β -glucan 1,151, 1,140, 1,076, 1,041, 1,026, 916 and 840 cm^{-1} ; arabinoxylans 1,166 and 998 cm^{-1} ; glucomannan 1,150, 1,092, 1,064, 1,034, 941, 898, 872 and 814 cm^{-1} ; and arabinogalactan 1,139, 1,078, 1,043, 985, 880 and 842 cm^{-1} [24–26]. The characteristic wavenumbers for cell wall non-starch polysaccharides were selected on the basis of the application of chemometric analysis [24]. It was also proved to be useful for a quick evaluation of polysaccharides used as additives in foodstuffs [27].

The aim of this work was to determine the quality of selected flours using several analytical methods to find the relationship among flour quality parameters. The set of Czech and Moravian wheat, barley and rye flours and their blends were analyzed and their qualitative parameters, such as content of moisture, ash, protein and starch, protein fractions, value of sedimentation Zeleny test, solvent retention capacity profile, gluten index, content of soluble, insoluble and total dietary fiber and β -glucans, were determined.

Fourier transform-infrared spectroscopy and principal component analysis were applied to correlate various nutritional and breadmaking parameters.

2. Materials and Methods

2.1 Sample Characterization

Totally 34 samples of commercial flours from wheat (*Triticum aestivum*) (winter), barley (*Hordeum vulgare*) (2-rowed, spring, hull-less) and rye (*Secale cereale*) were analyzed. 7 samples of wheat flours growing in 2010 in different Czech regions, 12 samples of wheat flours growing in 2010 in different regions of Moravia, 3 samples of barley flours (Czech region, 2010 crop), 1 sample of barley bran (Czech region, 2010 crop), 1 sample of rye flour (Czech region, 2010 crop) and 10 samples of flours blends were used as experimental materials (Table 1). The blends were prepared by mixing in various proportions of cereals (20%, 30%, 40%, 50% and 60% portions of barley to wheat; and blends wheat:rye:barley 30%:10%:60%, 25%:15%:60% and 20%:20%:60%). Samples no. 15 and 16 were wheat flours for biscuits and cookies, samples no. 17 and 18 were blends wheat-rye flours for bread and bakery production. Samples no. 19–34 were wheat flours for bread production. All flours were sieved through a 0.8 mm sieve.

2.2 Chemical Analysis

Moisture content was determined by drying at 105 °C to constant weight [28]. Ash content was determined by burning the samples at 925 °C to constant weight [28]. The soluble, insoluble and total dietary fiber content was determined according to the method AOAC 985.29 [29] combined with total dietary fiber assay kit K-TDFR (Megazyme International Ireland Ltd., Wicklow, Ireland). The content of mixed linkage (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucans was determined according to the AACC Method 32-23 [30] combined with McCleary method assay procedure K-BGLU (Megazyme International Ireland

Table 1 Summary of analyzed samples of flours and their blends.

Sample No.	Type of flour	Origin location
1	wheat	Czech
2	barley:wheat (20%:80%)	Czech
3	barley:wheat (30%:70%)	Czech
4	barley:wheat (40%:60%)	Czech
5	barley:wheat (50%:50%)	Czech
6	barley:wheat (60%:40%)	Czech
7	wheat:rye:barley (20%:20%:60%)	Czech
8	wheat:rye:barley (25%:15%:60%)	Czech
9	wheat:rye:barley (30%:10%:60%)	Czech
10	barley	Czech
11	barley bran	Czech
12	barley	Czech
13	barley	Czech
14	rye	Czech
15	soft wheat for cookie	Czech
16	soft wheat for cookie	Czech
17	wheat: rye (70:30) for bread	Czech
18	wheat: rye (60:40) for bread	Czech
19	wheat for bread and bakery	Czech
20	wheat for bread and bakery	Czech
21	wheat for bread and bakery	Czech
22	wheat for bread and bakery	Czech
23	wheat for bread and bakery	Moravia
24	wheat for bread and bakery	Moravia
25	wheat for bread and bakery	Moravia
26	wheat for bread and bakery	Moravia
27	wheat for bread and bakery	Moravia
28	wheat for bread and bakery	Moravia
29	wheat for bread and bakery	Moravia
30	wheat for bread and bakery	Moravia
31	wheat for bread and bakery	Moravia
32	wheat for bread and bakery	Moravia
33	wheat for bread and bakery	Moravia
34	wheat for bread and bakery	Moravia

Ltd., Wicklow, Ireland). Total starch content was quantified enzymatically by a total starch assay kit from Megazyme (AACC 76-13) [30]. Nitrogen content was measured using the Kjeldahl method and multiplied by a factor 5.7 to determine the protein content (ICC 105/2, 1996) [28]. Fractionation of proteins was performed by modified procedure [31]. Determination of gluten quality by means of the sedimentation index (Zeleny test) (ISO 5529:2007) [32] and gluten index (GI) (AACC 38-12) [30] was

carried out. Sedimentation test of SRC (solvent retention capacity) profile (AACC 56-11) [30] was based on the reaction of individual components (gluten, damaged starch, arabinoxylans-pentosans) with water and aqueous solvents of sucrose, sodium carbonate or lactic acid.

All the determinations were carried out in duplicate and were expressed on dry weight basis. Fourier transform infrared spectra (FT-IR) of flours and their blends were measured and processed by principal component analysis (PCA).

2.3 FT-IR Spectroscopy and Statistical Analyses

Fourier transform infrared spectra (FT-IR) of flours and their blends were measured in the wavenumber region of 4,000-400 cm^{-1} (mid infrared region) in KBr tablet, transmittance mode and at the resolution of 2 cm^{-1} . Collected spectra were processed by PCA within the 1,200-800 cm^{-1} region (software package Statistica, version 7.1, StatSoft CR, Czech Republic). The relationships among the different analytical parameters of analyzed flours were tested by a simple correlation (Pearson correlation). Significant differences were declared at $P < 0.05$.

3. Results and Discussions

3.1 Breadmaking Characteristics of Flours

The higher content of ash had barley bran (3.8%) and blends (1.1%) (all values are related to dry matter) (Table 2). The content of total starch was determined from 62% to 73%. The average content of protein in flours was 12.7%, whereas the highest content of protein (15.2%) was found in sample no. 25 (wheat Moravian flour) and the lowest content (7.5%) was in sample no. 17 (wheat: rye Czech flour). The samples of Czech flours (samples no. 19 to 22) had higher content of protein in comparison to samples of Moravian flours (samples no. 23 to 34). The values of GI, Zeleny sedimentation and SRC of lactic acid (expression of glutelins quality) were not significantly distinct for wheat Czech and Moravian flours. An

Table 2 Breadmaking characteristics of studied samples (values are expressed in % in dry matter).

Sample No.	Moisture	Ash	Starch	Protein	GI	Zeleny test	SRC water	SRC lactic acid	SRC sodium carbonate	SRC sucrose
1	12.7	0.4	72	12.6	96	31	64	132	76	100
2	12.1	0.6	69	12.3	92	31	65	104	82	99
3	12.0	0.8	69	12.0	94	26	68	94	88	102
4	11.8	0.9	67	11.8	89	25	71	92	91	105
5	11.6	1.0	66	11.6	90	20	73	88	96	106
6	11.6	1.1	62	11.4	97	17	77	91	100	108
7	11.0	1.1	69	11.1	66	13	83	105	114	124
8	11.3	1.1	70	10.7	72	12	81	102	110	120
9	11.5	1.1	70	10.5	75	14	82	97	108	117
10	13.6	1.0	69	10.9	imp.	25	91	106	120	133
11	11.5	3.8	69	8.9	imp.	18	134	134	148	197
12	12.1	0.9	70	6.7	imp.	25	76	96	98	122
13	10.9	1.9	70	9.4	imp.	43	89	113	129	124
14	11.6	0.7	60	8.0	imp.	23	121	126	155	153
15	14.3	0.5	65	9.8	92	31	86	162	103	105
16	14.0	0.5	65	9.5	84	30	77	177	97	102
17	8.9	0.7	63	7.5	imp.	30	149	141	135	118
18	13.7	0.8	62	11.4	imp.	30	95	169	118	125
19	14.3	0.5	62	13.5	96	44	84	184	108	121
20	14.0	0.5	67	12.2	87	39	80	183	90	82
21	12.5	0.5	66	13.6	85	48	83	182	108	128
22	14.0	0.5	65	13.1	96	40	84	186	111	106
23	14.2	0.5	73	8.3	96	31	87	175	99	136
24	15.1	0.5	73	9.6	97	39	78	182	89	131
25	15.2	0.5	74	9.3	96	41	85	172	100	136
26	13.1	0.5	70	9.7	75	31	86	163	102	122
27	13.5	0.4	70	8.8	93	35	81	169	107	113
28	12.4	0.5	70	10.7	83	30	84	156	105	118
29	13.6	0.5	66	9.5	97	35	80	159	103	115
30	12.6	0.5	67	11.1	80	31	79	163	101	124
31	13.0	0.6	69	8.8	87	30	85	170	105	125
32	13.0	0.5	70	9.9	81	31	82	160	99	122
33	15.0	0.4	68	10.6	95	30	80	166	95	142
34	11.5	0.7	68	10.4	81	31	84	186	120	143

GI: gluten index;

SRC: solvent retention capacity;

imp.: it was impossible to analyze;

Data are averages of duplicates, presented as % of dry weight except for Zeleny test value, which is expressed in mL.

addition of barley and rye to wheat flour caused a decrease of protein content in blends (decrease of value of Zeleny test and gluten index) and pronounced deterioration of breadmaking quality of flours. Wheat flours for bread production showed the higher content of gluten (Zeleny test, SRC of lactic acid) in comparison with blends. Wheat flours and blends did

not show different value of gluten index.

Solvent retention profile of selected flours and their blends is showed in Fig. 1. The value of SRC of lactic acid characterized the high content of glutenins (high molecular fraction of gluten) in wheat flours and the low content of hordenins in barley flours (Table 2). The highest content of protein, glutenin (determined by

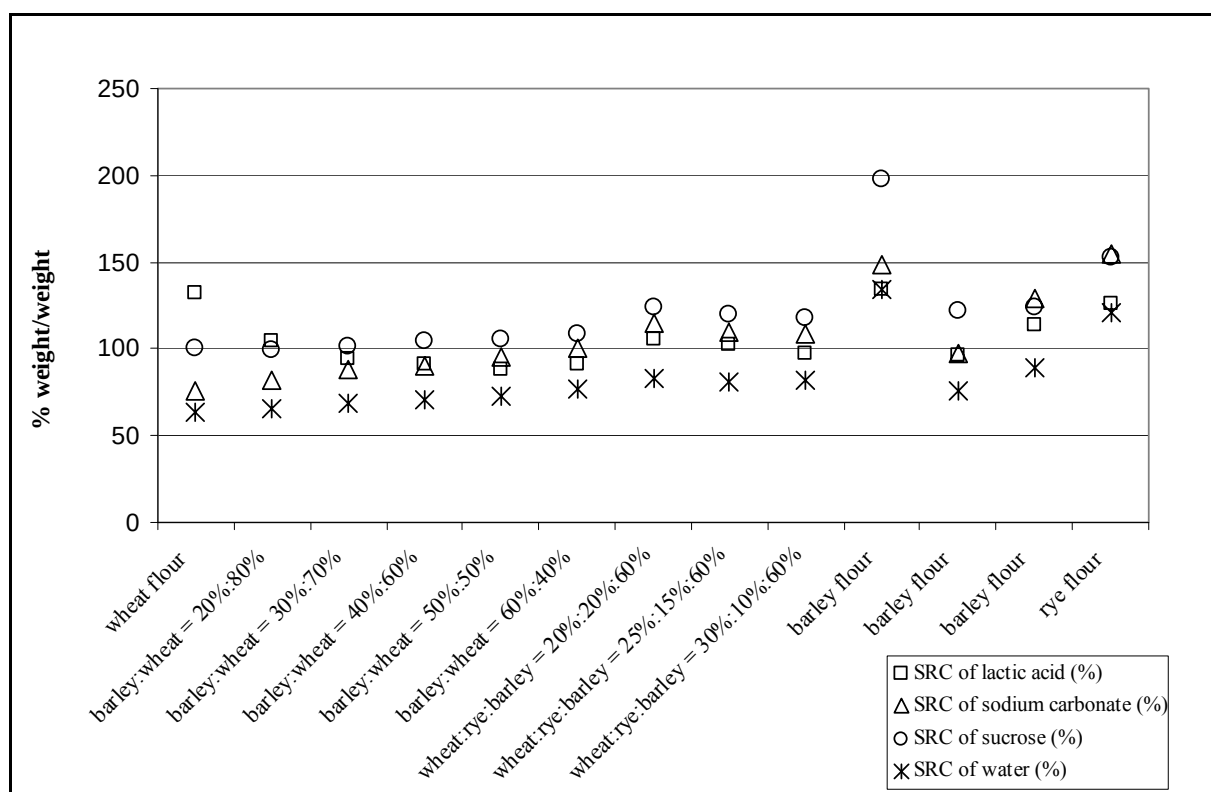


Fig. 1 Solvent retention capacity profile of selected flours and their blends.

SRC of lactic acid) and glutenin fraction was determined in wheat Czech flour (sample no. 1). The content of glutenin decreased both in wheat and barley blends (samples no. 1 to 5) and in wheat, barley and rye blends (samples no. 7, 8 and 9). It corresponded to the decrease of protein content determined by Kjeldahl. The mentioned tendency corresponds to the results of fractionation (especially the content of glutelins).

The increased value of SRC of sucrose indicated higher content of arabinoxylans in rye (sample no. 14) and barley flour (sample no. 12). An addition of barley and rye to wheat flour resulted in increase of nutrition value of blends. The rye flour had higher value of SRC of sodium carbonate; it can mean more damaged starch and higher water absorption. An addition of barley and rye to wheat flours increased the value of SRC of sodium carbonate in blends. The rye flour had the highest value of SRC of water. The highest of water absorption was caused by the present of water-soluble components (β -glucans and arabinoxylans). On the contrary wheat flours had the

lowest water absorption (low value of SRC of water).

3.2 Nutritional Characteristics of Flours

Generally, wheat flours had the lowest content of dietary fiber and β -glucans (Table 3). An addition of barley or rye increased the content of fiber and β -glucans in blends. Brennan [5] and Rakha [18] described that the content of β -glucans is about 1% in wheat grains, 1%-2% in rye and 5%-11% in barley. In our case, barley flour contained from 2.5% of β -glucan (sample no. 10) to 4.2% (sample no. 13). The highest content of total dietary fiber had blended flours (samples no. 6-9), barley flour (sample no. 13) and rye flour (sample no. 14). The insoluble dietary fiber involved a predominant part of total fiber.

The portion of protein fractions of Czech flours and blends were not significantly different (Table 3). Only, rye flour (sample no. 14) had evidently higher content of albumins and globulins in comparison with other cereals. The most often published wheat and barley protein fraction proportions are 20%-25%, 40%-50%,

Table 3 Nutritional characteristics of studied samples (values are expressed in % in dry matter).

Sample No.	β -glucan	IDF	SDF	TDF	Albumins and globulins	Gliadins	Glutenins
1	0.2	1.9	1.4	3.0	19.8	31.7	48.4
2	1.0	3.2	1.4	4.7	20.7	33.9	45.5
3	1.6	3.0	1.9	6.3	22.1	33.8	44.1
4	1.8	2.1	2.4	6.0	22.6	34.0	43.4
5	2.3	5.4	2.2	7.1	23.5	33.9	42.6
6	2.7	5.2	3.1	8.5	24.8	33.9	41.3
7	2.9	4.9	2.9	9.2	28.4	32.9	38.7
8	2.7	5.5	3.1	9.0	27.4	33.1	39.5
9	3.1	5.3	3.2	9.1	26.1	33.3	40.5
10	2.5	2.4	1.5	4.1	27.2	26.3	46.5
11	3.0	6.5	3.7	9.8	26.1	26.9	47.0
12	2.7	2.1	1.8	4.2	26.4	26.8	46.8
13	4.2	4.0	2.6	7.0	26.1	26.6	47.3
14	1.3	4.0	2.9	7.9	43.9	25.8	30.3
15	0.1	0.9	0.4	1.5	19.1	35.5	45.4
16	0.1	1.0	0.4	1.5	19.3	36.2	44.5
17	1.1	1.8	1.3	3.1	34.1	24.4	41.5
18	1.3	1.7	1.4	3.2	21.2	30.7	48.1
19	0.5	1.7	1.4	3.2	21.8	33.1	45.2
20	0.5	1.8	1.5	3.2	23.2	33.0	43.8
21	0.6	1.6	1.3	3.2	22.5	30.0	47.5
22	0.5	1.9	1.2	3.2	23.1	33.3	43.6
23	1.1	1.6	1.3	3.2	19.4	35.0	45.6
24	1.2	1.7	1.5	3.1	21.5	36.8	41.7
25	1.1	1.8	1.3	3.0	23.3	39.7	37.0
26	1.1	1.7	1.0	3.0	22.0	28.2	49.8
27	1.1	1.7	1.2	3.0	22.2	37.0	40.7
28	1.0	1.6	1.3	2.9	27.0	30.8	42.2
29	1.2	1.8	1.5	3.0	24.2	15.4	60.4
30	1.1	1.8	1.4	3.1	24.9	14.3	60.8
31	1.0	1.8	1.5	3.1	27.1	12.9	60.0
32	1.1	1.6	1.3	3.0	20.9	32.7	46.4
33	1.0	1.7	1.2	2.9	21.9	35.1	43.0
34	1.2	1.9	1.7	3.2	21.2	40.7	38.1

SDF: soluble dietary fibre;

IDF: insoluble dietary fibre;

TDF: total dietary fibre.

and 35%-40% for albumins and globulins, gliadins and glutenins, respectively [12]. Different fraction proportion is showed in rye: albumins 44%, globulins 10%, gliadins 21% and glutelins 25%. Some Moravian flours came from same place of origin (e.g. samples no. 23-25, or samples no. 29-31) and they had comparable contents of protein fractions. The higher content of glutenins and the lowest content of gliadins were found in samples no. 29, 30 and 31. The content of glutelins decreased in blends in accordance with a decrease of total protein content determined by Kjeldahl.

Statistically significant positive correlations were

observed between β -glucan and protein ($r = 0.85$, $P < 0.05$), β -glucan and SRC of sucrose ($r = 0.93$, $P < 0.05$), between β -glucan and soluble dietary fiber ($r = 0.88$, $P < 0.05$), and β -glucan and gluten value of Zeleny test ($r = 0.81$, $P < 0.05$). A strong positive correlation between the content of β -glucan and protein and between β -glucan and soluble fiber was confirmed with the results obtained by Holtekjølén [33]. Positive correlations were found between soluble dietary fiber and SRC of water ($r = 0.95$, $P < 0.05$), between proteins and total dietary fiber ($r = 0.88$, $P < 0.05$), and SRC of lactic acid and gluten value of

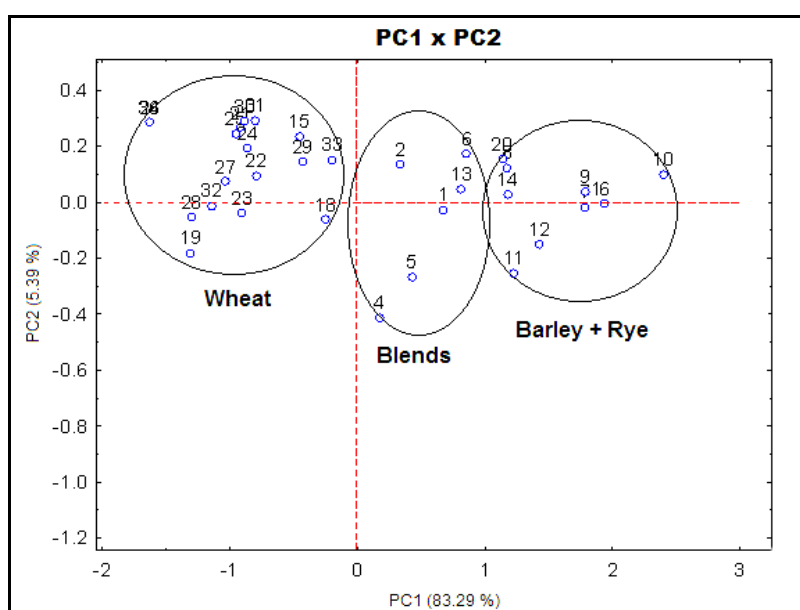


Fig. 2 PCA score scatter plot of the FT-IR spectra of flours in the 1,200-800 cm⁻¹ wavenumber region. The clusters included the individual wheat flours, barley, rye flours and blends on the basis of starch and non-starch polysaccharides content.

Zeleny test ($r = 0.70$, $P < 0.05$). Significant negative correlations were observed between content of β -glucan and starch ($r = -0.69$, $P < 0.05$) and between proteins and starch ($r = -0.83$, $P < 0.05$).

3.3 FT-IR Spectroscopy and Principal Component Analysis

The transmission FT-IR spectra of flours and blends were recorded. The characteristic region of starch, non-starch polysaccharides and protein absorption was observed. PCA was used on IR data and PCA score allowed to separate the flours and their blends according to the content of starch and non-starch polysaccharides, especially β -glucan and fiber content. The flours were separated to three clusters (wheat, blends, barley and rye) (Fig. 2).

The application of a PCA to the FT-IR spectra in the mid-infrared region was effective for fast distinction of various different types of flours on the basis of nutritional and breadmaking flour parameters.

4. Conclusions

An addition of barley or rye to wheat flour influenced the quality of flour blends significantly. The content of nutritive and healthy components

(soluble proteins, fiber, β -glucans and pentosans) was increased in blends, but the breadmaking quality decreased (higher content of damaged starch, higher water capacity and sticky dough).

FT-IR spectroscopy and chemometric analysis (PCA analysis) can be used to a fast screening of the cereal flour quality and to classification of flours on the basis the specific purpose of their uses.

Acknowledgments

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic (project No 321141615) and project New Food No QI111B053. The authors are grateful for the technical support from the Zeelandia Company (Malšice, Czech Republic).

References

- [1] M.H. Alu'datt, T. Rababah, K. Ereifej, I. Alli, M.A. Alrababah, A. Almajwal, et al., Effect of barley flour and barley protein isolate on chemical, functional, nutritional and biological properties of Pita bread, *Food Hydrocolloids* 26 (1) (2012) 135-143.
- [2] D. Peressini, A. Sensidoni, Effect of soluble dietary fiber addition on rheological and breadmaking properties of wheat doughs, *Journal of Cereal Science* 49 (2) (2009) 190-201.
- [3] S. Ragaei, I. Guzar, N. Dhull, K. Seetharaman, Effects of fiber addition on antioxidant capacity and nutritional

- quality of wheat bread, *LWT-Food Science and Technology* 44 (10) (2011) 2147-2153.
- [4] P. Van Hung, T. Maeda, M. Fujita, N. Morita, Dough properties and breadmaking qualities of whole waxy wheat flour and effects of additional enzymes, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87 (13) (2007) 2538-2543.
 - [5] A. Rakha, P. Åman, R. Andersson, Characterization of dietary fiber components in rye products, *Food Chemistry* 119 (3) (2010) 859-867.
 - [6] I. Bondia-Pons, A.M. Aura, S. Vuorela, M. Kolehmainen, H. Mykkänen, K. Poutanen, Rye phenolics in nutrition and health, *Journal of Cereal Science* 49 (3) (2009) 323-336.
 - [7] B.K. Baik, S.E. Ullrich, Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest, *Journal of Cereal Science* 48 (2) (2008) 233-242.
 - [8] K. Dieckmann, beta BARLEY-the new beta-glucan rich barley for baking and more, *Baking+Biscuit International* 1 (2011) 58-63.
 - [9] B. Škrbić, S. Milovac, D. Dodig, B. Filipčev, Effects of hull-less barley flour and flakes on bread nutritional composition and sensory properties, *Food Chemistry* 115 (3) (2009) 982-988.
 - [10] K. Dewettinck, F. Van Bockstaele, B. Kühne, D. Van de Walle, T.M. Courtens, X. Gellynck, Nutritional value of bread: Influence of processing, food interaction and consumer perception, *Journal of Cereal Science* 48 (2) (2008) 243-257.
 - [11] S.H. Park, J.D. Wilson, B.W. Seabourn, Starch granule size distribution of hard red winter and hard red spring wheat: Its effects on mixing and breadmaking quality, *Journal of Cereal Science* 49 (1) (2009) 98-105.
 - [12] T.B. Osborne, *Proteins of the wheat kernel*, Carnegie Inst. Washington, USA, 1907.
 - [13] W. Wang, K. Khan, Effect of the molecular weight distribution of glutenin protein from extra-strong wheat flour on rheological and breadmaking properties through reconstitution studies, *Cereal Chemistry* 86 (6) (2009) 623-632.
 - [14] A.S. Tatham, P.R. Shewry, The S-poor prolamins of wheat, barley and rye: Revisited, *Journal of Cereal Science* 55 (2) (2012) 79-99.
 - [15] AACC Report, Report of the dietary fiber definition committee to the board of directors of the American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, USA, 2001.
 - [16] H. Salovaara, T. Sontag-Strohm, H. Antilla, Physical state of soluble oat fiber and health claims, in: H. Salovaara, F. Gates, M. Tenkanen (Eds.), *Dietary Fiber-components and functions*, Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, 2007, pp. 91-112.
 - [17] P.J. Wood, Cereal β -glucans in diet and health, *Journal of Cereal Science* 46 (3) (2007) 230-238.
 - [18] Ch.S. Brennan, L.J. Cleary, The potential use of (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucans as functional food ingredients, *Journal of Cereal Science* 42 (1) (2005) 1-13.
 - [19] M. Mathlouthi, J.L. Koenig, Vibrational spectra of carbohydrates, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 44 (1986) 17-19, 22-23.
 - [20] A. Gałat, Study of the Raman scattering and infrared absorption spectra of branched polysaccharides, *Acta Biochimica Polonica* 27 (1980) 135-141.
 - [21] M. Kačuráková, R.H. Wilson, Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates, *Carbohydrate Polymers* 44 (4) (2001) 291-303.
 - [22] N. Dupuy, C. Wojciechowski, C.D. Ta, J.P. Huvenne, P. Legrand, Mid-infrared spectroscopy and chemometrics in corn starch classification, *Journal of Molecular Structure* 410-411 (1997) 551-554.
 - [23] P.R. Shewry, A.S. Tatham, P. Lazzeri, Biotechnology of wheat quality, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 73 (4) (1997) 397-406.
 - [24] M.A. Coimbra, A. Barros, M. Barros, D.N. Rutledge, I. Delgadillo, Multivariate analysis of uronic acid and neutral sugars in whole pectic samples by FT-IR spectroscopy, *Carbohydrate Polymers* 37 (3) (1998) 241-248.
 - [25] M. Kačuráková, P. Capek, V. Sasinková, N. Wellner, A. Ebringerová, FT-IR study of plant cell wall model compounds: Pectic polysaccharides and hemicelluloses, *Carbohydrate Polymers* 43 (2) (2000) 195-203.
 - [26] R. Sun, J.M. Fang, A. Goodwin, J.M. Lawther, A.J. Bolton, Fractionation and characterization of polysaccharides from abaca fibre, *Carbohydrate Polymers* 37 (4) (1998) 351-359.
 - [27] M. Cerna, A.S. Barros, A. Nunes, S.M. Rocha, I. Delgadillo, J. Copikova, et al., Use of FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of polysaccharide food additives, *Carbohydrate Polymers* 51 (4) (2003) 383-389.
 - [28] ICC, *Standards Methods*, International Association for Cereal Science and Technology, 6th ed., Vienna, Austria, 1996.
 - [29] AOAC, *Official Methods of Analysis*, Association of Official Analytical Chemists, 15th ed., Washington, USA, 1990.
 - [30] AACC, *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists*, 10th ed., St. Paul, Minnesota, USA, 2000.
 - [31] I. Michalik, Unified method for discontinual fractionation of cereal grain protein complex, *Agriculture* 48 (7) (1992) 333-341.
 - [32] ISO, *International Standards*, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2007.
 - [33] A.K. Holtekjølén, A.K. Uhlen, E. Bråthen, S. Sahlstrøm, S.H. Knutsen, Content of starch and non-starch polysaccharides in barley varieties of different origin, *Food Chemistry* 94 (3) (2006) 348-358.

Application of Amylographic Method for Determination of the Staling of Bakery Products

MARCELA SLUKOVÁ¹, MIROSLAV KUBÍN³, Šárka HORÁČKOVÁ² and JOSEF PŘÍHODA¹

¹Department of Carbohydrates and Cereals and ²Department of Dairy, Fat and Cosmetic Science, Faculty of Food and Biochemical Technology, University of Chemistry and Technology Prague, Czech Republic; ³MILLBA-CZECH, Ústí nad Labem, Czech Republic

Abstract

SLUKOVÁ M., KUBÍN M., HORÁČKOVÁ Š., PŘÍHODA J. (2015): **Application of amylographic method for determination of the staling of bakery products.** Czech J. Food Sci., 33: 507–512.

Staling is the general term that describes the time-dependent loss in quality of flavour and texture of bakery products after their baking and during storage. A modified amylographic method (viscometric measurement using the pro-mylograph) for rapid evaluation of the staling rate of fine sweet wheat bakery products were verified. In comparison with the standard method using an amylograph the modified amylographic method consisted in the measurement performed at a constant temperature curve. The staling of bakery products was followed for several days by viscometric measurement of crumb slurry, penetrometry measurement of crumb firmness, and evaluation of sensory properties of bakery products. A significant correlation between viscometric results and penetrometry was found.

Keywords: bread; aging; viscosity of slurry; viscometric measurement of crumb; penetrometry; sensory evaluation

Staling is a complex process that starts immediately after baking when products are cooled. It can be described as a common result of physical, chemical, and sensory changes affecting the consumer's acceptability of baked product. Retrogradation or recrystallisation of starch polymers is supposed to be the main reason for staling (BECHTEL *et al.* 1953 and others).

The three-dimensional structure keeping a shape of baked wheat product is based on the spatial network of protein macromolecules, and during baking the main part of water from dough is absorbed by starch polymers. At the temperatures higher than 60°C gluten gel is denatured and water is transferred to starch polymers and serves in its gelatinisation. Starch polymers are changed from the partly crystalline microstructure to the disordered one, mainly due to the migration of water molecules inside the structure. During cooling after baking, water starts to migrate back to its original partly crystal lattice (RONDA *et al.* 2011).

Sensory changes of baked products are caused by the loss of moisture in the crumb, and by the retrogradation of starch polymers. During cooling

water migrates to the crust and in part is lost by evaporation (GRAY & BEMILLER 2003). The crumb consequently hardens.

Different direct or indirect methods are used to study the staling of baked products (KARIM *et al.* 2000). Direct objective instrumental methods usually employed a deformation measurement by the compression of the crumb or penetration of a spherical or half-spherical body into the crumb (penetrometer, texturometer, Instron, etc.) (BAIK & CHINACHOTI 2000).

Three main types of indirect measurements are used: a study of changes of microstructure by means of electron microscope (ROJAS *et al.* 2000; BÁRCENAS *et al.* 2006) or transmission microscope (HUG-ITEN *et al.* 2001), measurement of crystal growth by means of roentgen diffraction (DRAGSDORF & VARRIANO-MARSTON 1980; SMITS *et al.* 1998; RIBOTTA *et al.* 2004), and measurement of changes of enthalpy during crystal growth (VODOVOTZ *et al.* 1996; BAIK & CHINACHOTI 2000).

Another method of indirect measurement of rheological changes of bread crumb during staling was

proposed many years ago. The basic idea is that the solubility of starch in the crumb depends on the part of starch gel which has not yet returned to a crystalline structure. Consequently, the viscosity of crumb suspension in water can be changed during staling (YASUNAGA *et al.* 1968). The amylograph is designed to measure the viscosity of starch or flour suspension and its changes during heating. It is in principle a rotational viscometer with the rather complicated geometry of measuring space (ICC Standard 126/1). The method described in International Standard is based on the recording of viscosity changes during the heating of a suspension up to a maximum consistency (“peak viscosity” by the authors YASUNAGA *et al.* 1968) of fully gelatinised starch. In the works mentioned, a standard amylographic curve was plotted with the peak viscosity under the heating of slurry. The peak viscosity of crumb decreased continuously during the post-baking storage of bread and was also decreased by additions of malt to the bread formula. Some other authors obtained seemingly contradicting results when either decreases (YASUNAGA *et al.* 1968) or increases (XU 1985) were found out in viscosity with storage times.

Bakery improvers such as enzymes (amylases, lipases, proteases, pentosanases), emulsifiers, hydrocolloids, and their blends serve as additives to improve technological (rheological) and texture properties of dough and slow down the staling of bread and bakery products (HUG-ITEN *et al.* 2003; BÁRCENAS & ROSELL 2005; JIANG *et al.* 2005; MOAYEDALLAIE *et al.* 2010; ROSELL & SANTOS 2010; PATEL *et al.* 2012, etc.). The addition of improvers (mostly in ppm amount) affects the standard quality of dough and bread and also the staling process of bread.

The aim of this study was to verify a modified amylographic method (viscometric measurement using a promylograph) for evaluation of the staling process of fine sweet wheat bakery products. These results were compared with those of conventional methods such as penetrometry and sensory evaluation. Three different dough improvers were used with the purpose to prepare baked samples with different crumb quality and different staling rate. Staling rate means the changes of the crumb structure (crumb firming) over time.

MATERIAL AND METHODS

Fine sweet wheat loaves were made using the formula: white wheat flour T530 (100 kg) (MILLBA-

CZECH Ltd., Mlýn Louny, Louny, Czech Republic), fat (Favorit A, commercial margarine with 82% of fat) (18 kg) (KaKa CZ, Jeneč, Czech Republic), sugar (saccharose) (16 kg) (Tereos TTD, Ltd., Cukrovar Dobruška, Czech Republic), solid compressed yeast (standard commercial fresh bakery yeast *Saccharomyces cerevisiae*) (5.5 kg) (Lesaffre Česko, Olomouc, Czech Republic), powder dough improver (1.5 kg) (Mlýn Louny, Czech Republic), salt (1.2 kg) (K+S Czech Republic, Olomouc, Czech Republic), water (45 l).

Characteristics of the wheat flour used: moisture content (12.1% w/w), ash content (0.57% w/w, in dry matter – DM), wet gluten content (35% w/w), falling number (278 s), farinographic absorption (58.5% v/w). Three types of dough improvers were used (labelled A, B, V) with different effectiveness on crumb quality and staling. The improver A consisted of wheat flour (Mlýn Louny), emulsifier (LAMETOP 500), ascorbic acid, and the enzymes xylanase and lipase (Nutrilife EM-U), amylase (Nutrilife AM 17; all BASF, Ludwigshafen, Germany) and protease. The improver B consisted of wheat flour (Mlýn Louny), emulsifiers (LAMETOP 500 and Nutrisoft 55), ascorbic acid, and the enzymes xylanase and lipase (Nutrilife EM-U) and amylase (Nutrilife AM 17). The improver V consisted of wheat flour (Mlýn Louny), emulsifier (DATEM; BASF, Ludwigshafen, Germany), ascorbic acid, and the enzymes xylanase (Nutrilife CCX 10), amylase (Nutrilife AM 17), and glucose oxidase. The components of each improver are shown in descending order, and the exact amount of each component in the used improver is a part of the know-how of the mill and bakery MILLBA-CZECH. All components of improvers were provided by the producer Donauchem (Nymburk, Czech Republic). Components were added to wheat flour in the mill (Mlýn Louny).

Sweet loaves were made at the standard bakery plant (based on the Internal Standard of MILLBA-CZECH bakery). All the ingredients were homogenised in a spiral kneader (DIOSNA, Osnabrück, Germany) for 11 minutes. Ripening time of dough was 5 min (31°C, 80% humidity). Final proofing time was 65 min after shaping on an industrial roller and topping. Dough pieces were baked at 220°C for 13 minutes. After cooling the baked loaves were wrapped in polyethylene bags, stored at room temperature and analysed. The staling of cooled fine sweet loaves was evaluated by viscometric method, sensory evaluation and penetrometry.

Modified method for the measurement of staled crumb viscosity. The staling of fine sweet loaves was

doi: 10.17221/184/2015-CJFS

examined in order to test the method. In our work we measured the gelatinisation of crumb slurry with T2-E promylograph (Max Egger, St. Blasen, Austria), which was based on the entirely same principle of measurement as amylograph (ICC Standard 126/1). The method for the measurement of staled crumb viscosity using a promylograph was developed by the authors on the basis of series of experiments on a laboratory scale and also in an industrial bakery plant. The modified amylographic method demonstrated the characteristics of starch polymers at a constant temperature rate (30°C) while YASUNAGA *et al.* (1968) showed the pasting characteristics of starch in baked bread at an increasing temperature.

60 g of fresh or staled crumb from the central part of fine sweet loaves was mixed with 145 ml of water (30°C) in the mixer bowl for 1 min to make a homogeneous suspension (slurry). The mixer slowest speed should be used to avoid slurry foaming. The slurry was placed into a rotating bowl with the pins fixed inside. Measuring head with the pins was immersed into slurry. Depending on slurry viscosity, the measuring head was turned and the angle of turning was proportional to viscosity. The viscosity of crumb slurry was recorded at the constant temperature of 30°C in empirical units of promylograph (PE) for 10 min of constant mixing and the highest value (maximum on the curve) was shown on display. The changes of crumb viscosity of fresh and stale loaves were drawn in diagrams depending on the time of storage in hours. Viscometric results were expressed as means of duplicate analysis and evaluated using the T2-E promylograph software (based on Instructions for Measurements with Max Egger Promylograph Apparatus, St. Blasen, Austria).

Penetrometry. The crumb firmness was measured on a penetrometer (PNR-12; Petrotest Instruments, Dahlewitz, Germany) during staling. The higher the penetration depth of the crumb, the slower the staling process. Penetrometry instructions were based on the producer's Petrotest Instruments (http://www.imeth.ch/downloads/petrotest-98-1301_pnr.pdf). Results of penetrometry crumb firmness were expressed as means of quadruple analyses.

Sensory evaluation. A panel of 7 skilled persons (3 women, 4 men) evaluated sensory changes during the storage of fine sweet loaves. Skills of the panellists were verified by an accredited laboratory at University of Chemistry and Technology (UCT) in Prague. Sensory evaluation was carried out based on internal methodology of UCT in Prague and MILLBA-CZECH

(KADLEC *et al.* 1986). Complex properties of loaves as well as crumb consistency parameters (toughness, chewiness, etc.), taste and flavour were tested using a hedonic scale that can reach maximum 100 points in total. The results were presented as mean value for each parameter obtained from 7 panellists.

Statistical analysis. In order to compare the predictive ability (relationships) of tested methods of staling evaluation and to emphasise the importance of modified amylographic method, correlation coefficients between obtained data of promylograph and penetrometry, promylograph, and sensory evaluation, and also sensory evaluation and penetrometry were calculated. Correlation analysis was performed by means of Microsoft Excel 2010 (Microsoft Windows, Tulsa, USA) on a significance level of 0.01% and 0.05%. Moreover, error bars with standard deviations for all data points of promylograph, penetrometry and sensory evaluation were calculated by Microsoft Excel 2010.

RESULTS AND DISCUSSION

The measurements of crumb viscosity, crumb firmness and sensory parameters of bakery products were carried out every 4 h during 80 hours. The results are shown in Figure 1 for bakery products with improvers A, B, V, respectively.

In general, penetrometry and modified viscometric measurements using a promylograph describe the physical nature of staling process, these methods describe changes in starch gels and changes in mechanical properties of the crumb over time. Specifically penetrometric changes reflect mainly the hardness and toughness of the crumb structure and they can significantly depend on the proportion of gelatinized and recrystallised starch. Also changes of viscometric measurements of the crumb slurry without heating depend on the proportion of starch gels and crystals during staling.

As seen in Figure 1, both curves from penetrometer and promylograph showed considerably more significant changes during the staling of bakery product. In most cases the staling rate was higher up to approx. 30 h (a little more with improver V). It was due to the specific composition of improver V (different emulsifier as compared to improver A and/or B). The emulsifier DATEM (as a component of the improver V) is a hydrophilic, anionic, highly effective emulsifier. DATEM has excellent stabilising properties

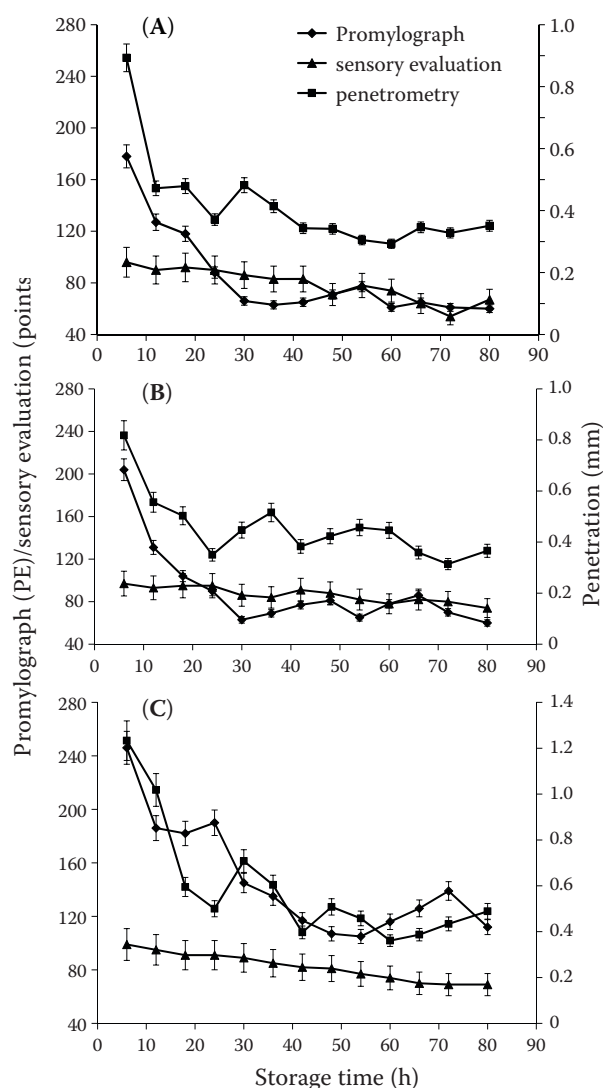


Figure 1. Changes of viscometric values (promylograph, units PE), firmness values (penetrometry, in mm), and sensory evaluation (scores) of the crumb during storage: (A) Improver A, (B) Improver B, and (C) Improver V

of emulsion; it is able to stabilise the starch-protein complex. It is one of the best antistaling components (STAMPFLI & NERSTEN 1995; PŘÍHODA *et al.* 2003; MOAYEDALLAIE *et al.* 2010). Consequently, the crumb of bakery products with DATEM addition remained smooth and soft for a longer time.

Besides DATEM, the enzymes like amylases and xylanases had a significant effect on the staling of bakery products from a practical point of view. Amylases may release high amounts of low molecular weight dextrins, which influence the staling process (LIN & LINEBACK 1990; MARTIN & HOSENEY 1991). Dextrins interfere with the ability of amylopectin retrogradation and interfere with protein-starch

interactions (HAROS *et al.* 2002). Xylanases strongly affect the arabinoxylan fraction of flours, and arabinoxylans are known by their high influence on staling. Xylanases transform water-insoluble arabinoxylans into a soluble form which binds water in dough and also in the crumb of final bread and bakery products (BUTT *et al.* 2008). The other non-starch components of improvers had a negligible influence on staling.

The curves obtained using both penetrometric and modified amylographic (promylograph) assessments represented the changes of physical properties of the crumb during staling. The curve obtained by promylograph demonstrated these changes more appositely compared with penetrometry. The curves also suggested a good and comparable possibility to differentiate between the effects of improvers on the staling rate and final degree of recrystallized starch polymers. The improver V showed the best results as already mentioned.

The results obtained from promylograph and penetrometry were in accordance with those from scan electron microscopy and roentgen diffraction (SLUKOVÁ *et al.* 2014). It supported results presented in this work and the main purpose of this work that the application of promylograph could be a commonly available simple way of rapid determination of the staling of bakery products.

Promylograph, as an alternative of amylograph, is a common rheological device used in mill and bakery laboratories especially in Czech Republic, Austria, Slovak Republic, and Hungary. The obtained results from promylograph and amylograph are comparable (PŘÍHODA *et al.* 2003). So the proposed modified viscometric measurements of the crumb using a promylograph could be acceptable for operational purposes of rapid and practicable evaluation of bakery product staling.

Sensory evaluation reflects the wider aspects of bakery product quality in comparison with penetrometry and viscometric measurement. Specifically, sensory evaluation covers both textural parameters and characteristics (such as toughness, hardness, and chewiness), and also the taste and flavour of bakery products. Moreover, the significant and conclusive results of sensory evaluation highly depend on stable evaluation conditions, certified panellists etc.

The decrease of sensory quality was almost linear during the storage period of analysed bakery products (Figure 1). In regard to the complex quality assessment of bakery products, neither crumb properties nor sensory evaluation were proved as predictive methods for determination of staling.

doi: 10.17221/184/2015-CJFS

Table 1. Correlation coefficients between the results of different methods (viscometric measurements using promylograph, penetrometry, sensory evaluation) describing the crumb staling for three used improvers ($n = 13$, critical value 0.684 for $\alpha = 0.01$; critical value 0.553 for $\alpha = 0.05$)

Relation	Improver		
	A	B	V
Promylograph vs penetrometry	0.879	0.857	0.812
Promylograph vs sensory evaluation	0.685	0.677	0.802
Sensory evaluation vs penetrometry	0.620	0.528	0.785

Error bars obtained from promylograph, penetrometry and sensory evaluation data are shown for each of the improvers in Figure 1. The correlation coefficients between the results of promylograph and penetrometry, promylograph and sensory evaluation, and also sensory evaluation and penetrometry are shown for each of the improvers in Table 1. The correlation coefficient between the results of modified amylographic method (promylograph) and penetrometry was high, in all cases with the coefficients considerably higher than the critical value for the significance level of 0.01%.

CONCLUSION

The method of viscometric measurements of crumb slurry in water using a promylograph was confirmed as a sufficiently rapid method for the evaluation of bakery product staling. Different recrystallization rate of starch polymers could be estimated based on the results of the measurement. Results of viscometric measurements were in strong correlation with results of penetrometry; the dependence of these results was proved. It follows that the modified amylographic method could be used as a simple alternative method to penetrometry for the evaluation of bakery product staling.

References

- Baik M.Y., Chinachoti P. (2000): Moisture redistribution and phase transition during bread staling. *Cereal Chemistry*, 77: 484–488.
- Bárcenas M.E., Rosell C.M. (2006): Different approaches for improving the quality and extending shelf life of the partially baked bread: low temperatures and HPMC addition. *Journal of Food Engineering*, 72: 92–99.
- Bárcenas M.E., Rosell C.M. (2005): Effect of HPMC addition on the microstructure, quality and aging of wheat bread. *Food Hydrocolloids*, 19: 1037–1043.
- Bechtel W.G., Meisner D.F., Bradley W.B. (1953): The effect of the crust on the staling of bread. *Cereal Chemistry*, 30: 160–168.
- Butt M.S., Tahir-Nadeem M., Ahmad Z., Sultan M.T. (2008): Xylanases and their applications in baking industry. *Food Technology and Biotechnology*, 46: 22–31.
- Dragsdorf R.D., Varriano-Marston E. (1980): Bread staling: X-ray diffraction studies on bread supplemented with α -amylases from different sources. *Cereal Chemistry*, 57: 310–314.
- Gray J.A., Bemiller J.N. (2003): Bread staling: molecular basis and control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2: 1–21.
- Harros M., Rosell C.M., Benedito C. (2002): Effect of different carbohydrases on fresh bread texture and bread staling. *European Food Research and Technology*, 215: 425–430.
- Hug-Iten S., Escher F., Conde-Petit B. (2001): Structural properties of starch in bread and bread model system: Influence of anti-staling α -amylase. *Cereal Chemistry*, 78: 421–428.
- Hug-Iten S., Escher F., Conde-Petit B. (2003): Staling of bread: Role of amylose and amylopectin and influence of starch-degrading enzymes. *Cereal Chemistry*, 80: 654–661.
- ICC Standard 126/1 (1992): Method for using the Brabender Amylograph. Vienna.
- Jiang X., Li X., Yang S., Li L., Tan S. (2005): Improvement of the breadmaking quality of wheat flour by the hyperthermophilic xylanase B from *Thermotoga maritima*. *Food Research International*, 38: 37–43.
- Kadlec P., Bubník Z., Čopíková J., Prášil T., Příhoda J., Svoboda A. (1986): *Návody z laboratoří chemie a technologie sacharidů*. 2nd Ed. Praha, SNTL.
- Karim A.A., Norziah M.H., Seow C.C. (2000): Methods for study of starch retrogradation. *Food Chemistry*, 71: 9–12.
- Lin W., Lineback O.R. (1990): Changes in carbohydrate fractions in enzyme-supplemented bread and the potential relationship to staling. *Starch/Stärke*, 42: 385–394.
- Martin M.L., Hoskeney R.C. (1991): A mechanism of bread firming. II. Role of starch hydrolyzing enzymes. *Cereal Chemistry*, 68: 503–507.
- Moayedallaie S., Mirzaei M., Paterson J. (2010): Bread improvers: Comparison of a range of lipases with a traditional emulsifier. *Food Chemistry*, 122: 495–499.
- Patel M.J., Ng J.H.Y., Hawkins W.E., Pitts K.F., Chakrabarti-Bell S. (2012): Effects of fungal α -amylase on chemically

- leavened wheat flour doughs. *Journal of Cereal Science*, 56: 644–651.
- Příhoda J., Humpolíková P., Novotná D. (2003): Základy pekárenské technologie. Praha, Pekař cukrář s.r.o.: 122–123.
- Ribotta P.D., Cuffini S., León A.E., Anón M.C. (2004): The staling of bread: an X-ray diffraction study. *European Food Research and Technology*, 218: 219–223.
- Rojas J.A., Rosell C.M., Benedito de Barber C., Pérez-Munuera I., Lluch M.A. (2000): The baking process of wheat rolls by cryo scanning electron microscopy. *European Food Research and Technology*, 212: 57–63.
- Ronda F., Caballero P.A., Quilez J., Roos Y.H. (2011): Staling of partly and fully frozen baked breads. Study of the combined effect of amylopectin recrystallization and water content on bread firmness. *Journal of Cereal Science*, 53: 97–103.
- Rosell C.M., Santos E. (2010): Impact of fibers on physical characteristics of fresh and staled bake off bread. *Journal of Food Engineering*, 98: 273–281.
- Slukova M., Příhoda J., Honcu I., Kubin M. (2014): The effect of bakery improvers on staling of wheat bakery products. In: 65th Starch Convention. April 09–10, 2014, Detmold, Germany.
- Stampfli L., Nersten B. (1995): Emulsifiers in breadmaking. *Food Chemistry*, 52: 353–360.
- Smits A.L.M., Ruhnau F.C., Vliegenthart J.F.G., van Soest J.J.G. (1998): Ageing of starch based systems as observed with FT-IR and solid state NMR spectroscopy. *Starch/Stärke*, 50: 478–479.
- Vodovotz Y., Hallberg L., Chinachoti P. (1996): Effect of aging and drying on thermo-mechanical properties of white bread as characterized by dynamic mechanical analysis (DMA) and differential scanning calorimetry (DSC). *Cereal Chemistry*, 73: 264–267.
- Xu A. (1985): Amylograph properties of bread crumb and their relation to crumb firmness. [Master's Thesis.] Manhattan, Kansas State University: 18, 23–54, 67–75.
- Yasunaga T., Bushuk W., Irvine G.N. (1968): Gelatinization of starch during bread-baking. *Cereal Chemistry*, 45: 269–279.

Received: 2015–04–17

Accepted after corrections: 2015–10–21

Corresponding author:

Ing. MARCELA SLUKOVÁ, Ph.D., Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav sacharidů a cereálií, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika;
E-mail: marcela.slukova@vscht.cz

RESEARCH ARTICLE

Characterization of milling fractions from new sources of barley for use in food industry

Iva Wiege¹, Marcela Sluková¹, Kateřina Vaculová², Blanka Pančíková¹ and Berthold Wiege³

¹ Department of Carbohydrates and Cereals, University of Chemistry and Technology Prague, Praha, Czech Republic

² Agrotest Fyto, Ltd., Kroměříž, Czech Republic

³ Department of Safety and Quality of Cereals, Max Rubner-Institut, Federal Research Institute of Nutrition and Food, Detmold, Germany

The aim of this work was to characterize three Czech spring and one German winter barley cultivars specifically cultivated for use in the food industry. Two hull-less and two waxy barleys were roller-milled and separated into ten milling fractions. Additionally one wholemeal flour was prepared. The chemical composition of flour fractions from all cultivars was compared individually. The starch content was very similar in white flour fraction C1 and coarse bran flour from both waxy genotypes. The highest β -glucan content was determined in bran fractions in all barley materials. The similar trend was also found for the arabinoxylan content. Czech spring breeding line KM 1057 showed higher arabinoxylan content in all milling fractions than the other varieties. A strong positive correlation between β -glucan and protein content, as well as β -glucan and dietary fibre was found. By choosing the suitable milling fractions (flour separated from bran or bran, especially in hull-less cultivars), as high fibre to starch ratio as 1:0.8 can be achieved. Furthermore these fractions contained a high content of β -glucan, protein and ash.

Received: September 15, 2015

Revised: October 27, 2015

Accepted: November 5, 2015

Keywords:

Beta-glucan / Food / Genotypes / Milling / New barley varieties

1 Introduction

Cereals constitute the bases the world's most widespread food, drink, and feed products. Although barley is only the fourth major cereal crop, its world production was about 145 million metric tons in the year 2013/2014 [1]. The largest part of the harvested barley is being used in the brewing and animal feed industries. Whereas only about 2–5% of barley is used in the food industry [2, 3].

Barley cultivars can be divided according to starch type (i.e., standard, waxy, and high amylose). Grains with standard starch type have generally an amylose (AM) content

of about 25% and an amylopectin (AP) content of about 75%, while in high amylose genotypes the AM content is approximately 35% or higher. In waxy varieties the AM content is in the range of 0–10%. The type of starch considerably affects technology and physicochemical properties of different flours and of prepared foods [2, 4, 5].

The non-starch polysaccharides (NSP), collectively termed dietary fibre, influence the physicochemical, technological, nutritional, and textural properties of prepared food via their intrinsic characteristics such as content, composition, degree of branching, viscosity, molar mass etc. The soluble part of dietary fibre (e.g., β -glucans, arabinoxylans) is able to absorb large amounts of water and thereby affect rheology, staling (starch retrogradation) and product quality [6]. Water binding and holding in products has also been shown to effect the feeling of satiety after consumption [7, 8].

β -glucans (BG), especially in barley, constitute the largest part of soluble dietary fibre. Regular consumption of BG (especially with higher molar mass) assists in the maintenance of normal blood cholesterol levels and a reduction of

Correspondence: Iva Wiege, Department of Carbohydrates and Cereals, University of Chemistry and Technology Prague, Technická 5, Praha 6, 166 28, Czech Republic
E-mail: honcui@vscht.cz
Fax: +420-220-445 130

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; AX, arabinoxylan; BG, β -glucan; IDF, insoluble dietary fibre; NSP, non-starch polysaccharides; SDF, soluble dietary fibre; TDF, total dietary fibre

blood glucose increase after a meal [9, 10]. Consumption of products with barley dietary fibre contributes to an increase of faecal bulk. In addition, it can be expected that the consumption of BG reduces the occurrence of cardiovascular disease and colon cancer [11, 12]. Potential prebiotic effect of BGs with smaller molar mass has also been examined in the literature [13–15].

The barley grain, as well as other cereals, is an important source of minerals in lifelong human nutrition. The mineral content is influenced by cultivar and growing conditions, where the weather and soil composition play the major role. Minerals are concentrated in the bran and aleurone layers of the grain, therefore the content of minerals in wholegrain flour can be three times greater than in white flour [16, 17].

The most common use of barley in food production is in the cereal industry, however it has also some/limited application in the dairy and meat industries as well. Primarily, hull-less barley is used and processed into wholemeal flour, flakes or flour. Barley can be also used as a garnish for soup, porridge, breakfast cereals and as a rice substitute. It can be included in sausages, pudding, used as couscous and puffed to popcorn-like products [2, 18, 19]. Barley flour has been successfully used in unleavened flat breads, such as Turkish bread or tortillas, at the level of 10–30, 40, or 60%, respectively [14]. It can replace up to 100% of wheat flour in chemically leavened products such as muffins, pancakes, biscuits, and sweet cakes [5, 20, 21]. In yeast leavened breads the addition of barley flour has been reported at various levels in the literature ranging from 10 to 30% [18, 22] to 60% [5], and even as much as 100% replacement of wheat flour [23]. In the case of pastas, the addition of barley flour has been reported to be most acceptable in range of 20–30%.

The aim of this study was to characterize and evaluate new barley cultivars, which are, or can be further used in the food industry. In particular, their suitability for processing under commercial conditions (milling) was tested and yields and chemical composition of partial milling fractions compared. In this study, the focus was on the content of those grain components (dietary fibre and its components, protein, starch, and ash), which are important from both a technological and a nutritional point of view.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Three two-row Czech spring barley cultivars and breeding lines (KM 1057, AF Cesar, KM 2460-2) were obtained from Agrotest Fyto Ltd. (Kroměříž, Czech Republic). AF Cesar and the breeding line KM 1057 were hull-less with a standard starch composition. AF Cesar, a new cultivar registered in the year 2014 for growing in the field conditions of the Czech

Republic for specific use in food production, had significantly higher BG content than KM 1057. The breeding line KM 2460-2 was a hulled barley with a waxy starch type. German winter multi-row hulled barley (Waxyma) was supplied by Dieckmann Seeds GmbH & Co. KG (Rinteln, Germany). Waxyma was registered in the year 2008. All raw materials were harvested in the years 2012 and 2013.

2.2 Barley processing

The hulled cultivars KM 2460-2 and Waxyma were abraded before milling (Laboratory peeling machine, F.H.Schulte GmbH, Hamburg, Germany). The weight loss was 9.4 and 13.6% for KM 2460-2 and Waxyma respectively. The process continued with the separation of abraded and not abraded grains by a grain cleaner (Brabender, Germany) and the pneumatic removal of the residual hulls (Labofix 90, Schmidt-Seeger AG, Germany) in all barleys. The barley was not conditioned before milling. Milling was carried out in a roller mill (Bühler MLU 202, Uzwil, Switzerland). Break flour fractions (B1–B3) were milled on corrugated rolls with roll flute orientation dull-to-dull, whereas smooth rolls for reduction flour (C1–C3) were used. One bran (divided to coarse bran and coarse bran flour) and one short fraction (divided to fine bran and fine bran flour) were collected. Rolls timing was 1:2 during the whole milling process. The width of grinding gap was from 0.50 to 0.01 mm for B1–C3 fractions. White flour fractions (B1–C3) and flour separated from bran had particle size below 180 µm and 250 µm, respectively. The rate of grain feed to the mill for hulled and hull-less barley cultivars was 1.8 and 2.3 kg/h, respectively. The wholemeal flour was obtained from an ultra centrifugal mill Retsch ZM 200 (Retsch, Germany) with a 500 µm screen.

2.3 Analyses

Basic analyses were carried out for all 10 fractions and the wholemeal flour. Moisture content was determined according to Method ICC Nr. 110/1 (1960). The total nitrogen content was determined by ICC Nr. 105/2 (1980) using the conversion factor 6.25 and a protein analyzer (Kjeltec™ 8400, FOSS). The determination of ash was carried out according to standard ICC Nr. 104/1 (1960). Starch content was determined by EN ISO 10520 (1997). Dietary fibre content (total dietary fibre-TDF, insoluble dietary fibre-IDF, soluble dietary fibre-SDF) was determined by means of the enzymatic-gravimetric procedure (AOAC 991.43, 1991). AX determination was performed according to Douglas (1981) [24] with xylose calibration. The content of BG was determined enzymatically using BG enzymatic assay kit (Megazyme Ireland International, Ltd., Wicklow, Ireland) following ICC Nr. 166 (1998). The content of all components is reported on dry matter basis (d.m.).

2.4 Statistical analysis

The results for SDF, IDF and TDF were based on triplicate analysis and the other results on six replicates analysis and expressed as percentages on dry matter basis. Statistical analyses were performed using STATISTICA software, version 12.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma). The experimental data were processed by one-way analysis of variance (ANOVA). Multiple comparisons (post-hoc tests) were calculated using Fisher's least significant difference (LSD) test at the significance level of $p < 0.05$. The values are expressed as means $\pm$ standard error of the mean (SEM). Relationships between analysed grain components were calculated using Pearson's coefficient of correlation.

3 Results and discussion

New cultivars of Czech and German barley for food application were characterized. The chemical composition of 11 milling fractions from each variety was compared.

The yield of white flour (B1–C3) was the highest for KM 1057 (45%), intermediate for cultivar AF Cesar (33%) and lowest for waxy barleys 30 and 28.5% for Waxyima and KM 2460-2, which is similar to the results of Andersson et al. 2003 [25]. Sundberg and Åman [26] reported also the highest flour yield for hull-less barley and lowest for hulled waxy barley. Yield of flour obtained by separation of bran was 34% for the breeding line KM 1057, in other barleys it was about 42%. The bran yield was between 19 and 30% in this study, where in dehulled waxy barleys it was higher and similar as reported for wheat bran [14]. The overall milling yields were 94–98% for the barley samples and the recoveries are comparable to large scale manufacturing conditions (Fig. 1).

As reported by Izydorczyk et al. [27] roll flute orientation dull-to-dull (also used in our study) caused better separation of starch granules from the cell walls material and, therefore, greater enrichment and availability of dietary fibre constituents.

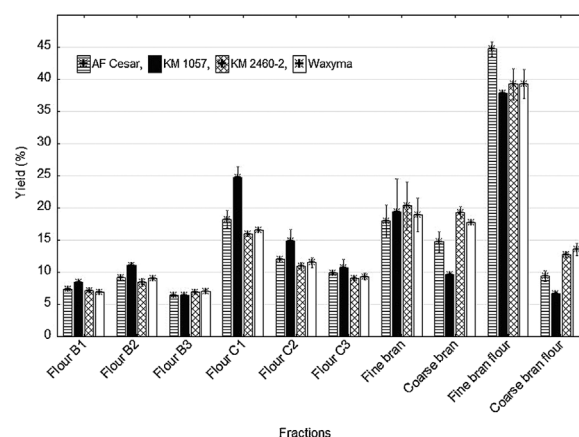


Figure 1. Relative yields (%) of white flour fractions (B1–C3), flours separated from bran and bran of barley grains. The results are shown as an average of years 2012, 2013.

The differences between Czech and German barley were significant with respect to total starch content (Table 1). Regardless of the barley varieties all three Czech barleys were similar, while Waxyima proved different. The lowest content of starch of all fractions (as the average value, calculated across all cultivars) was found in the bran, while in flour fractions (especially, C1 and B3) the starch content was the highest. Starch content in flour fractions (B, C) from hull-less barley and in wholemeal flour from all cultivars was in accordance with values found in literature 73.8–81.4, 57.0–68.0% respectively [18, 28]. The starch content in flour, bran fractions and flour separated from bran was similar to values reported by Anderson et al. [25].

The ash content in fractions is dependent on milling conditions (Table 2). In hull-less barley the ash content ranged from 1.0 to 4.5%, which was more than what has been reported in literature (0.9–1.5% ash) [18]. Arendt [28] published ash content in the barley grain in the range of 1.5–3.0%, which is mostly in agreement in our results. In Czech hull-less cultivars (KM 1057; AF Cesar) the ash content was similar. The lowest ash

Table 1. Starch content in Czech and German barley and their milling fractions (values are expressed in % d.m.)

Milling fraction/Barley	KM 1057	AF Cesar	KM 2460-2	Waxyima
Wholemeal flour	57.5 $\pm$ 0.6 ^a	61.4 $\pm$ 0.6 ^b	61.0 $\pm$ 0.8 ^b	66.7 $\pm$ 0.1 ^c
Flour B1	79.7 $\pm$ 3.1 ^b	73.9 $\pm$ 0.1 ^b	68.1 $\pm$ 0.3 ^a	74.3 $\pm$ 0.4 ^b
Flour B2	77.6 $\pm$ 1.1 ^b	73.6 $\pm$ 0.8 ^b	70.2 $\pm$ 0.2 ^a	76.4 $\pm$ 0.8 ^b
Flour B3	74.7 $\pm$ 1.2 ^a	74.9 $\pm$ 0.4 ^a	74.9 $\pm$ 0.9 ^a	80.6 $\pm$ 0.3 ^b
Flour C1	76.5 $\pm$ 0.2 ^b	77.1 $\pm$ 1.2 ^{b,c}	73.8 $\pm$ 0.4 ^a	79.6 $\pm$ 0.4 ^c
Flour C2	67.9 $\pm$ 0.4 ^a	74.0 $\pm$ 1.1 ^b	68.6 $\pm$ 0.5 ^a	75.5 $\pm$ 0.7 ^b
Flour C3	63.6 $\pm$ 0.5 ^a	72.7 $\pm$ 0.5 ^c	69.0 $\pm$ 0.2 ^b	75.1 $\pm$ 0.2 ^d
Coarse bran flour	59.0 $\pm$ 1.0 ^a	65.4 $\pm$ 0.5 ^b	72.6 $\pm$ 0.9 ^c	78.2 $\pm$ 0.2 ^d
Fine bran flour	52.4 $\pm$ 1.3 ^a	64.3 $\pm$ 1.3 ^c	61.2 $\pm$ 0.1 ^b	67.0 $\pm$ 0.3 ^c
Coarse bran	39.3 $\pm$ 0.5 ^a	43.4 $\pm$ 0.6 ^a	53.8 $\pm$ 1.2 ^b	55.1 $\pm$ 1.1 ^b
Fine bran	26.2 $\pm$ 1.9 ^a	33.8 $\pm$ 1.6 ^b	44.7 $\pm$ 0.2 ^c	45.8 $\pm$ 0.2 ^c

Different letters in same line (fraction) show significant difference among experimental barley samples ($p < 0.05$).

Table 2. Ash content in Czech and German barley and their milling fractions (values are expressed in % d.m.)

Milling fraction/Barley	KM 1057	AF Cesar	KM 2460-2	Waxyma
Wholemeal flour	2.1 ± 0.1 ^b	2.0 ± 0.1 ^b	1.9 ± 0.0 ^{a,b}	1.6 ± 0.1 ^a
Flour B1	1.1 ± 0.0 ^a	1.4 ± 0.0 ^b	2.4 ± 0.0 ^c	1.7 ± 0.0 ^d
Flour B2	1.0 ± 0.0 ^a	1.2 ± 0.0 ^a	1.8 ± 0.1 ^c	1.4 ± 0.0 ^b
Flour B3	1.2 ± 0.0 ^a	1.1 ± 0.0 ^a	1.5 ± 0.0 ^b	1.2 ± 0.0 ^a
Flour C1	1.0 ± 0.0 ^a	1.0 ± 0.1 ^a	1.5 ± 0.1 ^c	1.2 ± 0.0 ^b
Flour C2	1.4 ± 0.1 ^a	1.2 ± 0.1 ^a	1.8 ± 0.1 ^b	1.3 ± 0.0 ^a
Flour C3	1.6 ± 0.1 ^{b,c}	1.3 ± 0.1 ^a	1.7 ± 0.0 ^c	1.3 ± 0.0 ^{a,b}
Coarse bran flour	2.0 ± 0.0 ^d	1.6 ± 0.0 ^c	1.3 ± 0.0 ^b	1.0 ± 0.0 ^a
Fine bran flour	2.3 ± 0.2 ^b	1.5 ± 0.1 ^a	1.8 ± 0.1 ^{a,b}	1.5 ± 0.0 ^a
Coarse bran	3.5 ± 0.1 ^b	3.7 ± 0.0 ^b	2.1 ± 0.0 ^a	2.0 ± 0.2 ^a
Fine bran	4.5 ± 0.5 ^b	4.6 ± 0.3 ^b	2.7 ± 0.1 ^a	2.7 ± 0.2 ^a

Different letters in same line (fraction) show significant difference among experimental barley samples ($p < 0.05$).

Table 3. Protein content in Czech and German barley and their milling fractions (values are expressed in % d.m.)

Milling fraction/Barley	KM 1057	AF Cesar	KM 2460-2	Waxyma
Wholemeal flour	16.7 ± 0.8 ^b	15.5 ± 1.3 ^{a,b}	16.2 ± 1.1 ^b	12.5 ± 0.1 ^a
Flour B1	10.1 ± 0.9 ^a	13.5 ± 0.3 ^b	13.3 ± 0.7 ^b	10.8 ± 0.3 ^a
Flour B2	10.9 ± 0.9 ^a	15.0 ± 0.4 ^b	14.7 ± 0.5 ^b	11.3 ± 0.3 ^a
Flour B3	12.8 ± 1.1 ^{a,b}	15.8 ± 0.2 ^c	14.0 ± 1.1 ^{b,c}	10.4 ± 0.4 ^a
Flour C1	11.4 ± 0.4 ^a	12.6 ± 0.7 ^{a,b}	14.2 ± 0.7 ^b	11.1 ± 0.2 ^a
Flour C2	14.5 ± 0.3 ^{b,c}	13.9 ± 0.9 ^{a,b}	16.1 ± 0.3 ^c	12.6 ± 0.5 ^a
Flour C3	16.2 ± 0.2 ^b	14.5 ± 0.8 ^b	15.9 ± 0.7 ^b	12.6 ± 0.3 ^a
Coarse bran flour	17.2 ± 1.5 ^c	18.2 ± 0.2 ^c	14.2 ± 1.0 ^b	10.7 ± 0.1 ^a
Fine bran flour	18.5 ± 0.4 ^c	15.7 ± 0.6 ^b	16.8 ± 1.0 ^{b,c}	13.5 ± 0.1 ^a
Coarse bran	21.2 ± 1.0 ^c	21.5 ± 0.1 ^c	17.1 ± 1.3 ^b	12.9 ± 0.0 ^a
Fine bran	22.8 ± 0.4 ^c	21.2 ± 0.0 ^c	17.4 ± 1.5 ^b	13.4 ± 0.2 ^a

Different letters in same line (fraction) show significant difference among experimental barley samples ($p < 0.05$).

Table 4. β -glucan content in Czech and German barley and their milling fractions (values are expressed in % d.m.)

Milling fraction/Barley	KM 1057	AF Cesar	KM 2460-2	Waxyma
Wholemeal flour	3.0 ± 0.1 ^a	6.7 ± 0.1 ^b	8.3 ± 0.1 ^c	6.2 ± 0.1 ^b
Flour B1	1.2 ± 0.1 ^a	2.5 ± 0.1 ^b	2.5 ± 0.0 ^b	2.9 ± 0.0 ^b
Flour B2	1.6 ± 0.0 ^a	2.9 ± 0.2 ^b	3.1 ± 0.1 ^b	3.2 ± 0.1 ^b
Flour B3	1.7 ± 0.0 ^a	2.5 ± 0.1 ^c	2.2 ± 0.1 ^b	2.1 ± 0.1 ^{ab}
Flour C1	1.7 ± 0.0 ^a	2.8 ± 0.2 ^c	2.4 ± 0.1 ^{bc}	2.1 ± 0.1 ^{ab}
Flour C2	2.1 ± 0.0 ^a	3.4 ± 0.2 ^b	2.8 ± 0.1 ^a	2.5 ± 0.1 ^a
Flour C3	2.4 ± 0.0 ^a	3.4 ± 0.1 ^c	3.1 ± 0.1 ^c	2.9 ± 0.0 ^b
Coarse bran flour	3.6 ± 0.2 ^a	6.0 ± 0.1 ^c	5.7 ± 0.2 ^c	4.6 ± 0.0 ^b
Fine bran flour	4.0 ± 0.1 ^a	7.7 ± 0.1 ^{bc}	8.4 ± 0.1 ^c	7.0 ± 0.2 ^b
Coarse bran	4.5 ± 0.3 ^a	8.4 ± 0.4 ^b	12.2 ± 0.4 ^c	10.4 ± 0.4 ^{bc}
Fine bran	4.6 ± 0.4 ^a	9.4 ± 0.4 ^b	14.2 ± 0.2 ^d	11.9 ± 0.1 ^{bc}

Different letters in same line (fraction) show significant difference among experimental barley samples ($p < 0.05$).

content of barley genotypes was found in flour fractions B3 and C1, which corresponds to the highest starch content.

The protein content of analyzed fractions is shown in Table 3. More or less, all B-flour fractions and flour C1 had

similar protein content regardless of the barley cultivar. Protein content was in the range of 10.1–22.8%, which was similar the results presented Holtekjøl et al. [3]. Sullivan et al. [15] confirmed the highest starch and lowest protein

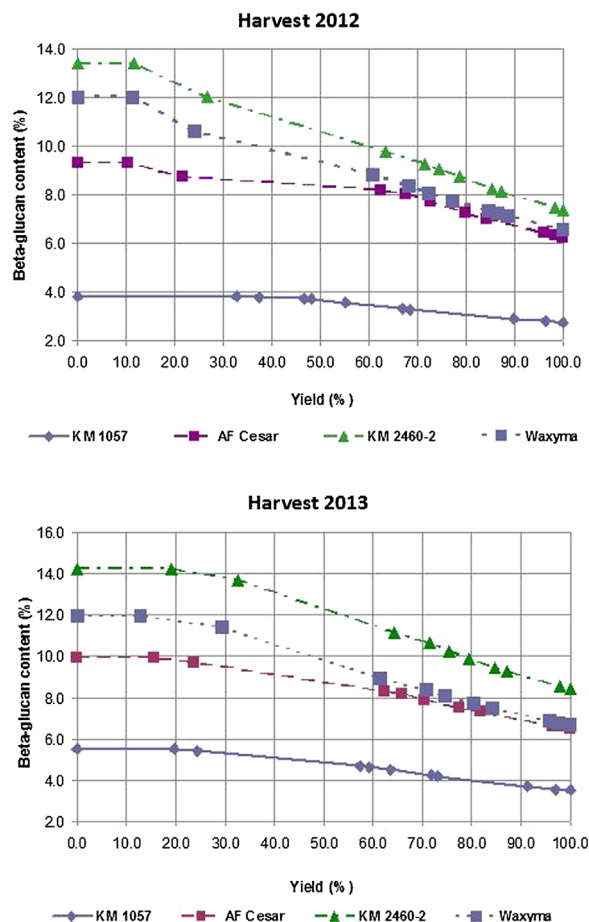


Figure 2. Changes of β -glucans content in different genotypes with increased sum of yields of milling fractions (harvest years 2012 and 2013).

content in endosperm B and C fractions, which is in agreement with the negative correlation in our presented study. Sullivan et al. [15] found twofold protein content in bran and middling than in endosperm. This trend was found only in KM 1057 in our study.

Protein and ash in hull-less barleys had a strong positive relation, on average ($r = 0.84$; $p < 0.05$), while hulled barleys had only low. The significant ($p < 0.05$) negative correlations between content of protein and starch ranged from $r = -0.60$ and $r = -0.64$ (for the hulled KM 2460-2 and Waxyima) to $r = -0.90$ and $r = -0.95$ (for the hull-less AF Cesar and KM 1057), as found also in research of Arendt and Zannini [28] and Velebna et al. [29].

Barley cultivars are rich in NSP, and because of their health benefits and product functionalities, so the primary goal of barley milling for food production is to get fractions with the highest content of these grain components. BG content in barley grain according to the literature is in the range from 2 to 11% [27, 30–32]. The BG content (Table 4) in cultivars with standard starch composition (KM 1057, AF Cesar) corresponded with BG values reported in the literature. On the other hand, for the waxy materials (KM 2460-2 and Waxyima) the BG content was at the upper limit of the previously reported range or higher. Other authors [3, 26] reported the amount of BG in range of 2.4–8.3% in grain and 1.6–5.8% in fractions, respectively. For hull-less barley BG content in milling fractions 3.5–4.6% was found [18]. In our study, the BG content as in grain (wholemeal flour) and in fractions from hull-less/hulled barleys was similar or higher than found in other studies. The lowest content of BG was found in the breeding line KM 1057 in all fractions. Conversely, finding the highest BG content in Czech breeding line KM 2460-2 was surprising. BG contents in flour separated from bran and in bran were similar in all varieties (exception KM 1057). A positive correlation in varieties between BG and protein, ash, AX content and a strong negative correlation between BG and starch content was determined [3, 29] and confirmed in this study. But a negative correlation between BG and AX obtained by Holtekjølén [3] was not found in this study.

The BG content as a function of the sum of yield is presented in the Fig. 2. The BG content in harvest year 2013 was higher than in 2012, therefore the BG content in the sum

Table 5. Arabinoxylan content in Czech and German barley and their milling fractions (values are expressed in % d.m.).

Milling fraction/Barley	KM 1057	AF Cesar	KM 2460-2	Waxyima
Wholemeal flour	6.5 ± 0.4^b	4.7 ± 0.1^a	4.4 ± 0.1^a	5.0 ± 0.2^a
Flour B1	4.2 ± 0.3^a	2.8 ± 0.3^a	3.9 ± 0.3^a	3.4 ± 0.3^a
Flour B2	4.7 ± 0.7^b	2.5 ± 0.1^a	$3.1 \pm 0.1^{a,b}$	2.7 ± 0.2^a
Flour B3	4.2 ± 0.2^b	2.2 ± 0.2^a	2.0 ± 0.1^a	2.1 ± 0.4^a
Flour C1	3.8 ± 0.1^b	1.8 ± 0.1^a	2.3 ± 0.1^a	2.0 ± 0.3^a
Flour C2	4.3 ± 0.2^b	2.1 ± 0.1^a	2.5 ± 0.1^a	2.4 ± 0.3^a
Flour C3	4.7 ± 0.2^b	2.2 ± 0.1^a	2.7 ± 0.2^a	2.3 ± 0.3^a
Coarse bran flour	6.2 ± 0.2^c	3.7 ± 0.1^b	$2.8 \pm 0.2^{a,b}$	2.7 ± 0.4^a
Fine bran flour	7.3 ± 0.3^b	3.7 ± 0.2^a	3.7 ± 0.3^a	4.4 ± 0.5^a
Coarse bran	9.7 ± 0.6^b	$6.7 \pm 0.3^{a,b}$	3.7 ± 0.7^a	$6.9 \pm 1.0^{a,b}$
Fine bran	11.3 ± 0.5^b	$8.4 \pm 0.3^{a,b}$	6.6 ± 0.2^a	$7.6 \pm 1.5^{a,b}$

Different letters in same line (fraction) show significant difference among experimental barley samples ($p < 0.05$).

Table 6. Dietary fibre content expressed as insoluble (IDF), soluble (SDF) and total (TDF) in milling fractions (values are expressed in % d.m.)

Milling fraction /Fibre /Barley	IDF			SDF			TDF		
	KM 1057	AF Cesar	KM 2460-2	Waxy	KM 1057	AF Cesar	KM 2460-2	Waxy	KM 1057
Wholemeal flour	18.2 ± 1.3 ^b	10.8 ± 0.4 ^a	9.6 ± 0.3 ^a	10.8 ± 0.9 ^a	5.6 ± 0.5 ^a	8.7 ± 0.5 ^b	10.8 ± 0.2 ^c	8.9 ± 0.6 ^b	23.5 ± 0.7 ^b
Flour B1	6.3 ± 0.2 ^{ab}	5.2 ± 0.3 ^a	8.4 ± 0.1 ^c	6.9 ± 0.5 ^b	2.8 ± 0.4 ^a	3.3 ± 0.6 ^a	5.1 ± 0.6 ^b	4.9 ± 0.2 ^b	9.2 ± 0.2 ^a
Flour B2	6.6 ± 0.2 ^b	4.3 ± 0.2 ^a	6.0 ± 0.2 ^b	4.3 ± 0.3 ^a	3.2 ± 0.2 ^a	3.8 ± 0.5 ^a	4.9 ± 0.2 ^b	5.9 ± 0.2 ^c	9.4 ± 0.2 ^{ab}
Flour B3	6.8 ± 0.1 ^b	3.4 ± 0.2 ^a	3.4 ± 0.2 ^a	3.3 ± 0.0 ^a	2.9 ± 0.8 ^a	3.8 ± 0.5 ^a	3.9 ± 0.2 ^a	3.8 ± 0.2 ^a	10.5 ± 0.3 ^c
Flour C1	5.8 ± 0.3 ^c	3.0 ± 0.1 ^a	4.1 ± 0.1 ^b	3.1 ± 0.2 ^a	3.7 ± 0.4 ^a	3.5 ± 0.6 ^a	3.8 ± 0.2 ^a	4.1 ± 0.2 ^a	9.1 ± 0.1 ^c
Flour C2	8.4 ± 0.3 ^c	4.2 ± 0.2 ^{ab}	4.5 ± 0.4 ^b	3.3 ± 0.4 ^a	3.9 ± 0.3 ^a	4.6 ± 0.2 ^{ab}	5.8 ± 0.2 ^b	4.8 ± 1.0 ^{ab}	11.7 ± 0.1 ^b
Flour C3	10.4 ± 0.7 ^b	4.8 ± 0.0 ^a	5.1 ± 0.0 ^a	4.4 ± 0.2 ^a	4.6 ± 0.1 ^a	4.7 ± 0.3 ^a	5.2 ± 0.2 ^a	4.7 ± 0.2 ^a	14.3 ± 0.1 ^b
Coarse bran flour	19.0 ± 2.2 ^c	8.2 ± 0.1 ^b	4.5 ± 0.1 ^a	4.1 ± 0.2 ^a	6.0 ± 0.1 ^a	7.8 ± 0.1 ^b	6.7 ± 0.2 ^a	6.2 ± 0.2 ^a	25.2 ± 2.1 ^c
Fine bran flour	18.9 ± 2.4 ^b	6.9 ± 0.2 ^a	8.0 ± 0.3 ^a	9.0 ± 0.6 ^a	7.0 ± 0.3 ^a	10.5 ± 0.8 ^b	9.8 ± 0.9 ^b	9.5 ± 0.6 ^b	25.5 ± 2.4 ^b
Coarse bran	32.0 ± 2.3 ^d	23.0 ± 0.6 ^c	11.3 ± 0.9 ^a	18.2 ± 1.3 ^b	8.0 ± 0.6 ^a	12.7 ± 0.1 ^b	14.1 ± 0.2 ^c	12.4 ± 0.2 ^b	38.4 ± 0.6 ^d
Fine bran	40.2 ± 3.0 ^c	30.6 ± 1.9 ^b	19.2 ± 0.5 ^a	22.6 ± 0.5 ^a	10.5 ± 0.1 ^a	15.2 ± 0.1 ^b	16.6 ± 0.7 ^c	14.9 ± 0.5 ^b	48.5 ± 2.5 ^b

IDF, insoluble dietary fibre; SDF, soluble dietary fibre; TDF, total dietary fibre. Different letters in the same group of fibre and fraction show significant difference among experimental barley samples ($p < 0.05$).

of yield was also higher. Only a variety Waxyima had very similar BG content in both crop years. Both curves of waxy materials had very similar course compared to KM 1057 and AF Cesar. BG values for 100% yield are comparable with values determined at wholegrain flour.

Another type of NSP are arabinoxylans. The content of AX is shown in Table 5. Higher AX content is typical especially for rye, but also barley can be rich in it. The AX content in the Czech breeding line KM 1057 was the highest from all determined genotypes. AX content in fractions was 1.8–11.3%, which was similar to the study of Andersson et al. 2003 [30] (1.2–11.8%) and was comparable with other results reported in the literature for the typical barley (3.4–7.8%) [30, 33]. Lower AX content found in waxy lines can be caused by abrasion of hulls before milling, because AX mostly occurs in cell walls of the aleurone layer. It corresponds to higher AX content in the bran fractions. Both hull-less varieties contained more AX than hulled ones, which was different from values reported by Holtekljølén et al. [3].

A strong positive correlation between AX-protein in AF Cesar and KM 1057, between AX-ash in all varieties, and between AX-BG content in AF Cesar, KM 2460-2 and Waxyima was found. A strong negative correlation between AX-starch content was found in Czech varieties, while in Waxyima was the negative correlation only moderate.

Content and quality of dietary fibre depend on genotype, environmental growing conditions and composition of the kernel [34]. The IDF content was in the range from 3.0% in flour C1/AF Cesar to 40.2% in fine bran/KM 1057 (Table 6).

The SDF content was in the range from 2.8% in flour B1/KM 1057 to 16.6% in fine bran/KM 2460-2. These results are in agreement with Arendt and Zannini [28], who detected 3–20% SDF in the barley kernel. In general, the SDF content was higher in waxy genotypes and also in the cultivar AF Cesar with standard starch composition. Higher SDF content is in agreement with higher BG content found in both waxy barleys and AF Cesar.

The TDF content in the hull-less barleys was in the range of 6.9% (flour B3/AF Cesar) to 48.5% in fine bran/KM 1057 and in waxy barleys it was from 6.6% in flour B3/Waxyima to 37.8% in fine bran/Waxyima. Ullrich [34] noted TDF content in hull-less barley grain with standard starch composition about 13% and in waxy hulled barley about 20%. In our study the TDF content in wholemeal flour in waxy barley was similar to the results found by Ullrich [34], while values obtained in hull-less barleys were higher. Higher content of IDF and TDF was determined in the breeding line KM 1057 and in cultivar AF Cesar, which can be caused by the fact that both varieties were not abraded before milling.

A strong positive correlation $r \geq 0.70$ ($p < 0.001$) between all components of dietary fibre and ash, protein, BG and AX were found in AF Cesar.

4 Conclusions

It was confirmed that the new barley cultivars and especially some milling fractions have a desirable ratio of the components allowing them to be successfully used in the food industry. The inclusion of wholemeal flour or undivided short fraction from waxy varieties or AF Cesar would significantly increase the content of health-promoting ingredients in food and provide greater health benefits.

The highest BG and AX content in all genotypes was observed in wholemeal flour, in fine bran flour, coarse and fine bran. The highest BG and AX content was found in fine bran from KM 2460-2 (14.2%) and KM 1057 (11.3%), respectively.

A strong positive correlation among protein, ash and AX was found only in cultivars with standard starch composition (KM 1057, AF Cesar). It was evident a strong positive correlation for AX, BG and ash in the waxy genotypes and in the cultivar AF Cesar. The negative correlation between BG and starch was confirmed only in all barley materials. The strong negative correlation between AX and starch content was shown in all Czech barley varieties.

The authors would like to gratefully thank to Agrotest Fyto Ltd., CZ; MRI Detmold, Germany for their technical support, Professor Petr Dejmeš and Professor Marilyn Rayner for useful discussion. The financial support from Ministry of Agriculture CR (projects Nr. RO0211, QJ1210257 and QI111B053) is gratefully acknowledged.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- http://www.igc.int/en/grainsupdate/sd.aspx?crop=Barley (19th May, 2015).
- Byung-Kee, B., Ullrich, E. S., Barley for food: Characteristics, improvement and renewed interest. *J. Cereal Sci.* 2008, **48**, 233–242.
- Holtekjølen, K. A., Uhlen, K. A., Bråthen, E., Sahlström, S., Knutsen, H. S., Contents of starch and non-starch polysaccharides in barley varieties of different origin. *Food Chem.* 2006, **94**, 348–358.
- Ajithkumar, A., Andersson, R., Christerson, R., Åman, P., Amylose and A-Glucan content of new waxy barleys. *Starch/Stärke* 2005, **57**, 235–239.
- Slukova, M., *Barley: Physical properties, genetic factors and environmental impacts on growth*. (Ed.: K. Hasunuma), (Ed.) Nova Science Publishers, New York 2014, pp. 143–163.
- Muralikrishna, G., Subba Rao, M. V., Cereal non-cellulosic polysaccharides: Structure and function relationship—An overview. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2007, **47**, 599–610.
- Wanders, A. J., Van Den Borne, J. J. G. C., De Graaf, C., Hulshof, T., et al. Effects of dietary fibre on subjective appetite, energy intake and body weight: A systematic review of randomized controlled trials. *Obesity Rev.* 2011, **12**, 724–739.
- Lyly, M., Liukkonen, K. H., Salmenkallio-Marttila, M., Karhunen, L., et al. Fibre in beverages can enhance perceived satiety. *Eur. J. Nutr.* 2009, **48**, 251–258.
- Commission Regulation (EU) No. 432/2012. Commission Regulation (EU) No 432/2012 of 16 May 2012 establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children's development and health.
- Wood, P., Cereal β -glucans and health. *J. Cereal Sci.* 2007, **46**, 230–238.
- Collins, H. M., Burton, R. A., Topping, D. L., Liao, M.-L., et al. Variability in fine structures of noncellulosic cell wall polysaccharides from cereal grains: Potential importance in human health and nutrition. *Cereal Chem.* 2010, **87**, 272–282.
- Newman, R. K., Newman, C. W. (Eds.), *Barley for food and health. Science, Technology, and Products*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey 2008.
- Arora, T., Loo, R. L., Anastasovska, J., Gibson, G. R., et al. Differential effects of two fermentable carbohydrates on central appetite regulation and body composition. *PLoS ONE* 2012, **7**, 43263.
- Barsanti, L., Passarelli, V., Evangelista, V., Frassanito, A. M., Gualtieri, P., Chemistry, physico-chemistry and applications linked to biological activities of beta-glucans. *Nat. Prod. Rep.* 2011, **28**, 457–466.
- Sullivan, P., O'Flaherty, J., Brunton, N., Gee, V. L., et al. Chemical composition and microstructure of milled barley fractions. *Eur. Food Res. Technol.* 2010, **230**, 579–595.
- Shewry, R. S., in: Shewry, R. P. and Ullrich, E. S., (Eds.), *Barley chemistry and technology*, AACC International, Inc, Minnesota 2014, pp. 169–192.
- McKevith, B., Nutritional aspects of cereals. *BNF Nutrition Bulletin* 2004, **29**, 111–142.
- Byung-Kee, B., in: Shewry, R. P. and Ullrich, E. S., (Eds.), *Barley chemistry and technology*. AACC International, Inc, Minnesota 2014, pp. 233–265.
- Jacobs, S. M., Izydorczyk, S. M., Preston, R. K., Dexter, E. J., Evaluation of baking procedures for incorporation of barley roller milling fractions containing high levels of dietary fibre into bread. *J. Sci. Food Agric.* 2008, **88**, 558–568.
- Andersson, M. A. A., Armo, E., Grangeon, E., Fredriksson, H., et al. Molecular weight and structure units of (1→3, 1→4)- β -D-glucans in dough and bread from hull—Less barley milling fractions. *J. Cereal Sci.* 2004, **40**, 195–204.
- Izydorczyk, S. M., Dexter, E. J., Barley β -glucans and arabinoxylans: Molecular structure, physicochemical properties, and use in food products—A Review. *Food Res. Int.* 2008, **41**, 850–868.
- Dieckmann, K., BetaBARLEY—the new beta-glucan-rich barley for baking and more. *Baking+Biscuit International* 2011, **1**, 58–63.
- Kinner, M., Nitschko, S., Sommeregger, J., Petrasch, A., et al. Naked barley optimized recipe for pure barley bread with sufficient beta-glucan according to the EFSA health claims. *J. Cereal Sci.* 2011, **53**, 225–230.
- Douglas, G. S., A rapid method for the determination of pentosans in wheat flour. *Food Chem.* 1981, **7**, 139–145.
- Andersson, M. A. A., Courtin, M. C., Delcour, A. J., Fredriksson, H., et al. Milling performance of north European

- hull-less barleys and characterization of resultant mill-streams. *Cereal Chem.* 2003, *80*, 667–673.
- [26] Sundberg, B., Åman, P., Fractionation of different types of barley by roller milling and sieving. *J. Cereal Sci.* 1994, *19*, 179–184.
- [27] Izydorczyk, S. M., McMillan, L. T., Kletke, B. J., Dexter, E. J., Effects of pearling, grinding conditions, and roller mill flow on the yield and composition of milled products from hull-less barley. *Cereal Chem.* 2011, *88*, 375–384.
- [28] Arendt, K. E., Zannini, E., in: Hughes, S., Cox, R., Hooper, A., McFadyen, H., (Eds.) *Cereal grains for the food and beverage industries*. Woodhead Publishing, Philadelphia 2013, pp 155–200 201e.
- [29] Velebna, N., Slukova, M., Honcu, I., Prihoda, J., The choice of nutritionally lucrative flour streams from barley milling flow. *Procedia Engineering* 2012, *42*, 2035–2043.
- [30] Příhoda, J., Skřivan, P., Hrušková, M., *Cereální chemie a technologie 1.*, publishing UCT Prague, Prague 2006.
- [31] Tiwari, U., Cummins, E., Sullivan, P., Flaherty, J. O., et al. Probabilistic methodology for assessing changes in the level and molecular weight of barley β -glucan during bread baking. *Food Chem.* 2011, *124*, 1567–1576.
- [32] Brennan Ch., S., Cleary, L. J., The potential use of cereal (1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4)- β -d-glucans as functional food ingredients. *J. Cereal Sci.* 2005, *42*, 1–13.
- [33] Trafford, K., Fincher, B. G., in: Shewry, R. P. and Ullrich, E. S., (Eds.), *Barley chemistry and technology*, AACC International, Inc, Minnesota 2014, pp. 71–95.
- [34] Ullrich, E. S., (Eds.), *Barley: Production, improvement and uses, 1st ed. World Agriculture Series*, Wiley-Blackwell Publishing Ltd, New Jersey 2011.



Cheese whey treated by membrane separation as a valuable ingredient for barley sourdough preparation



M. Sluková^{a,1}, A. Hinková^{a,*}, S. Henke^{a,1}, F. Smrž^{b,2}, M. Lukačíková^{a,1}, V. Pour^{a,1}, Z. Bubník^{a,1}

^a Institute of Chemical Technology, Prague, Department of Carbohydrates and Cereals, Technická 5, 16628 Prague 6, Czech Republic

^b Zeelandia Company, Malsice 267, 39175 Malsice, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 October 2014

Received in revised form

5 March 2015

Accepted 9 March 2015

Available online 20 April 2015

Keywords:

Propionic acids

Rejection

Recovery

Food preservatives

Cheese whey

Sourdough

Diafiltration

Barley

Extrusion

Fluid drying

ABSTRACT

Utilisation of cheese whey for production of healthier food has been the main task of this study. Cheese whey, which is often considered as a waste material, was treated by a series of processes including fermentation, membrane filtrations, mixing with barley flour, drying, and/or extrusion to produce barley sourdough.

In the first series of experiments, the effect of membrane ultrafiltration (UF) and nanofiltration (NF) on separation of whey components has been studied. Non-fermented sweet cheese whey was treated by pilot-plant membrane ultrafiltration (50 kDa tubular ceramic membrane, TAMI Industries, France), followed by three step diafiltration to minimise losses of lactose, glucose, galactose, and organic acids (namely lactic acid) in retentate. The UF permeates were used for the subsequent nanofiltration and diafiltrations (spiral wound membrane NF 270–2540, Filmtec, Dow Chemicals, USA). The results showed high recovery of proteins (81%) during UF and reduction of lactose and propionate losses by using diafiltration. Rejections of components on the NF membrane were: 93% lactose, 77% galactose, and 76% lactic acid. However, the diafiltration on the NF membrane reduced the relative recovery both for carbohydrates and organic acids.

In the second series of experiments, cheese whey was concentrated by reverse osmosis (RO) and the obtained retentate was fermented with *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Proionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii*. Part of the fermented whey was mixed with barley flour and dried by cold air fluid drying to produce sourdough pellets. The other part of fermented whey was filtered by nanofiltration and both permeate and retentate were sprayed on the surface of sourdough pellets in several layers and dried again. The extrusion of a mixture containing barley flour and fermented whey was tested for pellet production as well. The main aims were to obtain sourdough rich in natural preservatives, and maintain the present microorganisms active. That is why all the technological processes, including drying, were carried out under low temperatures. The content of organic acids (lactic, acetic and propionic) was analysed in final sourdough samples.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The technology of fermented cereal products is nearly as old as the humankind itself, and seemingly, there is not much to improve. Nevertheless, concerns about food safety and quality, nutritional properties, and positive effect on human health boosted the

research even on traditional food products, such as bread. Nowadays, the attention is drawn to sourdough, as well as new types of cereals.

Barley represents such cereal even though it is one of the oldest crops. Barley has been mostly used as animal feed or for malt production, and only 5% is being used in food (FAO, 2009). From a nutritional point of view, barley contains high amount (8–10%) of soluble dietary fibre in form of β -glucans (Dickin et al., 2011; Dieckmann, 2011), which are evenly distributed in the whole grain, including endosperm and pericarp (Baik and Ullrich, 2008; Holtekjølén et al., 2006).

* Corresponding author. Tel.: +420 220443111; fax: +420 220445130.

E-mail addresses: hinkovaa@vscht.cz (A. Hinková), fsmrz@zeelandia.cz (F. Smrž).

¹ Tel.: +420 220443111; fax: +420 220445130.

² Tel.: +420 602491470.

Many studies have confirmed the positive effect of β -glucans in human diet on the prevention of many life-style diseases, such as type 2 diabetes, cardiovascular diseases, obesity and high cholesterol levels (Andersson and Åman, 2011). For example, according to Collins et al. (2010), a higher dietary fibre intake reduced the risk of cardiovascular disease and myocardial infarction. Barley β -glucans have been proved to lower the glucose and insulin responses in blood serum (Rieder et al. 2012), and reduce the glycaemic properties of bread (Lappi et al., 2010). β -glucans of different origin exhibited a protective activity against different mutagenic agents (Mantovani et al., 2008). However, the effect depends strongly on the amount of beta-glucans in the diet (Wood, 2007). According to the European Food Safety Authority (EFSA, 2011) “4 g of beta-glucans from oats or barley for each 30 g of available carbohydrate should be consumed per meal” to decrease post-prandial glycaemic responses.

Spontaneous fermentation of barley milling represents a great option for using barley in human alimentation. The sourdough fermentation of wholemeal flour or bran by means of yeast and bacteria brought interesting results regarding the improvement of the baking (flavour, structure and stability), nutritional (Torrieri et al., 2014) and also sensory quality of bread (Mariotti et al., 2014). In addition, sourdough can also retard starch digestibility leading to low glycaemic responses and improve bioavailability of minerals and bioactive compounds (Poutanen et al., 2009). Cereal fermentation may produce non-digestible polysaccharides (dietary fibre) or new bioactive compounds (such as prebiotic oligosaccharides) and also reduce gluten to develop gluten-free products (Moroni et al., 2009).

Lactic acid bacteria (LAB), the dominant microorganisms in sourdoughs, produce lactate, acetate and other antifungal compounds. Propionibacteria (PAB), the producers of propionate, have been known in dairy. Both lactate and propionate serve as food preservatives and they are often used in bakery products to prolong the shelf life, especially in wheat white bread. Since the consumers prefer few or no food additives, the sourdough fermentation is another natural way how to improve the shelf life of bread (Zhang et al., 2010; Ryan et al., 2008).

Lactose from cheese whey can serve as a source of carbon for fermentation. Cheese whey is produced in large quantities in cheese manufacture. Despite the whey's high content of valuable substances (lactose, milk proteins), whey is often disposed of in waste waters. Hugenschmidt et al. (2011) used the filtered whey for fermentation of *Lactobacillus plantarum* SM39 and *Propionibacterium freudenreichii* DF13 to obtain high concentration of folate and intra-cellular vitamin B12.

Our research followed several aims. The main aim was to use cheese whey as a beneficial ingredient for preparation of sourdough with high amount of propionic and lactic acids, which are natural preservatives improving the rheological properties of cereal dough. To increase the nutritional value and the shelf life of the final product, barley was chosen to be blended with fermented whey.

Whey was treated by several processes to produce sourdough pellets. First of all, cheese whey was concentrated by reverse osmosis (RO) and the retentate fermented with *L. plantarum*, *Lactobacillus sanfranciscensis* and *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii*. The synergistic effect of lactobacilli and propionic bacteria was used (Zhang et al., 2010; Ryan et al., 2008). Part of the fermented whey was directly mixed with barley flour and the mixture was fluid dried by cold air to obtain barley sourdough pellets. Other part of the fermented whey was processed by nanofiltration, and both the permeate and the retentate fractions were sprayed onto the surface of dried sourdough in several layers and dried again. Low temperature extrusion has been investigated

for sourdough preparation using fermented whey as well.

Membrane techniques were tested for possible improvement of whey composition. Therefore, the separation properties of 50 kDa tubular inorganic ultrafiltration (UF) membrane were studied in non-fermented sweet cheese whey. The ultrafiltration aimed at the concentration of proteins in retentate with minimal losses in sugars and organic acids. Ultrafiltration was followed by three step diafiltration using the same UF membrane where sugars and organic acids were expected to be transferred into permeate. UF permeates were treated by nanofiltration (NF) on a spiral wound polymeric membrane to concentrate components important for sourdough quality, such as organic acids and sugars. The three step diafiltration on the NF membrane was carried out as well to study the effect on separation.

2. Material and methods

2.1. Material

2.1.1. Cheese whey and barley flour

1.2 kg of bovine dried sweet cheese whey (Moravia Lacto, Czech Republic) was diluted with 18.8 kg of demineralised water and used as feed solution for ultrafiltration, nanofiltration and all diafiltrations. Dried whey composition was: proteins 11.0%, milk fat 1.5%, lactose 69.5%, mineral substances 7–9%, pH 6.

Bovine sweet cheese whey from a local dairy (Milko, Poděbrady, Czech Republic) was concentrated by reverse osmosis and retentate was used as a substrate for fermentation and preparation of sourdough pellet. Lactose content in concentrated whey (RO retentate) was 12.5% (w/w). Whey was used fresh without any modifications.

Barley flour for sourdough preparation was obtained from a local mill (Automatické mlýny, Klíma, Křesín, Czech Republic).

2.1.2. Microorganisms

Bacteria *L. plantarum* (JM-57V-7A), *L. sanfranciscensis* (CCDM 451), and *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* were obtained from the Culture collection of The Dairy Research Institute (VUM, Tabor, Czech Republic).

2.1.3. Chemicals

2.1.3.1. Chemicals for anion-exchange chromatography. Lactose standard was purchased from Fluka (Switzerland), galactose and glucose were obtained from Sigma Aldrich (Germany). Ultrapure water (Simplicity, Millipore, USA) with the resistivity of 18.2 M Ω and 50% sodium hydroxide (Fluka, Germany) were used for mobile phase preparation.

2.1.3.2. Chemicals for isotachopheresis. The standards used were: lactic acid (Lachema, Czech Republic), citric acid (Penta, Czech Republic), acetic acid (Lachema, Czech Republic), and propionic acid (Penta, Czech Republic).

The composition of leading electrolyte (pH 4.5) was: 10 mM hydrochloric acid (Sigma, Germany), 22 mM epsilon-amino caproic acid (Sigma, Germany), and 0.1% hydroxypropyl methyl cellulose (Fluka, Germany). The terminal electrolyte composition was 5 mM caproic acid (P Lab, Czech Republic).

2.2. Filtration stations and membranes

2.2.1. Ultrafiltration

The cross flow ultrafiltration station ARNO 600 (Mikropur, Hradec Králové, Czech Republic) is equipped with a piston pump Hydra-cell (model G13, Wanner Engineering Inc., USA), having a maximum power of 1500 W and a speed of 1450 RPM (Fig. 1). The maximum output is 600 l/h, the maximum operation pressure is

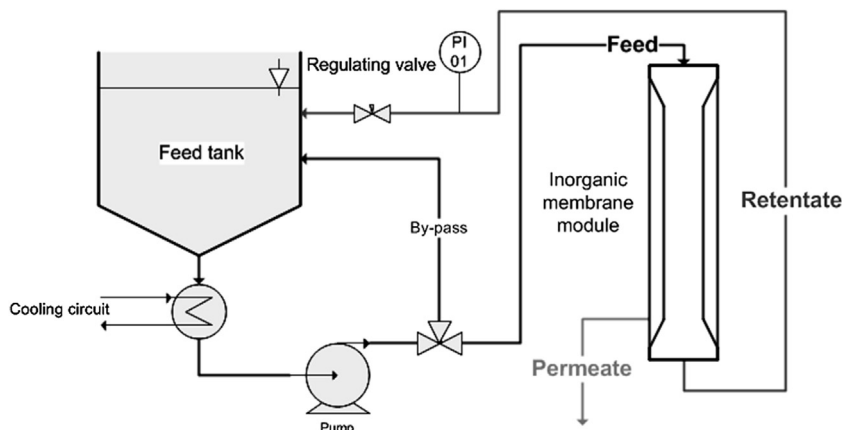


Fig. 1. The technological scheme of the filtration unit ARNO 600.

6 MPa, and the maximum temperature is 75 °C. A ceramic tubular membrane (TAMI Industries, Nyons, France) with a cut off of 50 kDa (with zirconia active layer), a length of 30 cm, and a filtration area of 0.076 m² was used for ultrafiltration.

2.2.2. Nanofiltration

Nanofiltration was carried out using filtration station TIA (model NA-IO, Bollene, France, Fig. 2). The filtration is driven by the Cat Pump 311 (Minneapolis, USA) with a maximum flow rate of 900 l/h. The maximum operation conditions are: temperature 50 °C, pressure 0.6 MPa, pH 2–11. A spiral wound membrane NF 270-2540 (Dow Chemical Company, Midland, USA) with a filtration area of 2.6 m² was used for nanofiltration. This membrane is intended for removing a high percentage of total organic carbon (TOC) and trihalomethanes (THM) precursors with medium to high salt passage and the MgSO₄ rejection (2000 ppm, 25 °C) of more than 97%.

2.2.3. Reverse osmosis

Fresh whey was concentrated in the local dairy (Milko, Poděbrady, Czech Republic) using a reverse osmosis membrane GE Osmonics, type AF3840C-30D (Lennotech, Delft, The Netherlands).

2.3. Process conditions

2.3.1. Ultrafiltration, nanofiltration and diafiltrations of non-fermented whey

Non-fermented cheese whey was filtered in two main steps, each consisting of several individual stages. Fig. 3 shows the

ultrafiltration set-up including the names of individual products/samples. Ultrafiltration (single step, UF) was carried out first to concentrate the whey. Then three diafiltrations (DUF1 – DUF3) followed, during which demineralised water was added into feed. The volume of permeate removed corresponded to the volume of added water; i.e. twice 4 kg and once 1 kg of water were added, which means 9 kg of water in total (Fig. 3). The driving pressure was 0.1 MPa at the temperature of 35 °C both for single step UF and all diafiltrations.

Permeates from ultrafiltration were mixed together and used as the feed solution for the following cross-flow nanofiltration (single step, NF) followed by three diafiltrations (DNF1 – DNF3), where 10 kg of water was added three times (Fig. 4). Again, the amount of water added corresponded to the amount of permeate removed. The driving pressure was 1.5 MPa at the temperature of 35 °C.

Both ultrafiltration and nanofiltration ran in the retentate recycling mode. Samples of feed, permeates and retentates were collected in every step, including diafiltrations. The process set-up and the names of samples in individual nanofiltration stages are summarised in Fig. 4.

2.3.2. Reverse osmosis of cheese whey

Reverse osmosis of fresh cheese whey was carried out in the local dairy in three stages. The process conditions were as follows; the temperature was 20 °C at the pressure of 0.88 MPa and the flow rate of 12,000 l/h in the 1st stage, in the 2nd stage the temperature was 40 °C at the pressure of 3.25 MPa, and in the 3rd stage the temperature was 5 °C at the flow rate was 5000 l/h. The whey was cooled down to 20 °C between the stages 2 and 3.

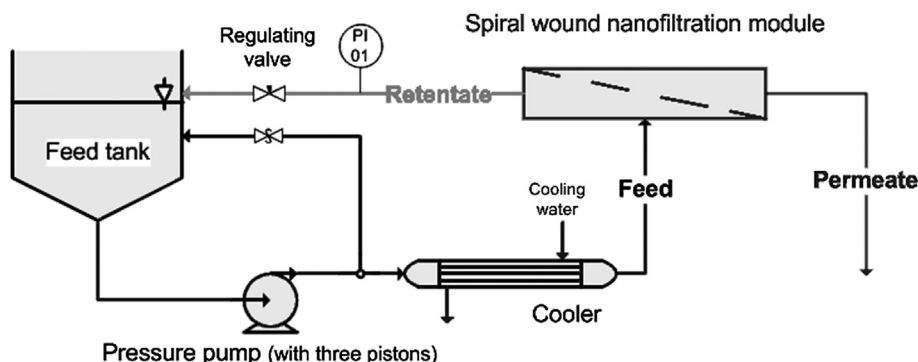


Fig. 2. The technological scheme of the filtration unit NA-IO TIA 600.

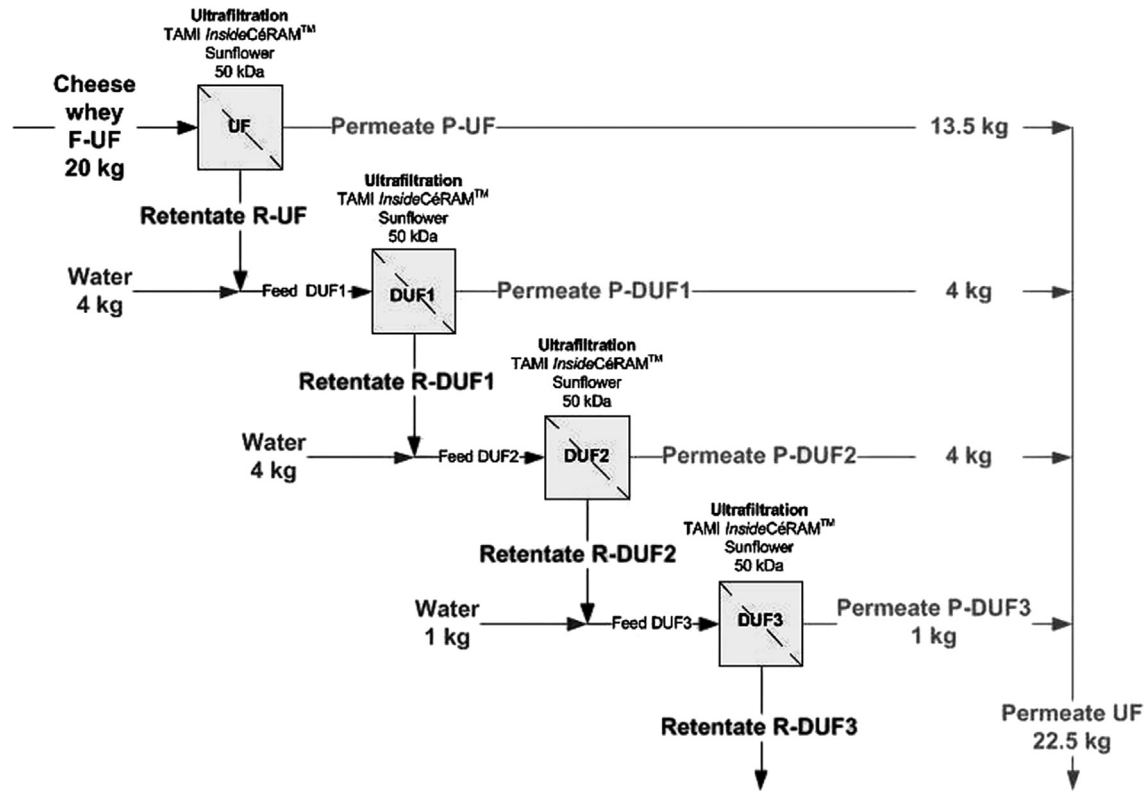


Fig. 3. The technological scheme of the ultrafiltration and following diafiltrations; F – feed, P – permeate, R – retentate, UF – ultrafiltration, DUF – dia-ultrafiltration.

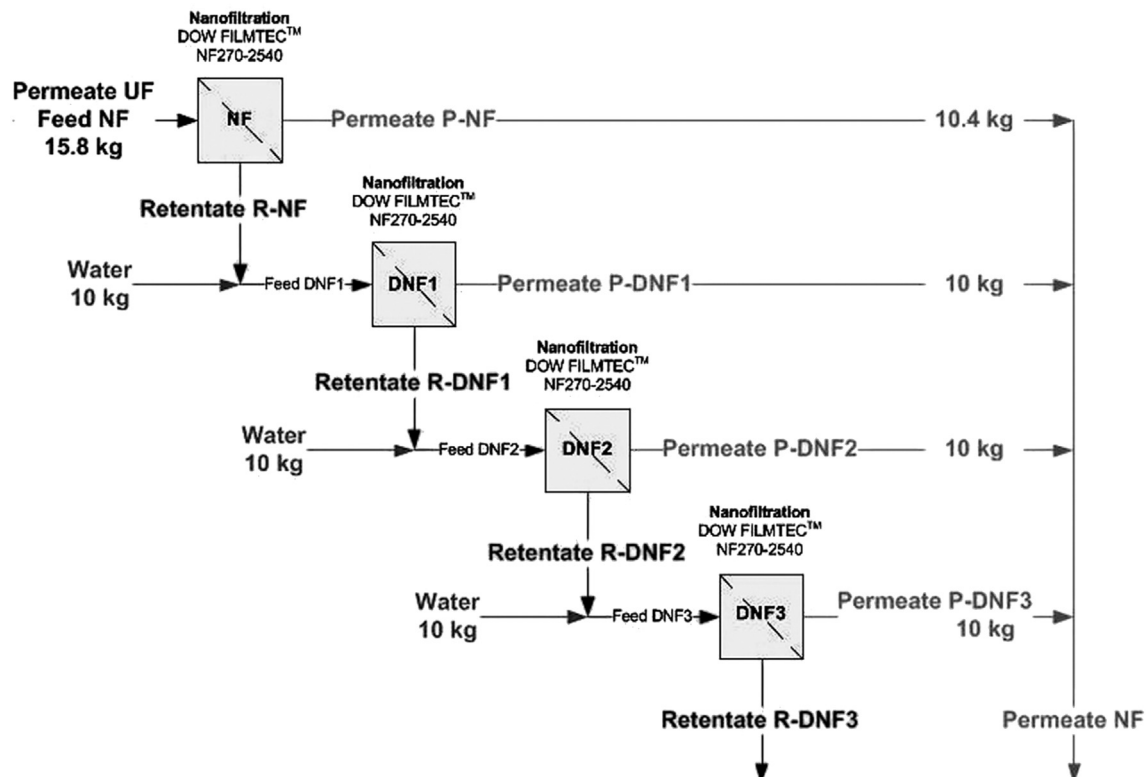


Fig. 4. The technological scheme of the nanofiltration and following diafiltrations; P – permeate, R – retentate, NF – ultrafiltration, DNF – dia-nanofiltration.

2.3.3. Nanofiltration of fermented whey

Fermented cheese whey for sourdough preparation was concentrated in single step nanofiltration (NF2) using FILMTEC NF 270-2540 membrane (Dow Chemical Company, Midland, USA) described in Section 2.2.2. Samples of permeates and retentates were taken every 15 min and analysed (organic acid content, pH, TTA and refractometric dry solids). The driving pressure was 1.5 MPa at the temperature of 35 °C. Samples of permeate and retentate taken in the 30th minute (samples P30 and R30) were used for sourdough preparation.

2.3.4. Whey fermentation

Fermentation was carried out in an industrial scale batch vertical fermenter with bottom heating (Josef Trkovský, Milevsko, Czech Republic) at the temperature of 35 °C for 72 h. Fermenter volume was 500 l, with a maximum filling ratio of 66%. The volume of fermented whey was 330 l and the pH was 5–6. No supplements were added to the bioreactor.

2.3.5. Sourdough preparation and drying

Fermented cheese whey was divided into three parts, each having a volume of approximately 100 l. Every part was then treated by several different processes to obtain dried sourdough pellets. The flow chart of all processes used is summarised in Fig. 5.

First part of the fermented cheese whey was blended with barley flour in a weight ratio of 3:1 (whey: barley flour) and dried in a fluid dryer (Revtech, Lorient, France) at a temperature of 10 °C for 30 min. Processing conditions for drying were set to concentrate sourdough but not to destroy naturally produced organic acids and the present microorganisms.

Other part of the fermented whey (approximately 100 l) was concentrated using nanofiltration. Both permeate and retentate taken in the 30th minute during the NF of fermented whey were sprayed on the surface of sourdough pellets with the aim to increase the concentration of organic acids in the final product. Every layer was dried in a fluid dryer (Revtech, Lorient, France) at 10 °C for 30 min before another layer has been applied. The total number of layers sprayed was 7.

Remaining part of fermented whey was treated by low-temperature extrusion in a twin screw extruder with three chambers (Fine-Mechanik, HB GmbH, Metten, Germany) for 6 h. Low temperature of extrusion (3–5 °C) was maintained by cold water (temperature of –4 °C) in a jacketed vessel cooling system. 80 l of fermented whey was mixed with barley flour (3:1) and this paste entered the extruder. Another 20 l of fermented whey was also injected into the 2nd chamber of the extruder and the paste was thickened in the 3rd chamber, where the pellets were formed. Then the pellets were dried in a fluid dryer (Revtech, Lorient, France) under the conditions described above.

2.4. Calculations

Feed and permeate weights were measured before and after the filtration, however, the amount of retentate could not be precisely measured due to the losses of solution inside the filtration units. That is why the amount of retentate was calculated from the mass balance (1) where m_R , m_P and m_F is weight of retentate, permeate and feed [kg], respectively.

$$m_R = m_F - m_P \quad [\text{kg}] \quad (1)$$

Mass concentration factor (MCF) was then calculated according to Eq. (2) (Koros et al., 1996):

$$\text{MCF} = m_F / m_R \quad [1] \quad (2)$$

Apparent rejection factor R_i was expressed by Eq. (3) (Koros et al., 1996) where c_{iP} and c_{iF} are concentrations [g/l] of component i in the permeate and the feed, respectively.

$$R_i = 1 - \frac{c_{iP}}{c_{iF}} \quad [1] \quad (3)$$

Relative recovery of components η_i was calculated by Eq. (4) (Koros et al., 1996), as a ratio of the weight of the component in the useful product $m_{i,\text{out}}$ to the total weight of the component entering the process $m_{i,\text{tot}}$:

$$\eta_i = m_{i,\text{out}} / m_{i,\text{tot}} \quad [1] \quad (4)$$

2.5. Analytical methods

Lactose and galactose content was measured by anion-exchange chromatography with amperometric detection (Electrochemical detector ED50, Dionex, Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, USA), column CarboPac PA1 (2 × 250 mm, Dionex, Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, USA), pump (model GS50, Dionex, Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, USA) providing a flow rate of 0.25 ml/min at 25 °C (thermostat TCC-100 Dionex, Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, USA). The mobile phase composition was 50 mM NaOH for isocratic elution (for 20 min) followed by 20 min of column regeneration in 200 mM NaOH.

Organic acids (lactic, acetic, propionic, citric) were analysed by isotachopheresis (Ionosep 2003, Recman, Ostrava, Czech Republic). The setting of electric current was: 10 µA for 10 s, 100 µA for 390 s, 50 µA for 400 s, and 10 µA for 30 s. Driving electric currents were 80 µA (beginning) and 30 µA (terminal). Organic acids in dried sourdough pellets were determined after pulverization of the sample. One g of powder was transferred into a 100 ml volumetric flask with 50 ml of demineralised water and extracted using an ultrasonic bath (Kraintek K3-L, Hradec Kralove, Czech Republic) for 15 min at 25 °C. Then the flask was cooled down to 20 °C and filled up with distilled water.

Dry solid content was determined by drying at 105 °C to constant weight (ICC 110/1, 1996).

Nitrogen and protein contents were measured using the Kjeldahl method. The multiplication factor to calculate the protein content was 5.7 (ICC 105/2, 1996).

Total titratable acidity (TTA) was determined by mixing 10 g of flour with 100 ml of demineralised water and few drops of ethanol to prevent lump formation. TTA was determined by titration of prepared suspension with the sodium hydroxide solution (0.1 mol/l), and phenolphthalein as indicator.

pH was measured by a digital pH meter INoLAB pH 720 (WTW, Weilheim, Germany). The refractometric dry solids was determined by a digital refractometer RFM 640 (Bellingham & Stanley Ltd., Basinstoke, UK).

3. Results and discussion

3.1. Membrane filtration

The filtration experiments were mainly focused on separation efficiency and recovery of individual components. The filtration kinetics was measured as well. The permeate flow rate was about 4–5 l/h m² during ultrafiltration and 3–5 during nanofiltration l/h m². In both cases, the permeate flow rate was not improved by addition of water during diafiltration.

3.1.1. Ultrafiltration of non-fermented whey

The aim of ultrafiltration and diafiltrations was to separate the protein fraction and obtain a permeate rich in lactose and organic

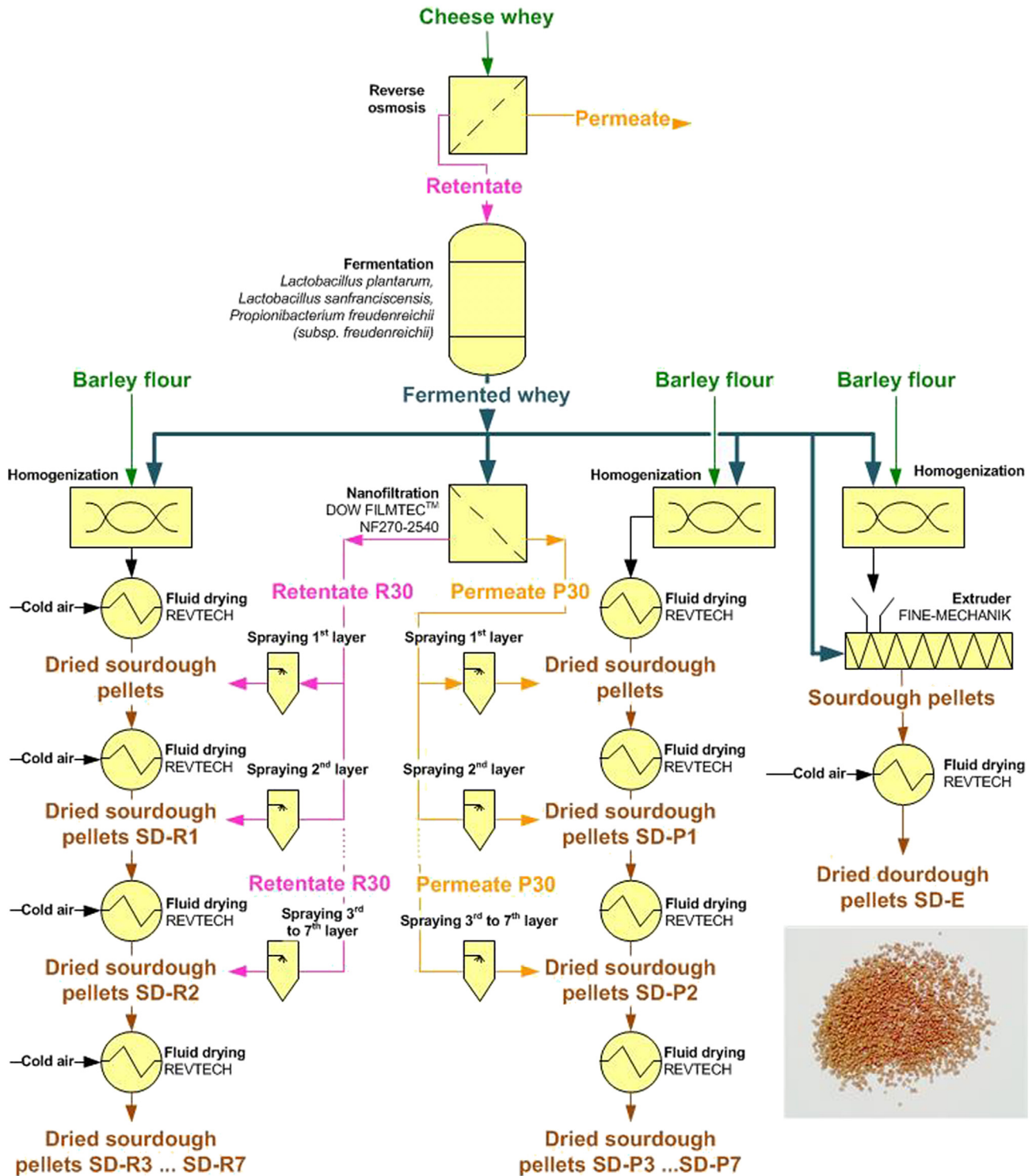


Fig. 5. The flow chart of technological procedures for sourdough preparation.

acids, which can be used for sourdough preparation. The concentrations of various compounds in products from ultrafiltration and diafiltrations are summarised in Table 1. The mass concentration factor in single step UF was 3.1. Changes in concentration of chosen components during the ultrafiltration on 50 kDa membrane are shown in Figs. 6 and 7. It is evident that the retention of proteins and nitrogen compounds (Fig. 6) was very high (80.9%) on the UF

membrane and both of these components became concentrated in the retentate even during the three diafiltrations. This membrane will retain most of larger proteins (Walstra et al., 1999), such as immunoglobulines (~150 to 900 kDa), bovine serum albumin (~66 kDa), lactoferrin (~86 kDa), and transferrin (~76 kDa). Separated proteins are a valuable fraction, which can be used for the production of a protein concentrate or a protein isolate and sold

Table 1
Concentrations and mass fractions of compounds in ultrafiltration feed, permeates and retentates.

T (h)	Sample	DS (% w/w)	N (% w/w)	Pr (% w/w)	Glc (g/l)	Gal (g/l)	Lac (g/l)	CA (g/l)	AA (g/l)
0.00	F-UF	5.6	0.12 ± 0.007	0.774 ± 0.042	0.036	1.530	43.36 ± 0.47	0.53	0.15
19.90	P-UF	4.2	0.02 ± 0.000	0.148 ± 0.000	0.023	—	37.59 ± 0.32	0.40	0.13
30.80	P-DUF1	2.5	—	—	0.018	—	20.40 ± 0.80	0.31	0.12
42.87	P-DUF2	1.4	—	—	0.015	1.288	10.13 ± 0.06	0.16	0.06
46.63	P-DUF3	1.4	—	—	0.013	1.369	9.72 ± 0.37	0.15	0.06
19.90	R-UF	7.4	0.30 ± 0.000	1.921 ± 0.000	0.068	3.139	42.48 ± 0.66	0.61	0.19
30.80	R-DUF1	6.2	0.32 ± 0.001	2.043 ± 0.008	0.025	3.061	29.59 ± 0.96	0.39	0.14
42.87	R-DUF2	4.1	0.28 ± 0.005	1.754 ± 0.033	0.013	1.905	16.93 ± 1.12	0.21	0.07
46.63	R-DUF3	4.4	0.33 ± 0.001	2.098 ± 0.006	0.007	2.123	17.91 ± 0.55	0.21	0.06

T – time of filtration, DS – dry solids, N – nitrogen compounds, Pr – proteins, Glc – glucose, Gal – galactose, Lac – lactose, CA – citric acid, AA – acetic acid, F – feed, P – permeate, R – retentate, UF – ultrafiltration, DUF – dia-ultrafiltration

separately. Proteins remaining in the whey UF permeate (19% of the entering proteins) contribute to the higher content of proteins in the final sourdough product.

The UF membrane also partly rejected lactose therefore some lactose remained in retentate. However, lactose concentration in the retentate decreased; as some of the lactose was washed into the permeate during diafiltrations. Similar effect is obvious in Fig. 7 where the organic acids partially retained in the single step ultrafiltration (samples P-UF and R-UF) were transferred into permeate during diafiltrations (samples P-DUF1, P-DUF2, and P-DUF3) and their concentration in retentates gradually declined after each diafiltration (samples R-DUF, R-DUF2, and R-DUF3).

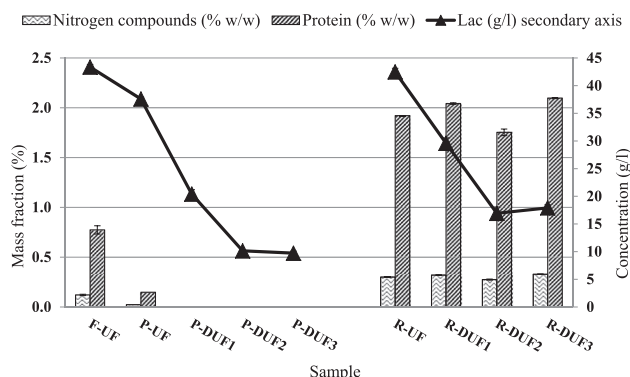


Fig. 6. Concentration of nitrogen compounds, proteins, and lactose (Lac) during ultrafiltration. F – feed, P – permeate, R – retentate, UF – ultrafiltration, DUF – dia-ultrafiltration.

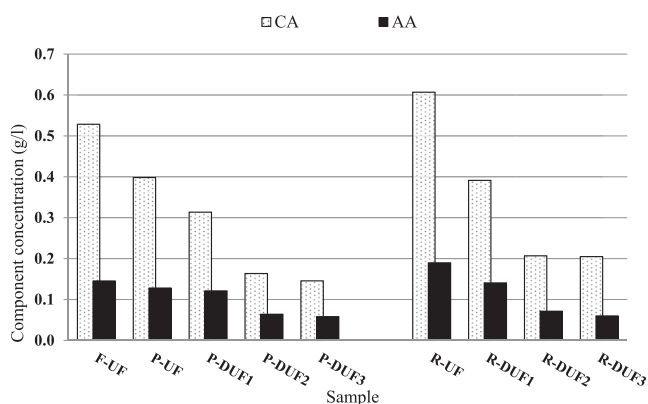


Fig. 7. Concentration of organic acids during ultrafiltration; CA – citric acid, AA – acetic acid, F – feed, P – permeate, R – retentate, UF – ultrafiltration, DUF – dia-ultrafiltration.

Relative recovery of components during single step ultrafiltration and all three diafiltrations in total was calculated (Table 2) from the mass balance. The recovery of nitrogen compounds was 81% in the retentate, both for single step ultrafiltration and diafiltrations. Lactose loss in single-step UF was 37%, but the diafiltrations reduced the loss of lactose to 14%. Similar effect is seen in organic acids rejection where the recovery after the three diafiltrations was between 80% and 90%. Diafiltrations on the ultrafiltration membrane were efficient in reducing of losses of components (mainly organic acids) important for sourdough preparation.

3.1.2. Nanofiltration of non-fermented whey

Nanofiltration membrane NF 270-2540 (Dow, Filmtec) was applied in order to obtain concentrated organic acids and carbohydrates from the UF permeate. The achieved mass concentration factor in single step NF was 2.9. Composition of various NF products is shown in Table 3. As it is seen from Fig. 8, nitrogen compounds and lactose were mostly retained by the membrane. Lactose and galactose rejection factor in a single step nanofiltration was 93.3% and 77.1%, respectively (Table 2). From all analysed organic acids, the citric acid was the most concentrated acid in retentate (Fig. 9). With its molecular weight of 192 g/mol, citric acid has the largest molecule from all analysed organic acids whose molecular weights are between 60 g/mol (acetic acid) and 91 g/mol (lactic acid). Rejection of organic acids was between 71% and 76%, and during the following diafiltration, the acids (apart from citrate) were transferred into permeate. As a consequence, the diafiltration deteriorated the relative recovery (Table 2). Only a single step nanofiltration is necessary to concentrate acids and carbohydrates, which can be used for sourdough preparation.

Table 2

Relative recovery (η_i) and rejection factors (R_i) of some components in various filtration products.

Component	Relative recovery η_i (%)				R_i (%)
	Permeate Single step	Retentate Single step	Permeate DF Total	Retentate DF Total	Single step
<i>UF</i>					
Nitrogen	19	81	19	81	—
Lactose	63	37	86	14	13.31
CA	58	43	80	20	24.67
AA	59	43	88	12	—
<i>NF</i>					
Nitrogen	47	53	55	45	—
Lactose	4	96	15	85	93.30
Galactose	34	66	48	52	77.08
CA	20	80	14	86	71.10
LA	33	67	81	19	76.41

CA – citrate, LA – lactic acid, AA – acetic acid, DF – diafiltration, UF – ultrafiltration, NF – nanofiltration.

Table 3

Concentrations and mass fractions of compounds in nanofiltration feed, permeates and retentates.

T (h)	Sample	DS (% w/w)	N (% w/w)	Pr (% w/w)	Glc (g/l)	Gal (g/l)	Lac (g/l)	CA (g/l)	LA (g/l)
0.00	F-NF	3.1	0.025 ± 0.002	0.159 ± 0.010	0.022	0.927	27.62 ± 0.95	0.299	0.365
0.68	P-NF	0.4	0.009 ± 0.000	0.058 ± 0.000	0.008	0.212	1.85 ± 0.23	0.087	0.086
1.02	P-DNF1	0.2	0.005 ± 0.001	0.034 ± 0.006	0.014	0.161	1.46 ± 0.21	0.064	0.045
1.95	P-DNF2	0.2	0.003 ± 0.000	0.021 ± 0.001	0.018	0.122	1.25 ± 0.15	0.055	0.025
3.13	P-DNF3	0.1	0.003 ± 0.000	0.020 ± 0.003	–	0.148	1.65 ± 0.22	0.064	0.013
0.68	R-NF	6.8	0.038 ± 0.003	0.243 ± 0.017	0.024	1.742	49.33 ± 1.21	0.652	–
1.02	R-DNF1	6.5	0.034 ± 0.000	0.220 ± 0.000	0.023	1.640	49.81 ± 1.52	0.705	–
1.95	R-DNF2	6.0	0.029 ± 0.000	0.187 ± 0.000	0.024	1.439	47.61 ± 1.67	0.638	–
3.13	R-DNF3	7.6	0.037 ± 0.002	0.238 ± 0.010	0.011	1.554	56.10 ± 3.20	0.796	–

T – time of filtration, DS – dry solids, N – nitrogen compounds, Pr – proteins, Glc – glucose, Gal – galactose, Lac – lactose, CA – citric acid, LA – lactic acid, F – feed, P – permeate, R – retentate, NF – nanofiltration, DNF – dia-nanofiltration.

3.2. Sourdough preparation

Traditional cheese whey fermentation with bacteria of *Lactobacillus* genera produces high amounts of lactic and acetic acids. The inhibition effect of propionic acid on the growth of microorganisms and moulds is much stronger than the one of lactic and acetic acids. In this work, the synergistic effect of lactobacilli and propionibacteria was used to transform lactic acid into propionate, which is a natural preservative. The aim was to produce a sourdough with high content of natural propionic acid.

Nanofiltration, previously tested for concentration of organic acids and lactose in non-fermented whey, was used for processing

of fermented whey too. Fig. 10 shows the content of organic acids (propionate, lactate and acetate) in the feed (sample F), permeate collected in the 30th minute (sample P30), and retentate collected in the 5th and 30th minute of the filtration (samples R5 and R30). It is obvious that the concentrations of acids in retentate increased very slowly during the nanofiltration. The reason is the large volume of feed filtered (50 l), and only small amount (10.25 l) of permeate collected in first 30 min. After 30 min, another 50 l of cheese whey was added into the feed tank to process large quantity of whey for the next sourdough preparation. That is why low concentration factors were achieved.

Both permeate P30 and retentate R30 from nanofiltration were sprayed on the surface of the sourdough pellets (Fig. 5). The resulting amount of naturally produced propionic, lactic and acetic acids in dried sourdough pellets is summarised in Table 4. The concentration of propionic acid, which is the main preservative, was between 0.24% and 4.11 % in dried sourdough and increased with number of layers sprayed on the top of the pellets. Therefore, gradual application of several layers of fermented whey on the pellet surface increased the total amount of propionate in the final sourdough product.

On the other hand, the differences between the applications of permeate (Table 4, samples SD-P1 to SD-P7) and retentate (samples SD-R1 to SD-R7) were insignificant. For example, the lactic acid contents in pellets with five layers of filtered whey (Table 4, samples SD-R5 and SD-P5) were similar both for retentate (2.23%) and permeate (2.27%) coating. This was caused by the fact that the samples of permeate and retentate (P30 and R30) were taken too early (after 30 min) and the fermented whey was not sufficiently concentrated by nanofiltration. Therefore, the expected higher

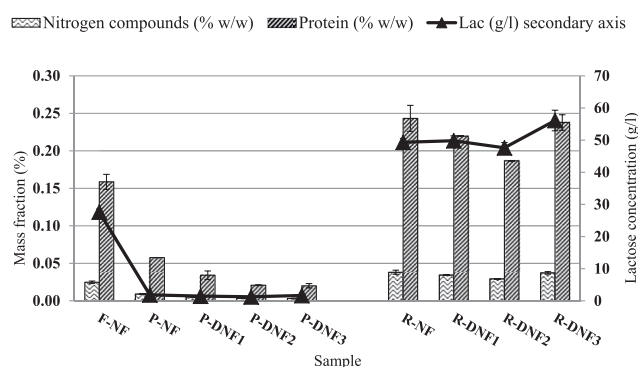


Fig. 8. Mass fraction of nitrogen compounds, proteins and lactose (Lac) during nanofiltration; F – feed, P – permeate, R – retentate, NF – nanofiltration, DNF – dia-nanofiltration.

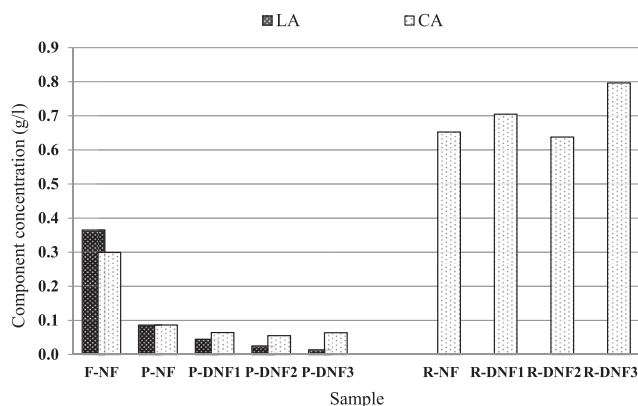


Fig. 9. Concentration of organic acids during nanofiltration; LA – lactic acid, CA – citric acid, F – feed, P – permeate, R – retentate, NF – nanofiltration, DNF – dia-nanofiltration.

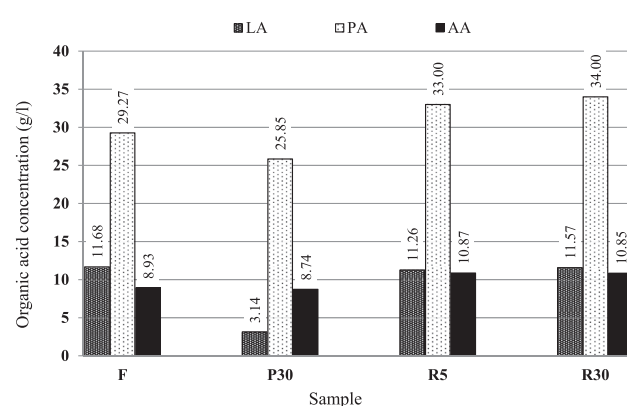


Fig. 10. Concentration of organic acids during nanofiltration of fermented cheese whey; LA – lactic acid, PA – propionic acid, AA – acetic acid, F – feed, P30 – permeate from the 30th minute, R5, R30 – retentates from the 5th and 30th minute, respectively.

Table 4
Concentration of organic acids, pH and TTA in dried sourdough pellets.

Sample	Treatment	pH	TTA ^a	LA (% w/w)	AA (% w/w)	PA (% w/w)
SD-R1	Applied 1 layer of whey retentate ^a	6.02	18.5	2.48	0.59	0.24
SD-P1	Applied 1 layer of whey permeate ^a	6.03	20	2.36	0.58	0.41
SD-R2	Applied 2 layers of whey retentate ^a	6.10	14.5	1.91	0.87	1.04
SD-P2	Applied 2 layers of whey permeate ^a	6.22	15.25	2.01	0.93	1.47
SD-R3	Applied 3 layers of whey retentate ^a	6.18	16.25	1.85	0.82	1.94
SD-P3	Applied 3 layers of whey permeate ^a	6.28	13.25	1.74	0.89	1.42
SD-R4	Applied 4 layers of whey retentate ^a	6.23	16.75	2.07	0.90	1.49
SD-P4	Applied 4 layers of whey permeate ^a	6.32	11.5	2.18	1.29	2.07
SD-R5	Applied 5 layers of whey retentate ^a	6.34	13.25	2.23	1.42	3.22
SD-P5	Applied 5 layers of whey permeate ^a	6.39	10	2.27	1.86	3.78
SD-R6	Applied 6 layers of whey retentate ^a	6.25	13.75	1.81	1.19	2.49
SD-P6	Applied 6 layers of whey permeate ^a	6.40	9.75	2.43	1.99	4.11
SD-R7	Applied 7 layers of whey retentate ^a	6.20	14.5	2.21	1.34	2.55
SD-P5	Applied 7 layers of whey permeate ^a	6.51	8.5	2.47	2.06	3.59
SD-E	Extrusion	—	—	13.58	2.35	3.23

TTA – Total titratable acidity, PA – propionic acid, LA – lactic acid, AA – acetic acid.

^a fluid drying.

concentration of components in retentate has not been achieved. To avoid this problem in a future, longer nanofiltration time will be necessary.

To achieve even higher concentration of organic acids in dried sourdough, the extrusion has been tested as another method for pellet preparation. The amount of propionate in a sample prepared by extrusion (sample SD-E, Table 4) was comparable with the samples prepared by spraying of at least 5 or more layers of NF retentate or permeate (e.g. sample SD-R5, SD-P5 or SD-P7). Acetate and lactate concentrations in the extruded sample were the highest from all dried pellets. Therefore, low temperature extrusion was very efficient for production of dried sourdough pellets.

Conclusions

Obtained results suggest that using cheese whey for sourdough preparation represents another possible alternative in utilisation of this problematical by-product. Both whey and barley contain many health beneficial compounds and their combination together with suitable technological procedure leads to a product, which has positive effects on human metabolism, and contributes to sustainable food production.

Various processes were tested in sourdough preparations; some of them were quite unique and novel. Fluid drying and extrusion at a low temperature resulted in a native sourdough with high activity and viability of lactobacilli and propionic bacteria. Prepared dried sourdough pellets were of pale brown colour, easy to transport, handle, and ready to use for bread making. The activity of bacteria in dried sourdough lasts for several months if the sourdough is stored at low temperature (5 °C). Prepared sourdough is a natural rich source of organic acids (mainly propionic and lactic), which are known for their inhibitory effect on the growth of food undesirable microorganisms and moulds. Therefore its application in bread making may improve the shelf life of the product and substitute chemical preservatives.

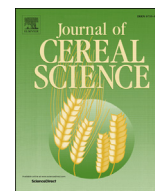
Acknowledgements

The authors wish to thank the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, program VAK 2011, Grant No. QI111B053 for the financial support.

References

- Andersson, A.A.M., Aman, P., 2011. Functional barley products. In: Hamaker, B.R. (Ed.), *Technology of Functional Cereal Products*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, pp. 261–276.
- Baik, B.-K., Ullrich, S.E., 2008. Barley for food: characteristics, improvement, and renewed interest. *J. Cereal Sci.* 48, 233–242.
- Collins, H.M., Burton, R.A., Topping, D.L., Liao, M.-L., Bacic, A., Fincher, G.B., 2010. Variability in fine structures of noncellulosic cell wall polysaccharides from cereal grains: potential importance in human health and nutrition. *Cereal Chem.* 87, 272–282.
- Dickin, E., Steele, K., Frost, G., Edwards-Jones, G., Wright, D., 2011. Effect of genotype, environment and agronomic management on -glucan concentration of naked barley grain intended for health food use. *J. Cereal Sci.* 54, 44–52.
- Dieckmann, K., 2011. BetaBARLEY—the new beta-glucan-rich barley for baking and more. *Baking + Biscuit. International* 1, 58–63.
- EFSA, 2011. Commission regulation (EU) No 432/2012 of 16 May 2012 establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children's development and health.
- FAO, 2009. *Agribusiness handbook: Barley, malt, beer*. <http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/tci/docs/AH3_BarleyMaltBeer.pdf> (accessed December 2014).
- Holtekjøl, A.K., Uhlen, A.K., Bråthen, E., Sahlstrøm, S., Knutsen, S.H., 2006. Contents of starch and non-starch polysaccharides in barley varieties of different origin. *Food Chem.* 94, 348–358.
- Hugenschmidt, S., Schwenninger, S.M., Lacroix, Ch., 2011. Concurrent high production of natural folate and vitamin B12 using a co-culture process with *Lactobacillus plantarum* SM39 and *Propionibacterium freudenreichii* DF13. *Process Biochem.* 46, 1063–1070.
- ICC, 1996. *Standards Methods*, International Association for Cereal Science and Technology, sixth ed. Vienna, Austria.
- Koros, W.J., Ma, Y.H., Shimidzu, T., 1996. Terminology for membranes and membrane processes (IUPAC recommendations 1996). *Pure Appl. Chem.* 68, 1479–1489.
- Lappi, J., Selinheimo, E., Schwab, U., Katina, K., Lehtinen, P., Mykkänen, H., Kolehmainen, M., Poutanen, K., 2010. Sourdough fermentation of wholemeal wheat bread increases solubility of arabinoxylan and protein and decreases postprandial glucose and insulin responses. *J. Cereal Sci.* 51, 152–158.
- Mantovani, M.S., Bellini, M.F., Angeli, J.P.F., Oliveira, R.J., Silva, A.F., Ribeiro, L.R., 2008. Glucans in promoting health: prevention against mutation and cancer. *Mutat. Res.* 658, 154–161.
- Mariotti, M., Garofalo, C., Aquilanti, L., Osimani, A., Fongaro, L., Tavoletti, S., Hager, A.-S., Clementi, F., 2014. Barley flour exploitation in sourdough bread-making: a technological, nutritional and sensory evaluation. *LWT – Food Sci. Technol.* 59, 973–980.
- Moroni, A.V., Bello, F.D., Arendt, E.K., 2009. Sourdough in gluten-free bread-making: an ancient technology to solve a novel issue? *Food Microbiol.* 26, 676–684.
- Poutanen, K., Flander, L., Katina, K., 2009. Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiol.* 26, 693–699.
- Rieder, A., Holtekjøl, A.K., Sahlstrøm, S., Moldestad, A., 2012. Effect of barley and oat flour types and sourdoughs on dough rheology and bread quality of composite wheat bread. *J. Cereal Sci.* 55, 44–52.
- Ryan, L.A.M., Bello, F.D., Arendt, E.K., 2008. The use of sourdough fermented by antifungal LAB to reduce the amount of calcium propionate in bread. *Int. J. Food*

- Microbiol. 125, 274–278.
- Torrieri, E., Pepe, O., Ventorino, V., Masi, P., Cavella, S., 2014. Effect of sourdough at different concentrations on quality and shelf life of bread. *LWT-Food Sci. Technol.* 56, 508–516.
- Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A., Van Boekel, M.A.J.S. Butter, 1999. In: Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A., Van Boekel, M.A.J.S. (Eds.), *Dairy Technology: Principles of milk properties and processes*. Marcel Dekker, New York, NY.
- Wood, P.J., 2007. Cereal-glucans in diet and health. *J. Cereal Sci.* 46, 230–238.
- Zhang, Ch., Brandt, M.J., Schwab, C., Gänzle, M.G., 2010. Propionic acid production by cofermentation of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus diolivorans* in sourdough. *Food Microbiol.* 27, 390–395.



The effects of extrusion on the content and properties of dietary fibre components in various barley cultivars



I. Honcú^{a,*}, M. Sluková^a, K. Vaculová^b, I. Sedláčková^b, B. Wiege^c, E. Fehling^c

^a University of Chemistry and Technology Prague, Department of Carbohydrates and Cereals, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic

^b Agrotest Fyto, Ltd., Havlíčkova 2787/121, 767 01 Kroměříž, Czech Republic

^c Max Rubner-Institut, Federal Research Institute of Nutrition and Food, Department of Safety and Quality of Cereals, Schützenberg 12, 327 56 Detmold, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 June 2015

Received in revised form

14 January 2016

Accepted 23 January 2016

Available online 26 January 2016

Keywords:

Barley

Extrusion

Dietary fibre

Beta-glucan

ABSTRACT

Wholemeal flour from five Czech spring barley materials was processed in a single-screw extruder at 130 °C, addition of 20% water and a screw speed of 220 rpm. Two barleys (AF Cesar, AF Lucius) were hullless cultivars with a standard starch composition, while three barleys (KM 2624, KM 2460-1, KM 2460-2) were hulled waxy lines. The effect of extrusion on content of different dietary fibre fractions was determined. Also the changes of the molar mass of β -glucan were studied. Regardless of the barley genotype (standard starch or waxy), the extrusion had no significant effect on arabinoxylan content. A significantly higher beta-glucan and soluble dietary fibre content in barley cultivars with standard starch composition was observed after extrusion. The content of insoluble dietary fibre decreased significantly in all extruded flours. The molar mass of water-extractable beta-glucan increased independently of the barley variety after extrusion. But the increase in beta-glucan extractability due to extrusion was not observed.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Barley is the fourth major cereal crop in the world. From 2013 to 2014 the world production of barley was 145 million metric tonnes (www.igc.int). Most harvested barley is used for feeding, malting and brewing, and only a minor part (2–5%) is consumed by the food industry. In 2013, 1.5 million metric tonnes of barley were harvested in the Czech Republic. About 75,000 tonnes of this barley were used for food production (Ministry of Agriculture CR, 2013). Barley kernels are processed into various sizes of pearls, flakes, and white or wholemeal flour. The average daily consumption of cereal products per person in Europe is about 226 g, and the WHO/FAO recommend consuming mainly whole grain products in order to increase the daily intake of dietary fibre. Hullless barley is a good source of fibre and can be easily prepared in the whole grain form, in contrast with hulled barley varieties.

Total dietary fibre (TDF) is the most important component of the

whole barley grain because it contributes to substantially lowering the risk of serious diet-related diseases as well as improving overall human health (Collins et al., 2010). The mean TDF content in hulled and hullless barley, with a standard composition of starch, is about 17% and 13%, respectively. TDF is about 20% in hulled barley and 14% in hullless genotypes of barley with a high content of amylopectin in starch (95–100%, e.g. called “waxy”) (Ullrich, 2011). The major parts of TDF are non-starch polysaccharides, mainly cellulose, arabinoxylans (AX), (1 → 3) (1 → 4)- β -D-glucans (BG), and oligosaccharides. The total mixed linked BG content in barley ranges from 2 to 10% (Brennan and Cleary, 2005; Tiwari et al., 2011) and the total AX content varies from 3 to 8% (Honcu et al., 2013). The location and the content of BG in barley grain are particularly important from a technological and nutritional point of view. The nutritional value and health-promoting potential of barley depends on the composition of the kernel and is controlled by genotype, environmental growing conditions and their interactions (Ullrich, 2011). Some nutritional and health benefits of BG consumption include the maintenance of normal blood cholesterol levels as well as the reduction of rises in blood glucose levels after meals (Commission Regulation (EU) No. 432/2012). Barley grain fibre also contributes to an increase in faecal bulk. It can be expected that the

* Corresponding author. University of Chemistry and Technology Prague, Department of Carbohydrates and Cereals, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic.

E-mail address: honcui@vscht.cz (I. Honcú).

Abbreviations

AX	arabinoxylan
BG	(1 → 3) (1 → 4)-β-D-glucans
CA	cellulose acetate
GPC	gel permeation chromatography
IDF	insoluble dietary fibre
Mw	mean molar mass
PET	polyethylene terephthalate
RVA™	Rapid Visco Analyser
SDF	soluble dietary fibre
SE	standard error
SEM	scanning electron microscopy
TCW	Thermocline for Windows™
TDF	total dietary fibre
TPEF	temperature profile of extruded flour
TPNF	temperature profile of native flour

consumption of BG may influence the risk of colon cancer and cardiovascular diseases (Collins et al., 2010; Newman and Newman, 2008). In addition to these features, the consumption of barley based products gives a feeling of satiety (Lyly et al., 2009; Wanders et al., 2011).

The extrusion process is a highly adaptable, highly productive, cost-effective and energy efficient technology with the ability to produce unique product shapes and high product quality (Sharma and Gujral, 2013; Vasanthan et al., 2002a). It is mostly carried out at high pressure, temperature and using mechanical shearing, however, low-temperature extrusion is also applied in cereal technology (Brennan et al., 2008; Gajula et al., 2008, 2009; etc.).

The chemical reactions that take place during extrusion, especially the breakdown of polymeric compounds, depend on many parameters concerning the raw materials, additives, technical equipment, and processing conditions. Rheological and physico-chemical properties of the dough, and physical properties of the extruded product, are influenced by different variables such as the type of extruder, feed rate, moisture content, residence time, temperature profile in the different heating zones, screw configuration and its geometry, screw speed etc. (Sharma and Gujral, 2013).

Extrusion causes changes to the properties of the barley flour's polymeric components such as starch, protein, BG and AX (e.g. an increase of solubility and viscosity, a breakdown of polymer side chains, a partial or full starch gelatinization and/or protein denaturation and possibly formation of the inclusion complex between lipids and amylose) and it may enhance its suitability in cereal technology. Colour, flavour, and the shape and texture of the product are affected conditions that occur during extrusion. Additionally, the molar mass of the dietary fibre components (BG, AX) can be changed, however, loss of vitamins and amino acids are comparatively low, due to the short retention time of the material in the extruder.

The aim of the presented study was to investigate the changes in composition and properties of dietary fibre components in different cultivars as well as new breeding lines of barley during the extrusion process. The ways in which extrusion affected the content of BG, AX, the soluble and insoluble parts of dietary fibre, and the molar mass distribution of water-extractable BG in native and extruded barley flours were also very closely studied.

2. Materials and methods

2.1. Barley

Five types of Czech spring barley were obtained from Agrotest Fyto Ltd. (Kroměříž, Czech Republic). AF Cesar and AF Lucius were hulless barley cultivars with standard starch compositions, registered for growing in the field conditions of the Czech Republic. AF Cesar, a new cultivar registered specifically for food production, had a significantly higher BG content than AF Lucius. The other three materials (KM 2624, KM 2460-1, KM 2460-2) were the new hulled waxy barley breeding lines with higher BG and AX contents, whereas genotypes KM 2460-1 and KM 2460-2 were sister lines.

2.2. Barley processing

The hulless barley was peeled and the hulled barley was abraded before milling. Peeling and abrasion were carried out with a low-diameter hulling machine KMPL (JK Machinery Ltd., Planá nad Lužnicí, Czech Republic) in Bio-Vavřinec Ltd. (Okrouhlice, Czech Republic). The hulless barley passed through the machine once, and only at a low speed. The hulled barley passed through the machine four times at a higher speed. The weight loss of the hulless barley was 4.9% and 3.5% for AF Cesar and AF Lucius, respectively. The weight loss of the hulled barley was 14.5–15.5%. The processed materials were milled in a hammer mill (ŠK 600, Štefan Tuška Company, Slovak Republic) into native barley flours (wholemeal) with a mesh size 1 mm. Particle size distribution of the native flours was determined by a sieve analysis with 6 sieves of the mesh size: 800, 630, 500, 200, 90 and 50 µm. The flour weight used for analysis was 50 g and the analysis time was 5 min. The highest flour particle amount for cultivars with a standard starch composition was determined to be between 90 and 200 µm, namely 37%. Between sieves with the mesh size 200 and 500 µm and 50 and 90 µm identically equal amount of the flour particles was established, 27%. About 9% of the flour particles were larger than 500 µm. The highest amount of flour particles for waxy lines was measured between 50 and 90 µm, namely 45%. Between the mesh sizes 200 and 500 µm about 30% of the particles were found. About 19% of flour particles had size between 90 and 200 µm, while only 4% of the particles were bigger than 500 µm.

2.3. Extrusion

Pilot scale extrusion processes were carried out under optimal operating conditions for barley (Extrudo Bečice Ltd., Bečice, Czech Republic). The extrusion conditions were adjusted and based on verified experience. A single-screw extruder (model 60-B-9250-BL, Schaaf Technologie GmbH, Bad Camberg, Germany) with the TURBO extrusion process was used (Fig. 1). When compared to conventional screw machines, the transport, mixing, and kneading of the dough mass is realized much more efficiently. There is a tremendous pressure difference created due to the high viscosity of the dough among the front and rear sides of the arms of the rotor. Moreover, cavitation, which is generally undesirable in the extrusion process, has a homogenizing effect and ensures optimal heat transfer within the dough mass when compared to the traditional extrusion process. This way it is possible to process materials containing higher amounts of fat, sugar or fibre, and furthermore, sterilization of the materials is more effective than in other extrusion processes (e.g. single extrusion). TURBO provides better product stability, texture and flexibility, and also gives uniform shape and texture with increased capacity and dependable reproduction of the extrusion parameters of the product. Through optimized dimensioning of the turbine, pressure plates, and sequential

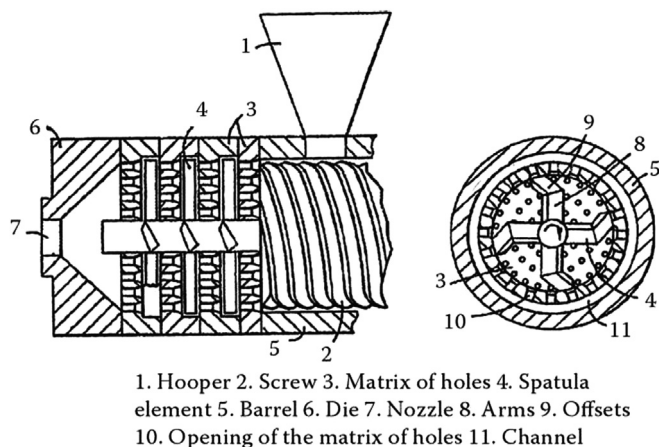


Fig. 1. Turbo extruder and its component, provided by Schaaf Technologie GmbH, Bad Camberg, Germany (Seker, 2012).

placement of numerous TURBO stages, it is possible to create very high through-puts even with smaller extruder lengths. The TURBO extrusion is also designated as high temperature, ultra short time, which is why the residence time is reduced to 8 s (Seker, 2012).

The processing conditions of extrusion were as follows: the temperature of extrusion in the barrel head was 130 °C, there was a water addition of 20% in relation to flour, and the screw speed was 220 rpm. The flow rate was about 50% of the nominal capacity and amounted to 150 kg/h. The L/D ratio was 2.3:1; the screw diameter was 92.5 mm and the processing barrel length was 210 mm. The diameter of 10 circular nozzles was 3 mm. The dough dosage to the screw was 40% and to the barrel 50%. The screw speed determines the number of the compression and decompression cycles to which the dough is subjected during the passage through the processing zone, and as well the dough temperature in the TURBO extruder. The changes of temperature in single barrel zones give rise to the compression and decompression of the dough. The final extruded products, barley pellets, have a length of 10 mm and an average diameter of 5 mm with an expansion index of 1.6. These pellets are intended to be a ready-to-eat snack. The pellets were milled (hammer mill) with the screen size of 0.5 mm. The final analyzed product was called extruded barley flour for further analysing and processing. Particle size distribution of the extruded flour was determined by a sieve analysis with 4 sieves having mesh sizes of 500, 200, 90 and 50 µm. The representation of the particle size in all extruded flour was very similar. On the screen with a mesh size of 500 µm, about 15% of extruded flour particles were remained. Between screens with mesh size of 200 and 500 µm, 40% of the particles was found. The amount of 28% of the particles was determined between sieves with mesh size 90 and 200 µm and between 50 and 90 µm, it was about 16%. The rest had dimensions of less than 50 µm.

2.4. Analyses

Basic chemical analyses were performed on native and extruded varieties of barley flour. The moisture content was determined according to Method ČSN EN ISO 712. The total nitrogen content was determined by ICC STANDARD No. 167 using a protein analyzer (FP-528, LECO Corporation, St. Joseph, Michigan, USA). The protein content was calculated with the conversion factor 6.25. The starch content (ČSN EN ISO 10520), free fat content (Javorský et al., 1987), dietary fibre content (total dietary fibre-TDF, insoluble dietary fibre-IDF, and soluble dietary fibre-SDF) (AOAC 991.43) were determined by standard methods. Crude dietary fibre (namely the

content of cellulose) was measured by oxidative hydrolysis according to the method of Javorský et al. (1987). AX determination was performed according to Douglas (1981) with xylose calibration. The content of the total BG in native and extruded barley flours and the content of water-extractable BG in extracts obtained from the flours (section 2.5.) were determined enzymatically using the BG enzymatic assay kit (Megazyme Ireland International, Ltd., Wicklow, Ireland) following the ICC Method Nr. 166. Moisture content in the extracts was determined by drying at 105 °C for 1.5 h. The content of all components was reported on a dry matter basis (d.m.).

2.5. β -glucan extraction process and molar mass determination

According to Temelli (1997), BGs were extracted from native and extruded barley flours using a modified procedure. In this study, fifty grams of native barley flour or twenty-five grams of extruded barley flour were used for extraction. The optimal conditions for extraction were as follows: $T = 55$ °C, $pH = 7.0$ and extraction time 2 h. The extraction of water-extractable BG was performed two times for each analysed barley flours. The molar mass distribution and mean molar mass (M_w) of the water-extractable BG in extracts was determined by gel permeation chromatography (GPC). The final extracts were dissolved in an aqueous solution of sodium azide (0.02%, w/v) by heating in a water bath at temperature in the range of 65–70 °C for 30 min. The final concentration of the extracts was 5 mg/ml and 1 mg/ml for native and extruded flours, respectively. The extracts were stirred two times with a vortex mixer for 30 min, and then filtrated through hydrophilic CA (cellulose acetate) membranes with a porosity of 0.45 µm. The chromatographic system consisted of an injector (Rheodyne 7725i) with injection volume 100 µl (IDEX Health & Science, Germany), a pump (Kontron 422, Germany) and a guard column (Shodex SB-G 50 × 6 mm) controlled with GPC/SEC software (Cirrus). Two columns (Shodex OHPak SB-803 HQ and SB-806 HQ, SHOWA DENKO EUROPE GmbH, Germany) with a polyhydroxymethylmethacrylate gel were used. Detection was carried out by a refractive index (RI) detector (ERC 7515A, ERMA CR, Inc., Tokyo). Pullulan standards (Polymer Laboratories Ltd) were used for the calibration.

2.6. Scanning electron microscopy (SEM)

The changes and differences in structure between native and extruded barley flours were observed by SEM (scanning electron microscope TESCAN VEGA3 LMU, conventional thermo emission tungsten cathode, BSE detector, low vacuum microscopy in so-called UniVac mode operation pressure 10 Pa) (TESCAN, Brno, Czech Republic). The flours were placed on a carbon tape mounted to the SEM holder and observed at 20 kV voltages. The obtained micrographs showed the structural arrangements of starch, protein and fibre in the native and extruded barley flours.

2.7. Rapid Visco™ analyser (RVA™)

The viscosity of the native and extruded barley flours was measured by RVA™ (RVA 4500, Perten Instruments, Sweden) combined with the ThermoLine for Windows™ (TCW3) software. The basic weight of both types of flour was 3 g (in raw basis) and was automatically corrected to a moisture basis of 12%. Water addition (25 g) was constant. The native flour was suspended in distilled water by rotating it with a paddle about 10 times, or until no lumps were observed. The canister with the sample and paddle was inserted to the RVA Instrument and the analysis was started.

The extruded barley flour was prepared by being added to the canister with water, capping the canister with rubber stopper and shaking vigorously. The paddle was then used as a spatula to scrape down the inside of the canister and for checking lumps. The suspension was stirred at 160 rpm. One determination required 16 min for the native flour, and 20 min for extruded flour. The profile was as follows for native flour: idle and hold at 50 °C, 0–1 min; ramp up to 95 °C, 1–4:45 min; hold 95 °C, 4:45–7:12 min; cooling on 50 °C–7:12–11 min; hold at 50 °C–16 min. The profile was as follows for extruded flour: idle and hold at 25 °C, 0–2 min; ramp up to 95 °C, 2–6 min; hold 95 °C, 7–10 min; cooling on 25 °C, 10–16 min; hold at 25 °C up to 20 min.

An RVATM test was performed to support the results obtained from the SEM analysis with regard to changes in physico-chemical properties of barley polymers. The results of RVATM are shown in Fig. 4.

2.8. Statistical analysis

Results of AX, SDF, IDF and TDF were expressed by means of quadruple analyses and the other results by sixfold analysis. All of the results were calculated on dry matter basis. Experimental data were assessed using STATISTICA software, version 12.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). Analysis of variance was carried out using one-way ANOVA test. Multiple comparisons (post-hoc tests) were calculated using an LSD test at the significance level of $p < 0.05$. The values were expressed as means of number determinations $\pm$ standard error of the mean (SE) and are shown in Tables 1 and 2.

Table 1

Composition of native and extruded barley flours (values are expressed in % d.m.).

Nutrient/Barley/Flour		AF Cesar	AF Lucius	KM 2624	KM 2460-1	KM 2460-2
Starch	F ^a	60.48 $\pm$ 0.45 ^c a ^d	64.35 $\pm$ 1.18bc	65.57 $\pm$ 0.37c	64.47 $\pm$ 0.81bc	63.15 $\pm$ 0.37b
	E ^b	59.21 $\pm$ 0.23a	63.09 $\pm$ 1.40b	64.88 $\pm$ 0.33b	64.21 $\pm$ 0.63b	63.86 $\pm$ 0.36b
Protein	F	16.24 $\pm$ 0.45b	13.67 $\pm$ 0.89a	12.56 $\pm$ 0.45a	14.15 $\pm$ 0.44a	13.96 $\pm$ 0.39a
	E	16.73 $\pm$ 0.20b	14.64 $\pm$ 0.91a	13.51 $\pm$ 0.48a	14.29 $\pm$ 0.56a	14.49 $\pm$ 0.50a
β -glucan	F	6.07 $\pm$ 0.08b	4.67 $\pm$ 0.08a	6.17 $\pm$ 0.26b	7.93 $\pm$ 0.18c	8.03 $\pm$ 0.21c
	E	6.33 $\pm$ 0.06b ^d	5.13 $\pm$ 0.14a ^d	6.53 $\pm$ 0.12b	7.90 $\pm$ 0.04c	8.23 $\pm$ 0.02d
Arabinoxylan	F	4.14 $\pm$ 0.53a	3.64 $\pm$ 0.39a	3.35 $\pm$ 0.28a	3.09 $\pm$ 0.35a	3.09 $\pm$ 0.29a
	E	4.48 $\pm$ 0.55b	3.86 $\pm$ 0.40ab	3.67 $\pm$ 0.32ab	3.11 $\pm$ 0.29a	3.55 $\pm$ 0.20ab
Free fat	F	2.84 $\pm$ 0.04b ^d	2.67 $\pm$ 0.07ab ^d	2.63 $\pm$ 0.10ab ^d	2.93 $\pm$ 0.12c ^d	2.46 $\pm$ 0.02a ^d
	E	1.69 $\pm$ 0.34a	1.25 $\pm$ 0.12a	1.21 $\pm$ 0.17a	1.38 $\pm$ 0.15a	1.66 $\pm$ 0.15a
Crude fibre	F	1.15 $\pm$ 0.03a ^d	1.08 $\pm$ 0.02a	0.99 $\pm$ 0.01a	1.02 $\pm$ 0.07a	1.04 $\pm$ 0.03a
	E	0.91 $\pm$ 0.09a	0.97 $\pm$ 0.11a	1.02 $\pm$ 0.06a	0.86 $\pm$ 0.07a	0.98 $\pm$ 0.06a
Moisture (%)	F	9.52 $\pm$ 0.22a ^d	9.46 $\pm$ 0.24a ^d	9.52 $\pm$ 0.23a ^d	9.37 $\pm$ 0.26a ^d	9.34 $\pm$ 0.28a ^d
	E	7.29 $\pm$ 0.09a	7.60 $\pm$ 0.09a	7.76 $\pm$ 0.13a	8.06 $\pm$ 0.07a	0.98 $\pm$ 0.10a

^a F - native flour.

^b E - extruded flour.

^c Mean value $\pm$ standard error. Different letters in the same line show significant difference among experimental barley materials ($p < 0.05$).

^d Mean value for native/extruded flour is significantly different ($p < 0.05$) from the other within a given nutrient and cultivar/line of barley.

Table 2

Dietary fibre content in native and extruded barley flours (values are expressed in % d.m.).

Nutrient/Barley/Flour		AF Cesar	AF Lucius	KM 2624	KM 2460-1	KM 2460-2
IDF	F ^a	10.00 $\pm$ 0.34 ^c d	9.05 $\pm$ 0.16c	7.94 $\pm$ 0.35b ^d	7.05 $\pm$ 0.18a ^d	7.32 $\pm$ 0.27ab
	E ^b	8.78 $\pm$ 0.43b	8.82 $\pm$ 0.24b	7.04 $\pm$ 0.20a	6.11 $\pm$ 0.21a	7.02 $\pm$ 0.53a
SDF	F	6.80 $\pm$ 0.61ab	6.14 $\pm$ 0.16a	7.42 $\pm$ 0.15bc	8.38 $\pm$ 0.43cd	9.30 $\pm$ 0.15d
	E	8.17 $\pm$ 0.05b ^d	6.81 $\pm$ 0.10a ^d	7.85 $\pm$ 0.11b	9.73 $\pm$ 0.20d	9.30 $\pm$ 0.12c
TDF	F	18.14 $\pm$ 0.60c ^d	15.35 $\pm$ 0.31a	16.34 $\pm$ 0.25 ab	16.83 $\pm$ 0.43b	17.42 $\pm$ 0.36bc
	E	16.71 $\pm$ 0.23bc	15.19 $\pm$ 0.37a	16.17 $\pm$ 0.31b	16.26 $\pm$ 0.26bc	17.11 $\pm$ 0.30c

^a F - native flour.

^b E - extruded flour.

^c Mean value $\pm$ standard error. Different letters in same line show significant difference among experimental barley materials ($p < 0.05$).

^d Mean value for native/extruded flour is significantly different ($p < 0.05$) from the other within a given nutrient and cultivar/line of barley.

3. Results and discussion

The composition of native and extruded barley flours is shown in Table 1. Statistically significant differences appeared in composition of native and extruded barley flours particularly among individual barley cultivars (Table 1). The ratio of starch:total dietary fibre:protein was 1.00:0.32:0.27 in native barley flour and 1.00:0.29:0.28 in extruded barley flour of AF Cesar, whereas in KM 2624 it was 1.00:0.24:0.19 in native flour and 1.00:0.26:0.21 in extruded flour.

The differences in BG content between native and extruded barley flours varied from about 0.03% (KM 2460-1, new waxy barley line with high BG content) to 0.46% (AF Lucius, standard BG cultivar). The increase in BG was significant only in cultivars with standard starch composition after extrusion. Therefore, the BG content differed not significantly in waxy lines. These changes are probably related to the different proportion of amylopectin in standard and waxy lines. Sharma and Gujral (2013) reported that the extrusion process did not have any significant effect on the total BG content.

Although AF Cesar is a cultivar with a standard starch composition, its BG content was comparable to that of waxy line KM 2624 in both native and extruded flours (Table 1).

The physico-chemical properties of BG (e.g. solubility, viscosity, chain length and molar mass), which influence the physiological effects of BG, can be changed during grain processing and also by the extrusion process. Therefore, the molar mass distribution of water-extractable BG in extracts from native and extruded barley flours was determined and compared. Sharma and Gujral (2013)

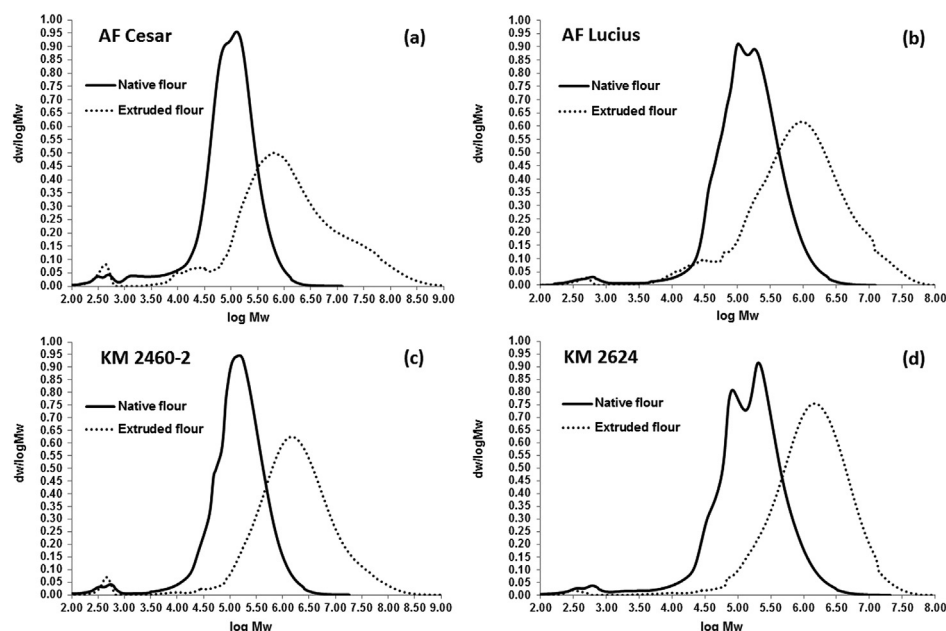


Fig. 2. Comparison of mean molar masses distribution of water-extractable BG of native and extruded barley flour. (a) standard barley AF Cesar; (b) standard barley AF Lucius; (c) waxy barley KM 2460-2; (d) waxy barley KM 2624.

have shown that the BG extractability increased after extrusion or roasting of barley or oat. It was shown, that BG extractability is affected by water addition to the dough during extrusion. Higher extractability of BG was achieved with higher water addition (20%) during extrusion. On the contrary, the higher temperature had negligible effect on the BG extractability. Andersson et al. (2004) and Gujral et al. (2011) reported, that increased BG extractability after heat treatment may be due to the release of BG from other complex cellular components. Extractability of BG depends also on the extraction agent and decreased in the order of NaOH, H₂O and Na₂CO₃. A true increase in BG extractability due to extrusion was not observed, but in contrast, a large decrease was observed (from 80% to 30%). It might be caused by the usage of water as an extraction agent.

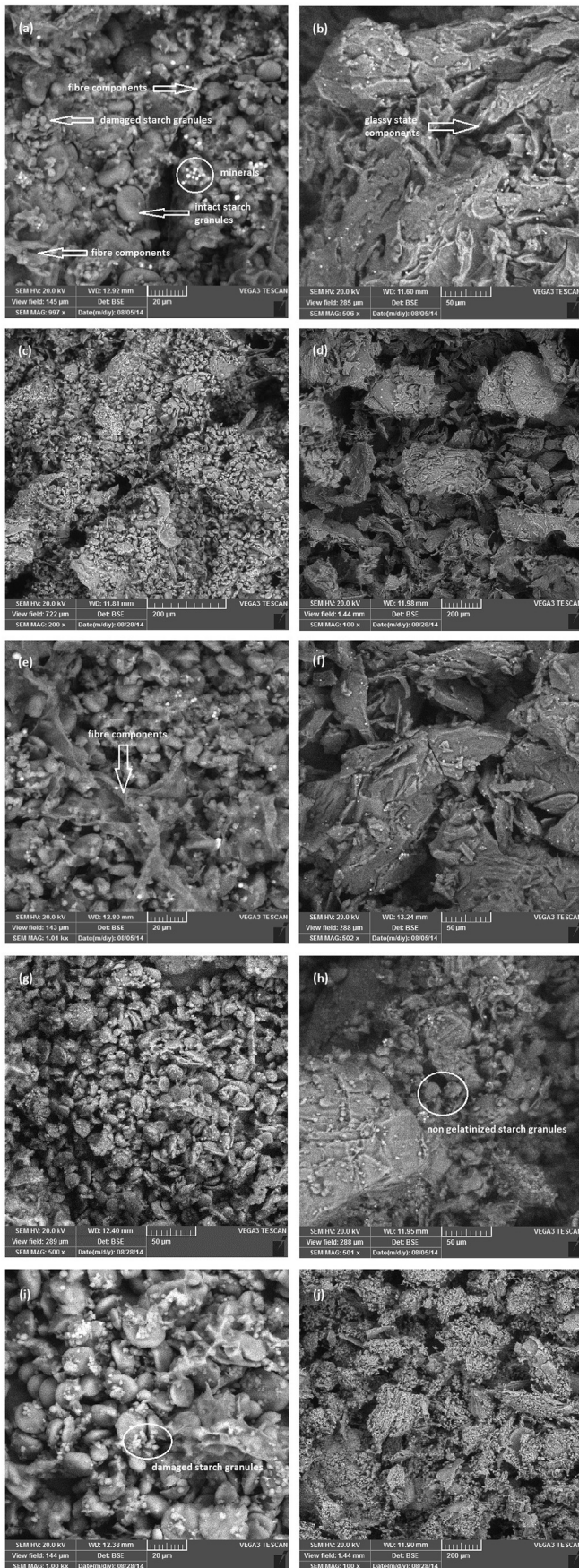
During extrusion a shift and increase of Mw of BG was determined in the extracts of barley flours. Sibakov et al. (2013) described, that in dry processed foods, such as pasta, muffins or extruded flakes, the molar masses of BG were higher. It is well known and verified, that BG with higher molar mass exhibit better health and nutritional effects to the maintenance of normal blood cholesterol levels and to the reduction of blood glucose rises after consumption of BG (Wood, 2007). However, BG with a smaller molar mass exhibited better prebiotic effects in the intestine (Arora et al., 2012; Barsanti et al., 2011). The molar mass of the water-extractable BG increased independently of the barley variety after extrusion (Fig. 2). The Mw value of the BG was in the range of about 10^5 g/mol in all barley flours. In general, waxy barley has a slightly higher Mw than barley flour with standard starch composition. It was evident that the Mw of BG increased after extrusion from approx. 10^5 – 10^6 g/mol in barley with standard starch compositions (Fig. 2a, b) and even up to $10^{6.5}$ g/mol in waxy barley (Fig. 2c, d).

Vasanthan et al. (2002b) reported a higher BG content than SDF content in two analysed native barley flours. In this study the higher SDF than BG content was determined in all analyzed Czech barley native and extruded flours. The higher content of SDF could be due to the presence of the soluble part of AX, or the other soluble components of dietary fibre e.g. the soluble part of hemicelluloses, fructans etc.

The AX content in native barley flours ranged from 3.09% (KM 2460-1 and KM 2460-2) to 4.14% (AF Cesar). The lower content of AX in hulled barley could be due to abrasion of hulls along with part of the aleurone layer (higher AX concentration). No statistically significant differences were observed between the AX content in native and extruded flours (Table 1).

Dietary fibre content was measured by means of an enzymatic-gravimetric procedure and presented as an insoluble and soluble part of fibre, and also the total dietary fibre, which was determined separately. Tiwari and Cummins (2009) reported that the fibre content and its physicochemical properties after extrusion depend on raw material, composition, and the process parameters. The mean results of dietary fibre content in standard and waxy types of barley are shown in Table 2. The content of insoluble dietary fibre in native barley flours varied from 7.05% to 10.00% in KM 2460-1 and AF Cesar, respectively. After extrusion, the IDF content decreased in all analysed flours. A significant decrease of IDF was observed in waxy lines KM 2426 and KM 2460-1, while a distinguished decrease of IDF was not found in waxy line KM 2460-2 (Table 2). The SDF content increased significantly only in genotypes with a standard starch composition (AF Cesar, AF Lucius) after extrusion. This was in agreement with higher BG content after extrusion in these cultivars. The SDF increase was about 1.37% and 0.67% after extrusion in AF Cesar and AF Lucius, respectively. The increase of SDF after extrusion is consistent with the results of Vasanthan et al. (2002b). Authors reported that the transformation of some IDF into SDF during extrusion and the formation of additional SDF, were caused by transglycosidation.

TDF content in native barley flours ranged from 15.35% in AF Lucius to 18.14% in AF Cesar. After extrusion the TDF content in AF Lucius was the lowest (15.19%), however the highest TDF content was determined in KM 2460-2 (17.11%). The results obtained in this study are in agreement with those of the work of Sobota et al. (2010). These authors also reported a decrease in TDF and IDF contents, while the SDF content was increased in corn-wheat extruded flours. After extrusion, a significant decrease in crude fibre content was determined in AF Cesar. The results between native and extruded flours from other varieties, however, did not



change significantly.

The microstructures of native and extruded barley flours were characterized by SEM (Fig. 3). There were observed big round starch granules of native flour, small lighting points (minerals), and some fibres (most likely dietary fibre, or some of its compounds). Partially damaged starch granules appeared in the native barley flour of AF Cesar (Fig. 3a). This damage can be caused during the milling process (bigger damaged starch granules) or by higher enzyme activity in native flour (smaller damaged starch granules). Significant differences were observed in the structure of the native flour (Fig. 3a, c, e, g, i) and extruded flour (Fig. 3b, d, f, h, j). The extruded flour was in a glassy state. It exhibited a compact structure consisting of partly gelatinized starch, partly denatured protein, and rearrangement of the fibre components.

The degree of starch gelatinization and changes of the physico-chemical properties of other components, which occur during the extrusion process, were verified by RVA™ (Fig. 4). Native flour from waxy lines had higher peak viscosity than those from cultivars with a standard starch composition. The higher peak viscosity in extruded flour (when compared with native flour) was determined in standard barley cultivars (AF Lucius and AF Cesar). Nevertheless, the hot peak viscosity of native flours was twice as high as that in extruded flours of all waxy varieties.

Cold peak viscosity indicates the formation of transitional products, which were created as a result of thermal and mechanical stress. The cold peak viscosity of raw materials was very low. Conversion products are characterized by viscosity-peaks shifted to a lower temperature. The swelling partly gelatinized starch after extrusion in cold water indicates already swollen starch granules or cold water-soluble components e.g. damaged starch granules, non-starch polysaccharides, granule fragments and other released polymers (Elliott et al., 2015).

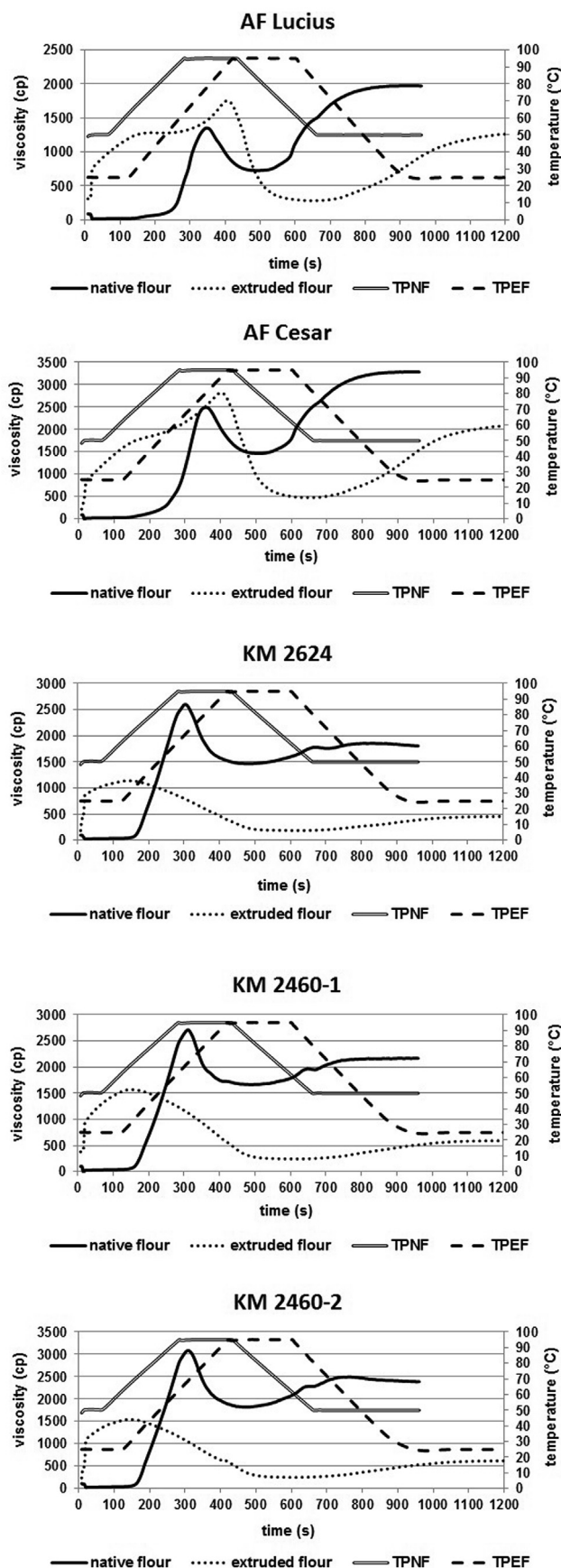
A pronounced cold peak viscosity was determined in extruded flours of AF Cesar and AF Lucius. High cold viscosity and broadness of the viscosity peak in cultivars with standard starch composition reveal that the starch after extrusion was more gelatinized than in waxy lines. There is a higher amylopectin content in waxy lines than in cultivars with standard starch composition. Amylopectin has a more arranged structure than amylose and therefore waxy lines show different pasting properties than cultivars with standard starch compositions. Significantly higher cold viscosity in AF Cesar and AF Lucius after extrusion was not caused only by larger starch gelatinization, but the role of soluble non-starch polysaccharides can be assumed. This statement is consistent with the significantly higher BG and SDF content, determined after extrusion, only in these two cultivars.

Cold viscosity is usually related to the setback viscosity. Elliott et al. (2015) reported lower hot and setback viscosity with an attended increase in cold viscosity for extruded flour in relation to native flour. In this study the lower hot and setback viscosity was confirmed only in waxy lines. Hot peak viscosity was higher in extruded flour than in native flour in cultivars with standard starch composition, and setback viscosity declined imperceptible.

4. Conclusion

In this study, the effects of extrusion on dietary fibre components in different Czech barley cultivars and new breeding lines

Fig. 3. Scanning electron micrographs (a) standard barley AF Cesar native flour; (b) standard barley AF Cesar extruded flour; (c) standard barley AF Lucius native flour; (d) standard barley AF Lucius extruded flour; (e) waxy barley KM 2624 native flour; (f) waxy barley KM 2624 extruded flour; (g) waxy barley KM 2460-1 native flour; (h) waxy barley KM 2460-1 extruded flour; (i) waxy barley KM 2460-2 native flour; (j) waxy barley KM 2460-2 extruded flour.



were investigated. Significant changes in content and also in physico-chemical properties of barley fibre components were determined. The content of BG and SDF increased significantly after extrusion in barley flour with standard starch composition. Whereas the content of IDF decreased distinctly in two extruded waxy barley flour, an insignificant change in TDF and crude fibre content in all barley materials was observed.

The increase of mean molar mass of soluble BG was determined independently on a barley genotype (standard and waxy type of barley) after extrusion. However, AF Lucius, with the lowest content of total BG, showed a significant increase of mean molar mass of extractable BG during extrusion. It can be concluded that extrusion is a process that is able to modify the physico-chemical properties of BGs. This may have a positive influence on their health effects, especially in barley genotypes similar to AF Lucius cultivar (e.g. AF Cesar).

A pronounced cold peak viscosity determined in extruded flours of AF Cesar and AF Lucius showed formation of transitional products which were created especially from starch and water soluble non-starch polysaccharides as a result of thermal and mechanical stress.

Acknowledgement

The authors would like to gratefully thank to Extrudo Bečice Ltd., CZ; Agrotest Fyto Ltd., CZ; MRI Detmold, Germany for their technical support and Ministry of Agriculture CR (projects Nr. R00211, Q111B044 and Q111B053) for financial support, Dr. Alena Michalcová (UCT) for SEM measurement and Dr. Jürgen Hollmann (MRI) for useful discussions.

References

- Andersson, A.A.M., Armo, E., Grangeon, E., Fredrikson, H., Andersson, R., Åman, P., 2004. Molecular weight and structure units of (1→3)(1→4)-β-glucans in dough and bread from hull-less barley milling fractions. *J. Cereal Sci.* 40, 195–204.
- Arora, T., Loo, R.L., Anastasovska, J., Gibson, G.R., Tuohy, K.M., Sharma, R.K., Swann, J.R., Deaville, E.R., Sleeth, M.L., Thomas, E.L., Holmes, E., Bell, J.D., Frost, G., 2012. Differential effects of two fermentable carbohydrates on central appetite regulation and body composition. *Plos One* 7, e43263.
- Barsanti, L., Passarelli, V., Evangelista, V., Frassanito, A.M., Gualtieri, P., 2011. Chemistry, physico-chemistry and applications linked to biological activities of beta-glucans. *Nat. Product. Rep.* 28, 457–466.
- Brennan, Ch S., Cleary, L.J., 2005. The potential use of cereal (1→3,1→4)-β-D-glucans as functional food ingredients. *J. Cereal Sci.* 42, 1–13.
- Brennan, M.A., Monro, J.A., Brennan, Ch S., 2008. Effect of inclusion of soluble and insoluble fibres into extruded breakfast cereal products made with reverse screw configuration. *Int. J. Food Sci. Technol.* 43, 2278–2288.
- Collins, H.M., Burton, R.A., Topping, D.L., Liao, M.-L., Bacic, A., Fincher, G.B., 2010. Variability in fine structures of noncellulosic cell wall polysaccharides from cereal grains: potential importance in human health and nutrition. *Cereal Chem.* 87, 272–282.
- Commission Regulation (EU) No. 432/2012. Commission Regulation (EU) No 432/2012 of 16 May 2012 establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children's development and health.
- Douglas, G.S., 1981. A rapid method for the determination of pentosans in wheat flour. *Food Chem.* 7, 139–145.
- Elliott, B., Dang, J.M.C., Bason, M.L., 2015. How the RVA Can Contribute to Understanding Extruded Foods and Feeds. Newport Scientific Pty. Ltd., Australia. Warriewood NSW 2102. <http://www.perten.com> (22nd September, 2015).
- Gajula, H., Alavi, S., Adhikari, K., Herald, T., 2008. Precooked bran-enriched wheat flour using extrusion: dietary fiber profile and sensory characteristics. *J. Food Sci.* 73, 173–179.
- Gajula, H., Shaowei, L., Alavi, S., Herald, T., Madl, R., Bean, S.R., Tilley, M., 2009. Precooked fiber-enriched wheat flour obtained by extrusion: rheological and functional properties. *Int. J. Food Prop.* 12, 27–44.
- Gujral, H.S., Sharma, P., Singh, R., 2011. Effect of sand roasting on beta glucan extractability, physicochemical and antioxidant properties of oats. *LWT Food*

Fig. 4. Comparison of viscosity of native and extruded barley flour in different temperature profiles obtained by RVA™. TPNF – temperature profile of native flour; TPEF – temperature profile of extruded flour.

- Sci. Technol. 44, 2223–2230.
- Honcu, I., Slukova, M., Vaculova, K., Wiege, B., 2013. The comparison of polysaccharides profiles of Czech and German barleys. In: Proceedings of the 9th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience, Prague, pp. 32–37. <http://www.igc.int/en/grainsupdate/sd.aspx?crop=Barley> (19th May, 2015).
- Javorský, P., Fojtíková, D., Kalaš, V., Schwarz, M., 1987. Chemické rozborý v zemědělských laboratorích, díl I. Ministerstvo zemědělství a výživy ČR, České Budějovice, pp. 61–63, 71–72.
- Lyly, M., Liukkonen, K.H., Salmenkallio-Marttila, M., Karhunen, L., Poutanen, K., Lähdenmäki, L., 2009. Fibre in beverages can enhance perceived satiety. Eur. J. Nutr. 48, 251–258.
- Ministerstvo zemědělství České Republiky, 2013. Zemědělství. MZe ČR, Praha, p. 134.
- Newman, R.K., Newman, C.W., 2008. Barley for Food and Health. Science, Technology, and Products. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Seker, M., 2012. Extrusion of snacks, breakfast cereals, and confectioneries. In: Maskan, M., Altan, A. (Eds.), Advances in Food Extrusion Technology. CRC Press, Boca Raton, pp. 169–208.
- Sharma, P., Gujral, S.H., 2013. Extrusion of hulled barley affecting β -glucan and properties of extrudates. Food Bioprocess Technol. 6, 1374–1389.
- Sibakov, J., Lehtinen, P., Poutanen, K., 2013. Cereal brans as dietary fibre ingredients. In: Delcour, J.A., Poutanen, K. (Eds.), Fibre-rich and Wholegrain Foods: Improving Quality. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, pp. 170–192.
- Sobota, A., Sykut-Domanska, E., Rzedzicki, Z., 2010. Effect of extrusion-cooking process on the chemical composition of corn-wheat extrudates, with particular emphasis on dietary fibre fractions. Pol. J. Food Nutr. Sci. 60, 251–259.
- Temelli, F., 1997. Extraction and functional properties of barley β -glucan as affected by temperature and pH. J. Food Sci. 62, 1194–1201.
- Tiwari, U., Cummins, E., 2009. Factors influencing β -glucan levels and molecular weight in cereal-based products. Cereal Chem. 86, 290–301.
- Tiwari, U., Cummins, E., Sullivan, P., Flaherty, J.O., Brunton, N., Gallagher, E., 2011. Probabilistic methodology for assessing changes in the level and molecular weight of barley β -glucan during bread baking. Food Chem. 124, 1567–1576.
- Ullrich, S.T., 2011. Barley: production, improvement and uses. In: World Agriculture Series. Wiley-Blackwell Publishing Ltd.
- Vasanthan, T., Gaosong, J., Yeung, J., Li, J., 2002b. Dietary fiber profile of barley flour as affected by extrusion cooking. Food Chem. 77, 35–40.
- Vasanthan, T., Gill, S., Ooraikul, B., Rosnagel, B., 2002a. Extrusion processing improves waxy barley flour for bread making. Barley Ctry. 11, 2.
- Wanders, A.J., Van Den Borne, J.J.G.C., De Graaf, C., Hulshof, T., Jonathan, M.C., Kristensen, M., Mars, M., Schols, H.A., Feskens, E.J.M., 2011. Effects of dietary fibre on subjective appetite, energy intake and body weight: a systematic review of randomized controlled trials. Obes. Rev. 12, 724–739.
- Wood, P., 2007. Cereal β -glucans in diet and health. J. Cereal Sci. 46, 230–238.

EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF B-GLUCANS FROM NEW CZECH BARLEY VARIETIES

LENKA KUMBÁROVÁ^{a,*}, ROMAN BLEHA^a, MARCELA SLUKOVÁ^a, PETRA SMRČKOVÁ^a, KATEŘINA VACULOVA^b, and PAVEL SKŘIVAN^a

^a University of Chemistry and Technology Prague, Department of Carbohydrates and Cereals, Technická 5, 166 28 Praha 6-Dejvice, ^b Agrotest Fyto, Ltd., Havlíčkova 2787/121, 767 01 Kroměříž, Czech Republic
Lenka.Kumbarova@centrum.cz

Introduction

Cereal beta-glucans are structural non-starch, linear, partially water-soluble polysaccharides and they are a major component of the soluble dietary fiber. In general, cereal beta-glucans are also called β -(1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucans or mixed linkage beta-glucans¹. Beta-glucans influence the nutritional values and functional properties of food^{2,3}. Barley is the most important source of beta-glucans from cereals. Beta-glucans are present in the aleurone layer of barley grain (about 25 % from the total amount of beta-glucans in grain) and in the endosperm (70–75 % from the total amount of beta-glucans in grain) as one of the basic components of the cell wall⁴. Beta-glucans content ranges from 2.5 to 12.0 % in dm. of barley grain. In the Czech Republic⁵, there are the new barley hullless varieties which can contain higher amount of beta-glucans (4.5–6.8 %).

Barley beta-glucans usually contain more than 1,000 glucose units^{5,6}. Molecular weight of barley beta-glucans ranges from 130 kg/mol to 2,500 kg/mol. Cereal beta-glucans usually contain about 70 % of residues with β -(1 $\rightarrow$ 4) and about 30 % β -(1 $\rightarrow$ 3) residues. The solubility and viscosity of cereal beta-glucans depend on their origin, structure, concentration in solution, and the number of β -(1 $\rightarrow$ 3) linkages in the molecule. The beta-glucans solubility in aqueous solutions increases, if there is a higher number of β -(1 $\rightarrow$ 3) linkages in the molecule of beta-glucans. More effective physiological effect in the human organism (the maintenance of normal glucose level and blood cholesterol level; the acting as prebiotics) and the beneficial rheological properties in the bread making can be expected in more soluble beta-glucans.

Therefore, it is necessary to identify and compare the structure of water-extractable beta-glucans as a parameter for the selection of cereal varieties with significant nutritional effects. Isolation techniques of beta-glucans from barley have been evaluated by several authors^{2,7–9}. Temperature, pH, extraction time, particle size of material, mixing rate, and solvent/flour ratio are critical parameters affecting the extraction process of beta-glucans. Results from several studies suggest that temperature and pH have a significant effect on the extraction and physical, chemical and functional properties of extracted beta-glucans. The extracted beta-glucans were characterized by chemical and rheological analysis, thermal, infrared spectroscopy, AFM (Atomic Force Microscopy) and SEM (Scanning Electron Microscopy)^{7,10–12}.

Beta-glucans have a number of positive physiological effects in the human body. Permitted health impacts of barley fiber and barley beta-glucans are shown in COMMISSION REGULATION (EU) No 432/2012 (“Barley grain fiber contributes to an increase in faecal bulk. Beta-glucans contribute to the maintenance of normal blood cholesterol levels. Consumption of beta-glucans from oats or barley as part of a meal contributes to the reduction of the blood glucose rise after that meal.”)¹³

The present study was focused to the partial characterization of beta-glucans extracted from a new genetic waxy variety of Czech spring hullless barley specially intended for cereal purposes. Barley grain was milled to wholemeal flour. Extraction of water-soluble beta-glucans from wholemeal barley flour was performed. The suggested extraction process of water-soluble beta-glucans was optimized. Sugar composition by GC/FID, FT-IR and FT Raman spectra, and molecular weight by GPC were determined at extracts of beta-glucans. Microstructure by SEM was compared among extracted beta-glucans, commercial beta-glucans and wholemeal barley flour.

Materials and methods

The analyzed barley wholemeal flour of waxy variety KM2551-389 was delivered by the research institute Agrotest Fyto, Ltd. (Kroměříž, Czech Republic). Particle size of wholemeal flour was 500 μ m. The beta-glucans content was 6.3 % in dm. of flour, the beta-glucans were determined by Megazyme β -Glucan Assay Kit Mixed Linkage (AACC 32-23).

For barley beta-glucans extraction, the method described by Ahmad⁸ and adapted by internal laboratory procedures with a few modifications. The beta-glucans extraction from barley flour was based on duplicate analysis and the amount of wholemeal barley flour was 150 g for extraction. The conditions of beta-glucans extraction and purification are show in Fig. 1.

FT-IR spectra (a spectral region of 400–4000 cm^{-1}) of purified extracted fractions were recorded in KBr pellets by Nicolet 6700 FT-IR spectrometer (ThermoScientific, USA); 64 scans were accumulated with a spectral resolution of 2.0 cm^{-1} . FT Raman spectra of the fractions were measured on Nicolet iS50 with FT Raman module (ThermoScientific, USA). The spectra were smoothed and baseline corrected using Omnic 8.0 and 9.0 (ThermoScientific, USA). Finally all the spectra were exported in ASCII format to Origin 6.0 (Microcal Origin, USA) software for preparation of final graphs.

Extracted beta-glucans, commercial beta-glucans (SANACEL beta G, supplied by DONAUCHEM, Czech Republic) and wholemeal barley flour were fixed to stubs with carbon tape and covered with a layer of gold of 0.5 nm each in a sputter coater. The visualization and photography of microstructure of the beta-glucans and flour were performed using a VEGA3 LMU electron microscope (TESCAN, Czech Republic), with tungsten cathode, BSE detector and an acceleration voltage of 10 kV.

The molecular weight of extracted beta-glucans was determined by gel permeation chromatography (GPC). Separation was performed using a pump Deltachrom SDS 030 (Watrex, Czech Republic), a guard column 50 $\times$ 7.5 mm PL aquagel-OH (Polymer laboratories Ltd., USA), analytical columns 3 $\times$ PL aquagel-60, particle size 8 μ m, 300 $\times$ 7.5 mm (Polymer laboratories Ltd., USA), refractive index detector Shodex RI 71 (Showa Denko, Germany). Elution was isocratic at a rate of 0.8 mL/min, phosphate buffer (c = 0.01mol/L, pH=7) and sodium nitrate aqueous solution (c =0.2 mol/L) were used as the

eluent. Program Clarity version 2.4.187 was used for evaluation of data. The average molecular weights were calibrated using dextran standards (10, 40, 70 250, 500 and 2,000 kg/mol) from Pharmacia Ltd. (Sweden). Results were reported as weight average molecular weights (MW).

Chemical analysis of extracted beta-glucans was performed by neutral sugars analysis. Sugars were released by acid hydrolysis in 72% H₂SO₄ and analyzed as alditol acetates by GC/FID using a Shimadzu GC2010 (Japan) equipped with 30 m capillary column DB-225 with internal diameter 0.25 mm and film thickness 0.15 µm. The temperatures of injector and detector were, respectively, 220 °C and 230 °C. The oven temperature program was following: 200 °C for 1 min, then increase to 220 °C (40 °C/min), hold at a temperature 220 °C for 7 min, then increase to 230 °C (20 °C/min) until, final temperature 230 °C for 1 min, total time 9 min.

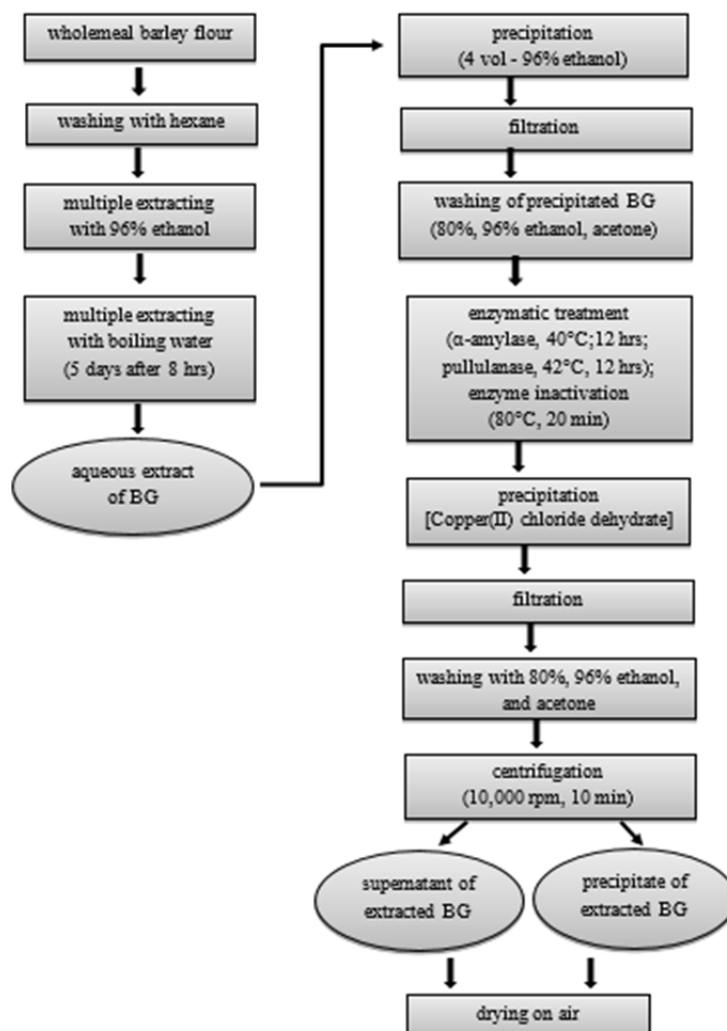


Fig. 1. Extraction and purification of beta-glucans from wholemeal barley flour

Results and discussion

On the basis of the proposed extraction and purification procedure two main fractions of extracted beta-glucans, precipitate (P) and supernatant (S) were obtained. Purity of both fractions of extracted purified beta-glucans was about 85 %. By comparison of the FT-IR spectra of β-glucans with standards, it was found that there are no residues of starch and proteins. The presence of other components in beta-glucans extracts was confirmed by sugar analysis (GC/FID) and FT-IR. The amount of impurities in beta-glucans extracts was about 10 %, apparently they were arabinoxylans. Monosaccharide analysis using GC/FID showed that the precipitate and supernatant of extracted beta-glucans contained mainly glucose (90 %) and also arabinose and xylose as minor sugars. Arabinose and xylose were derived from the present arabinoxylans. It means that it is necessary to extend the purification steps (e.g. to repeat dialysis and add xylanase treatments) and to remove of arabinoxylans by alkali solution for the future analyses. The presence of arabinoxylans was verified by FT-IR and by sugar analysis on GC/FID.

It was found that the precipitate showed higher average molecular weight (MW=680 kg/mol) than supernatant (MW=510 kg/mol). Johansson⁷ reported that molecular weight of water-soluble barley beta-glucans which were extracted from normal whole grain was about 470 kg/mol. Molecular weight of extracted beta-glucans depends on initial cereal material, and also on the extraction conditions and method of determination of MW (column and detector type, standard dextran or pullulan etc.).^{2,10,14}

The infrared spectra of extracted beta-glucans are shown in Fig. 2a and 2b and Fig. 3. Spectra of precipitate and supernatant did not show significant differences.

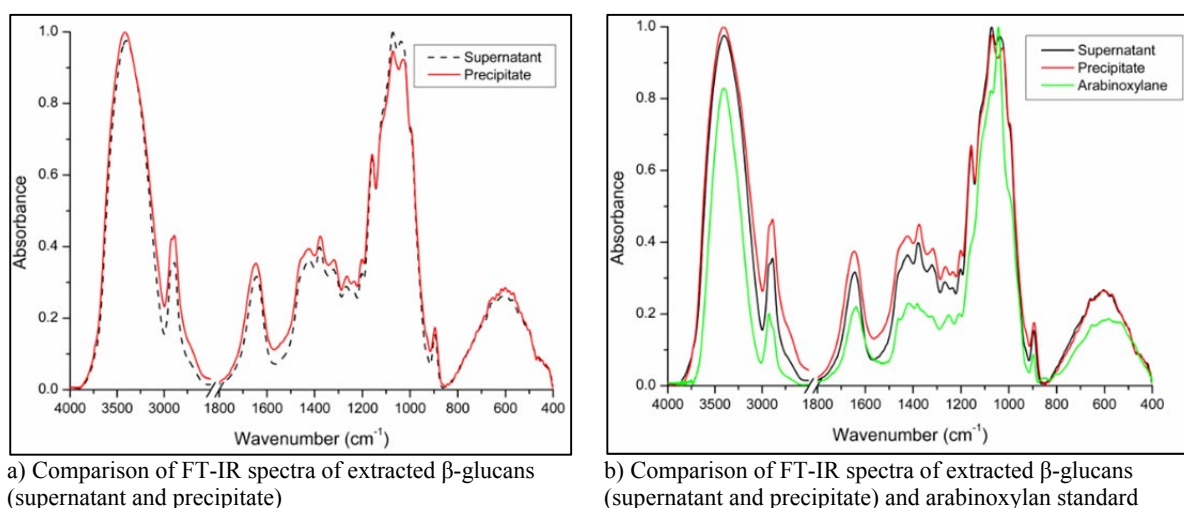


Fig. 2. Infrared spectra of extracted beta-glucans

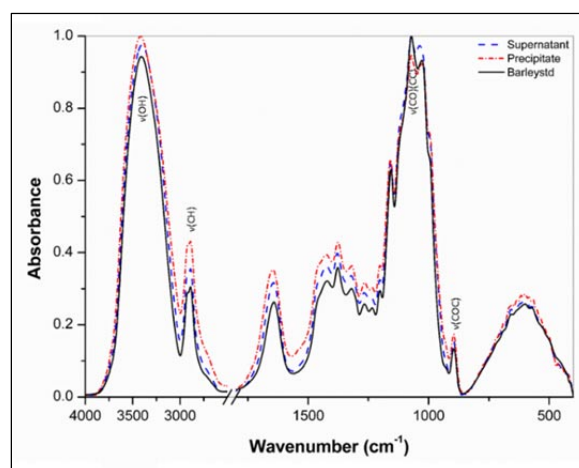


Fig. 3. Infrared spectra of extracted beta-glucans in comparison with standard of barley beta-glucans

Infrared spectroscopy is suitable to measure molecular vibrations of covalent bonds. Figures 2 and 3 compared the extracted beta-glucans [supernatant (S), precipitate (P)] with arabinoxylans to prove the minor impurities, and with commercial beta-glucan to confirm the main structure of extracted beta-glucans. Specific bands that characterize normal vibrational asymmetric and symmetric stretching of OH groups were at wavenumbers 3404 cm^{-1} (for S) and 3414 cm^{-1} (for P). The absorptions at 2920 cm^{-1} (for S) and 2918 cm^{-1} (for P) belong to asymmetric and symmetric stretches of CH groups. The region $1285\text{--}242\text{ cm}^{-1}$ with maximum peak at 1072 cm^{-1} was assigned to COC and CO bonds. β -glycosidic anomeric bonds were determined at 896 cm^{-1} for supernatant and precipitate. The obtained data were consistent with those reported by Limberger-Bayer⁷. The presence of minor impurity with arabinoxylans was also confirmed by neutral sugar analysis (GC/FID).

The morphology of precipitate and supernatant of extracted beta-glucans was significantly different. Precipitate showed a fluffy (airy), porous and spongy appearance with larger homogenous clusters while supernatant had a rigid and glassy structure (Fig. 4). Microstructure of commercial beta-glucans was similar to that of precipitate. Commercial beta-glucans contained significant content of starch (rounded particles) and matrix with proteins and fiber. It was confirmed that the commercial beta-glucans (SANACEL G, purity 54 %) showed the presence of starch and protein (data based on company documentation). Commercial beta-glucans had an irregular particles and visible traces of cell wall structure. The differences between precipitate and commercial beta-glucans were observed in particle size distribution. The results were consistent with those of Johansson⁷. The structural differences between the beta-glucans could be probably a consequence of the extraction method used and the subsequent treatment, mainly the final drying and milling steps.

Vasanthan and Temelli¹⁵ also showed a microstructure with similar characteristics to that obtained in this work for beta-glucans extracted by an alkaline aqueous method.

Wholemeal barley flour contained visible flakes and flattened and slightly damaged starch grains.

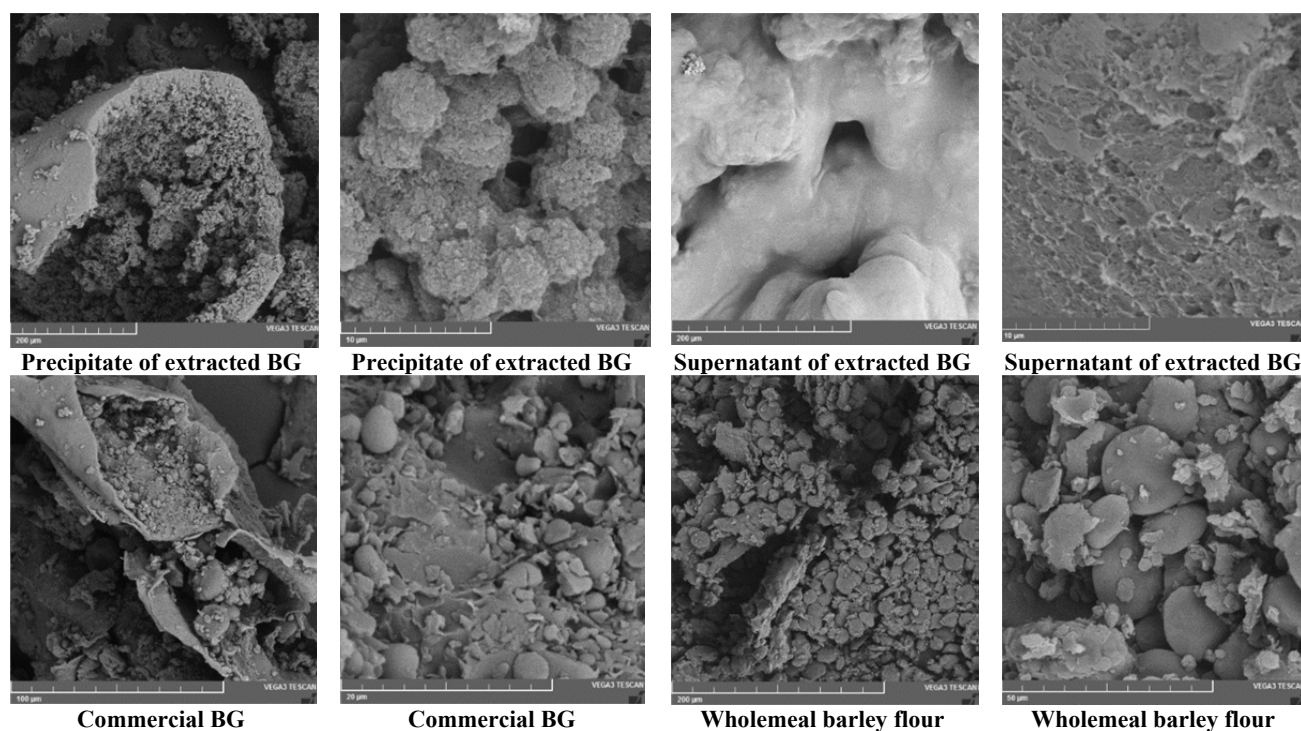


Fig. 4. Scanning electron micrographs of extracted beta-glucans (BG) (precipitate and supernatant); commercial barley beta-glucans; original wholemeal barley flour

Conclusion

Czech hulless waxy barley KM 2551-389 was a new breeding variety for special food processing (especially cereal technology). The barley showed high content of beta-glucans and fiber. There is a need to increase the consumption of barley related products in human nutrition through analysis and development of products with an added value.

Beta-glucans in wholemeal flour produced from waxy barley were extracted and partially characterized. The fractions of extracted beta-glucans showed a presence of minor level of arabinoxylans. It is necessary to pay attention to alkali steps in extraction procedure and enzymatic treatments in the future. Both fractions of extracted beta-glucans had higher molecular weights as compared to those in literature. Higher functionality of the extracted beta-glucans in nutrition and technology could be expected.

Financial support for this research was provided from the specific university research (MSMT No 21-SVV/2018) and the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (project QJ1610202).

REFERENCES

1. Synytsya A., Novak M.: Carbohydr. Polym. 92, 792 (2013).
2. Benito-Roman O., Alonso E., Lucas S.: J. Cereal Sci. 53, 271 (2011).
3. Newman R. K., Newman C. W.: *Barley for Food and Health*; John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, USA (2008).
4. Izydorczyk S. M., Dexter E. J.: Food Res. Int. 41, 85 (2008).
5. Vaculová K.: *Renesance ječmene - publikace České technologické platformy pro potraviny PK ČR* (2012), pp. 7-9 (Czech language).
6. Johansson L., Tuomainen P., Ylinen M., Ekholm P., Virkki L.: Carbohydr. Polym. 58, 267 (2004).
7. Limberger-Bayer V.M., de Francisco A., Chan A., Oro T., Ogliari P. J.: Food Chem. 154, 84 (2014).
8. Ahmad A., Anjumb F.M., Zahoorb T., Nawazc H., Ahmedd Z.: Int. J. Biol. Macromol. 46, 304 (2010).
9. Temelli F.: J. Food Sci. 62, 1194 (1997).
10. Ryu J. H., Lee S., You S. G., Yoo S. H.: Carbohydr. Polym. 89, 1238 (2012).
11. Papageorgiou M., Lakhdara N., Lazaridou A., Biliaderis C. G., Izydorczyk M.: J. Cereal Sci. 42, 213 (2005).
12. Agbenorhevi J. K., Kontogiorgos V., Kirby A. R., Morris V. J., Tosh S. M.: Int. J. Biol. Macromol. 49, 369 (2011).
13. COMMISSION REGULATION (EU) No 432/2012.
14. Mikkelsen M. S., Meier S., Jensen M. G., Qin F., Stoica I. M., Martens H. J., Blenow A., Jespersen B. M.: J. Cereal Sci. 75, 45 (2017).
15. Vasanthan T., Temelli F.: Food Res. Int. 41, 876 (2008).

Není beta-glukan jako beta-glukan ...

Ing. Iva Wiege, Ph.D.¹⁾, Ing. Marcela Sluková¹⁾, Ph.D., Ing. Kateřina Vaculová, CSc.²⁾, Ing. Pavel Skřivan, CSc.³⁾

¹⁾ Ústav sacharidů a cereálií, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

²⁾ Agrotest fyto, s. r. o., Kroměříž

³⁾ Výzkumný ústav potravinářský Praha, v. v. i.

Abstrakt

Po chemické stránce termín beta-glukan označuje poměrně širokou skupinu látek, která se liší strukturou, fyzikálně-chemickými vlastnostmi a zdravotním účinkem na organismus člověka i zvířat. Beta-glukany jsou neškrobové, necelulosové polysacharidy, které se vyskytují v buněčných stěnách obilovin, hub, kvasinek, řas a bakterií. Molekula beta-glukanu je tvořena glukosovými jednotkami spojenými mezi sebou β -glykosidovou vazbou. Struktura beta-glukanů obilovin a tím i jejich funkce je odlišná od beta-glukanů hub, kvasinek a řas. Pouze pro beta-glukany obilovin byla povolena zdravotní tvrzení (Nařízení komise EU č. 432/2012). Prospěšné fyziologické účinky konzumace obilných beta-glukanů jako součásti jídla spočívají v udržení normální hladiny cholesterolu v krvi a v omezení nárůstu hladiny glukosy v krvi po tomto jídle. Předpokládané zdravotní účinky beta-glukanů z jiných zdrojů než z obilovin jsou odvozovány z jejich struktury a chování. Prozatím nebyla schválena pro beta-glukany hub, kvasinek a řas žádná zdravotní tvrzení.

Úvod

Pokud hovoříme o beta-glukanech, jejich struktuře, vlastnostech, biologické aktivitě a potenciálních zdravotních účincích je potřeba specifikovat o jaký typ a druh beta-glukanu se konkrétně jedná. Obecně již samotný termín „beta-glukan“ není vhodné zvolen. Z chemického hlediska je „beta-glukanem“ jakákoli sloučenina složená z glukosových jednotek navzájem spojených β -glykosidovými vazbami. Nejznámějším a v přírodě nejvíce rozšířeným „beta-glukanem“ je celulósa. Celulósa je ve vodě nerozpustný, vysokomolekulární lineární polymer d-glukosových jednotek vázaných glykosidovými vazbami β -(1→4). Celulósa je základním strukturním polysacharidem buněčných stěn vyšších rostlin [1].

Sloučeniny nazývané beta-glukany (β -glukany) v daném kontextu chápeme jako strukturní (stavební), neškrobové a necelulosové polysacharidy, které mohou být ve vodě částečně rozpustné, bobtnavé, schopné zvyšovat viskozitu roztoku a mohou vykazovat řadu pozitivních fyziologických účinků v lidském organismu. β -glukany jsou zčásti roz-

pustnou a částečně nerozpustnou vlákninou, patří do skupiny hemicelulos, konkrétně heteroglukanů. β -glukany mohou být nevětvené (lineární), nebo větvené polysacharidy. Podle typu glykosidové vazby rozlišujeme vedle β -glukanů také α -glukany. Jedná se zejména o skupinu glukanů z hub, kde jsou glukosové jednotky spojeny vazbami α -(1→3), α -(1→4) nebo α -(1→6), nebo jejich kombinacemi [2, 3, 4].

Polysacharidy nazývané β -glukany, také β -(1→3), (1→4)-d-glukany, nebo β -glukany se smíšenými vazbami jsou složkou buněčných stěn vyšších rostlin a semen (obilok) některých obilovin [1]. Na rozdíl od ovsa, kde jsou β -glukany rozmístěny zejména ve vnějších vrstvách endospermu [5], v zrně ječmene jsou β -glukany přítomny jak v aleuronové vrstvě (25–26 %), tak i v endospermu (70–75 %), jako jedna ze základních složek buněčných stěn [6].

Příbuzné polymery, které se rovněž nazývají β -glukany nebo β -(1→3), (1→6)-d-glukany, jsou syntetizovány vyššími houbami, plísněmi a kvasinkami a nachází se také v mořských řasách. β -glukany tedy slouží jako stavební jednotky buněčných stěn rostlin, řas, hub a kvasinek, a vyplňují prostory mezi celulosovými vlákny [1].

β -glukany mohou být izolovány různými postupy z rostlinných nebo mikrobiálních zdrojů. β -glukany z rozdílných zdrojů se liší svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, jako jsou struktura molekuly, větvení řetězce, typ a počet vazeb v molekule, molekulová hmotnost, rozpustnost, vaznost vody, viskozita apod. S těmito vlastnostmi, s původem a čistotou izolovaných β -glukanů souvisí také odlišná biologická aktivita a jejich potenciální zdravotní účinky. Izolované frakce β -glukanů jsou významnými doplňky stravy a tvoří součást řady farmaceutických a kosmetických přípravků [4].

Některé β -glukany mají schopnost podporovat imunitní reakce v organismu, a proto se řadí mezi tzv. imunostimulátory (biostimulátory). Jiné β -glukany se podílejí na udržení normální hladiny cholesterolu a glukosy v krvi po jídle apod.

O většině β -glukanů a zejména o jejich chování v lidském těle však nemáme stále dostatečné informace.

Obilné beta-glukany – zdroje a struktura

Nejvýznamnějším zdrojem β -glukanů obilovin je ječmen, kde se obsah β -glukanů pohybuje mezi 2,5–11,3 % (hmotnostní procenta v sušině zrna). V porovnání s ječmenem má oves obsah β -glukanů nižší (do 8 %). V ostatních obilovinách zejména v pšenici a žitě jsou β -glukany zastoupeny v nižším množství, uvádí se kolem 2 % a méně [6, 7]. Sladovnické odrůdy ječmene (většinou pluchaté odrůdy) vykazují nižší obsahy β -glukanů než cíleně šlechtěné odrůdy (většinou bezpluché odrůdy). Mezi speciální odrůdy ječmene vyšlechtěné pro potravinářské využití patří např. německá odrůda betaBarley® [8], české odrůdy AF Lucius® a AF Cesar®, které mají vyšší obsahy β -glukanů (od 4,5 do 6,8 % v sušině zrna) [9].

Obsah β -glukanů v obilovinách závisí na dané obilovině a její odrůdě, pěstebních a klimatických podmínkách. Vyšší obsahy β -glukanů byly nalezeny u odrůd s anomální skladbou škrobu (voskový - waxy, s vysokým obsahem amylopektinu nebo vysoko-amylový, s vysokým obsahem amylosy), u obilovin pěstovaných v extrémních podmínkách (sucho, teplo) anebo u některých ozimých odrůd ječmene [10]. Obsah β -glukanů souvisí i s obsahem škrobu v zrna. U odrůd s celkovým obsahem škrobu nižším než 40 % byly naměřeny vysoké obsahy β -glukanů (v rozmezí 10–20 %).

β -glukany se nachází v buněčné stěně endospermu (až 75 % z celkového obsahu β -glukanů) a v menší míře pak v aleuronové vrstvě (kolem 25 %) [8, 10]. Rozložení β -glukanů v obilném zrna závisí na jejich celkovém množství. Bylo zjištěno, že u ječmene s nízkým obsahem β -glukanů se jich nejvíce nachází v aleuronové vrstvě, zatímco u ječmene s průměrným obsahem β -glukanů se jich více vyskytuje v buněčných stěnách endospermu [10].

V obilných β -glukanech jsou molekuly glukosy spojeny vazbami β -(1→3)-(1→4) do lineárního řetězce, který může obsahovat až 250 000 glukosových jednotek.

Obilné β -glukany obvykle obsahují kolem 70 % reziduí s vazbou β -(1→4) a kolem 30 % reziduí s vazbou β -(1→3). Úseky glukos (většinou 2-3 jednotky) s vazbou β -(1→4) jsou propojeny jednou glukosovou jednotkou s vazbou β -(1→3). Takto strukturně podobné β -glukany se v jednotlivých obilovinách liší v poměru triosylových a tetraosylových jednotek. Pro β -glukany ječmene se tak udává poměr jednotek přibližně 1:3 [11] a pro β -glukany ovsa 1:2 [12] [pozn. poměr 1:3 pro ječmen znamená téměř trojnásobnou převahu jednotek s vazbami β -(1→4) nad jednotkami spojených

vazbami β -(1→3)]. V případě pšeničných β -glukanů je poměr 1:4 [13]. Z toho vyplývá (a bylo také chemickou strukturní analýzou potvrzeno), že pšeničné β -glukany mají nižší počet vazeb β -(1→3), pravidelnější strukturu, nižší rozpustnost a odlišné chování (viskozita, tvorba gelu apod.) než ječné a ovesné β -glukany.

Obilné beta-glukany – vlastnosti

Jako již bylo uvedeno, rozpustnost obilných β -glukanů závisí na jejich původu, struktuře a na počtu β -(1→3) vazeb v molekule. Rozpustnost ve vodě klesá v pořadí oves > ječmen > pšenice. S vyšší počtem β -(1→3) jednotek se tedy rozpustnost β -glukanů zvyšuje [1]. Uvádí se, že u ječmene je asi 20 % β -glukanů a u ovsa až 80 % β -glukanů rozpustných ve vodě při teplotě 40 °C [9].

Viskozita a reologické chování β -glukanů v roztoku jsou ovlivněny uspořádáním (konformací) jejich řetězců, molekulovou hmotností a koncentrací. Molekulová hmotnost β -glukanů se pohybuje v širokém rozsahu od desítek do tisíců kDa. S vyšší molekulovou hmotností β -glukanů se zvyšuje viskozita roztoku. β -glukany s vysokou molekulovou hmotností (tisíce kDa) ve vodě bobtnají a vytváří viskózní roztoky. β -glukany s nižší molekulovou hmotností (jednotky kDa) mohou tvořit tzv. měkké gely. V porovnání s ječnými nebo ovesnými β -glukany jsou pšeničné β -glukany v roztoku méně stabilní a vytváří gely. Tvorba viskózních roztoků a filmů je nežádoucí při výrobě piva, proto se ve sladovnictví používají výhradně ječmeny s nízkým obsahem β -glukanů [7]. Obdobně i pro zpracování ječmene na bioetanol se zkoumají a šlechtí nové typy ječmene s minimálním obsahem těchto polysacharidů [6]. V ostatních odvětvích potravinářského průmyslu ovlivňují β -glukany zejména konzistenci výrobku a mohou být využívány jako plnidla, stabilizátory, zahušťovadla, náhrady tuku, jako prostředek k prodloužení trvanlivosti výrobku a zpomalení procesu stárnutí, snižují energetickou a zvyšují výživovou hodnotu potravin. Jak již bylo zmíněno, β -glukany

MAVA spol. s r.o.

Sovova 1291/5

703 00 Ostrava-Vítkovice

Tel/FAX: 596 783 360



PROJEKT-DODÁVKY-MONTÁŽ-SERVIS

- moderní technologie
- komplexní dodávky na klíč
- poradenská činnost
- optimalizace stávajících kuchyní
- výpočtové metody při navrhování kuchyní

www.mava-t.cz, www.projekty-gastro.cz, mava@mava-t.cz

jsou součástí doplňků stravy a řady kosmetických produktů [14].

Obilné beta-glukany – zdravotní účinky

V nařízení EU č. 432/2012 jsou uvedena dvě zdravotní tvrzení týkající se účinků obilných β -glukanů:

1) „ β -glukany přispívají k udržení normální hladiny cholesterolu v krvi.“ Toto tvrzení smí být použito pouze u potravin, které obsahují nejméně 1 g β -glukanů z ovesa, ovesných otrub, ječmene, ječných otrub nebo ze směsi těchto zdrojů v kvantifikované porci. Aby bylo možné tvrzení použít, musí být spotřebitel informován, že příznivého účinku se dosáhne při přívodu 3 g β -glukanů denně.

2) „Konzumace β -glukanů z ovesa nebo ječmene jakožto součástí jídla přispívá k omezení nárůstu hladiny glukosy v krvi po tomto jídle.“ Tvrzení smí být použito pouze u potravin, které obsahují nejméně 4 g β -glukanů z ovesa nebo ječmene na každých 30 g využitelných sacharidů v kvantifikované porci jakožto součástí jídla. Aby bylo možné tvrzení použít, musí být spotřebitel informován, že příznivého účinku se dosáhne konzumací β -glukanů z ovesa nebo ječmene jakožto součástí jídla [15].

Působení β -glukanů spočívá ve zpomalení vstřebávání glukosy, ve snížení koncentrace postprandiální glukosy a cholesterolu v krvi [16]. Obilný β -glukan s nižší molekulovou hmotností (kolem 80 kDa) má menší vliv na snížení hladiny cholesterolu, může však působit jako významné prebiotikum [17]. Uvádí se, že mechanismus působení β -glukanů je výsledkem schopnosti této obilné vlákniny tvořit gel, který zvyšuje gastrointestinální viskozitu [6, 7]. Tato schopnost je funkcí molekulové hmotnosti (MW) a koncentrace β -glukanů v roztoku (c) a parametr $\log(MW \times c)$ je tak považován za klíčový indikátor zdravotního účinku β -glukanů. Při komerčním zpracování je udržení co nejvyšší MW jedním z klíčových ukazatelů efektivnosti extrakce, společně s konečnou produkcí obilných β -glukanů. Volba optimálních podmínek extrakce (zejména teplota a pH) má tak rozhodující význam.

Některé výzkumy ukazují, že pravidelný příjem 3 g rozpustné vlákniny denně (hlavně ječné a ovesné vlákniny) může vést ke snížení vzniku kardiovaskulárních onemocnění až o 25–36 % [6, 7]. β -glukany vážou velké množství vody a v žaludku vytvoří objemnou, viskózní, gelovitou hmotu, která prochází tenkým střevem téměř nezměněna a je zcela nebo částečně rozkládána až mikrobiotou tlustého střeva. Zrychlením nástupu pocitu sytosti a jeho prodloužením je možné předejít přejídání se a zabránit tak rozvoji nadváhy a obezity.

Beta-glukany z hub a kvasinek – zdroje, struktura

Neméně významným zdrojem β -glukanů jsou buněčné stěny hub a kvasinek. Díky odlišné struktuře

(v porovnání s obilnými β -glukany) působí β -glukany hub a kvasinek jako tzv. imunomodulátory (modulátory biologické odpovědi; biologicky účinné látky ovlivňující některé biologické funkce) [4, 18].

Mezi zdroje těchto β -glukanů patří hlíva ústříčná, žampion brazilský, různé druhy lišejníků (např. *Parmotrema austrosinense*), ale i pekařské nebo pivovarnické kvasnice (*Saccharomyces cerevisiae*). Z cizokrajných hub jsou to pak např. houby shiitake (houževnatec jedlý), reishi (lesklokorka lesklá) a další různé druhy chorošotvarých hub.

Buněčná stěna většiny hub a kvasinek se skládá z pěti hlavních sacharidových složek: β -(1→3)-d-glukanu, β -(1→6)-d-glukanu, α -(1→3)-d-glukanu, chitinu a glykoproteinů (zejména mannoproteinu), přičemž v kvasinkách β -(1→3)-d-glukan většinou chybí [19]. Novější studie však uvádí, že buněčné stěny kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* obsahují i glukany spojené vazbami α -(1→3) [20]. β -glukany s vazbami β -(1→3) a β -(1→6) izolované z buněčné stěny kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jsou nejintenzivněji studovanými β -glukany, které vykazují nejsilnější biologické účinky v porovnání s ostatními druhy kvasinek [4].

Nejčastěji je řetězec β -glukanů hub tvořen jednotkami β -(1→3)-d-glukanu s místem větvení β -(1→6). β -glukany lišejníku a mechu (někdy nazývané také lichenany) jsou naopak lineární molekuly spojené glykosidovými vazbami β -(1→3) a β -(1→4) s podobným uspořádáním jako obilné β -glukany [21].

Beta-glukany z hub a kvasinek – zdravotní účinky

Jak již bylo uvedeno, struktura (délka řetězce, stupeň větvení, molekulová hmotnost) a tím i biologická aktivita daného β -glukanu se liší v závislosti na zdroji. β -glukany hub a kvasinek vykazují významnou fyziologickou aktivitu, která je součástí obranných mechanismů buňky (zejména schopnost fagocytózy) [4]. S tím souvisí účinky působení těchto β -glukanů na lidský organismus (imunomodulační a protinádorová aktivita, antioxidační, protizánětlivé nebo analgetické účinky, zvyšují odolnost vůči některým infekcím, podpora hojení ran na kůži, popálenin apod.).

Hlavní funkcí β -glukanů hub a kvasinek je tedy ovlivnění buněk účastnících se imunitních reakcí. Ve zralých houbách jsou hlavní řetězce β -glukanů stočeny do trojitě šroubovice stabilizované postranními řetězci (jednoduchá a dvojitá vlákna z β -(1→3)-d-glukopyranosových jednotek) s molekulovou hmotností vyšší než 90 kDa. Díky těmto vlastnostem je podpořena funkce fagocytózy a s tím související zdravotní účinek β -glukanů.

Podmínky izolace, extrakce a přečištění β -glukanů z původního rostlinného nebo mikrobiálního zdroje

souvisí s čistotou a biologickou aktivitou preparátu obsahujícího β -glukany. Použitím mírně alkalického roztoku při extrakci β -glukanu došlo k rozvolnění původní helikální struktury β -glukanu a k nepatrnému snížení jeho molekulové hmotnosti. Dosažení vysoké čistoty izolovaného β -glukanu a udržení rozumné ceny doplňku stravy není komerčně možné. Čistota preparátu obsahujícího β -glukany může být vyjádřena jako podíl polysacharidu β -glukanu z celkového obsahu sacharidů. V případě přítomnosti dalších sacharidů jako je glukosa, mannosa, galaktomannany, mannoproteiny apod. může být však toto vyjádření čistoty β -glukanu nepřesné.

β -glukan izolovaný z kvasinek je mimo jiné schopen absorbovat mykotoxiny obilovin (deoxynivalenol, zearalenon, aflatoxin B₁, T-2 toxin a další) [22]. Mechanismus účinku pravděpodobně spočívá v interakci molekul β -glukanu a mykotoxinu a tvorbě komplexní struktury stabilizované vodíkovými vazbami a van der Waalsovými silami. Bylo zjištěno, že krmivo určené pro hospodářská zvířata obohacené tímto β -glukanem zvyšovalo účinek fagocytózy a baktericidní aktivitu makrofágů, což vedlo ke snížení průniku některých nebezpečných bakterií do okolních tkání.

β -glukany vybraných jedlých hub (např. hlíva ústříčná, pečárka dvouvýtrusná, penízovka same-tonohá aj.) mohou mít pozitivní vliv na snižování hladiny cholesterolu a lipoproteinu s nízkou hustotou (LDL cholesterolu), což může vést ke snížení rizika vzniku srdečně-cévních onemocnění. Pro dané typy β -glukanů zatím nejsou schválena žádná zdravotní tvrzení.

Další zdroje beta-glukanů (mořské řasy, bakterie)

β -glukany nalezneme i v buněčných stěnách mořských řas rodu *Laminaria* sp., *Adenocystis* sp. a dalších. β -glukany hnědých řas rodu *Laminaria* sp. se nazývají *laminarany*, zatímco u řas *Adenocystis* sp. se jedná o fukoidany. Jejich struktura a vlastnosti jsou v popředí zájmu již desítky let [4, 22 a další]. Jedná se především o lineární β -glukany spojené vazbami β -(1→3). Vlastnosti a účinky těchto β -glukanů jsou intenzivně studovány zejména v Japonsku a na Dálném Východě a také na Islandu. Významné cyklické β -glukany se 17 a 40 glukosovými jednotkami spojenými vazbami β -(1→2) jsou produkty bakterií rodu *Rhizopus* sp. a *Agrobacterium* sp. [23].

Závěr

V překládaném odborném článku jsou shrnuty vlastnosti a účinky jednotlivých typů a druhů beta-glukanů. Beta-glukany, jako stavební, neškrobové a necelulosové polysacharidy, jsou součástí

vlákniny potravy a při pravidelné konzumaci mohou vykazovat řadu ověřených zdravotních účinků. Obilné beta-glukany mají vliv na snížení hladiny cholesterolu a glukosy v krvi po jídle, zvyšují pocit sytosti a podporují střevní peristaltiku. Zatímco beta-glukany z hub a kvasinek mohou působit u člověka i zvířat jako významné imunomodulátory. Zvyšují odolnost vůči virovým, bakteriálním, houbovým nebo parazitárním infekcím, mohou vykazovat anti-oxidační a analgetické účinky, a mohou preventivně působit proti nádorovým onemocněním. Obecně u všech typů a druhů beta-glukanů platí, že biologická aktivita a účinky beta-glukanů významně závisí na jejich zdroji, použité izolační metodě a na jejich konkrétních fyzikálně-chemických vlastnostech (tj. na struktuře, viskozitě a molekulové hmotnosti) popř. na následných technologických operacích při výrobě potravin a doplňků stravy.

Dedikace: Příspěvek byl vypracován za podpory MZe ČR, projektu č. QJ1610202 a institucionální podpory na dlouhodobý rozvoj VO, rozhodnutí č. RO1117.

Literatura

1. Velišek J, Hajšlová J (1999) Chemie potravin I. díl. 3. vydání. Osis, Tábor.
2. Synytsya A, Novák M (2013) Structural diversity of fungal glucans. Carbohydrate Polymers 92, 792–809.
3. Novák M. (2007) β -glukany, historie a současnost. Chemické listy 101, 872–880.
4. Větvicka V (2013) Beta Glukan Tajemství přírody.
5. Chu YF (2014) Oats Nutrition and Technology, str. 464. Barrington, Illinois: Wiley Blackwell, USA.
6. Newman RK, Newman CW (2008) Barley for Food and Health, str. 2459. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, USA.
7. Collins H, Burton R, Topping D et al. (2010) Variability in fine structures of noncellulosic cell wall polysaccharides from cereal grains: potential importance in human health and nutrition. Cereal Chemistry 87, 272–282.
8. Dieckmann K (2011) betaBARLEY-the new beta-glucan-rich barley for baking and more. Baking+Biscuit International 1, 58–63.
9. Vaculová K (2014) Bezpluchý ječmen a perspektivy jeho využití v potravinářství. Publikace České technologické platformy pro potraviny Renesance ječmene 2015. Potravinářská komora České republiky.
10. Izdorczyk SM, Dexter EJ (2008) Barley β -glucans and arabinoxylans: Molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products – a Review. Food Research International 41, 850–868.
11. Mikkelsen MS., Jespersen BM., Møller BL et al. (2010) Comparative spectroscopic and rheological studies on crude and purified soluble barley and oat β -glucan preparations. Food Research International 4, 2417–2424.

12. Agbenorhevi JK, Kontogiorgos V, Kirby AR et al. (2011) Rheological and microstructural investigation of oat β -glucan isolates varying in molecular weight. *International Journal of Biological Macromolecules* 49, 369–377.
13. Cui W, Wood PJ, Blackwell B, Nikiforuk J (2000) Physicochemical properties and structural characterization by two-dimensional NMR spectroscopy of wheat β -D-glucan—comparison with other cereal β -D-glucans. *Carbohydrate Polymers* 41, 249–258.
14. Harris JP, Smith GB (2006) Plant cell walls and cell-wall polysaccharides: structures, properties and uses in food products. *International Journal of Food Science and Technology* 41, 129–143.
15. Nařízení komise (EU) č. 432/2012.
16. Tosh SM (2007) Factor affecting bioactivity of cereal β -glucans. V knize: Salovaara H., Gates F., Tenkanen M. (ed.) *Dietary fibre-components and functions*. Wageningen Academic Publishers. Nizozemí.
17. Lam K-L, Cheung PCh-K (2013) Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 2, 45–64.
18. Manzi P, Pizzoferrato L (2000) Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry* 68, 315–318.
19. Grün Ch (2003) Structure and biosynthesis of fungal β -glucans. *Disertační práce*. Utrecht University.
20. Osumi M (2012) Visualization of yeast cells by electron microscopy. *Journal of Electron Microscopy* 61, 343–365.
21. Olafsdottir ES, Ingólfssdottir K (2001) Polysaccharides from lichens: structural characteristics and biological activity. *Planta Med.* 67, 199–208.
22. Freimund S, Sauter M, Rys P (2003) Efficient adsorption of the mycotoxins zearalenone and T-2 toxin on a modified yeast glucan. *Journal of Environmental Science and Health B* 38, 243–255.
23. Breedveld MW, Miller KJ (1994) Cyclic beta-glucans of members of the family Rhizobiaceae. *Microbiology Review* 58, 145–161.

Abstract

Chemically, the term beta-glucan refers to a relatively broad group of substances that differ in their structure, physico-chemical properties, and human and animal health effects. The beta-glucans are perceived as non-starch, non-cellulosic polysaccharides found in the cell walls of cereals, fungi, yeast, algae and bacteria. The beta-glucan molecule is composed of glucose units linked by a β -glycosidic linkage. The structure and function of cereal beta-glucans is different from those of fungi, yeast and algae beta-glucans. The health claims have been allowed only for cereal beta-glucans (EU Commission Regulation No. 432/2012). The beneficial physiological effects of eating cereal beta-glucans as part of a meal are to maintain normal blood cholesterol levels and to limit the increase in blood glucose levels after eating. The expected health effects of beta-glucans from sources other than cereals are derived from their structure and behavior. No health claims have yet been approved for beta-glucans of fungi, yeast and algae.

Konference

Zpráva o konferenci INDC 2017

17. Mezinárodní konference INDC se konala v Praze v hotelu DUO ve dnech 9.–12. října 2017. Hlavním organizátorem byl RADANAL s.r.o. Pardubice, dále Společnost pro výživu Praha, Institut Nutrce a Diagnostiky Pardubice a Česká společnost pro klinickou biochemii Praha. Konferenci dále podpořily další společnosti, které poskytly účastníkům konference své výrobky. Záštitu nad touto konferencí převzal poslanec parlamentu Pharm. Dr. Jiří Skalický, Ph.D.

Na konferenci bylo přítomno 140 delegátů z 25 zemí a 5 kontinentů světa. Konference se konala 4 dny. Celkový počet přihlášených přednášek byl 60, po kterých následovaly věcné diskuse. Plakátových přihlášených sdělení bylo 43. Odborná komise vybrala k ocenění pět nejlepších posterů.

Konferenci otevřeli tři přednášející: doc. Aleš Horna z Institutu Nutrce a Diagnostiky Pardubice, prof. Helena Tlaskalová – Hogenová z Mikrobiologického Ústavu Akademie Věd a prof. Mirek Macka z Tasmánské Univerzity v Austrálii. Doc. Horna představil ve své přednášce nově založený Institut Nutrce a Diagnostiky v Pardubicích a v současnosti zde řešené výzkumné projekty. Dále připomněl historii mezinárodní konference INDC od roku 2001. Prof. Tlaskalová se věnovala imunopatologii střeva, onemocněním celiakií a autoimunitou. Prof. Macka se věnoval miniaturizaci v analytické diagnostice.

Přednášky byly rozvrženy do 8 sekcí, kterým předsedali přední odborníci v oboru jak z praxe, tak i z univerzit z různých zemí světa. Témata přednášek se většinou týkala problémů spojených s výživou. To znamená, že se obsah přednášek týkal jak surovin – tedy potravin, např. jaké výhody má konzumace česneku. Dále byla uvedena i různá onemocnění např. diabetes, což je onemocnění, jehož počet stále vzrůstá. Několik přednášek bylo věnováno vitaminům a antioxidantům, jejichž účinek je ve výživě významný. Přednášky se nevyhnuly ani obezitě, která ve světě i u nás vzrůstá. Dále byl zdůrazněn význam probiotik pro imunitu člověka. Jedna ze sekcí byla věnována analytickým metodám a jejich uplatněním v klinické diagnostice.

Konference byla hodnocena účastníky jako velmi úspěšná a to jak pro odborné stránce, tak i pro možnost navazování odborných osobních kontaktů a atraktivní doprovodný společenský program. Abstrakta jednotlivých přednášek a posterů z konference jsou uvedena ve Sborníku INDC 2017.

18. ročník INDC se bude konat ve dnech 22.–25. září 2018 v Praze v hotelu DAP, Vítězné náměstí 4, 160 00 Praha 6.

Ing. Jarmila Blatná, CSc., doc. Ing. Aleš Horna, CSc.