

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

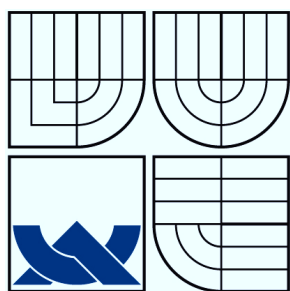
VLIV PŘÍDAVNÝCH LÁTEK NA OBSAH AKRYLAMIDU
V TEPELNĚ OPRACOVANÝCH POTRAVINÁCH

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

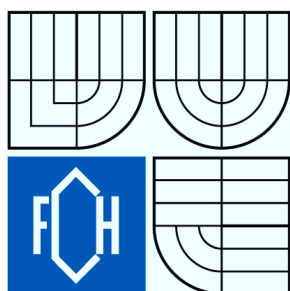
Bc. LUCIE MARKOVÁ

BRNO 2009



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VLIV PŘÍDAVNÝCH LÁTEK NA OBSAH AKRYLAMIDU V TEPELNĚ OPRACOVANÝCH POTRAVINÁCH

EFFECT OF ADDITIVES ON ACRYLAMIDE CONTENT IN THERMALLY TREATED FOODS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

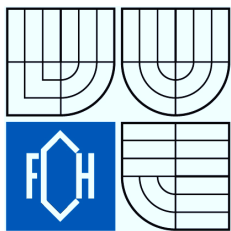
Bc. LUCIE MARKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. PETER ŠIMKO, DrSc.

BRNO 2009



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0238/2008** Akademický rok: **2008/2009**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Bc. Lucie Marková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (N2901)
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)
Vedoucí diplomové práce: **prof. Ing. Peter Šimko, DrSc.**
Konzultanti diplomové práce:

Název diplomové práce:

Vliv přídavných látek na obsah akrylamidu
v tepelně opracovaných potravinách

Zadání diplomové práce:

1. Zvládnout problematiku stanovení akrylamidu pomocí GC/MS a HPLC/MS/MS
2. Sledovat vliv přídavných látek na obsah akrylamidu v modelových soustavách a reálných potravinách
3. Optimalizovat poměry přídavných látek s cílem minimalizace obsahu akrylamidu v potravinách

Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Lucie Marková
Student(ka)

prof. Ing. Peter Šimko, DrSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Akrylamid je nežádoucí karcinogenní složka tepelně opracovaných potravin, vznikající reakcí monosacharidů a asparaginu. V práci byl sledován vliv amonných a sodných kypřících látek na obsah akrylamidu v perníkách, přičemž byly aplikovány jak samotné tak v kombinaci s L-asparaginázou, která katalyzuje hydrolýzu asparaginu a tím eliminuje tvorbu akrylamidu v matrici. V práci byl také studován vliv vybrané řady anorganických solí na obsah akrylamidu v modelové matrici simulující složení cereálních výrobků. Zároveň byl sledován vliv těchto solí na aktivitu L-asparaginázy s cílem optimalizace podmínek její aplikace v technologii výroby cereálních potravin. Na základě experimentů bylo zjištěno, že je možné zredukovat obsah akrylamidu přidávkem L-asparaginázy o 40 % a anorganickými solemi v rozsahu 30 - 99 %, když nejvyšší účinnost eliminace měli sloučeniny NH_4Cl a CaCl_2 .

ABSTRACT

Acrylamide is an undesirable carcinogenic component of thermally processed foods being formed from reducing saccharides and asparagine. In this work, the effect of ammonium and sodium raising agents themselves or in their combination with L-asparaginase enzyme catalyzing the conversion of asparagine into aspartic acid resulting in the reduction of acrylamide in gingerbreads was studied. Also, the influence of selected inorganic salts on the content of acrylamide in a model matrix simulating a composition of cereal products was observed. Simultaneously, the impact of these salts on activity of L-asparaginase was examined to find optimal conditions for its application in cereal technology. Based on experiments it was found, that addition of L-asparaginase reduces acrylamide content by 40 % while inorganic salts addition decreases acrylamide content in the range of 30 - 99 % when the most effective compounds were NH_4Cl and CaCl_2 .

KLÍČOVÁ SLOVA

HPLC/MS/MS, akrylamid, tepelně opracované potraviny, eliminace, anorganické soli, L-asparagináza

KEYWORDS

HPLC/MS/MS, acrylamide, thermally treated foods, elimination, inorganic salts, L-asparaginase

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

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Velmi ráda bych poděkovala všem, kteří mi pomáhali při vzniku této práce. Především prof. Ing. Peteru Šimkovi, DrSc., vedoucímu mé diplomové práce, za trpělivé vedení a množství praktických rad. Mé velké díky patří také Ing. Zuzaně Ciesarové, CSc. za její trpělivost, vstřícnost a drahocenné rady, dále Ing. Kristíně Kukurové, PhD., která mi vždy ochotně pomohla cennými informacemi, Ing. Aleně Bednárikové, PhD. za stanovení obsahu aminokyselin a akrylamidu a všem zaměstnancům Výzkumného ústavu potravinářského v Bratislavě za jejich ochotu a vstřícnost.

Nakonec bych chtěla poděkovat také rodičům za poskytnuté zázemí a všem svým blízkým za podporu.

OBSAH

1	ÚVOD.....	12
2	SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY AKRYLAMIDU.....	14
2.1	Charakteristika akrylamidu.....	14
2.2	Výskyt akrylamidu	15
2.3	Mechanismus vzniku akrylamidu v tepelně upravených potravinách.....	17
2.3.1	Vznik akrylamidu reakcí asparaginu s karbonylovými sloučeninami.....	18
2.3.2	Vznik akrylamidu reakcí 3-aminopropionamidu s redukujícími sacharidy	20
2.3.3	Vznik akrylamidu reakcí asparaginu s lipidy	21
2.3.4	Přímý vznik akrylamidu z aminokyselin	21
2.4	Možnosti eliminace akrylamidu	22
2.4.1	Eliminace prekurzorů akrylamidu	23
2.4.1.1	Minimalizace obsahu sacharidů.....	24
2.4.1.2	Minimalizace obsahu asparaginu.....	24
2.4.2	Snižování obsahu akrylamidu změnou receptury.....	24
2.4.2.1	Minimalizace přídavku hydrogenuhličitanu amonného	24
2.4.2.2	Použití vedlejších přísad.....	25
2.4.2.3	Eliminace akrylamidu změnou pH	25
2.4.2.4	Substituce složek potravin	26
2.4.2.5	Změna výrobního procesu	26
2.4.3	Zpracování jako prevence vzniku akrylamidu.....	26
2.4.3.1	Fermentace.....	26
2.4.3.2	Ovlivnění poměru teplota/čas a kontrola obsahu vody	26
2.4.3.3	Předběžná úprava.....	27
2.4.4	Finální úprava potravin minimalizující vznik akrylamidu	27
2.4.4.1	Barva potravin	27
2.4.4.2	Struktura a chuť	28
2.4.4.3	Skladování, trvanlivost a zpracování potraviny spotřebitelem.....	28
2.5	Vliv anorganických solí na vznik a eliminaci akrylamidu v tepelně upravených potravinách	29
2.6	Vliv antioxidantů na vznik a eliminaci akrylamidu v tepelně upravených potravinách	32
2.7	Použití asparaginázy na eliminaci prekurzorů vedoucích ke vzniku akrylamidu v tepelně upravených potravinách	34

2.8	Charakteristika enzymu L-asparaginázy	36
2.9	Charakteristika surovin.....	37
2.9.1	Charakteristika obilovin a jejich mouk.....	37
2.9.1.1	Pšenice.....	40
2.9.1.2	Ječmen.....	41
2.9.1.3	Žito.....	42
2.9.1.4	Oves.....	42
2.9.1.5	Kukuřice.....	43
3	CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	44
4	MATERIÁLY A METODY.....	45
4.1	Stanovení expozice.....	45
4.2	Vliv solí a L-asparaginázy na obsah akrylamid v perníkách.....	45
4.2.1	Použité chemikálie.....	45
4.2.2	Použité přístroje.....	45
4.2.3	Použité metody stanovení.....	46
4.2.3.1	Reálné vzorky.....	46
4.2.3.2	Příprava vzorků pro stanovení obsahu akrylamidu.....	47
4.2.3.3	Příprava vzorků pro stanovení obsahu aminokyselin.....	47
4.2.3.4	Stanovení obsahu akrylamidu pomocí LC/ESI-MS-MS.....	47
4.2.3.5	Stanovení obsahu aminokyselin pomocí LC/ESI-MS-MS.....	48
4.2.3.6	Měření barvy perníku.....	48
4.2.3.7	Statistické zhodnocení výsledků.....	49
4.3	Sledování vlivu solí a L-asparaginázy na obsah akrylamid v modelovém systému.....	49
4.3.1	Použité chemikálie.....	49
4.3.2	Použité přístroje.....	50
4.3.3	Použité metody stanovení.....	50
4.3.3.1	Modelová směs.....	50
4.3.3.2	Příprava vzorků pro stanovení obsahu akrylamidu.....	50
4.3.3.3	Příprava vzorků pro stanovení obsahu aminokyselin.....	51
4.3.3.4	Extrakce.....	52
4.3.3.5	Stanovení obsahu akrylamidu a aminokyselin pomocí LC/ESI-MS-MS.....	53
4.3.3.6	Stanovení pH.....	53
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	54
5.1	Vyhodnocení expozice.....	54

5.2	Vyhodnocení vlivu solí a L-asparaginázy na obsah akrylamidu v perníkách	58
5.2.1	Stanovení obsahu akrylamidu v perníkách.....	59
5.2.2	Stanovení obsahu aminokyselin v perníkách.....	61
5.2.3	Vyhodnocení barvy perníků	63
5.3	Vyhodnocení vlivu solí a L-asparaginázy na obsah akrylamidu v modelovém systému	65
5.3.1	Volba modelové směsi.....	65
5.3.2	Kinetika tvorby akrylamidu v modelové směsi.....	66
5.3.3	Vliv pH na tvorbu akrylamidu.....	67
5.3.4	Vliv anorganických solí na tvorbu akrylamidu v modelové směsi	69
5.3.5	Kinetika působení enzymu L-asparaginázy v modelové směsi.....	76
5.3.6	Vliv solí na eliminaci akrylamidu v modelové směsi působením L-asparaginázy.....	78
6	ZÁVĚR.....	83
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	85
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	93
9	SEZNAM PŘÍLOH	94
10	PŘÍLOHY	95

1 ÚVOD

V dubnu 2002 Národní úřad pro potraviny ve Švédsku zveřejnil prohlášení o výskytu vysokých hodnot akrylamidu v tepelně opracovaných potravinách bohatých na sacharidy [1] na základě nálezů v rozsahu od $\mu\text{g}/\text{kg}$ až po mg/kg , které publikovali Tareke *et al.* [2] Toto zjištění vedlo k intenzivnímu výzkumu příčin a dopadů výskytu akrylamidu v potravinách [3], protože akrylamid je od roku 1994 Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC) řazen mezi pravděpodobné lidské karcinogeny [1].

V roce 2005 WHO a FAO společně oznámili, že potraviny zpracované při vysokých teplotách obsahují značné úrovně akrylamidu, které mohou do jisté míry nepříznivě ovlivňovat lidské zdraví [4], prozatím však neexistuje žádná směrnice upravující hodnoty akrylamidu v potravinách. Obsah akrylamidu je regulován pouze v pitné vodě a balené pitné vodě podle Směrnice Rady 98/83/ES o jakosti pitné vody určené pro lidskou spotřebu, kdy nejvyšší mezní hodnota je $0,1 \mu\text{g}/\text{l}$ [5, 6].

Početné studie umožňují pochopit vznik akrylamidu v průběhu tepelného zpracování potravin. Nehledě na rozvoj analytických metod pro stanovení obsahu akrylamidu v potravinách je výzkum zaměřen na objasnění mechanismu vzniku a především snížení jeho obsahu v konečném produktu [7]. Možných formací mechanismu vzniku bylo identifikováno několik, přičemž prekurzory akrylamidu v potravinách jsou karbonylové skupiny redukcujících sacharidů a aminoskupina asparaginu [1]. Zároveň se zjištěním přítomnosti akrylamidu byly vyvíjeny metody pro analýzu akrylamidu v potravinách. V současné době se nejvíce používá plynová chromatografie nebo vysokotlaká kapalinová chromatografie, obě v kombinaci s hmotnostní detekcí [8, 9, 10].

Znalosti mechanismu vzniku a metody analýzy usnadňují studie účinků faktorů na vznik a eliminaci akrylamidu v potravinách. Mezi eliminační faktory patří např. teplota, čas, obsah vody, pH nebo složky matrice. Studie prokazatelných eliminačních účinků lze následně využívat při výrobě potravin za účelem snížení obsahu akrylamidu a s ním spojená zdravotní rizika [11].

Tato práce se především zabývá vlivem anorganických solí na vznik a eliminaci akrylamidu v tepelně upravených potravinách i v kombinaci s použitím enzymu L-asparaginázy. Cílem je získat poznatky, definovat podmínky a charakterizovat možné důsledky použití anorganických solí v kombinaci s L-asparaginázou k minimalizaci obsahu akrylamidu v modelových i reálných systémech s využitím techniky LC/MS/MS pro

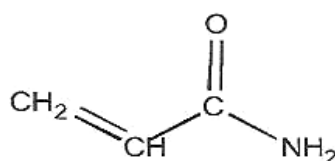
stanovení obsahu akrylamidu. Práce je součástí několikaletého výzkumného projektu probíhajícího na Výzkumném ústavě potravinářském v Bratislavě, který je zaměřen na zvýšení bezpečnosti potravin eliminací tepelně vznikajících kontaminantů, podporovaného Agenturou na podporu výzkumu a vývoje SR na základě kontraktu APVV-COST 0015-06, APVV SK-CZ 0124-07, a také Agenturou Ministerstva školství SR pro strukturální fondy Evropské unie na základě smlouvy 011/2009/4.1/OPVaV.

Součástí této práce je také zhodnocení denního příjmu akrylamidu na základě posouzení výsledků získaných zpracováním údajů z dotazníku zaměřeného na běžně konzumované potraviny se zvýšeným obsahem akrylamidu.

2 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY AKRYLAMIDU

2.1 Charakteristika akrylamidu

Akrylamid (jeho strukturní vzorec je znázorněn na Obr. 1) je bílý krystalický prášek bez zápachu, jehož molární hmotnost je 71,08 g/mol [12]. Bod tání je 84,5 °C a vzniká hydratací akrylonitrilu [13]. Akrylamid je rozpustný ve vodě, methanolu, ethanolu, acetonu, acetaldehydu, heptanu a etheru. Akrylamid je stabilní. Na světle nebo při zahřátí na teplotu tání může polymerovat [12].



Obr. 1: Strukturní vzorec akrylamidu [12]

Jako polymer, který není toxický, má akrylamid [14] široké uplatnění např. při výrobě papíru, plastů, barviv, kosmetiky, v textilním průmyslu, či jako injektážní látka do betonu nebo jako flokulační činidlo pro čištění odpadních vod [15, 10]. Akrylamid má také významné uplatnění ve vědeckém výzkumu, především pro svou schopnost modifikovat SH skupiny ve strukturních a funkčních proteinech a jako polyakrylamidový gel je využíván v elektroforéze obzvláště pro separaci proteinů [13].

Akrylamid je klasifikován jako velmi toxický. Pravděpodobná orálně podaná smrtící dávka pro člověka je v rozmezí 50 - 500 mg/kg. Při krátkodobém vystavení dochází k dráždění očí, kůže a dýchací soustavy. Při dlouhodobé vystavení způsobuje akrylamid rakovinu u zvířat a může způsobit rakovinu kůže a plic u lidí, je také genotoxický a mutagenní [14, 16].

Hogervorst *et al.* [17, 18] zveřejnili studie poskytující první epidemiologické údaje, že příjem akrylamidu z potravin může zvyšovat riziko rakoviny u lidí. Byla zjištěna souvislost mezi zvyšujícím se rizikem rakoviny endometria a vaječníků se stoupajícím příjmem akrylamidu z potravin, zvláště u trvalých nekuřáků, a také spojitost s rakovinou ledvinových buněk. Rozdíly mezi celkovou skupinou a trvalými nekuřáky mohou být způsobeny modifikacemi kouřením nebo překrytím účinků potravního akrylamidu akrylamidem i eventuelně dalšími látkami v tabákovém kouři [17, 18].

V současnosti se předpokládá, že efektozem karcinogenního účinku akrylamidu při odhadech rakovinných rizik je genotoxické působení glycidamidu [18]. Vztah mezi příjmem akrylamidu a rakovinou endometria a vaječníků také naznačuje, že mechanismem vývoje rakoviny působením akrylamidu může být i porucha hormonální rovnováhy [17]. Akrylamid je reaktivní látka, která je schopna alkylovat amino- a sulfhydrylové skupiny v proteinech, což může vést ke změně bílkovinné funkčnosti a tím způsobovat rakovinu [19]. Aktivita nebo kapacita enzymů metabolismu akrylamidu může být vlivem nízkých dávek zvýšena nebo snížena, tudíž se detoxikace nebo vyloučení akrylamidu či glycidamidu u lidí může od zvířat lišit [17], proto hlodavci nejsou vhodným (kvantitativním) modelem pro hormonální efekty [18].

Průměrný příjem akrylamidu z potravin je přibližně v rozmezí 0,5 – 1,0 µg/kg tělesné hmotnosti na den [20, 19, 21], u dětí může být vyšší. Při pracovní vystavení je příjem asi 1 µg/kg/den a kouření cigaret zvyšuje příjem akrylamidu až na 3 µg/kg/den [20].

Jako důsledek antropogenních ale i přirozených procesů se akrylamid může vyskytovat v životním prostředí. Je též složkou cigaretového dýmu [22]. Do těla může být vstřebán kůží, inhalací a gastrointestinálním traktem [23]. Akrylamid má vysokou mobilitu v půdě a podzemní vodě, je biodegradovatelný. Některé mikroorganismy produkují enzymy, které katalyzují syntézu a biodegradaci akrylamidu. Např. *Rhodococcus rhodochrous* a mikroorganismy rodu *Nocardia* produkují enzymy umožňující tvorbu akrylamidu. Bakterie rodu *Rhodococcus* a *Klebsiella pneumoniae* produkují amidázu, která akrylamid odbourává [13].

2.2 Výskyt akrylamidu

Akrylamid není v žádné formě přidáván do potravin, proto může být jeho přítomnost způsobena buď kontaminací z vnějšího prostředí či kontaktem s obalovými materiály, nebo, což je pravděpodobnější, samotným vznikem akrylamidu v potravině během tepelné úpravy. Minimální obsah akrylamidu mohou být v potravinách zjištěna po použití akrylamidových polymerů a kopolymerů po dobu technologického zpracování potravin, nebo jako důsledek jejich použití v obalových materiálech potravin. Je ale nepravděpodobné, že by vysoký obsah akrylamidu v tepelně opracovaných produktech byly způsobeny jejich kontaktem s materiály, případně vodou nebo půdou obsahující polyakrylamid [22].

Akrylamid se vyskytuje především v tepelně opracovaných potravinách rostlinného původu s vysokým obsahem redukcujících sacharidů a nízkým obsahem proteinů. Stopy

akrylamidu se mohou nalézat i ve vařených potravinách, ale významně se nachází především v potravinách zpracovávaných při teplotách nad 120 °C. Nejvíce akrylamidu se vyskytuje ve výrobcích pečených, smažených nebo pražených, kdy klesá obsah vody a zvyšuje se teplota potravin [24].

Potravinami rostlinného původu bohaté na prekurzory akrylamidu jsou převážně brambory a obiloviny, naopak potraviny živočišného původu obsahují jen nízký obsah akrylamidu. Široké změny obsahu akrylamidu byly pozorovány nejen v různých potravinových kategoriích, ale i v různých značkách potravin ze stejné kategorie (Tab. 1) [13]. Zvláštní pozornost byla věnována především bramborovým produktům kvůli vysokému obsahu akrylamidu a konzumnímu poměru jako základní potraviny [25].

Tab. 1: Obsah akrylamidu ve vybraných potravinách dostupných na českém trhu [$\mu\text{g}/\text{kg}$] [26]

Název výrobku	Výsledek
Negrill, chléb vícezrný	33
Chléb slunečnicový	<LOD
Chléb Oligo Vital	49
Plnozrný norský bochník	33
Konzumní perník	1120
Konzumní perník	1582
Ovocný medovník	806
Zlaté ruměnky	698
Gold Fischli Sesam, crakerové pečivo	237
Úlker, sýrové crakerové pečivo sypané sezamem	368
Telka maková, pikantní slané crackery s mákem	585
Krit – canapé Mediterráneo Sésamo y Orégano trvanlivé crakerové pečivo s olivovým olejem, sezamem a oregánem	381
Telka bagety slané crackery se sezamem a mákem	287
Diabetické BeBe Dobré ráno kakao-oříškové	2561
Amaranth, sušenky s přírodním sladidlem a sladidlem	651
Čajové pečivo bez cukru – přidané sacharózy	278
Linecký dezert, slazený sorbitem	<LOD
Dadák Rocca Zlatá	258
Dadák, standardní směs	347
Jihlavanka standard	347
Krönung Premium	213

Název výrobku	Výsledek
Paloma	235
Golden Chips	739
Bohemia Chips	393
Lay's	1287
Bramborové lupínky smažené solené paseka	702
Bramborové lupínky smažené česnekové paseka	794
Rouskovy české brambůrky, solené	1066
Rouskovy české brambůrky česnekové	699

Pozn.: použitá analytická metoda GC/HR-TOF

Mez detekce (LOD) 10 µg/kg pro vzorky chipsů a trvanlivého pečiva, 15 µg/kg pro vzorky chlebů a obilných vloček, 30 µg/kg pro vzorky kávy

Procentický příjem akrylamidu z různých jídel v průběhu dne je přibližně: snídaně – 8 %, oběd – 21 %, večeře – 22 %, sladkosti a slané snacky – 13 % a káva – 36 % [13]. Vysoké přispění kávy k celkovému příjmu akrylamidu stojí za povšimnutí. Na základě zkoumání množství akrylamidu na 1 kg tělesné hmotnosti vyplývá z vystavených dat, že u dětí hrozí větší nebezpečí než u dospělých [13].

Podle současných znalostí o akrylamidu doporučuje FDA jíst vyváženou stravu, vybírat potraviny s nízkým obsahem tuku a bohaté na vlákninu a ovoce a zeleninu. FAO a WHO také doporučuje spotřebitelům, aby potraviny nebyly příliš dlouho zahřívány při vysokých teplotách. Ale doporučují potraviny dostatečně tepelně opracovat, zvláště maso a masné výrobky, aby došlo k likvidaci patogenních mikroorganismů [27].

2.3 Mechanismus vzniku akrylamidu v tepelně upravených potravinách

Publikované studie v roce 2002 odhalily, že významným reakčním mechanismem vedoucím ke vzniku akrylamidu v tepelně zpracovaných potravinách jsou Maillardovy reakce [28], během nichž dochází k tvorbě celé řady žádoucích sensoricky aktivních látek, ale i některých toxických sloučenin s mutagenními a karcinogenními vlastnostmi [22]. K tvorbě akrylamidu dochází zvláště v matricích bohatých na redukující sacharidy a asparagin, který přímo poskytne páteř molekuly akrylamidu [28]. Význam asparaginu jako jedné z reagujících složek rozpoznali Mottram *et al.* [29] a Stadler *et al.* [30]. Roli asparaginu jako prekurzoru

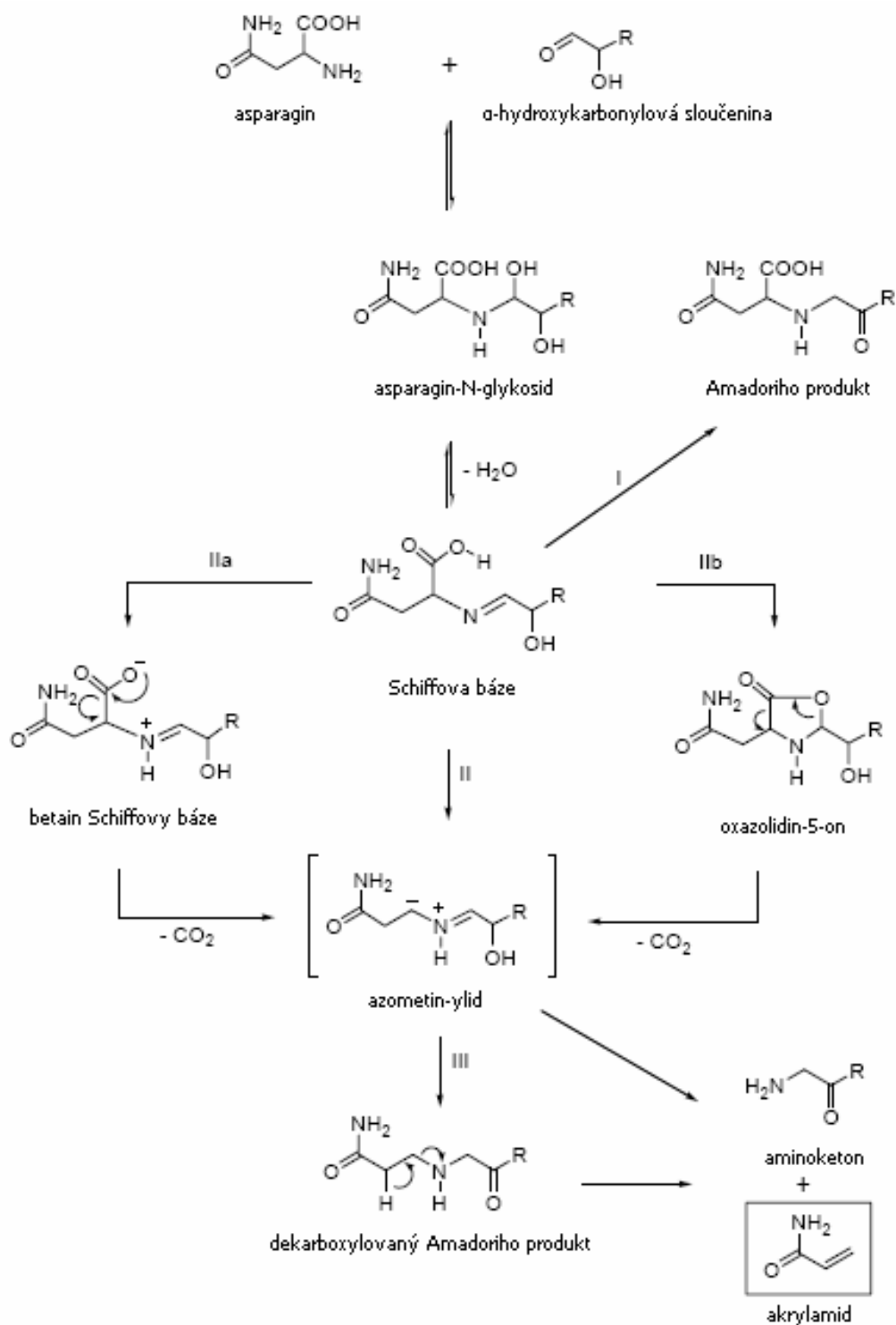
akrylamidu také potvrdili Becalski *et al.* [31]. V současnosti se předpokládá, že akrylamid může vznikat 4 následujícími způsoby:

- a) Reakcí asparaginu s karbonylovými sloučeninami (např. redukující sacharidy)
- b) Reakcí 3-aminopropionamidu s redukujícími sacharidy
- c) Reakcí asparaginu s lipidy
- d) Tvorbou akrylamidu z jiných aminokyselin [32]

2.3.1 Vznik akrylamidu reakcí asparaginu s karbonylovými sloučeninami

V tomto případě byly navrženy dva možné mechanismy vzniku akrylamidu jako důsledku Maillardových reakcí, kdy oba představují komplex paralelních i na sebe navazujících reakcí, přičemž v současné době nejsou zcela všechny meziprodukty známe [32].

Mottram *et al.* [29] předpokládali reakci asparaginu a α -dikarbonylových sloučenin za vzniku Streckerova aldehydu, jako hlavního prekurzoru akrylamidu. Ve druhém způsobu, který navrhli Stadler *et al.* [28], je hlavním prekurzorem akrylamidu asparagin-N-glykosid. Mechanismus je znázorněn na Obr. 2. Asparagin-N-glykosid vznikající reakcí asparaginu a karbonylové sloučeniny se při vyšších teplotách dehydratuje na Schiffovu bázi. Ve vodném prostředí může Schiffova báze hydrolyzovat za vzniku prekurzorů, nebo dochází k přesmyku na Amadoriho produkt (Obr. 2: Dráha I), který je jen málo významným prekurzorem tvorby akrylamidu [28].



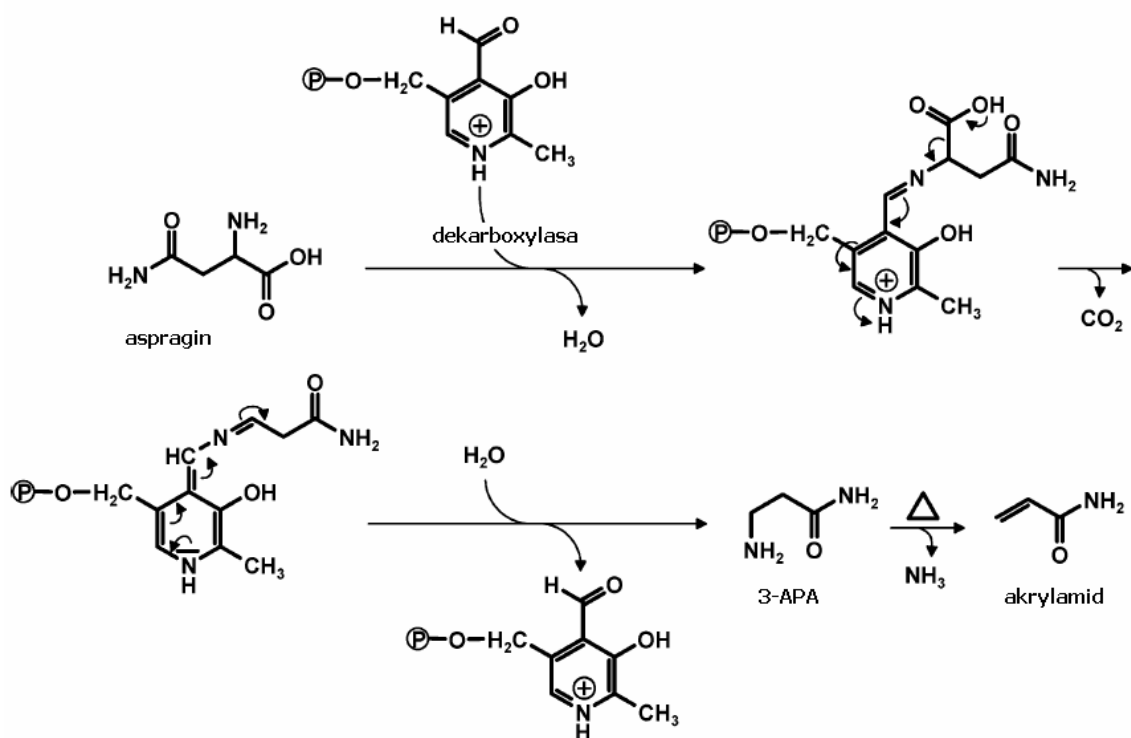
Obr. 2: Mechanismus vzniku akrylamidu reakcí asparaginu a karbonylových sloučenin [28]

Za vhodných podmínek dochází k dekarboxylaci Schiffovy báze na poměrně stabilní azometin ylid (Obr. 2: Dráha II). Ke vzniku azometin ylidu může docházet přes zwitteriony (Obr. 2: Dráha IIa), což je upřednostňováno v porovnání s klasickým Streckerovým degradačním mechanismem, nebo intramolekulární cyklizací Schiffovy báze přes

oxazolidin-5-on (Obr. 2: Dráha IIb). Ze stabilního azometin ylidu se následně po tautomerizaci a protonaci může generovat dekarboxylovaný Amadoriho produktu (Obr. 2: Dráha III) [28]. Podmínkou pro uskutečnění této reakce je přítomnost OH skupiny v β -poloze vůči atomu dusíku, proto α -hydroxykarboxylové sloučeniny generují více akrylamidu než sloučeniny α -dikarboxylové [32]. V důsledku β -eliminace a štěpení kovalentní vazby mezi uhlíkem a dusíkem vzniká z dekarboxylovaného Amadoriho produktu akrylamid a odpovídající aminoketon [28].

2.3.2 Vznik akrylamidu reakcí 3-aminopropionamidu s redukcí sacharidy

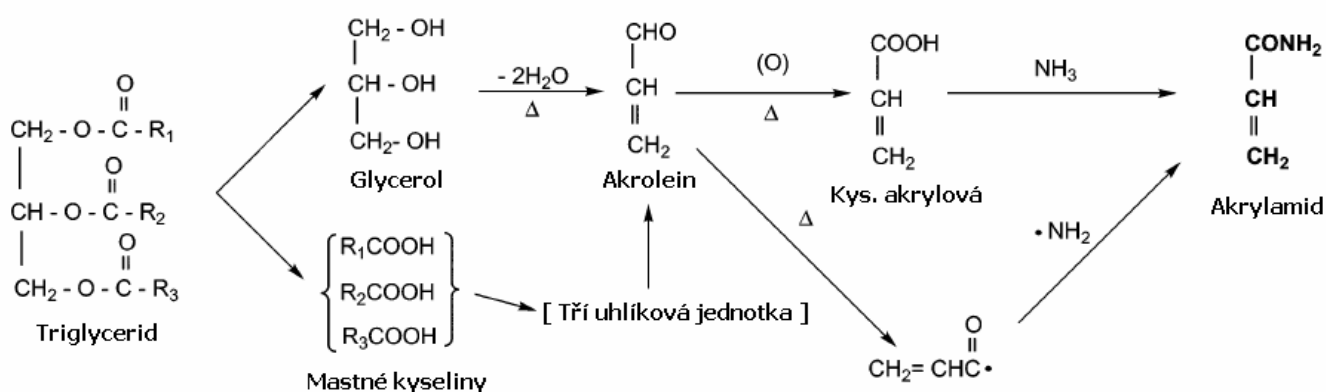
Publikace Zyzak *et al.* [3] ukazuje, že 3-APA je významným meziproductem při vytváření akrylamidu během tepelné degradace asparaginu [33]. 3-APA může být také v potravinách vytvořen enzymatickou dekarboxylací asparaginu, která je znázorněna na Obr. 3, a reakcí s redukcí sacharidy poskytovat vysoké výtěžky akrylamidu [32]. Podle výsledků Granvogla *et al.* [33, 34] poskytuje směs 3-APA a glukózy při teplotě 140 °C po dobu 20 minut až 800-násobně vyšší výtěžek akrylamidu než směs asparaginu a glukózy, což ukazuje na 3-APA jako velmi efektivního předchůdce akrylamidu.



Obr. 3: Enzymatická dekarboxylace asparaginu s pyridoxal fosfátem jako kofaktorem [33]

2.3.3 Vznik akrylamidu reakcí asparaginu s lipidy

Další možná hypotéza vzniku akrylamidu je z aminokyselin a lipidů. Za zvýšené teploty vzniká z lipidů velké množství akroleinu považovaného za významný prekurzor akrylamidu (Obr. 4) [35]. Akrolein může být také vytvořen z methionalu vzniklého Streckerovou degradací aminokyseliny methionin [32]. Následně dochází k oxidaci akroleinu na kyselinu akrylovou, která reakcí s amoniakem uvolněným z asparaginu poskytuje akrylamid [35]. Kyselina akrylová může vzniknout i při pyrolýze glukózy přes metylglyoxal [32] nebo může být vytvořena z kyseliny asparagové Maillardovými reakcemi [28].

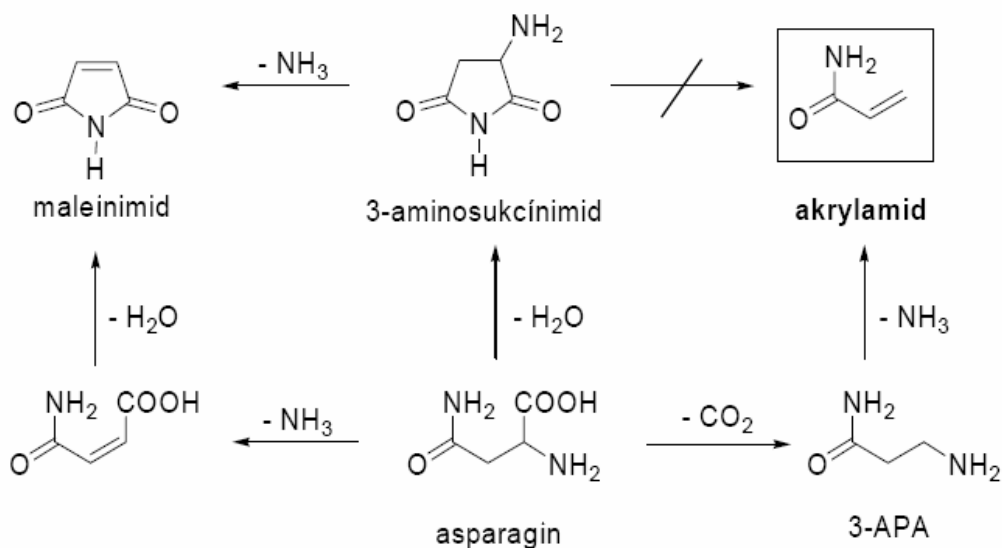


Obr. 4: Hypotetický mechanismus vzniku akrylamidu z lipidů [35]

S kyselinou akrylovou mohou za vzniku akrylamidu reagovat i jiné aminokyseliny, ale nejvýraznější tvorbě akrylamidu dochází při reakci s asparaginem. Pokud se kyselina akrylová nahradí akroleinem, poskytuje akrylamid jen asparagin, u jiných aminokyselin ke vzniku akrylamidu nedochází, což ukazuje, že oxidace akroleinu na kyselinu akrylovou je kritickým krokem v reakčním mechanismu [32].

2.3.4 Přímý vznik akrylamidu z aminokyselin

Ke vzniku akrylamidu může dojít přímo ze samotného asparaginu jeho termicky indukovanou dekarboxylací na 3-APA a následnou deaminací (Obr. 5). Přesto hlavní podíl akrylamidu vzniká pouze v přítomnosti redukcujících sacharidů. Bylo totiž prokázáno, že vznik akrylamidu podporují všechny karbonylové sloučeniny, ale asparagin sám upřednostňuje intramolekulární cyklizaci a tvorbu iminu před dekarboxylací a tvorbou akrylamidu [22, 32].



Obr. 5: Termická degradace asparaginu [22, 32]

Některé aminokyseliny mohou při tepelném namáhání poskytovat kyselinu akrylovou, která v přítomnosti amoniaku přechází na akrylamid [32]. Sohn a Ho [36] ukázali, že hlavním zdrojem amoniaku jsou asparagin, glutamin, cystein a kyselina asparagová.

Ke vzniku akrylamidu může docházet také při pyrolýze dipeptidu karnozinu (N-alanyl-L-histidin), přičemž při zahřívání samotného dipeptidu vzniká více kyseliny akrylové a akrylamidu než v případě modelového systému asparagin/glukóza srovnatelného se systémem karnozin/glukóza. Přesto v reálných potravinách obsahujících karnozin (v mase) dochází ke vzniku akrylamidu o mnoho méně, než v případě asparagin/redukující sacharid. To vedlo ke studiu jeho reakcí za využití modelového systému obsahujícího karnozin, lysin (reaktivní aminokyselina) a kreatin (významná složka masa) a jejich vlivu na množství vzniklého akrylamidu. Ukázalo se, že lysin ovlivňoval vznik akrylamidu a kyseliny akrylové jen nepatrně, ale kreatin nejen že významně redukoval obsah kyseliny akrylové, ale způsoboval i vznik dvou nových toxických komponentů N-methylakrylamidu a N,N-dimethylakrylamidu [32].

2.4 Možnosti eliminace akrylamidu

Vyhodnocení zdravotního rizika vedlo k doporučením, které by měli snižovat obsah akrylamidu v potravinách v zájmu ochrany zdraví [37]. Možnosti eliminace ale musí být navrženy všeobecně, protože je nezbytné počítat s rozdíly mezi recepty, postupy zpracování, zařízení, i s rozdíly mezi stejnými výrobky různých značek nebo dokonce i s odlišnostmi

jednotlivých výrobků stejné kategorii. Celkově bylo identifikováno 13 možných parametrů ovlivňující obsah akrylamidu v potravinách [38]:

- a) agronomický/genetický
 - obsah sacharidů
 - obsah asparaginu
- b) receptura
 - hydrogenuhličitan amonný
 - další vedlejší přísady (např. soli vápníku, glycin)
 - pH
 - zředění
 - změna výrobního procesu
- c) zpracování
 - fermentace (odbourání prekurzorů)
 - teplota/čas a kontrola obsahu vody
 - předběžná úprava
- d) finální úprava
 - konečná barva produktu
 - struktura/chuť
 - uskladnění výrobku/trvanlivost/úprava spotřebitelem [38]

2.4.1 Eliminace prekurzorů akrylamidu

Becalski *et al.* [39] publikovali výsledky ukazující, že obsah sacharidů a asparaginu významně ovlivňuje vznik akrylamidu. Výběrem potraviny s nízkým obsahem sacharidů či asparaginu může být obsah akrylamidu významně redukován i při použití standardních průmyslových postupů a teploty 180 °C [39].

Některé studie ukázaly, že úpravou zemědělské praxe lze dosáhnout změny obsahu prekurzorů akrylamidu v kulturních rostlinách již během pěstování. Elmore *et al.* [40] zkoumali vliv nedostatku síry na vznik akrylamidu v tepelně opracovaných bramborech. Odezvou byl nárůst obsahu volných aminokyselin v hlízách a také významné zvýšení obsahu sacharidů. I přesto byl obsah akrylamidu v hlízách s nedostatkem síry po tepelném opracování vždy nižší než u vzorků s dostatkem síry. Zvýšení obsahu asparaginu a sacharidů bylo kompenzováno zvýšením obsahu všech volných aminokyselin. Sacharidy tak mohly reagovat s jakoukoliv z přítomných aminokyselin a množství sacharidů přístupné pro reakci s asparaginem bylo nižší, což vedlo i ke snížení produkce akrylamidu. Z této studie vyplývá,

že snížením obsahu síry v hnojivech brambor lze dosáhnout snížení produkce akrylamidu během jejich zpracování. Problémem ovšem zůstává udržení složité rovnováhy mezi množstvím síry potřebné k dosažení kvalitní úrody a množstvím síry, které vede ke snížení obsahu akrylamidu. Nevýhodou jsou také změny obsahu aminokyselin v bramborách, protože tak může dojít k ovlivnění vůně nebo barvy produktu [40].

2.4.1.1 Minimalizace obsahu sacharidů

Redukující sacharidy jsou významným prekurzorem vzniku akrylamidu především u brambor. U obilovin je klíčovým determinantem spíše asparagin. Kontrola sacharidů je primárním bodem redukce úrovní akrylamidu v brambůrkách a smažených bramborových hranolkách. Snížení sacharidů v bramborách lze dosáhnout výběrem odrůd brambor s nižším obsahem redukujících sacharidů, vhodně zvolenými skladovacími podmínkami (pro dlouhodobé uskladnění je vhodná teplota $>6\text{ }^{\circ}\text{C}$) nebo sklízet pouze zralé hlízy, protože nezralé mají vyšší obsah sacharidů. Do budoucna je snaha o vyšlechtění odrůd brambor s nízkým obsahem redukujících sacharidů a optimalizace zemědělské praxe vedoucí k eliminaci redukujících sacharidů a asparaginu. Minimalizace obsahu redukujících sacharidů má vliv na výživové a organoleptické vlastnosti, proto musí být cílená vzhledem k postupu zpracování a charakteristice konečného výrobku (barva, chuť, atd.) [38].

2.4.1.2 Minimalizace obsahu asparaginu

Asparagin je aminokyselina nezbytná pro rostlinný růst, která je také kritickou složkou potravin vedoucí ke vzniku akrylamidu. Je proto vhodné volit odrůdy plodin s nízkým obsahem této aminokyseliny. Značné snížení asparaginu ale může mít nepříznivý dopad na některý z orgánů rostlin nebo vést ke změně jejich výživových vlastností [38].

2.4.2 Snížování obsahu akrylamidu změnou receptury

2.4.2.1 Minimalizace přídavku hydrogenuhličitanu amonného

NH_4HCO_3 podporuje formování cukerných fragmentů (glyoxal a methylglyoxal), které velice rychle reagují s asparaginem a poskytují tak vyšší výnosy akrylamidu než přirozeně se vyskytující redukující sacharidy za mírných podmínek. Nahrazení NH_4HCO_3 vhodným činidlem umožňuje relativně snížit obsah akrylamid v určitých obilných výrobcích. Pro dosažení ideální rovnováhy je často nutno použít kombinaci NH_4HCO_3 , NaHCO_3 a okyselovacího přípravku [38].

2.4.2.2 Použití vedlejších přísad

Přídavek volných aminokyselin jiných než asparagin k potravinové matici způsobuje značné snížení obsahu akrylamidu pravděpodobně konkurenční reakcí [41]. Použití glycinu vede ke snížení obsahu akrylamidu a zvýšení hnědnutí, ale má značný dopad na smyslové vlastnosti výrobku [38]. Claeys *et al.* [41] zjistili, že přidání lysinu do systému vedlo k významnému snížení obsahu akrylamidu, za což je nejspíše odpovědná vysoká reaktivita lysinu v Maillardových reakcích. Přídavkem cysteinu ke kontrolnímu systému lze dosáhnout ještě většího snížení než přídavkem lysinu. Reaktivita aminokyselin v Maillardových reakcích závisí na počtu atomů uhlíků a na bazicitě a polaritě molekuly. Obecně jsou zásadité aminokyseliny (např. lysin) v Maillardových reakcích více reaktivní, než neutrální nebo kyselé aminokyseliny [41].

K redukci vzniku akrylamidu v bramborách je možné použít i soli vápníku. Smyslové testy předpokládaly dobrou přijatelnost, ale při průmyslovém použití byl výrobek velice křehký a doprovázen hořkými pachy. Proto se využití vápníku nadále zkoumá [38].

Obsah akrylamidu vytvořeného z asparaginu může být ovlivňována i různorodostí monosacharidů. Celková reaktivita sacharidů při vzniku akrylamidu klesá od glukózy přes fruktózu k sacharóze a se stoupající teplotou. Nižší výnosy akrylamidu ze sacharózy v porovnání s glukózou a fruktózou mohou být přisuzovány skutečnosti, že sacharóza je neredukující sacharid a jako takový nemůže s asparaginem reagovat přímo za vzniku akrylamidu, ale musí být převedena na reaktivní karbonylovou směs [42]. Nevýhodou nahrazení redukcí sacharidů sacharózou je ztráta požadované barvy [38].

2.4.2.3 Eliminace akrylamidu změnou pH

pH je důležitým faktorem působícím na rozsah vzniku reakčních produktů [43]. Podle Elmore *et al.* [44] a Jung *et al.* [45] má snížení pH ze 7 na 4 za následek 99,1 % pokles obsahu akrylamidu v kontrolním systému (asparagin – glukóza) po tepelném zpracování při 150 °C po dobu 30 minut. To lze vysvětlit zvýšeným obsahem H^+ při nižším pH, což má za následek vyšší obsah protonované aminoskupiny asparaginu. Vznik akrylamidu bude tedy zablokovaný, protože pro první krok vzniku akrylamidu Maillardovými reakcemi je potřebná nukleofilní neprotonovaná aminoskupina asparaginu [46].

Výsledky těchto experimentů kladou důraz na kontrolu pH potravin, které může kolísat. To je zvláště důležité u přísad modifikujících pH. Z toho důvodu je vhodnější používat je v neutrální formě [43]. Ke snížení pH potravin lze v praxi použít kyselinu citrónovou nebo

vinnou. Může ale dojít k ovlivnění vlastností konečného výrobku, jako je kyselá chuť nebo nedostatečné hnědnutí [38].

2.4.2.4 *Substituce složek potravin*

Nižších výnosů akrylamidu se dá také dosáhnout částečným nahrazením součástí potravin méně reaktivními složkami např. u chleba nebo bramborových výrobků lze použít obiloviny s nižším obsahem asparaginu. V závislosti na volbě substitučního materiálu je nutné zohlednit možnost změny složení produktu a charakteristických vlastností [38].

2.4.2.5 *Změna výrobního procesu*

Podle studií z Německa může mít také změna výrobního procesu vliv na obsah akrylamidu v konečném výrobku. Tento vliv ale doposud nebyl prokazatelně potvrzen. I přesto lze pro řadu potravin použít nejrůznější výrobní postupy i receptury a výrobci by tak měli testovat každý případ [38].

2.4.3 *Zpracování jako prevence vzniku akrylamidu*

2.4.3.1 *Fermentace*

Fermentací lze redukovat prekurzory akrylamidu a snížit pH, ale pro potraviny z brambor ji nelze v praxi aktuálně využít vzhledem k současným výrobním procesům. Na protě tomu u výrobků z obilovin je kvašení velice významným krokem vedoucím k nižším úrovním obsahu akrylamidu a je vhodné tento krok do výrobního procesu zařadit, případně prodloužit dobu kvašení, protože delší kvašení pomocí droždí (kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*) účinně redukuje obsah asparaginu. Během kvašení dochází k mírnému nárůstu fruktózy, která je ale následně rovněž kvasinkami zpracována. Je také velice vhodné použití kvasnic se sníženou produkcí plynu. Pro zachování stejného celkového plyn-generačního poměru je nutné užít více kvasnic, což má za následek rychlejší rozkládání asparaginu [38].

2.4.3.2 *Ovlivnění poměru teplota/čas a kontrola obsahu vody*

Formace akrylamidu během pečení výrobků je těsně vázána na obsah vody a kombinaci teplot a doby pečení. Obsah vody má výrazný vliv na aktivační energii hnědnutí a formace akrylamidu. Při nízkém obsahu vody je aktivační energie formace akrylamidu mnohem větší, je tedy snaha o co nejvyšší, ještě přijatelný obsah vody v konečném výrobku [38]. Malým zvýšením konečného obsahu vody (z 1 % na 2 %) dochází ke snížení obsahu akrylamidu v bramborových lupínkách [47].

Poměr teploty a času je spíše než samotná teplota kritickým bodem ovlivňujícím vlastnosti výrobku. Pro minimalizaci vzniku akrylamidu je doporučováno provádět tepelnou úpravu potravin při nižší teplotě a to i přesto že dochází k prodloužení doby pečení. Nevýhodou je snížení barevného vývoje [38]. Také bylo zjištěno, že při tepelném zpracování potravin okolo 200 °C (např. pražení) je nárůst obsahu akrylamidu následován rychlým snížením, které může být vysvětleno jeho reaktivností. Experimentální pozorování a kinetický model naznačují, že akrylamid není konečným produktem Maillardovy reakce. Je možné, že dále polymeruje nebo působí v Michaelově adiční reakci [37].

Pro dosažení minimalizace vzniku akrylamidu lze použít i alternativní technologie tepelného opracování jako je infračervený ohřev nebo pečení pomocí vodní páry. Infračervený ohřev je vhodný zvláště pro ploché výrobky (např. koláč, chléb), kdy dochází ke snížení až o 60 % při zachování sensorických vlastností. I použití pečení pomocí páry ve finálním kroku pečení umožňuje snížení obsahu akrylamidu a to o 40 % při zachování smyslové kvality [38].

2.4.3.3 Předběžná úprava

U smažených bramborových hranolků je velice významné blanšírování, které umožňuje kontrolovat obsah redukujících sacharidů (odstranění nebo přidávání) pro požadovanou úroveň zbarvení konečného výrobku a tím i obsah akrylamidu [38]. V praxi se používají různé teploty blanšírovací vody a postupy s využitím jednoho, dvou nebo tří předvářečů [48]. K zabránění odbarvování neuvařených hranolků lze zabránit přidáním kyselého pyrofosforečnanu sodného ihned po blanšírování k bramborovým hranolkům, jehož vedlejším účinkem je redukce obsahu akrylamidu snižováním pH [38].

Během přípravy potravin je možné použít i asparaginázu, která významně napomáhá snížení obsahu akrylamidu zvláště za zvýšené teploty u systému s vysokým obsahem vody a neutrálním pH [38].

2.4.4 Finální úprava potravin minimalizující vznik akrylamidu

2.4.4.1 Barva potravin

Hlavním konečným produktem Maillardových reakcí jsou melanoidy. Tyto hnědé polymery mají významný vliv na kvalitu potravin, protože barva je důležitým potravinovým atributem a klíčovým faktorem pro přijetí spotřebitelem. Barva potravin bývá obvykle měřena

v jednotkách $L^* a^* b^*$, což je mezinárodním standardem pro měření barvy, přijato komisí Internationale d'Eclairage (CIE) v roce 1976 [49].

Gökmen *et al.* [49] pozorovali, že změny v obsahu akrylamidu a červeném parametru a^* během zahřívání při vyšších teplotách sledovaly typický kinetický model, v němž je počáteční nárůst po dosažení maxima následován snížením. Podobnost mezi změnami v obsahu akrylamidu a červeném parametru a^* v průběhu zahřívání ukázala, že barva může být spolehlivým indikátorem obsahu akrylamidu v tepelně opracovaných potravinách [49].

Pro snížení obsahu akrylamidu se doporučuje tepelně upravovat výrobek pouze do dosažení zlatavé barvy. U brambůrků je také vhodné odstranit tmavé lupínky. U některých výrobků může být barva významnou senzoricou vlastností a atribut pro spotřebitelské přijetí, proto ne vždy je možné toto aplikovat [38].

2.4.4.2 Struktura a chuť

Do vybraných výrobků (např. perníku) jsou pro dosažení požadované chuti záměrně přidávány redukující sacharidy. Tyto výrobky pak obsahují vyšší obsah akrylamidu. Pokud by se redukující sacharidy nepřidaly došlo by sice ke snížení obsahu akrylamidu, ale na úkor chuti. Výrobky pečené při vysoké teplotě a s nízkým obsahem vody pro dosažení křehkosti mají také vyšší obsah akrylamidu. Pro eliminaci akrylamidu je vhodné snížit teplotu a to i přesto, že dojde k prodloužení doby pečení [38].

2.4.4.3 Skladování, trvanlivost a zpracování potravin spotřebitelem

Bylo prokázáno, že při uskladnění syrových bramborových hranolů při 4 °C došlo ke zvýšení obsahu redukujících sacharidů oproti stejnému produktu skladovaného zmražením. To je pravděpodobně způsobeno zbytkovou aktivitou enzymu α -amyláza, který může pomalu uvolňovat redukující sacharidy i během skladování při nízkých teplotách. U balené pražené kávy naopak dochází během dlouhodobějšího skladování ke snížení obsahu akrylamidu. To je dáno reakcí závislou na teplotě. Akrylamid pravděpodobně interaguje s kávovou maticí doposud neznámým mechanismem, a nepřechází tak po uvaření do nápoje, ale zůstává vázaný v kávové sedlině [38].

Samotným spotřebitelům se doporučuje pro předejití vzniku významnějšího obsahu akrylamidu tepelně upravovat potraviny jen do zlatavého zbarvení [38].

2.5 Vliv anorganických solí na vznik a eliminaci akrylamidu v tepelně upravených potravinách

Formace akrylamidu může být značně omezena některými přísadami. Nedávné studie prokázali, že NaCl, který je běžnou složkou potravin, má inhibiční účinky na tvorbu akrylamidu [50]. Studie byly prováděny smísením modelové směsi asparagin/glukóza s přidávkou 0, 1, 5 a 10 % NaCl a zahříváním na teplotu 171,1 °C po dobu 10 minut. Následně byl stanovován obsah akrylamidu metodou GC/MS [51]. Výsledky, zobrazené v Tab. 2, prokázaly inhibiční účinek NaCl na tvorbu akrylamidu ve všech směsích [52].

Tab. 2: Obsah akrylamidu v modelové směsi asparaginu a D-glukózy s přidávkou NaCl [52]

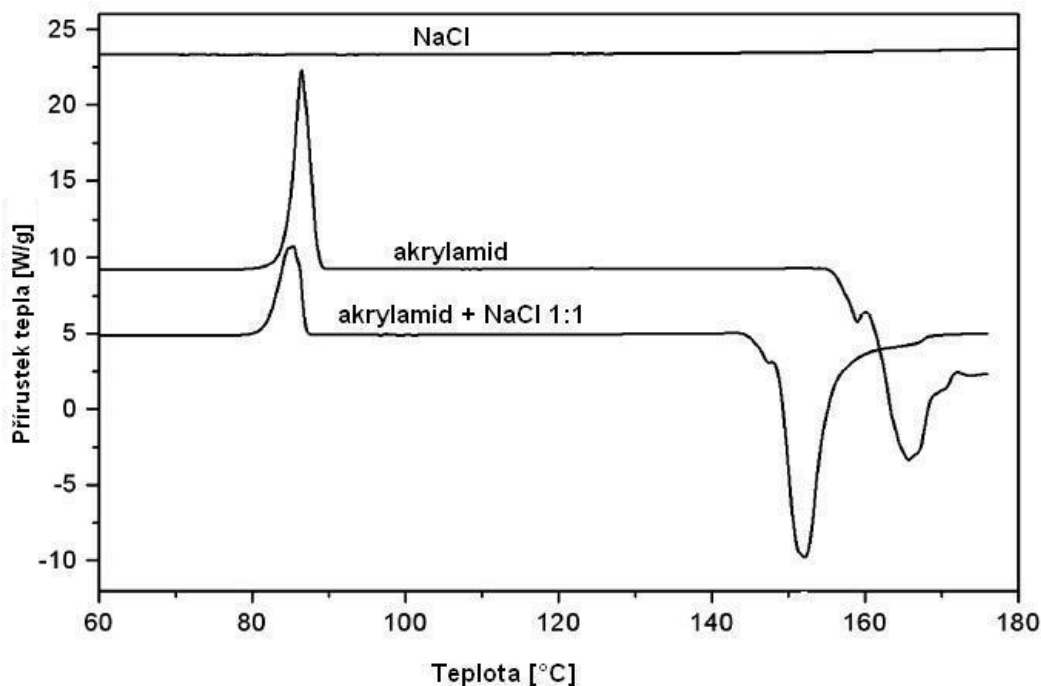
Přídavek NaCl	0 % n = 27	1 % n = 27	5 % n = 27	10 % n = 27
Průměrný obsah akrylamidu [μg akrylamidu/g směsi]	267	181	171	160
Směrodatná odchylka [μg akrylamidu/g směsi]	30	9	10	22
Relativní směrodatná odchylka [%]	11	5	6	14
Relativní obsah akrylamidu [%]	100	68	64	60

n – počet analyzovaných vzorků

Velmi důležité je, že efektivní snížení obsahu akrylamidu až o 32 % bylo pozorováno již po přidání 1 % NaCl, což lze využít v technologických procesech potravinářského průmyslu, protože obsah NaCl okolo 1 % reprezentuje jeho běžný obsah v mnoha potravinářských výrobcích. Na druhé straně rozdíl mezi přidávkou 1 a 10 % NaCl již není tak značný, obsah akrylamidu se liší o 8 %. Snížení obsahu akrylamidu není lineární, závislost je hyperbolická – limitní hodnoty přidavku NaCl dosahuje nad 10 % [51, 52].

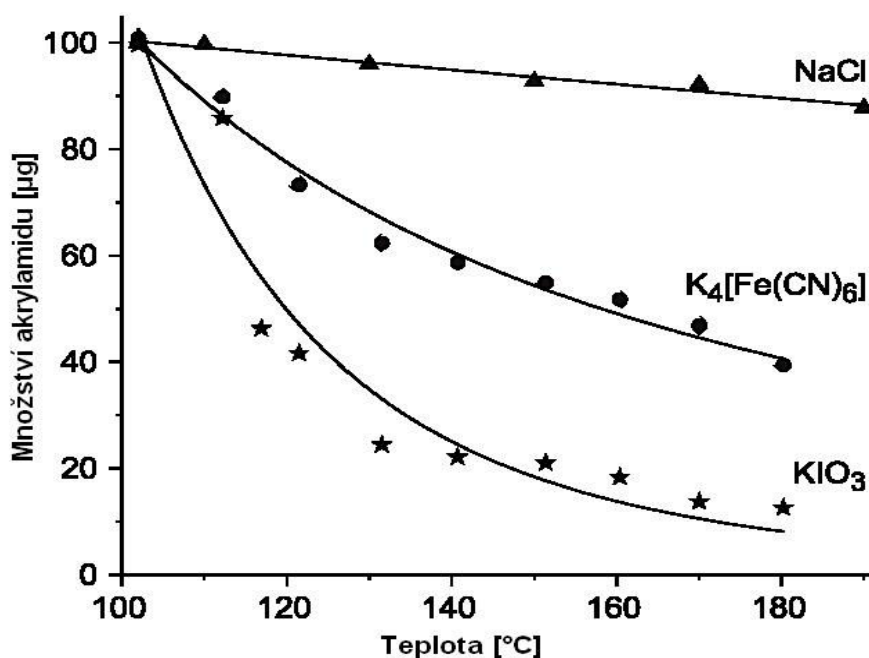
Ilustrační pohled na chování akrylamidu během zahřívání i na přítomnost další složek nám může poskytnout DSC. Na DSC záznamu (Obr. 6) je vidět, že ve vybraném rozmezí teplot je NaCl inertní. DSC záznamy čistého akrylamidu jsou tvořeny dvěma vrcholy. První pík (endotermický) s vrcholem při 83 °C odpovídá bodu tání akrylamidu. Druhý pík (exotermický) s vrcholem při 156 °C odpovídá polymeraci. DSC záznam směsi akrylamidu a NaCl také ukazuje pík představující bod tání. Začátek druhého exotermického píku je

posunutý na 144 °C. NaCl tedy snižuje počáteční teplotu polymerace akrylamidu o 12 °C v porovnání s teplotou polymerace čistého akrylamidu [51, 53].



Obr. 6: DSC záznamy NaCl, akrylamidu a směsi akrylamidu a NaCl (1:1), teplotní nárůst je 10 K/min [53]

První pokusy eliminace akrylamidu byli prováděny pouze s chemicky čistým NaCl, ale účinek této soli nebyl až tak výrazný. K intenzivnějšímu snížení obsahu akrylamidu přispěly další dvě látky: $K_4[Fe(CN)_6]$ a KIO_3 . Obě tyto látky značně zesilují účinek NaCl na snížení obsahu akrylamidu v potravinách. Za stejných experimentálních podmínek došlo ke snížení obsahu akrylamidu pomocí $K_4[Fe(CN)_6]$ o 61 % a pomocí KIO_3 o více než 88 % (Obr. 7). Z praktického hlediska jsou tyto poznatky velice důležité, protože obě tyto látky se používají při výrobě kuchyňské soli jako její přísady. $K_4[Fe(CN)_6]$ je povolený pro použití v potravinářském průmyslu a jeho číslo je v mezinárodním číselném systému 535. Stejně číslo má i v evropské potravinářské legislativě, kdy je možné jej přidávat ke kuchyňské soli v množství až 20 mg/kg jako protihrudkující látka, protože absorbuje vodu a předchází tak vzniku shluků zhoršující sypkost kuchyňské soli. KIO_3 se v některých zemích používá namísto KI pro jodaci kuchyňské soli v množství až 35 mg/kg, protože jodid může při vlhkých podmínkách působením kyslíku oxidovat na jód a postupně sublimovat ven ze soli. Navíc lze KIO_3 použít jako zrající činidlo během pečení [50].



Obr. 7: Pokles obsahu akrylamidu zahřátého v přítomnosti anorganických solí [50]

Snížení obsahu akrylamidu lze dosáhnout i pomocí solí vápníku. Laboratorní výzkum prokázal pokles obsahu akrylamidu v bramborových lupínkách přímým působením vápenatých solí, nikoliv jeho vlivem na pH. Podle sensorických testů je použití vápníku v potravinách přijatelné, bohužel ale bylo zjištěno, že při průmyslovém použití může být výrobek velice křehký a doprovázen pronikavým zápachem [38].

Naproti tomu lze snížení obsahu akrylamidu vápníkem využít především u obilných výrobků, kdy v porovnání s běžně fortifikovanými moukami (0,3 % CaCO₃) vedl přídavek 1 % CaCl₂ do chlebového těsta k 35 % snížení obsahu akrylamidu. Vhodné je také působení Ca²⁺ jejich uvolněním z pečící formy, což umožňuje eliminaci akrylamidu vytvářeného v kůrce pekařského výrobku [38].

Další studie ukázaly, že vznik akrylamidu lze také významně ovlivnit použitím hydrogenuhličitanových a uhličitanových solí. Bylo zjištěno, že přídavek NaHCO₃ (rozmezí 1,0 – 2,8 %) v porovnání k modelovému systému (směs vody a pšeničné mouky) představující těsto na sušenky vedlo k výraznému potlačení vzniku akrylamidu oproti systému bez přídavku NaHCO₃. Také použití KHCO₃ v ekvivalentním množství vedlo podobně ke snížení obsahu akrylamidu, i když né tak výraznému. Zpočátku bylo předpokládáno, že NaHCO₃ eliminoval akrylamid v pečených sušenkách zvýšením pH, protože přidáním 2,8 % NaHCO₃ došlo ke zvýšení pH z 6,3 na 8,5. Změnou pH tak mohla být potenciálně ovlivněna řada jiných reakcí.

Studií změny pH z 6,3 na 7,4 a 8,3 pomocí 0,19 g a 0,42 g NaOH bylo zjištěno, že zvýšení pH má zanedbatelný vliv. Změna pH byla významná až při zvýšení na 9,6 a 10,5 [54].

Naopak použití NH_4HCO_3 mělo zcela odlišný vliv. V tomto případě nedošlo k snížení obsahu akrylamidu v systému, což ostře kontrastuje s výsledky získanými při použití NaHCO_3 a KHCO_3 . Amrein *et al.* [55] a Biedermann *et al.* [56] zjistili, že NH_4HCO_3 významně zvyšuje obsah akrylamidu v receptech obsahující přidaný sacharid. Při testování NH_4HCO_3 na systému voda/pšeničná mouka bez přidaného sacharidu nedošlo k výraznému zvýšení obsahu akrylamidu [54].

2.6 Vliv antioxidantů na vznik a eliminaci akrylamidu v tepelně upravených potravinách

Novou a možnou metodou pro snížení obsahu akrylamidu v potravinové matrici je působení antioxidantů, která ale prozatím nebyla dostatečně popsána. Fernandez *et al.* [57] studovali snížení obsahu akrylamidu přidáním koření obsahujícího flavonoidy. Dodatek flavonoidů vedl ke snížení obsahu akrylamidu asi o 50 %. Hedegaard *et al.* [58] potvrdili eliminační účinek rozmarýnu.

Jako přirozený antioxidant pro snížení obsahu akrylamidu byl prvně použit antioxidant bambusových listů (dále jen AOB) [59]. AOB je světle hnědý prášek získaný extrakcí z bambusových listů a je bezpečný při požití. AOB je značně antioxidačně aktivní a zastavuje řetězové reakce při autooxidaci tuků nebo syntetické reakce nitrosaminů. Hlavní funkční součásti v AOB jsou flavonoidy, laktony a fenolové kyseliny. Nejdůležitější skupinou zastupující flavonoidy v AOB jsou C-glykosidy. Postupně byl AOB uveden v národních standardech pod označením GB-2760, jako druh potravinového antioxidantu v Číně [60].

Zhang *et al.* [60] demonstrovali účinek AOB na snížení obsahu akrylamidu během tepelného zpracování. Vzorky bramborových lupínků a smažených bramborových hranolků byly ponořeny do roztoků s různým obsahem AOB. Po usmažení byl obsah akrylamidu stanoven metodou LC-MS/MS [60]. Z výsledků vyplynulo, že obsah akrylamidu se pozvolna snižuje s prodlužující se dobou ponoření vzorku do roztoku AOB. Tato změna pravděpodobně souvisí se změnou obsahu prekurzorů akrylamidu v potravinové matrici. Při máčení nejspíše dochází k vyluhování těchto prekurzorů, což vede ke vzniku nižšího obsahu akrylamidu [60].

Během krátké doby máčení (< 60 s) vzorku v roztoku AOB nedošlo k významné změně obsahu akrylamidu, protože AOB plně neprostoupil do matrice. Pokud ovšem máčení vzorku

trvalo déle než 60 s, byly pokles obsahu akrylamidu v matrici nižší s prodlužující se dobou. Výsledky rovněž ukázaly, že u vzorků s relativně dlouhou dobou máčení se zvyšuje jejich obsah vody, což také může ovlivňovat pokles obsahu akrylamidu. Obsah vody v bramborovém materiálu před smažením je nepřímě úměrný obsahu akrylamidu, protože olej obklopující vzorky vytváří bariéru zabraňující úniku vlhkosti z povrchu vzorku [60].

Z výsledků také vyplývá, že u jednotlivých vzorků dochází při použití roztoku AOB o stejné koncentraci k rozdílnému poklesu obsahu akrylamidu. Proto je nutné volit vhodnou koncentraci roztoku AOB pro dosažení co největšího snížení obsahu akrylamidu v závislosti na druhu vzorku. U vzorku bramborových lupínků byla nejúčinnější koncentrace AOB 0,1 %. Oproti tomu u vzorku smažených bramborových lupínků byla neúčinnější koncentrace 0,01 %. Tyto výsledky pravděpodobně souvisejí se základními vlastnostmi antioxidantů a antioxidační aktivitou potravinových matric, které jsou nazývány jako “antioxidační paradox” [60]. Summa *et al.* [61] objevili vztah mezi obsahem akrylamidu a aktivitou antioxidantu a demonstrovali, že kombinované podmínky včetně dlouhé doby pečení, vysokého obsahu bílkovin ve vzorcích a nízkém obsahu vody mohou současně zvyšovat obsah akrylamidu i aktivitu antioxidantu. Přesto všechno bylo prokázáno, že při ošetření vzorků AOB dochází k poklesu obsahu akrylamidu ve srovnání se vzorky bez jakéhokoliv ošetření [60].

Při studiu možnosti snížení obsahu akrylamidu použitím exogenních chemických látek je důležité, aby bylo dosaženo podstatného snížení při udržení sensorických vlastností. Proto při sledování změny obsahu akrylamidu ve vzorcích ošetřených AOB byla prováděna i sensorická analýza. Křehkost a vůně vzorků se v porovnání s kontrolními vzorky nijak významně nelišila při použití koncentrace AOB < 0,5 %, zatímco ke změně barvy nedocházelo při rozsahu 0,001 - 0,05 %. V současnosti bylo nalezeno několik možností, jak snížit obsah akrylamidu vzniklého během tepelného zpracování, ale sensorické hodnocení nebylo zcela příznivé nebo dokonce nepřijatelné. Je velice důležité dosáhnout rovnováhy mezi snížením obsahu akrylamidu a sensorickou akceptovatelností. [60]

Také byl zkoumán účinek methanol-voda (4:1, v/v) extraktů koření na vznik akrylamidu, jako vztah mezi obsahem akrylamidu a antioxidační kapacitou těchto extraktů. Extrakty koření (nové koření, pepř černý, majoránka, oregáno) byly před zahříváním přidány k modelovému systému představujícímu bramborovou matrici. Analýza následně ukázala, že dodatek extraktu koření vedl k významnému snížení obsahu akrylamidu. K nejvýraznějšímu snížení došlo při použití extraktu nového koření a to až o 75 %. Extrakty z oregána a majoránky eliminovaly akrylamid o 60 % a extrakt z pepře černého o 50 % [59].

Mechanismus působení antioxidantů není prozatím vysvětlen. Hypotézou je, že dodání antioxidantů ovlivňuje mechanismus vzniku akrylamidu z akroleinu, který vzniká degradací lipidů, a z něhož oxidací vzniká kyselina akrylová. V přítomnosti zdroje dusíku a za vhodných reakčních podmínek vzniká z kyseliny akrylové akrylamid. Antioxidanty pravděpodobně do jisté míry blokuji oxidaci akroleinu a tím snižují vznik akrylamidu. Tato hypotéza ale nemůže být uplatněna v případě nepřítomnosti tuků. Alternativním mechanismem může být vzájemné ovlivňování fragmentů sacharidů s konjugovaným systémem polyfenolů, které tak odstraňují volné fragmenty sacharidů, jenž by mohly vést ke vzniku akrylamidu [59].

2.7 Použití asparaginázy na eliminaci prekurzorů vedoucích ke vzniku akrylamidu v tepelně upravených potravinách

Množství volného asparaginu velmi významně ovlivňuje obsah akrylamidu v konečném výrobku. Bylo zjištěno, že dodatek 250 mg asparaginu k 1 kg směsi pro výrobu perníku vedl ke zvýšení obsahu akrylamidu až 4x. Při přidání 1000 mg/kg se obsah akrylamidu zvýšil na >8000 µg/kg, přičemž barva produktu byla jen o málo tmavší než u standardního perníku. Z toho vyplývá, že odbourání asparaginu před tepelnou úpravou zamezuje vzniku akrylamidu [55]. Protože amidová skupina postranního řetězce asparaginu je včleněna do amidové vazby akrylamidu, je vhodné eliminovat asparagin odbouráním této amidové vazby hydrolýzou a to buď použitím kyseliny nebo enzymu. Způsob jak vykonat toto specificky pro asparagin je použít enzym asparagináza, který katalyzuje hydrolýzu asparaginu na kyselinu asparagovou a amoniak [3]. Vědci z Novozymes [62] také ukázali, že asparagináza může hydrolyzovat i glutamin, ale žádné jiné volné aminokyselinové zbytky uvnitř proteinu nebo peptid.

Zyzak *et al.* [3] testovali účinnost asparaginázy na redukci formace akrylamidu v bramborové kaši tepelně upravené mikrovlnným ohřevem, kdy úprava vzorku asparaginázou před tepelným opracováním vedla ke snížení asparaginu o 88 % a tím ke snížení obsahu akrylamidu o víc než 99 % v porovnání se vzorky zpracovávanými stejným způsobem bez použití asparaginázy. Amrein *et al.* [55] zjistili, že po použití asparaginázy obsahoval vzorek perníku 228 µg/kg akrylamidu, to odpovídalo redukci obsahu akrylamidu o 55 % vzhledem k vzorku neošetřeného asparaginázou. Chuť i barva zůstaly prakticky stejné, což je velikou výhodou tohoto přístupu k redukci obsahu akrylamidu. Analýza vzorku těsta po použití asparaginázy ještě před tepelným opracováním ukázala, že vzorek obsahoval 22 mg/kg

asparaginu. Bylo tedy degradováno přibližně 75 % volného asparaginu. Neúplná hydrolýza byla pravděpodobně dána maximální pohyblivostí enzymu a substrátu uvnitř těsta [55].

Pedreschi *et al.* [48] zkoumali účinek asparaginázy na formaci akrylamidu ve smažených bramborových hranolkách vyrobených z brambor obsahující 14,6 g/kg asparaginu a 17,6 g/kg glukózy. Syrové bramborové hranolky byly máčeny v 10 000 ANSU/l roztoku asparaginázy, následně byly sušeny při 85 °C po dobu 10 minut a částečně smaženy 1 minutu při 170 °C. Poté byly zmrazeny při -30 °C na 2 dny a usmaženy při 175 °C během 3 minut. V hranolkách máčených při 40 °C po dobu 20 minut došlo ke snížení obsahu akrylamidu o 30 %, u hranolků máčených při 50 a 60 °C po dobu 10 minut došlo ke snížení jen o 20 % a 22 %. Naproti tomu u hranolků, které byly před máčením v roztoku enzymu blanširovány 10 minut při 75 °C došlo k výraznějšímu snížení obsahu akrylamidu. U blanširovaných hranolků máčených v roztoku asparaginázy po dobu 20 minut při 40 °C došlo ke snížení obsahu akrylamidu až na 483 µg/kg. V porovnání s hranolkami neošetřenými asparaginázou obsahující 1264 µg/kg došlo ke snížení o 62 %. U blanširovaných hranolků máčených 10 minut při 50 a 60 °C byl obsah akrylamidu redukován o 34 % a 33 % [48].

Optimální teplota aktivity asparaginu při pH 7 je 60 °C, při teplotách nad 60 °C se aktivita enzymu rychle snižuje, proto je rozsah teplot mezi 40 – 60 °C vhodnější. Ale při teplotách 50 a 60 °C vedlo ošetření asparaginázou k nižší degradaci asparaginu. To může být způsobeno tím, že doba ošetření je natolik dlouhá, až dochází k inaktivaci enzymu. Nejlepších výsledků ošetření asparaginázou bylo dosaženo při 40 °C po dobu 20 minut [48].

Předúprava brambor tepelným opracováním jako je blanširování, způsobuje změnu ve struktuře bramborových hranolků, což může zlepšit rozptyl asparaginu směrem k roztoku asparaginázy obklopující hranolky. Blanširování pravděpodobně způsobuje mikrostrukturní změny v tkáni brambor a to urychluje kontakt asparaginu a asparaginázy [48].

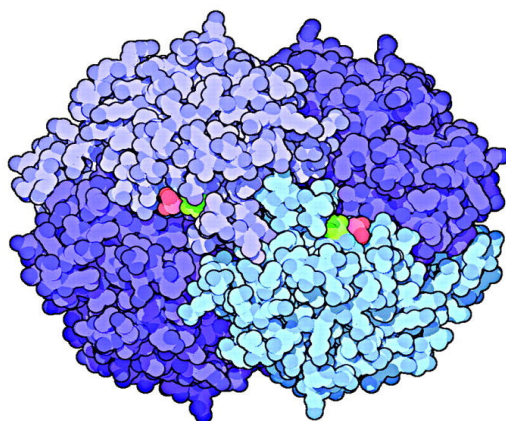
Pedreschi *et al.* [48] ukázali, že ošetření hranolků vařením (75 °C, 10 minut) a použití asparaginázy nemělo významný vliv na eliminaci glukózy, která je také důležitým prekurzorem akrylamidu. Na druhé straně bylo tímto ošetřením dosaženo značného snížení asparaginu [48].

Asparagináza je v současnosti komerčně dostupný enzym. Její využití k eliminaci formace akrylamidu závisí na ochotě výrobce upravit výrobní proces. Cena ošetření asparaginázou závisí na optimalizaci poměru času/teploty/dávkování. Náklady mohou být sníženy opětovným využitím enzymu. Navíc obsah asparaginázy v roztoku je natolik nízký, že nedochází k ovlivnění kvality odpadní vody [48].

Úspěšné experimenty použití asparaginázy k eliminaci vzniku akrylamidu naznačují, že i další enzymy mohou být účinné v modifikování předchůdců akrylamidu, včetně komerčně dosažitelné glukózooxidázy, která katalyzuje oxidaci glukózy. Jednou z možností by mohlo být i využití tzv. akrylamidinázy (nebo dalších enzymů) umožňující hydrolyzu akrylamidu v potravinách na kyselinu akrylovou a amoniak nebo jinak metabolizované molekuly pro nereaktivní a bezpečné produkty. I když takovéto enzymy nejsou momentálně k dispozici, mohli by být připraveny technikami rekombinantní DNA [63].

2.8 Charakteristika enzymu L-asparaginázy

L-Asparagináza, nebo-li L-Asparagin aminohydroláza (EC 3.5.1.1) [67], je potencionálně velmi efektivní prostředek pro eliminaci tvorby akrylamidu v potravinách odbouráním jeho prekursoru asparaginu [68]. První zdokumentovanou aplikaci L-asparaginázy pro redukcii obsahu asparaginu a tím i vzniku akrylamidu v potravinách z brambor uvedl ve své studii Zyzak *et al.* [3].



Obr. 8: Struktura L-asparaginázy tvořená 4 podjednotkami [69]

Enzym L-asparagináza se skládá ze čtyř identických podjednotek (Obr. 8), ve své molekule obsahuje aktivní místa pro uchopení asparaginu (červené) a vhodně umístěnou aminokyselinu threonin (zelené), která provádí rozštěp reakce [69]. L-Asparagináza se nachází u některých bakterií (*E. coli*, *Erwinia*), plísních (*Aspergillus*), rostlinách i mnohých zvířatech, u lidí se ale přirozeně nevyskytuje [70]. Extracelulární asparagináza je průmyslově získávána submerzní fed-batch fermentací z geneticky modifikované plísně *Aspergillus oryzae* [67, 68], která má sníženou schopnost produkce sekundárních metabolitů [67]. L-asparagináza pro eliminaci

tvorby akrylamidu v určitých potravinách je také průmyslově získávána fermentací z plísně *Aspergillus niger* [70].

L-asparagináza katalyzuje konverzi L-asparaginu na L-asparagovou kyselinu a amoniak [67]. Enzym ale není aktivní jen s L-asparaginem jako substrátem, např. z glutaminu také odštěpuje aminoskupinu i když v pomaleji [69]. Vzniklý amoniak tvoří následně s α -ketoglutarátem kyselinu L-glutamovou. Tato reakce je katalyzována glutamát dehydrogenázou v přítomnosti NADH, který je oxidován na NAD^+ s doprovodnou ztrátou absorbance měřené při 340 nm. Aktivita L-asparaginázy se tedy určuje měřením rychlosti spotřeby NADH za standardních podmínek ($\text{pH } 7,00 \pm 0,05$ a $37,0 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$) a vyjadřuje se v ASNU jednotkách. 1 ASNU je definována jako množství asparaginázy produkující 1 μmol amoniaku za 1 minutu při standardních podmínkách [67]. Stanovováním aktivity bylo zjištěno, že L-asparagináza z *A. oryzae* je nejaktivnější v neutrálním pH a teplotě do $60 \text{ }^\circ\text{C}$, stabilní je mezi pH 4 – 8 při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 2 hodin [68]. Při vysokých teplotách dochází k inaktivaci enzymu proteolýzou [71].

Existuje několik proměnných, které ovlivňují efektivnost enzymem katalyzovaných reakcí, a to dávka enzymu, doba působení, obsah vody v reakční prostředí, teplota a pH, při nichž reakce proběhne. Při aplikaci L-asparaginázy v potravinářství je nutné brát tyto proměnné do úvahy, i když většinou probíhá inkubace (např. při aplikaci v pekárenství) při běžné teplotě nebo mírně vyšší a pH těsta. Nejdůležitějšími proměnnými při aplikaci v potravinách jsou pak tedy především doba působení enzymu, která se například rovná době uležení těsta před pečením, a dávka enzymu [68]. Použití minimální dávky enzymu postačující na účinnou eliminaci akrylamidu je důležitá především z ekonomického hlediska, protože vzhledem k současné ceně enzymu, která se promítá do výrobních nákladů a výsledné ceny finálního produktu, to není zanedbatelné.

2.9 Charakteristika surovin

2.9.1 Charakteristika obilovin a jejich mouk

Z hlediska tvorby akrylamidu je důležité poznat v surovinách především obsah jeho prekurzorů, tedy zdroj sacharidů a aminokyselin, a také možnosti variability ve složení a zastoupení těchto prekurzorů.

Základními stavebními složkami obilných zrn jsou sacharidy a bílkoviny. V menších množstvích jsou obsaženy lipidy, minerální látky, a ve velmi malých množstvích vitaminy, barviva a ve stopových množstvích další složky, které mají růstové a regulační funkce [66].

a) Sacharidy obilovin

Obsah nejdůležitějších sacharidů v pšeničné a žitné mouce je uveden v Tab. 3 [65].

Volné monosacharidy se ve zralých zrnech vyskytují pouze v nepatrném množství. Do mouky se jich dostává max. 1 – 3 %. Nejdůležitějšími monosacharidy v obilovinách jsou: pentózy – arabinóza, xylóza, ribóza; hexózy – glukóza, fruktóza, galaktóza a manóza [66].

Také oligosacharidy se ve zralém, neporušeném a suchém zrně vyskytují jen ve velmi nízkém obsahu. Významné jsou především maltóza, isomaltóza, sacharóza [66].

Nejvýznamnější skupinou biopolymerů obilovin jsou polysacharidy, které jsou u obilných zrn děleny na škrob a skupinu neškrobových polysacharidů. Obsah škrobu tvoří přibližně 60 - 75 % sušiny obilky a kolísá zhruba v uvedeném rozmezí podle druhů a odrůd. Jeho obsah v mouce, která je tvořena převážně endospermem, je asi 80 % [66].

Hlavními představiteli neškrobových polysacharidů jsou celulóza, pentózany a β -glukany. Celulóza v těstě snižuje vaznost vody a pevnost a pružnost těsta, proto jsou do mouky přidávány prostředky posilující lepkovou strukturu. Obsah pentózánů v obilovinách je velmi rozdílný, velmi bohaté jsou na ně žitné mouky (4 – 7 %), ve srovnání např. s pšeničnými (1 – 3 %). Rozpustné pentózany vytvářejí glykoproteiny přispívající k tvorbě prostorové struktury žitných těst. Žitné pentózany jsou schopny vázat na svůj hmotnostní podíl několikanásobné množství vody a spolu se škrobem tvoří základ struktury žitných těst. β -glukany jsou rozpustné polysacharidy obsažené především v ječmeni a ovsu. Jsou schopny vytvářet vysokoviskózní gely, což se projevuje zvyšováním a prodlužováním vláčnosti výrobků i v příznivém fyziologickém působení při trávení výrobků [66].

Tab. 3: Obsah sacharidů v pšeničné a žitné mouce [65]

	Pšeničná mouka	Žitná mouka
Sacharidy	Obsah v $\mu\text{mol/kg}$	Obsah v $\mu\text{mol/kg}$
Glukóza	3020	11900
Fruktóza	2360	13400
Sacharóza	28500	33700
Maltóza	43900	32400

b) Bílkoviny obilovin

Zralá zrna obilovin obsahují podle druhů a odrůd nejčastěji 9 – 13 % bílkovin v sušině [66]. V Tab. 4 je vidět obsah volných aminokyselin v pšeničné a žitné mouce [65].

Tab. 4: Obsah volných aminokyselin v pšeničné a žitné mouce [65]

	Pšeničná mouka	Žitná mouka
Aminokyselina	Obsah v $\mu\text{mol/kg}$	Obsah v $\mu\text{mol/kg}$
Alanin	748	2721
Glycin	403	851
Kys. α -aminobutyrová	7	16
Valin	219	602
β -alanin	13	76
Leucin	316	480
Izoleucin	99	227
Threonin	95	264
Serin	147	328
Kys. γ -aminobutyrová	1154	456
Prolin	332	1173
Asparagin	1327	4793
Kys. asparagová	1399	3123
Methionin	41	57
Kys. glutamová	180	1071
Fenylalanin	107	207
Glutamin	65	329
Ornitin	9	17
Lysin	136	167
Histidin	31	75
Tyrozín	71	103
Tryptofan	946	123

c) Lipidy obilovin

Obilná zrna jsou na lipidy poměrně chudá, vyšší výskyt tuků je v klíčcích. Endosperm a tak i mouky obsahují max. 2 % lipidů, především triacylglycerolů. I přesto jsou lipidy při tvorbě těsta důležité. Zvyšující se podíl polárních lipidů má příznivý vliv na objem pečiva,

naopak stoupající podíl nepochlívání lipidů jej snižuje. Při delším skladování může docházet ke žluknutí mouky, což je způsobeno přítomností kys. linolové, olejové a linolenové, které snadno podléhají oxidaci [66].

d) Ostatní látky obsažené v minoritním množství

Obiloviny jsou zdrojem vitaminů skupiny B. Thiamin (B₁) a riboflavin (B₂) se vyskytují v obalových vrstvách a v klíčcích. Kyselina nikotinová a nikotinamid jsou přítomny především v pšenici a ječmeni. Důležitý je také obsah vitaminu E v pšeničných klíčcích, z nichž je izolován pro výrobu vitaminových preparátů ve farmaceutickém průmyslu [66].

Obsah popela (minerálních látek) v zrnech obilovin je přibližně 1,3 – 2,5 % a vzrůstá se stupněm vymletí a je tak základem pro klasifikaci mouk a jejich označení typovým číslem. Popel obilovin je tvořen převážně P₂O₅, důležitými kovy jsou Mg, Ca a Fe [66].

Biologicky významnými látkami v obilovinách jsou cholin, který je významný pro nervomotorickou činnost našeho organismu, a kyselina para-aminobenzoová, která je významným růstovým faktorem [66].

2.9.1.1 Pšenice

Rod pšenice (*Triticum L.*) je velice rozmanitý a její druhy se dělí podle počtu chromozomů (ploeditou). Nejpěstovanější je pšenice obecná nebo-li setá (*Triticum aestivum L.*) a pšenice tvrdá (*Triticum durum Desf.*), méně pak pšenice naduřelá (*Triticum turgidum L.*) a pšenice špalda (*Triticum spelta L.*). Při pěstování jsou rozlišovány užitkové směry pšenice:

- pšenice potravinářská s různou pekárenskou jakostí
- pšenice ke krmným účelům
- pšenice k výrobě těstovin
- pšenice pro průmyslové účely, např. k výrobě škrobu, ethanolu, atd. [64]

Na jakosti potravinářské pšenice se podílí odrůda a pěstitelské podmínky. Nejvíce je ovlivněn obsah bílkovin, mokrý lepek a jakost lepku, přičemž lepek je soubor bílkovin, které po navlhčení nabobtnají a vytvoří souvislou lepkovou mřížku. Vliv odrůdy je značný a předpokládá se, že v budoucích dodavatelských a odběratelských vztazích bude nutné ji deklarovat. I přesto mají také pěstitelské podmínky značný vliv a souvisí především s klimatickými podmínkami i aktuálním průběhem počasí v daném ročníku [64].

Značná pozornost je věnována především pšenici špalda, která má vyšší obsah základních látek než pšenice setá (Tab. 5). Významný je i vyšší obsah některých esenciálních aminokyselin, např. leucin, isoleucin, methionin, tryptofan a fenylalanin. Nevýhodou pšenice

špalda je horší kvalita lepku, což se projevuje na horší pekařské jakosti pro běžné pekárenské výrobky [64].

Tab. 5: Obsah výživných látek ve špaldě a pšenici seté [64]

Výživná látka ve 100 g	Špalda	Pšenice setá
Bílkoviny [g]	14,3	10,2
Tuky [g]	2,9	2,0
Glycidy [g]	74,5	72,0
Popeloviny [g]	1,7	1,5
Vitamin B1 [mg]	0,65	0,35
Vitamin B2 [mg]	0,23	0,13
Niacin PP [mg]	0,60	0,42
Draslík [mg]	385,0	384,0
Vápník [mg]	38,0	40,0
Železo [mg]	4,17	3,50
Hořčík [mg]	0,62	0,32
Zinek [mg]	3,4	2,80

2.9.1.2 Ječmen

Všechny kulturní ječmeny představují jeden druh a to ječmen setý (*Hordeum vulgare L.*), který je dělen na ječmen setý víceřadý a ječmen setý dvouřadý [64].

Ječmen je využíván především k výrobě sladu, whisky a méně k potravinářským účelům, speciální využití má i ve škrobárenství pro získání škrobu. Užitkové směry ječmene jsou:

- ječmen pro krmné účely
- ječmen pro sladovnictví
- ječmen pro potravinářství
- ječmen pro průmyslové účely – produkce ethanolu, škrobu, detergentů, atd.
- ječmen píceňářský – na senáž, sušení, granulování [64]

U potravinářského ječmene je velmi důležitý obsah esenciálních aminokyselin, zejména lyzinu. Důležitý je i vyšší obsah β -glukanů, které snižují hladinu cholesterolu v krvi, a obsah tokoferolu a vitamínu E. Chemické složení ječmenu je uvedeno v Tab. 6 [64].

Tab. 6: Chemické složení bezpluchých ječmenů [64]

	Zrno	Kroupy
Dusíkaté látky [%]	13,6	11,0
Škrob [% sušiny]	60,6	69,7
Tuk [%]	4,1	1,9
Vitamin E [mg/100 g]	2,84	0,92
Tokoferoly [mg/100 g]	7,28	3,61
Lysin [mg/g sušiny]	6,17	5,11
Threonin [mg/g sušiny]	5,76	4,23
Methionin [mg/g sušiny]	0,59	0,34

2.9.1.3 Žito

Žito seté (*Secale cereale L.*) je hojně využíváno v potravinářství. Ke krmným účelům se používá jen málo. V menší míře slouží k výrobě žitné kávy a kávoviny, ve větší míře k produkci bioethanolu [64].

Tritikale - žitovec (*Triticosecale Wittmack Müntzing*) je uměle vytvořený druh vzniklý zkřížením pšenice a žita. Odrůdy mají vysoký výnosový potenciál a jsou tolerantnější k horším pěstitelským podmínkám. Nejvíce ceněná je jeho vysoká krmná hodnota. Vysoce ceněný je obsah lyzinu. Obsah nejdůležitějších výživných látek tritikale je uveden v Tab. 7 [64].

Tab. 7: Obsah nejdůležitějších výživných látek tritikale a pšenice [64]

	Tritikale	Pšenice
Tuk [%]	1,6	1,7
Bílkoviny [%]	10,8	11,8
Vláknina [%]	2,3	2,8
Popeloviny [%]	1,5	1,9
Škrob [%]	55,0	58,0
Lysin [%]	0,4	0,3

2.9.1.4 Oves

Ze 70 druhů ovsa se pěstuje především oves setý (*Avena sativa L.*). Oves je řazen k nejlepším potravinářským a krmným cereáliím vzhledem k vynikajícímu chemickému složení obilky ovsa (Tab. 8). Vyniká obsahem bílkovin a tuku. Jeho vláknina má vysoký podíl

rozpustné složky včetně β -glukanů. Významný je i obsah minerálních látek – Mg, Ca, Fe, Zn, Mn a dalších. Obsahuje také lecitin, niacin, vitaminy B a E a antioxidanty [64].

Oves je využíván pro potravinářské nebo krmné účely. Lze jej využít i na píci nebo jako krycí plodiny pro podsev jetelovin [64].

Tab. 8: Nutričně významné látky v zrně ovsa [64]

	Oves nahý	Oves pluchatý
N-látky [%]	16,5	12,4
Stravitelné N-látky [%]	14,0	9,8
Globuliny [mg N/g sušiny]	0,70	0,61
Albuminy [mg N/g sušiny]	0,61	0,41
Prolaminy [mg N/g sušiny]	0,45	0,32
Gluteliny [mg N/g sušiny]	1,04	0,78
Lysin [g/100 g N-látek]	4,04	3,84
Esenciální aminokyseliny [g/100 g N-látek]	31,97	28,50
Škrob [%]	56,3	39,6
Hrubá celulóza [%]	1,4	11,8
Tuk [%]	8,3	3,5

2.9.1.5 Kukuřice

Kukuřice (*Zea mays L.*) je ve světovém měřítku po pšenici a rýži nejrozšířenější obilninou. Její potravinářské využití je poměrně široké, konzumují se extrudované obilky – pukavce, mouka, krupice. Získává se též škrob (modifikované škroby), cukr (dextróza) – různé sirupy (glukózový, fruktózový), gluten, sorbit, alkohol. Je také nepostradatelným komponentem do krmných směsí [64].

3 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Hlavním cílem diplomové práce je získat poznatky, definovat podmínky a charakterizovat možné důsledky aplikace anorganických solí (NaCl, KCl, CaCl₂, NH₄Cl, NaHCO₃, KHCO₃, NH₄HCO₃, NaH₂PO₄, KH₂PO₄, Na₂H₂P₂O₇, Na₄P₂O₇, mléčnan vápenatý, citran sodný a citran draselný) i v kombinaci s použitím enzymu L-asparaginázy v modelovém a reálném systému tepelně opracovaných potravin za účelem minimalizace obsahu toxického akrylamidu.

Tohoto cíle lze dosáhnout:

- studií změn v obsahu akrylamidu v perníkách způsobených aplikací 3 různých kypřících činidel i jejich kombinací s použitím L-asparaginázy a volba nejvhodnějšího kypřidla i v kombinaci s L-asparaginázou pro praktické použití v předejetí vzniku akrylamidu v potravinách
- studií změn v obsahu akrylamidu vyvolaných aplikací jednotlivých anorganických solí v modelovém systému simulujícím složení cereálních výrobků
- stanovení optimálních podmínek aplikace jednotlivých anorganických solí v kombinaci s použitím L-asparaginázy vzhledem na minimalizaci tvorby akrylamidu v modelovém systému, mezi tyto podmínky patří obsah solí, enzymu, teplota a čas enzymového a tepelného působení a vliv pH

4 MATERIÁLY A METODY

4.1 Stanovení expozice

Příjem akrylamidu byl zjišťován pomocí dotazníku, při jehož vytváření byl použit klasický postup tvorby dotazníků. Cílem dotazníku bylo stanovení konzumovaného množství vybraných běžných potravin za den, které jsou hlavním zdrojem akrylamidu v lidské stravě, pro stanovení průměrného denního příjmu akrylamidu z těchto potravin. Pro toto zjištění byla použita částečně otevřená forma otázek, kdy jsou odpovědi předem dané a případně může dotazovaný dodat ještě vysvětlení své odpovědi. Takové to otázky umožňovaly získat konkrétní fakta o frekvenci konzumace vybraných potravin u náhodné nereprezentativní skupiny respondentů a výsledky jednoduše elektronicky zpracovat.

Použitá forma dotazníku pro stanovení expozice je uvedena v příloze 1.

4.2 Vliv solí a L-asparaginázy na obsah akrylamid v perníkách

4.2.1 Použité chemikálie

Akrylamid (Serva, New York, USA); d_3 -kyselina glutamová (97–98 %), d_3 -akrylamid (98 %) (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA); (S)–(+)-kyselina glutamová (>99 %), (S)–(+)-glutamin (>99 %), (S)–(+)-kyselina asparagová (>99 %), roztok Carrez II. (síran zinečnatý p.a., 300 g/l), ledová kyselina octová 100 %, bezvodá p.a. (Merck, Darmstadt, Německo); roztok Carrez I. (ferrokyanid draselný p.a., 150 g/l) (Slavus, Bratislava, Slovenská republika); L-asparagin monohydrát (>99,5 %), ethylacetát (99,7 %) (Sigma – Aldrich, Steinheim, Německo); deionizovaná voda (přístroj: Purite LTD, Thame Oxon., Velká Británie).

4.2.2 Použité přístroje

Analytické váhy AP-110 S (Ohaus, Švýcarsko), vortex mixer VM-300 (Gemmy Industrial Corp., Taiwan), ultrazvuková lázeň TESON 1 (Tesla, Československá republika), laboratorní centrifuga s možností chlazení 2–16 KC (SIGMA, Osterode am Harz, Německo), vakuová rotační odparka WB 2000 (Heidolph, Německo), spektrofotometr Specord M40 (Carl Zeiss Jena, Německo), HPLC/MS/MS kapalinový chromatograf 1200 série (Agilent Technologies, USA) s hmotnostním detektorem Agilent 6410 Triple Quad s ESI iónovým zdrojem.

4.2.3 Použité metody stanovení

4.2.3.1 Reálné vzorky

Změny obsahu akrylamidu působením hydrogenuhličitanu amonného a pyrofosfátu sodného i v kombinaci s enzymem L-asparaginázou byly stanoveny ve vzorkách perníků. Vzorky již hotových perníků s přidavkem kypřících činidel a enzymu byly poskytnuty firmou I.D.C. Holding, a.s. z pracoviště v Seredi. Receptura těsta pro výrobu perníku je výrobním tajemství společnosti I.D.C. Holding, a.s.

Těsta pro výrobu perníků byla připravována v množství 1 kg a skladována při běžné teplotě (20 – 30 °C). Teplota těst byla 25,3 °C. Doba ručního mísení byla 13 minut a začala se počítat od smísení kypřícího činidla se sirupem v těstě. Množství kypřícího činidla ve formě uvedených solí (NH_4HCO_3 , $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, NaHCO_3) a invertního sirupu přidaného do těsta je uvedeno v Tab. 9. Enzym (100 nebo 1000 U/kg těsta) byl přidáván do směsi soli a sirupu. Na peci bylo možné nastavit ohřev vrchní a spodní desky. Teplota vrchního ohřevu byla nastavena na 250 °C a teplota spodního na 230 °C. Pečení trvalo 5 minut a probíhalo při otevřené ventilační klapce.

Tab. 9: Přehled množství invertního sirupu a kypřících činidel přidaných do těsta

Těsto	Invertní sirup [g]	Kypřící činidlo	
		Druh	Množství [g]
AMON	16,20	NH_4HCO_3	17,30
AMON + 100 U	16,18	NH_4HCO_3	17,30
AMON + 1000 U	18,82	NH_4HCO_3	17,30
SAPP 22 + soda	19,04	$\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$	17,30
		NaHCO_3	24,22
SAPP 22 + soda + 100 U	18,38	$\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$	17,30
		NaHCO_3	24,22
SAPP 22 + soda + 1000 U	18,48	$\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$	17,30
		NaHCO_3	24,22
SAPP 28 + soda	19,04	$\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$	17,30
		NaHCO_3	24,22
SAPP 28 + soda + 100 U	18,38	$\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$	17,30
		NaHCO_3	24,22
SAPP 28 + soda + 1000 U	18,48	$\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$	17,30
		NaHCO_3	24,22

4.2.3.2 Příprava vzorků pro stanovení obsahu akrylamidu

Stanovení obsahu akrylamidu v reálné matici bylo prováděno podle postupu Ciesarová *et al.* [72]. K 1 g vzorku rozdrčeného perníku bylo přidáno 50 μl d_3 – akrylamid ($c = 20 \mu\text{g/ml}$) a 9 ml CH_3COOH (0,2 mmol/l). Zhomogenizované vzorky se poté vystavily po dobu 5 minut ultrazvukovým vibracím. Pro vyčeření se přidalo 0,5 ml roztoku Carrez I. a 0,5 ml roztoku Carrez II. a vzorky se protřepaly. Následně se provedla centrifugace při rychlosti 8720 x g a teplotě -5°C po dobu 10 minut.

Z vodné vrstvy se po odstředění odebralo 5 ml a provedla se 3x extrakce 5 ml ethylacetátu. Spojené ethylacetátové extrakty se odpařily na rotační vakuové odparce a suchý extrakt se rozpustil v 1 ml CH_3COOH (0,2 mmol/l). Před analýzou pomocí LC/ESI-MS-MS se vzorky zfiltraly přes nylonové filtry s velikostí pórů o průměru 0,20 μm .

4.2.3.3 Příprava vzorků pro stanovení obsahu aminokyselin

Stanovení aminokyselin byl prováděn podle postupu Ciesarová *et al.* [72]. Rozdrčené perníky byly odváženy (1 g) do 10 ml centrifugačních zkumavek se zátkou. Následně se přidalo 10 ml CH_3COOH (0,2 mmol/l) a vzorky se 2 min protřepávaly. Poté se zcentrifugovaly při rychlosti 1900 x g a teplotě -4°C po dobu 10 minuta. 500 μl čistého supernatantu bylo odebráno do 10 ml odměrných baněk, přidalo se 50 μl vnitřního standardu (d_3 -kyselina glutamová, $c = 100 \mu\text{g/ml}$) a baňky byly doplněny po rysku CH_3COOH (0,2 mmol/l). Před analýzou pomocí LC/MS se provedla filtrace přes nylonové filtry s velikostí pórů o průměru 0,20 μm .

Vzorky s enzymem nebyly zředovány pomocí CH_3COOH . Vnitřní standard (50 μl) byl přidáný přímo ke vzorku a poté se pokračovalo stejným postupem.

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

LC/ESI-MS-MS analýza byla prováděna pomocí HPLC systému 1200 série (Agilent Technologies, USA) spolu s Agilent 6410 Triple Quad detektorem vybaveným ESI iónovým zdrojem. Separace analytu se prováděla na chromatografické koloně Purospher® STAR RP-8ec (150 mm x 4,6 mm, 3 μm) použitím izokratické směsi složené ze 100 ml acetonitrilu a 900 ml vodného roztoku perfluorooktanové kyseliny (0,05 mmol/l). Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min při laboratorní teplotě (místnost byla kondicionovaná na 25°C). Všechny parametry ESI-MS-MS systém byly založeny na tvorbě protonovaných molekulových iontů z akrylamidu a vnitřního standardu (d_3 -akrylamid), a následnou indukovanou kolizí byly produkovány specifické fragmenty iontů. Tento typ experimentu se označuje jako MRM

(multiple reaction monitoring, vícenásobné reakční monitorování) a sledovány byly následující přechody: přechod pro akrylamid: 72 → 55, přechod pro d₃-akrylamid: 75 → 58. Další parametry používané pro analýzu akrylamidu v ESI+ módu: tok sušícího plynu (N₂) 11 l/min, teplota zplynění 350 °C, tlak rozprašování 345 kPa, napětí v kapiláře 2,5 kV, napětí fragmentoru 80 V, kolizní energie 5 V, zdržení (dwell) 50 ms.

Kalibrace byla připravena ředěním zásobního roztoku akrylamidu (0,02 g/100 ml methylalkoholu) v rozsahu 50 – 2000 ng/10 ml s 50 µl vnitřního standardu (d₃-akrylamid, c = 20 µg/ml).

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

LC/ESI-MS-MS analýza pro kvantifikaci 4 volných aminokyselin (asparagin, kyselina asparagová, glutamin a kyselina glutamová) byla prováděna pomocí HPLC systému 1200 série (Agilent Technologies, USA) spolu s Agilent 6410 Triple Quad detektorem vybaveným ESI iónovým zdrojem. Separace analytu se prováděla na chromatografické koloně Purospher® STAR RP-8ec (150 mm x 4,6 mm, 3 µm) použitím izokratické směsi ze 100 ml acetonitrilu a 900 ml vodného roztoku perfluorooktanové kyseliny (0,05 mmol/l). Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min při laboratorní teplotě (místnost byla kondicionovaná na 25°C). Všechny parametry ESI-MS-MS systému byly založeny na tvorbě protonovaných molekulových iontů z aminokyselin a vnitřního standardu (d₃-kyselina glutamová) a následnou indukovanou kolizí byly produkovány specifické fragmenty iontů. Při MRM experimentu byly sledovány následující přechody: přechod pro asparagin: 133 → 74, 87; přechod pro kyselinu asparagovou: 134 → 74, 87; přechod pro glutamin: 147 → 84, 102; přechod pro kyselinu glutamovou: 148 → 84, 130; přechod pro d₃-kyselinu glutamovou: 151 → 87, 105. Ostatní parametry používané pro LC-MS-MS analýzu aminokyselin v pozitivním ESI módu: tok sušícího plynu (N₂) 8 l/min, teplota zplynění 320 °C, tlak rozprašování 345 kPa, napětí v kapiláře 3 kV, napětí na fragmentoru 40 V, kolizní energie 12 V, zdržení 50 ms.

Kalibrace byla připravena ředěním zásobních roztoků aminokyselin (c = 1 mg/ml) v rozsahu 20 – 2000 ng/ml s 50 µl vnitřního standardu (d₃-kyselinu glutamová, c = 0,1 mg/ml).

4.2.3.6 Měření barvy perníku

Barva povrchu vzorků perníku byla měřena jako reflektance spektrofotometrem Specord M40 podle CIELAB, což je $L^* a^* b^*$ barevný prostor, který byl definován v roce 1976 mezinárodní komisí zabývající se problematikou světla Commission Internationale de l'Éclairage, zkráceně označovaná jako CIE. V tomto barevném prostoru L^* představuje

světlost (přechod od bílé po černou) a a^* a b^* jsou souřadnice barvy, přičemž a^* je přechod od červené po zelenou a b^* od žluté po modrou.

Vzorky perníků nebyly před měřením nijak upravovány, pouze byl jejich povrch očištěn od mouky, která by zkreslila výsledky měření. Zdrojem záření bylo umělé denní světlo D₆₅ a měření bylo prováděno za podmínek stanovených výrobcem. Jako referenční materiál byl použit síran barnatý. Každý vzorek perníku byl změřen 2x a z výsledků byla vypočítána průměrná hodnota.

4.2.3.7 *Statistické zhodnocení výsledků*

Pro statistické zhodnocení výsledků byla použita jednofaktorová analýza rozptylu - ANOVA: jeden faktor. Zhodnocení výsledků bylo prováděno na hladině významnosti 0,05.

4.3 Sledování vlivu solí a L-asparaginázy na obsah akrylamid v modelovém systému

4.3.1 Použité chemikálie

D-(+)-glukóza monohydrát, D-(-)-fruktóza ($\geq 99\%$), pšeničný škrob, (S)-(+)-glutamin ($>99\%$), (S)-(+)-kyselina glutamová ($>99\%$), (S)-(+)-kyselina asparagová ($>99\%$), ledová kyselina octová 100 %, bezvodá p.a., difosforečnan tetrasodný dekahydrát p.a. (Merck, Darmstadt, Německo); L-asparagin monohydrát ($>99,5\%$), ethylacetát (99,7 %) (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo); akrylamid (Serva, New York, USA); d₃ – akrylamid (98 %), d₃ – kyselina glutamová (97 – 98 %) (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA); chlorid sodný p.a., chlorid draselný p.a., chlorid vápenatý dihydrát p.a., chlorid amonný p.a. (Lachema, Brno, Česká republika); hydrogenuhličitan sodný p.a., hydrogenuhličitan draselný p.a., hydrogenuhličitan amonný p.a., dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p.a., dihydrogenfosforečnan draselný p.a., dihydrogenfosforečnan amonný p.a., dihydrogendifosforečnan sodný p.a., mléčnan vápenatý pentahydrát p.a., citran sodný dihydrát p.a., citran draselný monohydrát p.a., citran vápenatý tetrahydrát p.a., citran amonný monohydrát p.a. (Slavus, Bratislava, Slovenská republika); L- asparagináza z *Aspergillus oryzae* (3500 U/g) (Novozymes, Bagsvaerd, Dánsko); deionizovaná voda (přístroj: Purite LTD, Thame Oxon., Velká Británie).

4.3.2 Použité přístroje

Analytické váhy AP-110 S (Ohaus, Švýcarsko), vypékací zařízení (Gebr. Liebisch, Bielefeld, Německo), vortex mixer VM-300 (Gemmy Industrial Corp., Taiwan), ultrazvuková lázeň s termostatem (Kraintek, Podhajska, Slovenská republika), vakuová rotační odparka WB 2000 (Heidolph, Německo), pHmetr pH 720 (InoLab, Weilheim, Německo), LC-MS kapalinový chromatograf 1200 série (Agilent Technologies, USA) s hmotnostním detektorem Agilent 6410 Triple Quad s ESI iónovým zdrojem.

4.3.3 Použité metody stanovení

4.3.3.1 Modelová směs

Modelová směs představuje zjednodušené těsto pro výrobu sušenek, jehož základními složkami jsou voda, mouka a cukr. Poměr jednotlivých složek v modelové směsi je zachován v souladu s recepturou, kde obsah vody a mouky je v poměru 1:1 a na toto množství připadá ¼ cukru. Cukr je zastoupen glukózou a fruktózou a mouku představuje pšeničný škrob a asparagin, jehož obsah v mouce je 0,1 %.

Pro experimenty byla použita modelová směs tvořená sypkou směsí vysušeného pšeničného škrobu (sušen při 120 °C po dobu 3 hodin), glukózy a fruktózy. Potřebný asparagin a voda byli přidávány v odpovídajícím objemu jako roztok asparaginu.

4.3.3.2 Příprava vzorků pro stanovení obsahu akrylamidu

Volba navážky: K sypké modelové směsi se přidal odpovídající objem roztoku asparaginu (viz. Tab. 10) a homogenní vzorky byly vypékány při 190 °C po dobu 10 minut.

Tab. 10: Přehled přidávaných objemů činidel k sypké modelové směsi v závislosti na její navážce

Navážka sypké modelové směsi	Přidaný objem		
	Roztok asparaginu (0,1 g/100 ml)	d ₃ – akrylamid (c = 20 µg/ml)	CH ₃ COOH (0,2 mmol/l)
1,00 g	760 µl	100 µl	10,0 ml
0,50 g	380 µl	50 µl	5,0 ml
0,25 g	190 µl	25 µl	2,5 ml

Kinetika tvorby akrylamidu: K 0,5 g sypké modelové směsi se přidalo 380 μ l roztoku asparaginu (0,1 g/100 ml). Vzorby byly vypékány při 190 °C v časech: 0, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20 a 30 minut.

Vliv solí: Pro stanovení vlivu anorganických solí na tvorbu akrylamidu v modelové směsi byly zvoleny 3 různé obsahy solí v modelové směsi (0,1; 0,05 a 0,01 mmol/g směsi). Kvůli zachování recepturou stanoveného obsahu vody a asparaginu v modelové směsi bylo ke vzorkům s navázkou 0,5 g přidáváno 190 μ l roztoku solí a 190 μ l roztoku asparaginu (0,2 g/100 ml). Vypékání se provádělo při 190 °C po dobu 9 minut. Jako kontrola byly použity vzorky bez přídavku soli.

Kinetika působení L-asparaginázy: K 0,5 g modelové směsi bylo přidáno 190 μ l vody, 140 μ l roztoku asparaginu (0,2714 g/100 ml) a 50 μ l L-asparaginázy ($c = 0,5$ U/g). Homogenní vzorky byly inkubovány při laboratorní teplotě (teplota místnosti byla udržována na 24 ± 1 °C) v časech 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 60 a 120 minut při laboratorní teplotě a následně pečeny při 190 °C po dobu 9 minut.

Kombinace solí a L-asparaginázy: K 0,5 g modelové směsi se přidalo 190 μ l soli ($c = 0,1$ mmol/g), 140 μ l roztoku asparaginu (0,2714 g/100 ml) a 50 μ l L-asparaginázy ($c = 0,5$ U/g). Homogenní vzorky byly inkubovány 10 minut při laboratorní teplotě (teplota místnosti byla udržována na 24 ± 1 °C) a následně pečeny při 190 °C po dobu 9 minut. Pro porovnání byly zároveň připraveny vzorky bez přídavku enzymu; bez přídavku soli bez přídavku soli i enzymu.

Všechny vzorky modelové směsi byly vypékány pomocí pečícího zařízení při teplotě 190 °C, která byla zvolena na základě výsledků studie Ciesarová *et al.* [73].

4.3.3.3 Příprava vzorků pro stanovení obsahu aminokyselin

Kinetika působení L-asparaginázy: Pro stanovení bylo použito 5; 0,5 nebo 0,05 U enzymu L-asparaginázy na 1 g modelové směsi. Modelovou směs v tomto případě tvořila pouze glukóza a fruktóza. Škrob byl nahrazen vodou, protože při inaktivaci enzymu varem vzniká ze škrobu a vody pevný nerozpustný gel, z něhož není možné pro další stanovení aminokyselin vyextrahovat. Modelovou směs pro stanovení aminokyselin tedy představoval roztok s rozpuštěným recepturou stanoveným množstvím glukózy, fruktózy a asparaginu nebo směsi aminokyselin.

K 500 μ l směsi glukózy a fruktózy se přidalo 190 μ l vody a 140 μ l roztoku směsi aminokyselin (Asn, Asp, Gln, Glu), kde byla zachována koncentrace asparaginu podle receptury a ostatní AK byly v ekvimolárním množství. Následně se přidalo 50 μ l

L-asparaginázy a homogenní vzorky byly inkubovány při laboratorní teplotě (teplota místnosti byla udržována na 24 ± 1 °C) v časech 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 a 120 minut při laboratorní teplotě. Enzym byl inaktivován vložení vzorků do vroucí vodní lázně na 10 minut.

Kinetika byla následně zopakována se vzorky, které obsahovali namísto roztoku směsi aminokyselin pouze roztok asparaginu (0,2 g/100 ml) a inkubace při laboratorní teplotě (teplota místnosti byla udržována na 24 ± 1 °C) byla prováděna v časech 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 a 30 minut.

4.3.3.4 *Extrakce*

Extrakce akrylamidu a aminokyselin ze vzorků byla prováděna podle postupu Ciesarová *et al.* [72], přičemž nebyly použity Carrezovy roztoky, protože ty se používají u reálných vzorků na vyčerení, což u modelových vzorků není třeba.

U ochlazených vypečených vzorků byla prováděna extrakce, kdy byl přidán vnitřní standard (v případě stanovení obsahu akrylamidu: d_3 – akrylamid ($c = 20$ µg/ml), při stanovení aminokyselin: d_3 – kyselina glutamová ($c = 100$ µg/ml)) a CH_3COOH (0,2 mmol/l). Přidané množství závisí na celkovém množství vzorku – viz. Tab. 10. Následně se vzorky vystavily ultrazvukovým vibracím po dobu 5 minut. Poté se ke vzorkům znovu přidalo stejné množství CH_3COOH (0,2 mmol/l) a opět se vložily na 5 minut do ultrazvuku. Získané extrakty pro stanovení obsahu akrylamidu byly před analýzou pomocí LC/ESI-MS-MS zfiltrvány přes nylonové filtry s velikostí pórů o průměru 0,20 µm.

V případě stanovení aminokyselin v uvařených vzorcích se přidá 9,10 ml CH_3COOH (0,2 mmol/l). Poté se odebere 0,5 ml a přidá se 50 µl d_3 – kyseliny glutamové ($c = 100$ µg/ml) a vzorky se doplnili CH_3COOH (0,2 mmol/l) na 10 ml. Před analýzou pomocí LC/ESI-MS-MS se vzorky zfiltrovaly přes 0,20 µm nylonové filtry.

U vypečených vzorků lze po extrakci CH_3COOH provést i preextrakci do ethylacetátu, kdy 5 ml vodné vrstvy získané v předchozích krocích bylo extrahováno 3x 5ml ethylacetátu. Spojené ethylacetátové extrakty se následně odpařily do sucha na vakuové rotační odparce a suchý odparek se rozpustil v 1 ml CH_3COOH (0,2 mmol/l) a zfiltroval přes 0,20 µm nylonový filtr. Analýza vzniklého akrylamidu byla opět prováděna pomocí LC/ESI-MS-MS.

Preextrakci do ethylacetátu je nutné provádět u vzorků obsahující soli pro odstranění jejich negativního vlivu v chromatografickém systému.

4.3.3.5 Stanovení obsahu akrylamidu a aminokyselin pomocí LC/ESI-MS-MS

Parametry LC/ESI-MS-MS pro stanovení obsahu akrylamidu jsou uvedeny výše v kapitole 4.2.3.3 a pro stanovení aminokyselin v kapitole 4.2.3.4.

4.3.3.6 Stanovení pH

U vzorků byla sledována změna pH vlivem přidaných solí během pečení. K 0,5 g sypké modelové směsi se přidalo 190 μ l roztoku asparaginu (0,2 g/100 ml) a 190 μ l roztoku soli ($c = 0,1$ mmol/g). Vzorky byly vypékány při 190 °C v časech: 0, 3, 5, 7 a 9 minut. Jako kontrola byly použity vzorky bez soli. Zároveň byla také sledována změna pH v kontrolních vzorcích, ke kterým byla přidána L-asparagináza. Po upečení a ochlazení se přidalo 10 ml deionizované vody a dobře se promíchaly. Vzorky se nechaly přes noc temperovat při laboratorní teplotě (teplota místnosti 22 ± 1 °C) a následně se změřilo pH výluhu.

Ke vzorkům bez pečení nebyla přidávána deionizovaná voda, ale vzorky byly připraveny v 10x větším objemu a pH bylo měřeno přímo v takto připraveném vzorku.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Vyhodnocení expozice

Vzhledem k tomu, že odhad expozice akrylamidem ve střední Evropě nebyl prozatím proveden, na získání obrazu o expozici a jejích zdrojích byl průzkum spotřebitelských zvyklostí uskutečněn na náhodné skupině spotřebitelů. Pro tento účel byla použita metoda standardizovaného rozhovoru pomocí dotazníku. Všechny výsledky získané z vyplněných dotazníků určených k vyhodnocení expozice akrylamidu byly zpracovány do elektronické formy pro jejich jednodušší manipulaci a zpracování.

Potraviny, na které byl dotazník zaměřen, a u nichž se při jejich přípravě předpokládá zvýšená tvorba akrylamidu, jsou uvedeny v Tab. 11. U jednotlivých potravin jsou uvedeny hodnoty obsahu akrylamidu a na základě dat zjištěných z dotazníků je uveden průměrný denní příjem akrylamidu z nich.

Tab. 11: Přehled dotazovaných potravin, obsah akrylamidu a jeho denní příjem z nich

Potraviny	Obsah akrylamidu [µg/g]		Příjem akrylamidu [µg/den]		Zdroj hodnot obsahu akrylamidu
	Min	Max	Min	Max	
Chléb konzumní	0,005	0,162	0,439	10,89	[74], [75]
Extrudovanýchléb	0,005	0,916	0,022	3,353	[74]
Pečivo	0,018	0,050	1,187	28,567	[74], [76]
Sladké pečivo	0,005	0,278	0,060	2,122	[74], [77], [26]
Topinka, pečený toast	0,030	3,200	0,302	32,189	[75]
Smažené bramborové hranolky	0,005	1,407	0,054	15,123	[74]
Pečené brambory	0,023		0,369		[77]
Smažené bramborové placky	0,532	0,692	1,058	1,378	[78]
Smažené bramborové chipsy	0,005	4,108	0,034	28,133	[74]
Solené opékané suchary (chlebové)	0,030	3,200	0,075	8,007	[75]
Slané snacky (tyčinky,...)	0,005	0,896	0,038	6,862	[74]

Potraviny	Obsah akrylamidu [µg/g]		Příjem akrylamidu [µg/den]		Zdroj hodnot obsahu akrylamidu
	Min	Max	Min	Max	
Kukuřičné křupky	0,005	0,032	0,009	0,057	[74]
Perník plněný	0,005	1,582	0,018	5,680	[74], [26]
Perníčky s polevou	0,005	0,698	0,024	3,315	[74], [26]
Medovník zdobený	0,401		0,087		[74]
Oplatky plněné	0,071	0,101	1,233	1,754	[74], [77]
Píškoty	0,005	0,024	0,018	0,085	[74]
Sladké sušenky neplněné	0,016	2,561	0,656	104,985	[77], [26]
Müsli tyčinky	0,005	0,070	0,026	0,364	[74]
Snídaňové cereálie	0,005	1,346	0,058	10,923	[74], [75], [77]
Káva	0,175	3,025	1,103	19,067	[74]
Kávoviny	0,050	0,070	0,048	0,068	[75]
Kakao	1,203		1,571		[74]
Horká čokoláda	0,032		0,061		[77]
Čokoláda	0,017		0,497		[77]
Čokoládový, čoko.– oříškový krém	0,017		0,053		[77]

Pro stanovení průměrného denního příjmu akrylamidu z potravin bylo osloveno celkem 285 lidí s rozdílným vzděláním, zaměstnáním a z různých okresů České a Slovenské republiky. Celkový počet dotazovaných tvořilo 69 mužů a 216 žen. Na Obr. 9 je znázorněn rozdílný podíl jednotlivých potravin na celkovém denním příjmu akrylamidu u mužů a u žen. Z grafů je patrné, že u mužů jsou hlavními zdroji akrylamidu sušenky a oplatky (22,7 %) a chipsy (21,2 %). V menší, ale nezanedbatelné míře je to pečivo (13,4 %) a topinky (11,2 %). U žen jsou dominantním zdrojem akrylamidu v každodenní stravě sušenky a oplatky (41,7 %). Vedlejšími zdroji je stejně jako u mužů pečivo (9,8 %) a topinky (10,9 %) a navíc i káva, kávoviny a čokoládové nápoje (8,5 %).

Muži



Ženy



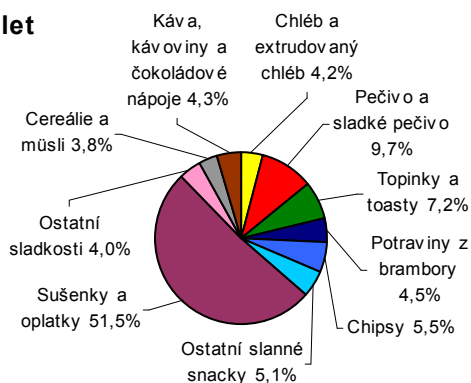
Obr. 9: Podíl jednotlivých potravin v denním příjmu akrylamidu u mužů a žen

Velmi zajímavé je také měnící se zastoupení potravin v denním příjmu akrylamidu s rostoucím věkem dotazovaných lidí. Z Obr. 10 je patrné, že k nejvýraznější změně v procentickém zastoupení dochází s přibývajícím věkem především u sušenek a oplatek, u kterých se podíl na denním příjmu akrylamidu spíše snižuje. Dále se mění zastoupení chleba a extrudovaných chlebů, topinek a toastů a kávy, kávovin a čokoládových nápojů. U těchto skupin potravin naopak dochází k nárůstu podílu na denním příjmu akrylamidu.

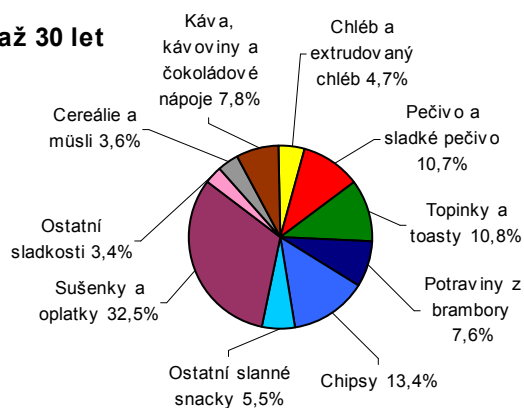
Výrazné i když očekávané rozdíly v podílu potravin na denním příjmu akrylamidu jsou také v hlavních denních jídlech (Obr. 11). Při snídani jsou hlavními zdroji akrylamidu cereálie (17,8 %), pečivo (13,6 %) a kakao a horká čokoláda (12,3 %). Během oběda jsou to podle očekávání hranolky (28,9 %), pečené brambory (29,5 %) a bramborové placky (20,4 %). V jídlech konzumovaných k večeři převládají jako hlavní zdroj akrylamidu topinky a toasty (17,0 %), chléb (13,4 %), bramborové placky (12,3 %) a pečivo (11,8 %). Mimo hlavní jídla se významnou měrou na dennímu příjmu akrylamidu podílejí především sladkosti – sušenky a oplatky (14,2 %), čokoláda (11,2 %) a perníky (10,7 %), v menší míře přispívají také různé slané snacky.

Z Obr. 11 je taktéž patrné, že některé potraviny jsou konzumovány bez ohledu na denní dobu. Jedná se především o kávu, která významně přispívá k dennímu příjmu akrylamidu, dále je to chléb a pečivo a v neposlední řadě i nejrůznější sladkosti.

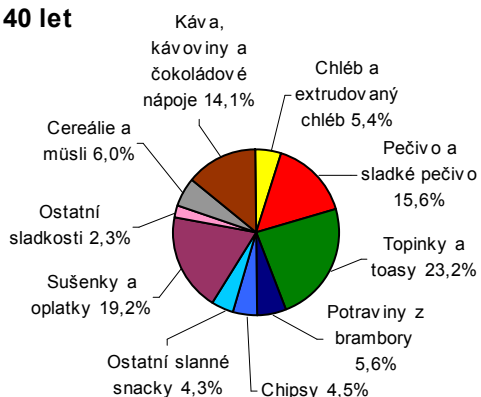
do 20 let



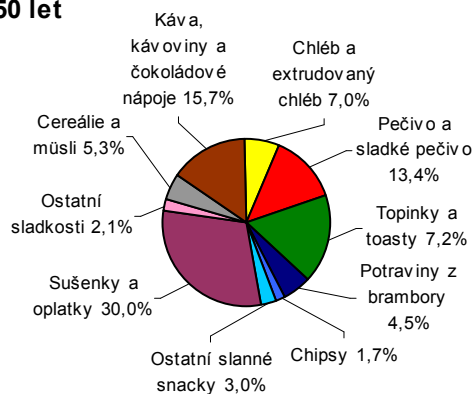
21 až 30 let



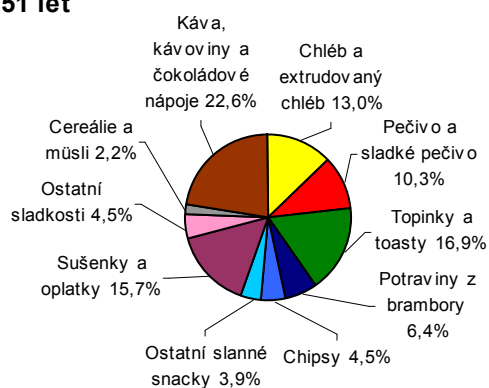
31 až 40 let



41 až 50 let



nad 51 let

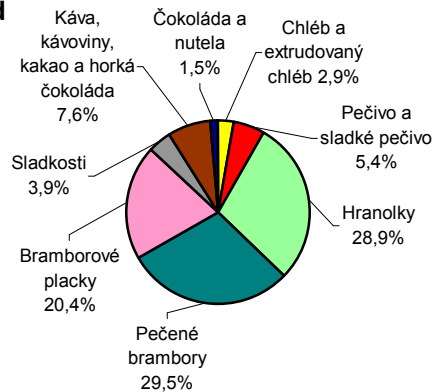


Obr. 10: Změny v zastoupení potravin v denním příjmu akrylamidu se zvyšujícím se věkem

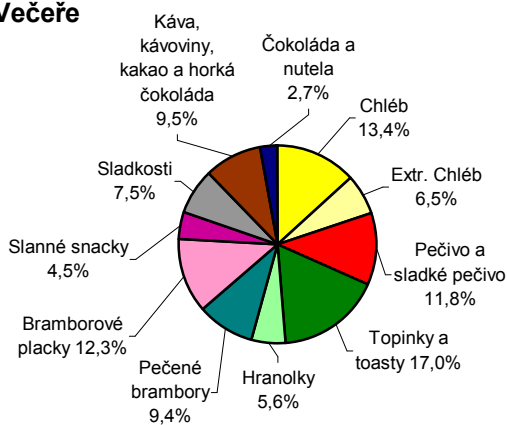
Snídaně



Oběd



Večeře



Ostatní jídla



Obr. 11: Procentické zastoupení potravin podílejících se na denním příjmu akrylamidu v hlavních denních jídlech

5.2 Vyhodnocení vlivu solí a L-asparaginázy na obsah akrylamidu v perníkách

Pro hodnocení vlivu solí a L-asparaginázy na obsah akrylamidu v reálné potravinové matici, byly použity perníky poskytnuté firmou I.D.C. Holding, a.s. z pracoviště v Seredi. Tyto perníky obsahovali 3 různé kypřící soli a byl sledován jejich vliv na obsah akrylamidu i na enzymatickou eliminaci akrylamidu. Z výsledků se následně zjišťovalo, které kypřící činidlo má pozitivní vliv na obsah akrylamidu v perníkách a také neovlivňuje působení enzymu L-asparaginázy, aby mohlo být využíváno v praxi pro produkci perníků s co nejnižším obsahem akrylamidu.

5.2.1 Stanovení obsahu akrylamidu v perníkách

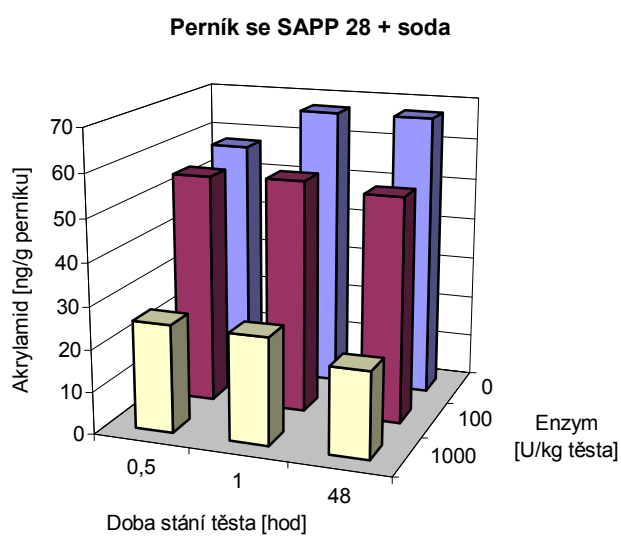
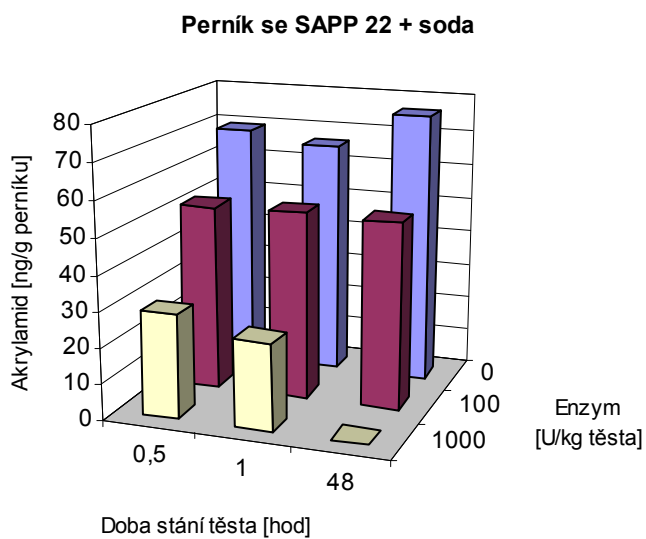
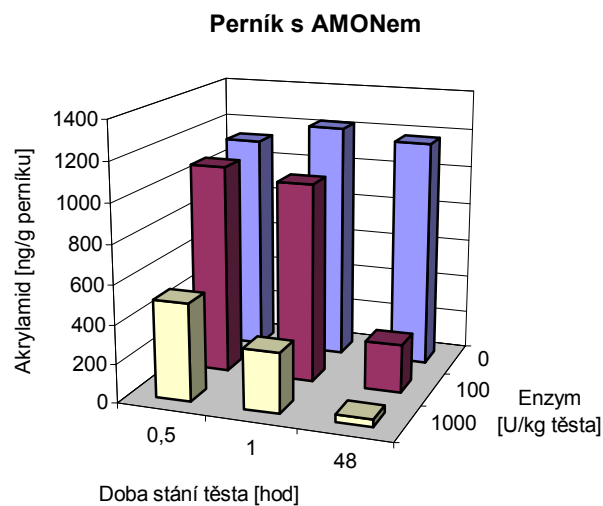
Stanovením obsahu akrylamidu v perníkách byla zjišťována účinnost enzymu L-asparaginázy ve spojení s použitým kypřícím činidlem v závislosti na čase a také, která kombinace enzym + kypřidlo je nejefektivnější. Stanovení obsahu akrylamidu bylo prováděno ve třech paralelních měření a z nich byla vypočítána výsledná průměrná hodnota.

Z výsledků (Obr. 12) je patrné, že u perníků bez přídavku enzymu dochází k pomalému nárůstu obsahu akrylamidu s prodlužující se dobou stání těsta. Je zde také vidět, že perníky s NH_4HCO_3 , nebo-li AMONem mají obsah akrylamidu až 17x vyšší než perníky, kde byly jako kypřící činidlo použity $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ a NaHCO_3 , tedy SAPP 22 nebo 28 se sodou (podle informací od výrobce: SAPP 22 působí pomaleji než SAPP 28, což by mělo vést k lepšímu nakypření těsta), z čehož vyplývá, že pro snížení denního příjmu akrylamidu je vhodnější používat tyto kypřidla.

V případě přídavku 100 U L-asparaginázy na 1 kg těsta došlo u všech tří druhů perníků ke snižování obsahu akrylamidu s prodlužující se dobou působení enzymu. V případě perníků se sodnými solemi byl ale pokles s prodlužující se dobou minimální. Naproti tomu u perníků s AMONem došlo po 48 hodinách ke značnému snížení obsahu akrylamidu (až o 79 %).

Při použití 1000 U L-asparaginázy na 1 kg těsta došlo ve všech typech perníků k výraznějšímu snížení obsahu akrylamidu. V případě perníku se SAPP 28 + soda bylo úbytek obsahu akrylamidu s prodlužující se dobou stání po počátečním výrazném poklesu (po 30 minutách pokles o 55 %) jen minimální (po 48 hodinách už jen asi o dalších 10 %). Naopak u perníků s AMONem a SAPP 22 + soda se obsah akrylamidu dále snižoval s prodlužující se dobou působení L-asparaginázy. Po 48 hodinách došlo u perníku s AMONem k téměř úplné eliminaci akrylamidu (o 97 %) a u perníků se SAPP 22 + soda byl akrylamid eliminován úplně.

Z výsledků i přes příznivý vliv L-asparaginázy vyplývá, že nejvhodnějším kypřidlem pro snížení obsahu akrylamidu jsou sodné soli, protože při použití amonné soli jako kypřidla lze dosáhnout hodnot obsahu akrylamidu srovnatelných s hodnoty u perníků se sodnými solemi až při přídavku 1000 U L-asparaginázy na 1 kg těsta a době jejího působení 48 hodin.



Obr. 12: Obsah akrylamidu v perníkách v závislosti na obsahu enzymu a době stání těsta
(RSD ± do 10 %)

5.2.2 Stanovení obsahu aminokyselin v perníkách

Ve vzorkách perníků a těsta byla také stanovována změna obsahu aminokyselin (Asn, Asp, Gln, Glu) v závislosti na obsahu a době působení L-asparaginázy. Stanovení bylo prováděno ve třech paralelních měření a z nich byla vypočítána výsledná průměrná hodnota.

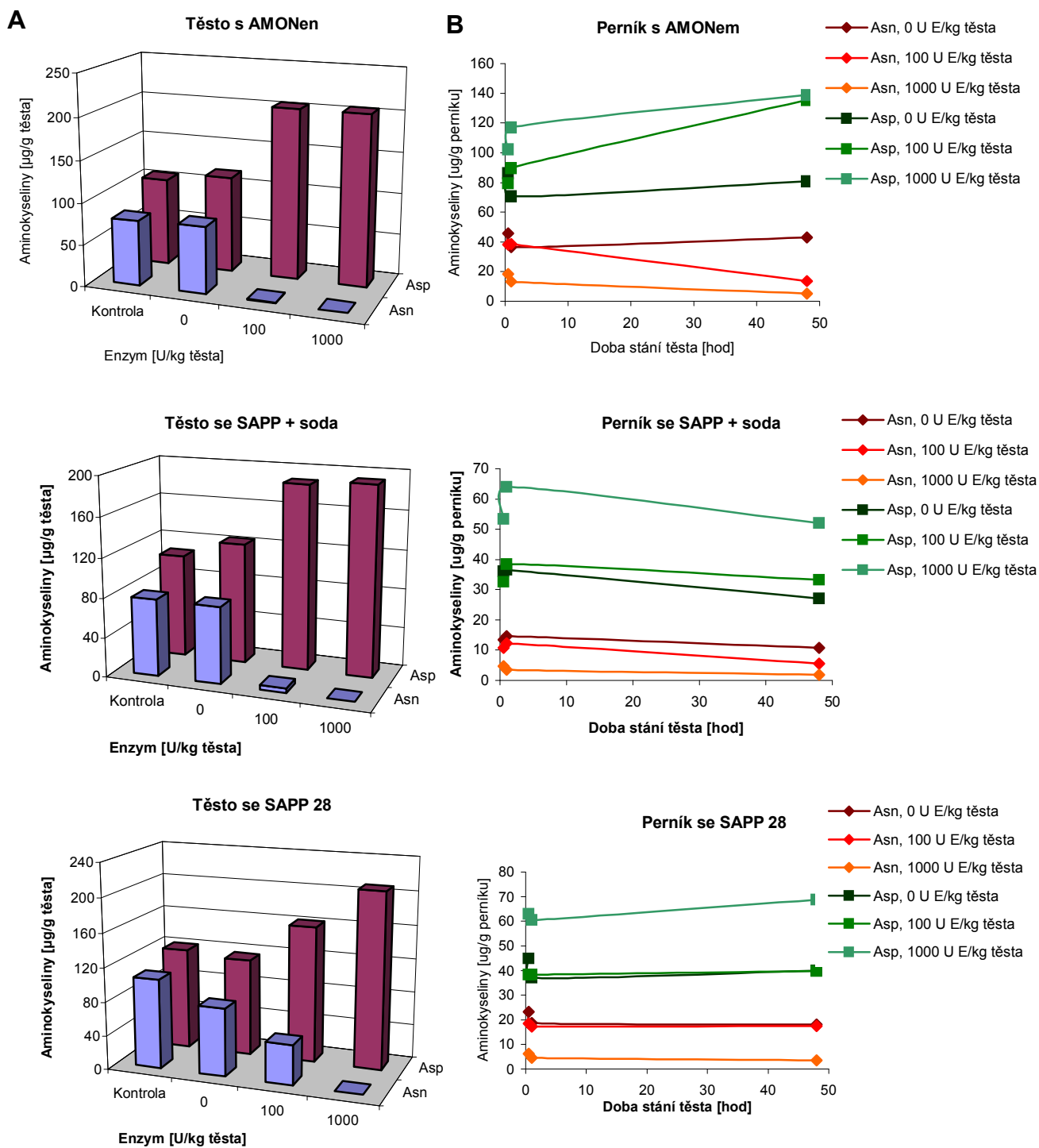
Jak je vidět na Obr. 13A působením L-asparaginázy v těstech (doba působení byla více jak 48 hodin) dochází k přeměně asparaginu na kyselinu asparagovou, což se projevilo snížením jeho obsahu a zvýšením obsahu kyseliny asparagové. Ke statisticky významným změnám v obsahu glutaminu a kyseliny glutamové v perníkách i jejich těstech nedocházelo, proto nejsou na Obr. 12 zobrazeny.

Jednotlivé druhy těsta se vyznačovaly rozdílnou rychlostí konverze asparaginu na kyselinu asparagovou. Nejpomalejší reakce byla pozorovaná v těstě s přísadkou SAPP 28 + soda. V těstech s AMONem nebo SAPP 22 + soda při obsahu L-asparaginázy 100 U/kg těsta byl obsah asparaginu téměř úplně eliminován. Při aplikaci 1000 U L-asparaginázy na 1 kg těsta dochází k eliminaci asparaginu ve všech těstech pod mez stanovení (LOQ < 20 ng/g).

Na proti tomu výsledky stanovení obsahu aminokyselin po upečení (Obr. 13B) ukazují, že v perníkách je i po aplikaci L-asparaginázy a době působení 48 hodin asparagin přítomen, i když jeho obsah je velmi nízký. To může být způsobeno tím, že v těstech oproti perníkům působila L-asparagináza déle než 48 hodin. Druhou možností je, že během pečení by mohlo docházet k uvolňování vázaného asparaginu a jeho obsah znovu narůstá i přesto, že byl v těstě enzymaticky odbourán, což znamená, že enzymaticky nelze připravit perník úplně bez obsahu akrylamidu. Pro prokázání jedné z těchto možností by bylo ale nutné zajistit, aby stanovení aminokyselin v těstech bylo provedeno ihned po uplynutí dané doby působení L-asparaginázy. Bohužel to nebylo možné vzhledem k tomu, že vzorky těst byly poskytnuty firmou I.D.C. Holding, a.s. až po více jak 2 dnech.

V případě porovnání výsledného obsahu aminokyselin (Obr. 13B) a akrylamidu (Obr. 12) v perníkách je patrné, že působením L-asparaginázy dochází k eliminaci asparaginu a nárůstu obsahu kyseliny asparagové, což vede i ke snížení obsahu akrylamidu. Při aplikaci L-asparaginázy o $c = 1000$ U/kg těsta dochází po 1 hodině ke snížení obsahu asparaginu ve všech třech těstech o 60 – 70 % a po 48 hodinách je eliminováno více jak 80 %. Toto snížení vede i k eliminaci akrylamidu, protože v perníkách s AMONem a se SAPP 22 + soda, v nichž byl stejný obsah L-asparaginázy a byla použita stejná doba působení, došlo ke snížení obsahu akrylamidu až o více jak 96 %. Zajímavé je, že v perníkách se SAPP 28 + soda, i přestože je

eliminováno až 80 % obsahu asparaginu, je pokles obsahu akrylamidu asi o 16 % nižší než u ostatních dvou těst.



Obr. 13: Obsah aminokyselin v těstech (A) a v perníkách (B) v závislosti na obsahu enzymu a u perníků na době stání těsta (RSD ± do 10 %)

V perníkách s AMONem byla účinnost eliminace asparaginu L-asparaginázou při jejím obsahu 100 a 1000 U/kg těsta velmi podobná, což je z praktického hlediska velmi zajímavé.

Zvláštností také je, že v případě perníků se SAPP 22 + soda dochází kromě poklesu obsahu asparaginu také přibližně po hodině stání těsta i k poklesu obsahu kyseliny asparagové a to jak v těstě bez L-asparaginázy tak i v těstech s jejím přídavkem. To může být způsobeno tím, vlivem přítomnosti SAPP 22 + soda dochází v těstě k procesům, které se následně projeví jako pokles obsahu kyseliny asparagové.

5.2.3 Vyhodnocení barvy perníků

Výsledné zbarvení bylo porovnáváno u perníků obsahující jako kypřící činidlo NH_4HCO_3 nebo $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ v kombinaci s NaHCO_3 (jedlá soda) s perníky, k nimž byl navíc přidán enzym L-asparagináza (100 nebo 1000 U/kg těsta) pro minimalizaci vznikajícího akrylamidu, jejíž doba působení byla 30 nebo 60 minut. Cílem bylo zjistit, zda působením L-asparaginázy nedochází k ovlivnění konečného zbarvení perníku, které je jedním z klíčových faktorů pro přijetí spotřebitelem.

Měření barvy perníků bylo provedeno ve dvou paralelních stanovení, z nichž byly vypočítány průměrné hodnoty (viz Tab. 12). Tyto výsledky byly vyhodnocovány použitím jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA: jeden faktor). Na základě této metody bylo zjištěno, že odbouráním asparaginu L-asparaginázou nedochází k ovlivnění výsledné barvy perníků a to jak při nižší tak i při vyšším obsahu enzymu.

Výrazný dopad na barvu perníků byl však pozorovaný vlivem změny kypřícího činidla, barva v případě sodných solí byla výrazně světlejší jak v případě amonné soli. Také byly výrazně ovlivněny další sensorické vlastnosti hotového výrobku (křehkost, pružnost, stopy slané chuti atd.), což v konečném důsledku znemožňuje použití samotných sodných solí jako kypřícího činidla v tomto druhu výrobku bez negativního dopadu na očekávané sensorické vlastnosti a akceptovatelnost spotřebitelem. Naproti tomu v případě aplikace enzymu nebyly pozorovány žádné změny v kvalitativních parametrech finálního produktu.

Tab. 12: Výsledné hodnoty měření barvy u jednotlivých druhů perníku v systému CIELab
(SD ± do 12 %)

Perníky	L*	a*	b*
AMON	43,55	13,29	14,58
AMON, 30 min	47,45	14,15	19,75
AMON, 60 min	46,33	13,15	15,79
AMON, 100 U	41,67	13,16	14,89
AMON, 100 U, 30 min	46,61	13,77	18,42
AMON, 100 U, 60 min	45,44	13,34	16,23
AMON, 1000 U	39,27	12,09	11,63
AMON, 1000 U, 30 min	47,89	14,23	19,18
AMON, 1000 U, 60 min	46,35	13,64	15,89
SAPP 22 + soda	60,60	16,18	31,97
SAPP 22 + soda, 100 U	57,02	15,32	28,89
SAPP 22 + soda, 30 min	60,49	13,18	28,71
SAPP 22 + soda, 60 min	57,39	14,27	26,84
SAPP 22 + soda, 100 U, 30 min	61,60	14,59	28,42
SAPP 22 + soda, 100 U, 60 min	60,05	13,55	26,33
SAPP 22 + soda, 1000 U	53,85	14,73	26,81
SAPP 22 + soda, 1000 U, 30 min	62,20	13,70	29,76
SAPP 22 + soda, 1000 U, 60 min	58,94	13,59	28,66
SAPP 28 + soda	53,75	13,20	22,63
SAPP 28 + soda, 30 min	63,73	13,70	29,87
SAPP 28 + soda, 60 min	62,05	14,37	30,50
SAPP 28 + soda, 100 U, Pec	58,13	14,62	28,41
SAPP 28 + soda, 100 U, 30 min	61,18	13,53	28,45
SAPP 28 + soda, 100 U, 60 min	61,27	14,69	29,26
SAPP 28 + soda, 1000 U, Pec	51,69	14,03	25,00
SAPP 28 + soda, 1000 U, 30 min	61,39	13,36	29,06
SAPP 28 + soda, 1000 U, 60 min	59,60	14,60	28,01

5.3 Vyhodnocení vlivu solí a L-asparaginázy na obsah akrylamidu v modelovém systému

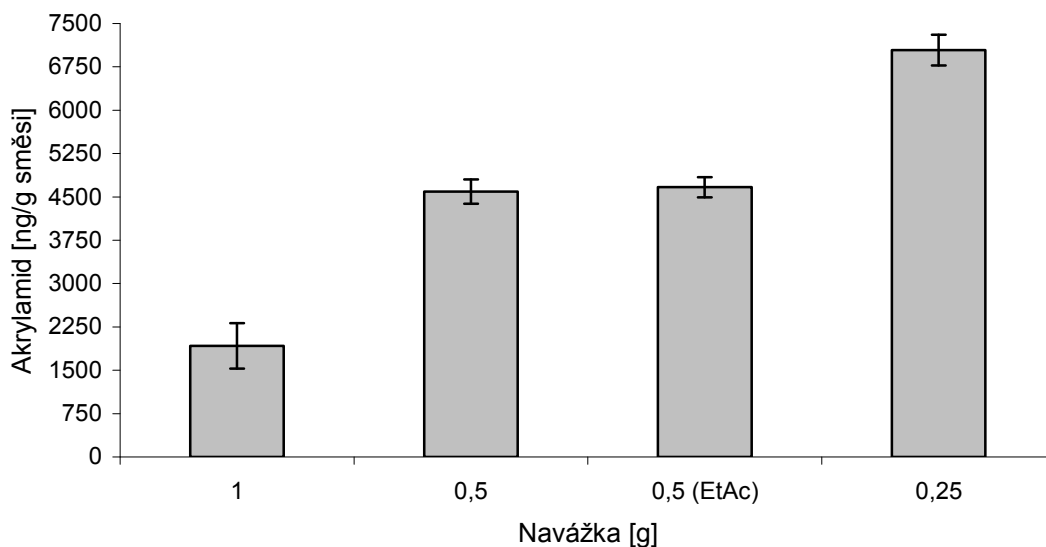
Na základě výsledků v aplikaci různých kypřících látek (amonných a sodných solí) v pernicích (viz kapitola 5.2.1) je zřejmý vliv těchto anorganických solí na výsledný obsah akrylamidu a také jejich účinek na enzymatickou eliminaci. Z výsledků bylo vidět, že hydrogenuhličitan amonný působil jako akcelerátor tvorby akrylamidu a proto by bylo vhodné jej nahradit sodnými solemi. Na druhé straně sodné soli mohou ovlivňovat aktivitu enzymu, z tohoto hlediska by bylo vhodnější aplikovat SAPP v kombinaci se sodou.

Na základě těchto výsledků byla tedy další část práce zaměřena na studium vlivu širokého spektra anorganických solí na obsah akrylamidu i na enzymatickou eliminaci akrylamidu v modelových podmínkách, které simulují cereální potravinovou matici a navazuje tak na předcházející práce úspěšné aplikace L-asparaginázy v bramborách [71] i v cereálních výrobcích [79]. Testované anorganické soli byly vybrány z řad jednomocných (sodných, draselných a amonných) a dvojmocných (vápenatých) solí chloridů, fosforečnanů, uhličitanů, citranů a mléčnanu.

5.3.1 Volba modelové směsi

Pro další měření bylo nutné zvolit optimální navážku suché modelové směsi, jejíž složení je uvedeno v Tab. 10 (viz kapitola 4.3.3.2). Na základě výsledků, které jsou uvedeny na Obr. 14, byla jako nejvhodnější navážka směsi zvolena 0,5 g. Při této navážce byly získány nejmenší směrodatné odchylky stanovení obsahu akrylamidu a také byla zabezpečena optimální homogenita směsi.

Z obrázku je také patrné, že analýzou vzorků získaných extrakcí CH_3COOH (0,2 mmol/l) lze dosáhnout srovnatelných výsledků jako u vzorků, z nichž byl akrylamid extrahován pomocí ethylacetátu. Preextrakci do ethylacetátu je ale nutné provádět u modelových vzorků s obsahem solí, u vzorek bez soli ji lze vynechat.

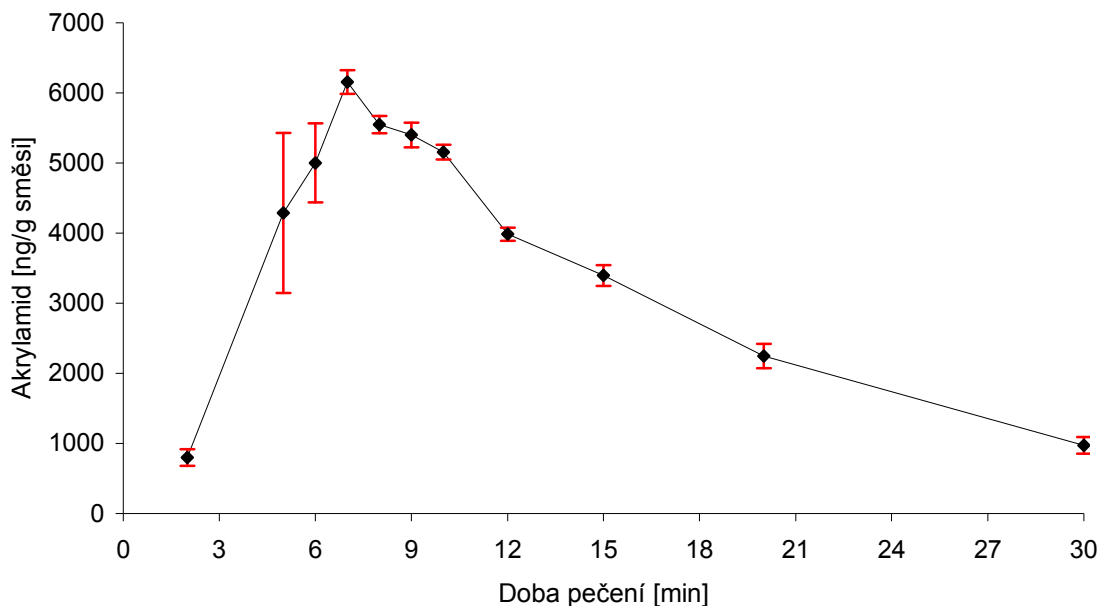


Obr. 14: Obsah akrylamidu ve vzorkách modelových směsí s různou navázkou (EtAc - akrylamid získaný ze vzorků extrakcí ethylacetátem)

5.3.2 Kinetika tvorby akrylamidu v modelové směsi

Na Obr. 15 je vidět měnící se obsah akrylamidu v závislosti na době pečení. Maxima tvorby akrylamidu je dosaženo v 7 minutě pečení. Poté se obsah akrylamidu snižuje, což je pravděpodobně způsobeno tím, že dochází k jeho polymerizaci jak uvedl ve své studii Stadler *et al.* [28] nebo Kolek *et al.* [53].

Po dosažení maxima byly hodnoty akrylamidu změřené v jednotlivých časech přibližně rovnoměrné, oproti strmému nárůstu před dosažením maxima, kdy hodnoty v jednotlivých časech značně kolísaly. Mezi 8 – 10 minutou byla rychlost vzniku i zániku akrylamidu přibližně stejná a množství vytvořeného akrylamidu bylo v těchto časech velmi podobné (rozdíly v hodnotách byl zhruba do 3,7 %), proto byla pro další měření zvolena doba pečení 9 minut.



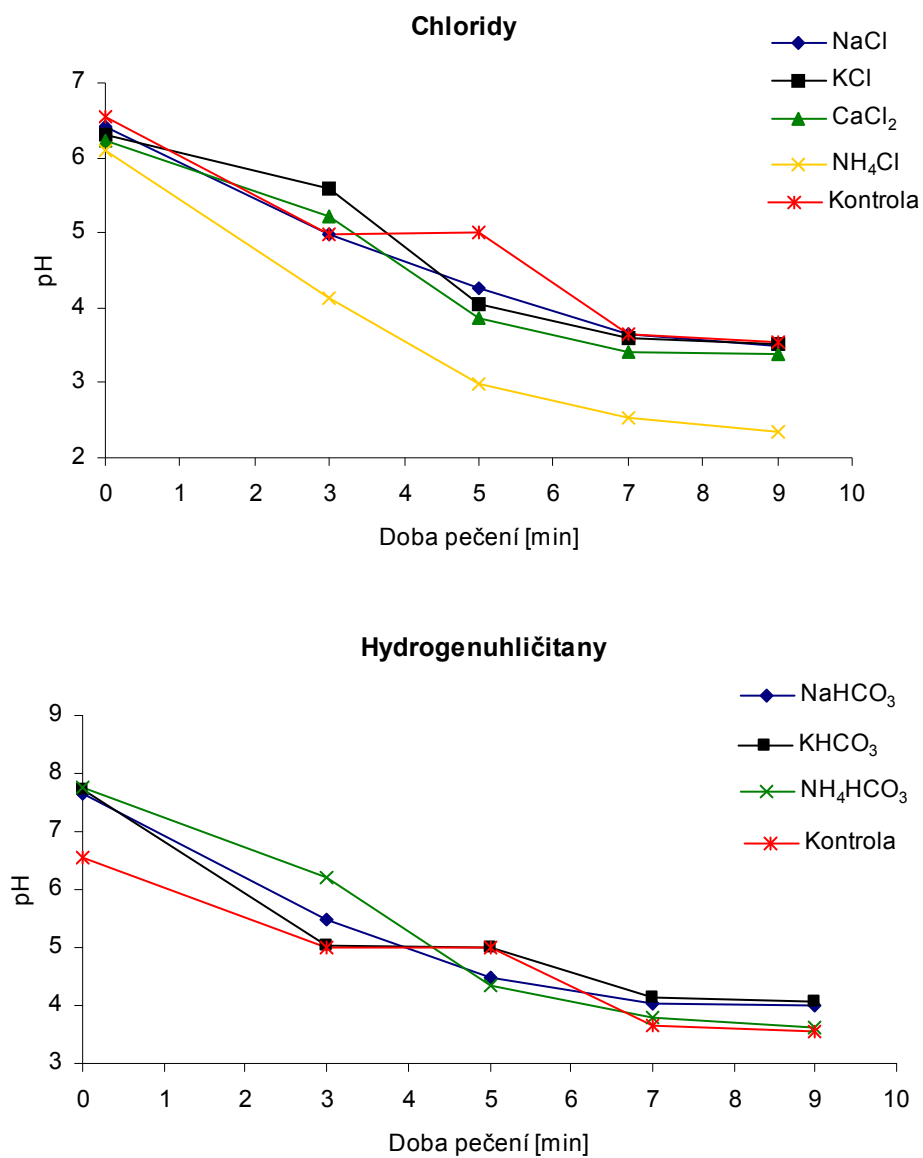
Obr. 15: Závislost obsahu akrylamidu v modelové směsi na době pečení při teplotě 190 °C

5.3.3 Vliv pH na tvorbu akrylamidu

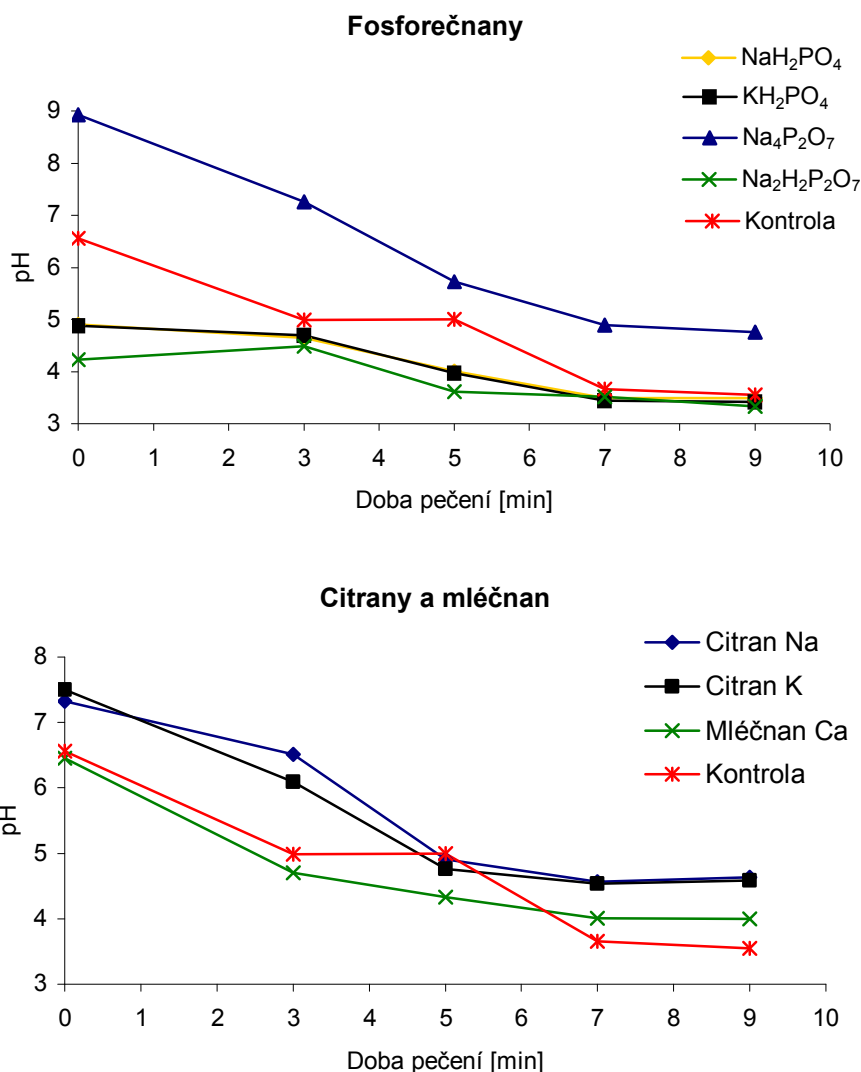
Po čas pečení vzorků modelové směsi s přidavkem soli byly sledovány změny pH, které má vliv na tvorbu akrylamidu. Průběh změny pH u vzorků je znázorněn na Obr. 16A a B, kde jsou soli rozděleny do skupin podle anionů. Z obrázku je patrné, že v přítomnosti chloridů se pH vzorků během pečení nijak zvlášť nemění kromě NH_4Cl , který pH výrazně snižuje.

V případě hydrogenuhličitanů dochází ke zvýšení hodnoty pH modelové směsi na počátku, ale postupně během pečení dochází ke poklesu a přiblížení se hodnotám pH v kontrole. Oproti tomu fosforečnany zase počáteční pH směsi snižují, avšak během pečení nedochází k výraznému poklesu pH a v závěru pečení je zde pH stejné jako v kontrole. Výjimkou je difosforečnan tetrasodný, jehož přítomností je především vstupní pH značně zvýšené a postupně během pečení dochází k jeho poklesu.

Poslední skupinou jsou citrany, které hodnoty pH oproti hodnotám kontroly zvýšily. Mléčnan vápenatý ovlivňuje pH až v závěru pečení, kdy v jeho přítomnosti nedochází k takovému snížení pH oproti kontrole.



Obr. 16A: Změny pH modelových vzorků s obsahem solí chloridů a hydrogenuhlčitanů ($c = 0,1 \text{ mmol/g}$) během pečení při $190 \text{ }^\circ\text{C}$



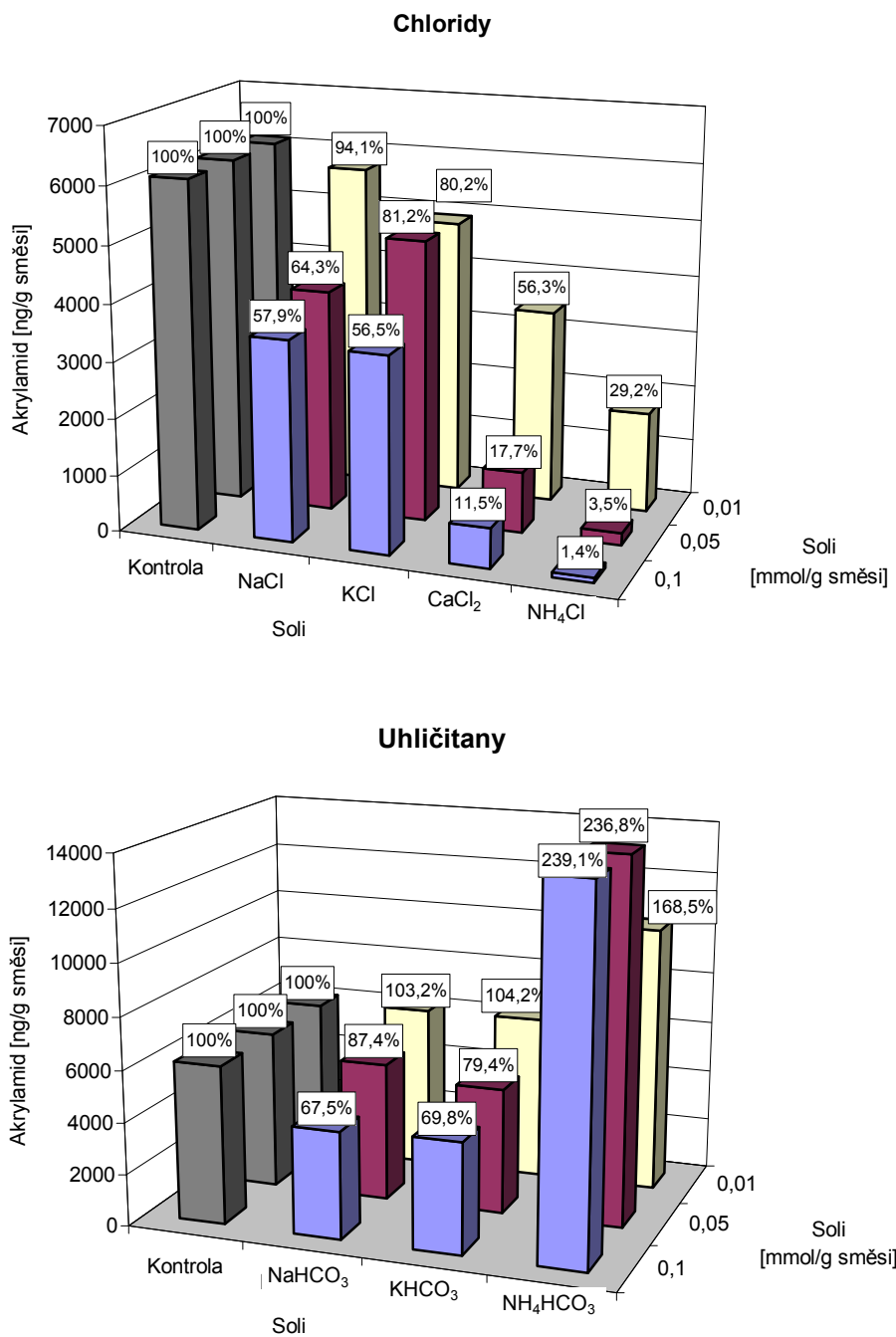
Obr. 16B: Změny pH modelových vzorků s obsahem solí fosforečnany, citrany a mléčnan ($c = 0,1 \text{ mmol/g}$) během pečení při $190 \text{ }^\circ\text{C}$

Na základě těchto výsledků měření pH během pečení se předpokládalo, že účinnost solí v eliminaci akrylamidu, která byla následně zjišťována stanovováním obsahu akrylamidu v modelové směsi po aplikaci solí, bude dána především jejich vlivem na pH směsi. Tedy, že čím více sůl sníží pH směsi, tím více sníží obsahu akrylamidu. Tento předpoklad byl založen na výsledcích studie De Vleeschouwer *et al.* [46], kteří zjistili, že snížení pH vede ke snížení obsahu akrylamidu.

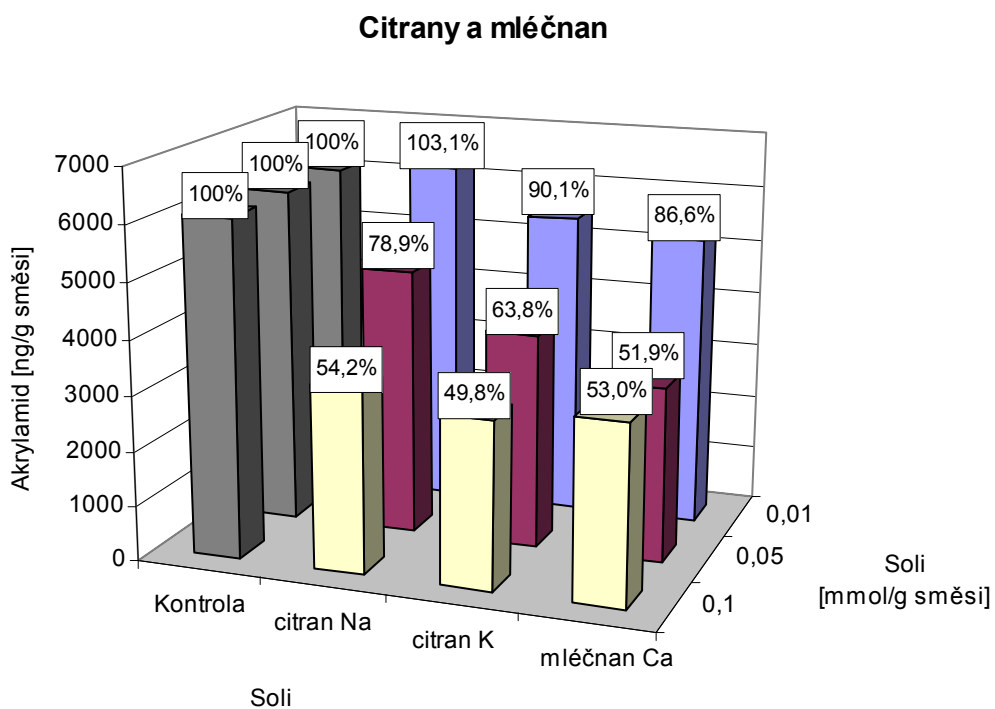
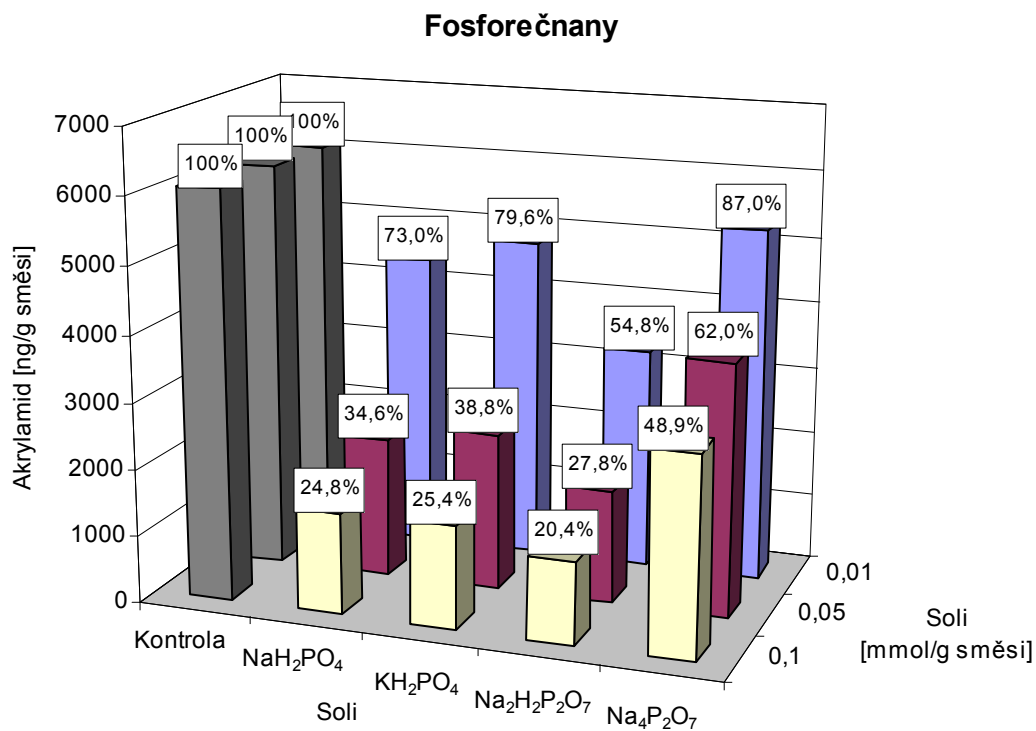
5.3.4 Vliv anorganických solí na tvorbu akrylamidu v modelové směsi

Výsledné hodnoty stanovení vlivu anorganických solí na tvorbu akrylamidu v modelové směsi jsou uvedeny na Obr. 17A a B. Anorganické soli jsou do grafů rozděleny podle anionu.

V grafech je nad každým sloupcem, který vyjadřuje obsah akrylamidu stanoveného v modelové směsi v závislosti na přidané soli, uvedena hodnota. Tato hodnota vyjadřuje obsah akrylamidu v % v daném vzorku v porovnání s kontrolním vzorkem bez soli.



Obr. 17A: Obsah akrylamidu v modelové směsi v závislost na obsahu přidané soli (chloridy, uhličitaný) (RSD ± do 10 %)



Obr. 17B: Obsah akrylamidu v modelové směsi v závislosti na obsahu přidané soli (fosforečnany, citrany a mléčnan) (RSD ± do 10 %)

Z výsledků je zjevné, že na výsledný obsah akrylamidu v modelové směsi má největší vliv nejvyšší obsah soli (0,1 mmol/g směsi). Je zde také vidět, že soli mají převážně pozitivní účinek, tedy že snižují obsah akrylamidu. Výjimkou je NH_4HCO_3 , který obsah akrylamidu naopak zvyšuje. U ostatních solí dochází se zvyšujícím se obsahem ke snižování obsahu akrylamidu v modelové směsi. Tato účinnost ale není lineární, její průběh je spíše hyperbolický. Tato zjištění se shodují s výsledky, které uvedl Kolek *et al.* [52] pro NaCl.

Tab. 13: Vliv solí na poměrné snížení obsahu akrylamidu [%] ($SD \pm$ do 8 %)

Sůl	0,01 mmol/g	0,05 mmol/g	0,1 mmol/g
NH_4Cl	70,8	96,5	98,6
CaCl_2	43,7	82,3	88,5
$\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$	45,2	72,2	79,6
NaH_2PO_4	27,0	65,4	75,2
KH_2PO_4	20,4	61,2	74,6
$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$	13,0	38,0	51,1
Citran K	9,9	36,2	50,2
Mléčnan Ca	13,4	48,1	47,0
Citran Na	0,0	21,1	45,8
KCl	19,8	18,8	43,5
NaCl	5,9	35,7	42,1
NaHCO_3	0,0	12,6	32,5
KHCO_3	0,0	20,6	30,2
NH_4HCO_3	+69,0	+137,0	+139,0

Eliminační účinnost jednotlivých solí není stejná, což je vidět v Tab. 13, v níž jsou soli seřazeny podle účinnosti snížení obsahu akrylamidu v modelové směsi při obsahu 0,1 mmol/g směsi. Eliminační účinnost solí je zde vyjádřena jako pokles obsahu akrylamidu v procentech.

U NH_4Cl je účinnost snížení obsahu akrylamidu velmi vysoká, již při jeho obsahu 0,05 mmol/g směsi je obsah akrylamidu snížen o 96,5 %. To je pravděpodobně způsobeno značným snížením pH během pečení v přítomnosti NH_4Cl (viz Obr. 16A v kapitole 5.3.3), protože nižší pH je významným faktorem v eliminaci akrylamidu.

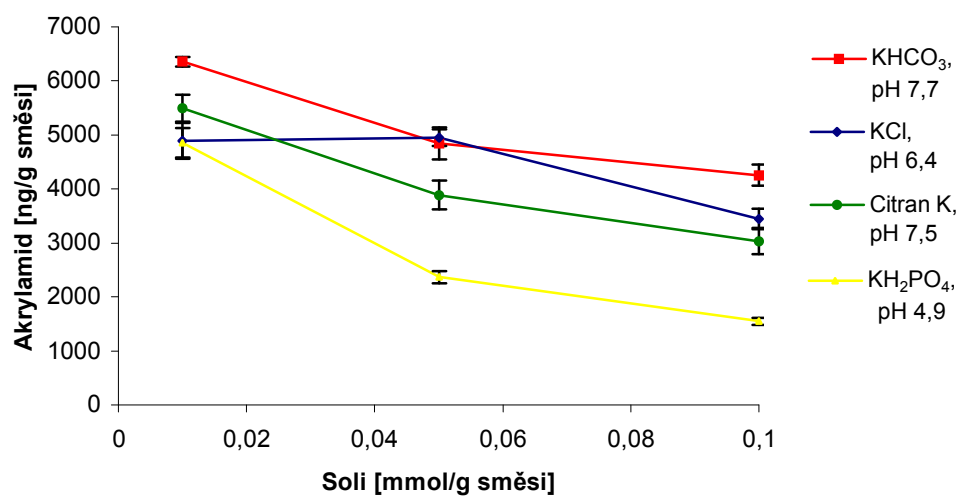
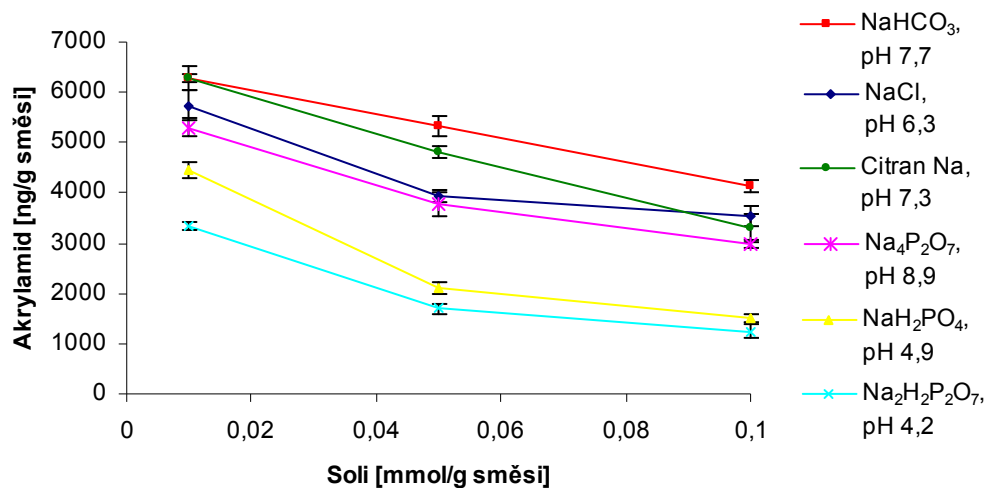
V případě chloridu vápenatého (0,05 mmol/g směsi) je také akrylamid velmi účinně eliminován, téměř o 83 %. U ostatních chloridů, NaCl a KCl, je účinnost mnohem nižší. Při

0,1 mmol/g směsi bylo eliminováno asi 44 % obsahu akrylamidu, při nižším obsahu byl NaCl účinnější než KCl. Tyto výsledky při porovnání účinnosti NaCl a CaCl₂ jsou ve shodě s výsledky Gökmen *et al.* [80], kteří uvádějí ve své studii, že dvojmocný kladný ion Ca²⁺ je efektivnější než jednomocný Na⁺. Podle jejich studie mají kladné ionty vliv na první kroky při tvorbě akrylamidu, kdy dochází k formaci Schiffovy báze mezi karbonylem a α-aminoskupinou asparaginu přes dehydrataci N-glykosylové složky a na základě měření zjistili, že Ca²⁺ přímo brání vzniku Schiffovy báze a tím i tvorbě akrylamidu. Druhý možný mechanismus eliminace akrylamidu vlivem solí uvádí Kolek *et al.* [51]. Ti pomocí DSC zjistili, že polymerizaci, kterou je akrylamid po dosažení maxima tvorby transformován na biologicky inaktivní polyakrylamid, lze urychlit přidavkem NaCl do potravinové matrice.

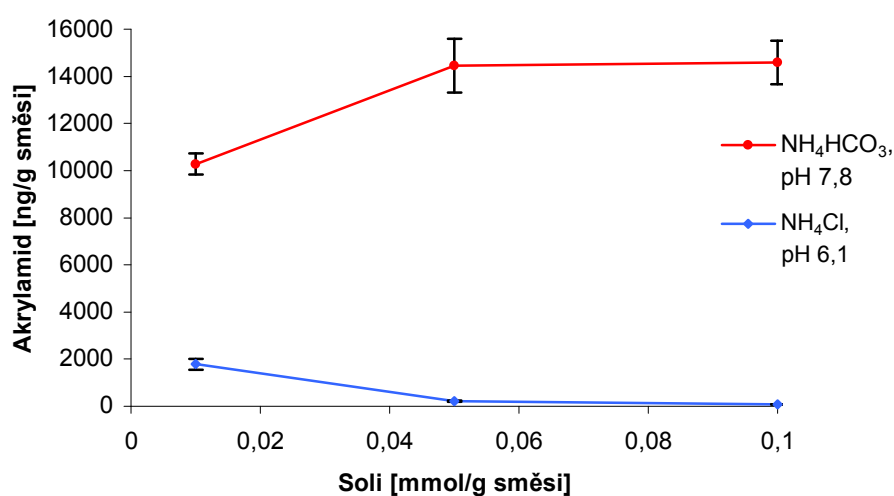
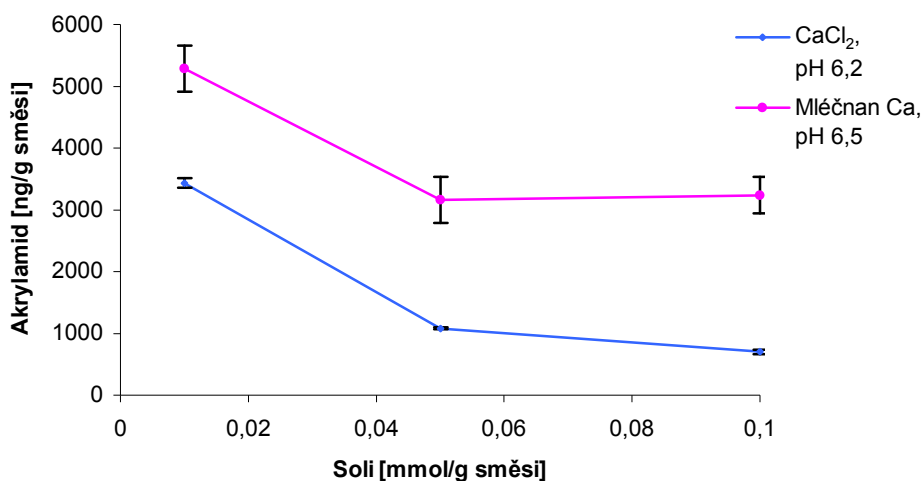
Velmi účinné jsou v eliminaci akrylamidu fosforečnanové soli. Nejúčinnější z nich je Na₂H₂P₂O₇, který při obsahu 0,1 mmol/g směsi snížil obsah akrylamidu téměř o 80 %. Velmi účinné jsou také NaH₂PO₄ a KH₂PO₄ jejichž eliminační účinnost byla přibližně 75 %. Na₄P₂O₇ už byl účinný o poznání méně, ale i přesto snížil obsah akrylamidu na polovinu. Citran draselný byl v eliminaci akrylamidu stejně účinný. Citran sodný byl méně účinný, k poklesu došlo přibližně o 45 %. Zajímavé je, že průběh eliminace akrylamidu v závislosti na obsahu soli byl u citranu sodného a Na₄P₂O₇ lineární.

Zajímavý je také vliv mléčnanu vápenatého. Jeho schopnost eliminace akrylamidu je při obsahu 0,1 a 0,05 mmol/g směsi takřka stejná. V obou případech dochází k eliminaci přibližně do 50 %.

Z dalších výsledků stanovení vlivu anorganických solí na obsah akrylamidu v modelové směsi je také vidět, že vznik akrylamidu lze ovlivnit použitím hydrogenuhličitanových solí, jak už uvedli ve své studii Levine *et al.* [54], i když jejich účinnost je v porovnání s ostatními solemi nejnižší. Účinnosti eliminace akrylamidu jsou u NaHCO₃ a KHCO₃ shodné a při nejvyšším obsahu dochází ke snížení téměř o 33 %. Naopak NH₄HCO₃, jak již bylo zmíněno, obsah akrylamidu značně zvyšuje a to při nejvyšším obsahu až 2,4x. Podle studií Amrein *et al.* [55] a Biedermann *et al.* [56] je obsah akrylamidu pomocí hydrogenuhličitanu amonného významně zvyšován hlavně v potravinách obsahující přidaný sacharid, kde NH₄HCO₃ zvyšuje tvorbu cukerných fragmentů (glyoxal a methylglyoxal), které velmi rychlou reakcí s asparaginem vedou k vyššímu obsahu akrylamidu než přirozené redukující sacharidy za mírných podmínek [38].



Obr. 18A: Eliminace akrylamidu v modelové směsi sodnými a draselnými solemi v závislosti na jejich obsahu



Obr. 18B: Eliminace akrylamidu v modelové směsi vápenatými a amonnými solemi v závislosti na jejich obsahu

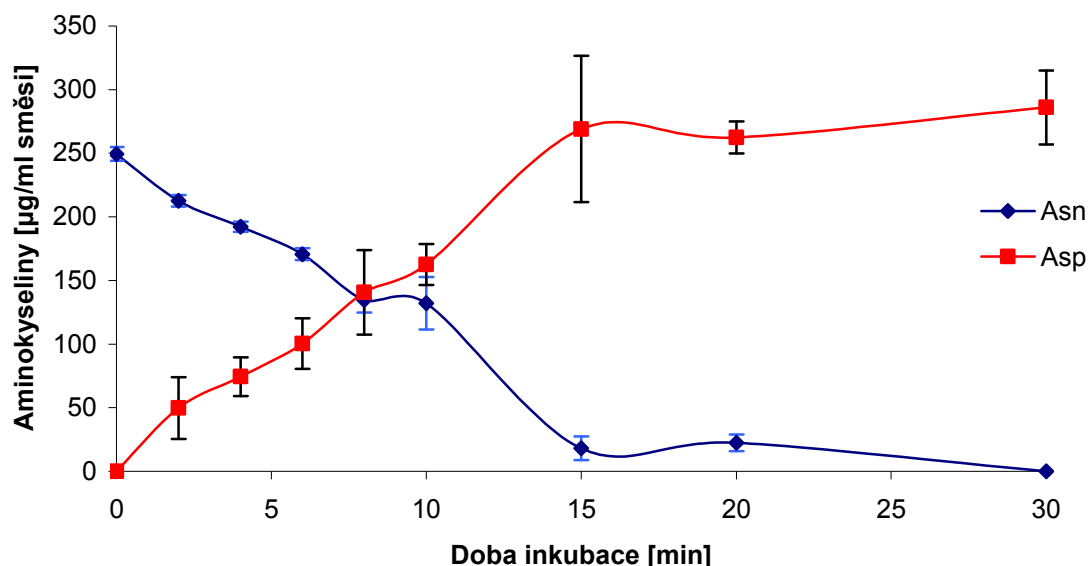
Z Obr. 18A i B, kde jsou soli rozděleny do grafů podle kationů, je vidět, že efektivnost solí v eliminaci akrylamidu je převážně způsobena snížením pH vzorků modelové směsi před pečením.

Tyto výsledky vlivu solí na obsah akrylamidu v modelové směsi jsou velice zajímavé, protože řada z nich je v potravinářském průmyslu používána v koncentracích, které odpovídají zde používanému nejvyššímu obsahu soli (0,1 mmol/g). Proto by bylo možné využít těchto poznatků i v praxi pro eliminaci akrylamidu v potravinách. Nevýhodou ale je, že účinek snížení obsahu akrylamidu těchto solí je převážně dán tím, že snižují pH matrice, čímž může dojít k ovlivnění sensorických a organoleptických vlastností potravin [80].

5.3.5 Kinetika působení enzymu L-asparaginázy v modelové směsi

Pro sledování vlivu kombinace solí a L-asparaginázy bylo nutné vhodně zvolit obsah enzymu a dobu jeho působení. Výběr byl prováděn z obsahů enzymu 5; 0,5 a 0,05 U/g směsi, přičemž nejvyšší byl zvolen na základě výpočtu ze vstupního obsahu asparaginu v modelové směsi podle definice jednotky aktivity enzymu L-asparaginázy, že 1 U je množství enzymu, které uvolní 1 μmol NH_3 z L-asparaginu za 1 minutu při pH 7,0 a teplotě 37 °C [67]. Kinetika působení L-asparaginázy byla sledována při pH 6,7 a laboratorní teplotě (teplota místnosti byla 25 ± 1 °C) stanovením obsahu aminokyselin a akrylamidu v modelové směsi.

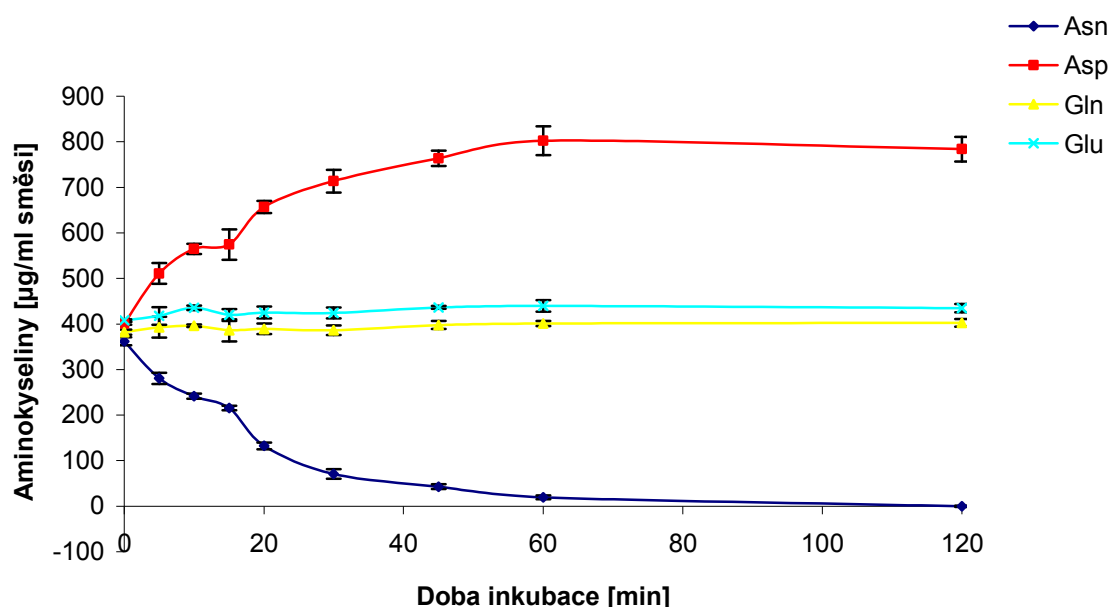
Stanovení L-asparaginázy na základně aminokyselin bylo prováděno ve zjednodušené modelové směsi neobsahující škrob. V této směsi byl po působení L-asparaginázy stanoven asparagin a kyselina asparagová. Při obsahu 5 U/g směsi běžela reakce odbourání asparaginu na kyselinu asparagovou tak rychle, že již po 2 minutách působení L-asparaginázy byl obsah asparaginu ve směsi pod limitem stanovení (LOQ = 20 ng/g). Oproti tomu při obsahu 0,05 U/g probíhala reakce velmi pomalu. Jako nejvhodnější byl tedy zvolen obsah enzymu 0,5 U/g (viz Obr. 19), při němž došlo po 10 minutách působení L-asparaginázy k poklesu obsahu asparaginu přibližně na polovinu, což nám umožnilo sledovat účinek L-asparaginázy v kombinaci se solemi. Také doba inkubace 10 minut je optimální, protože v případě použití v praxi nedochází k výraznému zdržení výrobního procesu.



Obr. 19: Konverze aminokyseliny asparagin na kyselinu asparagovou účinkem L-asparaginázy (0,5 U/g) při laboratorní teplotě

Stanovení působení L-asparaginázy bylo prováděno i ve zjednodušené modelové směsi, která obsahovala kromě asparaginu také další aminokyseliny (kyselina asparagová, glutamin, kyselina glutamová), protože enzym by mohl působit i na glutamin jak uvedl Goodsell [69].

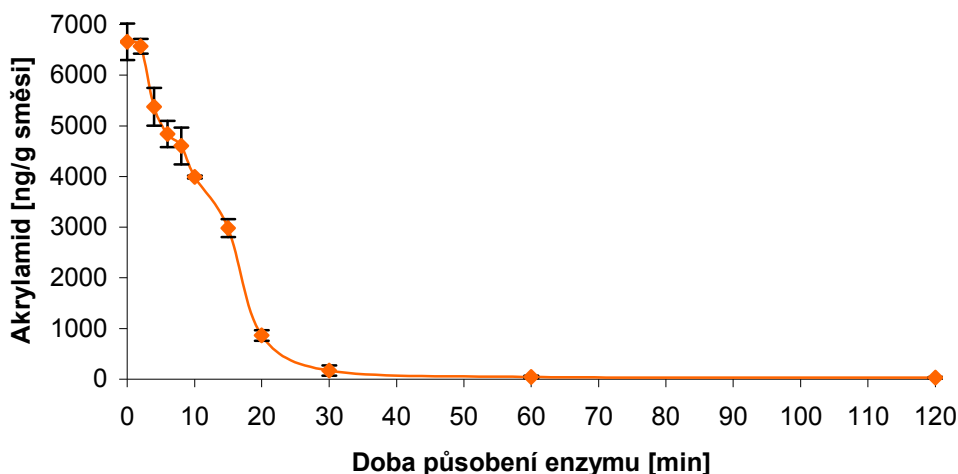
Přítomnost dalších aminokyselin v modelovém systému vedlo ke zpomalení přeměny asparaginu na kyselinu asparagovou pomocí L-asparaginázy (viz Obr. 20). Toto zpomalení je pravděpodobně způsobeno značnou podobností struktury asparaginu a glutaminu, což vedlo ke snížení rychlosti působení L-asparaginázy. Jak je vidět i na základě těchto zjednodušených modelových podmínek je výsledná účinnost enzymatické konverze asparaginu podmíněna mnohými faktory, proto je potřebné pro její aplikaci v praxi věnovat dostatek pozornosti nastavení vhodných inkubačních podmínek.



Obr. 20: Účinek L-asparaginázy (5 U/g) na ekvimolární směs čtyř vybraných aminokyselin (Asn, Asp, Gln, Glu) při laboratorní teplotě

Působení L-asparaginázy v modelové směsi s obsahem škrobu bylo sledováno stanovením obsahu akrylamidu po vypečení vzorků. Porovnáním získaných výsledků (Obr. 21) s výsledky ze stanovení asparaginu (Obr. 19) je patrné, že přítomnost škrobu v modelové směsi nijak výrazně neovlivňuje průběh přeměny asparaginu L-asparaginázou. Výsledky také potvrzují optimálnost volby obsahu L-asparaginázy 0,5 U/g a dobu inkubace 10 minut.

L-asparagináza c = 0,5 U/g



Obr. 21: Eliminace akrylamidu v modelové směsi (pečené 9 minut při 190 °C) působením L-asparaginázy (0,5 U/g) při laboratorní teplotě

5.3.6 Vliv solí na eliminaci akrylamidu v modelové směsi působením L-asparaginázy

Po stanovení vlivu řady anorganických solí na tvorbu akrylamidu v modelové směsi byl sledován také jejich účinek v kombinaci s L-asparaginázou (c = 0,5 U/g směsi). Cílem bylo zjistit zda sůl podporuje nebo naopak potlačuje pozitivní účinek L-asparaginázy na obsah akrylamidu. Výsledky stanovení jsou uvedeny v Tab. 14, kde jsou seřazeny podle účinnosti soli při nejvyšší obsahu ve směsi.

Z výsledků při stanovení kinetiky působení L-asparaginázy v kapitole 5.3.4 bylo zjištěno, že L-asparagináza při c = 0,5 U/g směsi a pH vzorku 6,7 eliminuje po 10 minutách působení přibližně 40 % obsahu akrylamidu. Na základě této hodnoty se předpokládalo, že pokud sůl nebude ovlivňovat působení L-asparaginázy, měl by obsah akrylamidu v modelové směsi klesnout oproti hodnotám získaných stanovením vlivu soli s obsahem 0,1 mmol/g směsi o množství představující 40 % obsahu akrylamidu v kontrole. Ve skutečnosti ale tento pokles nebyl až tolik výrazný a v některých případech se účinek L-asparaginázy vůbec neprojevil, což by mohlo být způsobeno změnou pH vzorku ještě před pečením vlivem přítomné soli.

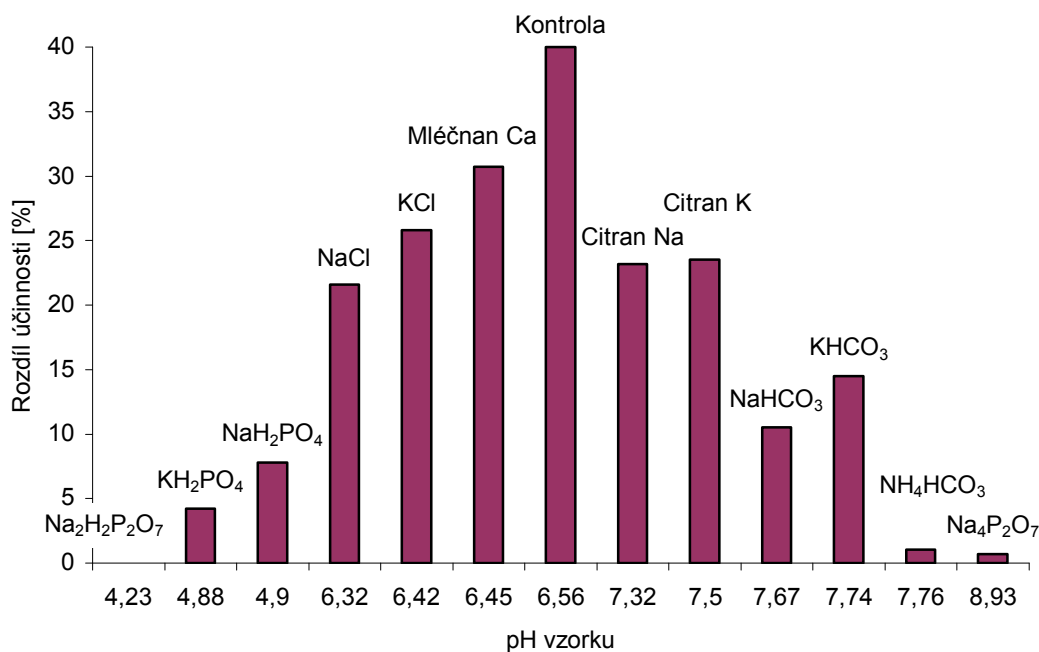
Tab. 14: Porovnání účinnosti solí a solí v kombinaci s L-asparaginázou (0,5 U/g směsi) na obsah akrylamidu (RSD ± do 10 %)

Sůl	Účinnost eliminace solí (0,1 mmol/g) [%]	Účinnost eliminace solí (0,1 mmol/g) v kombinaci s L-asparaginázou [%]	pH modelového vzorku se solí před vypečením
Kontrola	0	40,0	6,7
NH ₄ Cl	98,7	99,1	6,1
CaCl ₂	89,3	92,2	6,2
Na ₂ H ₂ P ₂ O ₇	84,2	83,6	4,2
NaH ₂ PO ₄	76,1	83,9	4,9
KH ₂ PO ₄	79,1	83,3	4,9
Na ₄ P ₂ O ₇	52,1	52,8	8,9
citran K	54,4	77,9	7,5
mléčnan Ca	48,0	78,7	6,5
citran Na	50,3	73,5	7,3
KCl	30,5	56,3	6,4
NaCl	34,4	56,0	6,3
NaHCO ₃	35,8	46,3	7,7
KHCO ₃	44,0	58,5	7,7
NH ₄ HCO ₃	+105,1	+104,1	7,8

Pokud se rozdíl účinnosti solí a solí v kombinaci s L-asparaginázou porovná s pH vzorku v přítomnosti soli (viz. Obr. 22) je patrné, že s rostoucím pH roste i účinnost L-asparaginázy až k dosažení jejího optimálního pH, poté se již její účinnost s rostoucím pH snižuje. Z těchto výsledků tedy vyplývá, že vliv solí na aktivitu L-asparaginázy je dán především tím, že soli ovlivňují pH matrice a tím je účinnost L-asparaginázy při eliminaci akrylamidu odbouráváním asparaginu snížena, protože maxima dosahuje při pH 7 [68].

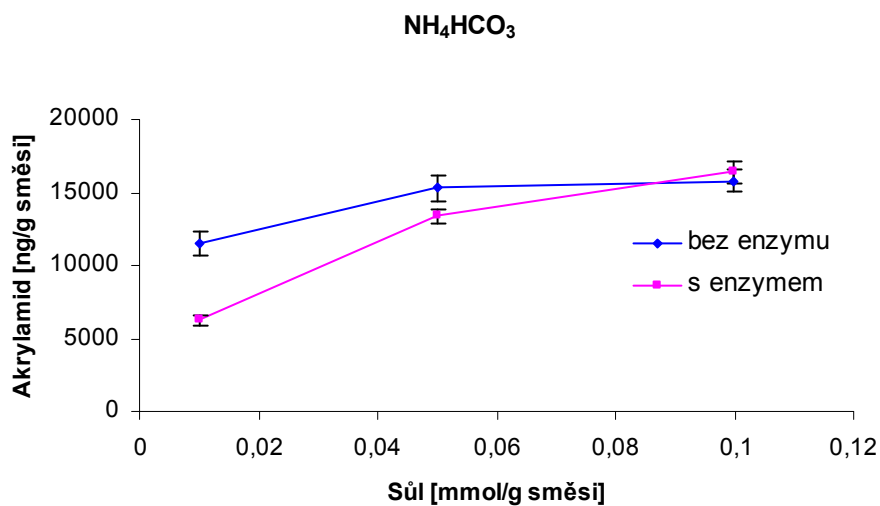
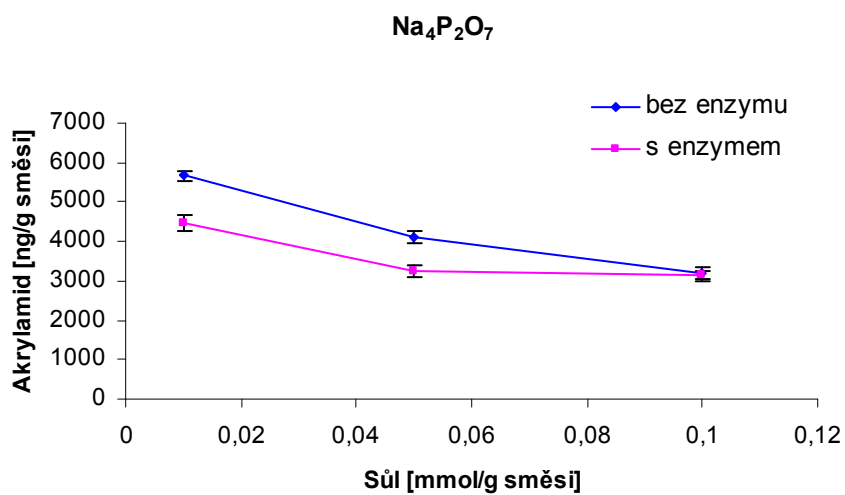
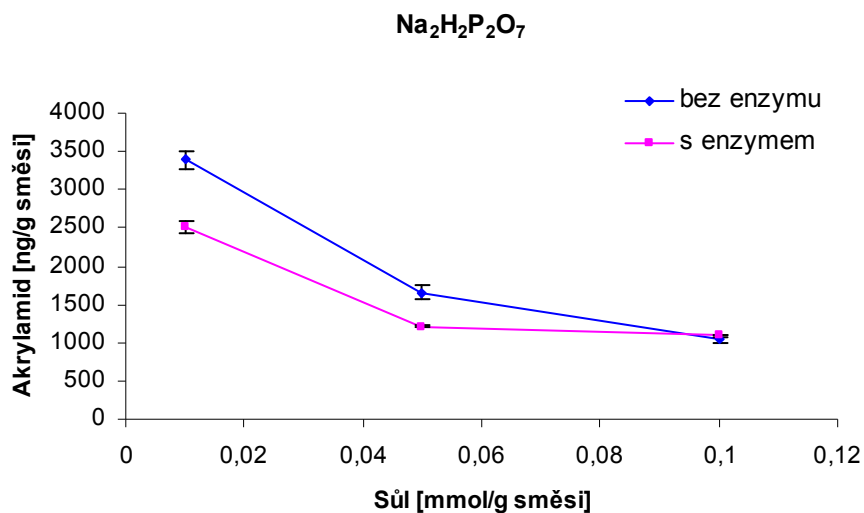
Do grafu na Obr. 22 nebyl zahrnut CaCl₂ a NH₄Cl. U CaCl₂ byl v kombinaci s L-asparaginázou obsah akrylamidu téměř úplně eliminován a v případě NH₄Cl lze říci, že došlo k eliminaci úplně, i když obsah akrylamidu byl v modelové směsi pomocí těchto solí i bez použití enzymu velmi účinně redukován. Bylo by tedy vhodné stanovit jejich vliv na působení L-asparaginázy při použití nižších obsahů solí, aby bylo možné definovat jejich vliv

na aktivitu enzymu. Z tohoto důvodu nebyly výsledky získané při vyšším obsahu solí do grafu na Obr. 22 zařazeny. Ale vzhledem na to, že chloridy výrazně neovlivňují pH hodnotu modelové směsi před vypečením, předpokládá se, že jejich vliv na aktivitu enzymu je zanedbatelný.



Obr. 22: Vliv pH modelové směsi (před pečením) s přidávkou jednotlivých anorganických solí na účinek *L*-asparaginázy (0,5 U/g směsi); rozdíl účinnosti = účinnost solí – účinnost soli v kombinaci s *L*-asparaginázou (RSD ± do 10 %)

Zajímavé je, že Na₂H₂P₂O₇, Na₄P₂O₇ a NH₄HCO₃ při nejvyšší sledované obsahu (0,1 mmol/g směsi) účinek *L*-asparaginázy úplně eliminovali. V případě Na₂H₂P₂O₇ to lze připsat výraznému snížení hodnoty pH skoro na 4,0, naproti tomu u Na₄P₂O₇ je to zase pravděpodobně způsobeno značným zvýšením pH skoro až na 9,0. V případě NH₄HCO₃ to může být také způsobeno zvýšením pH, i když tato sůl velmi výrazně podporuje vznik akrylamidu. Pro tyto soli bylo stanovení zopakováno i při jejich nižším obsahu v modelové směsi. Z výsledků, které jsou uvedeny na Obr. 23, je patrné, že snížením obsahu těchto solí se zvyšuje účinek *L*-asparaginázy, což může být způsobeno tím, že nižší obsah soli méně ovlivňuje pH vzorku a tím i účinnost enzymu. Účinnost enzymu nemusí být ovlivněna pouze změnou pH vlivem přítomné soli, ale soli mohou také ovlivnit i iontovou sílu prostředí a tak následně stupeň denaturace enzymu.



Obr. 23: Vliv soli o různém obsahu ve směsi na působení L-asparaginázy (0,5 U/g)

Tyto výsledky slouží jako podklad pro aplikaci solí v reálných matricích, přičemž je však třeba brát do úvahy, že působení solí na L-asparaginázu může být ovlivněno celou řadou látek, které jsou v potravině přítomny. Ale i přesto z těchto výsledků stanovení vyplývá, že je velmi důležité vhodně volit kombinaci sůl a enzym i s ohledem na obsah soli pro dosažení co nejlepších výsledků v eliminaci akrylamidu v potravinách.

Nicméně rozhodujícím faktorem zůstává dopad na senzorycké vlastnosti finálního produktu, které rozhodují o akceptovatelnosti spotřebitelem a tím i o celkové využitelnosti zvoleného přístupu redukce obsahu akrylamidu v potravinách. Z tohoto hlediska je jednoznačnou výhodou aplikace samotného enzymu, u kterého nebyly zjištěné žádné nežádoucí vlivy na kvalitu výrobků při současné dostatečné eliminaci akrylamidu v nich.

6 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo studium vlivu tří různých kypřících činidel i v kombinaci s enzymem L-asparagináza na obsah akrylamidu v perníkách. Na základě těchto výsledků byl následně sledován vliv anorganických solí na obsah akrylamidu v modelové směsi představující cereální výrobky a také jejich vliv na působení L-asparaginázy v modelové směsi, která odbouráváním asparaginu předchází vzniku akrylamidu.

Z výsledků stanovení vlivu kypřících látek (NH_4HCO_3 , $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ v kombinaci s NaHCO_3) bylo patrné, že v přítomnosti amonné soli byl obsah akrylamidu v perníkách velmi vysoký (až 17x vyšší) v porovnání s ostatními kypřidly. V případě kombinace kypřidla s L-asparaginázou (100 a 1000 U/kg těsta) došlo v perníkách k většímu snížení obsahu akrylamidu než u perníků bez L-asparaginázy, ale toto snížení se v závislosti na použitém kypřidle lišilo. I když byl obsah akrylamidu vlivem sodných solí prakticky úplně eliminován, nevýhodou jejich použití je změna sensorických vlastností produktu a tedy i akceptovatelnost výrobku spotřebitelem.

Stanovení vlivu kypřících látek na obsah akrylamidu v perníkách tedy ukázalo, že přítomnost anorganických solí ovlivňuje obsah akrylamidu a že jejich vliv se vzájemně značně liší. Také jejich kombinací s L-asparaginázou dochází k ovlivnění účinnosti tohoto enzymu v eliminaci akrylamidu. Z těchto důvodů byl následně stanovován vliv celé řady anorganických solí na obsah akrylamidu a také jejich vliv na působení L-asparaginázy v modelové směsi.

Soli byly k modelové směsi ve třech různých obsazích (0,1; 0,05 a 0,01 mmol/g směsi), z nichž nejvyšší odpovídal koncentraci běžně používané v potravinách, a u vzorek bylo před vypečením měřeno pH. Po vypečení (při 190 °C po dobu 9 minut) byl stanovován obsah akrylamidu v modelovém vzorku a porovnáván s obsahem v kontrolním vzorku bez soli. Porovnáním účinnosti solí v eliminaci akrylamidu v modelové směsi bylo zjištěno, že účinnost jednotlivých solí není stejná.

Soli pravděpodobně ovlivňují obsah akrylamidu působením na mechanismus jeho vzniku nebo na následující reakce vzniklého akrylamidu. Ke snížení obsahu akrylamidu v modelové směsi mohlo vlivem některých solí také docházet tím, že snížily pH matrice, protože nízké pH je významným faktorem v eliminaci akrylamidu. Tento mechanismus účinku je pravděpodobný především u fosforečnanů, které eliminovali obsah akrylamidu o více jak 75 %. Fosforečnany ještě před pečením snižují pH směsi ze 6,7 ke 4,0 a během pečení až na pH 3,5. Tímto způsobem je pravděpodobně eliminován obsah akrylamidu i v přítomnosti

NH_4Cl , který snižuje během pečení pH až na 2,3 a v jehož přítomnosti je akrylamid prakticky úplně eliminován.

Po stanovení účinnosti jednotlivých solí (při obsahu 0,1 mmol/g směsi) na obsah akrylamidu v modelové směsi byl sledován také jejich vliv na působení L-asparaginázy (0,5 U/g směsi, doba působení 10 minut). Z výsledků bylo zjištěno, že jejich vliv na enzym je dán především tím, že ovlivňují iontovou sílu, což může vést k denaturaci enzymu a pH matrice před tepelným opracováním, čímž se mění aktivita enzymu. L-asparagináza je totiž nejaktivnější při neutrálním pH a při hodnotách nižších nebo vyšších než pH 7,0 její aktivita klesá.

Z výsledků této diplomové práce vyplývá, že při použití anorganických solí pro eliminaci akrylamidu v reálné matrici je nutné vhodně volit druh soli a také její obsah v matrici vzhledem k tomu, že její přítomnost ovlivňuje pH i iontovou sílu matrice, což může mít dopad zvláště na sensorické vlastnosti potravin, které jsou klíčovým faktorem pro přijetí potravinu spotřebitelem. Druh soli a její obsah je nutné také zohlednit při eliminaci akrylamidu v potravinách působením L-asparaginázy, aby byla zajištěna co nejvyšší aktivita enzymu.

Součástí této diplomové práce je také sledování denního příjmu akrylamidu pomocí dotazníku zaměřeného na potraviny obsahující vyšší úroveň akrylamidu. Z údajů získaných zpracováním vyplněných dotazníků vyplynulo, že zastoupení potravin v denním příjmu akrylamidu je u mužů i žen odlišné a liší se i při porovnání věkových kategorií, přesto je ale patrné že hlavním zdrojem akrylamidu ve stravě jsou bez ohledu na věk a pohlaví především sladkosti (hlavně sušenky oplatky).

Výsledky této práce byly již z části publikovány ve slovenských a českých karentovaných vědeckých časopisech a také jako příspěvek na konferenci. Zmíněné publikace jsou uvedeny v přílohách 2, 3, 4 a 5.

Diplomová práce je podkladem pro další studium vlivu anorganických solí vhodných na eliminaci akrylamidu v různých potravinářských produktech s cílem zabezpečení vyšší bezpečnosti konzumovaných potravin a ochrany zdraví spotřebitele.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] DABRIO, M. – SEJERØE-OLSEN, B. – MUSSER, S. – EMTEBORG, H. – ULBERTH, F. – EMONS, H. Production of a certified reference material for the acrylamide content in toasted bread. *Food Chemistry*. 2008, 110, pp. 504-511.
- [2] TAREKE, E. – RYDBERG, P. – KARLSSON, P. – ERIKSSON, S. – TORNQVIST, M. Analysis of Acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2002, 50, pp.4998-5006.
- [3] ZYZAK, D. V. – SANDERS, R. A. – STOJANOVIC, M. – TALLMADGE, D. H. – EBERHART, B. L. – EWALD, D. K. – GRUBER, D. C. – MORSCH, T. R. – STROTHERS, M. A. – RIZZI, G. P. – VILLAGRAN, M. D. Acrylamide Formation Mechanism in Heated Foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2003, 51, pp. 4782-4787.
- [4] JIAO, J. – ZHANG, Y. – REN, Y. – WU, X. – ZHANG, Y. Development of a quantitative method for determination of acrylamide in infant powdered milk and baby foods in jars using isotope dilution liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2005, 1099, pp. 198-202.
- [5] Směrnice Rady 98/83/ES o jakosti vody určené pro lidskou spotřebu. *Úřední věstník č. L 330*. 1998, s. 1-30.
- [6] BERMUDO, E. – MOYANO, E. – PUIGNOU, L. – GALCERAN, M.T. Determination of acrylamide in foodstuffs by liquid chromatography ion-trap tandem mass-spectrometry using an improved clean-up procedure. *Analytica Chimica Acta*. 2006, 559, pp. 207-214.
- [7] ROBERT, F. – VUATAZ, G. – POLLIEN, P. – SAUCY, F. – ALONSO, M.-I. – BAUWENS, I. – BLANK, I. Acrylamide Formation from Asparagine under Low-Moisture Maillard Reaction Conditions. 1. Physical and Chemical Aspects in Crystalline Model Systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2004, 52, pp. 6837-6842.
- [8] ANDRZEJEWSKI, D. – ROACH, J. A. G. – GAY, M. L. – MUSSER S. M. Analysis of Coffee for the Presence of Acrylamide by LC-MS/MS. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2004, 52, pp. 1996-2002.

- [9] ZHANG, Y. – ZHANG, G. – ZHANG, Y. Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods. Review and recent developments. *Journal of Chromatography A*. 2005, 1075, pp. 1-21.
- [10] CHU, S. – METCALFE, CH. D. Analysis of Acrylamide in Water Using a Coevaporation Preparative Step and Isotope Dilution Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2007, 79, pp. 5093-5096.
- [11] DE VLEESCHOUWER, K. – VAN DER PLANCKEN, I. – VAN LOEY, A. – HENDRICKX, M. E. The kinetics of acrylamide formation/elimination in asparagine-glucose systems at different initial reactant concentrations and ratios. *Food Chemistry*. 2008, 111, pp. 719-729.
- [12] *Acros* [online]. [cit. 2008-07-10]. Dostupné z: <http://www.acros.com/DesktopModules/Acros_Search_Results/Acros_Search_Results.aspx?search_type=CatalogSearch&SearchString=acrylamide>.
- [13] FRIEDMAN, M. Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide. A Review. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2003, 51, pp. 4504-4526.
- [14] POHANISH, R. P. Sittig's Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens: Acrylamide: Toxicity Data. *Knovel* [databáze online]. 2002 [cit. 2008-07-02]. Dostupné z: <<http://www.knovel.com>>.
- [15] VATTEM, D. A. – SHETTY, K. Acrylamid in food: a model for mechanism of formation and its reduction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2003, 4, pp. 331-338.
- [16] PRESTON, A. – FODEY, T. – ELLIOTT, CH. Development of high-throughput enzyme-linked immunosorbent assay for the routine detection of the carcinogen acrylamide in food, via rapid derivatisation pre-analysis. *Analytica Chimica Acta*. 2008, 608, pp. 178-185.
- [17] HOGERVORST, J. G. – SCHOUTEN, L. J. – KONINGS, E. J. – GOLDBOHM, R. A. - VAN DEN BRANT. P. A. A Prospective Study of Dietary Acrylamide Intake and the Risk of Endometrial, Ovarian, Breast Cancer. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2008, 87, pp. 1428-1438.
- [18] HOGERVORST, J. G. – SCHOUTEN, L. J. – KONINGS, E. J. – GOLDBOHM, R. A. - VAN DEN BRANT. P. A. Dietary acrylamide intake and the risk of renal cell, bladder, and prostate cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2008, 16, pp. 2304-2313.

- [19] OLESEN, P. T. – OLSEN, A. – FRANDBSEN, H. – FREDERIKSEN, K. – OVERVAD, K. – TJØNNELAND, A. Acrylamide exposure and incidence of Breast cancer among postmenopausal women in the Danish Diet, Cancer and Health study. *International Journal of Cancer*. 2008, 122, pp. 2094-2100.
- [20] CLEMENT, F. C. – DIP, R. – NAEGELI, H. Expression profile of human cells in culture exposed to glycidamide, a reactive metabolite of the heat-induced food carcinogen acrylamide. *Toxicology*. 2007, 240, pp. 111-124.
- [21] MUCCI, L. A. – DICKMAN, P. W. – STEINECK, G. – ADAMI, H.-O. – AUGUSTSSON, K. Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney, and bladder: Absence of an association in a population-based study in Sweden. *British Journal of Cancer*. 2003, 88, pp. 84-89.
- [22] CIESAROVÁ, Z. Minimalizácia obsahu akrylamidu v potravinách. *Chemické Listy*. 2005, 99, s. 483-491.
- [23] GANGOLLI, S. Dictionary of Substances and Their Effects: Acrylamide. *Knovel* [databáze online]. 2005 [cit. 2008-07-02]. Dostupné z: <www.knovel.com>.
- [24] Summary and conclusions from the 64 th meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). *World Health Organization, Rome, 8.-17. February 2005* [online]. 2005 [cit. 2008-07-11], pp. 1-47. Dostupné z: <http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/summary_report_64_final.pdf>.
- [25] AMREIN, T. M. – BACHMANN, S. – NOTI, A. – BIEDERMANN, M. – BARBOSA, M. F. – BIEDERMANN-BREM, S. – GROB, K. – KEISER, A. – REALINI, P. – ESCHER, F. – AMADO, R. Potential of Acrylamide Formation, Sugars, and Free Asparagine in Potatoes: A Comparison of Cultivars and Farming Systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2003, 51, pp. 5556-5560.
- [26] SCHNEEWEISS, P. Zpráva o výsledcích plánované kontroly cizorodých látek v potravinách v roce 2005: březen 2005. *Státní zemědělská a potravinářská inspekce* [online]. 2005 [cit. 2008-07-13], s. 1-34. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/news_files/files/17/828BA9D8-5C2A-4628-93AB-8DCFF46CAFBCB.pdf>.
- [27] BREN, L. Turning Up the Heat on Acrylamide. *FDA Consumer* [online]. 2003-01-07 [cit. 2008-07-12]. Dostupné z: <http://www.fda.gov/fdac/features/2003/103_food.html>.

- [28] STADLER, R. H. – ROBERT, F. – RIEDIKER, S. – VARGA, N. – DAVIDEK, T. – DEVAUD, S. – GOLDMANN, T. – HAU, J. – BLANK, I. In-Depth Mechanistic Study on the Formation of Acrylamide and Other Vinylogous Compounds by the Maillard Reaction. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2004, 52, pp. 5550-5558.
- [29] MOTTRAM, D. S. – WEDZICHA, B. L. – DODSON, A. T. Acrylamide is formed in the Maillard Reaction. *Nature* 2002, 419, pp. 448-449.
- [30] STADLER, R. H. – BLANK, I. – VARGA, N. – ROBERT, F. – HAU, J. – GUY, A. P. – ROBERT, M.-C. – RIELIKER, S. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* 2002, 419, pp.449-450.
- [31] BECALSKI, A. – LAU, B. P.-Y. – LEWIS, D. – SEAMEN, S. W. Acrylamide in Foods: Occurrence, Sources, and Modeling. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2003, 51, pp. 802-808.
- [32] KOLEK, E. *Štúdium vzniku a metódy stanovenia akrylamidu v potravinách*. Výskumný ústav potravinársky, Bratislava, 2006. 48 s.
- [33] GRANVOGL, M. – JEZUSSEK, M. – KOEHLER, P. – SHIEBERLE, P. Quantitation of 3-Aminopropionamide in Potatoes – A Minor but Potent Precursor in Acrylamide Formation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2004, 52, pp. 4751-4757.
- [34] GRANVOGL, M. – KOEHLER, P. – SHIEBERLE, P. Neue Entwicklungen in der Analytik von Acrylamid – Anwendung zu Nachweis von Bildungsmechanismen. *Getreidetechnologie*. 2005, 59, pp. 85-90.
- [35] YASUHARA, A. – TANAKA, Y. – HENGEL, M. – SHIBAMOTO, T. Gas Chromatographic Investigation of Acrylamide Formation in Browning Model Systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2003, 51, pp. 3999-4003.
- [36] SOHN, M. – HO, C. T. Ammonia generation during thermal degradation of amino acids. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1995, 43, pp. 3001-3003.
- [37] KNOL, J. J. – VAN LOON, W. A. M. – LINSSEN, J. P. H. – RUCK, A.-L. – VAN BOEKEL, M. A. J. S. – VORAGEN, A. G. J. Toward a Kinetic Model for Acrylamide Formation in a Glucose-Asparagine Reaction System. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2005, 53, pp. 6133-6139.
- [38] The CIAA Acrylamide "Toolbox". *Confederation of the food and drink industries of the EU* [online]. 2007 [cit. 2008-06-28], s. 1-39. Dostupné z: <<http://www.ciaa.be/documents/brochures/toolbox%20rev11%20nov%202007final.pdf>>.

- [39] BECALSKI, A. – LAU, B. P.-Y. – LEWIS, D. – SEAMAN, S. W. – HAYWARD, S. – SAHAGIAN, M. – RAMESH, M. – LECLERC, Y. Acrylamide in French Fries: Influence of Free Amino Acids and Sugars. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2004, 52, pp. 3801-3806.
- [40] ELMORE, J. S. – MOTTRAM, D. S. – MUTTUCUMARU, N. – DODSON, A. T. – PARRY, M. A. J. – HALFORD, N. G. Changes in Free Amino Acids and Sugars in Potatoes Due to Sulfate Fertilization and the Effect on Acrylamide Formation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2007, 55, pp. 5363-5366.
- [41] CLAEYS, W. L. – DE VLEESCHOUWER, K. – HENDRICKX, M. E. Effect of Amino Acids on Acrylamide Formation and Elimination Kinetics. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2005, 21, pp. 1525-1530.
- [42] CLAEYS, W. L. – DE VLEESCHOUWER, K. – HENDRICKX, M. E. Kinetics of Acrylamide Formation and Elimination during Heating of an Asparagine – Sugar Model System. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2005, 53, pp. 9999-10005.
- [43] RYDBERG, P. – ERIKSSON, S. – TAREKE, E. – KARLSSON, P. – EHRENBERG, L. – TORNQVIST, M. Investigations of Factors That Influence the Acrylamide Content of Heated Foodstuffs. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2003, 51, pp. 7012-7018.
- [44] ELMORE, J. S. – KOUTSIDIS, G. – DODSON, A. T. – MOTTRAM, D. S. – WEDZICHA, B. L. The effect of cooking on acrylamide and its precursors in potato, wheat and rye. In *Chemistry and Safety of Acrylamide in Food*; Friedman, M., Mottram, D., Eds.; Springer: New York, 2005; pp 255-269.
- [45] JUNG, M. Y. – CHOI, D. S. – JU, J. W. A novel technique for limitation of acrylamide formation in fried and baked corn chips and in french fries. *Journal of Food Science*. 2003, 68, pp.1287-1290.
- [46] DE VLEESCHOUWER, K. – VAN DER PLANCKEN, I. – VAN LOEY, A. – HENDRICKX, M. E. Impact of pH on the Kinetics of Acrylamide Formation/Elimination Reactions in Model Systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2006, 54, pp. 7847-7855.
- [47] DE VLEESCHOUWER, K. – VAN DER PLANCKEN, I. – VAN LOEY, A. – HENDRICKX, M. E. Kinetics of Acrylamide Formation/Elimination Reactions as Affected by Water Activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2007, 23, pp. 722-728.

- [48] PEDRESCHI, F. – KAACK, K. – GRANBY, K. The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries. *Food Chemistry*. 2008, 109, pp. 386-392.
- [49] GÖKMEN, V. – SENYUVA, H. Z. Study of colour and acrylamide formation in coffee, wheat flour and potato chips during heating. *Food Chemistry*. 2006, 99, pp. 238-243.
- [50] KOLEK, E. – ŠIMKO, P. – ŠIMON, P. – GATIAL, A. Confirmation of polymerisation effects of sodium chloride and its additives on acrylamide by infrared spectrometry. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2007, 46, pp. 39-44.
- [51] KOLEK, E. – ŠIMKO, P. – ŠIMON, P. Effect of NaCl on the decrease of acrylamide content in a heat-treated model food matrix. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2006, 45, pp. 17-20.
- [52] KOLEK, E. – ŠIMKO, P. – ŠIMON, P. Inhibition of acrylamide formation in asparagine/D-glucose model system by NaCl addition. *European Food Research and Technology*. 2006, 224, pp. 283-284.
- [53] KOLEK, E. – ŠIMON, P. – ŠIMKO, P. Nonisothermal Kinetics of Acrylamide Elimination and Its Acceleration by Table Salt—A Model Study. *Journal of Food Science*. 2007, 72, pp. 341-344.
- [54] LEVINE, R. A. – SMITH, R. E. Source of Variability of Acrylamide Levels in a Cracker Model. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2005, 53, pp. 4410-4416.
- [55] AMREIN, M. T. – SCHÖNBÄCHLER, B. – ESCHER, F. – AMANDÒ, R. Acrylamide in Gingerbread: Critical Factors for Formation and Possible Ways for Reduction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, 52, pp. 4282-4288.
- [56] BIEDERMANN, M. – GROB, K. Model studies on acrylamide formation in potato, wheat flour and corn starch; ways to reduce acrylamide contents in bakery ware. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*. 2003, 94, pp. 406-422.
- [57] FERNANDEZ, S. – KURPPA, L. – HYVOENEN, L. Content of acrylamide decreased in potato chips with addition of a proprietary flavonoid spice mix (Flavomare®) in frying. *Innovations in Food Technology*. 2003, 18, pp. 24-26.
- [58] HEDEGAARD, R. V. – GRANBY, K. – FRANDBSEN, H. – THYGESEN, J. – SKIBSTED, L. H. Acrylamide in bread. Effect of prooxidants and antioxidants. *European Food Research and Technology*. 2008, 227, pp. 519-525.

- [59] CIESAROVÁ, Z. – SUHAJ, M. – HORVÁTHOVÁ, J. Correlation between acrylamide contents and antioxidant capacities of spice extracts in a model potato matrix. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2008, 47, pp. 1-5.
- [60] ZHANG, Y. – CHEN, J. – ZHANG, X. – WU, X. – ZHANG, Y. Addition of Antioxidant of Bamboo Leaves (AOB) Effectively Reduces Acrylamide Formation in Potato Crisps and French Fries. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2007, 55, pp. 523-528.
- [61] SUMMA, C. – WENZL, T. – BROHEE, M. – DE LA CALLE, B. – ANKLAM, E. Investigation of the Correlation of the Acrylamide Content and the Antioxidant Activity of Model Cookies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, 54, pp. 853-859.
- [62] Novozymes Switzerland AG (2007). Novozymes launches enzyme to reduce acrylamide in food. Dostupné z: <<http://www.emaxhealth.com/75/15582.html>>.
- [63] FRIEDMAN, M. – LEVIN, C. E. Review of Methods for the Reduction of Dietary Content and Toxicity of Acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, 56, pp. 6113-6140.
- [64] PETR, J. – LOUDA, F. *Produkce potravinářských surovin*. 1. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 1998. 213 s. ISBN 80-7080-332-0.
- [65] ELMORE, J. S. – KOUTSIDIS, G. – DODSON, A. T. – MOTTRAM, D. S. – WEDZICHA, B. L. Measurement of Acrylamide and Its Precursors in Potato, Wheat, and Rye Model Systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2005, 53, pp. 1286-1293.
- [66] KADLEC, P. et al. *Technologie sacharidů*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2000. 138 s. ISBN 80-7080-400-9.
- [67] Asparaginase from *Aspergillus oryzae* expressed in *A. oryzae*. *FAO JECFA Monographs 4* [online]. 2007 [cit. 2009-05-04]. Dostupné z: <<http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/monograph4/additive-498-m4.pdf>> .
- [68] HENDRIKSEN, H. V. – KORNBRUST, B. A. – ØSTERGAARD, P. R. – STRINGER, M. A. Evaluating the Potential for Enzymatic Acrylamide Mitigation in a Range of Food Products Using an Asparaginase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2009, DOI:10.1021/jf900174q.
- [69] GOODSSELL, D. S. The molecular perspective: L-Asparaginase. *The oncologist* 10. 2005, pp. 238-239.

- [70] DSM announces that PreventASe™ can now be applied for acrylamide mitigation in all EU member states. *DSM Food Specialties* [online]. 2007-10-31 [cit. 2009-05-06]. Dostupný z: http://www.dsm.com/en_US/html/dfs/news_items/preventase_31_10_07.htm?source=search
- [71] CIESAROVÁ, Z. – KISS, E. – BOEGL, P. Impact of L-asparaginase on acrylamide content in potato products. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2006, 45, pp. 141-146.
- [72] CIESAROVÁ, Z. – KUKUROVÁ, K. – BEDNÁRIKOVÁ, A. – MORALES, F. J. Effect of heat treatment and dough formulation on the formation of Maillard reaction products in fine bakery products – benefits and weak points. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2009, 48, pp. 20-30.
- [73] CIESAROVÁ, Z. – KISS, E. – KOLEK, E. Study of Factors Affecting Acrylamide Levels in Model Systems. *Czech Journal of Food Sciences*. 2006, 24, pp. 133-137.
- [74] Databáze údajů Štátnej veterinárnej a potravinovej správy, Bratislava v letech 2005-2008.
- [75] Health implications of acrylamide in food: report of a joint FAO/WHO consultation. *WHO Headquarters*. Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002, pp. 1-35.
- [76] CLAUS, A. – WEISZ, G. M. – KAMMERER, D. R. – CARLE, R. – SCHIEBER, A. A method for the determination of acrylamide in bakery products using ion trap LC-ESI-MS/MS. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2005, 49, pp. 918-925.
- [77] Survey Data on Acrylamide in Food: Total Diet Study Results. *Center for Food Safety & Applied Nutrition* [online]. 2004, [cit. 2009-04-26]. Dostupné z: <<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/acrydat2.html#table4>>.
- [78] CIESAROVÁ, Z. – KUKUROVÁ, K. – BEDNÁRIKOVÁ, A. – MACHÁČKOVÁ, K. Acrylamide mitigation in cereal-based products by L-asparaginase addition. In: *Proc. ICC International Conference Bosphorus 2008*, Istanbul 24 - 26. April 2008, pp. 197.
- [79] KUKUROVÁ, K. – MORALES, J. F. – BEDNÁRIKOVÁ, A. – CIESAROVÁ, Z. Effect of L-asparaginase on acrylamide mitigation in a fried-dough pastry model. *Molecular Nutrition and Food Research*, in press.
- [80] GÖKMEN, V. – ŞENYUVA, H. Z. Acrylamide formation is prevented by divalent cations during the Maillard reaction. *Food Chemistry*. 2007, 103, pp. 196-203.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

3-APA	3-aminopropionamid
AMON	hydrogenuhličitan amonný
ANSU	Jednotka aktivity L-asparaginázy
AOB	antioxidant bambusových listů
Asn	L-asparagin
Asp	Kyselina asparagová
atd.	A tak dále...
DSC	Diferenciální skenovací kalorimetrie
FAO	Organizace OSN pro výživu a zemědělství
FDA	Americký úřad pro kontrolu potravin a léků
GC/HRTOF	Plynová chromatografie s využitím hmotnostně spektrometrického detektoru s vysokorozlišovacím analyzátozem typu time-of-flight
GC/MS	Plynová chromatografie spojená s hmotnostním spektrometrem
Gln	Glutamin
Glu	Kyselina glutamová
HPLC/RI	Vysokotlaká kapalinová chromatografie s refraktometrickou detekcí
LC/ESI-MS-MS	Kapalinová chromatografie s elektrosprejovou ionizací a tandemovou hmotnostní spektrometrií
LC/MS/MS	Kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez stanovení (kvantifikace)
např.	Například
SAPP 22 + soda	Dihydrogendifosforečnan sodný + hydrogenuhličitan sodný (podle výrobce: SAPP 22 působí pomaleji než SAPP 28, což by mělo vést k lepšímu nakypření těsta)
SAPP 28 + soda	Dihydrogendifosforečnan sodný + hydrogenuhličitan sodný
WHO	Světová zdravotnická organizace

9 SEZNAM PŘÍLOH

1. Dotazník
2. ŠIMKO, P. – KOLEK, E. – ŠIMON, P. – ŠIMÚTH, T. – MARKOVÁ, L.
Elimination of acrylamide by polymerization catalysed by inorganic food components. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2009, 48, pp. 8-13.
3. CIESAROVÁ, Z. – KUKUROVÁ, K. – BEDNÁRIKOVÁ, A. – MARKOVÁ, L. – BAXA, S. Improvement of Cereal Product Safety by Enzymatic Way of Acrylamide Mitigation. *Czech Journal of Food Sciences*. 2009, 27, pp. 87-89.
4. KUKUROVÁ, K. – CIESAROVÁ, Z. – BEDNÁRIKOVÁ, A. – MARKOVÁ, L. Effect of Inorganic Salts on Acrylamide Formation in Cereal Matrices. *Czech Journal of Food Sciences*. 2009, 27, pp. 103-106.
5. KUKUROVÁ, K. – MARKOVÁ, L. – BEDNÁRIKOVÁ, A. – CIESAROVÁ, Z. Vplyv solí na účinok enzymatickej eliminácie akrylamidu v cereálnych výrobkoch. V: *Interaktívna konferencia mladých vedcov*, 2.3. – 8.6. 2009.

10 PŘÍLOHY

Příloha 1: Dotazník

Vážení paní, vážený pane,

výzkumy tohoto dotazníku nám umožní zjistit demou příjem akrylamidu, který se nejčastěji vyskytuje v užze uvedených potravinách, a pomohou nám tak v dalším zdravotním účinku této látky na lidský organismus. Velice Vám děkujeme za pomoc, kterou nám poskytnete vyplněním tohoto dotazníku.

U každé potraviny zvolte její množství a jak často toto množství jíte. Následně zaškrtněte denní dobu, v které tuto potravinu konzumujete. Příklad: Chlébu konzumuji 2 krajice denně k snídani. U některých potravin je nutné před zvolením množství (počtu) zvolit i objem potraviny, popřípadě uvést konkrétní typ potraviny. V případě, že Vám žádná z odpovědí nevyhovuje, vyplňte kolonku „Jiná odpověď“.

Část A: Demografické údaje:

1. Věk: 2. Pohlaví: Muž Žena 3. Stav:

4. Nejvyšší vzdělání: 5. Zaměstnání:

6. Ve velikosti obce trvalého bydliště:

do 1 tisíc obyvatel	<input type="checkbox"/>
1 001 – 4 999 obyvatel	<input type="checkbox"/>
5 000 – 19 999 obyvatel	<input type="checkbox"/>
20 000 – 99 999 obyvatel	<input type="checkbox"/>
nad 100 tisíc obyvatel	<input type="checkbox"/>

7. Okres trvalého bydliště:

8. Aktuální hmotnost:

Část B: Spotřebníkové zvyklosti:

Uveďte, či vůbec a pokud ano, jak často a kdy obvykle jíte následující potraviny:

1. Chléb konzumní
Uveďte druh chleba:

Množství:	Jak často:	Kdy:
1 krajice:	Denně:	Snídaně:
2 krajice:	Týdně:	Oběd:
3 krajice:	Měsíčně:	Večere:
4 krajice:	Ročně:	Mimo hl jídel:
5 krajiců:		
Víc než 5:		
Jiná odpověď:		

1

2. Chléb extrudovaný (s vlákninou, ryžový, kashičehrodit, suchary...), 1 krajice = 10 g)
Uveďte druh chleba:

Množství:	Jak často:	Kdy:
1 krajice:	Denně:	Snídaně:
2 krajice:	Týdně:	Oběd:
3 krajice:	Měsíčně:	Večere:
4 krajice:	Ročně:	Mimo hl jídel:
5 krajiců:		
Víc než 5:		
Jiná odpověď:		

3. Pečivo (např. rohlík, houska, celozrnný rohlík,...)
Uveďte druh pečiva:

Množství:	Jak často:	Kdy:
1 ks:	Denně:	Snídaně:
2 ks:	Týdně:	Oběd:
3 ks:	Měsíčně:	Večere:
4 ks:	Ročně:	Mimo hl jídel:
5 ks:		
Víc než 5:		
Jiná odpověď:		

4. Topinka/pečený most
Uveďte druh pečiva:

Množství:	Jak často:	Kdy:
1 ks:	Denně:	Snídaně:
2 ks:	Týdně:	Oběd:
3 ks:	Měsíčně:	Večere:
4 ks:	Ročně:	Mimo hl jídel:
5 ks:		
Víc než 5:		
Jiná odpověď:		

5. Sladké pečivo (koblížky - šišky, smažené pivošky...)
Uveďte druh pečiva:

Množství:	Jak často:	Kdy:
1 ks:	Denně:	Snídaně:
2 ks:	Týdně:	Oběd:
3 ks:	Měsíčně:	Večere:
4 ks:	Ročně:	Mimo hl jídel:
5 ks:		
Víc než 5:		
Jiná odpověď:		

2

6. Smažené bramborové hranolky (1 porce - 150 g)

Množství:

1 porce: 2 porce: 3 porce: 4 porce: 5 porcí:

Víc než 5: Uveďte kolik:

Jiná odpověď:

Jak často:

Denně: Týdně: Měsíčně: Ročně:

Kdy:

Snídaně: Oběd: Večeře: Mimo hl.jídel:

7. Pečené brambory (1 porce - 150g)

Množství:

1 porce: 2 porce: 3 porce: 4 porce: 5 porcí:

Víc než 5: Uveďte kolik:

Jiná odpověď:

Jak často:

Denně: Týdně: Měsíčně: Ročně:

Kdy:

Snídaně: Oběd: Večeře: Mimo hl.jídel:

8. Smažené bramborové placky (1 ks - 50 g)

Množství:

1 porce: 2 porce: 3 porce: 4 porce: 5 porcí:

Víc než 5: Uveďte kolik:

Jiná odpověď:

Jak často:

Denně: Týdně: Měsíčně: Ročně:

Kdy:

Snídaně: Oběd: Večeře: Mimo hl.jídel:

9. Smažené bramborové chipsy

Gramáž balení: 30 g 90 g 160 g 200 g

Množství:

1 balení: 2 balení: 3 balení: 4 balení: 5 balení:

Víc než 5: Uveďte kolik:

Jiná odpověď:

Jak často:

Denně: Týdně: Měsíčně: Ročně:

Kdy:

Snídaně: Oběd: Večeře: Mimo hl.jídel:

10. Solené opékané suchary - chlébové chipsy (Bake rolls...) (1 balení - 90 g)

Množství:

1 balení: 2 balení: 3 balení: 4 balení: 5 balení:

Víc než 5: Uveďte kolik:

Jiná odpověď:

Jak často:

Denně: Týdně: Měsíčně: Ročně:

Kdy:

Snídaně: Oběd: Večeře: Mimo hl.jídel:

11. Slané snacky - např. tvárnky, slané hrčky... (1 balení - 125 g)

Množství:

1 balení: 2 balení: 3 balení: 4 balení: 5 balení:

Víc než 5: Uveďte kolik:

Jiná odpověď:

Jak často:

Denně: Týdně: Měsíčně: Ročně:

Kdy:

Snídaně: Oběd: Večeře: Mimo hl.jídel:

12. Kukuřičné křupky (1 balení - 60 g)

Množství:

1 balení: 2 balení: 3 balení: 4 balení: 5 balení:

Víc než 5: Uveďte kolik:

Jiná odpověď:

Jak často:

Denně: Týdně: Měsíčně: Ročně:

Kdy:

Snídaně: Oběd: Večeře: Mimo hl.jídel:

13. Perník plněný (1 kus - 60 g)

Množství:

1 ks: 2 ks: 3 ks: 4 ks: 5 ks:

Víc než 5: Uveďte kolik:

Jiná odpověď:

Jak často:

Denně: Týdně: Měsíčně: Ročně:

Kdy:

Snídaně: Oběd: Večeře: Mimo hl.jídel:

14. Perníčky s polevou (1 balení – 180 g)

Množství: 1 balení: 2 balení: 3 balení: 4 balení: 5 balení:
 Více než 5: Uveďte kolik:
 Jiná odpověď:

Jak často: Denně: Týdně: Měsíčně: Ročně:
 Kdy: Snídaně: Oběd: Večeře: Mimo hlídale:

15. Medovník z bobek (1 srdíčko – 20 g)

Množství: 1 ks: 2 ks: 3 ks: 4 ks: 5 ks:
 Více než 5: Uveďte kolik:
 Jiná odpověď:

Jak často: Denně: Týdně: Měsíčně: Ročně:
 Kdy: Snídaně: Oběd: Večeře: Mimo hlídale:

16. Oplatky pšené – např. tatranka, sista, miňonky... (1 oplatka – 50 g)

Množství: 1 oplatka: 2 oplatky: 3 oplatky: 4 oplatky: 5 oplatek:
 Více než 5: Uveďte kolik:
 Jiná odpověď:

Jak často: Denně: Týdně: Měsíčně: Ročně:
 Kdy: Snídaně: Oběd: Večeře: Mimo hlídale:

17. Pšičky (1 balení – 75 g)

Množství: 1 balení: 2 balení: 3 balení: 4 balení: 5 balení:
 Více než 5: Uveďte kolik:
 Jiná odpověď:

Jak často: Denně: Týdně: Měsíčně: Ročně:
 Kdy: Snídaně: Oběd: Večeře: Mimo hlídale:

18. Sladké sušenky nepřlužené – např. BeBe dobré ráno, BeBe, Albert... (1 balení – 130 g)

Množství: 1 oplatka: 2 oplatky: 3 oplatky: 4 oplatky: 5 oplatek:
 Více než 5: Uveďte kolik:
 Jiná odpověď:

Jak často: Denně: Týdně: Měsíčně: Ročně:
 Kdy: Snídaně: Oběd: Večeře: Mimo hlídale:

19. Míslí tyčinky (1 tyčinka – 30 g)

Množství: 1 tyčinka: 2 tyčinky: 3 tyčinky: 4 tyčinky: 5 tyčinek:
 Více než 5: Uveďte kolik:
 Jiná odpověď:

Jak často: Denně: Týdně: Měsíčně: Ročně:
 Kdy: Snídaně: Oběd: Večeře: Mimo hlídale:

20. Cereálie pro snídani (ovesné vločky, kukuričné lupinky a pod.) (1 porce – 30 g)

Uveďte druh:

Množství: 1 porce: 2 porce: 3 porce: 4 porce: 5 porcí:
 Více než 5: Uveďte kolik:
 Jiná odpověď:

Jak často: Denně: Týdně: Měsíčně: Ročně:
 Kdy: Snídaně: Oběd: Večeře: Mimo hlídale:

21. Káva (1 šálek – 7 g zrnkové kávy nebo 1,5 g instantní kávy = 1 káv. lžička)

Množství: 1 šálek: 2 šálky: 3 šálky: 4 šálky: 5 šálků:
 Více než 5: Uveďte kolik:
 Jiná odpověď:

Jak často: Denně: Týdně: Měsíčně: Ročně:
 Kdy: Snídaně: Oběd: Večeře: Mimo hlídale:

22. Kávoviny (cikorka, Bikava, Kavvi, Caro a pod) (1 šálek – 7 g kávoviny = 1 kv. lžička)

Množství: 1 šálek: 2 šálky: 3 šálky: 4 šálky: 5 šálků:

Více než 5:

Jiná odpověď:

Jak často: Denně: Týdně: Měsíčně: Ročně:

Kdy: Snídaně: Oběd: Večere: Mimo hl.jídel:

Uvedte kolik:

23. Kakao (1 šálek – 7 g kakaového prášku = 1 kv. lžička)

Množství: 1 šálek: 2 šálky: 3 šálky: 4 šálky: 5 šálků:

Více než 5:

Jiná odpověď:

Jak často: Denně: Týdně: Měsíčně: Ročně:

Kdy: Snídaně: Oběd: Večere: Mimo hl.jídel:

Uvedte kolik:

24. Horká čokoláda (1 šálek – 30 g čokolády)

Množství: 1 šálek: 2 šálky: 3 šálky: 4 šálky: 5 šálků:

Více než 5:

Jiná odpověď:

Jak často: Denně: Týdně: Měsíčně: Ročně:

Kdy: Snídaně: Oběd: Večere: Mimo hl.jídel:

Uvedte kolik:

25. Čokoláda (1 tabulka – 100 g)

Množství: 1 tabulka: 2 tabulky: 3 tabulky: 4 tabulky: 5 tabulek:

Více než 5:

Jiná odpověď:

Jak často: Denně: Týdně: Měsíčně: Ročně:

Kdy: Snídaně: Oběd: Večere: Mimo hl.jídel:

Uvedte kolik:

26. Čokoládový, čokoládo-oriškový krém (nutela a pod.)

Gramáž balení: 100 g 250 g 400 g

Množství: 1 balení: 2 balení: 3 balení: 4 balení: 5 balení:

Více než 5:

Jiná odpověď:

Jak často: Denně: Týdně: Měsíčně: Ročně:

Kdy: Snídaně: Oběd: Večere: Mimo hl.jídel:

Uvedte kolik:

Část C: Informovanost:

1. Slysíte(a) jste již o akrylamidu? Pokud ano, z jakého zdroje a co o něm víte?

2. Je podle Vás pro lidský organismus prospěšný nebo nebezpečný?

3: Dotazy, poznámky:

Děkujeme za spolupráci!
Výskumný ústav potravinársky, Bratislava
Kontakt: ctesarova@vup.sk

Elimination of acrylamide by polymerization catalysed by inorganic food components

PETER ŠIMKO – EMIL KOLEK – PETER ŠIMON – TOMÁŠ ŠIMŮTH – LUCIE MARKOVA

Summary

This paper summarizes results of the experiment: aimed at the behaviour of acrylamide (AA) in contact with NaCl and additive of table salt at elevated temperatures. In the first experiment, samples were heated at 171.1 °C for 10 min. Presence of NaCl in the matrix brought about a decrease in AA content of up to 40%, when the highest decrease in the AA content was observed in the range of 0–1 % (w/w) of NaCl added. Then, differential scanning calorimetry measurements, it was found that the elimination of AA was caused by its polymerization at elevated temperatures and initiated by NaCl. For more intensive support of polymerization, the potassium ferrioxalate and potassium persulfate (in table salt additives), which decrease AA content by 91% and 88%, respectively, in comparison to pure NaCl. Comparing infrared spectra of AA and the product formed during the reaction, it was found that all functional groups brought about by polymerization of AA, most of them are C=C linkage among vinyl groups, while category as well as amino groups of AA molecule remained in the original state. Based on the treatment of experimental results, parameters characterizing the kinetics of AA polymerization at non-isothermal conditions were established.

Keywords

acrylamide; polyacrylamide; sodium chlorides; potassium ferrioxalate; potassium iodate; infrared spectroscopy; gas chromatography – mass spectrometry; differential scanning calorimetry

Acrylamide (AA) is a toxic compound formed during thermal processes of food production as one of numerous products of Maillard reaction taking place between reducing saccharides and amino acids, when key role play such compounds as reducing saccharides and asparagine [1, 2]. Formation and occurrence of AA in various foods is considered a risk factor due to its ability to increase probability of perimenopausal endometrial and ovarian cancer [3]. Since AA is formed from precursors frequently occurring in raw materials, procedures preventing totally its formation seem to be unrealistic. On the other hand, several papers have dealt extensively with procedures of AA elimination in final food products [4–6]. Up to date, a lot of procedures have been developed to minimize AA content in food matrices, such as amino acids addition [7, 8], usage of additional or special technological procedures [9, 10], removal of asparagine by enzymatic degradation using the enzyme asparaginase [11], addition of antioxidant

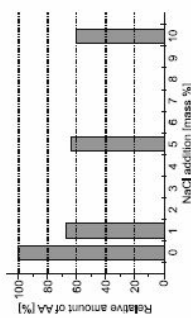


Fig. 1. Relative amount of acrylamide in an equimolar mixture of asparagine and glucose after heat treatment at 171.1 °C for 10 min, as a function of NaCl addition.

were maintained, when NaCl was added to the mixture at 1, 5 and 10%. Every heating experiment and determination was repeated for 27 times to obtain sufficient amount of data for calculation of standard deviation as well as relative standard deviation. The decrease in AA content resulting from the heat treatment is shown in Fig. 1. As can be seen, addition of NaCl had considerable inhibitory effects on AA formation in the studied systems. However, the decrease was not linear with the addition of NaCl and the dependence was hyperbolic-like with the tendency to reach a limit value for NaCl addition above 10%. The high decrease in the AA content (by 33%) was already observed for the additional of 1% of NaCl, which is important for practical applications in real technological procedures during thermal food processing. On the other side, the increase in the added amount from 1 to 10% had less effect, when AA content decreased only by 8%.

Study of AA behaviour in contact with NaCl as followed by differential scanning calorimetry [16]

The effect of NaCl on AA behaviour during heating was studied by differential scanning calorimetry (DSC). Pure NaCl, pure AA and the mixture AA and NaCl (1 : 1, w/w) were heated at a heating rate of 10 K·min⁻¹ and recorded. In Fig. 2, the record of NaCl is a horizontal line, which indicates that no process occurs in NaCl. AA shows an endothermic peak with the onset at a temperature of 82 °C corresponding to melting of AA. At 156 °C, an exothermic peak starts, which is obviously connected with polymerization of AA. In the DSC record of the mixture of AA and NaCl,

one can see that melting occurs at the same temperature as for pure AA. However, the polymerization peak is shifted by 12 °C to lower temperatures, so indicating a strong acceleration of the AA polymerization by NaCl. The elimination of AA may occur not only by AA polymerization to biologically inactive polyacrylamide but, in a real food matrix, also by the reaction of AA with other compounds. The DSC measurements have shown that the AA elimination by polymerization is strongly accelerated by the presence of NaCl, which is apparently the reason of the lower AA content in the model food matrix.

Confirmation of AA polymerization in the presence of NaCl and additives of table salt [17]

Individual inorganic compounds (NaCl, K₂Fe(NH₄)₂SO₄·6H₂O) and AA dissolved in methanol were placed into a 40 ml glass vessel and methanol was removed using a stream of nitrogen. Then, the vessels were sealed tightly with PTFE/silicone septa and heated in a thermostat from 102 °C to 180 °C at a heating rate of 2 °C·min⁻¹. The temperature of reactants inside the vessels was monitored by a thermometer. Systems were sampled periodically by carrying out three parallel measurements. After reaching the selected temperature, the vessels were cooled and their contents were dissolved in methanol. Then, deuterium-labeled acrylamide (D₃-AA) dissolved in methanol was added, sonicated for 5 min, filtered and analyzed by GC-MS. For Fourier transform infrared (FTIR) spectrometry analysis, 0.5 g of the inorganic compound and AA were mixed and homogenized thoroughly in a mortar dish, then the mixture

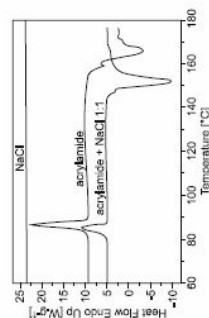


Fig. 2. DSC records of NaCl, pure acrylamide and the mixture of acrylamide and NaCl (1 : 1, w/w) at a heating rate of 10 K·min⁻¹.

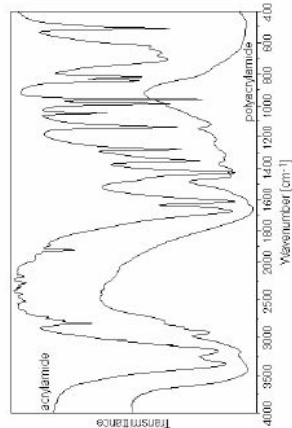


Fig. 3. Infrared spectrum of acrylamide (top) and the isolated product, polyacrylamide (bottom) in a KBr pellet at room temperature.

was placed into a glass tube, sealed tightly with FITE/silicone septa, placed in a thermostat and heated to 180 °C for 20 min. After cooling, 10 ml of water was mixed with the tube content and the formed gel was centrifuged. To remove completely the inorganic component, the gel washing was repeated ten times, and then it was dried in a laboratory drier at 80 °C. Finally, KBr pellets containing the product and AA were prepared for the FTIR analysis.

FTIR spectra of AA and the product in the mid-infrared region of 4000–400 cm⁻¹ are shown in Fig. 3. The AA bands at 3454 cm⁻¹ and 3184 cm⁻¹ assigned as NH₂ stretching antisymmetric and symmetric modes, respectively, remained practically at the same wave numbers in the polymer spectrum and kept similar shapes and intensities. On the other hand, AA bands corresponding to the C–H stretching modes were above 3000 cm⁻¹, which is typical for olefinic hydrogens and normally indicates the presence of sp²-hybridized carbon in CH bonds. In the product, these bands disappeared and the new ones appeared at 2952, 2932 and 2887 cm⁻¹, respectively. The area below 3000 cm⁻¹ is typical for C–H stretching modes of saturated hydrocarbons with secondary and tertiary bonded carbon in methylene –CH₂– and methane CH groups, respectively. Thus, NH₂ group can be identified from this part of the spectrum of the product and, in comparison with AA, disappearance of the vinyl group and the presence of a saturated carbon chain is notable. IR spectrum of the amide group is characteristic for several modes described in terms of amide vibrations as amide I (C=O stretching), amide II (NH₂ deformation or scissoring), amide III (C–N stretching), amide IV (C=O deformation or rocking), amide V (NH₂ wagging) and amide VI (C=O wagging). In the condensed-state spectra, the amide I and II modes appear as strong bands in the regions (1680 ± 40) cm⁻¹ and (1610 ± 30) cm⁻¹, respectively [22]. Hence, the assignment of AA bands at 1674 cm⁻¹ and 1614 cm⁻¹ as C=O stretching and NH₂ deformation modes is obvious. C=C stretching mode occurring in this region at 1648 cm⁻¹ is very weak in the IR spectrum and, consequently, not useful for diagnostic purposes. The spectrum of the product in this region is very similar to the AA spectrum indicating that both amide modes are present. It means that the amide group remains unchanged in the product. Frequency upshift of C–N stretching mode (amide III) at 1412 cm⁻¹ and >CH₂ deformation mode at 1450 cm⁻¹ were used as a proof of AA polymerization under the influence of γ-irradiation [23]. The changes regarding the vinyl group can be monitored through its very characteristic three wagging modes including all three hydrogens in –CH=CH₂ group. In two of them, hydrogen atoms in *trans* and *cis* positions participate. They appear in a narrow region (975±55) cm⁻¹ and in a wide one (565±165) cm⁻¹ [22], and they are also known as CH=CH *trans* and *cis* wagging. The former is usually present as a strong band and often is marked as =CH wagging. Both ending hydrogen atoms mainly participate in the third wagging mode appearing in the region (895±85) cm⁻¹. This mode is marked as =CH₂ wagging. It is usually present as a strong band and additionally accompanied by the very characteristic medium-intensive overtone around 1900 cm⁻¹. This mode

is sensitive to α-bonded atom and appears in the region (950±30) cm⁻¹ in compounds with C=O bond [22]. Therefore, the strong absorptions at ≈975 cm⁻¹ and ≈950 cm⁻¹ with the overtone at ≈1900 cm⁻¹ are the most useful infrared bands to elucidate the –CH=CH₂ structure. In the IR spectrum of AA, there is =CH wagging mode at 990 cm⁻¹ and =CH₂ wagging mode at 962 cm⁻¹ with the overtone at 1921 cm⁻¹. Absence of these three bands in the IR spectrum of the product indicates the transformation of the vinyl group into a saturated carbon chain similarly as the above-mentioned results for N–H and C–H stretching regions.

Non-isothermal Kinetics of AA elimination and its acceleration by NaCl and additives of table salt [18]

The changes in AA content were followed under non-isothermal conditions. The reason for use of these experimental conditions was the impossibility to establish immediately the isothermal conditions in reaction vessels, in particular at temperatures above 100 °C. The results of measurements showed that the sample reached the target temperature after approximately 5 min, when the approach to the target temperature followed an exponential course. It means that the measurement under “isothermal” conditions would be non-isothermal and the “isothermal” conditions would be ill-defined. Therefore, it was decided to use the well-defined linear heating conditions with the heating rate of 2 °C min⁻¹. The measured dependence of AA content on temperature is shown in Fig. 4. As follows from the experimental results, NaCl strongly accelerated the decrease in AA content.

Mechanisms of the processes in condensed phase are very often unknown or too complicated to be characterized by a simple kinetic model. They tend to occur in multiple steps that have different rates. To describe their kinetics, methods based on the single-step approximation are frequently used. Within the approximation, the rate of the complex multi-step condensed-state process can be formally described as

$$\frac{dA}{dt} = k(T)f(\alpha) \quad (1)$$

where *t* is time, *T* is temperature, α is the conversion of the process under study, *k*(*T*) and *f*(α) are temperature and conversion functions, respectively. Eq. (1) is mostly called the general rate equation.

The temperature function in Eq. (1) is almost exclusively expressed by the Arrhenius equation. For non-isothermal processes with linear heating, the temperature integral cannot be expressed in a closed form when the Arrhenius equation is used. It has been discussed that, for the single-step approximation, there is no need to be confined to the Arrhenius equation. Other functions leading to the closed form of the temperature integral were suggested. We chose the function

$$k(T) = AT^m \quad (2)$$

where *A* and *m* are parameters. Considering the conversion function, for the non-isothermal kinetic data it is recognized that almost any *f*(α) can satisfactorily fit the experimental data. We chose a first-order conversion function in the form:

$$f(\alpha) = 1 - \alpha \quad (3)$$

Combination of Eq. (1) – Eq. (3) gives after some manipulations:

$$\int_0^\alpha \frac{d\alpha}{1-\alpha} = \int_{T_0}^T AT^m dt \quad (4)$$

For linear heating, the dependence of temperature on time can be expressed as

$$T = T_0 + \beta t \quad (5)$$

where *T*₀ is the starting temperature and β stands for the heating rate. Combining Eq. (4) and Eq. (5), one can get after integration and some rearrangement:

$$\alpha = 1 - \exp\left[-\frac{AT^{m+1}}{\beta(m+1)}\right] \quad (6)$$

In Eq. (6), it is assumed that no process occurs at the beginning of the experiment so that the lower temperature integration limit was set *T*₀ = 0 K. The conversion of AA polymerization is defined as

$$\alpha = \frac{g_0 - g}{g_0} \quad (7)$$

where *g*₀ and *g* are the amounts of AA in the reaction vessel at the temperatures *T*₀ and *T*, respectively.

In order to avoid the manipulation with extremely small values of the parameter *A*, for the treatment of experimental results we defined the reduced temperature, θ:

$$\theta = \frac{T}{T_r} \quad (8)$$

where *T*_r is the reference temperature. In this paper, the reference temperature of 126.85 °C

(400 K) was chosen. Then, Eq. (2) can be re-written as

$$k = a \delta^m \quad (9)$$

where

$$a = A T^m \quad (10)$$

Finally, Eq. (6) takes the form

$$\alpha = 1 - \exp \left[- \frac{a T_0^m \delta^{m+1}}{\beta (m+1)} \right] \quad (11)$$

Combining Eq. (7) and (11), one can get:

$$g = \delta \exp \left[- \frac{a T_0^m \delta^{m+1}}{\beta (m+1)} \right] \quad (12)$$

Eq. (12) was used for the treatment of experimental data. The adjustable parameters were g , a and m . For the minimization of the sum of squares between experimental and fitted values of the AA amount, non-linear curve fit was applied using Origin 5 (OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA) software. The experimental points and fitted curves are shown in Fig. 4. This single-step approximation is a mathematical tool for describing the kinetic in a simple way represented by Eq. (1), irrespective of the complexity of the overall process. For a complex process, the adjustable parameters in the temperature function have no mechanistic significance or physical meaning, so there is no reason to be confined to the Arrhenius relationship and the use of Eq. (2) is fully justified. The kinetic parameters obtained thus do not have any mechanistic significance. Knowing their values, however, one can model the kinetics of the process without a deeper insight into its mechanism. It is possible to calculate α at a chosen time

for any time-temperature regime. For a constant temperature, taking into account Eq. (9), the time for a first-order reaction can be expressed as

$$t_{0.5} = \frac{\ln(1-\alpha)}{k} = \frac{\ln(1-\alpha)}{a \delta^m} \quad (13)$$

CONCLUSIONS

1. AA elimination can be accelerated by the addition of NaCl, which is able to initiate polymerization reactions of this food contaminant.
2. Inorganic salts $K_4[Fe(CN)_6]$ and KIO_3 , used as table salt additives, exhibit much stronger effects on AA elimination during thermal processing than pure NaCl.
3. Formation of polyacrylamide has been proven by FTIR spectroscopy, which confirmed formation of C-C backbone polymer, while the carbonyl and amino groups remained unchanged.
4. With regard to high AA reactivity and complexity of a real food matrix, polymerization may represent just one of conceivable pathways of acrylamide elimination taking place during thermal processes.
5. For description of AA elimination, the equation and parameters characterizing the kinetics of AA polymerization, e.g. the rate of its elimination at non-isothermal conditions, can be obtained.
6. The kinetic parameters obtained facilitate the calculation of rate constant values for any temperature in an isothermal regime.
7. This approach simplified considerably the complexity of the overall processes taking place in food matrix during heating and makes possible modelling the kinetics of AA elimination without a deeper insight into its mechanism.

Acknowledgements

The financial support from the Slovak Grant Agency, grant No. 1/06/009 and Science and Technology Assistance Agency of Slovak Republic under the contract No. APVT-27-03/0202, is gratefully acknowledged.

REFERENCES

1. Friedmann, M.: Chemistry, biochemistry and safety of acrylamide. *A review*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 2003, pp. 4504-4526.
2. Yajayan, V.A., Wozniowski, A., Peres Locat, C.: Why acrylamide needs carbonylates: to generate acrylamide. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 2003, pp. 1753-1757.
3. Högersvortz, J.G., Schouwen, L.J., Koning, E.J.,

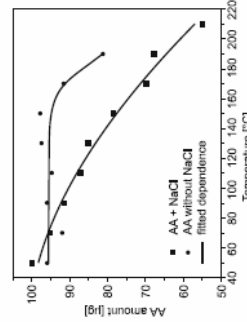


Fig. 4. Changes in acrylamide amount in non-isothermal conditions as a function of temperature.

- Goldboom, R.A., Van Den Brandt, P.A.: A prospective study of dietary acrylamide intake and the risk of endometrial, ovarian, and breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 16, 2008, pp. 2304-2313.
4. Clair, A., Cailé, R., Schieber, A.: Acrylamide in cereal products: A review. *Journal of Cereal Science*, 47, 2008, pp. 118-133.
5. Morales, F., Capuano, E., Fogliano, V.: Migration strategies to reduce acrylamide formation in fried potato products. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1126, 2008, pp. 89-100.
6. Friedman, M., Levin, C.E.: Review of methods for the reduction of dietary content and toxicity of acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2008, pp. 6113-6140.
7. Kim, C.T., Hwang, E.S., Lee, H.J.: Reducing acrylamide in fried snack products by adding amino acids. *Journal of Food Science*, 70, 2005, pp. C354-C358.
8. Clarys, W.L., De Vrieschouwer, K., Heerdicks, M.E.: Effect of amino acids on acrylamide formation and elimination kinetics. *Biotechnology Progress*, 21, 2003, pp. 1525-1530.
9. Fan, X., Marovska, K.: Effectiveness of ionizing radiation in reducing furan and acrylamide levels in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2006, pp. 8266-8270.
10. Eroglu, S.B., Polazoglu, I.K., Gökmen, V., Sarayba, H.Z., Ekiz, H.T.: Reduction of acrylamide formation in French fries by microwave pre-cooking of potato strips. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 2007, pp. 133-137.
11. Cisarová, Z., Kliz, E., Boegl, P.: Impact of L-asparagines on acrylamide content in potato product. *Journal of Food and Nutrition Research*, 45, 2006, pp. 141-146.
12. Cisarová, Z., Šubaj, M., Horvátová, J.: Correlation between acrylamide contents and antioxidant capacities of spice extracts in a model potato matrix. *Journal of Food and Nutrition Research*, 47, 2008, pp. 1-5.
13. Gökmen, V., Şenyuva, H.Z.: Acrylamide formation is prevented by divalent cations during the Maillard reaction. *Food Chemistry*, 103, 2007, pp. 196-203.
14. Clair, A., Mougill, M., Weitz, G., Schieber, A., Carle, R.: Impact of formulation and technological factors on the acrylamide content of wheat bread and bread rolls. *Journal of Cereal Science*, 47, 2008, pp. 546-554.
15. Kollek, E., Šimko, P., Simon, P.: Inhibition of acrylamide formation in asparagine-D-glucose model system by NaCl addition. *European Food Research and Technology*, 234, 2006, pp. 283-284.
16. Kollek, E., Šimko, P., Simon, P.: Effect of NaCl on the decrease of acrylamide content in a heat-treated model food matrix. *Journal of Food and Nutrition Research*, 45, 2006, pp. 17-20.
17. Kollek, E., Šimko, P., Simon, P., Gatal, A.: Confirmation of polymerization effects of sodium chloride and its additives on acrylamide by infrared spectroscopy. *Journal of Food and Nutrition Research*, 46, 2007, pp. 39-44.
18. Kollek, E., Šimko, P., Simon, P.: Non-isothermal kinetics of acrylamide elimination and its acceleration by table salt - a model study. *Journal of Food Science*, 73, 2007, pp. 341-344.

Received 2 December 2008; revised 15 January 2009; accepted 22 January 2009.

Improvement of Cereal Product Safety by Enzymatic Way of Acrylamide Mitigation

Z. CIESAROVÁ^{1*}, K. KUKUROVÁ¹, A. BEDNÁRIKOVÁ¹, L. MARKOVÁ² and S. BAXA³

¹Food Research Institute, 824 75 Bratislava, Slovak Republic; ²Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Czech Republic; ³I.D.C. Holding A/S Pastry Factory Sered, Slovak Republic, *E-mail: ciesarova@vvp.sk

Abstract: Acrylamide as a probably carcinogenic compound is known to be formed in many high thermally treated products with a natural occurrence of amino acid asparagine and reducing sugars as well. Cereal products, especially gingerbreads are extensively affected by acrylamide formation up to 1000 µg/kg and more. This study compares pros and cons of enzyme treatment and a substitution of ammonium raising agent for sodium salt addition in manufactured gingerbreads with respect to their final sensory quality. More than 97% reduction of acrylamide content was achieved by the asparaginase application before baking with no observed detrimental effect on sensory quality of final products. On the other hand, sodium raising agents efficiently decreased acrylamide content, but with no acceptable impact on colour, texture, softness, delicacy and an expected appearance of gingerbread. For that reason, the application of L-asparaginase enzyme seems to be a perspective way to mitigate acrylamide.

Keywords: acrylamide; gingerbread; L-asparaginase; raising agent

plication of L-asparaginase enzyme converting one of the crucial precursors amino acid asparagine to aspartic acid which does not enter the reaction of acrylamide formation. An unambiguous advantage of this approach is that no detrimental effect on sensory quality of final products is observed. The desirable efficiency of enzyme activity depends on the appropriate conditions during enzyme treatment.

The presented study is focused on the determination of enzyme and raising agent effects on acrylamide formation in manufactured gingerbreads and their sensorial evaluation.

MATERIAL AND METHODS

Baking procedure. Dough for gingerbread making was treated with L-asparaginase enzyme addition in concentration of 100 U and 1000 U/kg of dough, respectively. Raising agents applied in dough were as follows: ammonium hydrogen carbonate (17.30 g of NH₄HCO₃ per kg of dough) or a mixture of sodium hydrogen carbonate (24.22 g of NaHCO₃) and sodium pyrophosphate (17.30 g of Na₂H₂P₂O₇) per kg of dough for 30 min and 60 min, respectively, during kneading at 25°C. In the third case dough was staying for 48 h at ambient temperature. After shaping pastries were baked in an oven at the temperature of 250°C (upper heating) and 230°C (bottom heating) for 5 min.

Final products were analysed to determine acrylamide and amino acid (asparagine, aspartic acid, glutamine, glutamic acid) contents by LC/MS/MS (CIESAROVÁ *et al.* 2009), as well as a dryness and pH value were measured and sensory properties were evaluated.

RESULTS AND DISCUSSION

During a standard procedure of gingerbread making with ammonium hydrogen carbonate addition more than 1200 µg/kg of acrylamide was developed. This high level of acrylamide was successfully decreased by enzyme addition in concentration of 1000 U/kg of dough after 30 min lasting incubation (45% of acrylamide from the initial value) and 60 min long incubation (75% reduction of acrylamide). Long-term dough staying for 48 h at ambient temperature resulted in 97% of acrylamide reduction. A promising decrease of acrylamide (approximately 80%) was achieved also with a lower 100 U/kg of dough enzyme concentration, but only after 48 h incubation (Figure 1). A substitution of ammonium raising agent for sodium salts resulted in a substantial decrease of acrylamide content (70 µg/kg). Further acrylamide elimination up to the values between 20 and 30 µg/kg and even lower than LOQ was reached with 1000 U/kg enzyme application (Figure 2). However, conspicuous disadvantages of this raising agent

INTRODUCTION

After the revealing of acrylamide presence in foods a lot of studies have confirmed its presence in nearly all fried, baked and roasted foods. Acrylamide exposure varies depending upon the population's eating habits and the way the foods are processed and prepared. Generally, fried potato products, ready-to-eat breakfast cereals, baked goods and roasted coffee are the most important food categories that contribute most to acrylamide exposure. Among them, according to European-wide database (IRMM 2006), gingerbreads belong to those with the highest content of acrylamide (number of samples: 1003; acrylamide content: minimum 5 µg/kg; median 303 µg/kg; maximum 7854 µg/kg). An average long-term exposure of acrylamide has been estimated of 0.3 to 0.8 µg/kg body weight/day (FAO/WHO 2002). The contribution of gingerbreads to the acrylamide exposure

for general population (1–97 year old) has been reckoned to be 6% (BOSN *et al.* 2005). Although gingerbreads are ones of seasonal products especially made at the Christmas time, but not entirely, they are usually consumed by children during a year as a snack. Based on the reported data, the Committee JECFA in 2005 noted that children may have intakes of acrylamide around two or three times higher those of adult consumers when expressed on a body weight basis (JECFA 2005). It is expected that children and adolescents have consumption patterns different from adults. Most of the types of foods in which acrylamide was detected are popular among children and adolescents. Moreover, they have a lower average body weight and, consequently, a higher average food intake per kilogram of body weight than adults. For that, acrylamide intake by these individuals is considered a concern. A perspective way of efficient acrylamide mitigation seems to be an ap-

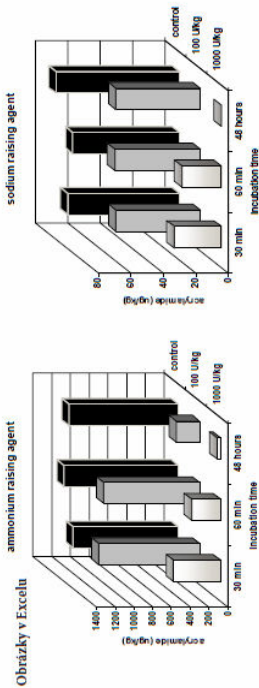


Figure 1. Acrylamide content in gingerbread with ammonium raising agent addition treated by L-asparaginase enzyme (0; 100; 1000 U/kg) for 30 min, 60 min and 48 h incubation at ambient temperature before baking

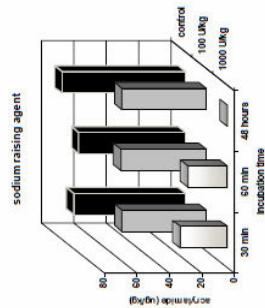


Figure 2. Acrylamide content in gingerbread with sodium salt raising agent addition treated by L-asparaginase enzyme (0; 100; 1000 U/kg) for 30 min, 60 min and 48 h incubation at ambient temperature before baking

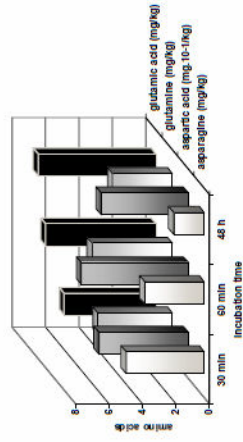


Figure 3. Amino acids (Asp – aspartic acid in $\text{mg} \times 10^{-3}/\text{kg}$; Asn – asparagine in mg/kg ; Glu – glutamic acid in mg/kg ; Gln – glutamine in mg/kg) in gingerbread with sodium agent addition treated by L-asparaginase enzyme (1000 U/kg) for different incubation time at ambient temperature before baking

replacement were inappropriate sensory properties of final products considering their colour, texture, softness, delicacy, and expected appearance as well. Thus, an enzymatic way of acrylamide reduction seems to be more acceptable. Moreover, an interesting impact on amino acid profiles of enzymatically treated samples with different raising agents was observed. In both cases of raising agent alternatives, after enzyme addition an expected decrease of asparagine content related with an adequate aspartic acid increase in first 60 min was found out which was evident especially in higher 1000 U/kg enzyme concentration (Figure 3). Later the content of aspartic acid decreased probably due to entering further reactions. However, a noteworthy fact is that the content of glutamine weakly decreased and glutamic acid content was slightly growing especially in case of sodium agent addition (Figure 3). These observations could imply the presence of transamination and transamidation reactions between the mentioned amino acids as a consequence of amino acid metabolism as well as they open the question of the substrate specificity of L-asparaginase enzyme related to amino acid glutamine.

Acknowledgement: This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. COST-0015-06 and No. SK-CZ-0124-07.

References

- BONNÉ, M., MUI A.D., VOIT H.V.D., DONKERSGOED G.V., BRETTÉ M., KLAVERTEN J.D.V. (2005): Calculation of dietary exposure to acrylamide. *Mutation Research*, **580**: 143–155.
- ČIŠAROVÁ Z., KUKUROVÁ K., BIEDNÁRKOVÁ A., MORALES J.F. (2009): Effect of heat treatment and dough formulation on the formation of Maillard reaction products in fine bakery products – benefits and weak points. *Journal of Food and Nutrition Research*, **48**: 20–30.
- FAO/WHO (2002): Opinion of the Scientific Committee on Food on new findings regarding the presence of acrylamide in food. Brussels, 3 July 2002. Available at: http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/acrylamide_june2002/en
- IRMM: Monitoring database, June 2006. Available at: <http://www.irmm.jrc.be/html/activities/acrylamide/database.htm>
- IECF: 68th Meeting Geneva, 19–28 June 2007: Available at: <http://www.who.int/ipcs/food/iecf/summaries/summary08.pdf>

Effect of Inorganic Salts on Acrylamide Formation in Cereal Matrices

K. KUKUROVÁ*, Z. ČIESAROVÁ, A. BEDNÁŘKOVÁ and L. MARKOVÁ

Food Research Institute, 824 75 Bratislava, Slovak Republic, *E-mail: kukurova@vup.sk

Abstract: The aim of the work was to compare the impact of different salts such as monovalent and divalent chlorides, hydrogencarbonates, phosphates and lactate on acrylamide formation in cereal model system during baking at 190°C for 9 min. Ammonium hydrogencarbonate promoted acrylamide production significantly. On the other hand, other inorganic salts lowered acrylamide content. Calcium chloride was the most effective with near to 90% acrylamide elimination ability. Sodium acid pyrophosphate, sodium as well as potassium dihydrogen phosphate were also very effective and brought about 75% acrylamide content decrease, followed by calcium lactate, sodium chloride and potassium chloride causing 40–45% of acrylamide elimination and finally sodium and potassium hydrogen carbonates that achieved 30% reduction of acrylamide.

Keywords: acrylamide; cereals; raising agents

INTRODUCTION

Acrylamide presence in food attracts a major concern due to its potential health impact.

Acrylamide formation was found to occur during a thermal process, by Maillard reaction, of reducing sugars with asparagine at temperatures above 120°C (Stadler *et al.* 2002).

Ammonium-based raising agents are widely used in biscuit manufacture, either individually or as part of a mixed raising system providing brown-ing, crisp and porous crumb (Sadd *et al.* 2008). Nevertheless, there is a deficiency of ammonium hydrogen carbonate in significant encouragement of acrylamide formation in bakery products. On the other hand, metal ions in salts that is added to cereals as a raising agents, preservatives or fortificants was demonstrated to cause a reduction of acrylamide. For example, the fortification of flour in U.K. with 0.3% calcium carbonate gave the acrylamide reduction of about 30% (a similar effect was obtained using calcium chloride or magnesium addition). It is noteworthy that not only cations but also anions play an important role in effect on acrylamide formation during food processing. Calcium causes an acrylamide

reduction if is added as a carbonate or chloride. However, calcium propionate which is added as a preservative (up to 0.2%) resulted in more than 90% increase in acrylamide (Gökmen & Şenyuva 2007; Sadd *et al.* 2008; CIAA Toolbox 2009). The aim of presented study was to compare selected salts on acrylamide formation in cereal model system.

MATERIAL AND METHODS

A cereal model system consisted of 0.38 g of wheat starch, 57 mg of fructose, 63 mg of glucose monohydrate, 0.38 mg of L-asparagine monohydrate and 380 µl of water to simulate the main composition of acrylamide precursors in dough. Reactants were combined in a closed glass test vials with PTFE lined storage caps and mixed well using vortex. Selected salts, NaCl, CaCl₂·2H₂O, KHCO₃, NaH₂P₂O₇·2H₂O, KH₂P₂O₇, NaHCO₃, NH₄HCO₃, Ca(C₂H₃O₂)₂·5H₂O (marked as: Cal₂), Na₂H₂P₂O₇ and KCl were added in concentrations 0.01, 0.05 and 0.1 mmol/g into model system. Impact of salts on pH value of system was measured in the highest concentration. Baking conditions

were tested at 190°C during 30 min to find out the maximum of acrylamide formation. All samples were prepared in triplicate. Acrylamide was extracted by acetic acid with further pre-extraction to ethylacetate to avoid the negative impact of salts reported by Gökmen and Şenyuva (2006) using the chromatography system published earlier (Čiesarová *et al.* 2009).

RESULTS AND DISCUSSION

Free amino acid asparagine in combination with reducing sugars generates significant amounts of acrylamide when heated at temperatures greater than 120°C (Morttram *et al.* 2002; Stadler *et al.* 2002). The generation of acrylamide in the cereal model system at customary baking temperature of 190°C was characterised by very fast acrylamide formation in first 7 min followed by a short interval of relative stable acrylamide concentration up to 10 min and subsequent an acrylamide decrement (Figure 1). The decline of the curves was most likely due to polymerisation as recently reported (Stad-

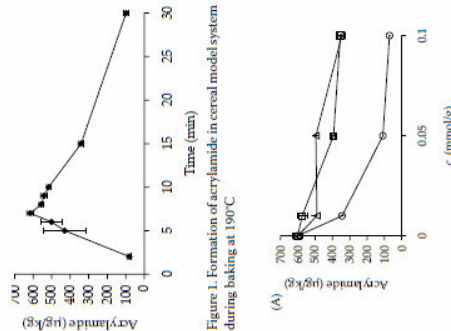


Figure 1. Formation of acrylamide in cereal model system during baking at 190°C

ler *et al.* 2004; Kolek *et al.* 2007). Reasonably, 9 min of baking was selected as a suitable time for thermal input in experiment for the determination of concurrent formation and degradation of acrylamide in the presence of selected salts.

When the cereal model system without the presence of salt was heated, the yield of (603 ± 29) µg/kg of acrylamide was achieved at 190°C after 9 minutes. The presence of salts in the reaction mixture resulted in a decrease of acrylamide concentration (Figures 2 and 3) with exception of ammonium hydrogen carbonate NH₄HCO₃, a well-known accelerator of acrylamide formation, since the highest content of acrylamide was detected (1488 ± 130 µg/kg, Figure 2). As it has been published, NH₄HCO₃ increased the formation of sugar fragments (glyoxal and methylglyoxal) that reacted rapidly with asparagine to furnish acrylamide in higher yield than the native reducing sugars under mild conditions. To achieve the correct balance of gas release during baking and optimum texture, flavour and colour, combinations of NH₄HCO₃, NaHCO₃ and acidulant are often required (CIAA Toolbox 2009). On the other hand, it has been suggested that adding of divalent metal ions could give additional high-temperature stability to asparagine matrix interactions (stable polymer network), thereby rendering the latter species unavailable for reaction with carbonyl precursors to produce acrylamide (Sadd *et al.* 2008). Gökmen and Şenyuva (2007) showed that the presence of cations in the reaction mixture influenced the rate of decomposition of acrylamide precursors significantly, mainly glucose, while the most asparagine remained unreacted. It was confirmed by mass spectrometric analyses of pyrolysates that the formation of the Schiff base of asparagine, which is the key intermediate leading

Figure 2. Effect of chloride (A – □ NaCl, pH 6.42, △ KCl, pH 6.42, ○ CaCl₂, pH 6.24) and hydrogen carbonate anions (B – □ NaHCO₃, pH 7.67, △ KHCO₃, pH 7.74, ○ NH₄HCO₃, pH 7.76) of sodium, calcium, potassium and ammonium salts on acrylamide formation in cereal model system (190°C/9 min)

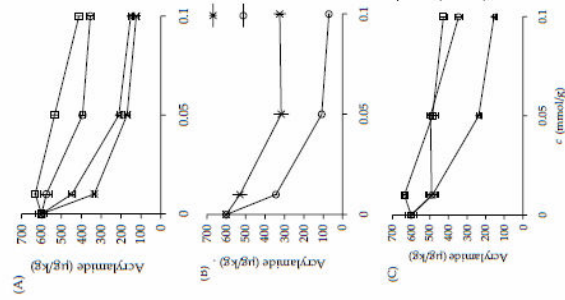


Figure 3. Effect of sodium (A – □ NaHCO₃, pH 7.67; ○ NaCl, pH 6.42; △ KH₂PO₄, pH 4.90; * Na₂H₂P₂O₇, pH 7.76); calcium (B – □ KHCO₃, pH 7.74; ○ KCl, pH 6.32; △ KH₂PO₄, pH 4.88); and potassium cations (C – * Ca₂⁺, pH 6.45; ○ CaCl₂, pH 6.34) of different salts on acrylamide formation in cereal model system (190°C/9 min)

to acrylamide, was prevented; meanwhile the reaction proceeded to form brown coloured products. Although the monovalent cations prevented from the formation of acrylamide in a certain extent, it was less efficient than the divalent cations (GÖKMEŇ & ŐENYUVA 2007). It was confirmed also in the presented study (Figure 2) where NaCl and KCl caused the comparable acrylamide mitigation from (603 ± 29) µg/kg up to (345 ± 19) µg/kg whereas CaCl₂ resulted in the final acrylamide concentration of (70 ± 4) µg/kg. The effect of the non-ammonium-based raising agents could be explained entirely in terms of shifts in pH that is obvious from results in Figure 3 depicting different sodium, calcium and potassium salts. Nevertheless,

there is a need to take into account that low pH is beneficial for acrylamide, but is limited in practice by dough buffering and the risk of promoting other contaminants such as 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) (SADD *et al.* 2008).

GÖKMEŇ and ŐENYUVA (2007) successfully applied chlorides to reach an acrylamide mitigation in potato strips by dipping into the 0.1 M solution of CaCl₂, as well as NaCl. The results confirmed that divalent cations were capable of inhibiting the formation of acrylamide. Despite the promising efficiency of CaCl₂ in acrylamide reduction strategy in food, trials at benchscale have given variable results, strongly affecting a product quality where calcium chloride hindered the rise of sweet biscuits and the products were unpalatable when tasted. For that reason, this approach have not been commercialised yet (CIAA Toolbox 2009).

It can be concluded that using inorganic salts is effective acrylamide mitigation strategy. CaCl₂ was the most effective in acrylamide mitigation in cereal model system followed by pyrophosphates and phosphates such as Na₂H₂P₂O₇, NaH₂P₂O₄ and KH₂P₂O₄.

Acknowledgements: This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the Contract No. COST-0015-06 and No. SK-CZ-0124-07.

References

- CIAA. Acrylamide Toolbox. Confederation of Food and Drink Industries of the EEC, February 2009, Revision 12. Available at: http://www.ciaa.eu/documents/brochures/ac_toolbox_20090216.pdf
- CIESAROVA Z., KUKUROVA K., BEDNARIKOVA A., MORALES J.E. (2009): Effect of heat treatment and dough formulation on the formation of Maillard reaction products in fine bakery products – benefits and weak points. *Journal of Food and Nutrition Research*, **48**: 20–30.
- GÖKMEŇ V., ŐENYUVA H.Z. (2006): A generic method for the determination of acrylamide in thermally processed foods. *Journal of Chromatography A*, **1120**: 194–198.
- GÖKMEŇ V., ŐENYUVA H.Z. (2007): Acrylamide formation is prevented by divalent cations during the Maillard reaction. *Food Chemistry*, **103**: 196–203.
- KOLEK E., ŐIMKO P., ŐIMON P., GATIAL A. (2007): Confirmation of polymerisation effect of sodium chloride and its additives on acrylamide by infrared spectrometry. *Journal of Food and Nutrition Research*, **46**: 39–44.

MOTTRAM D.S., WEDZICHA R.L., DODSON A.T. (2002): Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, **419**: 448–449.

SADD P.A., HAMLET C.G., LIANG L. (2008): Effectiveness of methods for reducing acrylamide in bakery products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**: 6154–6161.

STADLER R.H., BLANK L., VARGA N., ROBERT F., HAU J., GUY P.A., ROBERT M.C., RIEDIKER S. (2002): Acryla-

mid from Maillard reaction products. *Nature*, **419**: 449–450.

STADLER R.H., ROBERT F., RIEDIKER S., VARGA N., DAVIDEK T., DEVAUD S., GOLDMANN L., HAU J., BLANK L. (2004): In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinyllogous compounds by the Maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 5550–5558.

Příloha 5: Příspěvek na konferenci

VPLYV SOLÍ NA ÚČINOK ENZYMATICKÉJ ELIMINÁCIE AKRYLAMIDU V CEREÁLNYCH VÝROBKOCH

Kristína Kukurová¹, Lucie Marková², Alena Bednářková¹, Zuzana Ciesarová¹

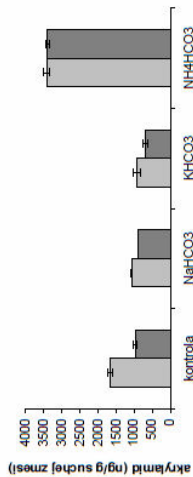
¹Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 824 75, Bratislava

²Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 646/118, Brno, ČR
e-mail: kukurova@vup.sk

Aplikácia L-asparaginázy patrí medzi vysoko efektívne metódy eliminácie toxického a potenciálne karcinogénneho akrylamidu v potravinovej matrici. Nespornou výhodou je zachovanie organoleptických vlastností charakteristických pre daný výrobok. Účinok asparaginázy bol v predchádzajúcich štúdiách úspešne testovaný na zemiakovej [1] a cereálnej matrici [2]. Mechanizmus účinku enzýmu je založený na konverzii hlavného prekursora akrylamidu, aminokyseliny asparagín, na kyselinu asparagovú, z ktorej sa akrylamid netvorí.

Priprítomnosť anorganických solí v cereálnych výrobkoch, ktoré sú pridávané najčastejšie za účelom kyprenia cesta, vplyvajú na výsledný obsah akrylamidu v hotovom produkte. Ich účinok sa môže prejavíť vo zvýšenom obsahu akrylamidu, ako je to v prípade hydrogenuhličitanu amónneho, alebo v poklese akrylamidu v prípade dvojmocných kationových solí, pričom bola pozorovaná aj koncentračná závislosť ich pôsobenia. Prezentovaná práca sa zameriava na systematické štúdium účinku širokého spektra solí, ktoré by mohli byť aplikované do cereálnych výrobkov počas technologického spracovania s cieľom zabezpečiť zníženie koncentráciu akrylamidu, ako aj na sledovanie vplyvu prídavku soli na aktivitu enzýmu. Bolo zistené, že hydrogenuhličitan znižujú účinok asparaginázy, pravdepodobne v dôsledku vplyvu na pH hodnotu cesta (Obr.).

□ hydrogenuhličitan (0,1 mmol/g) ■ hydrogenuhličitan (0,1 mmol/g) + enzým (0,5 U/g)



Obr. Vplyv hydrogenuhličitanov na koncentráciu akrylamidu v modelovej cereálnej zmesi s prídavkom a bez prídavku L-asparaginázy.

Podakovanie: Práca vznikla s podporou grantu APVV-COST-0015-06.

[1] Ciesarová, Z.; Kiss, E.; Boegl, P. *J. Food Nutr. Res.* **2006**, *45*, 141–146.

[2] Kukurová, K.; Morales, J.F.; Bednářková, A.; Ciesarová, Z. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, (in press).