

Agrotest fyto, s.r.o.



**Efektivní metodika stanovení obsahu β -glukanů v ječmenu,
jeho meziproduktech a vedlejších produktech**

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Kroměříž, 2017

Dedikace:

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu CK TAČR, č. TE02000177 „Centrum pro inovativní využití a posílení konkurenceschopnosti českých pivovarských surovin a výrobků“.

Autoři:

Ing. Ondřej Jirsa, Ph.D.	podíl 60 %
Ing. Irena Sedláčková	podíl 30 %
Ing. Kateřina Vaculová, CSc.	podíl 10 %

Agrotest fyto, s.r.o.
Havlíčková 2787/121
767 01 Kroměříž

Oponenti:

RNDr. Vladimír Erban, CSc.
Ing. František Kůst (Ministerstvo zemědělství ČR)

Abstrakt:

Metodika přináší uživatelům časově a finančně úspornější způsob stanovení obsahu β -glukanů v nativních zrnech obilovin, zejména ječmene, a produktech jejich zpracování, při zachování spolehlivosti.

Klíčová slova:

Obiloviny, ječmen, β -glukany, stanovení, enzymová metoda, GOPOD

Metodika byla certifikována Odborem rostlinných komodit Ministerstva zemědělství České republiky vydáním osvědčení č. 76275/2017 – 17221 ze dne 16. 1. 2018.

Vydal Agrotest fyto, s.r.o.
Kroměříž, únor 2018
ISBN 978-80-87555-16-3

Obsah

1. Cíl metodiky	4
2. Vlastní popis metodiky	4
2.1. Úvod	4
2.2. Principy stanovení obsahu β -glukanů	5
2.3. Princip enzymové metody	5
2.4. Vybavení a roztoky nového upraveného postupu	6
2.5. Postup stanovení podle upraveného postupu	7
2.6. Příklad aplikace upraveného postupu	9
3. Srovnání „novosti postupů“	11
4. Popis uplatnění Certifikované metodiky	11
5. Ekonomické aspekty	11
6. Seznam použité související literatury	12
7. Seznam publikací, které předcházely metodice	14

1. Cíl metodiky

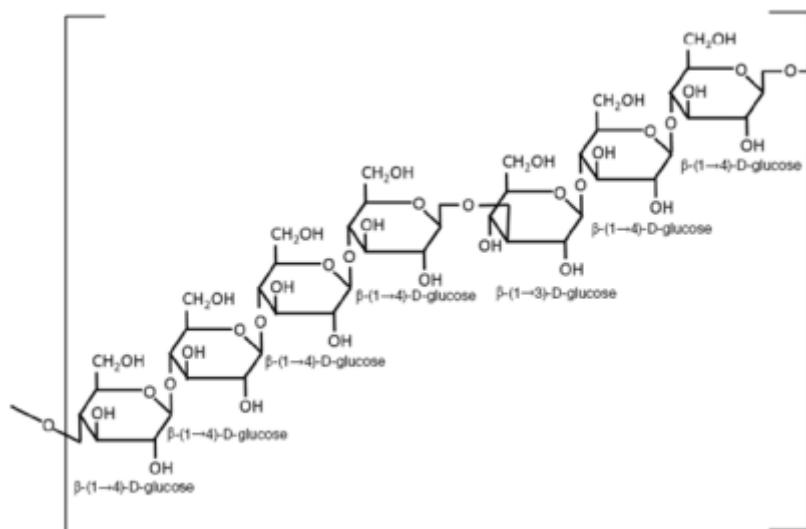
Ječmen je jednou ze světově nejrozšířenějších a nejvšestrannějších obilovin. Preferované využití ječmene je ve sladařství a pivovarství. Většina produkce ječmene je však využita pro krmení zvířat, kde jsou méně přísné požadavky na kvalitu. Uplatnění ječmene jako přímé potraviny pro lidi je stále omezené na oblasti s tradičními způsoby jeho využití, ale skýtá slibný rozvoj díky zdravotním benefitům vlákniny potraviny, v ječmenu zastoupené především ve vodě rozpustnými neškrobovými polysacharidy – β -glukany. Jejich obsah má také význam technologický a krmivářský. To vše vytváří požadavky na znalost jejich obsahu a tedy postupy jejich stanovení.

Cílem metodiky je poskytnout uživatelům pomůcku pro efektivní stanovení obsahu β -glukanů v obilovinách se zaměřením na ječmen, ať už přímo ve formě nativního zrna nebo produktů jejich zpracování.

2. Vlastní popis metodiky

2.1. Úvod

β -glukany jsou neškrobové polysacharidy tvořené nerozvětvenými řetězci glukopyranosových jednotek vázaných glykosidovými smíšenými vazbami β -(1,3),(1,4) nebo β -(1,3),(1,6). Jsou součástí buněčných stěn bakterií, hub, kvasinek, řas, lišejníků ((1,3),(1,6)- β -D-glukany) a vyšších rostlin ((1,3),(1,4)- β -D-glukany), ve větším množství se nacházejí v semenech některých obilovin (Velíšek 1999). Obsah β -glukanů závisí na obilovině, odrůdě, pěstebních a klimatických podmínkách. Ječmen a oves mají vyšší obsah β -glukanů (2,5 % až 8 %) než pšenice a žito (do 2 %), sladovnické odrůdy ječmene mají nižší obsah než speciální potravinářské odrůdy nahého ječmene. Chování β -glukanů ve vodě závisí na jejich struktuře, molekulové hmotnosti, teplotě, koncentraci. Rozpustnost klesá např. s vyšší molekulovou hmotností nebo s počtem β -(1 \rightarrow 4) vazeb, v řadě oves > ječmen > pšenice.



Obr. 1 Struktura (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -D-glukanů (Jacob et al., 2014)

2.2. Principy stanovení obsahu β -glukanů

Rostoucí zájem o zjišťování obsahu β -glukanů souvisí také s rozvojem metod pro jejich stanovení. Bylo publikováno několik metod pro jejich stanovení (Hozová et al., 2007). Důležitý je výběr vhodné extrakční techniky, protože může ovlivnit kvalitu, strukturu, reologické vlastnosti, molekulovou hmotnost a další funkční vlastnosti extrahovaných β -glukanů (Ahmad et al., 2012). V současnosti jsou nejvíce používané McClearyho enzymatická metoda (Megazyme) a metoda průtokové vstříkovací analýzy (FIA).

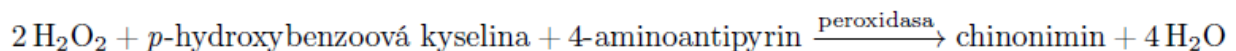
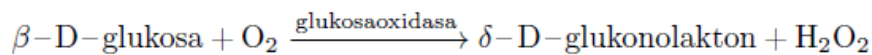
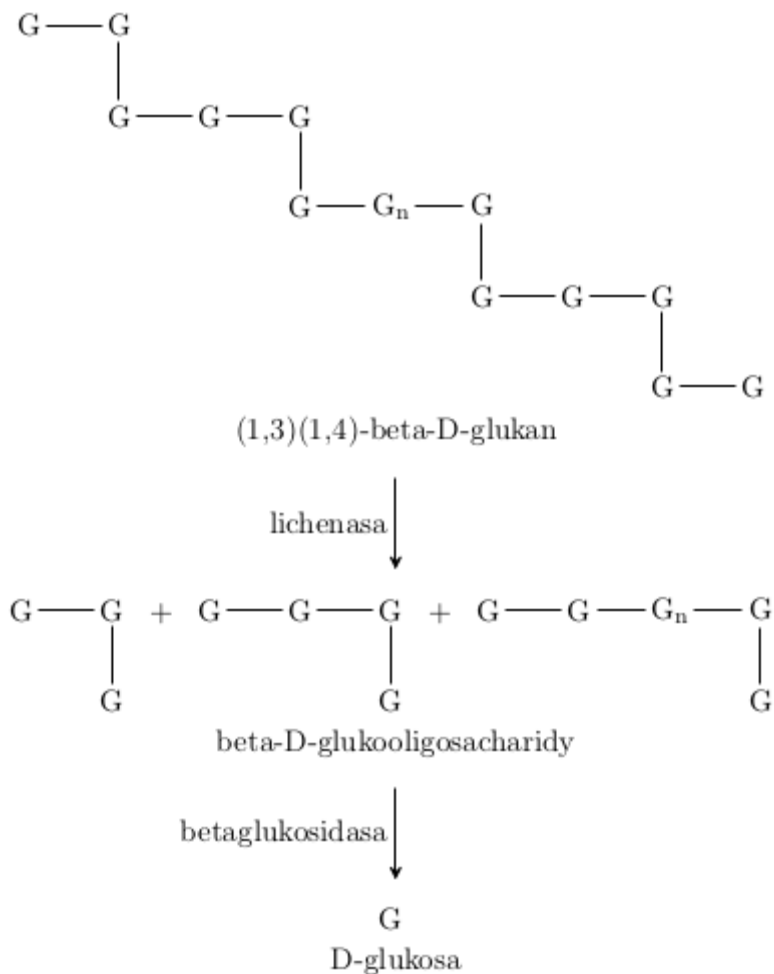
Tabulka 1. Přehled metod stanovení β -glukanů a jejich použití

Metoda	Zdroj
enzymová (Megazyme)	McCleary a Glennie-Holmes, 1985; McCleary a Codd, 1991; Hu a Burton (2008); Motilva et al. (2014)
enzymová / FIA	Jensen et al., (1981); Jørgensen (1988); Wu et al. (2008)
enzymová / chromatografická	Pérez-Vendrell et al. (1995); Pérez-Vendrell et al. (1996); Johansson et al. (2004)
enzymová / jiná	Åman and Hesselman (1985); Carr, et al. (1990); Saulnier et al. (1994)
NIR	Czuchajowska et al. (1992); Szczodrak et al. (1992); Synytsya et al (2010)

2.3. Princip enzymové metody

Tato metoda byla publikována v roce 1985 (McCleary a Glennie-Holmes, 1985) a zůstává celosvětově standardním postupem pro měření β -glukanů se smíšenými vazbami v ječmenu, sladu, sladidě a ovsu (Cauvain and Young, 2009). McCleary a Codd (1991) zjednodušili komerčně dostupnou enzymatickou metodu kvantitativního měření (1,3),(1,4)- β -D-glukanu. Jejich zlepšení byla dosažena bez ztráty přesnosti a správnosti a se zvýšením spolehlivosti. Činidlo s obsahem glukosaoxidas/ peroxidasy bylo výrazně upraveno, aby byla zajištěna barevná stabilita po dobu až 1 hodiny po vývoji. Některé problémy, které se vyskytly s původní metodou, byly řešeny a vyřešeny a byly navrženy a provedeny další experimenty prokazující kvantitativní povahu testu.

Zjednodušená β -glukanová metoda (metoda Megazyme) byla úspěšně hodnocena AOAC International (metoda 995.16), AACC (metoda 32-23.01) a ICC (metoda č. 166, schválená 1998). Tato metoda určuje kvantitativní (1,3),(1,4)- β -D-glukan (β -D-glukan se smíšenými vazbami) a je použitelná na zrna obilovin, jejich mleté produkty a potraviny na bázi obilovin obsahující vysokou hladinu glukózy po předběžné extrakci vodným ethanolem. Metoda je rychlý postup pro přímé, kvantitativní měření (1,3),(1,4)- β -D-glukanu (β -D s použitím velmi čisté lichenasy a β -glukosidas). β -D-glukan je specificky hydrolyzován lichenasou na oligosacharidy, které se pak kvantitativně štěpí na glukosu pomocí β -glukosidas. Glukosa se měří pomocí pufované směsi glukosaoxidas a peroxidasy (Cauvain and Young, 2009).



Obr. 2 Schéma enzymového stanovení obsahu β -glukanů se smíšenými vazbami.

2.4. Vybavení a roztoky nového upraveného postupu

Přístrojové a materiální vybavení

Spektrofotometr (510 nm) pro mikrotitrační destičky, odstředivka, vodní lázeň, inkubátor (50 °C), laboratorní mlýn se sítím 0,5 mm, vortexová třepačka a další běžné laboratorní vybavení (váhy, mikropipety, filtry, polypropylenové zkuševky, aj.)

Sodný fosfátový pufr (20 mM, pH 6,5)

3,12 g dihydrogenfosforečnanu sodného ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) se rozpustí v 900 ml destilované vody a pH se upraví na 6,5 přidáním 100 mM roztoku hydroxidu sodného (4 g/l) (je třeba cca 50 ml). Objem se doplní do 1 l. Přidá se 0,2 g azidu sodného.

Sodný octanový pufr (50 mM, pH 4,0)

2,9 ml ledové kyseliny octové se přidá k 900 ml destilované vody a pH se upraví na 4,0 přidáním 1 M roztoku hydroxidu sodného (4 g/l). Objem se doplní do 1 l. Přidá se 0,2 g azidu sodného.

Sodný octanový pufr (200 mM, pH 4,0)

11,6 ml ledové kyseliny octové se přidá k 900 ml destilované vody a pH se upraví na 4,0 přidáním 1 M roztoku hydroxidu sodného (4 g/l). Objem se doplní do 1 l. Přidá se 0,2 g azidu sodného.

Lichenasa (200 µl, 50 U/ml)

Roztok lichenasy [specifická, endo-(1-3)(1-4)-β-D-glukan 4-glukanohydrolasa] (1 ml).

Obsah lahvičky 1 (lichenasa) se zředí na 20,0 ml 20 mM fosfátovým pufr (pH 6,5).

β-Glukosidasa (100 µl, 0,2 U) v 50 mM sodném octanovém pufru

Roztok β-glucosidasy (1 ml).

Celý obsah lahvičky 2 (β-glukosidasa) se zředí na 20,0 ml 50 mM octanovým pufr (pH 4,0).

GOPOD (150 µl)

Pufr činidla GOPOD. Pufr (50 ml, pH 7,4), *p*-hydroxybenzoová kyselina a azid sodný (0,095 % w/v).

Obsah lahvičky 3 (pufr činidla GOPOD) se zředí na 1 l destilovanou vodou (toto je roztok 3).

Obsah lahvičky 4 se rozpustí ve 20 ml roztoku 3 a kvantitativně se přeneso do lahvičky obsahující zbytek roztoku 3.

2.5. Postup stanovení podle upraveného postupu

Příprava vzorku

Vzorek obiloviny nebo potravinového výrobku (cca 50 g) se semele na vhodném centrifugačním mlýnku se sítím 0,5 mm.

Jednoduchá extrakce

Tento postup je vhodný pro vzorky nezpracovaného zrna obilovin.

Přesně zvážený připravený vzorek (100±20 mg) se přidá do centrifugační zkumavky (objem cca 15 ml), sklepnutím se zajistí, že na stěnách ulpělý podíl propadne na dno.

Vzorek se navlhčí 200 µl 50% vodného roztoku etanolu (v/v) pro usnadnění disperse, přidají se 4 ml fosfátového pufru (20 mM, pH 6,5) a obsah se zamíchá na vortexové třepačce.

Po zamíchání se zkumavka vloží do vroucí vodní lázně a inkubuje se dobu 60 s, energicky se zamíchá na vortexové třepačce, inkubuje se při 100 °C další 2 minuty a opět se zamíchá.

Zkumavka s obsahem se inkubuje při 50 °C a ponechá se 5 min na ustavení rovnováhy.

Extrakce s předextrakcí

Při analýze β -glukanů ve vařených, opékaných a extrudovaných cereálních výrobcích by měl být vzorek předextrahován vodným roztokem etanolu pro odstranění volných cukrů a snížení hladiny tuků a olejů.

Přesně zvážený vzorek (~200 mg) se přidá do centrifugační zkumavky (objem cca 15 ml), sklepnutím se zajistí, že na stěnách ulpělý podíl propadne na dno.

Přidá se 5 ml 50% vodného roztoku etanolu (v/v) a inkubuje se ve vroucí vodní lázni po dobu 5 min. Obsah se zamíchá na vortexové třepačce a přidá se dalších 5 ml 50% vodného roztoku etanolu (v/v), zamíchá se.

Zkumavky se odstředí 10 min při 1800 g (cca. 3000 ot/min), supernatant se odstraní.

Zbylá peleta se resuspenduje 5 ml 50% vodného roztoku etanolu (v/v), obsah se zamíchá na vortexové třepačce a přidá se dalších 5 ml 50% vodného roztoku etanolu (v/v), znovu se zamíchá, odstředí se a supernatant se odstraní (jako v předchozím kroku).

Peleta se suspenduje ve 4 ml fosfátového pufru (20 mM, pH 6,5) a zkumavka s obsahem se inkubuje při 50 °C po dobu 5 min.

Štěpení β -glukanů

Přidá se 200 μ l lichenasy a obsah zkumavky se promíchá. Zkumavka se uzavře parafilmem a inkubuje se při 50 °C s pravidelným energickým promícháním (tj. 3-4 krát) na vortexové třepačce nebo lépe v lázni s kontinuálním třepáním.

Přidá se 5 ml octanového pufru (200 mM, pH 4,0) a obsah se energicky zamíchá na vortexové třepačce.

Zkumavka se ponechá 5 min při pokojové teplotě na ustavení rovnováhy a odstředí se (1,000 g, 10 min).

Opatrně a přesně se oddělí alikvoty (100 μ l) do připravených jamek 1. mikrotitrační destičky. Do dvou z těchto jamek (reakčních) se přidá 100 μ l β -glucosidasy (0,2 U) v 50 mM octanovém pufru (pH 4,0), do třetí (slepé) jamky 100 μ l 50 mM octanového pufru (pH 4,0).

Destička se nechá inkubovat v termostatu při 50 °C po dobu 10 min.

Stanovení glukosy

Do připravených jamek 2. mikrotitrační destičky se odeberou alikvotní podíly (10 μ l). Přidá se činidlo GOPOD (150 μ l).

Destička se nechá inkubovat v termostatu při 50 °C po dobu 20 min.

Změří se absorbance při 510 nm.

Kontrolní vzorky

Do každé řady stanovení se zahrnují v duplikátech slepý vzorek a standard D-glukosy v množství 50 μ g a/nebo 100 μ g. Slepý vzorek na první destičce tvoří 100 μ l destilované vody + 100 μ l

octanového pufru. Glukosový standard na první destičce tvoří 100 µl octanového pufru + 100 µl D-glukosového standardu (50 µg/ml nebo 100 µg/ml).

Do každé řady stanovení by se měl zahrnout alespoň jeden vzorek standardní ječné mouky se známým obsahem β-glukanů.

Snížení navážky vzorku

Množství D-glukosy přítomné ve zkumavce (tj. ve 100 µl analyzovaného vzorku) by mělo činit 4 až 100 µg. Roztok vzorku před přidáním β-glucosidasy se musí dostatečně zředit 200 mM octanovým pufrům k dosažení koncentrace mezi 0,04 a 1,0 g/l, která je ekvivalentní přibližně 0,35 a 8,5 % β-glukanů v původním vzorku. Např. pokud vzorek obsahuje 20 % β-glukanů, měl by se 3krát zředit 200 mM octanovým pufrům před oddělením alikvotů pro inkubaci s β-glucosidasou.

Pro vzorky s vysokým obsahem β-glukanů lze alternativně snížit velikost vzorku na 50 mg a objem nastavit na 100 ml 200 mM octanovým pufrům po ošetření lichenasou.

2.6. Příklad aplikace upraveného postupu

Po odstředění zkumavek v centrifuze (MPW-350R, MPW MED. INSTRUMENTS) byly 100 µl alikvotní podíly přeneseny do jamek 96-ti jamkové mikrotitrační destičky. Uspořádání na destičce bylo takové, že jeden sloupec tvořily slepé vzorky a dva sloupce reakční vzorky a dále se situace opakovala. Mezi vzorky byl zařazen glukosový standard, standardní vzorek ječmene a kontrolní vzorek. Po přidání octanového pufru a β-glucosidasy a jemném zatřepání byla první destička inkubována 10 min v termostatu (Q-CELL 60, POL-LAB) při 50 °C. Po vytažení byly přeneseny 10 µl alikvoty do druhé destičky ve stejném uspořádání a přidáno 150 µl činidla GOPOD. Po jemném zatřepání se nechala druhá destička inkubovat v termostatu při 50 °C dalších 20 min. Po vytažení byla změřena absorbance na spektrofotometru (MRX II, DYNEX Technologies). Hodnoty reakčních absorbancí byly zkorigovány na slepé vzorky a obsah β-glukanů byl vypočítán podle původního protokolu.

Teoretická spotřeba roztoků na destičkách činí v závislosti na počtu glukosových kontrol (GK):

1 GK: 3,4 ml octanový pufr, 3,0 ml β-glucosidasa, 14,4 ml GOPOD

4 GK: 4,0 ml octanový pufr, 2,4 ml β-glucosidasa, 14,4 ml GOPOD

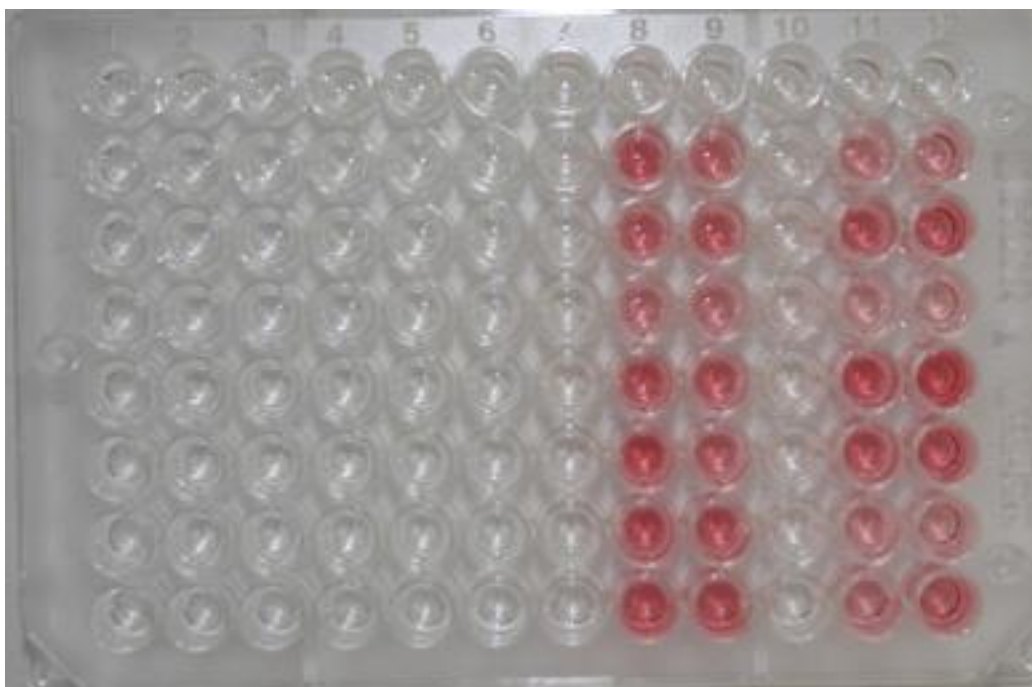
Pro ověření postupu a srovnání s původní metodou byly použity vzorky nativního a máčeného zrna ječmene, mlecí frakce ječmene a extrudované výrobky.

Tabulka 2 Porovnání výsledků získaných upraveným a původním postupem

Soubor	Počet vzorků	Rozsah hodnot	R ²
zrno ječmene	33	2,8 – 7,6	0,98
výrobky z ječmene	10	3,4 – 5,2	0,96
mlecí frakce ječmene	24	1,3 – 8,7	0,98



Obr. 3 Plně obsazená 96-ti jamková mikrotitrační destička po barevné reakci. Čtyři bezbarvé sloupce představují slepé vzorky, v horním řádku se střídá voda (slepý vzorek) a dvě glukosové kontroly (100 $\mu\text{g/ml}$).



Obr. 4 96-ti jamková mikrotitrační destička po barevné reakci s polovičním počtem vzorků. V levé polovině byla provedena reakce s β -glukosidasou, v pravé barevná reakce s činidlem GOPOD.

3. Srovnání „novosti postupů“

Enzymová metoda pro stanovení β -glukanů je široce používaná od svého vzniku v roce 1985 a stala se průmyslovým standardem díky tomu, že je přesná a spolehlivá. Na druhé straně však mohou být omezující relativně vyšší náklady a nižší výkonnost při větších sériích vzorků. Z těchto důvodů bylo navrženo při zachování spolehlivosti několik způsobů úprav standardní metody, které však nebyly standardizovány. Náš modifikovaný protokol přináší časově a finančně úspornější způsob enzymového stanovení β -glukanů s využitím 96-ti jamkových mikrotitračních destiček a přináší jej v ucelené podobě odborné veřejnosti.

4. Popis uplatnění Certifikované metodiky

Zájem společnosti na zvyšování kvality stravy včetně výrobků z obilovin (výroba pečiva) a produktů sladovnického a pivovarského průmyslu vede k potřebě znalosti nutriční hodnoty nejen výchozích surovin, ale i meziproduktů a produktů jejich zpracování. Kvůli zaměření pozornosti na míru příznivého vlivu výživy na zdraví lidí se stále častěji sleduje i zastoupení bioaktivních látek, ke kterým patří β -glukany. Prezentovaná metodika rozšiřuje aplikaci enzymové metody hodnocení obsahu β -glukanů, především pro hodnocení velkých souborů vzorků. Nově navržený postup je tak vhodný pro využití na pracovištích nejrůznějšího typu, přes akademická až po praktické provozy, které se zabývají sledováním obsahu rozpustné vlákniny v potravinářských produktech na bázi obilovin. Budoucími uživateli metodiky mohou být univerzity či výzkumná a šlechtitelská pracoviště, kde ji mohou uplatnit při řešení výzkumných projektů, v šlechtitelských programech k hodnocení šlechtitelských materiálů a pro urychlení selekčního procesu tvorby nových genetických zdrojů a odrůd. Metodika najde rovněž uplatnění při popisech a charakterizaci genových zdrojů na pracovištích zabývajících se vedením a udržováním genofondů obilovin. Uvedený postup lze úspěšně aplikovat i v potravinářském průmyslu pro hodnocení vstupních surovin nebo výrobků.

5. Ekonomické aspekty

Metoda vyžaduje v zásadě běžné laboratorní vybavení, tj. mikrotitrační destičky, pipety, vortexovou třepačku, odstředivku a spektrofotometr. Metoda vychází z protokolu Megazyme pro stanovení β -glukanů v obilovinách a cereálních výrobcích. Navrženými úpravami v nové metodice jsou sledovány finanční a časové úspory oproti výchozímu postupu.

V původní metodice představují cenově významnou provozní položku použité chemikálie. V novém postupu je úspora dosažena především u činidla GOPOD, kdy se používá 5 % původního množství (150 μ l proti 3 ml). To znamená, že při ceně balení 185 € / 660 analýz je vyčíslená úspora nákladů na chemikálie při 1000 analýzách již 266 €, tedy cca 20 Kč (0,8 €) na jeden vzorek. Dále je zde i nezanedbatelná časová úspora (cca 20 min) díky možnosti využití multikanálové pipety a měření absorbance až pro 32 vzorků najednou. Skutečná míra úspor je vždy ovlivněna konkrétním provedením, tj. počtem kontrolních vzorků, efektivitou využití roztoků a materiálu, zručností, ztrátami atd.

6. Seznam použité související literatury

- Åman, P., Hesselman, K., 1985: An enzymic method for analysis of total mixed-linkage β -glucans in cereal grains. *J. Cereal Sci.*, 3(3): 231-237.
- Carr, J. M., Glatter, S., Jeraci, J. L., Lewis, B. A., 1990: Enzymic determination of β -glucan in cereal-based food products. *Cereal Chem.*, 67(3): 226-229.
- Cauvain, S. P., Young, L. S., 2009: *The ICC Handbook of Cereals, Flour, Dough & Product Testing: Methods and Applications*. Lancaster DEStech Publications. ISBN: 978-1-932078-99-2.
- Czuchajowska, Z., Szczodrak, J., Pomeranz, Y., 1992: Characterization and Estimation of Barley Polysaccharides by Near-Infrared Spectroscopy. I. Barleys, Starches, and Beta-D-Glucans. *Cereal Chem.*, 69(4): 413-418.
- Hozová, B., Kuniak, L., Moravčíková P., Gajdošová A., 2007: Determination of water-insoluble β -d-glucan in the whole-grain cereals and pseudocereals. *Czech J. Food Sci.*, 25: 316–324.
- Hu, G., Burton, Ch., 2008: Modification of standard enzymatic protocol to a cost-efficient format for mixed-linkage (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4)- β -D-glucan measurement. *Cereal Chem.*, 85(5): 648-653.
- Jacob, J. P., Pescatore, A. J., 2014. Barley β -glucan in poultry diets. *Ann. Transl. Med.*, 2(2):20. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.01.02.
- Jensen, S. Å., Aastrup, S., 1981: A fluorimetric method for measuring 1,3:1,4- β -glucan in beer, wort, malt and barley by use of Calcofluor. *Carlsberg Res. Commun.*, 46(1): 87–95.
- Johansson, L., Tuomainen, P., Ylinen, M., Ekholm, P., Virkki, L., 2004: Structural analysis of water-soluble and -insoluble β -glucans of whole-grain oats and barley. *Carbohydr. Polym.*, 58(3): 267-274.
- Jørgensen, K. G., 1988: Quantification of high molecular weight (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)- β -d-glucan using Calcofluor complex formation and flow injection analysis. I. analytical principle and its standardization. *Carlsberg Res. Commun.*, 53(5): 277.
- McCleary, B. V., Glennie-Holmes, M., 1985: Enzymic quantification of (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 4)- β -D-glucan in barley and malt. *J. Inst. Brew.*, 91(5): 285–295.
- McCleary, B. V., Codd, R., 1991: Measurement of (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -D-glucan in barley and oats: A streamlined enzymic procedure. *J. Sci. Food Agric.*, 55(2): 303–312.
- Mixed-linkage beta-glucan. Assay procedure (McCleary method). K-BGLU 02/17. Megazyme, 2017. https://secure.megazyme.com/files/Booklet/K-BGLU_DATA.pdf
- Motilva, M.-J., Serra, A., Borrás, X., Romero, M.-P., Domínguez, A., Labrador, A., Peiró, L., 2014: Adaptation of the standard enzymatic protocol (Megazyme method) to microplaque format for β -(1,3)(1,4)-D-glucan determination in cereal based samples with a wide range of β -glucan content. *J. Cereal Sci.*, 59(2): 224–227.
- Pérez-Vendrell, A. M, Guasch, J., Francesch, M., Molina-Cano, J. L., Brufau, J., 1995: Determination of β -(1–3), (1–4)-D-glucans in barley by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 718(2): 291-297.

- Pérez-Vendrell, A. M., Brufau, J., Molina-Cano, J. L., Francesch, M., Guasch, J., 1996: Effects of cultivar and environment on β -(1,3)-(1,4)-D-glucan content and acid extract viscosity of Spanish barleys. *J. Cereal Sci.*, 23(3): 285–292.
- Saulnier, L., Gévaudan, S., Thibault, J.-F., 1994: Extraction and partial characterisation of β -glucan from the endosperms of two barley cultivars. *J. Cereal Sci.*, 19(2): 171-178.
- Szczodrak, J., Czuchajowska, Z., Pomeranz, Y., 1992: Characterization and Estimation of Barley Polysaccharides by Near-Infrared Spectroscopy. II. Estimation of Total Beta-D-Glucans. *Cereal Chem.*, 69(4): 419-423.
- Synytsya, A., Budilová, E., Čopíková, J., 2010: *Metodika třídění a výběru ječmene s odlišným obsahem neškrobových polysacharidů využitím FT-IR a FT-NIR*. Certifikovaná metodika. VŠCHT Praha. ISBN: 978-80-7080-770-5.
- Wu, J., Deng, X., Tian, B., Wang, L., Xie, B., 2008: Interactions between oat β -glucan and calcofluor characterized by spectroscopic method. *J. Agric. Food Chem.*, 56(3): 1131-1137.
- Wrigley, C. W., Batey, I. L., 2010: *Cereal Grains. Assessing and Managing Quality*. Abington Hall, Woodhead Publishing. 520 s. ISBN: 978-1-84569-563-7; 978-1-84569-952-9.
- Wu, J., Deng, X., Tian, B., Wang, L., Xie, B., 2008: Interactions between oat β -glucan and calcofluor characterized by spectroscopic method. *J. Agric. Food Chem.*, 56(3): 1131-1137.

7. Seznam publikací, které předcházely metodice

Jirsa, O., Sedláčková, I., Vaculová, K., 2018: Quantification of β -glucans in barley – review. *Kvasný průmysl*, 64(1). (v tisku)

Jirsa, O., Vaculová, K., Sedláčková, I., 2017: Hodnocení vlastností mlecích frakcí nahého ječmene. Sborník příspěvků – XLVII. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, Skalský Dvůr u Bystřice nad Pernštejnem, 22.–24. 5. 2017. VŠCHT, Praha, VÚPP, Praha, 2017, s. 86–89. [online] ISSN 1802-1433.

Vaculová K., Sedláčková I., Jirsa O., Sluková M., Skřivan P., 2017: Changes in chemical composition and nutritional properties of wholemeal flours from different barley materials due to controlled germination. Pages 302-306 in: Proceedings of the 13th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience: 8 - 10 November 2017, Prague, Czech Republic. Prague, Czech Chemical Society. Editors: Řápková, R., Čopíková, J., Šárka, E. ISBN 978-80-86238-74-6, ISSN 2336-6796.

Vaculová K., Sedláčková I., Jirsa O., Bajerová E., 2016: The influence of controlled germination on the content of selected nutrients in grain and milling fractions of barley for prospective human consumption. Pages 283-287. In: Proceedings of the 12th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience: 19th-21st October 2016, Prague, Czech Republic. Prague, Czech Chemical Society. Editors: Řápková, R., Čopíková, J., Šárka, E. ISBN 978-80-86238-59-3, ISSN 2336-6796.

Vaculová, K., Jirsa, O., Balounová, M., Sedláčková, I., 2012: Evaluation of chemical and technological properties of grain and milling fractions of hullless barley for bakery use. p. 467-473. In Komlenić, D.K. (ed.): Proceedings of the 6th International congress FLOUR-BREAD '11, Opatija, Croatia, 12-14 October 2011, University of Osijek, Faculty of Food technology Osijek, 2012, ISSN 1848-2562.