

# Zhodnocení metod pro stanovení obsahu škrobu

Bc. Hana Šutová

---

Diplomová práce  
2009/2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav biochemie a analýzy potravin  
akademický rok: 2009/2010

## **ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE**

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Hana ŠUTOVÁ**  
Osobní číslo: **T080494**  
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Zhodnocení metod pro stanovení škrobu**

Zásady pro vypracování:

### **I. Teoretická část**

- 1. Charakteristika škrobu**
- 2. Přehled metod stanovení sacharidů**

### **II. Praktická část**

- 1. Stanovení škrobu u vybraných plodin zvolenými metodami**
- 2. Zhodnocení metod**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] Viles, F.J., Silverman, L. Determination of Starch and Celulose with Antone. Analytical Chemistry. 21, p. 950–953, 1949.

[2] Yemm, E.W., Willis A.J. The Estimation of Carbohydrates in Plant Extracts by Anthrone. Biochemical Journal, 57, p. 508–514, 1954.

[3] Klouda P. Moderní analytické metody. 2003, Pavel Klouda. ISBN 80-86369-07-2.

[4] Davídek, J., Velíšek, J. Analýza potravin, Ediční středisko VŠCHT, Praha, 1992.

[5] Velíšek, J. Chemie potravin, I, II, III. OSSIS, Tábor.

Vedoucí diplomové práce:

**Mgr. Monika Černá**

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

**4. ledna 2010**

Termín odevzdání diplomové práce:

**19. května 2010**

Ve Zlíně dne 8. dubna 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.  
*děkan*



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: Šutová Hana

Obor: Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byla jsem seznámena s tím, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně .....

.....

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce se zabývá zhodnocením metod pro stanovení obsahu škrobu. Teoretická část se zabývá charakteristikou škrobu, včetně chemických a fyzikálních vlastností škrobu. Dále jsou zde stručně popsány jednotlivé druhy škrobu a výrobky ze škrobu. Další část pojednává o fyzikálních a chemických metodách stanovení sacharidů. Cílem experimentální části bylo optimalizovat metody pro stanovení škrobu ve škrobnatých plodinách. Pro pokus byla vybrána metoda podle Ewera a dále spektrofotometrická metoda s použitím anthronu. Součástí je i validace spektrofotometrické metody.

Klíčová slova: andské plodiny, brambory, škrob, hlízy, polarimetrie, spektrofotometrie

## **ABSTRACT**

This diploma work deals with the evaluation of methods for the determination of starch content. A theoretical part handles starch characteristic including chemical and physical properties and further briefly describes the particular types of starch and starch products. Next part deals with the physical and chemical methods for the determination of sugars. The aim was to optimize the experimental methods for determination of starch in starchy crops. For the experiment were chosen according to Ewers method and spectrophotometric method using anthron. Moreover, it also contains the validation of spectrophotometric method.

Keywords: andean crops, potato, starch, tubers, polarimetry, spectrophotometry

Děkuji vedoucímu diplomové práce paní Mgr. Monice Černé za odborné vedení, rady a připomínky, které mi poskytovala při řešení této práce.

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvolněno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka. Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Ve Zlíně

.....  
Podpis

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>1 CHARAKTERISTIKA ŠKROBU</b> .....	<b>13</b>
1.1 CHEMICKÉ VLASTNOSTI ŠKROBU .....	13
1.2 FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI ŠKROBU .....	15
1.3 DRUHY ŠKROBŮ .....	18
1.4 OSTATNÍ MÉNĚ VÝZNAMNÉ DRUHY ŠKROBNATÝCH PLODIN.....	24
1.4.1 Čirok.....	25
1.4.2 Maniok .....	25
1.4.3 Batáty.....	27
1.4.4 Triticale .....	28
1.4.5 Andské plodiny .....	28
1.5 VÝROBKY ZE ŠKROBU .....	31
1.5.1 Rozdělení výrobků ze škrobu .....	32
1.5.2 Modifikované škroby .....	32
<b>2 METODY STANOVENÍ SACHARIDŮ</b> .....	<b>35</b>
2.1 CHEMICKÉ METODY STANOVENÍ SACHARIDŮ.....	35
2.1.1 Titrační metody .....	35
2.1.2 Spektrofotometrické metody .....	37
2.2 FYZIKÁLNÍ METODY STANOVENÍ SACHARIDŮ.....	38
2.2.1 Gravimetrická metoda .....	38
2.2.2 Denzitometrické metody .....	38
2.2.3 Optické metody .....	39
2.2.4 Chromatografické metody .....	41
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>47</b>
<b>3 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>48</b>
<b>4 METODIKA PRÁCE</b> .....	<b>49</b>
4.1 CHARAKTERISTIKA ANALYZOVANÝCH VZORKŮ .....	49
4.2 CHEMICKÉ ANALÝZY .....	52
4.2.1 Stanovení vlhkosti .....	52
4.2.1.1 Příprava misek .....	52
4.2.1.2 Předsoušení .....	52
4.2.1.3 Sušení.....	52
4.2.1.4 Vyhodnocení .....	53
4.2.2 Izolace škrobů z plodin .....	54
4.2.3 Stanovení obsahu škrobu.....	54
<b>5 VÝSLEDKY A DISKUSE</b> .....	<b>59</b>



5.1	STANOVENÍ VLHKOSTI .....	59
5.2	STANOVENÍ OBSAHU ŠKROBU .....	60
5.2.1	Stanovení obsahu škrobu metodou podle Ewerse .....	60
5.2.2	Stanovení obsahu škrobu spektrofotometrickou metodou .....	65
<b>ZÁVĚR .....</b>		<b>76</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>		<b>78</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>		<b>89</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>		<b>90</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>		<b>92</b>
<b>SEZNAM GRAFŮ .....</b>		<b>93</b>

## ÚVOD

Škrob znali již staří Egypťané (3500 př. n. l), kteří jej získávali zaděláním rozdrčené pšenice, nebo rýže s vodou a vypíráním vzniklého těsta. Byl nazýván *amylum* (prášek) a používán v kosmetice, medicíně, při úpravě *papyru* a po rozvaření zejména jako lepidlo. Počátek průmyslové výroby pšeničného škrobu v Evropě spadá do 16. a 17. století, později začal být též škrob vyráběn z brambor dovezených z Ameriky. Současně se v 17. a 18. století rozvíjí v Americe výroba kukuřičného škrobu. Další prudký vzestup výroby v 19. století byl způsoben rozvojem tzv. „průmyslové chemie škrobů“, tj. zpracováním nativního škrobu na velkou škálu výrobků ze škrobu, např. hydrolyzátů, modifikovaných škrobů, škrobových derivátů nebo technických dextrinů.

Škrob je zásobní polysacharid, který je vytvářen fotosyntézou a ukládán převážně v semenech, hlízách a oddencích. Pro rostlinu představuje zásobu energie, pro nás je však cennou obnovitelnou surovinou, využívanou pro chemický nebo jiný průmysl. Avšak pouze malá část z celkové produkce škrobů je pro průmysl určena.

Světová roční produkce škrobu je asi 12 miliónů tun. Z toho asi 65 % připadá na škrob kukuřičný, 25 % na škrob bramborový, 5 % na škrob pšeničný a zbytek tvoří škrob rýžový, ječný, maniokový a další.

V ČR tradičně převažovala výroba škrobu z brambor, který se vyznačoval vysokou kvalitou. Později výroba bramborového škrobu výrazně poklesla. Zvýšila se cena brambor, nastaly ekologické problémy s odpadními vodami, řada škrobáren byla zrušena a některé škrobárny přešly na výrobu pšeničného škrobu. V současné době se v ČR získává škrob převážně z brambor a pšenice. Ročně se vyrobí asi 17 tisíc tun škrobu bramborového a 16 tisíc tun škrobu pšeničného.

Hlavní plodiny poskytující škrob jsou kukuřice, brambory, maniok, pšenice a rýže. Tyto plodiny zajišťují 99 % světové produkce škrobu. Škrob z ječmene, hrachu nebo ovsy není dosud ve větší míře využíván. Další plodiny pěstované pro získávání škrobu jsou dnes méně významné. Z celosvětového hlediska mezi ně patří palma ságová, batáty, čirok, lotosové kořeny, taro, dosna a čočka.

V technické praxi se škrob používá už dlouho pro výrobu různých průmyslových výrobků a také výrobků denní potřeby. Dnes hraje škrob velmi důležitou roli, neboť více

než 2 mil. tun škrobu a škrobových výrobků se používá v Evropě v technickém sektoru a vzhledem k jeho neškodnosti a obnovitelnosti zdrojů jeho využití roste.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 CHARAKTERISTIKA ŠKROBU

Škrob (lat. *amylum*) je jeden z nejrozšířenějších a nejdůležitějších polysacharidů na Zemi. Jako dostupný zdroj energie ho využívá široké spektrum organismů (vyšší rostliny, živočichové a mikroorganismy). Vyskytuje se v přírodě v rostlinném materiálu jako rezervní látka v podobě zrnek uložených v semenech, kořenech, hlízách a také listech [1]. Zrna se vyskytují ve volné formě a nejsou chemicky ani fyzikálně vázána na žádnou chemickou složku [2]. Rozměry škrobových zrn se pohybují v rozmezí 1 až 110  $\mu\text{m}$ , přičemž výjimečně byla nalezena i zrna větších rozměrů. Počet malých zrn (do 10  $\mu\text{m}$ ) je větší než velkých zrn (nad 60  $\mu\text{m}$ ) [3].

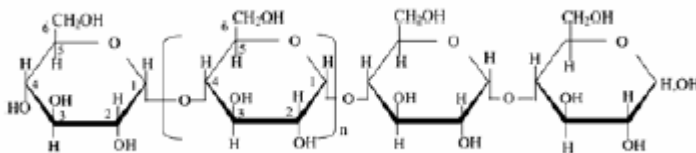
Přestože se škroby vyskytují ve všech částech rostlin, technologicky jsou zajímavé hlízy nebo semena. Mezi hlízovými škroby a škroby ze semen je velký rozdíl. Škrob, který je uložený v hlízách (např. škrob bramborový), se vyskytuje v materiálu, jehož převážnou složku představuje voda. Tato zrna jsou poměrně velká, polydisperzní, zejména však nakypřená a je možné, aby voda volně vstupovala dovnitř a ven jakoby velkou „smotanou“ molekulární sítí. Naopak škroby v zrnech (např. pšenice, kukuřice) jsou uloženy na vrcholu rostliny, v semenech. Tyto škroby jsou většinou monodisperzní, drobné a monokompaktní a vstup vody je velmi pomalý.

K průmyslovému využití má význam především škrob bramborový, dále pak kukuřičný a také pšeničný [4].

### 1.1 Chemické vlastnosti škrobu

Po chemické stránce je škrob makromolekulární sacharid  $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ , jehož základní stavební složkou je glukosa, která je vázána  $\alpha$ -glykosidicky, přičemž tato glukosová jednotka se opakuje tisíckrát až desettisíckrát. Kromě těchto polysacharidických látek obsahují jednotlivé škroby i malé množství průvodních látek, jakými jsou lipidy a proteiny; a zhruba 10 až 20 % vody. Škroby jsou tvořené pomocí dvou různých polysacharidů – amylosy a amylopektinu. Škrobová zrna obsahují obvykle 10–30 % amylosy a 70–90 % amylopektinu. Základní jednotkou u obou těchto polysacharidů je D-glukopyranosa [5].

**Amylosa** je lineárním řetězcem obsahujícím jednotky D-glukosy navzájem vázané vazbou  $\alpha$  (1,4), přičemž tento řetězec má strukturu šroubovice, do jejíhož nitra lze vázat až 20 % jodu (Obr. 1). Toho se využívá v analytické chemii při důkazech jodu [6].



Obr. 1 Schématické znázornění amylosy [7]

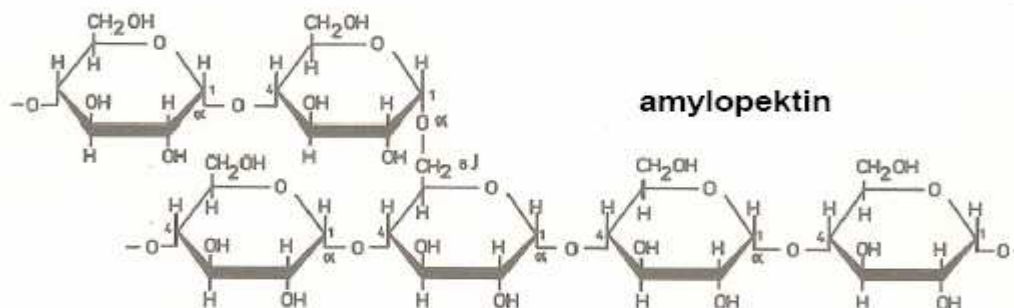
Relativní molekulová hmotnost amylosy je v rozmezí od 16 tisíc do 1 milionu. Přiměřený obsah amylosy v škrobech kolísá v rozmezí 0–75 %, ale typická hodnota je 20–25 % [7]. U škrobů z kořenů a hlíz bývá molekulová hmotnost větší než u škrobů ze semen [8].

Kyselou hydrolyzou se štěpí amylosa na glukosu. Působením amylytických enzymů amylas se amylosa štěpí tak, že se z ní neustále odštěpují maltosové jednotky. Molekulová váha amylosy přitom stále klesá a vznikají nízkomolekulární dextriny [2]. Dextriny jsou ve vodě rozpustné, bílé až slabě nažloutlé barvy a jsou opticky aktivní. Analyticky se prokazují přidáním roztoku jodu za tvorby hnědočerveného až fialového zbarvení. Dextriny vznikají také zahříváním škrobu na teplotu asi 160 °C (např. při pečení chleba). Jedná se o pražené dextriny, které mohou intenzivnějším záhřevem karamelizovat a tmavnout. Dextriny jsou nezkvasitelné kvasinkami, takže zůstávají obsaženy např. v pivě, kde vznikly při výrobě neúplnou enzymatickou hydrolyzou škrobu. S klesající molekulovou vahou dextrinu klesá i schopnost tvořit barevné komplexy s jodem [9].

Amylosa se ve vodě rozpouští na čirý, málo viskózní roztok, záhřevem nemazovatí [10]. Po čase se z roztoků vylučuje následkem retrogradace. S roztokem jodu v jodidu se amylosa barví modře [8].

**Amylopektin** je nerozpustný ve vodě, v teplé vodě pouze bobtná. Jodem se barví fialově. Není tvořen pouze přímými řetězci glukosových jednotek spojených  $\alpha$  (1,4) - glykosidovou vazbou (polymer maltosy), ale má i boční větvení (stavební jednotkou je isomaltosa) s glykosidovými vazbami  $\alpha$  (1,6) a to přibližně po každých dvaceti až pětadvaceti glukosových zbytcích (Obr. 2). Výjimečně se také mohou vyskytnout vazby

$\alpha$  (1,3), kde stavební jednotkou je laminaribiosa. Obsahuje také malé množství esterově vázané kyseliny fosforečné (asi 0,17 %  $P_2O_5$ ) [11].



Obr. 2 Schématické znázornění amylopektinu [11]

Relativní molekulová hmotnost amylopektinu je řádově vyšší než relativní molekulová hmotnost amylosy [1]. Kompletní molekulová hmotnost amylopektinu má přibližně 2 mil. glukosových jednotek a tím se zařazuje mezi největší makromolekuly v přírodě [12]. Nejakceptovanější model amylopektinu je „cluster“ model [13]. Stupeň hydrolyzy amylopektinu závisí na druhu použitých enzymů amylas. Hydrolyzou vznikají nízkomolekulární dextriny, maltosa a isomaltosa [2].

Poměr amylosy a amylopektinu ve škrobu závisí na rostlinném původu, přičemž většina škrobu obsahuje podstatně více amylopektinu než amylosy. Bramborový škrob obsahuje 18–21 % amylosy, škrob některých odrůd kukuřice může obsahovat pouze amylopektin. Také byly vyšlechtěny již odrůdy kukuřice s obsahem 80 % amylosy, rovněž tak některé odrůdy hrachu obsahují převážně lineární amylosu [5].

## 1.2 Fyzikální vlastnosti škrobu

Škrob je jemný, sypký prášek, bez mechanických nečistot, neutrální vůně a chuti, je silně hygroskopický a ve studené vodě nerozpustný. Barva bramborového škrobu je bílá, u pšeničného bílá se slabým odstínem do šeda a u kukuřičného bílá s odstínem do žluta [5]. Je-li suchý, dá se velmi dobře skladovat. Ve vlhkém stavu podléhá snadno zkáze. Pod mikroskopem se jeví škrobová zrna nebo jejich shluky velmi zřetelně, přičemž pro jednotlivé druhy škrobu jsou charakteristická nejen jejich velikost, ale také tvar a způsob vrstvení [14]. Jednotlivá škrobová zrna se jeví jako sférokrystaly, vznikající apozicí nových vrstev, jež se ukládají kolem jádra, umístěného ve středu nebo excentricky. Jádro může být

jedno, dvě nebo může být jader více. Podle jejich počtu se pak rozeznávají zrna jednoduchá a složená [15].

Bramborový škrob má zrna oválného, vejčitého až lasturnatého tvaru s dobře zřetelným rýhováním a s excentricky umístěným jádrem. Měrná hmotnost bramborového škrobu je 1,648. Čím jsou zrna větší, tím jsou těžší a tím rychleji sedimentují (Obr. 3) [14]. Velikost zrna se pohybuje mezi 10–80  $\mu\text{m}$ .



Obr. 3 Bramborový škrob [16]

Kukuřičný škrob je hranatý, s ostře odstíněným jádrem, bez zřetelného vrstvení. Velikost zrn se nejčastěji pohybuje v rozmezí 7–50  $\mu\text{m}$  (Obr. 4) [15].



Obr. 4 Kukuřičný škrob [16]

Pšeničný škrob je čočkovitého až kulatého tvaru s centrálním, méně patrným vrstvením. Pšeničné zrno obsahuje 58–70 % škrobu (v závislosti od odrůdy) uloženého ve vnitřní části endospermu v podobě škrobových zrn, které jsou buď menší (A-*typ*) s velikostí 2–10  $\mu\text{m}$ , anebo větší (B-*typ*) o velikosti 10–30  $\mu\text{m}$  (Obr. 5) [17].



Obr. 5 Pšeničný škrob [16]

Škroby přijmou za normálních podmínek z atmosféry asi 12–14 % vody. Studená voda může proniknout do amorfních částí škrobového zrna, aniž by se porušily micely.



Tímto způsobem může škrob nabrat až 30 % vody beze změny velikosti a tvaru částic. Jestliže stoupá teplota suspenze škrobových zrn ve vodě, charakter zrn se zpočátku nemění. Až při teplotě, kdy molekuly nabudou dostatečnou energii k tomu, aby se přerušily vodíkové vazby, nastává bobtnání. Teplota, při níž zrna začínají bobtnat, tzv. želatinizační teplota, závisí na druhu škrobu; u škrobu kukuřičného se pohybuje od 62–70 °C, u rýžového od 68–78 °C, pšeničného od 60–64 °C, žitného od 57–70 °C, bramborového od 58–66 °C. Během bobtnání škrobové zrna postupně přijímá velké množství vody (při 70 °C maximálně až 25násobek hmotnosti škrobu), která proniká do prostoru mezi polysacharidickými řetězci škrobu. Tím se naruší uspořádaná struktura zrna [8].

Jestliže bobtnání postoupilo tak daleko, že se vazby mezi molekulami škrobu zcela rozrušily, vznikne tekutý škrobový maz. Maz ještě může obsahovat zrna, ovšem mnohonásobně zvětšená [8]. Teprve při teplotách kolem bodu varu, zvláště při třepání nebo intenzivním míchání, se zrna poruší a jejich obsah se vylíje do prostředí [14]. Vytvoří se škrobový roztok, tzv. maz, v němž molekuly volně rotují. Tím roste viskozita, zvláště při vyšších koncentracích [8].

Při ochlazení škrobového roztoku viskozita značně stoupá. Tímto způsobem vznikne gel. Struktura gelu se postupně mění tím, že se vytvářejí další vodíkové můstky. Síť řetězců polysacharidu se tak stává hustší, a proto vytlačí část vody, původně v gelu zachycené. Tento jev se obecně nazývá syneréze, u škrobových gelů retrogradace. Retrogradace poněkud snižuje stravitelnost škrobu. Rychlost retrogradace závisí na teplotě; největší je při teplotách kolem 0 °C, zvláště proběhne-li několik cyklů tuhnutí tání vody vázané v gelu. Retrogradece se zvláště nepříznivě projevuje na konzistenci chleba a pečiva při skladování, kde se jí předchází speciálními přísadami. Při teplotách kolem 60–70 °C retrogradece nenastává. Při zahřátí retrogradovaného gelu se původní konzistence mění. Reverze vznikne ovšem jen tehdy, jestliže během retrogradace nedošlo ke ztrátám vyloučené vody, např. odpařením [8].

Zahřívá-li se tedy škrob s vodou, dochází nejdříve k bobtnání a pak k mazovatění, přičemž se objem zvětšuje až 120krát. Velká škrobová zrna bobtnají a mazovají rychleji než zrna malá. Analyticky se škrob dokazuje pomocí roztoku jódu v jodidu draselném známým modrým zbarvením, které zahřáním mizí, avšak po ochlazení se znovu vrací [14].

### 1.3 Druhy škrobů

V České republice se využívá především škrob bramborový, pšeničný a kukuřičný. V teplejších oblastech (Čína, Japonsko apod.) se vyrábí škrob hlavně z rýže. V tropickém a subtropickém pásmu se používají jako suroviny k výrobě škrobu maniok, batáty a čirok.

Průmyslové využití škrobu je různé. Používá se hlavně v potravinářství, lihovarnictví, v textilním průmyslu, při výrobě kosmetiky, cyklodextrinů, maltodextrinů, glukosových a fruktosových sirupů a krystalického cukru [18]. Kromě klasického průmyslového využití se škrob s úspěchem začíná prosazovat i v nejmodernějších technologiích současnosti. V medicíně jako alternativa kapslí při podávání léčiv, na výrobu speciálních „plastických materiálů“ apod., přičemž mnohé technologie využívající tento biopolymer jsou v stádiu vývoje [19, 20].

#### 1.3.1 Bramborový škrob

Z celkové produkce škrobu se u nás vyrábí asi 10 % z brambor. Ale i tato minimální produkce bramborového škrobu je nepostradatelnou součástí českého škrobárenského průmyslu.

V zemích EU je výroba bramborového škrobu kvótována. ČR byla v hospodářském roce 2008/2009 přidělena národní kvóta v celkové výši 33 660 tun bramborového škrobu. Pšeničný škrob kvótován není.

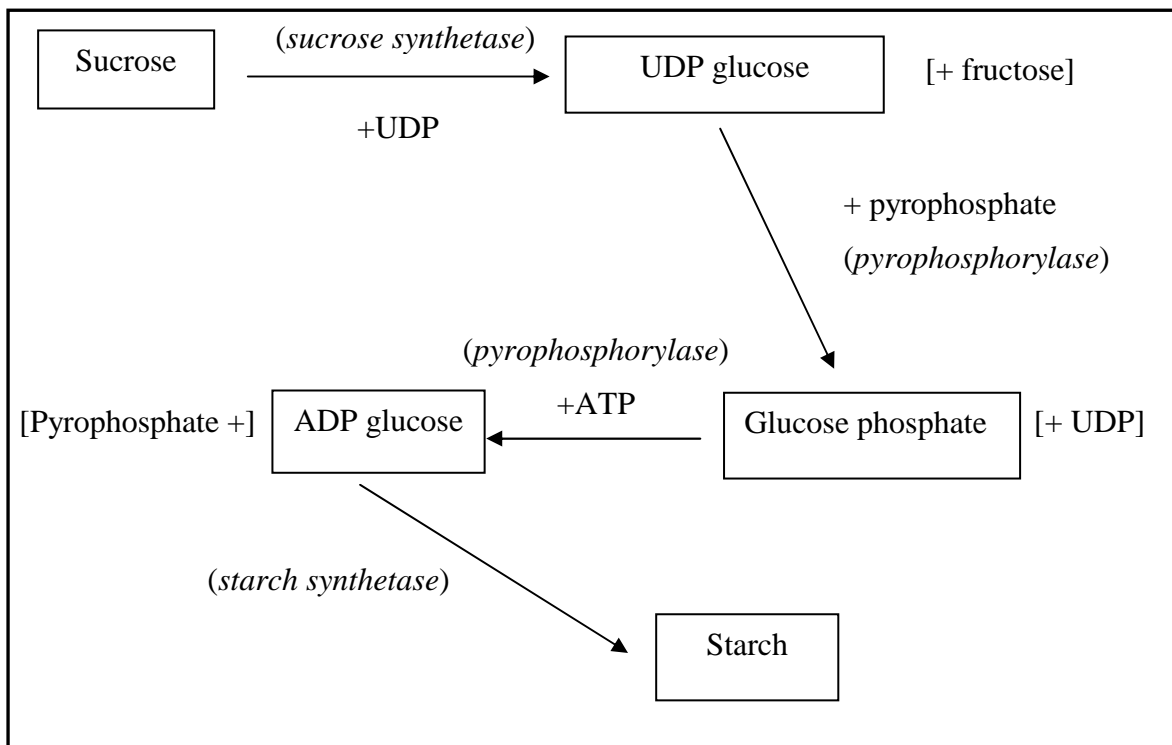
Brambory pro výrobu škrobu jsou v České republice pěstovány na bezmála 5 tis. hektarech, převážně v krajích Vysočina, v Jihočeském a Moravskoslezském kraji. V ostatních krajích je pěstování spíše okrajovou záležitostí.

Největším zpracovatelským závodem s celkovou výrobní kapacitou 30 tisíc tun bramborového škrobu je Lyckeby Amylex, a.s. Horažďovice. Druhý největší závod jsou Škrobárny Pelhřimov, a.s. s poloviční výrobní kapacitou [21].

Bramborový škrob je přírodní polysacharid izolovaný z brambor. Je tvořen z 80 % sacharidy, zbytek zaujímají bílkoviny a tuky. Dobře znám je především pod názvem solamyl a v domácnostech se využívá pro přípravu moučníků, dortů a drobného pečiva. Používá se také k zahušťování jídel. Toho zejména využívají lidé trpící celiakií. Bramborový škrob totiž na rozdíl od mouky neobsahuje lepek. Bramborový škrob je také

možné využít i k nepotravinářským účelům, zejména se ho využívá v papírenském průmyslu, textilním průmyslu, při výrobě lepidel, ve stavebnictví aj.

Podstatnou část sušiny brambor tvoří škrob. Z hlediska energetického u brambor představuje 15% obsah škrobu 255 kJ, tj. 87 % celkového energetického obsahu sušiny 293 kJ. Je tedy hlavním rostlinným zásobním polysacharidem, který se ukládá ve formě zrn v amyloplastech a chloroplastech, kde probíhá jeho biosyntéza. Zabudování sacharosy do škrobu řadou reakcí je uveden na Obr. 6.



Obr. 6 Biosyntéza škrobu [22]

Jedním z prekurzorů škrobu je adenzindifosfátglukosa, jejíž tvorba z glukosa-1-fosfátu a ATP je katalyzována enzymem ADP-glukosapyrofosforylasou (AGPasou). Dřívější studie potvrdily, že ADP-glukosa je výhradním prekurzorem biosyntézy škrobu, neboť mutanty se sníženou hladinou AGPasy izolované u kukuřice obsahovaly v endospermu obilek výrazně nižší obsah škrobu [23].

Čím kratší je období výstavby produkčních orgánů rostliny a zásobních pletiv pro ukládání škrobu a čím delší je období, ve kterém se může tvořit a ukládat škrob, tím vyšší bude obsah škrobu v hlízách. Proto všechny faktory, které příznivě ovlivňují optimální poměr růstu rostliny a tvorby zásobního škrobu, rozhodují o škrobnatosti a jsou příčinou

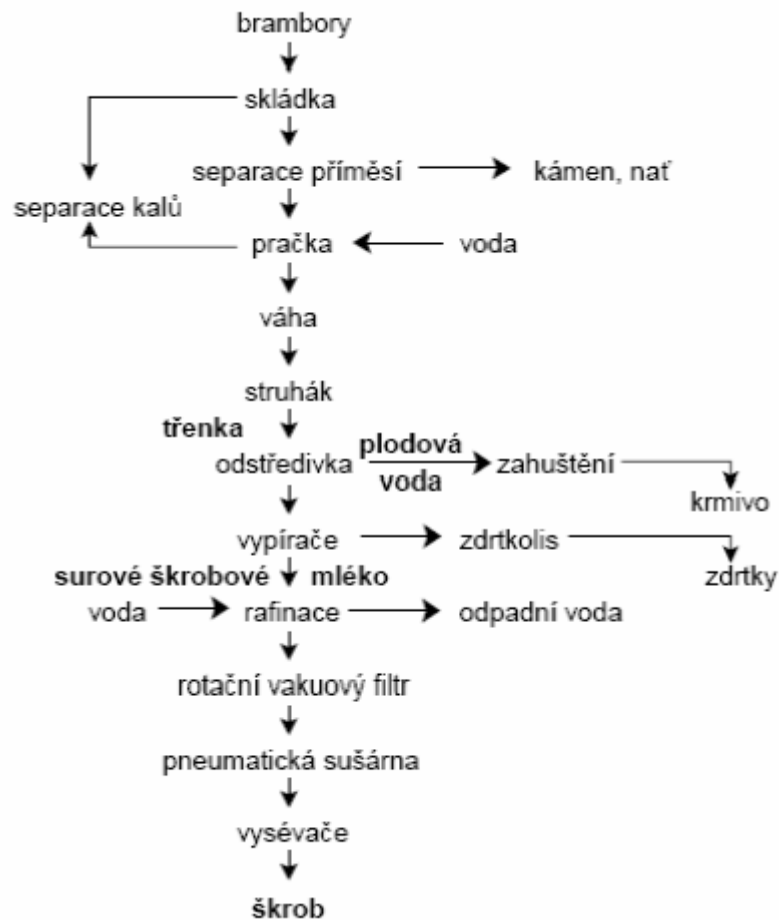
jejího kolísání. Mezi hlavní faktory patří zejména odrůdové charakteristiky, průběh počasí, druh půdy, stav výživy a agrotechnika [24].

#### Výroba bramborového škrobu

Mezi brambory, které jsou vhodné pro produkci škrobu, patří odrůdy jak rané, polorané, tak i polopozdní až pozdní.

Výroba bramborového škrobu spočívá v izolaci škrobových zrn od ostatních látek obsažených v bramborové hlíze. Děje se tak v principu mechanickým způsobem, tj. vypíráním škrobu z otevřených buněk a jeho dalším čištěním za použití značného množství vody [15]. Má-li být při výrobě bramborového škrobu docíleno dobrých technologických i ekonomických výsledků musí mít brambory náležitě odpovídající vlastnosti. Hlízy brambor mají být čisté, zdravé, dobře vyzrálé, střední velikosti a obsah škrobu má být nejméně 15 % [4].

Brambory nakoupené od zemědělců se skladují buď v krytém zastřešeném skladu nebo na volné ploše. Před zpracováním je nutné brambory zbavit veškerých nečistot. K tomuto účelu slouží zařízení pro praní brambor tzv. pračka. Odtud jsou brambory dávkovány do struháku, kde jsou rozdraceny na jemnou třenku. Rozstrouháním dojde k uvolnění škrobu z hlízy. Tato kaše je čerpána na vypěrače vlákniny, které oddělí bramborovou vlákninu, tzv. zdrtky, které slouží jako krmivo. Získané surové škrobové mléko, které obsahuje také hlízovou šťávu, je dále čerpáno do bloku hydrocyklonů, které zajistí oddělení většiny této hlízové šťávy. Zbytek plodové vody je oddělen na pásových vakuových filtrech. Surové škrobové mléko zbavené hlízové šťávy je dále rafinováno, je čištěno od nežádoucích nečistot, zbytků vlákniny a písku pomocí hydrocyklonů, filtrací přes síto nebo pomocí odstředivých sít. Rafinované škrobové mléko je čerpáno do nádrže před sušením [25]. Rafinované škrobové mléko je nejprve částečně odvodněno na rotačních vakuových filtrech. Takto získaný předsušený škrob je potom dosušován prostřednictvím horkého vzduchu o teplotě 130–160 °C v pneumatické sušce na obchodní sušinu minimálně 80 %. Usušený škrob je chlazen na teplotu 25–35 °C. Suchý škrob vycházející ze sušárny není ještě v takové formě, aby mohl být pytlován a expedován. Ve škrobové moučce jsou drobné hrudky, které se tvoří v sušárně, dále i jistý podíl škrobové krupice. Suchý škrob musí být proto vyséván. Vysátý škrob se pytluje do papírových pytlů [4]. Příklad získávání bramborového škrobu je znázorněn na Obr. 7.



Obr. 7 Schéma výroby bramborového škrobu [26]

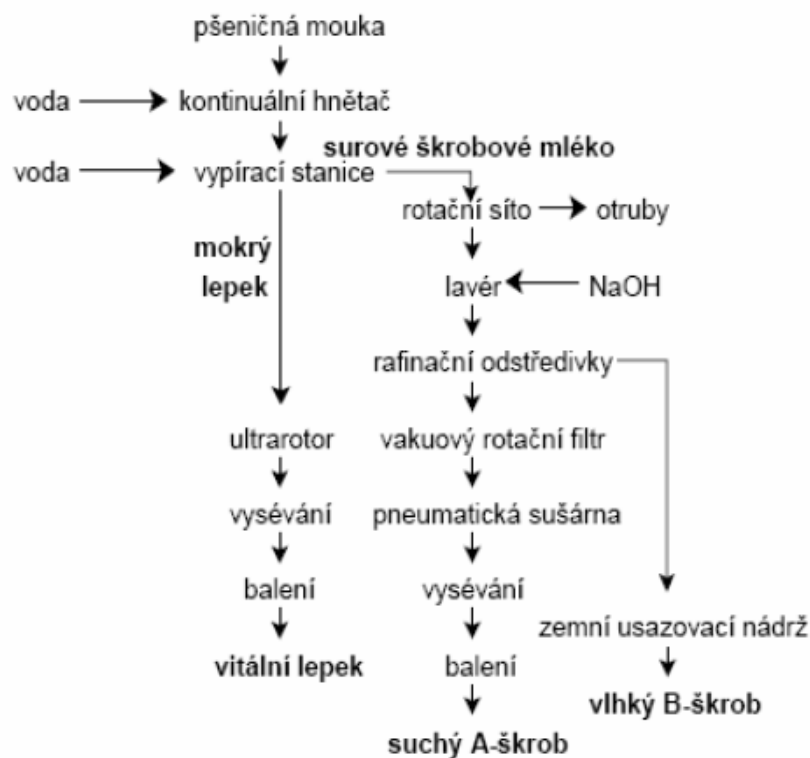
### 1.3.2 Pšeničný škrob

Výroba pšeničného škrobu má v Evropě i na území České republiky mnohem delší tradici, než výroba bramborového škrobu. Jestliže bramborový škrob se v Evropě vyráběl od 18. století, pak pšeničný se vyráběl již o několik století dříve. Z hlediska výroby škrobu jsou škrobnaté suroviny srovnatelné. Avšak nejvýhodnější je technologie zpracování pšenice, neboť vedle škrobu se získá pšeničný lepek, což je bílkovina velmi bohatá pro potravinářský průmysl (používá se např. k posílení lepku slabých mouk, mouk pro výrobu těstovin apod.). Dále je také možné použít lepek i k nepotravinářským účelům, jako je např. krmivo pro krevety, produkce šamponů apod. [4].

#### Výroba pšeničného škrobu

Výrobní proces začíná zaděláním jednomleté mouky s vodou v těsto, které se po odležení (30 minut) vypírá v bubnových pračkách. Zde se za vydatného postříku vodou vypere škrob, který prochází sítím, kdežto lepek – gluten se sbaluje a po opuštění pračky se

dále zpracovává. Surové škrobové mléko se vede na odlučovače. Velkozrnný škrob se rozmíchá s vodou a přečerpá na rafinační odlučovač, odkud se po vyčištění a předsušení na vakuovém filtru dopravuje do sušárny. Usušený škrob, tzv. pudr (86 % sušiny) se prosévá, pytluje, váží a expeduje. Jádrový, malozrnný škrob se nejekonomičtěji zpracovává na líh nebo se používá na krmení. Pšeničný lepek se vede na ultrarotor, kde se získá suchý vitální lepek, který se dále vysévá, pytluje a expeduje. Hotový výrobek se používá v masném a pekárenském průmyslu [15]. Příklad získávání pšeničného škrobu je znázorněn na Obr. 8.



Obr. 8 Schéma výroby pšeničného škrobu [26]

### 1.3.3 Kukuřičný škrob

Kukuřice je u nás nejvýznamnější jednoletou píceinou. Asi 90 % kukuřice je pěstována na siláž, která v současnosti představuje hlavní energetickou složku objemných krmiv pro skot. Zbýlých 10 % tvoří kukuřice na zrno. Kukuřičné zrno se využívá v potravinářství, pro krmení hospodářských zvířat a pro průmyslové zpracování. Pro výživu lidí se vyrábí kukuřičná mouka a krupice, která se využívá např. pro výrobu corn-flakes. Z kukuřičného zrna se vyrábí alkohol, škrob, invertní cukr a z klíčků se získává kukuřičný olej [27].

### Výroba kukuřičného škrobu

Výhodou kukuřice je, podobně jako u pšenice, dobrá skladovatelnost, vysoký obsah škrobu, dobré vlastnosti kukuřičného škrobu i hodnotné vedlejší produkty. Kukuřice se dělí na několik botanických poddruhů, z nichž význam pro škrobárenství má především koňský zub, přičemž lokalita má významný vliv na chemické složení.

Kukuřičný škrob se získává několika technologickými postupy, z nichž nejběžnější je **kyselý, teplý, uzavřený postup**. Máčení kukuřičného zrna se provádí v kádích zařazených do baterie protiproudým způsobem. Na máčení se používá slabý roztok  $\text{H}_2\text{SO}_3$  (0,15–0,20 %), která přerušuje životní procesy a je dobrým antiseptickým činidlem. Teplota vody je 48–50 °C a doba máčení je odvislá od suroviny (typ koňský zub 32–36 h, jiné variety 48–50 h). Koncentrace kyseliny siřičité během máčení klesá, po 24 h se sníží na 0,01 %, což aktivuje bakterie mléčného kvašení, které se příznivě uplatňují. Dále se provádí hrubé mletí, které je důležité pro odseparování klíčků a provádí se nadvakrát pro dokonalé oddělení klíčků. Separace se provádí v odstředivkách nebo hydrocyklonech. Při prvním mletí se získá 75–85 % klíčků, při druhém 15–20 %. Odseparované klíčky se promývají, aby se odstranil volný škrob. Výtěžek klíčků činí 6,5–7,5 % sušiny kukuřice a zpracovávají se na jedlý olej a pokrutiny. Následuje jemné mletí drti, které se provádí na kamenných mlýnech nebo mlecích zařízeních s úderovým principem. Cílem je dokonalé uvolnění škrobu z částic endospermu. Po jemném mletí se získá škrobové mléko. Oddělení volného škrobu od vlákniny se provádí na sítích, nejprve s otvory 0,6–0,8 mm (hrubá vláknina), pak 165–143  $\mu\text{m}$  (jemná vláknina) a nakonec se provádí rafinace na sítích 99–87  $\mu\text{m}$ . Poté se rozdělí škrob a bílkoviny ze suspenze po rafinaci na sítích. K oddělení se dnes používají odstředivé rychloběžné separátory s talířovými vložkami. Škrobové mléko se dále promývá pro odstranění rozpustných látek a pak zahušťuje na vakuových filtrech. Sušení zahuštěného škrobu se provádí v pneumatických sušárnách, kde se škrob suší v proudu horkého vzduchu po dobu několika vteřin, takže je možné použít vzduch s teplotou až 170 °C. Suší se na 86 % sušiny.

### Mezi vedlejší produkty kukuřičného škrobu patří:

- *kukuřičný extrakt*, který se zahušťuje na odparce na 50% sušinu, tzv. corn steep a používá se jako složka živných půd při různých mikrobiologických výrobcích, nebo jako složka krmiva,

- *klíčky*, které se využívají na výrobu kukuřičného oleje,
- *vláknina* (hrubá a jemná), která se používá na výrobu suchých kukuřičných krmiv nebo přímo na krmení v původním stavu,
- *kukuřičný gluten* (bílkovina) spolu s vlákninou.

Při výrobě kukuřičného škrobu lze použít také **suchý alkalický způsob**. Princip výroby spočívá v rozdrčení kukuřice za sucha, na drť se působí slabou alkálií, přičemž se bílkovina rozpustí a oddělí na odstředivce. Alkalická rozpustná frakce se pak zneutralizuje až do kyselé reakce, čímž se bílkovina znovu vysráží a oddělí [5]. Proces získávání kukuřičného škrobu je znázorněn na Obr. 9.



Obr. 9 Schéma výroby kukuřičného škrobu [26]

#### 1.4 Ostatní méně významné druhy škrobnatých plodin

Hlavní plodiny poskytující škrob jsou kukuřice, brambory, pšenice a tritikale. Škrob z ječmene, ovsa, hrachu, čiroku nebo čočky není dosud ve větší míře využíván. Jako další suroviny k výrobě škrobu se používají maniok a batáty.



### 1.4.1 Čirok

Čirok pochází z Afriky. Postupně se rozšířil do teplých a suchých oblastí všech kontinentů. Čiroky jsou v celosvětovém měřítku v první desítce pěstovaných obilnin. Mezi významné tradiční pěstitele čiroku patří Indie, kde se také intenzivně pracuje na šlechtění. Vysokou produkcí se vyznačují Spojené státy americké, kde docilují nejvyšších hektarových výnosů (více než  $4 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ). Z afrického kontinentu je největším producentem Nigérie. V Evropě se čirok pěstuje především ve Francii a v Itálii [28].

Čirok, stejně jako kukuřice jednoletá, je teplomilná rostlina dobře snášející sucho. Vyžaduje průměrné denní teploty okolo  $16 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nízké teploty vyvolávají žloutnutí listů a zhoršují opylení květů. U nás lze proto pěstovat pouze odrůdy s krátkou vegetační dobou, která musí proběhnout v nejteplejším období roku. Na kvalitu půdy nemá čirok žádné zvláštní požadavky. Je však třeba se vyvarovat chladných a vlhkých stanovišť [29].

Čirok obecný má vysoký energetický potenciál (ve formě polysacharidů) a obsah bílkovin. Je součástí krmných směsí pro prasata, drůbež a skot a také pro malá domácí zvířata. Přidává se i do potravin, jako je např. chleba, energetické tyčinky a snacky. Krmná hodnota čiroku odpovídá kukuřici s malým rozdílem. Čirok obsahuje méně oleje, zato více bílkovin a méně lysinu a žádný karoten. Některé odrůdy jsou bohaté na antioxidanty. Kromě toho čirok neobsahuje lepek [30]. Čirok má také mnoho využití v průmyslu, jako např. při výrobě stěnových desek, etanolu a koproduktů při výrobě ethanolu a lihovarského zrna.

Z nutričního hlediska je zrnový čirok složen z 11,3 % proteinů a 3,3 % tuku. Čirok potravinového typu má vysoký obsah nerozpustné vlákniny s relativně malým množstvím rozpustné vlákniny. Protein a škrob v zrnovém čiroku je pomaleji rozkládán než jiné obiloviny [30].

### 1.4.2 Maniok

Maniok patří k hlavním tropickým zemědělským plodinám. Pochází sice z Jižní Ameriky, ale pro kořeny plné škrobu se pěstuje po celém světě. Tvoří základ obživy mnoha lidí například v Brazílii, Thajsku, Nigérii, Zairu nebo Indonésii. V Africe závisí existenčně na sklizni manioku 250 milionů lidí, což představuje asi 40 % obyvatel "černého

kontinentu". Na celém světě se maniok významně podílí na obživě 600 milionů lidí. Z jediného hektaru mohou rolníci sklídit až 90 tun kořenů s vysokým obsahem škrobu.

Maniok je odolná plodina schopná růst v různých podmínkách, přizpůsobivá různým druhům půd a úrodnosti půd. Je částečně významná díky schopnosti výnosu na půdách s extrémně nízkou úrodností. Často se pěstuje tam, kde se jiným plodinám nedaří. Pěstování manioku je relativně jednoduché, je nutná pouze velmi malá příprava půdy a jednoduchá výsadbová technika pouhého sázení stonku do půdy. Avšak v době sklizně je náročnost co se týče pracovní síly, kvůli dobývání hluboko zapaštěných kořenů z půdy. Doba růstu obvykle potřebná k dozrání je 6–10 měsíců [31, 32] (Obr. 10).



Obr. 10 Maniok [33]

Kořeny manioku jsou energeticky bohaté, ačkoli jsou chudé na bílkoviny, ale obsahují hlavně škrob a některé rozpustné sacharidy. Odhaduje se, že více jak 60 % vypěstovaného manioku je zkonsumováno lidmi a kolem jedné třetiny je zkrmeno zvířaty, zatímco zbytek je zpracován do vedlejších výrobků. Maniok může být zpracován jako *gari* (západní Afrika), *fufu* (Ghana), *chikwangu* (střední Afrika), mouka na chléb apod. [34].

Hlízy obsahují vysoce toxický kyanid, který se odbourává vařením. Čerstvé kořeny obsahují o 2/3 méně škrobu než rýže a o 1/2 méně než chléb. Také nutriční hodnota manioku je nevyvážená a jejich dlouhodobá konzumace způsobuje nedostatek bílkovin [34].

Užitím různých výrobních postupů pro zpracování manioku jsou získávány průmyslové výrobky jako škrob, kliš, maniokové pivo, maniokový alkohol a maniokový ocet.

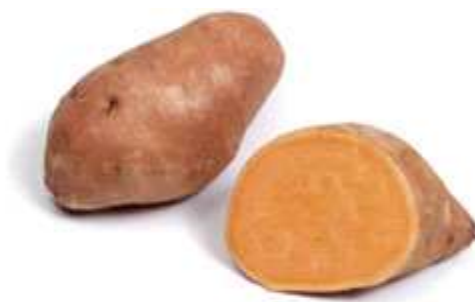
Škrob je získáván po oloupaní, umytí a následném nastrohání kořenů. Ze vzniklé vláknité hmoty je pak cezením získáván škrob, který se dále čistí usazováním nebo

odstředěním, nakonec je usušen a mlet na jemný prášek. Škrob se používá při výrobě textilu, potravin jako je chléb a při výrobě fruktosového sirupu. Škrob z manioku je surovinou pro dextriny užívané při výrobě klišů. Mouka z manioku se používá jako doplněk v pivovarnictví. Po alkoholovém kvašení manioku se z něj destiluje alkohol. Přidáním bakterií octového kvašení (*Acetobacter* spp.) po předešlém zakvašení uvařeného manioku rýžovými kvasnicemi a enzymu celulasa se získává maniokový ocet [34].

### 1.4.3 Batáty

Jedná se o kořenové hlízy Povijnice jedlé (*Ipomoea batatas*), z čeledi svlačcovitých. Batáty, zvané také sladké brambory, nejsou botanicky příbuzné pravým bramborám, i když oboje jsou původem ze Střední Ameriky. Batáty dorazily do Evropy dříve než brambory a byly ve své době vysoce ceněny. Díky vysokému obsahu škrobu se v některých oblastech světa staly batáty jednou z nejdůležitějších potravin místního obyvatelstva, domácích zvířat, ale i četných polních škůdců. Obsahují 6 % sacharidů, asi 20 % škrobu, 2 % bílkovin a 9 % pektinů [35, 36].

Po celém světě se pěstují stovky odrůd sladkých brambor. Rozdělují se do tří skupin a to na suché a moučné, měkké a lojovité a dále na krmné s hrubou strukturou. Bílé a světlé typy jsou moučné s kaštanově karamelovou chutí, zatímco žluté a oranžové odrůdy jsou sladké, vodnaté. Batáty obsahují zhruba o polovinu více kalorií a vitamínu C než klasické brambory (Obr. 11) [37].



Obr. 11 Batáty [38]

Pěstování sladkých brambor vyžaduje dlouhé vegetační období bez mrazů, aby se kořenové hlízy dobře vyvinuly. Původem pocházejí batáty z Jižní a Centrální Ameriky. Komerčně se batáty v Americe pěstují především v Severní Karolíně a Louisianě. V tropických a subtropických oblastech tvoří batáty vydatný zdroj živin.

#### 1.4.4 Tritikale

Tritikale – **žitovec** (*Triticosecale* Wittm.) je uměle vytvořený mezidruhový kříženec pšenice seté a žita setého, kde původní mateřskou rostlinou je pšenice a otcovskou žito. Rodové označení *Triticosecale* je složeninou latinského označení pšenice (*Triticum*) a žita (*Secale*). U nás je v současné době registrováno 5 odrůd ozimého tritikale (Presto, Disko, Sekundo, Kolor, Modus). Budoucnost této plodiny je velmi slibná, protože je víc přizpůsobivá a rezistentní vůči chorobám, suchu a pesticidům, oproti jejím rodičovským druhům [39, 40].

Zrno tritikale má nápadně velkou obilku, u některých odrůd se svrstěným povrchem. Potravinářské využití tritikale je především pro výrobu mouky na chléb, jehož receptura se ale musí upravovat vzhledem k tomu, že tritikale nemá stejný obsah lepku jako pšenice. Stále nedoceněnou vlastností tritikale je vysoká krmná hodnota jeho zrna, která je dána vyšším obsahem bílkovin a příznivou skladbou aminokyselin, především vyšším obsahem lysinu. Jak vyplývá z tuzemských i zahraničních údajů, ve srovnání s pšenicí má až dvojnásobný podíl rozpustných bílkovinných frakcí [39, 40].

#### 1.4.5 Andské plodiny

Andské plodiny obsahují zejména tyto čeledi: *Asteraceae*, *Basellaceae*, *Brassicaceae*, *Leguminosae*, *Nyctaginaceae*, *Oxalidaceae*, *Solanaceae*, *Tropaeolaceae*, *Umbeliferae*.

Konzumací andských plodin by se mohla rozšířit paleta plodin typu jako *Solanum* sp. Andské plodiny představují nevyužitelné zdroje škrobu, aminokyselin a ostatních nutričních faktorů a dále i přírodních pesticidů (viz. Tab. 1). Andské plodiny jsou také ceněny pro významný zdroj antimikrobiálních proteinů a sekundárních metabolitů. Dalším kladem těchto plodin je velká adaptabilita pěstování mimo původní území. Např. plodina *Oxalis tuberosa* je již pěstována na území Austrálie, Nového Zélandu a v současné době je přestavována také v Evropě a Austrálii [41, 42, 43].

Tab. 1. Nutriční hodnoty andských plodin (ppm v sušině) [44]

Nutriční parametr	Mashua	Oca	Ulluco	Brambory
K. askorbová	670–4800	370–2284	230–1750	170–990
Vápník	70–500	40–247	30–365	34–2550
Sacharidy	59–786	138–852	118–912	171–862
Tuk	2–43	6–37	2–15	1–9
Vláknina	6–57	5–49	3–44	3–27
Železo	2–85	8–49	7–58	5–128
Fosfor	13–115	340–2099	340–2775	320–4200
Protein	220–3000	7–62	10–73	10–127
Kcal	—	630–3890	500–3725	780–3755

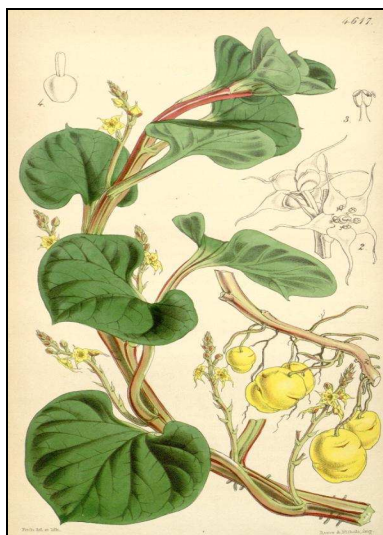
### **Oca (*Oxalis tuberosa*, Oxalidaceae)**

Po bramborách patří oca k nejznámějším druhům andských plodin (Obr. 12). Velikost hlíz se pohybuje od 7–11 cm. Barva slupky hlíz je bílá, zelená, růžová, červená, fialová nebo černá [45]. Tato rostlina je velmi rozšířena a je pěstována na území s nadmořskou výškou od 2800 – 4000 m a se srážkami v rozmezí 570–2500 mm. Roste v chladnějších podmínkách (pod 5 °C), v půdě s pH 5,3–7,8. Oca je pěstována ve vyšších místech a zejména na území Ekvádoru, Bolívie a Peru, ale také byla nalezena v oblastech Chile, Argentiny, Columbie a Venezuely. V současné době je rozšiřována i na území Nového Zélandu, Austrálie, Mexika, Francie a Velké Británie [43]. Obsah sacharidů, vápníku, železa, tuků je závislý zejména na odrůdě.

Obr. 12 *Oxalis tuberosa* [46]

**Ulluco (*Ullucus tuberosus*, Basellaceae)**

Tato plodina dosahuje menších rozměrů a vytváří sukulentní listy (Obr. 13). Hlízy bývají tenké, podlouhlé nebo zakulacené s tenkou slupkou a mají nenápadná očka. Barva hlíz bývá bílá, růžová, oranžová, purpurová či červená. Plodiny konzumují zejména obyvatelé Peru a jejich úroda se pohybovala v roce 1999 okolo 89 t.ha<sup>-1</sup> [47]. Hlízy jsou velmi dobrým zdrojem bílkovin, sacharidů a vitamínu C [48]. Protože hlízy podléhají rychlé zkáze, obyvatelé je suší nebo zmrazují. Tento produkt nazýván lingli nebo chuño se dále mele a poté je přidáván do mouky. Hlízy této plodiny jsou dále užívány těhotnými ženami pro zklidnění bolestí během těhotenství a při bolestech břicha u novorozenců. Nicméně tyto účinky nebyly vědecky prokázány [43].



Obr. 13 *Ullucus tuberosus* [46]

**Achira (*Canna edulis*, Cannaceae)**

Achira roste v mírných až tropických oblastech (Obr. 14). Rostlina dosahuje výšky až 2,5 m a vytváří oddenky dlouhé asi 60 cm. Oddenky jsou bohaté zejména na sacharidy, z toho škrob tvoří až 80 % a glukosa a sacharosa až 14 %. Mouka a škrob z *Canna edulis* je používána zejména v Asii na výrobu nudlí [49].



Obr. 14 *Canna edulis* [46]

### **Mauka (*Mirabilis expansa*, Nyctaginaceae)**

Mauka je plodina, která dosahuje výšky okolo 1 m a vytváří jedlé a skladovatelné plodiny (Obr. 15). Navíc je celkem odolná vůči chorobám hlíz. Je pěstována v oblastech Peru, Bolívie a Ekvádoru s nadmořskou výškou od 2200–3500 m a teplotou vod od 4 do 29 °C. Výnos této plodiny je uváděn okolo 20 t.ha<sup>-1</sup> [50]. Poprvé tuto plodinu popsal v šedesátých letech minulého století vědec Julio Rea a označil ji jako „živý potravinový zdroj“ [51].



Obr. 15 *Mirabilis expansa* [46]

## **1.5 Výrobky ze škrobu**

Škrob jako výchozí surovina je základnou rozsáhlé průmyslové výroby. Rozvoj a modernizace průmyslových odvětví jsou spojeny s rostoucími nároky na nové technologické pomocné látky nebo suroviny pro nové výrobky, jež vycházejí ze škrobu. Škrobárenský průmysl není schopen uspokojovat rostoucí požadavky jen „nativními

škroby“, které se vyrábí bez úprav fyzikálně-chemických vlastností, a proto vznikl významný obor známý jako průmyslová chemie škrobů [5].

### 1.5.1 Rozdělení výrobků ze škrobu

V současné době je v celosvětovém měřítku vyráběno pod různými firemními názvy několik set ne-li tisíc druhů výrobků ze škrobu.

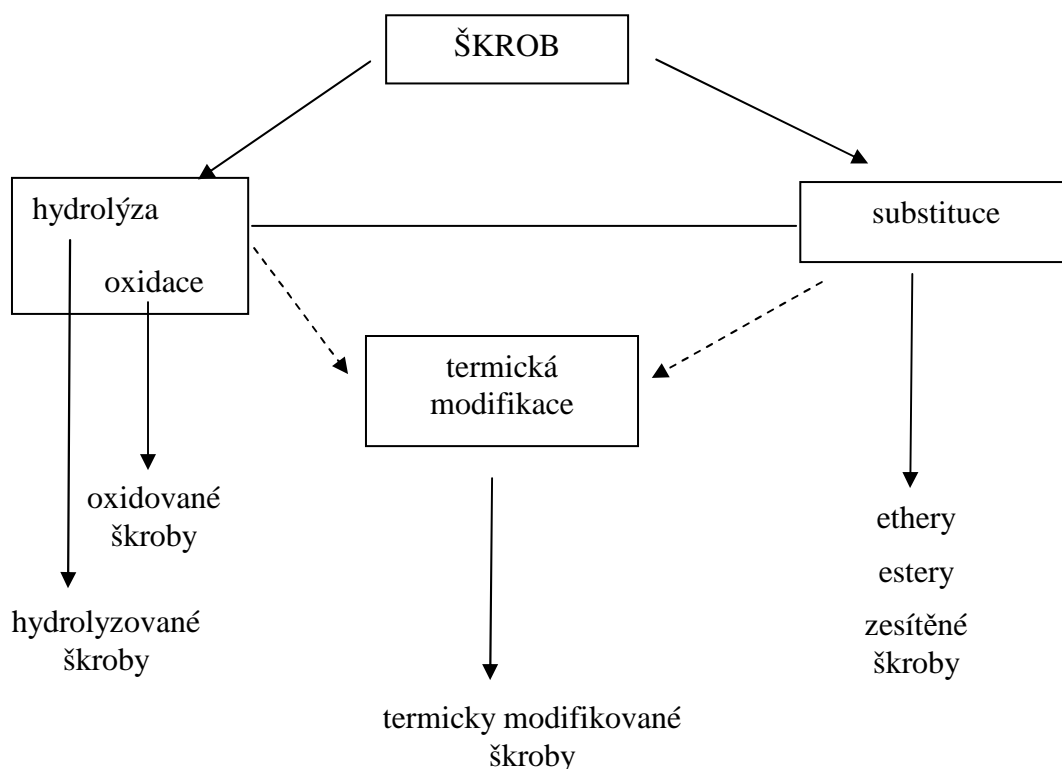
Výrobky ze škrobu jsou děleny na:

- produkty frakcionace škrobu, tj. amylosu a amylopektin,
- modifikované škroby, které jsou v současné době nejvýznamnější výrobky ze škrobu s nejrozmanitějším uplatněním,
- substituované škroby (deriváty škrobu), výrobky získané chemickými reakcemi škrobu s různými sloučeninami, jejichž substituenty jsou pak v molekule škrobu jako nové obsaženy,
- technické dextriny, které jsou připravené pražením škrobů za přídavku katalyzátorů,
- hydrolyzáty škrobu, což jsou výrobky získané hlubokou až totální hydrolyzou škrobu [26].

### 1.5.2 Modifikované škroby

Modifikovanými škroby (Obr. 16) se rozumí výrobky ze škrobu, které mají zachovánu alespoň jednu původní charakteristickou vlastnost škrobu, a jejichž vlastnosti jsou biochemickým, chemickým, fyzikálním nebo kombinovaným vlivem přizpůsobeny určitému účelu. Modifikační proces si klade za úkol některou původní vlastnost zvýraznit (viskozita, schopnost vázat vodu, želírující schopnost, tvorba filmu, iontovýměnná schopnost), jinou potlačit nebo vytvořit vlastnost novou [5].





Obr. 16 Schéma členění modifikovaných škrobů [5]

Hydrolyzované (odbourané) škroby se připravují mírnou hydrolyzou škrobu. Mají zvýšenou rozpustnost a sníženou viskozitu mazu a používají se na přípravu homogenních past. Příkladem jsou pudinkové prášky.

Oxidované škroby se používají v textilním průmyslu jako šlichtovací a apretační prostředky, v papírenství k povrchovému klížení papíru.

Termicky modifikované škroby vznikají narušením vodíkových můstků mezi škrobovými molekulami. Mají široké uplatnění v potravinářském, textilním a papírenském průmyslu [52].

Substituované škroby mají v hydroxylové skupině nahrazen vodík alkylem nebo acetylem. Používají se především v textilním průmyslu, farmacii, potravinářství. Mají výbornou sorpční i flokulační schopnost.

Zesítěné škroby vznikají reakcí škrobových makromolekul s vícefunkčními činidly. Uplatňují se zejména v potravinářství a farmaceutickém průmyslu [5].

Geneticky modifikované škroby se získávají z geneticky modifikovaných odrůd kukuřice, rýže, brambor apod. Patří sem např. škrob waxy, což je vysoce viskózní škrob s nízkou gelovací schopností. Obsahuje převážně jen molekuly amylopektinu [53].

## 2 METODY STANOVENÍ SACHARIDŮ

### 2.1 Chemické metody stanovení sacharidů

#### 2.1.1 Titrační metody

Základní metoda je založena na principu, že redukující cukry vyredukuje ionty stříbrné v amoniakálním prostředí na kovové stříbro nebo v alkalickém prostředí měďnatých iontů na oxid měďný  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Dále lze pro stanovení využít metod na bázi  $\text{Cu}_2\text{O}$  nebo přebytku  $\text{Cu}^{2+}$ . V potravinářské praxi se na stanovení redukujících cukrů chemickými metodami používají hlavně Bertrandova a Schoorlova titrace. Neredukující cukry je nejprve potřeba enzymaticky nebo chemicky převést na redukující nebo je stanovit fyzikálně-chemickými metodami [54].

#### Metody založené na redukčních schopnostech sacharidů

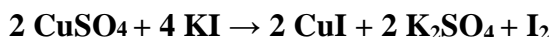
##### **Bertrandova metoda**

Jedná se o stanovení redukujících cukrů, které využívá tvorby oxidu měďného redukcí Fehlingova činidla (Fehling I –  $\text{CuSO}_4$ , Fehling II – vlnan sodnodraselný a  $\text{NaOH}$ ) a jeho následnou nepřímou manganometrickou titrací. Smícháním obou roztoků se vytvoří tzv. Fehlingův komplex. Ten se po přidání čirého vzorku za varu redukuje na červený oxid měďný, který dobře sedimentuje. Reakce není přesně stechiometrická, proto je důležité dodržet podmínky stanovení. Při redukci vzniká oxid měďný, příslušné cukerné kyseliny (např. kyselina glukonová) a regeneruje se vlnan sodnodraselný. Přebytek Fehlingova činidla se odstraní dekantací horkou vodou a zbylý čistý oxid měďný se rozpustí v roztoku  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)$  v kyselině sírové. Měďné ionty se zoxidují na měďnaté a vznikne ekvivalentní množství  $\text{Fe}^{2+}$ , které se stanoví manganometricky v silně kyselém prostředí. Spotřeba  $\text{KMnO}_4$  je úměrná množství vyredukovatého  $\text{Cu}_2\text{O}$  a tím i množství redukujících sacharidů. Spotřebu je třeba korigovat na slepý pokus.

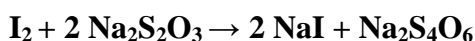
Na podobném principu je založena gravimetrická metoda. Sraženina se přefiltruje přes porcelánový filtrační kelímek, promyje vodou, etanolem a dietylerem, vysuší při  $105\text{ }^\circ\text{C}$  přesně 45 minut a zváží. Obsah cukrů se určí z tabulek [55, 56].

### Schoorleho metoda

Redukujícími sacharidy se redukuje dvojmocná měď Fehlingova činidla na oxid měďný. Okyselením kyselinou sírovou se z komplexu uvolní nadbytečné měďnaté ionty, které se pak redukují jodidovými ionty na měďné, za vzniku elementárního jódu. Reakcí měďných iontů s nadbytečným jodidem draselným vzniká ihned těžce rozpustný jodid měďný.



Elementární jód, který se při reakci uvolnil, se titruje roztokem thiosíranu sodného:



### Kolthoffova metoda

Používá se pro stanovení aldosa vedle ketos. Aldosa se oxidují ve slabě alkalickém prostředí na příslušné kyseliny. Ketosa, případně látky s intramolekulárně vázanou aldehydickou skupinou (př. sacharosa) se za těchto podmínek neoxidují. Do vyčiřeného základního roztoku cukrů se přidá roztok jódu a NaOH. Glukosa se oxiduje na tmavém místě 3 až 10 minut a nezreagovaný jód se následně stanoví thiosíranem sodným na škrobový maz. Podobně se provádí i slepý pokus, kde se místo vzorku pipetuje destilovaná voda. Reakce probíhá podle následující rovnice:



Stejným principem je možné stanovit i fruktosu vedle aldosa s tím rozdílem, že se fruktosa po oxidaci aldosa stanoví jako redukující cukr. Fruktosu je možné vypočítat jako rozdíl redukujících cukrů a glukosy za předpokladu, že vzorek obsahuje jen tyto dva redukující cukry [54, 55].

### Metody založené na barevných kondenzačních reakcích degradačních produktů cukrů

#### Stanovení neutrálních cukrů podle Duboise

Tato metoda je založená na dehydrataci cukrů kyselinou sírovou a následné kondenzaci vzniklého furfuralu či 5-hydroxymetylfurfuralu s fenolem za vzniku barevných kondenzačních produktů, které lze stanovit spektrofotometricky [57].

#### Stanovení redukujících cukrů mikrometodou podle Somogyiho

Oxid měďný vyredukovaný redukujícími cukry se přidavkem arsenomolybdenového činidla podle Nelsona převede na barevný komplex, jehož zbarvení se proměří spektrofotometricky, při vlnové délce 500 nm. Metoda je udávána s přesností  $\pm 0,01$  mg [55].

### 2.1.2 Spektrofotometrické metody

Spektrofotometrické metody se vyznačují hlavně jednoduchostí, časovou nenáročností a poměrně velkou citlivostí, takže jsou vhodné pro sériovou analýzu. Většina z nich je založena na barevných reakcích derivátů furfuralu, vznikajícího z cukru v kyselém prostředí (reakce s anthronem), nebo na stanovení barevné intenzity nespotřebovaného alkalického měďnatého roztoku [55].

#### Kolorimetrická metoda stanovení škrobu

Pro kolorimetrické stanovení se většinou využívá obarvení škrobu jodovým roztokem. Nepřímo lze škrob kolorimetricky stanovit po hydrolýze na glukosu anthronem.

Pro kolorimetrické stanovení škrobu uvádí Cerevitinov jednoduchý postup:

- 0,5 g suchého škrobu se zahřívá 45 minut v baňce se zpětným chladičem se 100 ml vody a 0,5 g kyseliny salicylové. Směs se zchladí, přidá se 30 ml roztoku NaOH a zředí vodou přesně na 1000 ml, 1 ml roztoku odpovídá 0,2 mg škrobu. 5 ml tohoto roztoku se zředí na 100 ml a ke kolometrii se vezme 50 ml. Ke zkoušenému vzorku i k stejnému množství standardního roztoku se přidají 3 ml HCl a 1 ml roztoku jodu [58].

Vzniklé zbarvení se porovná vizuálně ve zkumavkách nebo v Dubosquově kolorimetru (případně jiném zařízení se stejným výsledkem). Széchényi přezkoušela metodu Nelsenovu, kde se škrob převádí do roztoku kyselinou chloristou a kolorimetricky se poměří barva jodškrobu vzniklého přidáním roztoku KI-KIO<sub>3</sub>. Doporučuje ji ke stanovení škrobu v bramborách a v hrášku [59]. Anthronu jako činidla ke stanovení škrobu použil kromě jiných Clegg. Po hydrolýze škrobu je vzniklý cukr stanovován anthronem. Aby se eliminovaly rušivé látky ve vzorcích, provádí paralelní srovnání se standardním roztokem glukosy. Autor doporučuje tuto metodu ke stanovení škrobu v obilovinách, obilných výrobcích a krmivech [60].

## 2.2 Fyzikální metody stanovení sacharidů

### 2.2.1 Gravimetrická metoda

Touto metodou je možné stanovit škrob po extrakci interferentů vodou, převedení na rozpustné formy a následné srážení etanolem. Sraženina se promyje, vysuší a zváží. Dále je možné pomocí gravimetrie stanovit obsah celulosy, kdy celulóza je oddělena od doprovodných látek kyselou nebo alkalickou hydrolýzou a nehydrolyzovatelný zbytek je následně vysušen a zvážen. Pro běžné stanovení vlákniny byla vypracována metoda gravimetrická a metoda enzymově gravimetrická [54].

#### Podstata metody

Analyt ve vzorku je srážení vhodným činidlem kvantitativně převeden na málo rozpustnou dobře definovanou sloučeninu. Z její hmotnosti zjištěné vážením a z jejího známého stechiometrického složení se obsah analytu stanoví. Málo rozpustná sloučenina musí mít určité vlastnosti, aby jí bylo možno pro gravimetrické stanovení použít:

- musí být vyloučitelná v čisté formě,
- musí být snadno zfiltrovatelná,
- musí mít definované chemické složení,
- musí být dostatečně stálá [54, 61].

### 2.2.2 Denzitometrické metody

Pro stanovení cukrů se používají fyzikální metody, denzitometrické měření hydrometrem a pyknometrem. Metoda je vhodná pro stanovení obsahu cukru v sirupech a zdánlivé sušiny.

#### Podstata metody

##### Stanovení pomocí pyknometru

Stanovení je založeno na měření specifické hmotnosti (hmotnosti objemové jednotky vzorku) ve standardizované nádobce o definovaném objemu při teplotě 20 °C vztažené na specifickou hmotnost vody (1,000 při 15,5 °C). Specifická hmotnost tekutin je často udávána s indexem 20/20 nebo 20/15, který udává teplotu kapaliny a vody při měření. Při praktické realizaci se počítá podle vzorce:

$$\rho = \frac{(m_s - m_0)}{m_w - m_0},$$

$m_0$  - hmotnost suchého a čistého pyknometru – [g],

$m_w$  - hmotnost pyknometru naplněného vodou – [g],

$m_s$  - hmotnost pyknometru naplněného sledovanou tekutinou ( $m_s$ ) – [g],

$\rho$  – hustota – [ $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ].

### Stanovení pomocí hustoměru

Stanovení pomocí hustoměru je založeno na Archimedově zákoně, podle něhož se plovoucí těleso ponoří do kapaliny tím více, čím menší je její hustota, tedy čím více kapaliny musí vytlačit k vyrovnání své hmotnosti. Ponořený objem tělesa je nepřímo úměrný hustotě kapaliny. Hmotnost kapaliny vztažena na objemovou jednotku se měří jako objem vytlačený tělesem jednotkové hmotnosti (hustoměrem). V kapalinách s nižší hustotou se hustoměr ponoří více než v kapalinách s vyšší hustotou. K měření se používají speciální hustoměry, které jsou opatřeny stupnicí v procentech a nazývají se sacharometry. Stupnice pořízená empiricky je umístěna v úzkém krčku hustoměru [54, 61].

## 2.2.3 Optické metody

### **Polarimetrická metoda**

Polarimetrie je optická metoda, jejíž základní princip je založen na schopnosti některých látek stáčet rovinu lineárně polarizovaného záření. Jedná se většinou o látky organické vykazující přítomnost asymetrického uhlíku, který nese čtyři odlišné substituenty. Dále to mohou být i látky anorganické s asymetrickou molekulou. Hovoříme o tzv. opticky aktivních látkách. Všeobecně lze za opticky aktivní látku považovat jakoukoliv látku, jejíž molekuly nelze ztotožnit s jejich zrcadlovým obrazem [62].

### **Polarimetrické stanovení škrobu**

#### Princip metody

Polarimetrické stanovení škrobu využívá jeho mimořádné specifické otáčivosti, která se pohybuje v rozmezí  $(\alpha)_D +190^\circ$  až  $202^\circ$ , takže touto metodou lze stanovit i malá množství škrobu. Úhel otočení roviny polarizovaného světla závisí na povaze analyzované

látky, na povaze rozpouštědla, na teplotě a vlnové délce. Specifická otáčivost je charakteristickou konstantou opticky aktivních látek. Hemicelulosa, které rovněž přecházejí do roztoku se škrobem, stanovení neruší, neboť jsou opticky aktivní, dextriny podobné otáčivostí škrobu lze snadno z roztoku odstranit. Škrob se převede na rozpustnou formu působením zředěné kyseliny chlorovodíkové za tepla. Po vyčeření se rozpustný škrob určí polarimetricky. Běžně se měření provádí při vlnové délce 589,3 nm a teplotě 20 °C [55].

Roztoky, u nichž se měří úhel otočení, musí být dokonale čiré, proto se u analyzovaných vzorků provádí čiření, z nichž nejvyužívanější je čiření podle Carreze. Čiřicího účinku je zde dosaženo vytvořením objemné sraženiny hexakynoželeznanu zinečnatého.

Tab. 2 Podmínky hydrolyzy škrobu pro polarimetrické stanovení [16]

Metoda	Činidlo	Teplota °C	Čas (min.)	$[\alpha]_D^{20}$
Ewersova	HCl 0,422 % – bramborový 1,124 % – obilný	100	15	+182,7
Lintnerova- Belschnerova	HCl 25 %	20	30	+220

### Refraktometrická metoda

Pro stanovení cukrů v čistých cukerných roztocích lze použít metodu refraktometrickou. Jestliže roztok obsahuje směs cukrů, popřípadě s menším množstvím jiných látek, raději se stanovuje refraktometrická sušina [56].

#### Princip metody

Podstatou metody je měření indexu lomu. Index lomu je poměr rychlostí světla v obou fázích. Aby bylo možné porovnávat látky podle jejich indexu lomu, volí se shodné prostředí, ze kterého paprsek dopadá. Pro index lomu analyzované látky platí Snellův zákon lomu:



$$n = \frac{\sin \alpha}{\sin \beta},$$

kde  $\alpha$  (úhel dopadu) a  $\beta$  (úhel lomu) jsou úhly, které svírá paprsek světla s kolmicí dopadu. Z teoretického hlediska je ideálním prostředím vakuum, z praktického hlediska je účelnější vzduch. Index lomu závisí na vlnové délce záření i na teplotě [61].

Měření indexu lomu se provádí pomocí refraktometrů. Nejběžnější je univerzální Abbeův refraktometr. U tohoto refraktometru postačuje k měření kapka vzorku, která se kápne mezi dva hranoly. Proto se označuje jako suchý refraktometr. Ponorný refraktometr je ten, ve kterém se hranol, do nějž vstupuje paprsek, musí ponořit do nádoby se vzorkem. Podstatou měření refraktometry je zjištění mezního úhlu lomu  $\beta_{\max}$ . Je to maximální možný úhel lomu, když úhel dopadu se limitně přiblíží  $90^\circ$  [62].

#### 2.2.4 Chromatografické metody

Objev chromatografie sahá do devadesátých let 19. století a je spojován se jménem botanika M. Cvětá, který použil skleněnou kolonu naplněnou uhličitánem vápenatým pro dělení a izolaci barviv z rostlinných extraktů. Název vznikl spojením dvou řeckých slov – chroma a grafo, v překladu barva a psát. Na nějakou dobu byla tato metoda zapomenuta a znovuobjevena Martinem a Syngem v roce 1941. Oba za svoji práci získali v roce 1952 Nobelovu cenu. V souvislosti s rozvojem chemického průmyslu po druhé světové válce došlo k dalšímu rychlému vývoji v oblasti separačních metod, který pokračuje do současnosti [55, 61].

Pod názvem chromatografické metody jsou zahrnuty všechny operace, jež spočívají na různých fyzikálně-chemických principech, při nich dochází k postupnému, mnohonásobně opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi dvěma, popřípadě i více fázemi [61, 62, 63].

Ačkoliv jsou chromatografické metody ve srovnání s ostatními metodami mnohem nákladnější a časově náročnější, jejich nespornou výhodou je nesrovnatelně vyšší přesnost. Chromatografie patří mezi separační metody a umožňuje kvalitativní i kvantitativní stanovení. Vzorek je zde separován mezi pevnou (stacionární) fází a pohyblivou (mobilní) fází, která jej unáší soustavou. Podle různé afinity ke stacionární fází dochází

k opožďování a tím také k separaci jednotlivých složek vzorku. Na konci systému se jednotlivé složky identifikují vhodným detektorem. Pro kvantitativní stanovení polysacharidů se nejčastěji využívá gelová permeační chromatografie. Polysacharidy lze registrovat pomocí refraktometrického detektoru. Pokud je sledována i přítomnost proteinů ve vzorku, lze pro jejich stanovení současně použít spektrofotometrický detektor v UV oblasti spektra [64].

Pro jednodušší dělení skupin cukrů, například pro oddělení mono- a disacharidů lze použít chromatografii na tenké vrstvě (Thin Layer Chromatography, TLC). V současné době je ale chromatografie na tenkých vrstvách zcela nahrazena vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC - High Performance Liquid Chromatography). Z dalších separačních metod se zřídka používá plynová chromatografie, převážně z důvodů nízké těkavosti cukrů [54].

Tab. 3 Srovnání předností HPLC a GC [16]

HPLC	GC
Vhodná i pro výše molekulární sacharidy (polysacharidy)	Vhodná zvláště pro monosacharidy
Kratší čas analýzy	Větší citlivost detekce
Vyšší výtěžnost, lepší správnost	Je možné separovat $\alpha$ - a $\beta$ -anomery
Jednodušší příprava vzorku – přímá analýza	Nutná derivatizace, větší pracnost

### Chromatografie na tenké vrstvě

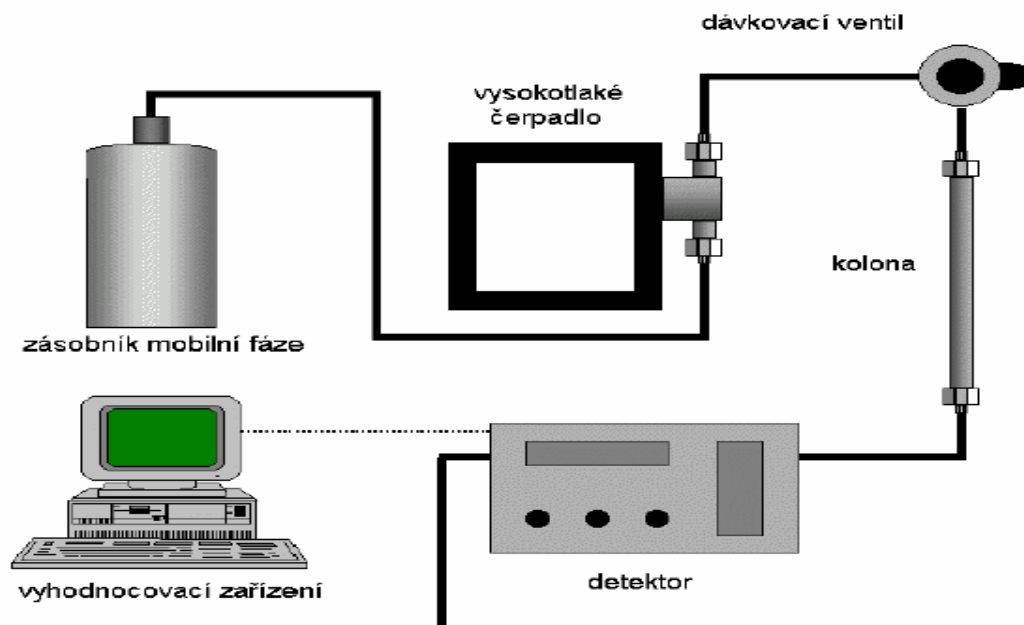
Největší vliv na hodnotu  $R_f$  sacharidů má velikost molekuly (počet monosacharidových jednotek) a počet uhlíků v molekule. Podstatně se uplatňuje také prostorové uspořádání hydroxylů, jejich počet a charakter cyklické formy anomeru. Sacharidy jsou velmi málo rozpustné v organických rozpouštědlech,  $R_f$  jsou čísla vesměs malá, je-li mobilní fází organické rozpouštědlo. Ze sorbentů se pro TLC nejčastěji používá fáze na bázi křemeliny nebo mikrokryalické celulosy, případně silikagel, u něhož se doporučuje předchozí impregnace tenké vrstvy puřem. Podle typu sorbentu je třeba cukry ve vzorku převést na vhodné deriváty (např. při použití silikagelu převedeme cukry na deriváty furfuralu, které následně kondenzují s hydrogenftalátem anilinu). Aldopentosy

dávají červenohnědé zbarvení, aldohexosy hnědé zbarvení s nádechem do žluta. Ketosy dávají nepatrné zbarvení a je nutno je detekovat jinými metodami) [57]. Jako vyvíjecí směsi jsou nejčastěji používány směsi organických rozpouštědel a kyselin, například 1-butanol :  $\text{CH}_3\text{COOH}$  :  $\text{H}_2\text{O}$  v poměru 4 : 1 : 5, 1-butanol : pyridin :  $\text{H}_2\text{O}$  v poměru 6 : 4 : 3, etylacetát :  $\text{CH}_3\text{COOH}$  :  $\text{H}_2\text{O}$  v poměru 3 : 1 : 3, etylacetát : isopropanol : voda 3 : 2 : 1. Obdobně lze postupovat při papírové chromatografii [55, 57].

Přestože TLC má určitá omezení, je stále vhodnou metodou díky své jednoduchosti, rychlosti a nízkým nákladům. Používáním automatických dávkovačů a denzitometrů a také nových modifikovaných metod (Optimum Performance Laminar Chromatography OPLC), se reprodukovatelnost a kvalita separace značně zlepšila [65].

## HPLC

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Na rozdíl od plynové chromatografie rozhodují o separaci složek vzorku nejen jejich interakce se stacionární fází, ale velmi výrazně i použitá mobilní fáze. Během separace se analyt rozděluje mezi mobilní a stacionární fází. Čas, jaký stráví v jedné nebo druhé fázi, závisí na afinitě analytu ke každé z nich [62].



Obr. 17 Obecné schéma kapalinového chromatografu [66]

### Dělení kapalinové chromatografie

- **Sorpční chromatografii**, kdy se separace uskutečňuje specifickými interakcemi částice s povrchem adsorbentu – adsorpční chromatografie (Liquid-Solid Chromatography) LSC nebo stagnující kapalnou stacionární fází nanesenou na nosiči – rozdělovací (absorpční) chromatografie (Liquid-Liquid Chromatography) - LLC.
- **Gelová (permeační) chromatografie (GPC)**, kdy se separace uskutečňuje na základě velikosti částic a velikosti pórů gelu.
- **Ionexová chromatografie (Ion-Exchange Chromatography, IEC)**, kdy dochází k separaci iontů na základě specifických interakcí s nabitým nosičem.
- **Speciální chromatografie** – afinitní, chirální aj. [62].

### Použití HPLC

Klasická kapalinová chromatografie se původně používala na rozdělení směsí tam, kde se jiné separační metody nemohly použít. Výhody chromatografických metod jsou v jejich schopnosti rozdělit a kvantitativně stanovit desítky až stovky složek vzorku. Další předností je rychlost a přesnost při stanovování vzorku. Vysokou účinnou kapalinová chromatografie má taky význam v tom, že umožňuje separovat i termolabilní kapalné a tuhé látky [67].

Mezi základní aplikace HPLC lze zařadit separaci a identifikaci látek ze směsí, kontrola čistoty preparátů nebo kontrola surovin, výrobních meziproductů a produktů. Za zmínku stojí také jeho použití při kontrolách životního prostředí, dále klinická a toxikologická analýza hormonů nebo léčiv a v neposlední řadě i kontrola potravinářských produktů [68].

### Čerpadla HPLC

Nejvíce se používají čerpadla pístová, která pracují za konstantního průtoku, v nichž se kapalina z malé pístní komory vytlačuje a nasává zpět přes dva zpětné ventily, z nichž sací je spojen se zásobníkem mobilní fáze a výtlačný s kolonou. Výhodou těchto čerpadel je možnost čerpání mobilní fáze bez přerušení. Nevýhodou je vznik tlakových pulsů. Ty jsou z části eliminovány zařazením tlumiče pulsů nebo zařazením většího počtu

čerpacích bloků. Pístová čerpadla se dvěma, třemi hlavami se používají v dnešní době nejvíce [69].

#### Dávkovací zařízení

Při vysokých tlacích na vstupu se dávkuje injekční stříkačkou, při zastavení průtoku nebo bez zastavení průtoku speciálními ventily. Dále je také možné dávkovat vzorek pomocí automatických dávkovačů. Pro kapalinovou chromatografii se stále vyvíjejí nové dávkovače, které více vyhovují požadavkům vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC). Dávkují se desítky  $\mu\text{l}$ .

#### Kolony HPLC

Chromatografická kolona je v podstatě trubka nebo kapilára rovnoměrně naplněná nebo pokrytá stacionární fází. Pro analytické aplikace se převážně používají kolony plněné pórovitými náplněmi o průměru 3–10  $\mu\text{m}$ , o délce 5–30 cm. Plášť kolony (hardware) má za úkol udržet pohromadě stacionární fází. Nejpoužívanější materiál k výrobě kolon je nerezová ocel, plasty nebo sklo [70].

Chromatografické kolony se podle použití dělí na mikrokolony, preparativní, analytické. Materiály pro plnění kolon jsou většinou založené na anorganické matici (silikagel), na nichž mohou být chemicky vázané nebo zakotvené různé stacionární fáze [69]. Při analýze sacharidů se používají kolony na bázi sulfonované divinylbenzenové pryskyřice v šesti kationtových cyklech (SUPELCOGEL). Dalším sorbentem je silikagel s více než 40 vázanými fázemi (SUPELCOSIL) [70].

Jako sorbentů se používá též křemene, oxidu zirkoničitého nebo polymeru (Prevail Carbohydrate). Na běžných stacionárních fázích je separace sacharidů nedokonalá, proto byla zavedena vhodná chromatografická technika s využitím chirální fáze. Přítomností opticky aktivní látky ve stacionární nebo mobilní fázi dojde k interakci daného optického izomeru obsaženého ve vzorku a tím i ke zvýšení retence na koloně [69]. Pro vysoceúčinnou analýzu sacharidů se používá chirální kolona apHera NH<sub>2</sub> Amino, která je na bázi vinylalkohol kopolymeru [70].

#### Detektory v HPLC

Detektor je jednou z nejdůležitějších součástí kapalinového chromatografu. Je to zařízení na určení přítomnosti vzorku nebo na kvantitativní sledování její koncentrace

v eluátu. Detektor v podstatě sleduje vhodným snímačem jednu nebo více vlastností eluátu a přenáší jejich změny na elektrické signály, které je možno zaznamenat. V některých případech může detektor určit i některé další vlastnosti analyzovaného vzorku jako například molární hmotnost vzorku nebo absorpční spektrum. Metoda HPLC využívá několik typů detektorů: spektrofotometrický detektor (UV-VIS), fluorescenční detektor, hmotnostní spektrometr, refraktometrický detektor, elektrochemický apod. Často používaným detektorem je detektor spektrofotometrický (UV-VIS) a fluorescenční. Podmínkou použití těchto detektorů je, aby daný vzorek absorboval záření určité vlnové délky (UV-VIS detekce) nebo aby emitoval fluorescenční záření (fluorescenční detekce). Pokud vzorek neabsorbuje záření v oblasti UV-VIS nebo neemituje fluorescenční záření, je použití těchto detektorů podmíněno derivatizací vzorku (vzorek je chemickou reakcí převeden na sloučeniny, které mají potřebné vlastnosti - absorpce UV-VIS, fluorescence) [67, 71].

**Spektrofotometrický detektor** patří v dnešní době k nejběžnějším detektorům. Jeho výhodou je jednoduchost a spolehlivost při detekci široké škály látek. Nejdokonalejší spektrofotometrické detektory jsou schopny pomocí diodového pole proměřit celá absorpční spektra během průchodu látky kyvetou v určené oblasti vlnových délek [72]. Pro stanovení sacharidů v ovocných džusech se využívá spektrofotometri v blízké – infračervené oblasti při vlnových délkách 1200 až 2450 nm [73].

**Refraktometrický detektor** (Refractive Index Detector – RI) měří rozdíl mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní fáze. Obsahuje-li eluát složku, objeví se výchylka. Tento typ detektoru není příliš citlivý, ale je velmi univerzální. Při jeho použití je třeba přísně udržovat konstantní teplotu.

**Fluorescenční detektor** využívá fluorescence, tedy schopnosti látek absorbovat ultrafialové záření a pak vysílat záření o vyšší vlnové délce, které se měří fotonásobičem kolmo na směr vstupujícího záření. Fluorescenční detektor je vysoce selektivní a lze jej kombinovat i s detektorem fotometrickým [62].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo optimalizovat spektrofotometrickou metodu s použitím anthronu pro stanovení obsahu škrobu ve škrobnatých plodinách. Pro naplnění tohoto cíle byla nejdříve vypracována literární rešerše týkající se stanovení obsahu sacharidů. Poté bylo provedeno stanovení obsahu škrobu metodou podle Ewerse a dále spektrofotometrickou metodou s použitím anthronu.



## 4 METODIKA PRÁCE

### 4.1 Charakteristika analyzovaných vzorků

Rostlinný materiál byl získán Institutem tropů a subtropů (Česká zemědělská univerzita v Praze) v rámci spolupráce s bolivijskou univerzitou (Universidad Nacional “Siglo XX”, Llallagua) v roce 2007. Další plodiny byly zakoupeny v obchodní síti Makro, s.r.o. Plodiny byly pěstovány jak v polních podmínkách, tak i způsobem mikrotuberizace. Charakteristiky jsou uvedeny v Tab. 4 a dané plodiny jsou zobrazeny na Obr. 18–25.

Tab. 4. Charakteristika vybraných plodin

Plodina	Způsob pěstování / zakoupení	Dodané množství (g)
<i>Mirabilis expansa</i> (červená)	Polní	285,3
<i>Mirabilis expansa</i> (bílá)	Polní	205,4
<i>Oxalis tuberosa</i>	Polní	120,6
<i>Canna edulis</i>	Polní	320,2
Brambory	Makro, s.r.o.	3512,6
Batáty	Makro, s.r.o.	1520,0
Maniok	Makro, s.r.o.	2053,1
Polyploid	Mikrotuberizace	6,2
Bolivia	Mikrotuberizace	5,5



Obr. 18 *Mirabilis expansa* (červená)



Obr. 19 *Mirabilis expansa* (bílá)



*Obr. 20 Oxalis tuberosa*



*Obr. 21 Canna edulis*



*Obr. 22 Batáty*



*Obr. 23 Maniok*



*Obr. 24 Polyploid*



*Obr. 25 Bolivia*

### **Metodika pěstování v polních podmínkách**

Rostliny *Canna edulis*, *Mirabilis expansa* a *Oxalis tuberosa* byly pěstovány na pokusném poli ITS ČZU v Praze, které se nachází v nadmořské výšce 286 m n.m. (50°05' s.š., 14°27' v.d.). Průměrná denní teplota v průběhu vegetace byla 10,2 °C, úhrn srážek 453 mm a trvání slunečního svitu 1593,3 h. [74]. Půda byla hnojena kompostem (30 t.ha<sup>-1</sup>) sedm měsíců před výsadbou. Průměrná délka vegetace činila 171 dnů.

Sadbový materiál (u *Canna edulis* mladé sazeničky ze semen, u *Mirabilis expansa* mladé rostliny získané ze stonkových řízků a u *Oxalis tuberosa* rostlinky vypěstované z hlíz) byl v roce 2009 na pole vysazen počátkem května do hrůbků ve sponu 0,70 x 0,70 m. V průběhu vegetace bylo prováděno 2x plečkování (první měsíc od výsadby a druhé dva měsíce po výsadbě) za účelem odplevelení porostu a nahrnutí hrůbků. Porost byl průběžně rovnoměrně zavlažován. Sklizeň byla provedena před příchodem podzimních mrazíků (počátek října).

### **Mikrotuberizace u meloku hlíznatého (*Ullucus tuberosus*) – Bolivia a Polyploid**

Mikrotuberizace byla navozena *in vitro* u nodální kultury: segmenty stonku nesoucí po jednom axilárním pupenu byly vysazeny na kultivační médium MS a byly pěstovány při teplotě 25±2 °C, fotoperiodě 18/6 hod (den/noc) a osvětlení 2000 lx (zářivky NARVA LT 36 W/010) [75]. Po 14 dnech byly segmenty převrstveny mikrotuberizačním médiem (tekuté MS médium + 10 mg BAP.l<sup>-1</sup> + 80 g sacharosy.l<sup>-1</sup>) a kultivovány ve tmě při teplotě 15 °C. Mikrohlízy se začaly vytvářet po 3 měsících a za účelem analýz byly odebrány hlízky 5–6 měsíců staré. Polyploidní klon meloku hlíznatého (*Ullucus tuberosus*) byl získán indukovanou polyploidizací *in vitro* za pomoci oryzalinu [76].

### **Plodiny zakoupené v obchodní síti Makro, s.r.o.**

Brambory odrůdy Komtesa (země původu ČR), batáty (země původu Egypt) a maniok (země původu Kostarika) byly zakoupeny v obchodní síti Makro, s.r.o. ve Zlíně dne 14. 1. 2010.

## 4.2 Chemické analýzy

### 4.2.1 Stanovení vlhkosti

#### 4.2.1.1 Příprava misek

Hliníkové misky s víčkem byly omyty a vysušeny v sušárně při 103 °C. Po vysušení byly umístěny do exsikátoru. Po vychladnutí na pokojovou teplotu byly komplety tvořené z hliníkové misky a víčka zváženy s přesností na 0,0001 g.

#### 4.2.1.2 Předsoušení

Stanovení vlhkosti u vybraných plodin bylo provedeno ihned po dodání vzorků. Vzorky zakoupené z Makra a vzorky z polních pokusů byly pečlivě omyty, oloupany a pomlety. Vlhkost u mikrohlíz byla stanovována u hlíz se slupkou. Do předem vysušených a zvážených hliníkových misek s víčkem bylo naváženo přibližně 20 g nastrouhaných hlíz (v případě mikrohlíz bylo množství 5 g), a to s přesností na 0,0001 g. Vzorky byly rovnoměrně rozprostřeny do vrstvy asi 10 mm. Následovně byly misky se vzorkem a odklopeným víčkem umístěny do laboratorní sušárny (Vential, BMT, a.s.) předeštěné na teplotu (58±2) °C. Předsoušení vzorků probíhalo do požadovaného snížení obsahu vlhkosti po dobu 24 hodin, potom byly misky vyjmuty ze sušárny a volně na vzduchu ponechány asi 12 hodin za účelem vyrovnání vlhkosti s okolní atmosférou (kondicionace). Vzorky byly chráněny před rozptýlením a zaprášením. Následně byly misky s víčkem a vzorkem zváženy. Vážení bylo ukončeno, když rozdíl mezi dvěma váženími po sobě jdoucími byl menší než 0,001 g. Tím bylo dosaženo konstantní hmotnosti [77]. Po zvážení byly vzorky rozemlety a dále pro homogenizaci bylo použito síto s normovanými otvory 1mm.

#### 4.2.1.3 Sušení

Do předem vysušených a zvážených hliníkových misek s víčkem bylo naváženo přibližně 5 g předsušených, rozemletých a prositých vzorků, a to s přesností na 0,0001 g. Misky se vzorky byly vloženy do sušárny předem vyhřáté na teplotu (103±2) °C a od okamžiku, kdy vnitřní prostor sušárny dosáhl opět výše uvedené teploty, byly sušeny do konstantního úbytku hmotnosti. Potom byly umístěny do exsikátoru a dále misky i se

vzorkem zváženy s přesností na 0,001 g. Po odvážení misky byl proveden kontrolní test tak, že byla miska se vzorkem vložena opět do sušárny vyhřáté na  $(103 \pm 2)$  °C a sušena s odkrytým víčkem další 2 hodiny. Po vyjmutí ze sušárny a ochlazení v exsikátoru byla opět zvážena s výše uvedenou přesností. Jestliže rozdíl mezi předešlým a tímto vážením nepřestavoval více, než odpovídá obsahu vlhkosti 0,2 %, stanovení vlhkosti, sušení bylo ukončeno. Jako konečná hmotnost byla vzata hmotnost v prvním vážení. Byl-li rozdíl mezi oběma váženími vyšší než výše uvedená hodnota, bylo provedeno další sušení do konstantního úbytku hmotnosti [77].

#### 4.2.1.4 Vyhodnocení

Obsah vlhkosti (X) jako procento vzorku byla vypočítána podle vzorce:

##### *Sušení bez předsoušení*

$$X = \frac{(m - m_0)}{m} \times 100 \quad (1)$$

kde:

$m$  = počáteční hmotnost zkoušeného vzorku v gramech

$m_0$  = hmotnost sušeného zkoušeného vzorku v gramech

##### *Sušení s předsoušením*

$$X_p = \left[ \frac{(m_2 - m_0) \times m_1}{m_2} + m - m_1 \right] \times \frac{100}{m} = 100 \times \left( 1 - \frac{m_1 \times m_0}{m \times m_2} \right) \quad (2)$$

kde:

$m$  = počáteční hmotnost zkoušeného vzorku v gramech

$m_1$  = hmotnost zkoušeného vzorku po předsoušení v gramech

$m_2$  = hmotnost zkoušeného vzorku po rozemletí nebo rozmělnění v gramech

$m_0$  = hmotnost sušeného zkoušeného vzorku v gramech

Vypočtené hodnoty jsou vyjádřeny v [%].

Obsah sušiny v % (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$Y = 100 - X \quad (3)$$

Výsledkem stanovení byl aritmetický průměr výsledků tří souběžně provedených stanovení, která splňovala podmínku opakovatelnosti (rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení obsahu vlhkosti provedených na stejném vzorku nepřekročil absolutní hodnotu vlhkosti 0,2 %) [77]. V případě mikrohlíz toto stanovení bylo provedeno pouze jednou (vzhledem k dodané hmotnosti mikrohlíz).

#### 4.2.2 Izolace škrobů z plodin

Vzorky jednotlivých odrůd byly šetrně oloupany a rozemlety na jemnou kaši tak, aby velikost částic byla přibližně 0,3 mm. Rozemleté vzorky byly vpraveny na síto kruhového tvaru o velikosti ok 0,5 mm. Tenkým proudem vody byly vzorky drtě opatrně několikrát vypírány tak, aby byl vyprán pouze škrob, a to všech velikostních podílů škrobových zrn.

Po dokonalé sedimentaci byly vzorky dekantovány opatrným slitím vody a posléze přefiltrovány přes filtr. Poté byl škrob sušen na rozprostřených filtračních papírech na vzduchu při pokojové teplotě do druhého dne. Vzorky byly chráněny před rozptýlením a zaprášením. Izolace škrobu byla provedena u všech hlíz s výjimkou mikrohlíz.

#### 4.2.3 Stanovení obsahu škrobu

##### I. Stanovení obsahu škrobu metodou podle Ewerse

Stanovení škrobnatosti u vybraných plodin bylo provedeno polarimetricky podle Ewerse ihned po dodání vzorků [77]. Touto metodou byl stanovován škrob u všech plodin s výjimkou mikrohlíz (vzhledem k množství, které bylo dodáno).

##### Princip metody

Metoda zahrnuje dva postupy. Nejprve je vzorek podroben působení horké zředěné kyseliny chlorovodíkové. Po vyčeření a filtraci je optická rotace roztoku měřena polarimetricky. Rozdíl mezi těmito měřeními násobený známým faktorem udává obsah škrobu ve vzorku.

##### a) Stanovení celkové optické otáčivosti

Do 100 ml odměrné baňky bylo naváženo 10 g vzorku čerstvých hlíz, přidáno 25 ml HCl o složení 0,422 hm.%. Obsah baňky byl důkladně krouživým pohybem promíchán a stěny spláchnuty dalšími 25 ml HCl. Potom byla baňka vložena do vroucí vodní lázně

a zahřívána přesně 15 minut, po 3 minutách byl obsah baňky znovu promíchán. Po 15 minutách byla baňka vyjmuta z lázně a bylo přidáno dalších 20 ml HCl a následně byla baňka ochlazena. Potom bylo provedeno číření podle Carreze. Při číření bylo nejprve přidáno 1 ml Carrez I a důkladně promícháno a potom byl přidán 1 ml Carezz II a opět byla baňka promíchána. Po 5 minutách působení byla baňka doplněna po rysku destilovanou vodou a roztok byl zfiltrován. První podíly filtrátu byly vráceny zpět na filtr. U čirého filtrátu byl na polarimetru (POL 1 kruhový, optika microscopes) změřen úhel. Výsledkem stanovení byl aritmetický průměr tří souběžně provedených stanovení.

#### Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah škrobu v  $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  byl vypočítán ze vztahu:

$$c = \alpha / (185,7 \times \text{délka polarimetrické trubice v dm})$$

$$c = \text{úhel} / (185,7 \times 1)$$

kde:

$\alpha$  – změřený úhel otáčení ( $^{\circ}$ )

185,7 $^{\circ}$  – specifická otáčivost pro bramborový škrob ( $^{\circ}$ )

1 – délka polarimetrické trubice (dm)

Obsah škrobu v analyzovaném vzorku se potom vypočítal v hmot. % z tohoto vztahu:

$$\check{S} = (c \times 100/n) \times 100$$

kde:

n – navážka vzorku k analýze (g)

c – obsah škrobu ( $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )

$\check{S}$  – obsah škrobu (% čerstvé hmoty)

#### b) Stanovení optické otáčivosti látek rozpustných ve 40% ethanolu

Vzorek byl extrahován 40% ethanolem. Po okyselení filtrátu 0,422% HCl, vyčerení a filtraci byla optická otáčivost roztoku měřena stejně jako u prvního stanovení. Obsah škrobu ve vzorku byl vypočítán jako rozdíl mezi těmito dvěma měřeními násobený známým faktorem.

c) Stanovení specifické otáčivosti izolovaného škrobu

Pro zjištění specifické otáčivosti pro škrob konkrétních plodin byl použit izolovaný škrob z daných plodin. Pro toto stanovení byl navažován vždy 1 g konkrétního škrobu a dále bylo postupováno podle metodiky stanovení uvedeného v bodě a) a b).

Výsledkem stanovení byl aritmetický průměr tří souběžně provedených stanovení.

II. Stanovení obsahu škrobu spektrofotometrickou metodou pomocí anthronu

Princip:

Podstatou anthronové metody je tvorba barevného komplexu furfural-anthron v prostředí koncentrované kyseliny sírové. Intenzita zbarvení je úměrná koncentraci zkoumaného sacharidu a může být měřena spektrofotometricky [78, 79, 80].

Vzhledem k tomu, že mezi zkoumané plodiny byly zahrnuty i mikrohlízy, byla zvolena tato spektrofotometrická metoda. Metoda byla zvolena zejména pro malé množství vzorku, které je potřeba k analýze (cca 0,1 g sušiny) a také pro finanční a časovou nenáročnost.

Pro následnou validaci metody byly zvoleny dílčí cíle:

1. Zjištění absorpčního maxima a kalibračních křivek.
2. Vliv doby hydrolýzy na obsah měřené glukosy.
3. Stabilita komplexu anthron – škrob.
4. Vliv koncentrace  $H_2SO_4$  při přípravě anthronového roztoku.
5. Zhodnocení extrakčního činidla.
6. Porovnání metody polarimetrické a spektrofotometrické.
7. Validace spektrofotometrické metody.

1) Pro extrakci byly zvoleny následující látky:

- 0,422% HCl [81]
- 1M roztok chloralhydrátu [82]



2) Pro vytvoření anthronového roztoku byly použity následující koncentrace  $\text{H}_2\text{SO}_4$  :

- 96%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  [82]
- 72%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  [81]

Použité chemikálie a roztoky:

- Bramborový škrob (Sigma-Aldrich, p.a.)
- Chloralhydrát (Sigma-Aldrich, p.a.)
- Kyselina sírová (96 % p.a., Penta, Petr Švec)
- Kyselina chlorovodíková (37 % p.a., Petr Lukeš)
- Anthron (Sigma-Aldrich, p.a.)
- Ethanol (96 % p.a., Penta, Petr Švec)

Postup:

Před stanovením byly všechny vzorky lyofilizovány při  $-4\text{ }^\circ\text{C}$ , 12156 Pa, po dobu 48 h (Christ Alpha 1–4 LSC, Labicom, ČR).

Do zkumavek bylo naváženo 0,1 g lyofilizovaných vzorků a přidány 4 ml 80% etanolu. Byla provedena centrifugace po dobu 5 minut při 2000–3000 g. Supernatant byl opatrně slit a pelet roztřepán ve 4 ml destilované vody. Opět byla provedena centrifugace po dobu 5 minut při 2000–3000 g. Supernatant byl opatrně slit a pelet roztřepán ve 4 ml destilované vody. Znovu byla provedena centrifugace. K peletu v centrifugační zkumavce byl přidán 1 ml 1M roztoku chloralhydrátu, nebo 5 ml 0,422% HCl . Pro zjištění vlivu doby hydrolyzy na obsah škrobu v plodinách byly vzorky umístěny do vroucí vodní lázně na následující doby: 5, 10, 15, 20, 25 a 30 minut. Po vyjmutí z vodní lázně byly vzorky centrifugovány 5 minut. Supernatant byl kvantitativně převeden do 5 ml odměrné baňky a doplněn po rysku 0,422% HCl. Dále do 50 ml odměrné baňky bylo napipetováno 1 ml roztoku vzorku a doplněno po rysku destilovanou vodou. Dále byl vytvořen anthronový roztok o koncentraci 0,2% (anthron v 96% nebo 72%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), poté byl roztok vložen do lednice (teplota  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ) na dobu 1, 5 a 15 hodin. Do zkumavek se zábrusem bylo napipetováno 3 ml příslušného anthronového roztoku zchlazeného na  $8\text{ }^\circ\text{C}$ , k němuž byl přidán 1 ml naředěného vzorku. Obě fáze byly důkladným protřepáním smíseny pod proudem studené vody. Promíchané vzorky byly umístěny na 5 minut do vroucí vodní

lázně. Po vyjmutí z lázně byly vzorky ochlazeny na pokojovou teplotu. Absorbance byla měřena na spektrofotometru (Biochrom Libra S6, Fischer Scientific) na vlnové délce 625 nm oproti slepému vzorku (3 ml anthronového roztoku + 1 ml destilované vody). Koncentrace škrobu v plodinách byla vypočítána z regresní rovnice kalibrační křivky škrobu (Sigma – Aldrich, p.a.) [81, 82].

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSE

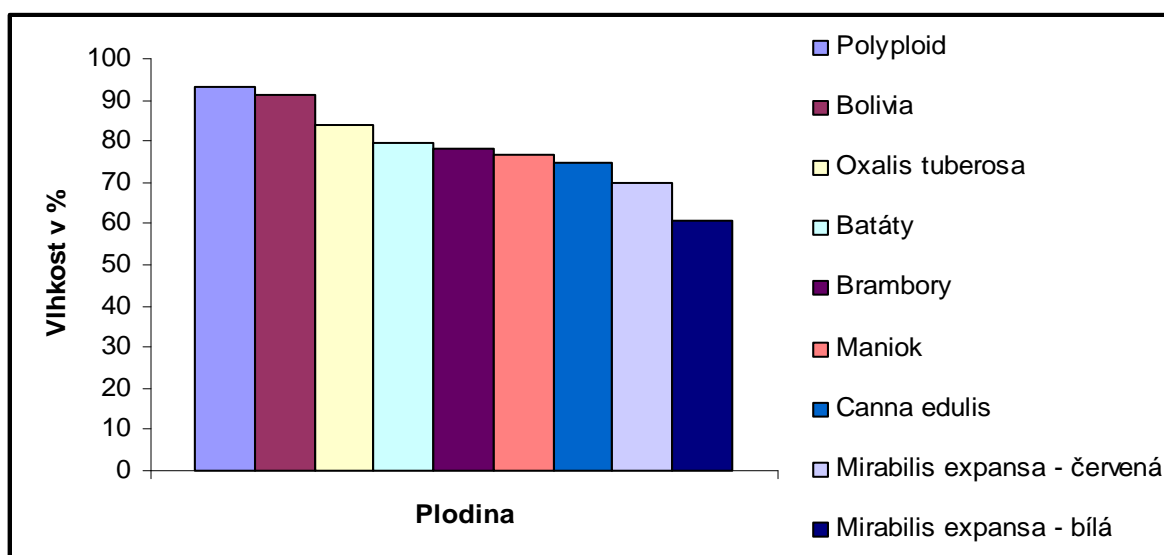
### 5.1 Stanovení vlhkosti

Stanovení vlhkosti u škrobnatých plodin bylo provedeno podle kapitoly 4.2.1. Průměrné hodnoty vlhkosti jsou uvedeny v tabulce 5. Pro přehlednost jsou výsledky znázorněny také v grafu (Graf 1).

Tab. 5 Průměrné hodnoty vlhkosti (%)

Plodina	Vlhkost v %
	Aritmetický průměr ± S. D. (n = 3)
Brambory	78,26 ± 0,11
Batáty	79,70 ± 0,02
Maniok	76,71 ± 0,09
<i>Canna edulis</i>	74,63 ± 0,07
<i>Mirabilis expansa</i> – bílá forma	60,62 ± 0,12
<i>Mirabilis expansa</i> – červená forma	70,08 ± 0,01
<i>Oxalis tuberosa</i>	84,06 ± 0,01
Mikrohlízy – Polyploid	93,39 ± 0,11
Mikrohlízy – Bolivia	91,29 ± 0,19

Graf. 1 Obsah vlhkosti ve škrobnatých plodinách (%)



Jak je zřejmé z tabulky č. 5, průměrný obsah vlhkosti u vybraných plodin se pohyboval v rozmezí 60,62–93,39 %. Jak se předpokládalo vzhledem ke způsobu pěstování, nejvyšší obsah vlhkosti byl nalezen u mikrohlíz Bolivia a Polyploid. Nejnižší

obsah vlhkosti byl u hlíz plodiny *Mirabilis expansa* – bílá forma, který dosáhl hodnot kolem 60 %. Ve srovnání s bramborami, u nichž obsah vlhkosti byl kolem 78 %, vykazovaly podobné hodnoty též batáty, maniok a *Canna edulis*.

Jedním z hlavních a rozhodujících činitelů ovlivňujících celkový stav skladovaných hlíz je teplota. Při teplotách nad 6 °C stoupá biologická činnost a intenzita dýchání, dochází k vysokým ztrátám na výživné hodnotě a kvalitě. U takto skladovaných hlíz se snižuje jejich nutriční a stolní hodnota (zejména chuť). Při propočtu na škrob prodýchají brambory 1 % škrobu při teplotě 3 °C za 70 dní, při 10 °C za 35 dní, zatímco při 20 °C již za 14 dní. Intenzita dýchání je tedy přímo úměrná teplotě a je intenzivnější u odrůd s vyšším obsahem cukru. Podle švédských vědců dosahují ztráty po 6 měsících uložení při 3 °C 1,4 %, při 5 °C 1,8 % a při 10 °C již 2,6 % sušiny. Jako nejvhodnější teplota pro skladované hlízy je uváděna teplota 3–5 °C, kdy je v hlízách v rovnováze tvorba cukru ze škrobu a jeho prodýchávání [83]. Klesá-li teplota pozvolna, rovnováha není narušena, nastane-li však rychlý pokles teploty, nestačí se cukr prodýchat a hlízy sládnou.

Podle Výzkumného ústavu bramborářského v Havlíčkově Brodě se vhodná teplota pro skladování brambor má pohybovat v rozmezí 4–6 °C. V Holandsku doporučují skladovací teplotu pro konzumní brambory při jejich spotřebě do konce března 5 °C, do konce dubna 4 °C a do konce května 3 °C [83].

Procházka a kol. [84] uvádí, že brambory vyžadují při uložení poměrně vysokou relativní vlhkost vzduchu, která se pohybuje v rozmezí 87–95 %. Nižší relativní vlhkost než 85 % zvyšuje nebezpečí rozvoje suchých hnilob, vyšší než 95 % podporuje šíření mokré bakteriální hniloby. Důležité pro skladování brambor je také občasné větrání a zamezení přístupu světla.

## 5.2 Stanovení obsahu škrobu

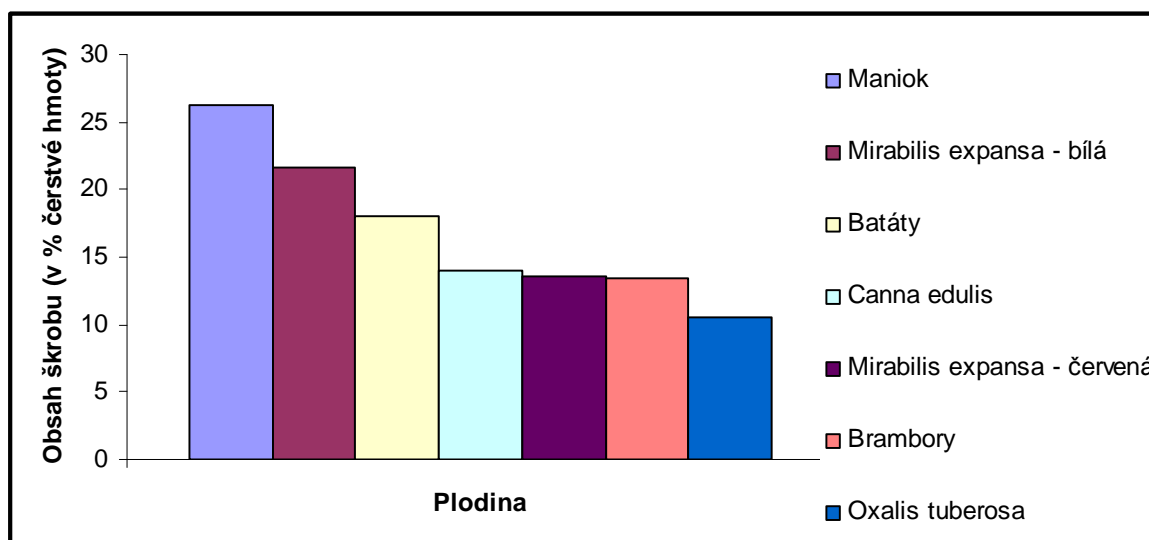
### 5.2.1 Stanovení obsahu škrobu metodou podle Ewerse

Stanovení obsahu škrobu u vybraných plodin bylo provedeno polarimetricky podle Ewerse (viz. kapitola 4.2.3). Průměrný obsah škrobu je uveden v tabulce 6. Pro přehlednost jsou výsledky znázorněny také v grafu (Graf 2).

Tab. 6 Obsah škrobu v hlízách škrobnatých plodin s použitím specifické otáčivosti bramborového škrobu (%)

Plodiny	Vědecké zdroje	Zjištěný (n = 3)
	Aritmetický průměr ± S. D.	
Brambory	11,0 – 16,0 <sup>[85]</sup>	13,46 ± 0,33
Batáty	20,4 – 22,5 <sup>[86]</sup>	17,99 ± 0,35
Maniok	21,0 – 30,0 <sup>[87]</sup>	26,26 ± 1,22
<i>Canna edulis</i>	12,7 – 13,6 <sup>[88]</sup>	13,94 ± 0,01
<i>Mirabilis expansa</i> – bílá forma	17,4 <sup>[41]</sup>	21,69 ± 0,02
<i>Mirabilis expansa</i> – červená forma	17,4 <sup>[41]</sup>	13,55 ± 0,03
<i>Oxalis tuberosa</i>	3,0 – 17,0 <sup>[89]</sup>	10,59 ± 0,01

Graf 2 Obsah škrobu v hlízách škrobnatých plodin – spec. otáčivost brambor. škrobu (%)



Jak je patrné z tabulky č. 6, průměrný obsah škrobu se pohyboval v rozmezí od 10,6 do 26,3 %.

Při vyhodnocení všech šesti plodin bylo zjištěno, že největší množství škrobu obsahoval maniok. Sriroth a kol. [87] ve své práci uvádí obsah škrobu u manioku v rozmezí 21–30 %, což se shoduje i s našimi výsledky. Nejmenší množství škrobu bylo zjištěno u plodin *Oxalis tuberosa*, a to kolem 11 %. Výsledky uvedené v diplomové práci též korespondují s údaji Chirinos a kol. [89], kteří ve své práci uvádějí obsah škrobu v těchto hlízách okolo 3–17 %. Piyachomkwan a kol. [88] se ve své práci zabývají obsahem škrobu ve čtyřech odrůdách *Canna edulis*. Zjistili, že průměrný obsah škrobu u těchto plodin se pohybuje v rozmezí 12,74–13,63 %.

Tabulka č. 7 udává průměrné hodnoty specifické otáčivosti pro dané druhy škrobů. Vzhledem k tomu, že v Nařízení komisi (ES) č. 152/2009 [77] je uvedena pouze specifická otáčivost pro bramborový škrob, bylo provedeno zjištění specifické otáčivosti pro ostatní vybrané druhy škrobů.

Tab. 7 Průměrné hodnoty specifické otáčivosti škrobů příslušných plodin (%)

Plodiny (škrob)	Aritmetický průměr ± S. D.	Specifická otáčivost ( ° ) [77]
Brambory	186,50 ± 0,62	185,7
Batáty	158,74 ± 1,95	nevedeno
Maniok	170,65 ± 1,85	nevedeno
<i>Canna edulis</i>	181,82 ± 1,92	nevedeno
<i>Mirabilis expansa</i> – bílá forma	159,31 ± 0,95	nevedeno
<i>Mirabilis expansa</i> – červená forma	189,31 ± 0,72	nevedeno
<i>Oxalis tuberosa</i>	162,81 ± 1,22	nevedeno

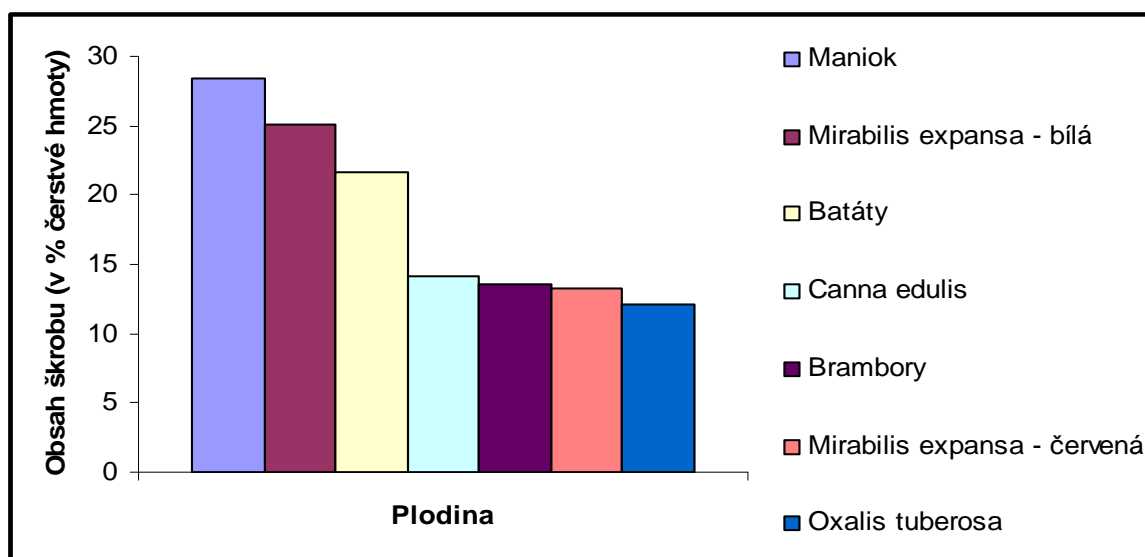
Z tabulky č. 7 je zřejmé, že nejvyšší specifickou otáčivost vykazuje škrob izolovaný z hlíz *Mirabilis expansa* červená forma. Naopak nejnižší hodnota specifické otáčivosti byla zjištěna u škrobu z batátů.

V tabulce č. 8 je znázorněn průměrný obsah škrobu u jednotlivých plodin na základě zjištěné specifické otáčivosti pro dané druhy škrobů. Pro přehlednost jsou výsledky znázorněny také v grafu (Graf 3).

Tab. 8 Obsah škrobu v hlízách škrobnatých plodin s použitím konkrétní specifické otáčivosti (%)

Plodina	Aritmetický průměr ± S. D. (n = 3)
Brambory	13,52 ± 0,35
Batáty	21,60 ± 0,42
Maniok	28,47 ± 1,32
<i>Canna edulis</i>	14,15 ± 0,03
<i>Mirabilis expansa</i> – bílá forma	25,10 ± 0,02
<i>Mirabilis expansa</i> – červená forma	13,20 ± 0,02
<i>Oxalis tuberosa</i>	12,06 ± 0,01

Graf 3 Obsah škrobu v hlízách škrobnatých plodin – spec. otáč. konkrétních škrobů (%)



Jak je zřejmé z tabulky č. 8, průměrný obsah škrobu, při použití zjištěné specifické otáčivosti pro dané druhy škrobů, se pohyboval v rozmezí od 12,1 do 28,5 %. Při porovnání výsledků s použitím specifické otáčivosti bramborového škrobu (viz. Tab. č. 6) a zjištěné specifické otáčivosti konkrétních škrobů (viz. Tab. č. 8) byly zjištěny významné odchylky. V případě použití konkrétní specifické otáčivosti byl obsah škrobu ve všech případech vyšší. Výjimkou byly hlízy *Mirabilis expansa* červená forma, u kterého došlo k poklesu o 2,6 %. Nejvyšší rozdíly v obsahu škrobu zjištěné s použitím konkrétní specifické otáčivosti lze zaznamenat u batátů (nárůst o 20 %) a *Mirabilis expansa* bílá forma (nárůst 15,7 %). V případě brambor specifická otáčivost škrobu byla v souladu se specifickou otáčivostí uvedenou v [77]. Z toho důvodu lze usuzovat, že výsledky, které jsou vypočítány se specifickou otáčivostí konkrétního škrobu, uvedené v tabulce č. 8 a grafu 3, by mohly být přesnější.

V podmínkách bramborářské oblasti bylo zjištěno, že podíl odrůdy na celkové variabilitě obsahu škrobu činil v pokusech Míči [90] 65,97 %, podíl ekologických podmínek 19,28 % a podíl interakce odrůda x prostředí 14,75 %. Z vlivů prostředí mají tedy ročník a lokalita v bramborářské oblasti přibližně stejný vliv. Na obsahu škrobu má vliv i zeměpisná délka (poledníkový vliv). Směrem od východu na západ klesá v ČR škrobnatost.

Obecně bylo stanoveno, že vysokého obsahu škrobu je možno docílit v oblastech a letech s dlouhým a na slunce bohatým pozdním létem, zatímco v oblastech a letech

s vlhkým a na slunce chudým studeným klimatem zůstávají obsahy škrobu nízké. Podle Míči a Vokála [91] je k optimální tvorbě škrobu ve čtyřech měsících (červen – září) potřebná suma teploty 60 °C (= suma čtyř měsíčních denních průměrných teplot) a 220 mm dešťových srážek.

Závažným problémem je délka vegetační doby brambor. Je známo, že s kratší vegetační dobou klesá i obsah škrobu. Byla prokázána těsná korelace mezi obsahem škrobu a délkou vegetační doby. Zrůst [92] zjistil pro soubor 22 odrůd korelační koeficient na úrovni 0,736, který byl vysoce průkazný. Znamená to, že rané a polorané odrůdy s požadovanou škrobnatostí – tehdy 16 % (dnes 17 %, Vokál [93], uvádí již 18 %, Čížek [94], kalkuluje rovněž s 18 % pro rentabilitu výroby průmyslových brambor) a s odpovídajícími hospodářskými vlastnostmi se získávají při použití šlechtitelského materiálu ze sortimentu odrůd obtížně.

Nogueira a spol. [95] zjistili, že při aplikaci draslíku se zvýšila produkce kořenů a dále, že vzrostl obsah škrobu a karotenu v bramborech. Podle Kima a spol. [96] se ukázalo, že u vzorků brambor vypěstovaných na půdách s vyššími koncentracemi dusičnanů došlo k inhibici růstu kořenů brambor, ale nedošlo k ovlivnění růstu listů. Obsah škrobu v kořenech klesl, v listech nebyl ovlivněn.

Jacobsen a spol. [97] zkoumali, vztah mezi fosforylací škrobu v hlízách brambor a hnojivem obsahujícím fosfor. Brambory byly vypěstovány volně na poli a ve skleníku. Škrob u brambor z nehnoujené půdy na poli obsahovaly 15,6 nmol P.mg<sup>-1</sup> škrobu a na hnojené půdě s 30 kg P.ha<sup>-1</sup> byl naměřen obsah 20,6 nmol P.mg<sup>-1</sup> škrobu. Rozdíl v obsahu fosforu ve škrobu oproti kontrolní nehnoujené variantě činil přibližně 30 %. Na základě měření Westermanna a spol. [98] bylo zjištěno, že dusík a fosfor redukuje množství škrobu a sušiny v hlízách brambor. Vašák [99] ve své práci uvádí, že působením manganu na bramborovou rostlinu byl pozorován zvýšený obsah škrobu, což potvrdil i ve svých výsledcích. Mangan hraje důležitou úlohu při fotosyntéze, aktivuje některé enzymy a v biochemických funkcích je podobný hořčíku a může ho nahrazovat. Právě hořčík představuje podle Zrůsta [100] důležitý předpoklad pro tvorbu škrobu.

Podle Nody a spol. [101] mají na vlastnosti škrobu v bramborových hlízách významný vliv především rozdíly v jednotlivých kultivarech brambor. Lahký [102] zjistil, že významnými ukazateli obsahu škrobu jsou půdní a klimatické podmínky.



Vokál a spol. [103] se ve své vědecké práci zabývali, jaký vliv má odrůda a ročník na obsah a výnos celkového škrobu u odrůd určených pro výrobu škrobu. Ze čtyřletých výsledků je zřejmý statisticky vysoce významný vliv sledovaných odrůd a ročníku na úroveň hodnocených ukazatelů. Vliv odrůd se uplatnil zejména u obsahu škrobu. Charakter ročníku (zejména průběh počasí) se uplatnil u obou hodnocených ukazatelů, více však u výnosu škrobu.

## 5.2.2 Stanovení obsahu škrobu spektrofotometrickou metodou

### 1. Zjištění absorpčního spektra a kalibračních křivek

Před vlastní analýzou bylo nejprve provedeno měření, které mělo určit, při které vlnové délce je dosaženo absorpčního maxima. V tabulce č. 9 je uvedeno absorpční spektrum standardního roztoku škrobu při různých vlnových délkách a stáří anthronu. Pro přehlednost jsou výsledky znázorněny také v grafu (Graf 4). V grafu č. 5 jsou znázorněny kalibrační křivky škrobu s anthronovým roztokem různého stáří.

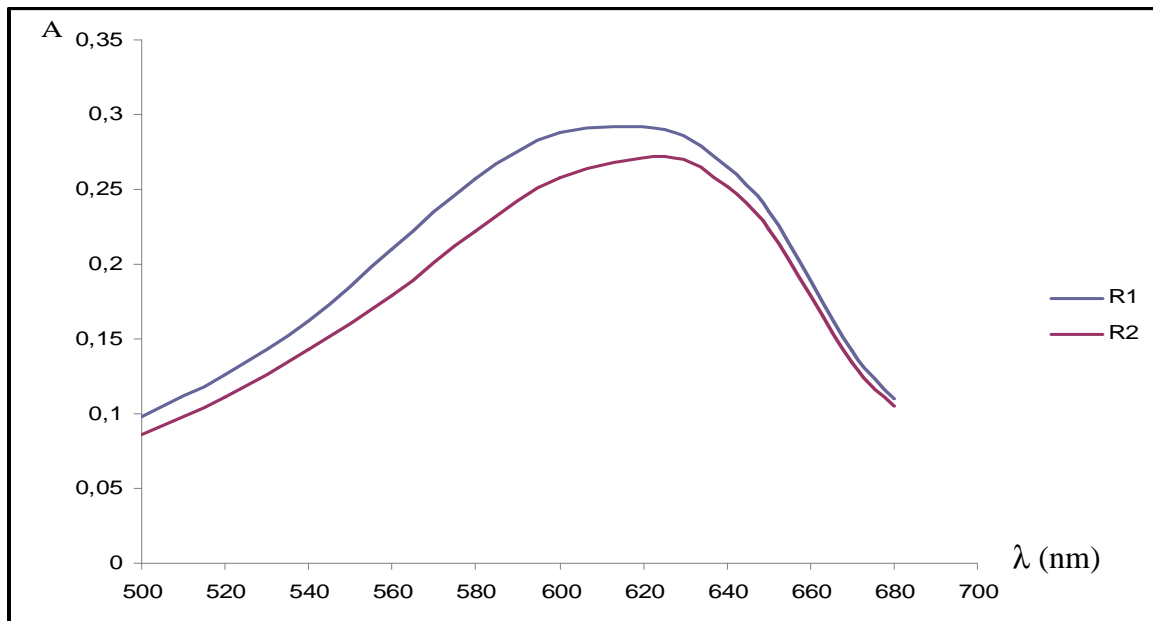
Někteří autoři [79, 80, 82] došli k závěru, že stáří anthronového roztoku má vliv na absorbanci, z tohoto důvodu byl použit anthronový roztok starý 5 hodin a 15 hodin. Tito autoři doporučují nepoužívat zcela čerstvý roztok, ale nechat ho alespoň 4 hodiny „uzrát“. Rovněž příliš starý roztok není vhodný, neboť se časem rozkládá a mění zbarvení z jasně žlutého na žlutohnědé.

Tab. 9 Absorpční spektrum standardního roztoku škrobu ( $400 \mu\text{g.ml}^{-1}$ )

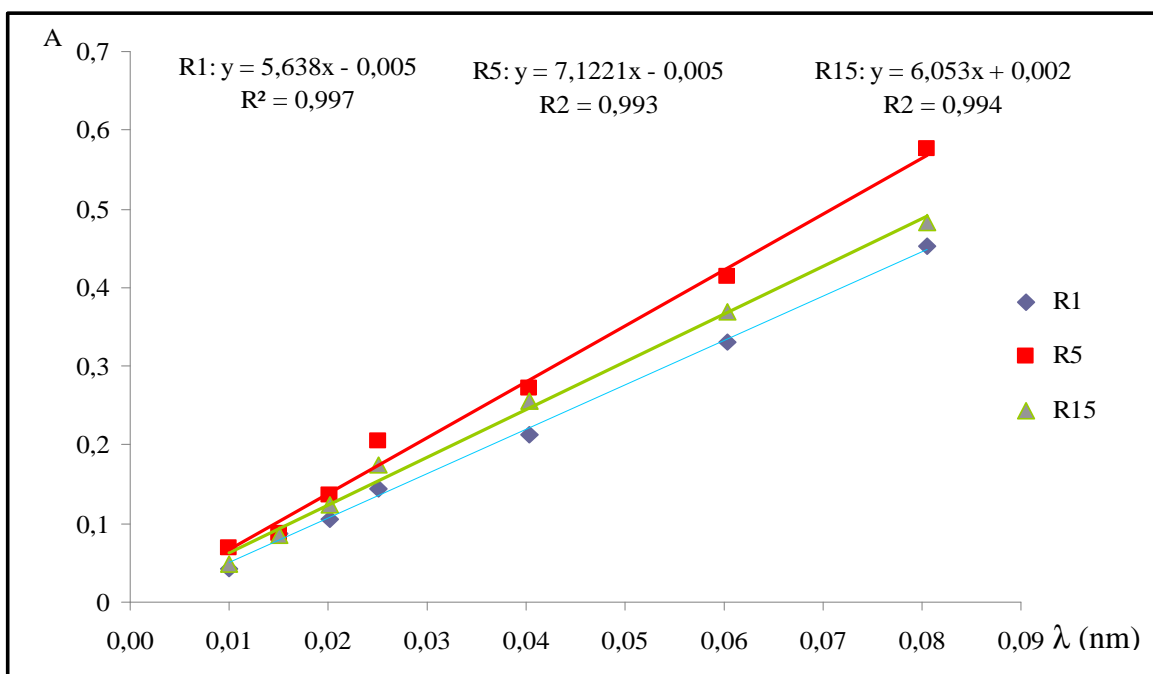
$\lambda$ (nm)	Absorbance	
	Aritmetický průměr $\pm$ S. D. (n = 6)	
	R1	R2
500	0,098 $\pm$ 0,003	0,086 $\pm$ 0,003
520	0,126 $\pm$ 0,005	0,111 $\pm$ 0,005
540	0,162 $\pm$ 0,009	0,143 $\pm$ 0,007
560	0,210 $\pm$ 0,010	0,179 $\pm$ 0,009
580	0,257 $\pm$ 0,011	0,222 $\pm$ 0,010
600	0,288 $\pm$ 0,012	0,258 $\pm$ 0,012
625	0,290 $\pm$ 0,012	0,272 $\pm$ 0,012
640	0,265 $\pm$ 0,012	0,252 $\pm$ 0,011
650	0,235 $\pm$ 0,011	0,223 $\pm$ 0,010
670	0,142 $\pm$ 0,007	0,134 $\pm$ 0,005
680	0,110 $\pm$ 0,003	0,105 $\pm$ 0,005

R1 – roztok anthronu, stáří 5 h, R2 – roztok anthronu, stáří 15 h

Graf 4 Absorpční spektrum



Graf 5 Kalibrační křivky standardních roztoků škrobu s použitím různě starých anthronových roztoků



R1 – roztok anthronu, stáří 1 h, R5 – roztok anthronu, stáří 5 h, R15 – roztok anthronu, stáří 15 h

Jak je zřejmé z grafu č. 4, absorpční maximum bylo nalezeno při 625 nm, a to jak v případě 15 hodinového, tak 5 hodinového starého anthronového roztoku. Tato vlnová délka byla dále používána při spektrofotometrickém stanovení obsahu škrobu. Pro stanovení se obvykle používá světlo té vlnové délky, při které je absorpce největší ( $\lambda_{\max}$ ), protože pak je stanovení nejcitlivější. Bylo také zjištěno, že u 5 hodinového starého anthronového roztoku byla absorbance vyšší než u anthronového roztoku starého 15 hodin.

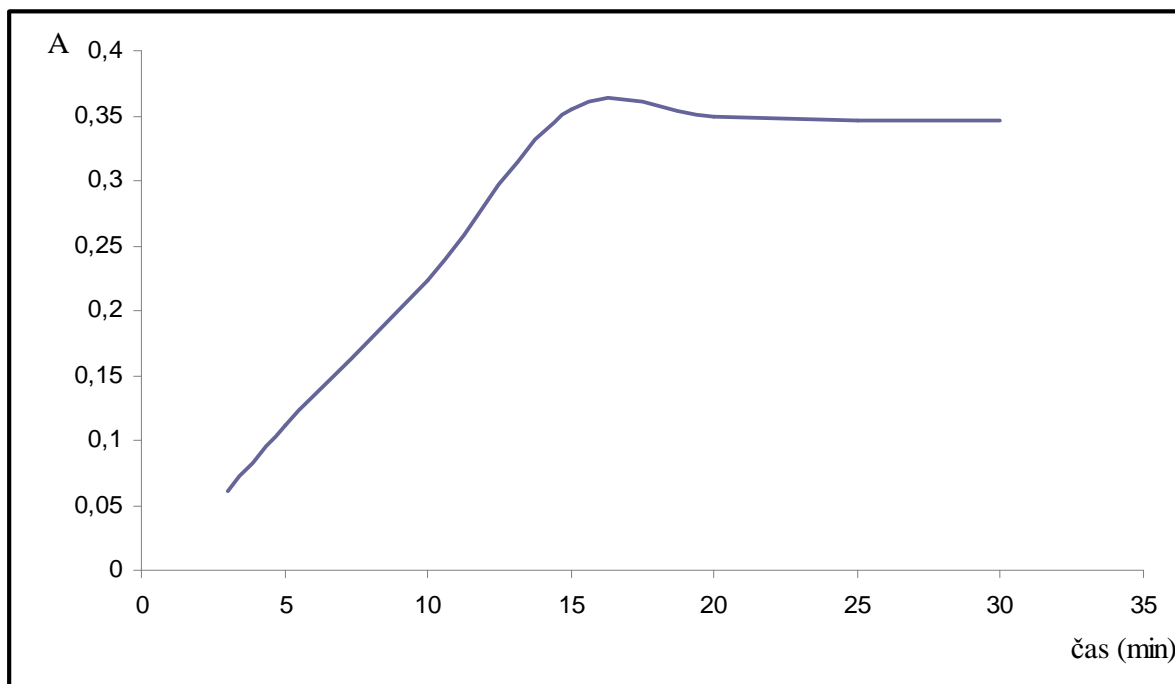
Stejný trend byl nalezen u celé kalibrační řady roztoků škrobů. Jak je patrné z grafu č. 5, je evidentní, že nejvyšších hodnot bylo dosaženo v případě použití anthronového roztoku starého 5 hodin, zatímco nejnižších hodnot bylo dosaženo při použití anthronu starého 1 hodinu. Z tohoto důvodu byl pro analýzu používán anthronový roztok starý 5 hodin.

## 2. Vliv doby hydrolýzy na hodnoty absorbance

Tabulka č. 10 a graf č. 6 udává jaký vliv má doba hydrolýzy škrobu na absorbanci (množství zjišťované glukosy).

*Tab. 10 Vliv doby hydrolýzy škrobu ( $400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) na absorbanci*

Doba (min.)	Absorbance
	Aritmetický průměr $\pm$ S. D. (n = 6)
3	0,061 $\pm$ 0,001
5	0,112 $\pm$ 0,003
10	0,223 $\pm$ 0,002
15	0,355 $\pm$ 0,021
20	0,349 $\pm$ 0,012
25	0,347 $\pm$ 0,005
30	0,347 $\pm$ 0,002

Graf 6 Vliv doby hydrolýzy na hodnoty absorpance (koncentrace škrobu  $400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )

Jak je patrné z grafu č. 6, nejvyšší hodnoty absorpance byly zjištěny v době 15 minut. Poté docházelo k jejímu mírnému poklesu a konstantnosti. Proto byla pro další měření použita doba 15 minut.

### 3. Stabilita komplexu anthron – škrob

V tabulce 11 je znázorněna stabilita barvy roztoku škrob – anthron.

Tab. 11 Stabilita barvy roztoku škrob ( $400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) – anthron

Doba (min)	Absorbance
	Aritmetický průměr $\pm$ S. D. (n = 6)
5	$0,347 \pm 0,004$
10	$0,342 \pm 0,006$
15	$0,344 \pm 0,023$
20	$0,347 \pm 0,004$
Doba (hod)	
1	$0,342 \pm 0,032$
5	$0,344 \pm 0,004$
10	$0,336 \pm 0,004$
15	$0,328 \pm 0,005$
20	$0,321 \pm 0,012$
25	$0,322 \pm 0,021$

Po zhodnocení výsledků lze konstatovat, že nejvyšší absorbance byla dosažena v době 5 minut. V průběhu času byl pozorován mírný pokles absorbance. V porovnání doby 5 minut a 25 hodin byl nalezen pokles o 7,2 %. Z tohoto důvodu byla u vzorků měřena absorbance ihned po ochlazení.

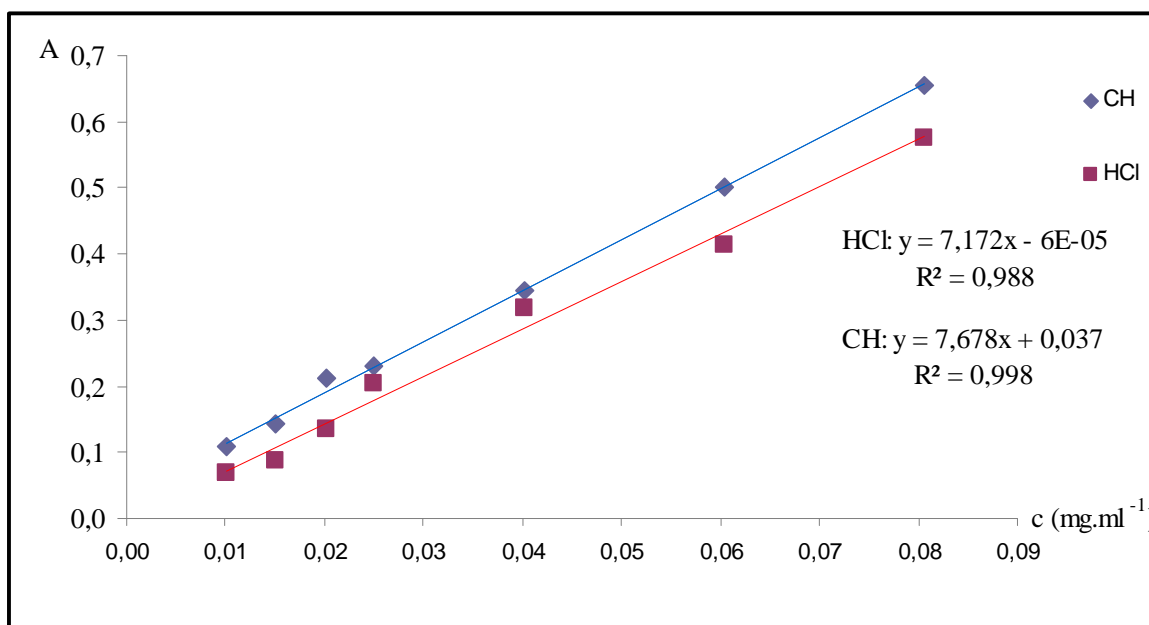
#### 4. Vliv koncentrace $H_2SO_4$ při přípravě anthronového roztoku

Vzhledem k tomu, že někteří autoři [79, 82] používají při přípravě anthronového roztoku 96%  $H_2SO_4$  a 72%  $H_2SO_4$ , byly obě tyto varianty aplikovány. Při použití roztoku anthronu v 72%  $H_2SO_4$  bylo pozorováno zakalení a vločkování roztoku. Anthronový roztok připraven z 96%  $H_2SO_4$  byl čirý a proto byl dále používán při analýze.

#### 5. Zhodnocení extrakčního činidla

V grafu č. 7 jsou znázorněny kalibrační křivky při použití chloralhydrátu a kyseliny chlorovodíkové jako extrakčního činidla.

Graf. 7 Kalibrační křivky v závislosti na typu extrakce



CH – pro hydrolýzu byl použit 1M roztok chloralhydrátu

HCl – pro hydrolýzu byl použit 0,422% roztok HCl

Grospietsch [82] uvádí, že při stanovování obsahu škrobu v rostlinném materiálu bývá největším problémem jeho extrakce. Nejčastěji se pro jeho převedení do roztoku

používá kyselé, nebo zásadité hydrolýzy pomocí kyseliny chlorovodíkové, chloristé, nebo hydroxidu draselného. Jinou, poměrně málo známou látkou, která velice dobře rozpouští škrob je chloralhydrát.

V pokusu byly použity jak 0,422% kyselina chlorovodíková, tak i 1M roztok chloralhydrátu. Jak je zřejmé z grafu č. 7 regresní rovnice při použití obou extrakčních činidel jsou srovnatelné. Vzhledem k tomu, že při práci s chloralhydrátem, který je toxický (R – věty 2536/38, S – věty 23 – 45) byla manipulace a činnost komplikovanější, neboť docházelo k vysrážení chloralhydrátu na stěnách zkumavky, byla pro další stanovení použita 0,422% kyselina chlorovodíková.

#### 6. Porovnání metody polarimetrické a spektrofotometrické

V tabulce 12 je uvedeno porovnání hodnot metody polarimetrické a metody spektrofotometrické.

Tab. 12 Obsah škrobu v % čerstvé hmoty stanovené příslušnými metodami

Název plodiny	Aritmetický průměr ± S. D.	
	M1 (n=3)	M2 (n=10)
Batáty	17,99 ± 0,02	16,81 ± 0,05
Maniok	26,26 ± 0,03	24,23 ± 0,02
Brambory	13,46 ± 0,15	13,21 ± 0,10
<i>Canna edulis</i>	13,94 ± 0,09	11,62 ± 0,03
<i>Mirabilis expansa</i> - bílá forma	21,69 ± 0,25	20,25 ± 0,02
<i>Mirabilis expansa</i> - červená forma	13,55 ± 0,12	12,76 ± 0,14
<i>Oxalis tuberosa</i>	10,59 ± 0,15	10,81 ± 0,11
Polyploid	*	2,35 ± 0,01
Bolivia	*	4,42 ± 0,02

M1 – polarimetrická metoda, M2 – spektrofotometrická metoda, \* neanalyzováno

Jak lze zjistit z tabulky 12, při porovnání metody polarimetrické a spektrofotometrické jsou výsledky srovnatelné. U mikrohlíz Polyploid a Bolivia bylo provedeno stanovení obsahu škrobu pouze metodou spektrofotometrickou, v důsledku malého množství vzorků. Jak je patrné, tyto mikrohlízy vykazovaly velmi nízký obsah škrobu, a to v rozmezí od 2,35 % do 4,42 %, což je i díky vysokému obsahu vlhkosti a samozřejmě i podmínek pěstování *in vitro*.

Sacharidy dávají při zahřátí s anthronem v roztoku s kyselinou sírovou charakteristické zelené zabarvení s píkem na 625 nm, které vzniká díky kondenzaci anthronu a furfuralových derivátů, které vznikly zahříváním v kyselině. Aktuálním reaktantem je enolový tautomer anthronu-anthronol. Zelené zbarvení může přecházet u koncentrovanějších roztoků do zabarvení modrého.

Původní procedura popsaná Pflúgerem [104] trvala 2 dny – již tehdy však byl použit univerzální postup hydrolýzy kyselinou sírovou a následné stanovení hexos jako redukujících cukrů. Good, Kramer a Somogyi [105] zkrátily délku metody na několik hodin. Mechanismus reakcí popsali Sattler a Zerban [106], Dreywood [107] ji použil na kvalitativní testy sacharidů a Morris [108] reakci první přizpůsobil ke kvantitativnímu stanovení sacharidů.

Viles a Silverman [79] analyzovali pomocí anthronového činidla škrob a celulosu. Používali 1% roztok anthronu a konstatovali, že roztok činidla je nestabilní, tmavne a že je nutno s každou sadou vzorků provádět kalibraci. Také uvádí, že teplo uvolněné při reakci kyseliny sírové a vodného roztoku vzorku je nezbytnou součástí metody. Ve své práci se také zabývají sledováním závislosti výsledků na době setrvání ve varné lázni a době chlazení vzduchem. Jako nejvhodnější způsob přidání činidla uvádí rychlé přidání a okamžité promíchání, přesto konstatují určitou neporovnatelnost tepelných rovnováh v jednotlivých zkumavkách.

Seifter a kol. [109] aplikoval metodu pro stanovení glykogenu ve zvířecích tkáních a zjistil, že interference proteinů je tak slabá, že reagent může být aplikován přímo do celé tkáně. Problém, který se vyskytoval v dřívějších pracích, a to vážné rozdíly ve výsledcích dokonce i u stejných čistých roztoků glukosy, byl přičítán závislosti reakce na teple uvolněném při přidání anthronového roztoku v kyselině k roztoku vzorku obsahujícímu vodu. Toto teplo nebylo konstantní ani u zkumavek stejných rozměrů. Seifter a kol. [109] ve své práci zavádí řešení: sada zkumavek je umístěna v ledové lázni, roztok anthronu také a jeho přidání ke vzorkům probíhá při současném třepání zkumavky v ledové lázni. Poté je celá sada naráz umístěna do varné lázně na 10 minut a pak zase ochlazena v ledové lázni. Delší setrvání ve varné lázni způsobuje pokles zabarvení. Takto vyvinuté zabarvení podléhá Beerovu zákonu a je stabilní několik hodin. Autor dokonce uvádí, že pokud je zabarvení tak syté, že nedovoluje spektrofotometrické měření (mnoho hexózy ve vzorku),

je možno po přidání příslušného objemu studeného roztoku vody a 2% anthronu (1:2) bez výrazných chyb znovu měřit absorbanci.

V mikrobiologických metodách [110] je použit podobný postup jako v práci Seifter a kol. [109]. Je použit 2% roztok anthronu v 75% kyselině sírové a malém množství ethanolu. Autoři používají jak standardní roztoky glukosy, tak promyté suspenze celých buněk bakterií či kvasinek. Využitelnost anthronové metody je také v papírové chromatografii sacharidů, zejména díky její citlivosti [111].

Hlavní výhodou anthronové metody je, že volná glukosa, její disacharidy a její polysacharidy dávají kvantitativně stejný barevný výtěžek na mol glukosy. Všechny dávají identickou zelenou barvu a jejich absorpční spektra mají hlavní jednoduchý pík na vlnové délce 625 nm. Pentosy a ribonukleové kyseliny dávají žlutozelenou barvu, která se ovšem vytvoří velice rychle během 2–3 minut a pak mizí, takže po 10 minutách ve varné lázni již není patrná. Hexosaminy, triosy, cukerné alkoholy a aminokyseliny kromě tryptofanu neinterferují při reakci hexos s anthronovým činidlem. Pokud je obsah sacharidů nízký (2–3 %) a nukleových kyselin vysoký (20 %), je pozorovatelné abnormální zabarvení reakčního produktu s píky 510 a 565 nm díky RNA a DNA.

Zajímavý objev učinili Juo a Stotzky [112]. Anthronová reakce prováděná na kořenových exudátech byla znemožněna přítomností dusičnanových solí z hnojiv. Ve vzorcích se vyskytovaly po přidání anthronu hnědé sraženiny a žluté zabarvení a to i v nízkých koncentracích dusičnanů (0,005M). Pokud je potřeba aplikovat anthronovou metodu na vzorky obsahující anorganické soli, musí být před reakcí odstraněny interferující dusičnany.

V článku Brink a kol. [113] je popisováno měření sacharidů v půdních hydrolyzátech. Vychází se z úvahy, že anthron reaguje s definovanou částí všech polysacharidů (hexosy) a tudíž může být použit pro relativní míru půdních polysacharidů, pokud při měření neinterferují nesacharidové složky v půdních hydrolyzátech. Půda byla vysušena, přesáta a půdní vzorky byly hydrolyzovány kyselinou sírovou. Roztok anthronu byl použit již standardně 0,2%. Autoři nepozorovali významnější interference nesacharidových látek. Chesire a Mundie [114], kteří aplikovali anthronovou metodu na půdní  $H_2SO_4$  hydrolyzát, také, uvádějí významné interference methylpentos, uronových kyselin, hexosaminů, ale žádné interference pentos.



Badalucco a kol. [115, 116] měřili s anthronem reagující složky v půdních extraktech 0,5M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Používali poměr 1 ml půdního extraktu a 5 ml 0,2% anthronu v 72% kyselině sírové. Shodně s Herbert a kol. [110] používali systém ledové, varné a opět ledové lázně. Nezaznamenávají žádnou interferenci pentos, ani hexosaminů ani dusičnanů. V této práci byla při přípravě anthronového roztoku použita 72% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Stejná koncentrace byla aplikována i v diplomové práci. Ale vzhledem k tomu, že docházelo k zakalení a vločkovatění, nebylo možno tento roztok používat při spektrofotometrickém měření.

### 7. Validace metody

Tato část se zabývá zhodnocením metod z hlediska schopnosti poskytnout při opakovaném měření stejný výsledek na stejném vzorku.

#### **Výsledky explorativní analýzy**

Testování v programu QC Expert s použitím jednorozměrné základní statistiky. Testování na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

*Tab. 13 Parametry a hodnoty analýzy*

	M1	M2
Aritmetický průměr	16,683	15,67
Spodní mez	11,501	11,044
Horní mez	21,865	20,015
Směrodatná odchylka	5,603	5,002
Rozptyl	31,392	25,015
Medián	13,94	13,21
Šikmost	0,684	0,725
Špičatost	2,133	2,096

M1 – polarimetrická metoda, M2 – spektrofotometrická metoda

#### **Validace metody**

Byl navržen model přímky  $y = \beta_0 + \beta_1 x$ . Použitím programu QC Expert byl navržen regresní model s následujícími charakteristikami.

*Tab. 14 Parametry regresního modelu*

Parametr	Odhad	S. D.	Závěr	Spočítán hlavní význam
$\beta_0$	1,450	0,788	Nevýznamný	0,163
$\beta_1$	0,871	0,042	Významný	$2,4 \cdot 10^{-4}$

Tab. 15 Statistické charakteristiky regrese

Vícenásobný korelační koeficient	0,997
Koeficient determinance	0,993
Predikovaný korelační koeficient	0,973
Střední kvadrat.chyba predikce, MEP	0,3247
Akaikeho informační kritérium, AIC	-5,044

**Zhodnocení kvality modelu**Test úsek

Intervalový odhad parametrů úseku  $\beta_0$

$$b_0 - t_{(1-\alpha/2)} \cdot \sqrt{D(b_0)} \leq \beta_0 \leq b_0 + t_{(1-\alpha/2)} \cdot \sqrt{D(b_0)}$$

$$-1,0569 \leq 3,9577$$

Tento interval obsahuje nulu, proto lze úsek považovat za nulový.

Test směrnice

Intervalový odhad parametrů směrnice  $\beta_1$

$$b_1 - t_{(1-\alpha/2)} \cdot \sqrt{D(b_1)} \leq \beta_1 \leq b_1 + t_{(1-\alpha/2)} \cdot \sqrt{D(b_1)}$$

$$0,7380 \leq 1,0038$$

Tento interval obsahuje jedničku, proto lze směrnici považovat za rovnu jedné.

Závěr: Výsledky spektrofotometrické metody se statisticky významně neliší od metody polarimetrické.

**Párové testování dvou metod**Porovnání dvou výběrůTest homogenity rozptylu

Počet stupňů volnosti (M2)	6
Počet stupňů volnosti (M1)	6
Tabulkový kvantil	4,284
Experimentální statistika	1,255

Závěr: Rozptyly se považují za shodné.

Test shody průměrů

Tabulkový kvantil

2,179

t-statistika

0,357

Závěr: Průměry se považují za shodné.

Výsledek: Na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  potvrzuje oboustranný klasický test shodu v rozptylech i průměrech. Výsledky spektrofotometrické metody se statisticky významně neliší od metody polarimetrické.

Závěr: Průměry se považují za shodné, test významnosti celkového vlivu – nevýznamný.

## ZÁVĚR

Škrob je bílý, ve studené vodě nerozpustný prášek. Jedná se o rezervní polysacharid, který tvoří v živých systémech zásobu energie, kterou lze uvolnit jeho odbouráním. Škrob některých rostlin slouží jako škrobárenská surovina a využívá se v mnoha průmyslových odvětvích, zvláště pak ve výrobcích ze škrobu.

Andské plodiny představují nevyužitelné zdroje škrobu, aminokyselin a ostatních nutričních faktorů a dále i přírodních pesticidů.

Skládá se ze dvou složek, které jsou po fyzikální a chemické stránce odlišné, tzv. amylosy a amylopektinu. Amylosa se v horké vodě rozpouští a prochází filtrem. Její roztoky jsou nestálé a snadno podléhají retrogradaci. Amylopektin je nerozpustný v horké vodě, jen bobtná, rosolovává a dává viskózní roztoky.

Pro stanovení monosacharidů a oligosacharidů jsou významné především reakce funkčních skupin s chemickými činidly na barevné nebo oxidační či redukční produkty a jejich detekce polarimetrií, spektrofotometrií nebo vizuální detekcí (titrační metoda), po vyčištění vzorku a oddělení rušivých složek. Pro stanovení složení polysacharidů je vhodné použít separační metody, ovšem vlastní hydrolyza polysacharidů je natolik obtížná, že se nejprve provede hydrolyza a stanoví se jednotlivé složky hydrolyzátu a z nich se zpětně určí struktura polysacharidů. Jednou z nejběžnějších titračních metod je nepřímé stanovení nezredukované mědi jodometricky podle Schoorla. Metoda se používá jako arbitrážní, zvláště v cukrovarnickém průmyslu, pro stanovení cukrů v potravinářských surovinách rostlinného původu. Další uplatnění nachází při stanovení laktosy v krmivech obsahujících více než 0,5 % laktosy. Z optických metod má největší význam polarimetrie, která se používá ke stanovení sacharosy v surovém cukru, melase a v cukrovarnických produktech, dále ke stanovení škrobu po jeho hydrolyze HCl v běžných potravinářských surovinách a potravinách obsahujících škrob. Nejúčinnějšími metodami pro kvalitativní a kvantitativní analýzu sacharidů jsou chromatografické metody. Pro běžnou analýzu sacharidů se používá HPLC, která umožňuje rychlejší a účinnější analýzu. HPLC metoda se používá nejčastěji pro stanovení laktosy, maltosy, sacharosy, glukosy, fruktosy a sorbitolu v potravinách.

Hlavním cílem diplomové práce bylo optimalizovat metody pro stanovení škrobu ve škrobnatých plodinách. Stanovení škrobu bylo provedeno metodou polarimetrickou

podle Ewerse a metodou spektrofotometrickou s využitím anthronu. Na základě tohoto měření je možno učinit tyto závěry:

- Nejvyšší hodnoty při stanovení vlhkosti vykazovaly mikrohlízy (Polyploid a Bolivia), naopak nejnižší byla u *Mirabilis expansa* – bílá forma.
- Při polarimetrickém stanovení škrobu s použitím specifické otáčivosti bramborového škrobu nejvyšších hodnot dosahoval maniok a *Mirabilis expansa* – bílá forma, u ostatních plodin byl obsah škrobu srovnatelný.
- Při porovnání výsledků s použitím specifické otáčivosti bramborového škrobu a zjištěné specifické otáčivosti konkrétních škrobů byly zjištěny významné odchylky s výjimkou bramborového škrobu.
- Při stanovení obsahu škrobu spektrofotometrickou metodou bylo nejdříve provedeno zjištění absorpčního spektra a kalibračních křivek. Absorpční maximum bylo zjištěno při 625 nm, v případě kalibrační řady roztoků škrobu bylo nejvyšších hodnot dosaženo při použití anthronového roztoku starého 5 hodin.
- Při zjišťování vlivu doby hydrolýzy škrobu na absorbanci, byly nejvyšší hodnoty zjištěny po době 15 minut.
- Při zjišťování stability komplexu anthron – škrob byla nejvyšší absorbance dosažena v době 5 minut.
- V případě hodnocení vlivu koncentrace  $H_2SO_4$  při přípravě anthronového roztoku byla zvolena 96%  $H_2SO_4$ .
- Při zhodnocení extrakčního činidla (HCl a chloralhydrátu) byla obě tato činidla srovnatelná, nicméně jako vhodnější činidlo bylo označeno HCl.
- Při stanovení obsahu škrobu spektrofotometrickou metodou byl nejvyšší obsah škrobu zjištěn u manioku a *Mirabilis expansa* – bílá forma, tak jako v případě stanovení polarimetrickou metodou.

Z výsledků pokusu vyplynulo, že metodu polarimetrickou a spektrofotometrickou při stanovování obsahu škrobu lze považovat za srovnatelné.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] TESTER, R. F., KARKALAS, J., QI, X. Starch-Composition, fine structure and architecture. *Journal of cereal Science*, 2004, vol. 39 (2), p. 151–165. ISSN: 0733-5210.
- [2] ŠÍCHO, V., *Potravinářská biochemie*, SNTL – Nakladatelství technické literatury, Praha 1969. 424 s. 04-801-69.
- [3] KOLBE, H. Einflussfaktoren auf die Inhaltsstoffe der Kartoffel: Zellwandverbindungen. *Der Kartoffelbau*, 1998, Deel 49, Nummer 5, p. 190–195. ISSN: 1013-739.
- [4] HRABĚ, J., BUŇKA, F., HOZA, I. *Technologie výroby potravin rostlinného původu*, Zlín, 2007. 190 s. ISBN 978-80-7318-520-6.
- [5] PELIKÁN, M., SÁKOVÁ, L. *Jakost a zpracování rostlinných produktů*, České Budějovice, 2001. 233 s. ISBN 80-7040-502-3.
- [6] *Polysacharidy a oligosacharidy* [on line]. [cit. 2010-15-1]. Dostupný z WWW: <http://naturstoff.sweb.cz/chemdir/polysach.html>.
- [7] LAURO, M., FORSSELL, P. M., SOURTTI, M. T., HULLEMAN, S. H. D., POUTANEN, K. S.  $\alpha$ -amylolysis of large barley starch granules. *Cereal Chemistry*, 1999, vol. 79 (6), p. 925–930. ISSN: 0009-0352.
- [8] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J. *Chemie potravin*, SNTL – Nakladatelství technické literatury, Praha, 1969. 632 s. 04-815-83.
- [9] ŠÍCHO, V., VODRÁŽKA, S., KRÁLOVÁ, B. *Potravinářská biochemie 2*, vyd. STNL Praha, 1981. 360 s.
- [10] CHANDRA, R., RUSTGI, R. Biodegradable polymers. *Progress in polymer science*, 1998, vol. 23 (7), p. 1273 – 1274. ISSN: 0079-6700.
- [11] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., BUDÍNSKÝ, P. *Potravinářská biochemie I*, UTB ve Zlíně 2006. 160 s. ISBN 80-7318-495-8.
- [12] VAN DER MAAREL, M. J. E. C., VAN DER VEEN, B., UITDEHAAG, J. C. M., LEEMHUIS, H., DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting

- enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 2002, vol. 94 (2), p. 137–155. ISSN: 0168-1656.
- [13] BULÉON, A., COLONNA, P., PLANCHOT, V., BALL, S. Starch granules: Structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1998, vol. 23 (2), p. 85–112. ISSN: 0141-8130.
- [14] DUDÁŠ, F. a kol. *Skladování a zpracování rostlinných výrobků*, SZN, Praha, 1981. 384 s. ISBN 07-083-81.
- [15] INGR, I. a kol. *Zpracování zemědělských produktů*, Mendlova zemědělská a lesnická univerzita, Brno, 2001. 249 s. ISBN 80-7157-520-8.
- [16] *Polysacharidy* [on line]. [cit. 2010-20-1]. Dostupný z WWW: [http://www.vscht.cz/zkp/ustav/skripta/AP/02/AP\\_6.pdf](http://www.vscht.cz/zkp/ustav/skripta/AP/02/AP_6.pdf).
- [17] MA, Y., CAI, CH., WANG, J., SUN, D. W. Enzymatic hydrolysis of corn starch for producing fat mimetics. *Journal of Food Engineering*, 2006, vol. 73 (3), p. 297–303. ISSN: 0260-8774.
- [18] NIGAM, P., SINGH, D. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme and Microbial Technology*, 1995, vol. 17 (9), p. 770–778. ISSN: 0141-0229.
- [19] VILIVALAM, V. D., ILLUM, L., IQBAL, K. Starch capsules: An alternative system for oral drug delivery. *Pharmaceutical Science and Technology Today*, 2000, vol. 3 (2), p. 64–69. ISSN: 1461-5347.
- [20] LÖRCKS, J. Properties and applications of compostable starch-based plastic material. *Polymer Degradation and Stability*, 1998, vol. 59 (1–3), p. 245–249. ISSN: 0141-3910.
- [21] *Nepotravinářské využití rostlinné produkce: Nepotravinářské využití škrobu* [on line]. [cit. 2010-22-1]. Dostupný z WWW: [http://home.zf.jcu.cz/~moudry/multif\\_zemedelstvi/frvs\\_pdf/10\\_vyuzitiRP.pdf](http://home.zf.jcu.cz/~moudry/multif_zemedelstvi/frvs_pdf/10_vyuzitiRP.pdf).
- [22] BURTON, W. G. The Potato. *Journal of Potato Research*, 1989, vol. 32 (4), p. 483–484. ISSN: 0014-3065.

- [23] PROCHÁZKA, S., MACHÁČKOVÁ, I., KREKULE, J., ŠEBÁNEK, J. a kol. *Fyziologie rostlin*. Academia Praha, 1998. 484 s. ISBN: 80-200-0586-2.
- [24] HUNNIUS, W. Welche Faktoren beeinflussen Stärkebildung und Stärkegehalt der Kartoffel? *Der Kartoffelbau*, 1972, Deel 17, Nummer 1, p. 1–4. ISSN: 1013-739.
- [25] ČESKÝ ŠKROBÁRENSKÝ SVAZ: *Pravidla správné výrobní a hygienické praxe pro výrobu škrobu* [on line]. [cit. 2010-26-1]. Dostupný z WWW: <http://www.google.cz/search?hl=cs&source=hp&q=technologie+pran%C3%AD+brambor&lr=&aq=f&oq=>.
- [26] KADLEC, P. *Technologie sacharidů*, VŠCHT, Praha 2000. 138 s. ISBN 80-7080-400-9.
- [27] *Obilniny* [on line]. [cit. 2010-27-1]. Dostupný z WWW: <http://www.sos-veseli.cz/download/Obilniny.ppt>.
- [28] KOUBOVÁ, Dana. *Čiřok místo kukuřice* [on line]. [cit. 2010-28-1]. Dostupný z WWW: <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=103&ch=1&typ=1&val=87086>.
- [29] GARTENBAU, E. H., SCHLENSTEDT, S. Energiepflanzen – es gibt viel mehr Alternativen als nur Mais. *Zeitschrift Gemüse*, 2008, 44. Jahrgang, Nummer 7, p. 49–50. ISSN: 0016-6286.
- [30] VONDRÁŠKOVÁ, Š. *Zrnový čiřok je slibný pro výrobu potravin a etanolu* [on line]. [cit. 2010-29-1]. Dostupný z WWW: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/en/default.asp?ch=67&typ=1&val=13142&ids=1058>.
- [31] SAYRE, R. *Super-sized cassava plants may help figur hunger in Africa* [on line]. [cit. 2010-30-1]. Dostupný z WWW: <http://researchnews.osu.edu/archive/suprtubr.htm>.
- [32] *Manioc stock photos and images. Cassava* [on line]. [cit. 2010-30-1]. Dostupný z WWW: <http://www.fotosearch.com/photos-images/manioc.html>.
- [33] *Food-info.net: Tropical roots and tubers: Cassava* [on line]. [cit. 2010-30-1]. Dostupný z WWW: <http://www.food-info.net/uk/products/rt/cassava.htm>.



- [34] BIGGS, M., McVICAR, J., FLOWERDEW, B. *The Complete Book of Vegetables, Herbs and Fruit*, 2004. 640 s. ISBN 1-85626-571-4.
- [35] *Batáty – sladké brambory* [on line]. [cit. 2010-1-2]. Dostupný z WWW: <http://ovoce.smejkalovi.cz/bataty.html>.
- [36] *Sweet potato* [on line]. [cit. 2010-2-2]. Dostupný z WWW: <http://aggie-horticulture.tamu.edu/plantanswers/vegetables/sweetpotato.html>.
- [37] *Sweet potatoes* [on line]. [cit. 2010-2-2]. Dostupný z WWW: <http://www.sweetpotatoes.com/>.
- [38] KRÁL, P. *Batáty – sladké brambory* [on line]. [cit. 2010-3-2]. Dostupný z WWW: <http://www.vareni.cz/trendy/bataty-sladke-brambory/>.
- [39] *Bezpečnost potravin – Tritikale* [on line]. [cit. 2010-4-2]. Dostupný z WWW: <http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=92031>.
- [40] SERNA-SALDIVAR, S. O., GUAJARDO-FLORES, S., VIESCA-RIOS, R.. Potential of Triticale as a Substitute for Wheat in Flour Tortilla Production. *Cereal Chemistry*, 2004, vol. 81 (2), p. 220–225. ISSN: 0009-0352.
- [41] FLORES, H. E., WALKER, T. S., BAIS, H. P., VIVANCO, J. M. Andean Root and Tuber Crops: Underground Rainbows. *HortScience*, 2003, vol. 38 (2), p. 161–167. ISSN: 0018-5345.
- [42] FLORES, H. E., FLORES, T. Biochemistry of plant storage. *Recent Advances in Phytochemistry*, 1997, vol. 31, p. 113–132. ISSN: 0079-9920.
- [43] National Research Council, 1989, *Lost Crops of the Incas: Little-Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation*. National Academy Press, Washington, D. C. p. 1–123 .
- [44] *Agricultural Research Service*. Dr. Duke's phytochemical and ethnobotanical database [on line]. [cit. 2010-4-2]. Dostupný z WWW: <http://www.ars-grin.gov/duke>.
- [45] SEMINARIO, J. El chago mauka (*Mirabilis expansa*) en Cajamarca, In: *Anales del VI Congreso Internacional de Cultivos Andinos, Suito, INIAP*, 1988, p. 251–264.

- [46] *Oxalis tuberosa*, *Ullucus tuberosus*, *Canna edulis*, *Mirabilis expansa* [on line]. [cit. 2010-4-2]. Dostupný z WWW: <http://images.google.cz/>.
- [47] VEGA, C. P. Cultivo de Olluco, IX Congreso Internacional de Cultivos Andinos, Cusco, Peru, 1997, p. 38–41.
- [48] BUSCH, J. M., SANGKETKIT, C., SABATE, G. P., MARTIN, R. J., HALLOY, S., DEO, B. Nutritional analysis and sensory evaluation of ulluco (*Ullucus tuberosus* Loz) grown in New Zealand. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, vol. 80 (15), p. 2232–2240. ISSN: 0022-5142.
- [49] International Potato Center Annual Report. Lost Andean roots and tubers travel ancient trade routes. Lima, Peru, 1994.
- [50] FRANCO, P., S., VEJARANO, J. El chago o Yuca Inca (*Mirabilis expansa*) Raiz Andian en Peligro de Extincion. Instituto Nacional de Investigacion Agraria, Cajamarca-Peru, 1996.
- [51] REA, J., LEON, J. La mauka (*Mirabilis expansa*) un aporte de la agricultura prehispanica de Bolivia. In: *Abales Cientificos de la Universidad Agraria La Molina, Lima*, 1965, p. 38–41.
- [52] KODET, J., ŠLECHTA, L., ŠTĚRBA, S. *Modifikované škroby*, VÚPP – Středisko technických informací potravinářského průmyslu, Praha, 1982. 167 s. ISBN 664.2.059.
- [53] HIXON R.M., SPRAQUE G.F. Waxy starch of maize and other cereals. *Industrial and Engineering Chemistry*, 1942, vol. 34 (8), p. 959–962. ISSN: 1226-086X.
- [54] KUBÁŇ, V., KUBÁŇ, P. *Analýza potravin*, 1. vyd. Brno, MZLU, 2007. 202 s. ISBN 978-80-7375-036.
- [55] DAVÍDEK, J. *Laboratorní příručka analýzy potravin*, 1. vyd. Praha, SNTL. 1977. 720 s. ISBN 04-814-81.
- [56] HÁLKOVÁ, J., RUMÍŠKOVÁ, M., RIEDLOVÁ, J.; *Analýza potravin. ÚJEZD U BRNA*, 2000. 102 s. ISBN 80-9027-753-5.
- [57] KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. *Laboratorní techniky biochemie, VŠCHT Brno*, 2005. 258 s. ISBN 80-7080-586-2.

- [58] NOVOTNÝ, F., *Metodiky chemických rozborů pro hodnocení kvality odrůd*, ÚKZÚZ Brno, 2006. 206 s. ISBN 80-86548-81-3.
- [59] NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi metod for the determination of glukose. *Journal of Biological Chemistry*, 1944, vol. 153, p. 375–380. ISSN: 0021-9258.
- [60] CLEGG, K.M. The application of the anthrone reagent to the estimation of starch in cereals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1956, vol. 7, p. 40–44. ISSN: 0022-5142.
- [61] OPEKAR F., JELÍNEK I. a kol. *Základní analytická chemie*. 1.vyd. Praha: Karolinum, 2003. 201 s. ISBN 80-246-0553-8.
- [62] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*, Pavel Klouda, Ostrava 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [63] CHURÁČEK, J., JANDERA, P. *Separace látek*, 2. vyd. Praha, STNL, 1986. 140 s. ISBN 05-033-86.
- [64] RUAS-MADIEDO P., DE LOS REYES-GAVILAN C G.: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 2005, vol. 88 (3), p. 843–856. ISSN: 0022-0302.
- [65] POTHIER, J., GALAND, N. Comparision of planar chromatographic methods (TLC, OPLC, AMD) applied to Essentials oils of wild thyme and seven chemotypes of thyme. *Il Farmaco*, 2001, vol. 56 (5–7), p. 505–511. ISSN: 0014-827X.
- [66] JEŽKOVÁ, V. *Stanovení prednisolonu po štěpení polymerních konjugátů*. Diplomová práce, Univerzita Pardubice, 2009. 68 s.
- [67] KARDOŠ, E., BEREK, D. *Základy kvapalinovej chromatografie*, 1. vyd. Bratislava Alfa, 1979. 269 s. ISBN 63-023-79.
- [68] *Metody HPLC* [on line]. [cit. 2010-3-3]. Dostupný z WWW: [http://www.tomcat.prf.jcu.cz/sima/vybrane\\_kapitoly/kapal\\_chrom\\_vyber.htm/](http://www.tomcat.prf.jcu.cz/sima/vybrane_kapitoly/kapal_chrom_vyber.htm/).

- [69] BÍLKOVÁ, K., KRÁLOVÁ, B. *Izolace biomakromolekul*, VŠCHT Praha, 1997. 206 s. S II 832.999.
- [70] *HPLC kolony Supelco* [on line]. [cit. 2010-11-3]. Dostupný z WWW: <http://www.labicom.cz/default.aspx?server=1&article=89&section=85>.
- [71] *Detectors and Detection Limits* [on line]. [cit. 2010-3-3]. Dostupný z WWW: <http://kerouac.pharm.uky.edu/asrg/hplc/detectors.html>.
- [72] ŠTULÍK, K. a kol. *Analytické separační metody*, Praha: Karolinum, 2005. 266 s. ISBN 80-246-0852-2.
- [73] RAMBLA, F., GARRIGUES, S. PLS-NIR determination of total sugar, glucose, fructose and sucrose in aqueous solutions of fruit juices. *Analytica Chimica Acta*, 1997, vol. 344 (1–2), p. 41–53. ISSN: 0003-2670.
- [74] *Český hydrometeorologický ústav* [on line]. [cit. 2010-3-3]. Dostupný z WWW: <http://www.chmi.cz/meteo/ok/okdat61.html>.
- [75] MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 1962, vol. 15 (3), p. 473–497. ISSN: 1399-3054.
- [76] ŠPATENKOVÁ, E. *In vitro cultures of Ullucus tuberosus*. Diplomová práce ITS-ČZU v Praze, KTSPA. 68 s.
- [77] Nařízení komise (ES) č. 152/2009 ze dne 27. ledna 2009, kterým se stanoví metody odběrů vzorků a laboratorního zkoušení pro úřední kontrolu krmiv.
- [78] SCOTT, T. A., MELVIN, E. H. Determination of Dextran with Anthrone. *Analytical Chemistry*, 1953, vol. 25, p. 1656–1661. ISSN: 1520-6882.
- [79] VILES, F. J., SILVERMAN, L. Determination of Starch and Celulose with Anthrone. *Analytical Chemistry*, 1949, vol. 21, p. 950–953. ISSN: 1520-6882.
- [80] YEMM, E. W., WILLIS, A. J. The Estimation of Carbohydrates in Plant Extracts by Anthrone. *Biochemical Journal*, 1954, vol. 57, p. 508–514. ISSN: 1470-8728.
- [81] HANSEN, J., MOLLER, I. Percolation of starch and soluble carbohydrates from plant tissue for quantitative determination with anthrone. *Analytical Biochemistry*, 1975, vol. 68, p. 87–94. ISSN: 0003-2697.

- [82] GROSPIETSCH, M. Stanovení rostlinného škrobu modifikovanou anthronovou metodou, s využitím chloralhydrátu jako rozpouštědla. *Methods in Plant Science*, 1997, s. 39–40.
- [83] ULBRICHT, G. *Qualitat von Speisekartoffeln*, Kartoffeltrends, Agrimedia, 2002, s. 8–11.
- [84] PROCHÁZKA, S. a kol. *Botanika – Morfologie a fyziologie rostlin*, MZLU Brno, 2002. 242 s. ISBN 80-7157-313-2.
- [85] PRUGAR, J. a kol. Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Praha, 2008. 327 s. ISBN 978-80-86576-28-2.
- [86] Katalog krmiv, česká akademie zemědělských věd, Komise výživy hospodářských zvířat, Ladislav Zeman, MZLU Brno, VÚVZ Pohořelice, 1995. ISBN 80-901598-3-4.
- [87] SRIROTH, K., SANTISOPASRI, V., PETCHALANUWAT, C., KUROTJANAWONG, K., PIYACHOMKWAN, K., OATES, C. G. Cassava starch granule structure – function properties influence of time and conditions at harvest on four cultivars of cassava starch. *Carbohydrate Polymers*, 1999, vol. 38 (2), p. 161–170. ISSN: 0144-8617.
- [88] PIYACHOMKWAN, K., CHOTINEERANAT, S., KIJKHUNASATIAN, CH., TONWITOWAT, R., PRAMMANEE, S., OATES, CH. G., SRIROTH, K. Edible canna (*Canna edulis*) as a complementary starch source to cassava for the starch industry. *Industrial Crops and Products*, 2002, vol. 16, p. 11–21. ISSN: 0926-6690.
- [89] CHIRINOS, R., BETALLELUZ-PALLARDEL, I., HUAMÁN, A., ARBIZU, C., PEDRESCHI, R., CAMPOS, D. HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa*) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. *Food chemistry*, 2009, vol. 113, p. 1243–1251. ISSN: 0308-8146.
- [90] MÍČA, B. Využití brambor a jejich produktů. In: Rybáček, V. a kol. *Brambory*, SZN Praha, 1988. 358 s.
- [91] MÍČA, B., VOKÁL, B. Bramborový škrob, jeho význam a podmínky v hlízách. *Bramborářství*, 1995, č. 3 (4), s. 11–14. ISSN: 1211-2429.

- [92] ZRŮST, J. Vliv vegetační doby, roků a modifikovaného prostředí na škrobnatost hlíz brambor. *Rostlinná výroba*, 1988, č. 34 (10), s. 1103–1110. ISSN: 0370-663X.
- [93] VOKÁL, B. Kvalita brambor jako podmínka konkurenceschopnosti. *Úroda*, 2004, č. 52 (9), s. 22–23. ISSN: 0139-6013.
- [94] ČÍŽEK, M. Ekonomika výroby brambor, In: Vokál, B. a kol. Pěstování brambor. *Agrospoj*, 2004, Praha, s. 243–248.
- [95] NOGUEIRA, F. D., DECARVALHO, V. D., GUIMARAES, P. T. G., DEPAULA, M. B. Liming and potassium fertilisation for sweet-potato, *Pesquisa Agropacuaria Brasileira*, 1992, vol. 27 (8), p.1129–1139. ISSN 0100-204X.
- [96] KIM, S. H., MIZUNO, K., SAWADA, S., FUJIMURA, T. Regulation of tuber formation and ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) in sweet potato (*Ipomoea batatas (L.) Lam.*) by nitrate. *Plant Growth Regulation*, 2002, vol. 37 (3), p. 207–213. ISSN 0167-6903.
- [97] JACOBSEN, H. B., MADSEN, M. H., CHRISTIANSEN, J., NIELSE, T. H. The degree of starch phosphorylation as influenced by phosphate deprivation of potato (*Solanum tuberosum L.*) plants. *Potato Research*, 1998, vol. 41 (2), p. 109–116. ISSN 0014-3065.
- [98] WESTERMANN, D., T., JAMES, D., W., TINDALL, T., A., HURST, R., L. Nitrogen and potassium fertilization of potatoes: sugars and starch. *American-Potato-Journal*, 1994, vol. 71(7), p. 433–453. ISSN 0003-0589.
- [99] VAŠÁK, J. Sledování vlivu manganu na výskyt strupovitosti a kvalitu brambor. Diplomová práce. 1. vyd. Brno, 1979, Vysoká škola zemědělská.
- [100] ZRŮST, J. Faktory ovlivňující obsah nutričně významných a škodlivých látek v hlízách a výrobcích z brambor, 2004. [on line]. [cit. 2010-14-4]. Dostupný z WWW: [www.phytosanitary.org](http://www.phytosanitary.org).
- [101] NODA, T., TAKAHATA, Y., SATO, T., IKOMA, H., MOCHIDA, H. Physicochemical properties of starches from purple and orange fleshed sweet potato roots at two levels of fertiliser. *Starch – Starke*, 1996, vol. 48 (11–12), p. 395–399. ISSN 0038-9056.

- [102] LAHKY, J. The influence of fertilisation, site and year on the yield and qualitative parameters of potatoes. *Rostlinná Výroba*, 1990, vol. 36 (8), p. 857–864. ISSN 0370-663X.
- [103] VOKÁL, B., DOMKÁŘOVÁ, J., DOLEŽAL, P., NOVOTNÝ, J. Vliv odrůdy a ročníku na obsah a výnos celkového škrobu u odrůd určených pro výrobu škrobu. *Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod*, 2008, č. 16, s. 137–148.
- [104] PFLÜGER, E. F. W. Das Glykogen und seine Beziehungen zur Zuckerkrankheit, Bonn, M. Hager, 1905. p. 53.
- [105] GOOD, C. A., KRAMER, H., SOMOGYI, M. The determination of glycogen. *Journal of Biological Chemistry*, 1933, vol. 100, p. 485, 1933. ISSN: 0021-9258.
- [106] SATTLER, L., ZEBRAN, F. W. *Journal of the American Chemical Society*, 1950, vol. 72, p. 3184–3188. In: Herbert D., Phipps P. J., Strange R. E. Chemical analysis of microbial cells. *Methods in Microbiology*, 1971, vol. 5, p. 242–328. ISSN: 0580-9517.
- [107] DREYWOOD, R. *Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition*, 1946, vol. 18, p. 499. In: Seifter, S., Dayton, S., Novic, B. and Muntwyler, E. The estimation of glycogen with the anthrone reagent. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1950, vol. 25, p. 191–200. ISSN: 0003-9861.
- [108] MORRIS, D. L. *Science*, 1948, vol. 107, p. 254–255. In: Herbert D., Phipps P. J. and Strange R. E. Chemical analysis of microbial cells. *Methods in Microbiology*, 1971, vol. 5, p. 242–328. ISSN: 0580-9517.
- [109] SEIFTER, S., DAYTON, S., NOVIC, B., MUNTWYLER, E. The estimation of glycogen with the anthrone reagent. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1950, vol. 25, p. 191–200. ISSN: 0003-9861.
- [110] HERBERT, D., PHIPPS, P. J., STRANGE, R. E. Chemical analysis of microbial cells. *Methods in Microbiology*, 1971, vol. 5, p. 242–328. ISSN: 0580-9517.
- [111] DIMLER, R. J., SCHAEFER, W. C., WISE, C. S., RIST, C. E. Quantitative paper chromatography of D-glucose and its oligosaccharides. *Analytical Chemistry*, 1952, vol. 24, p. 1411–1414. ISSN: 1520-6882.

- [112] JUO, P. S., STOTZKY, G. Interference by nitrate and nitrite in the determination of carbohydrates by anthrone. *Analytical Biochemistry*, 1967, vol. 21, p. 149–153. ISSN: 0003-2697.
- [113] BRINK, R. H., DUBACH, P., LYNCH, D. L. Measurements of carbohydrates in soil hydrolyzates with anthrone. *Journal of Soil Science*, 1960, vol. 89, p. 157–166. ISSN: 0361-5995.
- [114] CHESIRE, M. V., MUNDIE, C. M. The hydrolytic extraction of carbohydrates from soil by sulphuric acid. *Journal of Soil Science*, 1966, vol. 17, p. 372–381. ISSN: 0361-5995.
- [115] BADALUCCO, L., GELSOMINO, A., DE' ORCO, S., NANNIPIERI, P. Biochemical characterization of soil organic compounds extracted by 0,5M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> before and after chloroform fumigation. *Soil Biology and Biochemistry*, 1992, vol. 24, p. 569–578. ISSN: 0038-0717.
- [116] BADALUCCO, L., NANNIPIERI, P., GRECO, S. Microbial biomass and anthrone - reactive carbon in soils with different organic matter contents. *Soil Biology and Biochemistry*, 1990, vol. 22, p. 899–904. ISSN: 0038-0717.



**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

UDP	adenozindifosfátglukóza
UV	Ultraviolet Light, Ultrafialové záření
TLC	Thin Layer Chromatography, Chromatografie na tenké vrstvě
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Vysocéúčinná kapalinová chromatografie
TLC	Thin Layer Chromatography, Chromatografie na tenké vrstvě
LSC	Liquid-Solid Chromatography, adsorpční chromatografie
LLC	Liquis-Liquid Chromatography, rozdělovací (absorpční) chromatografie
GPC	Gel Permeation Chromatography, gelová (permeační) chromatografie
IEC	Ion-Exchange Chromatography, ionexová chromatografie
RI	Refractive Index Detector, refraktometrický detektor

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1.	Schématické znázornění amylosy .....	14
Obrázek 2.	Schématické znázornění amylopektinu .....	15
Obrázek 3.	Bramborový škrob .....	16
Obrázek 4.	Kukuřičný škrob .....	16
Obrázek 5.	Pšeničný škrob .....	16
Obrázek 6.	Biosyntéza škrobu.....	19
Obrázek 7.	Schéma výroby bramborového škrobu .....	21
Obrázek 8.	Schéma výroby pšeničného škrobu.....	22
Obrázek 9.	Schéma výroby kukuřičného škrobu.....	24
Obrázek 10.	Maniok.....	26
Obrázek 11.	Batáty.....	27
Obrázek 12.	<i>Oxalis tuberosa</i> .....	29
Obrázek 13.	<i>Ullucus tuberosus</i> .....	30
Obrázek 14.	<i>Canna edulis</i> .....	31
Obrázek 15.	<i>Mirabilis expansa</i> .....	31
Obrázek 16.	Schéma členění modifikovaných škrobů.....	33
Obrázek 17.	Obecné schéma kapalinového chromatografu.....	43
Obrázek 18.	<i>Mirabilis expansa</i> – červená.....	49
Obrázek 19.	<i>Mirabilis expansa</i> – bílá.....	49
Obrázek 20.	<i>Oxalis tuberosa</i> .....	50
Obrázek 21.	<i>Canna edulis</i> .....	50
Obrázek 22.	Batáty.....	50
Obrázek 23.	Maniok.....	50
Obrázek 24.	Polyploid.....	50

---

Obrázek 25.      Bolivia.....50

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1.	Nutriční hodnota andských plodin.....	29
Tabulka 2.	Podmínky hydrolýzy škrobu pro polarimetrické stanovení.....	40
Tabulka 3.	Srovnání předností HPLC a GC .....	42
Tabulka 4.	Charakteristika vybraných plodin.....	49
Tabulka 5.	Průměrné hodnoty vlhkosti (%).....	59
Tabulka 6.	Obsah škrobu v hlízách škrobnatých plodin s použitím specifické otáčivosti bramborového škrobu (%) .....	61
Tabulka 7.	Průměrné hodnoty specifické otáčivosti škrobů (%).....	62
Tabulka 8.	Obsah škrobu v hlízách škrobnatých plodin s použitím konkrétní specifické otáčivosti (%) .....	62
Tabulka 9.	Absorpční spektrum standardního roztoku škrobu ( $400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).....	65
Tabulka 10.	Vliv doby hydrolýzy škrobu ( $400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) na absorbanci.....	67
Tabulka 11.	Stabilita barvy roztoku škrob ( $400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) – anthron .....	68
Tabulka 12.	Obsah škrobu v % čerstvé hmoty stanovené příslušnými metodami.....	70
Tabulka 13.	Parametry a hodnoty analýzy.....	73
Tabulka 14.	Parametry regresního modelu.....	73
Tabulka 15.	Statistické charakteristiky regrese .....	74

**SEZNAM GRAFŮ**

Graf 1.	Obsah vlhkosti ve škrobnatých plodinách (%).....	59
Graf 2.	Obsah škrobu v hlízách škrobnatých plodin – spec. otáčivost bramborového škrobu (%).....	61
Graf 3.	Obsah škrobu v hlízách škrobnatých plodin – spec. otáčivost konkrétních škrobů (%).....	63
Graf 4.	Absorpční spektrum.....	66
Graf 5.	Kalibrační křivky standardních roztoků škrobu s použitím různě starých anthronových roztoků.....	66
Graf 6.	Vliv doby hydrolýzy na hodnoty absorbance.....	68
Graf 7.	Kalibrační křivky v závislosti na typu extrakce.....	69