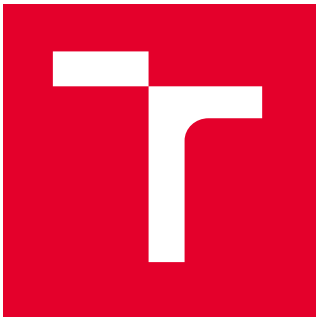


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VYUŽITÍ ODPADNÍHO LIGNOCELULÓZOVÉHO MATERIÁLU Z POTRAVINÁŘSKÉHO PRŮMYSLU

UTILIZATION OF WASTE LIGNOCELLULOSIC MATERIAL FROM THE FOOD INDUSTRY

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE — Ing. Zuzana Slavíková

AUTHOR

ŠKOLITEL — doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.

SUPERVISOR

BRNO 2024

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

Zadání dizertační práce

Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	Akademický rok: 2024/25
Studentka:	**Ing. Zuzana Slavíková**	
Studijní program:	Potravinářská chemie	
Studijní obor:	bez specializace	
Vedoucí práce:	**doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.**	

Název dizertační práce:

Využití odpadního lignocelulózového materiálu z potravinářského průmyslu

Zadání dizertační práce:

1. zpracujte literární rešerši zabývající se problematikou lignocelulozových materiálů a rostlinných proteinů
2. navrhněte a ověřte možnosti izolace proteinů z pšeničných otrub
3. otestujte možnosti využití proteinového izolátu z pšeničných otrub v potravinářském průmyslu

Termín odevzdání dizertační práce: :

Ing. Zuzana Slavíková studentka	doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D. vedoucí práce	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc. vedoucí ústavu

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

V Brně dne

ABSTRAKT

Tato dizertační práce je zaměřena na udržitelné zhodnocení pšeničných otrub, konkrétně se věnuje izolaci jejich proteinové frakce a její následné využití při výrobě potravin s vysokým obsahem bílkovin. Pšeničné otruby jsou lignocelulózový materiál složený primárně z polysacharidů, obsahují přibližně 18 % bílkovin. Byla vyvinuta a ověřena technologie pro izolaci proteinů pomocí metody pH-shift, pomocí které bylo možné získat proteinový koncentrát s 83% čistotou. Výtěžnost technologie se pohybovala okolo 9 g/100 g otrub. Podmínky izolačního procesu neměly vliv na frakcionaci proteinů, jejich molekulová hmotnost byla shodná s proteiny v pšeničných otrubách. Izolovaný protein disponuje kompletním aminokyselinovým profilem, i když s nižšími hladinami esenciálních aminokyselin (zejména lysinu) ve srovnání s živočišnými proteiny. Izolací proteinů bylo dosaženo významného zvýšení jejich stravitelnosti (93 %) oproti bílkovinám v pšeničných otrubách. Dále byly ověřeny aplikace proteinu izolovaného z otrub při výrobě vysokoproteinového jogurtu a pečiva, u kterých byly sledovány především změny v textuře produktu, chuti a přijetí spotřebiteli. Velkoobjemové ověření izolační technologie odhalilo nezbytnost účinného odstřeďování pro produkci proteinových prášků s maximální čistotou. Zjištění podporují potenciál pšeničných otrub jako alternativního zdroje bílkovin, který může přispět jak k ekonomickému růstu, tak k udržitelnosti životního prostředí při výrobě potravin.

KLÍČOVÁ SLOVA

Pšeničné otruby, proteinový koncentrát, vysokoproteinové potraviny

OBSAH

1 ÚVOD 3
2 TEORETICKÁ ČÁST 4
2.1 Pšeničné otruby jako zástupce lignocelulózových materiálů 4
2.1.1 Složení pšeničných otrub 4
2.1.2 Biorafinace pšeničných otrub 6
2.2 Využití rostlinných proteinů v potravinářství 7
2.2.1 Nutriční význam rostlinných proteinů 7
2.2.2 Metody izolace proteinů z rostlinných materiálů 9
2.2.3 Vysokoproteinové potraviny 9
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 11
3.1 Charakterizace pšeničných otrub a proteinového materiálu z pšeničných otrub . 11
3.2 Izolace proteinové frakce z pšeničných otrub 11
3.3 Velkoobjemová izolace proteinové frakce z pšeničných otrub 12
3.4 Aplikace proteinového koncentrátu z pšeničných otrub v potravinářství 13
4 VÝSLEDKY A DISKUZE 15
4.1 Charakterizace pšeničných otrub 15
4.2 Izolace proteinové frakce z pšeničných otrub 16
4.3 Charakterizace proteinového materiálu z pšeničných otrub 18
4.4 Transfer technologie izolace proteinů z pšeničných otrub do poloprovozních podmínek 20
4.5 Aplikace proteinového koncentrátu z pšeničných otrub v potravinářství 20
5 ZÁVĚR 23
6 CITACE 25

1 ÚVOD

Udržitelný rozvoj je základní ideologií pro zajištění ekonomického růstu, ochrany životního prostředí a sociální spravedlnosti. Jednou z aktuálních priorit udržitelného rozvoje je šertné, avšak efektivní využívání přírodních zdrojů se zaměřením na vodu, nerostné suroviny, ale i potraviny a zemědělství. Právě udržitelný rozvoj v zemědělství a v potravinářství může vést k řešení problémů s hladem, chudobou, změnou klimatu nebo se ztrátou biodiverzity. Využívání lignocelulózových materiálů z potravinářského průmyslu, které jsou často označovány za odpad, lze zařadit do postupů, které jsou v souladu s principy udržitelného rozvoje. Efektivní zhodnocení lignocelulózových materiálů může vést jak k podpoře ekonomiky díky produkci hodnotných výrobků, tak k ochraně životního prostředí díky redukci množství vznikajícího odpadu.

Lignocelulózové materiály jsou tvořeny převážně ligninem, celulózou a hemicelulózami a vyskytují se zejména v zemědělských residuích, v lesním odpadu nebo v potravinářských sekundárních produktech, jako jsou například pšeničné otruby. Valorizace lignocelulózových materiálů představuje jejich transformaci na hodnotné produkty, která je však možná pouze na základě navržené a ověřené technologie. Mezi ekonomicky nejvýhodnější možnosti valorizace lignocelulózových materiálů patří technologie pro produkci biopaliv, které se věnuje již několik evropských biorafinerií. Lignocelulózové materiály lze však využít také v potravinářském průmyslu, kde může být ceněná zejména jejich proteinová frakce.

Právě pšeničné otruby (PO) jsou lignocelulózovým odpadním materiálem s relativně vysokým zastoupením proteinů (18 %). PO jsou sekundárním produktem zpracování pšeničných zrn, od pšeničného endospermu jsou odstraněny v průběhu mletí. Pšeničné otruby jsou v dnešní době běžně používané pro krmné účely, v menší míře také pro lidskou výživu. Velké množství PO je však využíváno nejméně preferovanými technikami v rámci hierarchie nakládání s odpady. Vzhledem ke složení pšeničných otrub může být však potenciál jejich uplatnění v potravinářství vyšší, mohou být považovány za alternativní zdroj bílkovin.

V souladu s udržitelným rozvojem se v potravinářství zvyšuje popularita rostlinných proteinů. Jejich produkce výrazně méně ovlivňuje životní prostředí než produkce bílkovin živočišných. Rostlinné proteiny však mohou mít vzhledem k jejich nutričním vlastnostem oproti živočišným řadu nevýhod – často nejsou plnohodnotným zdrojem esenciálních aminokyselin a jejich stravitelnost může být ovlivněna přítomností antinutričních látek. Izolací proteinů z rostlinných materiálů lze jejich nutriční vlastnosti zlepšit, je ale také získán produkt – proteinový izolát, který je ekonomicky mnohem hodnotnější než jeho původní zdroj.

Proteinové izoláty už dávno nejsou konzumovány pouze sportovci za účelem nárůstu svalové hmoty. Stále více roste obliba vysokoproteinových potravin nejrůznějšího druhu, jako například vysokoproteinového pečiva, mléčných výrobků nebo trvanlivých výrobků (těstoviny, tyčinky apod.). Přídavek proteinů do potraviny však může ovlivnit jak senzorické vlastnosti výrobku, tak postup výroby v závislosti na jejich původu, složení nebo metodě izolace. Proto jsou receptury a technologie vysokoproteinových výrobků vyvíjeny tak, aby byly nutričně přínosné, ale zároveň také pozitivně hodnoceny spotřebiteli.

V rámci této dizertační práce byla vyvinuta a ověřena technologie pro izolaci proteinů z pšeničných otrub – lignocelulózového materiálu považovaného za alternativní zdroj bílkovin. Bylo charakterizováno chemické složení a nutriční vlastnosti proteinového izolátu z pšeničných otrub. Získaný proteinový izolát byl také použit pro vývoj pečiva a jogurtů se zvýšeným obsahem proteinů.

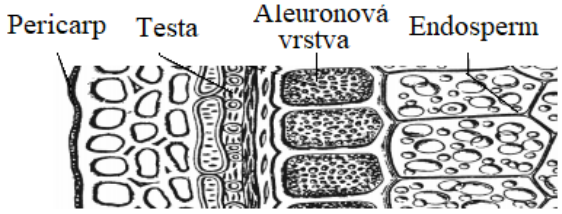
2 TEORETICKÁ ČÁST

Lignocelulóza je jedním z nejzastoupenějších organických materiálů na Zemi. Je zejména součástí dřeva, ale i materiálů, které jsou produkovány potravinářským průmyslem (sláma, otruby apod.). Vzhledem k jejich různorodému složení je možné tyto materiály využít také jako alternativní zdroje proteinů. Rostlinné proteiny mají díky svým jedinečným vlastnostem své uplatnění v potravinářském průmyslu. Jejich využití nepřináší pouze nutriční benefity, ale má také ekologický přesah. Lze je využít například pro produkci masových analogů nebo vysokoproteinových potravin.

2.1 Pšeničné otruby jako zástupce lignocelulózových materiálů

Lignocelulóza je organický materiál, který tvoří až 50 % světové biomasy. Tvoří ji 3 základní složky – celulóza, lignin a hemicelulóza. Nejvíce je lignocelulóza zastoupená ve dřevě či slámě, její jednotlivé složky však můžeme nalézt v každé rostlinné hmotě. Každoročně celosvětově přibude přes 180 miliard tun lignocelulózového materiálu, okolo 8 miliard tun je dále využito zejména jako palivo nebo krmivo. Jelikož se ovšem jedná o obnovitelný zdroj, je tento materiál také slibnou surovinou pro výrobu ekonomicky hodnotnějších produktů. Nevýhodu pro zpracování lignocelulózy však prozatím představuje její složitá struktura [1].

Mezi jeden z nejvíce zastoupených lignocelulózových potravinářských odpadů patří také pšeničné otruby. Jejich roční celosvětová produkce se pohybuje kolem 150 mil tun. Pšeničné otruby vznikají jako vedlejší produkt v mlýnském průmyslu při mletí pšeničných zrn. Tvoří asi 13–17 % hm. zrna. Skládají se z aleuronové a hyalinní vrstvy, testy a vnitřního a vnějšího perikarpu, mohou obsahovat také zbytky klíčků [2]. Tyto vrstvy se mezi sebou liší svou mikrostrukturou (obrázek 1) a také chemickým složením. Zatímco perikarp je tvořen zejména nerozpustnou vlákninou, aleuronová vrstva je bohatá na proteiny, rozpustné oligosacharidy a mnohé bioaktivní látky [3].



Obrázek 1 Obalové vrstvy pšeničného zrna [3]

Otruby jsou oddělovány od zbytku zrna v procesu mletí, které se nejčastěji provádí pomocí série válcových stolic, vyšší účinnosti se dosahuje nastavením rozdílných rychlostí otáčení, šířky mlecí spáry nebo povrchem jednotlivých válců. Cílem je maximální vymletí endospermu ze zrna a později z obalových vrstev [4]. Zrna se před mletím také často kondiciují – namáčí, což vede ke zvýšení elasticity obalových vrstev, které poté lépe odolávají mechanickému tlaku a mohou být efektivně odděleny [2].

2.1.1 Složení pšeničných otrub

Chemické složení pšeničných otrub závisí na odrůdě pšenice, podmínkách jejího pěstování a způsobu a kvalitě zpracování zrn. Obecně obsahují pšeničné otruby vysoké množství vlákniny, reprezentované zejména celulózou, ligninem a hemicelulotickými xylany, galaktany a fruktany (34-63 %), na které jsou dále vázané proteiny. V rozpustné vláknině se poté nachází ještě glukany a xylany [5]. Obsah lipidů v otrubách je závislý na množství s nimi

zpracovávaných klíčků. Otruby jsou také bohaté na minerální látky, hlavně železo, zinek, mangan, hořčík, a fosfor, který se ovšem vyskytuje převážně ve formě fytátů. Jejich komplexy s Fe, Zn a Mg poté způsobují biologickou nedostupnost takto vázaných minerálů [2]. Složení pšeničných otrub obohacuje zejména aleuronová vrstva. Ze všech obalových vrstev pšeničného zrna obsahuje největší množství proteinů, aminokyselin, bioaktivních látek, kyseliny fytové, antioxidantů, vitaminů a minerálů [6, 7]. Procentuální zastoupení jednotlivých složek je uvedené v 1, rozmezí hodnot je dáno rozdíly ve složení jednotlivých vrstev pšeničných otrub.

Tabulka 1 Procentuální zastoupení jednotlivých složek pšeničných otrub [6, 8–10]

Složka	Obsah [%]
Polysacharidy	60-75
Proteiny	9,9-18,6
Tuky	5,0-6,3
Voda	11,6-12,0
Popel	5,7-6,5

Celkový obsah **sacharidů** v sušině pšeničných otrub je okolo 58 % (cca 65 g/100 g pšeničných otrub), toto procento ovšem velmi závisí na zastoupení škrobu. Ten je hlavní složkou endospermu a v procesu mletí je cílem veškerý jeho podíl z otrub vymlet [11]. Jelikož se jedná o lignocelulózový materiál, významné zastoupení zde mají také celulóza (okolo 20 %) a hemicelulózy (okolo 18 %) [12]. Z dietárního pohledu lze polysacharidy považovat za vlákninu, která dle své rozpustnosti může mít v těle významné funkce [13]. Její zastoupení v pšeničných otrubách je okolo 50 %. Nerozpustná vláknina v pšeničných otrubách převažuje (35-52 %), svými laxativními účinky pomáhá udržovat zdraví tlustého střeva a podporuje peristaltiku [11]. Vláknina pšeničných otrub může být také slibným prebiotikem, disponuje navíc také antioxidační aktivitou [14, 15].

Obsah **proteinů** v pšeničných otrubách je okolo 17 %, přičemž jejich největší množství se nachází v aleuronové vrstvě, kde se vyskytují převážně ve formě zásobních globulinů. Proteiny vnějších a středních vrstev mají poté většinou obranné funkce a zabraňují oxidativnímu stresu [11]. Dle Idris et al. [16] jsou proteiny pšeničných otrub tvořeny albuminy (23,5 %), globuliny (15,5 %), prolaminy (18,5 %), gluteliny (25,5 %) a nerozpustnými proteiny (17,5 %). Nutriční kvalita proteinů je charakterizována obsahem esenciálních aminokyselin. Nejzastoupenějšími aminokyselinami proteinů pšeničných otrub jsou kyselina glutamová, asparagová a arginin, z esenciálních aminokyselin leucin. S ohledem na adekvátní denní příjem dospělého člověka je, stejně jako u většiny cerálií, limitující aminokyselinou lysin [17]. V porovnání s proteiny pšeničného endospermu obsahují pšeničné otruby vyšší množství argininu a glycinu [13, 18].

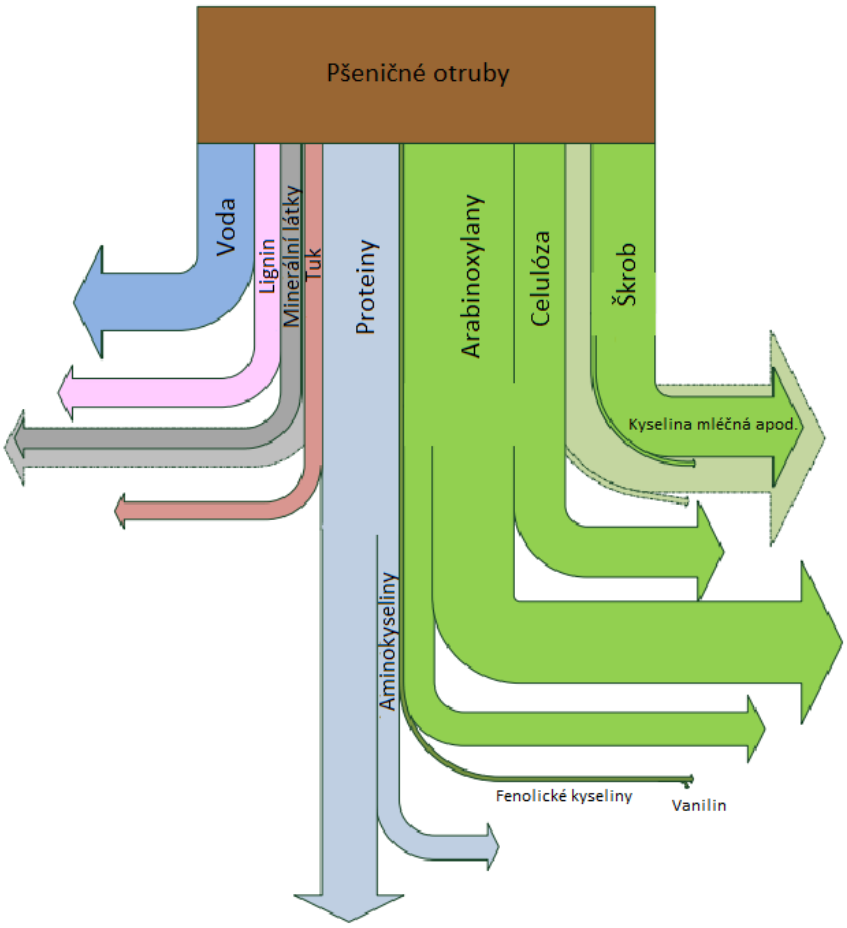
Za **bioaktivní látky** pšeničných otrub jsou považovány sloučeniny s antioxidační nebo protizánětlivou aktivitou. Jejich množství v pšeničných otrubách je ovlivněno odrůdou nebo klimatickými a enviromentálními podmínkami [19]. Nejzastoupenější skupinou jsou fenolické látky – sekundární metabolity rostlin, které díky své struktuře disponují dobrými antioxidačními účinky. V pšenici jsou to zejména deriváty kyseliny hydroxyskořicové, konkrétně kyselina ferulová, sinapová a kumarová. Vyskytují se převážně v obalových vrstvách, jelikož jsou vázané na strukturální složky buněčné stěny [20].

Pšeničné otruby mají také relativně vysoký obsah **draslíku** (118 mg/kg) a **fosforu** (101 mg/kg), což jsou základní rostlinné nutrienty nezbytné pro správný vývoj rostlin [21]. Ovšem většina minerálních látek pšeničných otrub nemá pro člověka žádný výživový význam,

jelikož je vázaná ve formě obtížně stravitelných fytátů [22]. Otruby tak ve své na tivní formě nejsou dobrým zdrojem minerálních látek. V procesu zpracování otrub se často cílí na odstranění fytátů z nutričně zajímavých produktů tak, aby se zvýšila jejich obecná výživová hodnota. Vázané formy prvků však nepředstavují problém pro utilizaci v rámci rostlinné říše, pšeničné otruby lze tak využít například jako hnojiva [21].

2.1.2 Biorafinace pšeničných otrub

Trendem nejen dnešní doby je maximální využití sekundárních produktů výroby a tím minimalizace množství vznikajících odpadů. Velký důraz se klade na zisk produktů, jejichž ekonomický význam převáží náklady spojené s jejich výrobou. Často se proto musí tyto výrobní procesy optimalizovat, aby bylo dosaženo co nejvyšších výtěžků za co nejpřijatelnějších podmínek. To platí i v případě pšeničných otrub, které mají řadu vlastností, jež se dají velmi dobře dále zúročit. Proces jejich plného využití se označuje jako biorafinace, jeden z návrhů je zobrazen na obrázku 2 [23].



Obrázek 2 Příklad biorafinace pšeničných otrub [23]

Pšeničné otruby se za účelem jejich valorizace mohou používat buď jako celek (lignocelulózový materiál), nebo mohou být valorizovány jejich jednotlivé složky. Tehdy se složení pšeničných otrub odráží v navržené technologii biorafinace. Mezi potenciálně významné složky pšeničných otrub se řadí polysacharidy, konkrétně celulóza, arabinoxylany a škrob, proteiny a jejich aminokyseliny, tuky, minerální látky, lignin, nebo fenolické látky. Tyto látky je však za účelem jejich valorizace nutné z pšeničných otrub nejprve v co nejčistší formě izolovat. Proces izolace jedné složky by současně neměl degradovat složky jiné. Zároveň

by koncept biorafinerie měl zahrnovat pouze udržitelné technologie bez použití nebo tvorby toxických kontaminantů škodlivých pro životní prostředí [24].
Jedna z aktuálně nejpoužívanějších technologií zhodnocení lignocelulózového materiálu je jejich konverze na **biopaliva**. Za tímto účelem je nejprve nutné polysacharidy hydrolyzovat na jednoduché cukry, které mohou dále sloužit mikroorganismům jako substrát pro konverzi. Jelikož jsou pšeničné otruby tvořeny převážně z polysacharidů, byla tato technologie aplikována také na ně [25], výtěžnosti jejich konverze na bioethanol dosahuje až 70 g/kg [26].
Pšeničné otruby mohou také představovat složku substrátu využívaného pro produkci různých typů **enzymů** nebo **organických kyselin** pomocí mikroorganismů. Fermentací pšeničných otrub v pevné fázi lze pomocí hub a mikroorganismů vyžadujících nižší vlhkost získat například α-amylázy, pektinázy nebo xylanázy. Při fermentaci v tekutém médiu pak mohou být produkovány lakkázy, karboxymethyl celulázy nebo esterázy kyseliny ferulové. Nejvýznamnější organickou kyselinou v pšeničných otrubách je kyselina ferulová, díky svým antioxidačním účinkům má potenciální významné uplatnění ve farmacii, kosmetice i potravinářském průmyslu. Biotechnologickou konverzí kyseliny ferulové z pšeničných otrub lze získat vanilin – přírodní aroma hojně využívané v potravinářství [27].
Pšeničné otruby lze také využít jako **hnojivo**, mohou být významným zdrojem minerálních látek, zejména fosforu, po jejich kompostování. Pšeničné otruby také prokázaly schopnost adsorbovat různé typy látek, které znečišťují životní prostředí, například krystalovou violeť [6], nebo ionty těžkých kovů [7]. Za účelem zlepšení absorpčních vlastností daného typu látky se provádí různé modifikace pšeničných otrub. Například termochemická modifikace pšeničných otrub vedla ke zlepšení adsorpce měďnatých iontů [8].

Díky relativně vysokému zastoupení proteinů (okolo 17 %) mohou být i pšeničné otruby považovány za jeden z nových, **alternativních zdrojů proteinů**. Oproti proteinům pšeničné mouky mají nutričně mnohem pestřejší aminokyselinový profil, jsou bohatým zdrojem argininu, kyseliny glutamové i některých esenciálních aminokyselin. Hledání alternativních zdrojů proteinů je jedním z hlavních zájmů v oblasti zlepšení bezpečnosti a kvality potravin. Má za cíl zejména snížení negativního vlivu produkce potravin a krmiv na životní prostředí [9]. Kromě nutričního a technologického významu se mohou proteiny pšeničných otrub uplatnit v oboru nanotechnologií, konkrétně jako nosiče nebo enkapsulační materiál pro různé významné nutrienty nebo bioaktivní látky [11].

2.2 Využití rostlinných proteinů v potravinářství

Proteiny jsou dusíkaté organické sloučeniny složené z dlouhého řetězce aminokyselin, které jsou nezbytné pro správné fungování všech žijících organismů. V dnešní době popularita rostlinných proteinů roste nejen pro jejich zdravotní benefity, ale také díky aktuálním trendům udržitelného rozvoje a ochrany životního prostředí nebo zvířat. Nejběžnějšími zdroji rostlinných proteinů jsou luštěniny (sója, hrách) a obiloviny (pšenice), každopádně díky valorizaci různých rostlinných materiálů se objevuje také řada jejich alternativních zdrojů (řasy, hmyz) [28]. Jelikož jsou však rostlinné proteiny odlišné od živočišných, jejich zařazení do stravy je nutné provádět s ohledem na jejich nutriční charakteristiky. Roste také poptávka po tzv. plant-based proteinových výrobcích, jejichž kvalita je z velké míry ovlivněna funkčními vlastnosti rostlinných proteinů [29].

2.2.1 Nutriční význam rostlinných proteinů

Příjem proteinů ve stravě je pro správný fyzický i psychický stav člověka nezbytný, ovlivňuje růst, vývoj a funkci svalů, kostí a nervového systému. Stravu by měly proteiny tvořit

z 10-20 %, přičemž za adekvátní denní příjem proteinů je považováno okolo 0,8 g na kg tělesné váhy [30]. Zvýšený příjem bílkovin (až 2 g/kg/den) je pak doporučován sportovcům, ale také starším lidem [31, 32]. Takováto výživa má za cíl předcházet ztrátě svalové hmoty a síly, ale také například snižovat riziko rozvoje obezity. Starší lidé by zároveň ze zdravotního hlediska měly dávat přednost konzumaci rostlinných proteinů před živočišnými například kvůli absenci cholesterolu, a dokonce schopnosti jeho hladinu snižovat.

Jeden z hlavních parametrů, které poukazují na nutriční kvalitu proteinů, je jejich **aminokyselinové složení**. Pro výživu je zásadní zejména zastoupení esenciálních aminokyselin. Kvalitní proteiny by měly obsahovat všechny esenciální aminokyseliny v množství dostatečném pro optimální funkci organismu. Tyto předpoklady splňuje zejména vaječný protein, který je z tohoto důvodu často označován jako referenční. Pro lidskou výživu jsou esenciálními aminokyselinami valin, leucin, isoleucin, threonin, methionin, lysin, fenylalanin a tryptofan, poloesenciální aminokyseliny arginin a histidin je nezbytné přijímat v dostatečném množství zejména v dospívání. Doporučený denní příjem esenciálních aminokyselin je závislý jak na hmotnosti konzumenta, tak věku [33].

Živočišné bílkoviny jsou vzhledem k zastoupení esenciálních aminokyselin považovány za kompletní. V proteinech rostlinného původu jsou obecně 4 esenciální aminokyseliny (Lys, Met, Thr, Trp), které se z nutričního hlediska mohou vyskytovat v neoptimálních koncentracích [34]. I přesto můžou být tyto proteiny ceněné pro obsah některých aminokyselin, které pozitivně ovlivňují procesy v těle [30]. Navíc jsou jedinou přijatelnou volbou pro vegany. Kombinací rostlinných proteinů z různých zdrojů lze však napodobit aminokyselinový profil živočišných bílkovin, a tím eliminovat jejich individuální nutriční nedostatky [35, 36]. Jak již bylo zmíněno, referenčnímu proteinu definovaným WHO svým složením nejvíce odpovídá protein z brambor nebo chlebovníku, jeho aminokyselinové složení bylo však možné napodobit také kombinací hrachového albuminu (86,6 %) a proteinu z goa fazolí (13,4 %) [35].

Stravitelnost je další vlastnost, která zásadně ovlivňuje nutriční význam proteinů. Stravitelnost proteinů je výsledkem působení vnějších a vnitřních faktorů. Vnější faktory zahrnují nepřístupnost proteinu vlivem přítomných antinutričních látek, vnitřní jsou dány pořadím aminokyselin, skladbou a způsobem zesíťování bílkovin. Zároveň může být stravitelnost bílkovin ovlivněna v průběhu zpracování jejich zdrojů [37]. Stravitelnost živočišných proteinů je obecně mnohem lepší než u proteinů rostlinných, což může být způsobenou rozdílnou strukturou těchto proteinů. Sekundární struktura rostlinných proteinů je totiž charakteristická častým výskytem β-skládaných listů a nízkým zastoupením α-helixů, což je příčinou jejich odolnosti vůči proteolýze v trávícím traktu [38]. Hydrofóbní β-struktury navíc způsobují shlukování proteinů, což také snižuje jejich stravitelnost [39, 40]. Další faktorem, který může snižovat stravitelnost rostlinných proteinů, je přítomnost neškrobových polysacharidů nebo vlákniny, které brání působení trávících enzymů [41].

Také přítomnost některých bioaktivních látek může snižovat stravitelnost proteinů. Například kyselina fytová, která se nachází v obilovinách, semenech nebo ořechách, může interakcí s proteiny vést k jejich snížené stravitelnosti. Z potravin je však možné ji odstranit namáčením, klíčením nebo její enzymatickou hydrolýzou fytázami [33, 35, 42]. V syrových luštěninách, obilovinách, bramborách nebo rajčatech se přirozeně vyskytují inhibitory proteáz, které narušují působení trávících enzymů trypsinu a chymotrypsinu, jejich obsah lze však významně zredukovat tepelným opracováním [36, 37].

Nutriční význam proteinů lze efektivně zhodnotit díky metodám, které vyhodnocují jak jejich aminokyselinové skóre, tak stravitelnost. Mezi tyto metody patří například PDCAAS

(protein digestibility corrected amino acid score), DIAAS (digestible indispensable amino acid score) nebo PER ((protein efficiency ratio).

2.2.2 Metody izolace proteinů z rostlinných materiálů

Existuje řada různých technik izolace či extrakce proteinů z rostlinných materiálů. Konvenční metody izolace proteinů mohou mít řadu nevýhod, např. denaturaci proteinů, nízkou výtěžnost, produkci velkého množství odpadní vody nebo vysokou spotřebu chemikálií. Proto jsou vyvíjeny také nové metody, u kterých jsou tyto nedostatky eliminovány. Jejich využití v průmyslu ovšem omezují vysoké pořizovací náklady na vybavení [43].

Nejčastější metoda pro izolaci proteinů se nazývá **pH-shift**. Využívá se v ní extrakce proteinů v alkalickém prostředí a izoelektrické precipitace. Proteiny jsou v alkalickém prostředí solubilizovány do roztoku, nerozpustné části jsou odstraněny centrifugací. Solubilizace probíhá v závislosti na typu proteinů v rozmezí pH 8–11, případně vyšším [30]. Pro precipitaci je poté pH upraveno na hodnotu pI, která se u rostlinných proteinů běžně pohybuje mezi 4–5 [13, 22, 44, 45].

V kombinaci s pH shift metodou se často využívají techniky **ultrafiltrace** nebo **diafiltrace**. To má za následek zejména zvýšení výtěžnosti extrakce proteinů a zlepšení jejich funkčních vlastností. Po solubilizaci proteinů dochází díky ultrafiltraci k odstranění vody a nízkomolekulárních látek pomocí membrány, a tím k zakoncentrování proteinů. Takto získáné proteinové koncentráty disponují vyšším zastoupením proteinů díky odstranění nežádoucí vlákniny [46].

Další metodou izolace proteinů z rostlinných materiálů je **vysolování**. Přídavkem soli se zvyšuje iontová síla proteinů, jejich hydratovatelnost vodou a tím i solubilizace. Avšak při koncentracích solí vyšších, než 1M se rozpustnost proteinů naopak výrazně snižuje, čehož se využívá pro jejich opětovnou precipitaci. Běžně používanými solemi v této technice izolace proteinů jsou buď chlorid sodný nebo síran amonný [47].

Proteiny lze z rostlinného materiálů izolovat také po **frakcionaci za sucha** – mletím materiálu dochází k rozpadu struktury a uvolnění jednotlivých komponent. Díky rozdílným velikostem částic a hustotám je umožněna separace proteinů, která se často provádí v proudu vzduchu. Výhodou této metody je úplná absence jakýchkoliv chemikálií, proteiny po izolaci navíc není nutné dodatečně sušit. Každopádně výtěžnost a účinnost suché frakcionace proteinů je velice nízká, je závislá na rychlosti mletí [46, 48].

Pokročilé metody izolace proteinů jsou nejen udržitelné, ale mají také vyšší výtěžky, získané proteiny disponují lepšími nutričními i technologickými vlastnostmi a jsou považovány za zdravotně bezpečnější [49]. Mezi tyto metody patří například extrakce za pomoci enzymů, eutektického rozpouštědla, reverzních micel, mikrovlnného záření, ultrazvuku, vysokého tlaku, subkritické vody, nebo pulsního elektrického pole [43].

2.2.3 Vysokoproteinové potraviny

Rostlinné proteiny mají díky své výživové hodnotě v potravinářství významné uplatnění. Zejména ve stravě veganské a vegetariánské jsou jediným možným zdrojem aminokyselin. Popularita rostlinných proteinů se však v posledních letech zvyšuje. Jejich největší zastoupení je v tzv. plant-based potravinách, které obsahují zejména ovoce, zeleninu, obiloviny, luštěniny, ořechy a semínka. Například v Evropě vzrostl trh s plant-based potravinami mezi lety 2020 a 2022 o 21 %, měl hodnotu 5,8 mld. eur (pro 13 vybraných evropských zemí) [50]. Celosvětová hodnota trhu s těmito potravinami v roce 2022 byla však 44,2 mld. amerických dolarů, do roku 2030 se předpokládá nárůst na téměř 162 mld. dolarů [51], tj. o více 366 %.

Rostlinné proteiny mohou být použity také pro fortifikaci konvenčních potravin, jako je například pečivo, těstoviny nebo nápoje za účelem zvýšení jejich nutriční hodnoty, případně diverzifikace aminokyselinového profilu. Tímto způsobem je možné produkovat i vysokoproteinové potraviny. Pro danou aplikaci je nutné použít takový typ proteinu, který svými funkčními vlastnostmi nenaruší charakter původní potraviny. K fortifikaci potravin se nejčastěji používají mandlové, kokosové, sójové nebo hrachové proteiny [52].

V **pečivu** je zdrojem rostlinných proteinů zejména mouka – pšeničná obsahuje okolo 10 % proteinů. Její nevýhodou je však relativně nízké zastoupení esenciální aminokyseliny lysinu [53]. Přídavkem rostlinných proteinů jiného původu lze vylepšit aminokyselinový profil, a tím i nutriční hodnotu pečiva, konzumentovi umožňuje zvýšit příjem bílkovin [54]. Do pečiva se nejčastěji přidává sójový nebo pšeničný protein, pozornost se ovšem upíná také k hrachovému, cizrnovému nebo fazolovému proteinu zejména kvůli jejich aminokyselinovému profilu [54]. Zároveň je však nutné zajistit texturu a chuť odpovídající danému pečivu, které mohou být, dle typu přidávaného proteinů, různě ovlivněny. Nejčastěji je přídavkem proteinů do pečiva ovlivňována agregace lepku a lepivost těsta [55]. Chuť a aroma pečiva obohaceného o rostlinné proteiny jsou často ovlivněny zdrojem daného proteinu – jeho typickým aroma. Rizikovým faktorem je také přetrvávající hořkost rostlinných proteinů [56].

Těstoviny jsou dalším typem potraviny, která je běžně obohacována o proteiny, čímž je dosaženo zlepšení aminokyselinového profilu, a tím zvýšení jejich nutriční hodnoty [57]. Zároveň je nutné zajistit technologické vlastnosti těstovin s přídavkem proteinů, jako je vařivost, bobtnavost nebo vaznost. Zásadní vliv na tyto vlastnosti má množství a typ přidávaného proteinu – ovlivňuje mechanické (tuhost) a strukturní vlastnosti těstovin (sílu lepku) [58]. Přídavek proteinové suroviny bohaté na vlákninu oslabuje těstovinovou síť a ovlivňuje jejich texturu. Každopádně u těstovin obohacených různými druhy luštěninových mouk byla pozorována různá tuhost, lepivost nebo množství sedimentu [59]. Stejně jako u pečiva může přítomnost rostlinných proteinů ovlivňovat i senzorické vnímání těstovin konzumenty. Například přítomnost slunečnicového proteinového izolátu měla za následek tmavší barvu těstovin [60], alternativní zdrojů bílkovin, jako jsou luštěniny, mohou způsobit nepříjemnou chuť či aroma [61].

Obohacování různých typů **nápojů** o proteiny s sebou přináší nezbytné úpravy technologie výroby, které zajistí senzorickou i nutriční kvalitu výrobku [62]. Zdroj proteinů je pro tuto kvalitu zásadní jak ze senzorického, tak technologického hlediska [63]. Historicky jsou nejvíce vyvíjeny ovesné nápoje [64], ovšem v poslední době roste využívání luštěnin, ořechů a semínek jako ingredience v různých typech nápojů [63]. Pro inkorporaci rostlinných proteinů do nápojů je nutné nejprve vyhodnotit jejich funkční vlastnosti, zejména hydrofobicitu, rozpustnost, vaznost vody, gelovatění, pěnotvornost a emulzifikační vlastnosti [65], na základě kterých lze poté odhadnou možné aplikace. Přídavek rostlinných proteinů však může způsobit také řadu negativních senzorických vjemů, například hořkost nebo svíravost. U nápojů obohacených fazolových proteinovým izolátem přetrvávala nepřirozená fazolová chuť [66].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Charakterizace pšeničných otrub a proteinového materiálu z pšeničných otrub

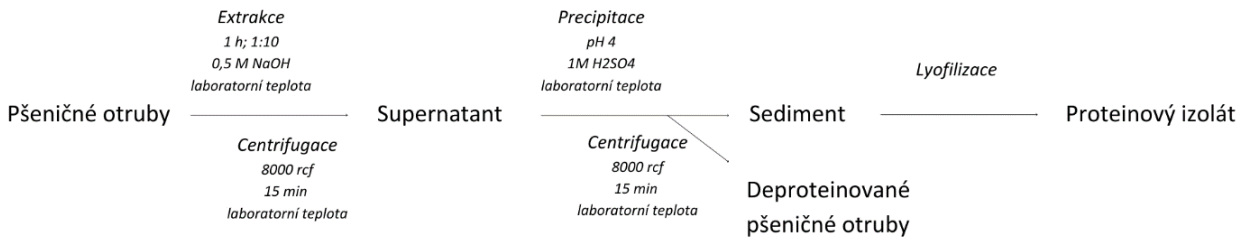
Ve všech experimentech provedených v rámci této dizertační práce byly použity pšeničné otruby z Mlýnů J. Voženílek (Česká republika). V pšeničných otrubách bylo stanoveno množství bílkovin (Kjeldahlova metoda, Kjeldatherm KT 8S, Vapodest VAP200, Gerhardt, Německo) a jejich molekulová hmotnost (SDS-PAGE), obsah vody (metoda dle Karl-Fishera, Metrohm 701 KF Titrino), tuků a jednotlivých mastných kyselin (plynová chromatografie, Thermo Fisher TRACETM GC), fenolických látek (kapalinová chromatografie, Waters HPLC Systém, 515 HPLC pump, UV-VIS detektro Waters 2487, Waters 717 autosampler) a minerálních látek (ICP-OES, Horiba Jobin Yvonne Ultima 2). Množství polysacharidů bylo nakonec určeno jako dopočet součtu všech zastoupených složek do 100 %.

U všech proteinových izolátů z pšeničných otrub, získaných různými izolačními postupy, bylo stanoveno zastoupení bílkovin (prvkový analyzátor Euroconvertor EA 3100) a výtěžnost daného procesu izolace (gravimetricky) vždy ve třech opakování. Výtěžnost byla poté definována jako množství izolovaného materiálu ze 100 g otrub ([g/100 g]). Jednotlivé izolační postupy byly mezi sebou porovnávány právě dle těchto dvou kritérií – obsahu bílkovin a výtěžnosti. U všech proteinových izolátů byla také stanovena molekulová velikost proteinů (SDS-PAGE) pro zhodnocení vlivu použitých metod izolace na štěpení proteinového řetězce.

U proteinového izolátu z pšeničných otrub, izolovaného z hlediska výtěžnosti a zastoupení bílkovin nejoptimálnějším postupem, byl kromě množství a molekulové velikosti bílkovin stanoven také obsah tuků a mastných kyselin (plynová chromatografie, Thermo Fisher TRACETM GC), fenolických (kapalinová chromatografie, Waters HPLC Systém, 515 HPLC pump, UV-VIS detektro Waters 2487, Waters 717 autosampler) a minerálních látek (ICP-OES, Horiba Jobin Yvonne Ultima 2) a aminokyselinový profil (AAA analyzátor) vždy ve třech opakování.

3.2 Izolace proteinové frakce z pšeničných otrub

Pro izolaci proteinů z pšeničných otrub byla použita metoda pH-shift, která využívá amfolytických vlastností bílkovin, jejich rozpustnosti v prostředí pH, které je vyšší, než je jejich izoelektrický bod. Celý proces izolace byl složen z několika základních kroků. V první fázi byly proteiny extrahovány roztokem hydroxidu sodného (0,05 M, odpovídá pH 11) v poměru 1:10 z lignocelulózové struktury pšeničných otrub za stálého míchání (120 rpm) po dobu 1 hodiny. Deproteinované pšeničné otruby byly dále od tekutého extraktu odděleny pomocí centrifugace (15 min, 8000 rcf, laboratorní teplota). Hodnota pH proteinového extraktu byla následně opět za stálého míchání upravena na 4, čímž došlo k precipitaci proteinů. Při další centrifugaci byl získán proteinový sediment, který byl nakonec sušen lyofilizací do konstantní hmotnosti. Tento proces izolace proteinů je zobrazen na obrázku 3.



Obrázek 3 Schéma průběhu izolace proteinů z pšeničných otrub

Za účelem zvýšení výtěžnosti a čistoty proteinového izolátu z pšeničných otrub byl původně navržený postup izolace modifikován. Tyto modifikace byly rozděleny do tří skupin – předúprava pšeničných otrub, úprava podmínek extrakce a úprava podmínek precipitace. Konkrétní změny provedené v postupu izolace proteinů z pšeničných otrub jsou uvedeny v tabulce 2. Každá změna v původně navrženém postupu byla provedena samostatně a její vliv na výtěžnost, zastoupení proteinu v izolátu a fragmentaci proteinových řetězců byl ověřen porovnáním s původně navrženou metodou.

Tabulka 2 Modifikace v procesu izolace proteinů z pšeničných otrub

Předúprava		Extrakce		Precipitace	
Mletí	<0,2 mm	Poměr	1:20 1:30	pH	3
Enzymatická hydrolýza	Celulázy	Teplota [°C]	40 50		5
	AMG	Koncentrace NaOH [M]	0,35		
Odtučnění [°C]	30 40 50	Doba [h]	2 3	Teplota [°C]	4
		Opakovaná extrakce	2x 3x		-4

3.3 Velkoobjemová izolace proteinové frakce z pšeničných otrub

Proces izolace proteinů z pšeničných otrub testovaný v laboratorních podmínkách byl transferován do poloprovozních měřítek. Celkem byly ověřeny 4 varianty izolace proteinů, které se mezi sebou lišily zejména použitím odlišných typů odstředivek, nebo poměrem extrakčního činidla ku množství otrub. Všechny testované varianty byly provedeny za účelem zvýšení výtěžnosti a zastoupení bílkovin ve finálním proteinovém materiálu.

První varianta izolace proteinů z pšeničných otrub byla odvozena od metody navržené a optimalizované v laboratorních podmínkách. Extrakce proteinů z pšeničných otrub byla provedena 0,05 M NaOH v poměru 1:20 w/v za stálého míchání (hřídelové míchadlo, 100 rpm), při laboratorní teplotě, po dobu 2 hodin. Tento proces byl proveden v bioreaktoru CSTR IF-1500 o objemu 1500 l, vybaveným hřídelovým míchadlem, do kterého bylo odváženo 50 g otrub a 1000 l 0,5 M NaOH.

Pro napodobení laboratorních podmínek izolace proteinů z pšeničných otrub byla pro oddělení proteinového extraktu od deproteinovaných pšeničných otrub použita série dvou různých odstředivek. V prvním kroku byla za stálého míchání suspenze čerpána (pístové čerpadlo s kapacitou 5 m^3/h, Johnson, Sweden) do odstředivky Aldec 10 decanter (otáčky bubnu 5000 ot./min, otáčky šnekového dopravníku 3-5 ot./min, objemový průtok suspenze 660 l/h), kde došlo k odstranění nejhrubších částí suspenze. V dalším kroku byl pak supernatant pumpován do odstředivky Alpha laval Clara 80 disck stack centrifuge (8000 ot./min, doba mezi cykly 30 minut, objemový průtok suroviny 450 l/h), čímž byl proteinový extrakt z pšeničných otrub ještě přečištěn.

Precipitace extrahovaných proteinů byla provedena úpravou pH supernatantu na hodnotu 4 ± 0,1 pomocí 2M H_2SO_4 za stálého míchání (100 ot/min, 30 min, teplota 25 °C) opět v bioreaktoru CSTR IF-1500 vybaveným hřídelovým míchadlem, který byl předem vyčištěn. Vzniklá suspenze byla opět čerpána pomocí pumpy X do odstředivky Alpha laval Clara 80 disck stack centrifuge (8000 ot./min, doba mezi cykly 15 minut, objemový průtok suroviny 500

l/h), kde došlo k oddělení precipitované proteinové frakce od supernatantu. Získaný sediment byl nakonec nalit na podnosy pro zmrazení (-35 °C, 6 hodin) a následně lyofilizován pomocí zařízení Lyo-tech (24hodin, tlak v komoře 30 Pa, teplota polic 20 °C).

Ve **druhé variantě** byla testována izolace proteinů z pšeničných otrub za stejných podmínek, ovšem s dvojnásobnou navážkou pšeničných otrub, tedy v poměru 1:10 (100 kg otrub/ 1000 l 0,5M NaOH). Se snížením poměru bylo nezbytné snížení otáček odstředivky Aldec 10 decanter na 4795 ot./min a upravit tak průtok suspenze na 480 l/h.

Ve **třetí variantě** izolace proteinů z pšeničných otrub byla provedena změna v nastavení odstředivky Aldec 10 decanter za účelem snížení celkového času izolace a zvýšení účinnosti odstřeďování. Při zvýšení otáček na 5000 ot/min a průtoku suspenze 580 l/h byla současně v této variantě izolace vynechána další odstředivka Alpha laval Clara 80 disck stack centrifuge, která byla v obou předchozích variantách použita pro přečištění supernatantu. Po precipitaci byl proteinový materiál separován od suspenze, v tomto případě ovšem za nižšího průtoku – 431 l/h.

Ve **čtvrté variantě** izolace proteinů z pšeničných otrub byla odstředivka Aldec 10 decanter nahrazena sedimentačním tankem s filtrační přepážkou. Obdélníkový sedimentační tank o rozměrech 1,4x0,7x0,6 m byl vybaven perforovanými deskami s 4vrstvou filtrační vložkou umístěnými na dně. Kapacita použitého tanku byla 151 l/m^{2}xh. Během separace byla suspenze otrub a extrakčního činidla neustále míchána, aby se předešlo problémům s jejím čerpáním do usazovací nádrže. V této variantě bylo také testováno alternativní sušení získaného proteinového materiálu, a to sprejovým sušením. Po centrifugaci precipitovaného proteinového materiálu byl jeho objem rozdělen na 2 části – 35 litrů bylo lyofilizováno a 18 litrů bylo sušeno pomocí sprejové sušárny s maximální kapacitou evaporované vody 30 l/h (Gea Niro Atomizer, Itálie).

3.4 Aplikace proteinového koncentrátu z pšeničných otrub v potravinářství

Proteinový koncentrát z pšeničných otrub byl následně použit pro fortifikaci jogurtů a chleba za účelem přípravy vysokoproteinových potravin. U obou aplikací byla provedena řada analýz, díky kterým bylo možné novou vysokoproteinovou potravinu ocharakterizovat a zhodnotit vliv přídavku proteinového koncentrátu z pšeničných otrub na její vlastnosti.

Vysokoproteinové jogurty byly vyrobeny z čerstvého, plnotučného, pasterizovaného mléka (Moravia Lacto, Česká republika). Komerční jogurtová kultura obsahující bakterie *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* (YF-L812, Chr. Hansen, Dánsko) byla zvolena pro přípravu 1% inokula, které bylo následně používáno pro zahájení fermentace mléka. Jogurty se zvýšeným obsahem proteinů byly obohaceny 2 a 5% hmotnostním přídavkem proteinového koncentrátu z pšeničných otrub nebo syrovátkového proteinu (Vilgain Aktin). Za účelem zlepšení senzorických vlastností vysokoproteinových jogurtů pak byly připraveny jogurty s 5% a 10% hmotnostním přídavkem OP, kombinace OP a SP nebo enkapsulovaného OP. Mléko bylo před přípravou vzorků jogurtů zahřáto na 70 °C po dobu 10 min, po ochlazení na teplotu laboratoře bylo přidáno inokulum v poměru 1:100 a odpovídající množství proteinového materiálu. Směs byla promíchána a zhomogenizována a umístěna do jogurtovač (Klarstein, Německo) vyhřívaného na definovanou teplotu 42 °C přibližně na 8 hodin. Poté byly vzorky umístěny do lednice (4 °C) do dalších analýz. Před každou analýzou byl vzorek jogurtu pomocí lžičky zhomogenizován.

U vzorků vysokoproteinových jogurtů byla za účelem jejich charakterizace stanovena kapacita zadržování vody, obsah sušiny, synereze jogurtů, reologické vlastnosti a životaschopnosti jogurtových bakterií. Díky senzorické analýze mohl být efektivně vyhodnocen vliv přídavku proteinového koncentrátu z pšeničných otrub na senzorické vlastnosti vysokoproteinových jogurtů. Byla hodnocena textura, aroma a chuť jednotlivých vzorků.

Vysokoproteinový chléb byl připraven substitucí části hladké pšeničné mouky (Mlýny J. Voženílek) proteinovým koncentrátem z pšeničných otrub nebo syrovátkovým proteinem. Bylo testováno několik procentuálních substitucí pšeničné mouky daným proteinovým materiálem, konkrétně byly vytvořeny směsi s 5, 10 a 15% obsahem daného proteinového materiálu. Jako reference sloužila neobohacená hladká pšeničná mouka. Ke každé takto připravené směsi bylo následně přidáno přibližně 2,6 g soli, 1,3 g kvasnic a 70 ml vody, všechny suroviny byly řádně promíchány. Poté se vzniklé těsto uválelo do tvaru baget a nechalo 20 min kynout při pokojové teplotě. Nakonec se nakynuté bagety pekly v elektrické troubě při teplotě 240 °C po dobu 20 min.

Pro vyhodnocení vlivu substituce mouky proteinovými materiály byly stanoveny farinografické (Farinograf-E Brabender, Německo) a extenzografické vlastnosti (Extenzograf-N, Brabender, Německo) těst. Za tímto účelem bylo ke každé směsi mouky a proteinového materiálu přidáno takové množství vody, díky kterému bylo připraveno těsto o konzistenci, která nepřesáhla hodnotu 500 FJ. Senzorické vlastnosti vzorků chleba byly vyhodnoceny v rámci senzorické analýzy 1 den po jejich přípravě. Byly hodnoceny texturní, chuťové vlastnosti a aroma každého vzorku.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

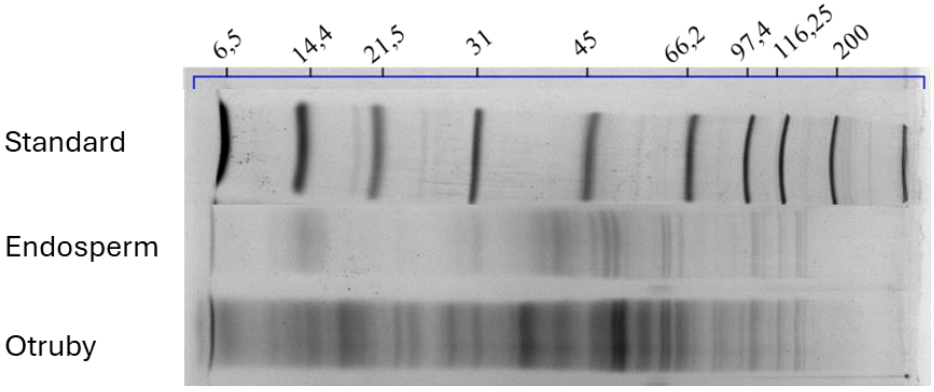
4.1 Charakterizace pšeničných otrub

Pro veškeré experimenty provedené v rámci této dizertační práce byly použity pšeničné otruby (PO) z Mlýnů J. Voženílek (Česká republika). Za účelem jejich valorizace bylo nejprve pomocí různých analytických technik charakterizováno složení pšeničných otrub. Zastoupení jednotlivých složek PO je uvedeno a porovnáno se zahraniční literaturou v tabulce 3.

Tabulka 3 Složení pšeničných otrub

Složka	PO Mlýny J. Voženílek [%]	PO dle Apprich et al. [%] [91]	PO dle Curti et al. [%] [309]
Polysacharidy	58,3 ± 2,9	56,8	21,1 – 38,9 (pouze škrob)
Bílkoviny	18,7 ± 0,1	13,2 –18,4	9,9 – 18,6
Voda	14,0 ± 1,8	12,1	8,1 – 12,7
Tuky	2,99 ± 0,47	3,5 – 3,9	5,0 – 6,3
Popel	6,03 ± 0,58	3,4 – 8,1	5,7 – 6,5

Dle údajů v tabulce 3 se složení PO z Mlýnů Voženílek výrazně neliší od složení PO uváděném Apprichem et al. [23] nebo Curtiem et al [67]. Celkový obsah **bílkovin** v PO Mlýny J. Voženílek byl necelých 19 %. Množství bílkovin v otrubách je závislé na způsobu a stupni vymletí pšeničného zrna [68]. Dle relativně malé odchylky v měření lze usuzovat, že proces mletí pšeničných zrn v Mlýnech J. Voženílek probíhá jednotně a nedochází tak k výkyvům v zastoupení bílkovin. Pomocí SDS-PAGE analýzy byly separovány jednotlivé frakce bílkovin pšeničných otrub dle jejich molekulové velikosti. Tyto frakce byly zároveň porovnány s bílkovinnými frakcemi pšeničného endospermu, jež jsou snadněji definovatelné. SDS-PAGE elektroforeogram bílkovin pšeničných otrub a pšeničného endospermu je zobrazen na obrázku 4.



Obrázek 4 Porovnání SDS-PAGE elektroforeogramů proteinů pšeničného endospermu a otrub

Dle přiložených elektroforeogramů (obrázek 4) je evidentní, že zastoupení bílkovinných frakcí v pšeničném endospermu a v pšeničných otrubách se od sebe liší. Nejvýraznějším rozdílem je absence bílkovin s molekulovou hmotností 15-30 kDa v endospermu. Na základě výsledků lze však konstatovat, že proteinové izoláty z pšeničného endospermu a z otrub mohou mít jiné zastoupení bílkovin a tím i jiné nutriční a funkční vlastnosti.

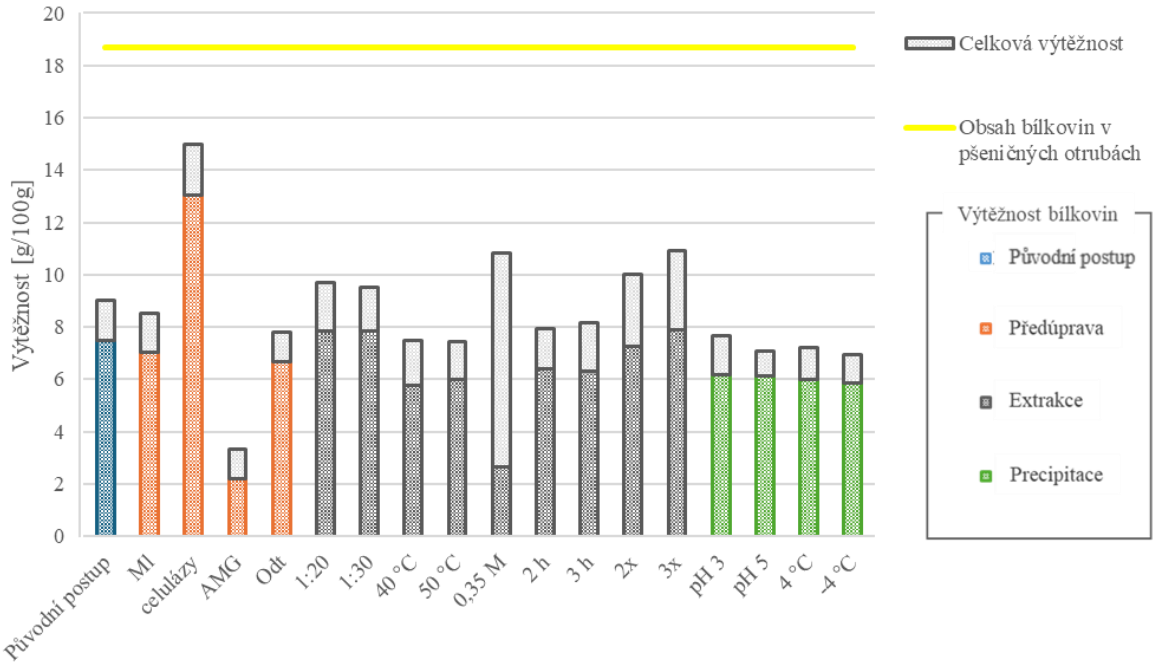
Testované pšeničné otruby obsahovaly 2,99 % ± 0,47 celkových **lipidů**, jejich bližší charakterizací bylo určeno také zastoupení jednotlivých mastných kyselin v PO. Nejvíce

zastoupené jsou polynenasycené mastné kyseliny (61 %), zejména kyselina linolová (C18:2). Mononenasycené mastné kyseliny (MUFA) reprezentované hlavně kyselinou olejovou (C18:1) tvoří přibližně 22 % lipidů a 16 % tvoří nasycené mastné kyseliny (SFA), obzvlášť kyselina palmitová. Obdobné poměry zastoupených mastných kyselin byly uvedeny také Jungem et al. v superkriticky extrahovaném oleji z pšeničných otrub [69] a Yadavem et al. v hexanovém extraktu PO [70].

Obsah **popela** v pšeničných otrubách byl stanoven na 6,03 ± 0,58 %. Mezi **prvky** byly nejzastoupenější fosfor (13,7 mg/g) a draslík (12,7 mg/g), PO obsahují také relativně vysoké množství hořčíku (4,5 mg/g). Při porovnání výsledků s dostupnou literaturou se otruby produkované v mlýnech Voženílek zásadně neodchylují od publikovaných dat [23, 71].

4.2 Izolace proteinové frakce z pšeničných otrub

Dle provedené charakterizace pšeničných otrub lze za jednu z nejhodnotnějších komponent PO považovat proteiny, které tvoří téměř 19 % celkového obsahu. Proto byl za účelem valorizace pšeničných otrub navržen postup izolace proteinové frakce z jejich lignocelulózové struktury. Izolace byla provedena pomocí metody pH-shift, základní postup izolace proteinů z pšeničných otrub byl postupně modifikován různými způsoby, které měly vést k efektivnějšímu uvolnění bílkovin z lignocelulózové struktury. Typy modifikací izolačního procesu byly rozděleny do tří skupin – (1) předúprava otrub, (2) změna podmínek extrakce proteinů a (3) změna podmínek precipitace proteinů. Pro každý postup izolace byla vyhodnocena **celková výtěžnost** proteinového materiálu (g materiálu ze 100 g PO) a **výtěžnost čistých bílkovin** ze 100 g PO, jejich hodnoty jsou uvedeny v grafu na obrázku 5.



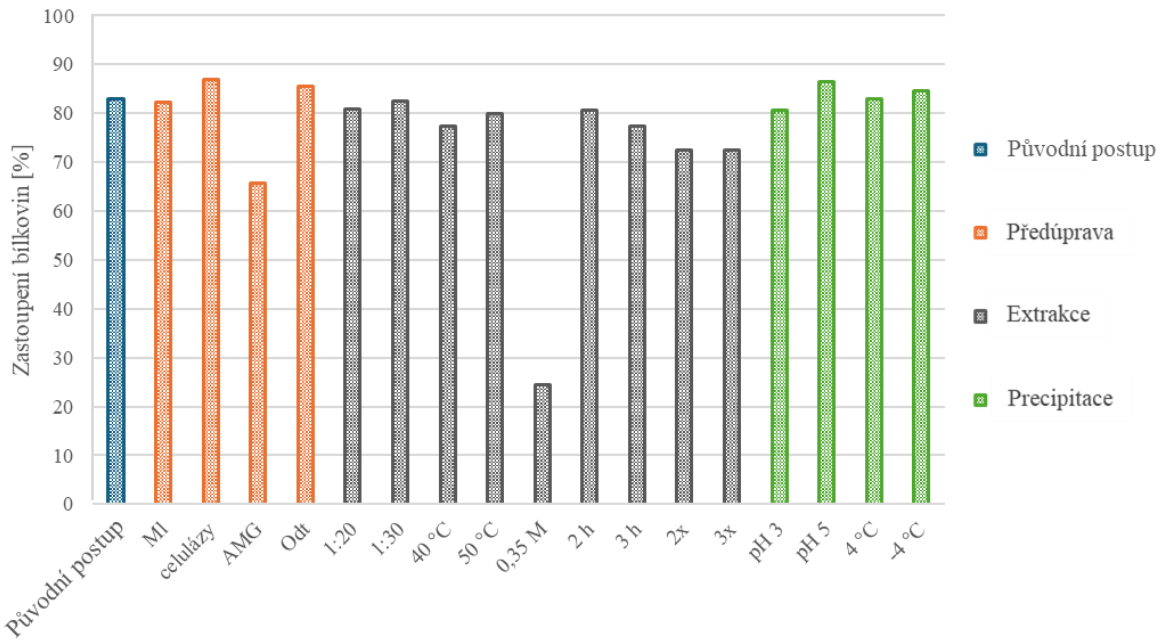
Obrázek 5 Výtěžnost různých postupů izolace proteinů z pšeničných otrub

Pomocí základního postupu se podařilo získat 9 g produktu ze 100 g PO. Při přepočtu na bílkoviny bylo ze 100 g otrub získáno 7,8 g bílkovin. S cílem zvýšit efektivitu technologie byly provedeny modifikace původně navrženého postupu.

Největší nárůst ve výtěžnosti byl pozorován při zařazení enzymové hydrolýzy pšeničných otrub pomocí celuláz jako způsobu předúpravy. Celková výtěžnost tohoto způsobu izolace dosahovala 15 g izolátu na 100 g otrub a výtěžnost bílkovin byla okolo 13 g/100 g. Jelikož jsou pšeničné otruby lignocelulózovým materiálem, řada proteinů může být pevně inkorporovaná do jejich struktury [72]. V takovém případě nedochází k jejich extrakci při použití slabých zásad, ale až po narušení lignocelulózy.

Žádná modifikace fáze extrakce proteinů nezpůsobila zvýšení výtěžnosti izolace. V případě použití koncentrovanějšího extrakčního činidla, konkrétně 0,35 M NaOH, došlo naopak ke štěpení proteinů na kratší peptidy, které se v kyselém prostředí nesráží. Stejně tak ke zvýšení výtěžnosti izolace nepomohly modifikace fáze precipitace. Snížení teploty významněji nepodpořilo precipitaci proteinů z extraktu, což poukazuje na fakt, že precipitace proteinů vyextrahovaných z pšeničných otrub probíhala velmi dobře i při pokojové teplotě. Změna pH pro srážení proteinů vedla naopak ke snížení celkové výtěžnosti i výtěžnosti bílkovin. Je tedy zřejmé že hodnota izolelektrického bodu extrahovaných bílkovin se pohybuje okolo pH 4, což je srovnatelné s hodnotou stanovenou Uttamem et al. [73].

Zastoupení bílkovin v bílkovinných izolátech je důležitý parametr, který poukazuje na čistotu konečného produktu. Pokud daný proteinový materiál obsahuje více než 90 % bílkovin, lze ho označovat jako proteinový izolát. V případě, že obsahuje mezi 30 a 90 % bílkovin, je takový materiál definovaný jako proteinový koncentrát. Zastoupení bílkovin v proteinových materiálech izolovaných různými postupu je zobrazeno na obrázku 6.



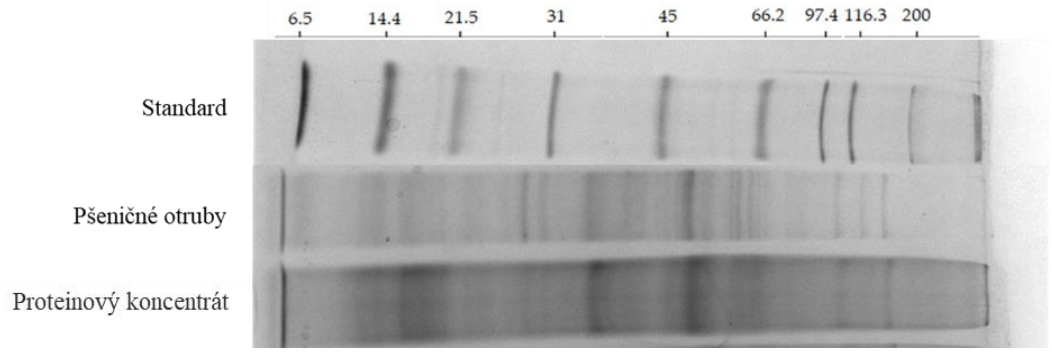
Obrázek 6 Zastoupení bílkovin v proteinovém materiálu z pšeničných otrub získaném různými způsoby izolace

Zastoupení bílkovin v materiálu izolovaném základním postupem se pohybovalo okolo 83 %, což odpovídá proteinovému koncentrátu. Takovéto typy materiálu vždy obsahují určité množství vlhkosti, dalšími složkami proteinových koncentrátů mohou být polysacharidy, v proteinovém izolátu z pšeničných otrub je to škrob.

Změna v zastoupení bílkovin v proteinových materiálech oproti původnímu postupu byla pozorována jen u několika modifikovaných způsobů izolace. Mírný nárůst v zastoupení

bílkovin oproti původnímu postupu byl pozorován pouze v případě předúpravy pšeničných otrub enzymatickou hydrolýzou pomocí celuláz (87 %), v proteinovém materiálu precipitovaném při pH 5 (86,4 %) a v materiálu, v kterém byla precipitace proteinů podpořena jednorázovým zchlazením na -4 °C (84,5 %).

Pomocí **SDS-PAGE analýzy** bylo provedeno porovnání fragmentace bílkovin v pšeničných otrubách a v proteinových koncentrátech z pšeničných otrub. SDS-PAGE elektroforeogram bílkovin pšeničných otrub a proteinového izolátu je zobrazen na obr. 22.



Obrázek 7 SDS-PAGE elektroforeogram bílkovin pšeničných otrub a proteinového izolátu

Dle přiloženého elektroforeogramu se zastoupení frakcí bílkovin v pšeničných otrubách a v proteinovém koncentrátu jeví jako kvalitativně totožné. Z toho lze usuzovat, že použitá metoda izolace je univerzální pro všechny velikosti bílkovinných řetězců a mohou být tímto způsobem účinně odděleny z lignocelulózové struktury.

Ve všech proteinových koncentrátech izolovaných rozdílnými postupy převládala bílkovinná frakce o molekulové hmotnosti 10-25 kDa. Nejzastoupenější bílkovina měla molekulovou hmotnost mezi 16 a 17 kDa. Přesto bylo zřejmé, že některé modifikace procesu izolace bílkovin ovlivnily zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí. Nejvýznamnější změny byly zaznamenány u frakce o molekulové hmotnosti 25-50 kDa, která odpovídá hmotnosti α, β a γ-gliadinů [74]. Právě tyto typy proteinů jsou zodpovědné za imunitní reakce spojené s autoimunitním onemocněním – celiakií. Inaktivace a degradace gliadinů v pšeničných materiálech je intenzivně zkoumána [75].

4.3 Charakterizace proteinového materiálu z pšeničných otrub

Celkový obsah bílkovin v proteinovém materiálu získaném izolací bílkovin z pšeničných otrub byl stanoven na 83,0 ± 1,6 %. Z obr. 23 vyplývá, že během procesu izolace byly kvalitativně izolovány veškeré proteinové frakce, které se nachází v pšeničných otrubách.

Vzhledem k obsahu bílkovin lze získaný materiál řadit mezi koncentráty a označovat ho jako proteinový koncentrát z pšeničných otrub (PKPO).

Výživová kvalita proteinů je primárně ovlivněna aminokyselinovým složením. **Aminokyselinový profil** vypovídá o nutriční kvalitě izolovaných proteinů a jejich přínosu ve výživě. Rostlinné proteiny mají oproti živočišným proteinům obecně nižší zastoupení esenciálních aminokyselin a řada z nich není jejich kompletním zdrojem. Kvalitní proteinové materiály obsahují všechny esenciální aminokyseliny v dostatečně vysokém množství, aby pokryly doporučené denní příjmy (DDP) aminokyselin. Příjem neesenciálních aminokyselin ve stravě však může rovněž poskytovat různé zdravotní benefity, podobně jako příjem semi-esenciálních aminokyselin, který je významný zejména pro výživu dětí a mladistvých. Analýzou izolovaného proteinového materiálu z pšeničných otrub byly zjištěny koncentrace celkem 16 aminokyselin. Aminokyselinový profil PKPO je zobrazen v tabulce 4.

Tabulka 4 Zastoupení aminokyselin v PKPO [g/100 g]

Esenciální aminokyseliny		Semi-esenciální aminokyseliny		Neesenciální aminokyseliny	
Val	4,6			Gly	5,2
Leu	6,8			Ala	4,6
Ile	2,8			Ser	4,7
Thr	3,3	Arg	7,7	Cys	1,6
Met	1,8	His	3,3	Asp	9,2
Lys	4,0			Glu	20,1
Phe	4,1			Tyr	3,7
Trp	0,9			Pro	9,5

V PKPO byly nejzastoupenějšími aminokyselinami kyselina glutamová, prolin a arginin. Tyto aminokyseliny jsou zodpovědné za růst a regeneraci svalů, jejich zvýšený příjem by proto mohl být žádoucí ve sportovní výživě [76]. Přínosné tyto aminokyseliny mohou být i ve výživě starších lidí, u kterých mohou zpomalit ztrátu svalové hmoty, nebo mohou napomoci prevenci tohoto problému, což z proteinového materiálu z pšeničných otrub dělá výživově významný proteinový doplněk či fortifikant. Vzhledem k cereálnímu původu pšeničných otrub obsahuje získaný proteinový materiál i relativně vysoké množství lysinu [53].

Minoritně zastoupené složky PKPO jsou voda, popel, fenolické látky a minerální látky. Obsah vody je závislý na procesu sušení proteinového koncentrátu a ovlivňuje jeho trvanlivost. Zbytkový obsah vody v proteinovém izolátu z pšeničných otrub po lyofilizaci byl 8,04 ± 0,20 %, což ukazuje na efektivní způsob dehydratace a lze tak očekávat i relativně dlouhou dobu trvanlivosti proteinového prášku. Množství popela v PKPO bylo 1,21 ± 0,02 %, což je výrazně méně než v surových pšeničných otrubách. Za podmínek pH-shift metody izolace proteinů se minerální látky rozpouští a dochází tak k jejich částečné separaci. Kyselé prostředí používané pro precipitaci proteinů navíc může zlepšit rozpustnost některých uhličitanů, fosforečnanů nebo síranů [73, 77, 78]. Jedinou fenolickou kyselinou, jejíž množství se v proteinovém izolátu pohybovalo nad limitem detekce použité analytické metody, byla kyselina ferulová (KF). Koncentrace KF v izolátu byla 53,0 ± 1,2 μg/g. KF je jedním z prekurzorů ligninu. Během procesu přípravy proteinového koncentrátu z PO není KF od proteinů zcela separována, její přítomnost může být však pozitivní [79].

Další z nutričních charakteristik PKPO je jeho **stravitelnost**. Izolace proteinového materiálu vedla ke snížení zastoupení antinutričních látek v analyzovaném materiálu, což se projevilo ve zvýšení celkové stravitelnosti proteinů. In vitro stravitelnost PKPO byla 93,4 ± 0,2 %, proteiny v pšeničných otrubách byly za stejným podmínek stravitelné pouze z 48,4 ± 0,2 %. Zvýšení stravitelnosti nejen rostlinných proteinů je předmětem současného výzkumu na celém světě. Kromě aplikace různých fyzikálních činitelů (např. vaření, autoklávování, klíčení nebo fermentace) [80], se často využívá také působení různých enzymů [81].

Na základě stravitelnosti a aminokyselinového profilu bylo vypočteno **PDCAAS skóre**. Limitující aminokyselinou v PKPO je lysin, který jediný není zastoupen v množství, které pokrývá jeho denní nutriční nároky. PDCAAS skóre proteinového koncentrátu z PO má proto hodnotu 0,73. Mezi rostlinnými proteiny jsou z hlediska PDCAAS skóre nejvýznamnější izolované sójové proteiny, jejichž hodnoty se blíží 1 [82]. Mezi obilnými proteiny je lysin obvyklou limitující aminokyselinou, která zásadně snižuje PDCAAS skóre. Například proteiny ječmene mají PDCAAS skóre mezi 0,5–0,76 [29].

4.4 Transfer technologie izolace proteinů z pšeničných otrub do poloprovozních podmínek

Proces izolace proteinů z pšeničných otrub navržený v laboratoři byl ověřen ve velkoobjemovém měřítku celkem ve 4 variantách, popsaných v kapitole 3.3. Shrnutí výtěžnosti a zastoupení proteinů u jednotlivých variant je uvedeno v tabulce 5.

Tabulka 5 Srovnání výtěžnosti všech variant velkoobjemové izolace a laboratorní izolace proteinů z pšeničných otrub

		Celková výtěžnost [g/100 g]	Zastoupení proteinů [%]
Laboratorní izolace		9,04	82,98
Velkoobjemová izolace	1. varianta	8,42	58,49
	2. varianta	8,10	58,35
	3. varianta	8,68	68,39
	4. varianta	6,80	39,21

Celková výtěžnost proteinového materiálu se při velkoobjemových izolacích blížila výtěžnosti získané v laboratorních podmínkách – ve variantě 3 byla nižší pouze o necelé 0,36 g/100 g. Ztráty materiálu mohly být způsobeny manipulací prostřednictvím potrubí, usazováním v extrakčních zařízení nebo odstředivkách.

U žádné z velkoobjemových variant nebylo dosaženo takové čistoty proteinového izolátu, která by se blížila laboratorním výsledkům. Kvůli časovým prodlevám vznikajícím při přečerpávání suspenzí docházelo k masivnějšímu uvolňování škrobu z pšeničných otrub, případně k jeho degradaci, což vedlo k zisku proteinového materiálu s nižší čistotou. Navíc ve velkoobjemovém testování nebyla použita taková zařízení pro separaci fází, která by svou účinností dosahovala účinnosti laboratorních centrifug.

Nejlepší testovanou velkoobjemovou variantou byla varianta třetí, při které byl získán proteinový materiál s 68,4% obsahem bílkovin a jejíž celková výtěžnost byla 8,68 g/100 g. Zároveň byla díky velkoobjemovým testům ověřena také možnost zpracování dvojnásobného množství otrub v jednom cyklu (poměr 1:10) bez nutných kompromisů v technologii. Ukázalo se, že separace pomocí vysokoúčinné odstředivky (např. Aldec 10) bude nezbytná pro zisk produktu s vyšším zastoupením bílkovin. Zásadní vliv na složení produktu bude mít také celkový čas separace. Sprejové sušení se pro tento typ produktu jeví jako rychlejší a ekonomičtější varianta, ovšem bylo by dále nezbytné otestovat jeho vliv na kvalitu proteinových materiálů s nižším zastoupením kratších sacharidů.

4.5 Aplikace proteinového koncentrátu z pšeničných otrub v potravinářství

PKPO izolovaný původním postupem izolace protenů navržené technologie byl dále aplikovány v potravinářství za účelem zvýšení nutriční hodnoty potravin, konkrétně jogurtů a pečiva.

U **vysokoproteinových jogurtů** bylo díky přídavku PKPO zvýšeno množství sušiny (13,8 %), což vedlo ke zvýšení jejich kapacity zadržování vody, a tedy snížení rizika vzniku synereze. Mezi obsahem sušiny a mírou synereze byl zjištěn významný negativní korelační koeficient s hodnotou r = -0,891, který potvrzuje, že s narůstajícím množstvím sušiny u vzorků vysokoproteinových jogurtů klesá objem uvolněné syrovátky. Podle Tamimea a Deetha je pro komerční jogurty žádoucí obsah sušiny okolo 15 %, čehož se dosahuje buď přídavkem sušeného mléka či syrovátky nebo zakoncentrováním mléka (odpařování apod.) [83].

S ohledem na tokové parametry vysokoproteinových jogurtu stanovené pomocí reometru lze odhadovat, že se zvyšujícím se přídavkem PKPO může docházet k narušení tvorby a stability viskoelastické struktury. Tato struktura může být mechanicky málo odolná a nestabilní. Dle tokových vlastností lze ovšem také usuzovat, že takto připravené vysokoproteinové jogurty budou dobře žvýkatelné a snadno konzumovatelné. Výsledky cytometrické analýzy neprokázaly, že by měl přídavek PKPO signifikantní vliv na celkový počet nebo životaschopnost jogurtových bakterií v porovnání s referencí. Všechny vzorky obsahovaly více než 10^9 životaschopných buněk. U vzorků s přídavkem PKPO byl zaznamenán pouze malý pokles počtu buněk, což mohlo být způsobeno přítomností fenolických kyselin extrahovaných spolu s proteinem z pšeničných otrub. Je prokázané, že fenolické kyseliny inhibují růst gram-pozitivních kmenů laktobacilů [84].

Senzorická analýza jogurtů s přídavkem PKPO odhalila negativní senzorické vlastnosti PKPO, zejména hořkost a písčitost, které se mohou v potravinách projevit [85]. Dle výsledků korelační analýzy byl celkový dojem vzorků jogurtů signifikantně ovlivněn právě hořkostí ($r = -0{,}7933$), aroma ($r = 0{,}5789$) a krémovitostí ($r = 0{,}7489$). Všechny tyto deskriptory pak úzce souvisí s mírou fortifikace jogurtů PKPO, která také silně negativně korelovala s celkovým dojmem ($r = -0{,}8294$). Hodnotitelé udělovali krémovějším jogurtům s příjemným aroma a nižší hořkostí vyšší skóre celkového dojmu.

S cílem vylepšit celkový dojem jogurtů bylo v další fázi PKPO upraveno mletím, mícháním se sušeným mlékem nebo enkapsulací alginátem. Mletí PKPO na menší částice nevyřešilo nízké skóre deskriptoru krémovitosti jogurtu, naopak prohloubilo jeho hořkost, což vedlo i ke zhoršení celkového dojmu. Náhrada PKPO sušeným mlékem pozitivně ovlivnila senzorické parametry jogurtů, ovšem za cenu ztráty diverzity aminokyselinového profilu. Přítomnost sušeného mléka v jogurtu efektivně maskovala hořkost a přirozené obilné aroma PKPO a současně zlepšila texturní vlatsnosti jogurtu. Enkapsulace PKPO do alginátu pak vedla ke snížení písčitosti, hořkosti i maskování obilného aroma PKPO v jogurtu, díky alginátu byla zachována i bílá barva jogurtu.

Proteinový koncentrát z pšeničných otrub získaný navrženým postupem izolace byl použit pro výrobu vysokoproteinových směsí a následně také **vysokoproteinového pečiva**. Fortifikace pomocí proteinů vedla k přípravě proteinových směsí s obsahem bílkovin až přes 20 %. V případě fortifikace mouky T530 proteinovým koncentrátem z pšeničných otrub byl pozorován postupný nárůst hodnoty sedimentačního indexu, a tedy bobtnavosti směsi oproti samotné mouce. To může být způsobeno fortifikací mouky bílkovinami, které disponují vysokou retenční kapacitou vody. Z toho vyplývá, že vzniklé směsi by měly tendenci tvořit kompaktnější pečivo, například chleby celozrnného typu.

Farinografická analýza byla provedena u směsí mouky s 5% přídavkem PKPO za účelem definování vlivu substituovaných proteinů na reologické vlastnosti vytvořených těst. Vzorek směsi s 5 % PKPO měl v porovnání s referenční moukou T530 vyšší hodnotu absorpce vody, což bylo pozorováno také po přídavku extrudovaných pšeničných otrub do chlebového těsta [86]. Přídavkem PKPO naopak nebyla ovlivněna doba vývoje těsta, avšak snížila se jeho stabilita. To bylo zřejmě způsobeno oslabením viskoelastické struktury lepku. Měknutí těsta směsi s 5% PKPO mělo po dobu 10 min stejný průběh jako těsta referenční mouky T530, po 12 minutách však bylo pozorováno významné zpomalení měknutí.

Extenzografická analýza byla provedena na směsích mouky a PKPO (5, 10 a 15% přídavek) za účelem ověření vlivu bílkovin na reologické vlastnosti vytvořených těst. Energie těsta s rostoucím přídavkem PKPO klesala, což vypovídá o zhoršování jeho kvality a stability. Vyšší

odpor těsta byl pak pozorován u vzorku směsi s 5% přídavkem PKPO, odpor těsta u vzorků s vyššími přídavky pak opět klesal. Tyto změny poukazují na křehnutí těsta v případě vyšší substituce PKPO a snížení jeho mechanické odolnosti. Tažnost těsta se se zvyšujícím se přídavkem PKPO významně snižovala. Příčina ztráty pružnosti těsta po přídavku PKPO může být způsobena přítomností polysacharidů, které ovlivňují redistribuci vody a tím brání vzniku pevné struktury lepku s charakteristickými viskoelastickými vlastnostmi [72]. Z hodnot poměrového čísla těst s přídavkem PKPO lze říct, že se tyto směsi dle extenzografické analýzy chovají jako speciální mouky, jejichž vlastnosti se od klasické pšeničné mouky zásadně odlišují.

V rámci senzorické analýzy byly hodnoceny texturní, chuťové vlastnosti a aroma vzorků chleba s různými přídavky PKPO a SP. Aroma a chuť byly zásadně ovlivněny přídavkem proteinů, přičemž vyšší přídavky PKPO zhoršovaly vnímání aroma i hořkosti vzorků. Vzorek pečiva s 5% přídavkem PKPO byl hodnocen nejlépe, bez výrazných senzorických defektů.

5 ZÁVĚR

Předložená dizertační práce se věnuje valorizaci pšeničných otrub, konkrétně izolaci proteinové frakce a její následné využití ve výrobě vysokoproteinových potravin. Pšeničné otruby jsou lignocelulózový materiál složen převážně z polysacharidů. Na základě analýz bylo stanoveno, že PO obsahují přibližně 19 % bílkovin, 8 % vody, 3 % tuků a 6 % nespalitelných látek (popel). Na základě SDS-PAGE analýzy proteinů bylo dále zjištěno, že tyto bílkoviny jsou dle jejich molekulové hmotnosti odlišné od bílkovin pšeničného endospermu, který se v potravinářství běžně používá.

Izolace proteinů z pšeničných otrub byla provedena metodou pH-shift. Proteiny byly v první fázi extrahovány z pšeničných otrub pomocí 0,05 M NaOH za stálého míchání po dobu 2 hodin v poměru 1:20. Poté byl pevný podíl oddělen pomocí centrifugace (8000 rcf, 10 min, laboratorní teplota), pH supernatantu bylo upraveno na hodnotu 4 ± 0,05. Po 30 minutách byl precipitovaný proteinový materiál opět oddělen centrifugací, a nakonec vysušen pomocí lyofilizace. Pomocí tohoto postupu izolace bylo izolováno 9 g proteinového materiálu ze 100 g otrub s 83% obsahem bílkovin.

Za účelem zvýšení výtěžnosti a zastoupení bílkovin v izolátu byly v původně navrženém postupu izolace provedeny modifikace, které se zaměřovaly na předúpravu pšeničných otrub, změny ve fázi extrakce proteinů nebo precipitace proteinů. Nejvyššího nárůstu ve výtěžnosti bylo dosaženo při předúpravě pšeničných otrub pomocí celuláz – výtěžnost proteinového materiálu vzrostla na 15 g/100 g s 87% čistotou bílkovin. Ostatní modifikace procesu izolace výrazně neovlivnily výtěžnost proteinů. Změny podmínek fází extrakce a precipitace naopak vedly k extrakci neproteinových složek pšeničných otrub, což mělo za následek snížení zastoupení bílkovin v izolovaném proteinovém materiálu. Molekulové hmotnosti izolovaných proteinů se dle stanovení pomocí SDS-PAGE podobaly molekulovým hmotnostem proteinů pšeničných otrub, což poukazuje na efektivní proces izolace. Fragmentace a zmenšení molekulové hmotnosti proteinů byla pozorována pouze při extrakci 0,35 M NaOH.

Vzhledem k výrobním nákladům byl pro další účely používán materiál získaný původním postupem izolace. Za účelem jeho použití v potravinářství byla nejprve provedena jeho důkladná charakterizace. Vzhledem k 83,0 ± 1,6 % obsahu bílkovin lze materiál klasifikovat jako proteinový koncentrát. Mezi minoritně zastoupené složky patří voda, fenolické kyseliny a anorganické látky. Izolovaný protein je bohatý na sodík a fosfor. Analýza aminokyselinového profilu ukázala, že extrahovaný materiál obsahuje všechny esenciální aminokyseliny, což z něj činí nutričně hodnotný doplněk. Nicméně, stejně jako mnoho rostlinných bílkovin, má ve srovnání s živočišnými bílkovinami nižší hladiny esenciálních aminokyselin, zejména lysinu, methioninu a tryptofanu. Stravitelnost proteinů pšeničných otrub je obecně nízká (48,4 ± 0,2 %), ale proces izolace zvýšil stravitelnost na 93,4 ± 0,2 % díky oddělení antinutričních látek. Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score (PDCAAS) pro izolát je 0,73, přičemž limitující aminokyselinou je lysin. Toto skóre je srovnatelné s jinými rostlinnými proteiny, ale nižší než u sójových izolátů.

Při velkoobjemovém ověřování technologie pro izolaci proteinů z pšeničných otrub navržené v laboratoři byly celkem testovány 4 varianty. První varianta využívala vyšší poměr otrub k extrakčnímu činidlu (1:20) a prodlouženou dobu extrakce (2 hodiny). Výtěžnost byla 8,42 kg/100 kg, s nižším obsahem bílkovin (58,5 %) oproti laboratorním výsledkům. Snížení koncentrace proteinů bylo přičítáno méně účinné centrifugaci a vyšším ztrátám během procesu.

Druhá varianta testovala poměr otrub a činidla 1:10, což umožnilo zpracování většího množství otrub (100 kg) v jednom cyklu. Výsledná výtěžnost byla 8,1 kg proteinového

materiálu ze 100 kg otrub s 58,35% zastoupením bílkovin. Tento poměr zlepšil ekonomickou efektivitu procesu, ale nevedl k výraznému zlepšení výtěžnosti. Třetí varianta používala optimalizované nastavení pro odstředění, což vedlo k mírnému zvýšení výtěžnosti na 8,68 kg/100 kg a zvýšení obsahu bílkovin na 68,39 %. Zkrátila se také doba izolace na 38,7 hodiny. Tato varianta prokázala nejlepší výsledky v testování. Čtvrtá varianta zahrnovala použití sedimentačního tanku místo dekantérové odstředivky a sprejové sušení místo lyofilizace. Ačkoliv výtěžnost přesáhla 10 %, došlo k výraznému snížení obsahu bílkovin na přibližně 40 %, kvůli nedokonalému oddělování škrobu. Velkoobjemovými testy bylo potvrzeno, že použití vysoce účinné odstředivky je klíčové pro dosažení vyšší koncentrace bílkovin. Sprejové sušení se ukázalo jako rychlejší a ekonomičtější, ale je třeba dále zkoumat jeho vliv na kvalitu produktu s nižším obsahem sacharidů.

Získaný proteinový materiál z pšeničných otrub byl pak použit pro výrobu vysokoproteinových jogurtů a pečiva. Jogurt je oblíbený mléčný výrobek známý pro svou chuť a nutriční výhody. Vytváření verzí se zvýšeným obsahem bílkovin je však složité kvůli tradičním přísadám a postupům. Syrovátkový protein se běžně používá ke zvýšení obsahu bílkovin. Přídavek rostlinných bílkovin, například sójových nebo hrachových, může zásadně ovlivnit texturu, viskozitu a chuť jogurtu. Byly vytvořeny vzorky jogurtu s 2, 5 a 10% přídavkem PKPO, jako reference sloužil jogurt vyrobený stejným způsobem, jen bez přídavku proteinů. Přítomnost bílkovin v jogurtu ovlivnila jejich reologické vlastnosti a schopnost zadržovat vodu. Jogurty s přidanými proteiny se chovaly jako nenewtonské tekutiny, vykazovaly pseudoplasticitu a tixotropní chování. Přidání otrubového proteinu ovlivnilo viskozitu a stabilitu jogurtu s vyšší počáteční a konečnou viskozitou ve srovnání s referenčním. Vyšší obsah bílkovin zvýšil podíl sušiny jogurtu, a tedy snížil riziko synereze, podobně jako při přídavku sušeného mléka nebo syrovátky. Přítomnost otrubového proteinu mírně snížila počet bakterií, ale neměla významný vliv na jejich celkovou životaschopnost. U jogurtů s vysokým přídavkem bílkovin z otrub byly zaznamenány senzorické vady, jako je snížená krémovitost a zvýšená zrnitost. Přídavek proteinů z otrub také vedl ke vzniku nežádoucí hořké chuti a obilného aroma jogurtů. Tyto senzorické defekty však bylo možné minimalizovat například enkapsulací proteinu do alginátu nebo přídavkem proteinů mléčných.

Také popularita vysokoproteinového pečiva se zvyšuje, přídavek bílkovin do pečících směsí však může ovlivnit jak proces výroby, tak vlastnosti finálních produktů. Na tyto změny má vliv jak typ proteinu, tak přidávané množství. Byly vytvořeny pekařské směsi s 5, 10 a 15% přídavkem PKPO, které byly porovnávány se směsmi s přídavkem syrovátkového proteinu a referencí bez přídavku proteinů. Množství přidávaného proteinů ovlivnilo jak obsah lepku, tak vlastnosti vzniklého těsta. Farinografické a extenzografické testy ukázaly, že přidání proteinu z pšeničných otrub zvyšuje pevnost těsta, které se však stává křehčí a málo elastické v porovnání s referencí. Přídavek syrovátkového proteinu naopak snižuje zadržování vody. Senzorická analýza pečiva ukázala, že vyšší přídavek bílkovin z otrub vedl ke vzniku pevnější a kompaktnější struktury, pečivo se syrovátkovým proteinem bylo měkčí. Přítomnost proteinů z otrub také vedla k rozvoji obilného aroma a hořké chuti. Se zvyšujícím se přídavkem tohoto proteinu se celkové hodnocení pečiva snižovalo.

6 CITACE

[1] R. C. Kuhad a A. Singh, „Lignocellulose Biotechnology: Current and Future Prospects", *Critical Reviews in Biotechnology*, roč. 13, č. 2, s. 151–172, led. 1993, doi: 10.3109/07388559309040630.

[2] N. Belc, G. Mustatea, L. Apostol, S. Iorga, V.-N. Vlăduţ, a C. Mosoiu, „Cereal supply chain waste in the context of circular economy", *E3S Web Conf.*, roč. 112, s. 03031, 2019, doi: 10.1051/e3sconf/201911203031.

[3] B. Gagnon a S. Berrouard, „Effects of several organic fertilizers on growth of greenhouse tomato transplants", *Can. J. Plant Sci.*, roč. 74, č. 1, s. 167–168, led. 1994, doi: 10.4141/cjps94-035.

[4] R. Badar a S. A. Qureshi, „Utilization of composted agricultural waste as organic fertilizer for the growth promotion of sunflower plants".

[5] F. Çiçek, D. Özer, A. Özer, a A. Özer, „Low cost removal of reactive dyes using wheat bran", *Journal of Hazardous Materials*, roč. 146, č. 1–2, s. 408–416, čvc. 2007, doi: 10.1016/j.jhazmat.2006.12.037.

[6] K. Kaya, E. Pehlivan, C. Schmidt, a M. Bahadir, „Use of modified wheat bran for the removal of chromium(VI) from aqueous solutions", *Food Chemistry*, roč. 158, s. 112–117, zář. 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.02.107.

[7] S. Das, S. Singh, a S. Garg, „Evaluation of Wheat Bran as a Biosorbent for Potential Mitigation of Dye Pollution in Industrial Waste Waters", *Orient. J. Chem*, roč. 35, č. 5, s. 1565–1573, lis. 2019, doi: 10.13005/ojc/350514.

[8] M. Farajzadeh a A. Monji, „Adsorption characteristics of wheat bran towards heavy metal cations", *Separation and Purification Technology*, roč. 38, č. 3, s. 197–207, zář. 2004, doi: 10.1016/j.seppur.2003.11.005.

[9] European Parliament. Directorate General for Parliamentary Research Services., *Alternative protein sources for food and feed*. LU: Publications Office, 2024. Viděno: 31. červenec 2024. [Online]. Dostupné z: https://data.europa.eu/doi/10.2861/999488

[10] C. J. O'Connor, D. Sun, B. G. Smith, a L. d. Melton, „The Inhibitory Effects of Brans and Their Aqueous Extracts on the Lipolysis of Tributyrin Catalyzed by Calf Pregastric Lipase", *Journal of Food Science*, roč. 68, č. 5, s. 1818–1825, čer. 2003, doi: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb12336.x.

[11] R. R. Balandrán-Quintana, J. N. Mercado-Ruiz, a A. M. Mendoza-Wilson, „Wheat Bran Proteins: A Review of Their Uses and Potential", *Food Reviews International*, roč. 31, č. 3, s. 279–293, čvc. 2015, doi: 10.1080/87559129.2015.1015137.

[12] L. Kaprelyants, L. Pozhitkova, a M. Buzhylov, „APPLICATION OF CO-BIOPROCESSING TECHNIQUES (ENZYMATIC HYDROLYSIS AND FERMANTATION) FOR IMPROVING THE NUTRITIONAL VALUE OF WHEAT BRAN AS FOOD FUNCTIONAL INGREDIENS", *EUREKA: Life Sciences*, roč. 5, s. 31–45, zář. 2019, doi: 10.21303/2504-5695.2019.00992.

[13] L. Stevenson, F. Phillips, K. O'sullivan, a J. Walton, „Wheat bran: its composition and benefits to health, a European perspective", *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, roč. 63, č. 8, s. 1001–1013, pro. 2012, doi: 10.3109/09637486.2012.687366.

[14] J. E. Sosa-Hernández *et al.*, „Mexican Microalgae Biodiversity and State-Of-The-Art Extraction Strategies to Meet Sustainable Circular Economy Challenges: High-Value Compounds and Their Applied Perspectives", *Marine Drugs*, roč. 17, č. 3, s. 174, bře. 2019, doi: 10.3390/md17030174.

[15] J. Cristóbal, C. Caldeira, S. Corrado, a S. Sala, „Techno-economic and profitability analysis of food waste biorefineries at European level", *Bioresource Technology*, roč. 259, s. 244–252, čvc. 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2018.03.016.

[16] W. H. Idris, E. E. Babiker, a A. H. El Tinay, „Fractionation, solubility and functional properties of wheat bran proteins as influenced by pH and/or salt concentration", *Nahrung*, roč. 47, č. 6, s. 425–429, pro. 2003, doi: 10.1002/food.200390094.
[17] P. Shewry, „What Is Gluten—Why Is It Special?", *Front. Nutr.*, roč. 6, s. 101, čvc. 2019, doi: 10.3389/fnut.2019.00101.
[18] A. Kårlund, C. Gómez-Gallego, A. M. Turpeinen, O.-M. Palo-oja, H. El-Nezami, a M. Kolehmainen, „Protein Supplements and Their Relation with Nutrition, Microbiota Composition and Health: Is More Protein Always Better for Sportspeople?", *Nutrients*, roč. 11, č. 4, s. 829, dub. 2019, doi: 10.3390/nu11040829.
[19] N. M. Anson, Y. M. Hemery, A. Bast, a G. R. M. M. Haenen, „Optimizing the bioactive potential of wheat bran by processing", *Food Funct.*, roč. 3, č. 4, s. 362, 2012, doi: 10.1039/c2fo10241b.
[20] X. Yan, R. Ye, a Y. Chen, „Blasting extrusion processing: The increase of soluble dietary fiber content and extraction of soluble-fiber polysaccharides from wheat bran", *Food Chemistry*, roč. 180, s. 106–115, srp. 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.01.127.
[21] M. Abbas, „A Quantitative Analysis And Comparison Of Nitrogen, Potassium And Phosphorus In Rice Husk And Wheat Bran Samples", *PAB*, roč. 1, č. 1, s. 14–15, čer. 2012, doi: 10.19045/bspab.2012.11003.
[22] C. Raghu Babu, H. Ketanapalli, S. K. Beebi, a V. C. Kolluru, „Wheat Bran-Composition and Nutritional Quality: A Review", *aibm*, roč. 09, č. 1, dub. 2018, doi: 10.19080/AIBM.2018.09.555754.
[23] S. Apprich *et al.*, „Wheat bran-based biorefinery 2: Valorization of products", *LWT - Food Science and Technology*, roč. 56, č. 2, s. 222–231, kvě. 2014, doi: 10.1016/j.lwt.2013.12.003.
[24] M. S. Celiktas, C. Kirsch, a I. Smirnova, „Cascade processing of wheat bran through a biorefinery approach", *Energy Conversion and Management*, roč. 84, s. 633–639, srp. 2014, doi: 10.1016/j.enconman.2014.04.039.
[25] L. Favaro, M. Basaglia, a S. Casella, „Processing wheat bran into ethanol using mild treatments and highly fermentative yeasts", *Biomass and Bioenergy*, roč. 46, s. 605–617, lis. 2012, doi: 10.1016/j.biombioe.2012.07.001.
[26] R. Cripwell *et al.*, „Utilisation of wheat bran as a substrate for bioethanol production using recombinant cellulases and amylolytic yeast", *Applied Energy*, roč. 160, s. 610–617, pro. 2015, doi: 10.1016/j.apenergy.2015.09.062.
[27] A. Katileviciute, G. Plakys, A. Budreviciute, K. Onder, S. Damiati, a R. Kodzius, „A Sight to Wheat Bran: High Value-Added Products", *Biomolecules*, roč. 9, č. 12, s. 887, pro. 2019, doi: 10.3390/biom9120887.
[28] P. Thornton, H. Gurney-Smith, a E. Wollenberg, „Alternative sources of protein for food and feed", *Current Opinion in Environmental Sustainability*, roč. 62, s. 101277, čer. 2023, doi: 10.1016/j.cosust.2023.101277.
[29] S. R. Hertzler, J. C. Lieblein-Boff, M. Weiler, a C. Allgeier, „Plant Proteins: Assessing Their Nutritional Quality and Effects on Health and Physical Function", *Nutrients*, roč. 12, č. 12, s. 3704, lis. 2020, doi: 10.3390/nu12123704.
[30] Z. Gao *et al.*, „Effect of alkaline extraction pH on structure properties, solubility, and beany flavor of yellow pea protein isolate", *Food Research International*, roč. 131, s. 109045, kvě. 2020, doi: 10.1016/j.foodres.2020.109045.
[31] S. Plazzotta, M. Moretton, S. Calligaris, a L. Manzocco, „Physical, chemical, and techno-functional properties of soy okara powders obtained by high pressure homogenization and alkaline-acid recovery", *Food and Bioproducts Processing*, roč. 128, s. 95–101, čvc. 2021, doi: 10.1016/j.fbp.2021.04.017.

[32] D. Carullo *et al.*, „Effect of pulsed electric fields and high pressure homogenization on the aqueous extraction of intracellular compounds from the microalgae Chlorella vulgaris", *Algal Research*, roč. 31, s. 60–69, dub. 2018, doi: 10.1016/j.algal.2018.01.017.
[33] National Research Council, Commission on Life Sciences, Food and Nutrition Board, a Subcommittee on the Tenth Edition of the Recommended Dietary Allowance, *Recommended Dietary Allowances (10th Edition)*. National Academies Press.
[34] M. Çelik, M. Güzel, a M. Yildirim, „Effect of pH on protein extraction from sour cherry kernels and functional properties of resulting protein concentrate", *J Food Sci Technol*, roč. 56, č. 6, s. 3023–3032, čer. 2019, doi: 10.1007/s13197-019-03785-8.
[35] L. Dimina, D. Rémond, J.-F. Huneau, a F. Mariotti, „Combining Plant Proteins to Achieve Amino Acid Profiles Adapted to Various Nutritional Objectives—An Exploratory Analysis Using Linear Programming", *Front. Nutr.*, roč. 8, s. 809685, úno. 2022, doi: 10.3389/fnut.2021.809685.
[36] S. H. M. Gorissen *et al.*, „Protein content and amino acid composition of commercially available plant-based protein isolates", *Amino Acids*, roč. 50, č. 12, s. 1685–1695, pro. 2018, doi: 10.1007/s00726-018-2640-5.
[37] I. Joye, „Protein Digestibility of Cereal Products", *Foods*, roč. 8, č. 6, s. 199, čer. 2019, doi: 10.3390/foods8060199.
[38] M. Carbonaro, P. Maselli, a A. Nucara, „Relationship between digestibility and secondary structure of raw and thermally treated legume proteins: a Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study", *Amino Acids*, roč. 43, č. 2, s. 911–921, srp. 2012, doi: 10.1007/s00726-011-1151-4.
[39] N. Mahmood *et al.*, „Effects of emerging food pretreatment and drying techniques on protein structures, functional and nutritional properties: An updated review", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, s. 1–17, čer. 2023, doi: 10.1080/10408398.2023.2212302.
[40] H. Kato, K. Suzuki, M. Bannai, a D. R. Moore, „Protein Requirements Are Elevated in Endurance Athletes after Exercise as Determined by the Indicator Amino Acid Oxidation Method", *PLoS ONE*, roč. 11, č. 6, s. e0157406, čer. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0157406.
[41] K. G. Duodu, J. R. N. Taylor, P. S. Belton, a B. R. Hamaker, „Factors affecting sorghum protein digestibility", *Journal of Cereal Science*, roč. 38, č. 2, s. 117–131, zář. 2003, doi: 10.1016/S0733-5210(03)00016-X.
[42] Weltgesundheitsorganisation, FAO, a Vereinte Nationen, Ed., *Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation ; [Geneva, 9 - 16 April 2002]*. in WHO technical report series, no. 935. Geneva: WHO, 2007.
[43] A. Hewage, O. O. Olatunde, C. Nimalaratne, M. Malalgoda, R. E. Aluko, a N. Bandara, „Novel Extraction technologies for developing plant protein ingredients with improved functionality", *Trends in Food Science & Technology*, roč. 129, s. 492–511, lis. 2022, doi: 10.1016/j.tifs.2022.10.016.
[44] Z. Usmani *et al.*, „Lignocellulosic biorefineries: The current state of challenges and strategies for efficient commercialization", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, roč. 148, s. 111258, zář. 2021, doi: 10.1016/j.rser.2021.111258.
[45] D. M. Waters, F. Jacob, J. Titze, E. K. Arendt, a E. Zannini, „Fibre, protein and mineral fortification of wheat bread through milled and fermented brewer's spent grain enrichment", *Eur Food Res Technol*, roč. 235, č. 5, s. 767–778, lis. 2012, doi: 10.1007/s00217-012-1805-9.
[46] A. Singhal, A. C. Karaca, R. Tyler, a M. Nickerson, „Pulse Proteins: From Processing to Structure-Function Relationships", in *Grain Legumes*, A. K. Goyal, Ed., InTech, 2016. doi: 10.5772/64020.
[47] H. Stone, „Example food: What are its sensory properties and why is that important?", *npj Sci Food*, roč. 2, č. 1, s. 11, čer. 2018, doi: 10.1038/s41538-018-0019-3.

[48] M. A. I. Schutyser, P. J. M. Pelgrom, A. J. Van Der Goot, a R. M. Boom, „Dry fractionation for sustainable production of functional legume protein concentrates", *Trends in Food Science & Technology*, roč. 45, č. 2, s. 327–335, říj. 2015, doi: 10.1016/j.tifs.2015.04.013.
[49] F. Chemat *et al.*, „Review of Alternative Solvents for Green Extraction of Food and Natural Products: Panorama, Principles, Applications and Prospects", *Molecules*, roč. 24, č. 16, s. 3007, srp. 2019, doi: 10.3390/molecules24163007.
[50] „Market insights on European plant-based sales 2020-2022". The Good Food Institute Europe, 2022. [Online]. Dostupné z: https://gfieurope.org/market-insights-on-european-plant-based-sales-2020-2022/?gad_source=1&gclid=Cj0KCQjwv7O0BhDwARIsAC0sjWNC92E_1nE7ndUUwt0TXgmugUrKLI9PKZJ6IAZoBR6dFW-om6VVYtsaApYcEALw_wcB
[51] N.-G. Wunsch, „Value of the plant-based food market worldwide from 2020 to 2030". Statista, 2024. [Online]. Dostupné z: https://www.statista.com/statistics/1280394/global-plant-based-food-market-value/#statisticContainer
[52] M. Tan, M. A. Nawaz, a R. Buckow, „Functional and food application of plant proteins – a review", *Food Reviews International*, roč. 39, č. 5, s. 2428–2456, čvc. 2023, doi: 10.1080/87559129.2021.1955918.
[53] K. P. Vogel, V. A. Johnson, a P. J. Mattern, „Protein and Lysine Contents of Endosperm and Bran of the Parents and Progenies of Crosses of Common Wheat [1]", *Crop Science*, roč. 18, č. 5, s. 751–754, zář. 1978, doi: 10.2135/cropsci1978.0011183X001800050014x.
[54] F. Boukid, „The realm of plant proteins with focus on their application in developing new bakery products", in *Advances in Food and Nutrition Research*, roč. 99, Elsevier, 2022, s. 101–136. doi: 10.1016/bs.afnr.2021.11.001.
[55] A. Hoehnel, C. Axel, J. Bez, E. K. Arendt, a E. Zannini, „Comparative analysis of plant-based high-protein ingredients and their impact on quality of high-protein bread", *Journal of Cereal Science*, roč. 89, s. 102816, zář. 2019, doi: 10.1016/j.jcs.2019.102816.
[56] S. B. Laugesen, S. L. Dethlefsen, I. L. Petersen, a M. D. Aaslyng, „Texturized Vegetable Protein as a Source of Protein Fortification of Wheat Buns", *Foods*, roč. 11, č. 22, s. 3647, lis. 2022, doi: 10.3390/foods11223647.
[57] G. Osipova, S. Koryachkina, V. Koryachkin, T. Seregina, a A. Zhugina, „Effects of protein-containing additives on pasta quality and biological value", *Foods and Raw Materials*, s. 60–66, říj. 2019, doi: 10.21603/2308-4057-2019-1-60-66.
[58] K. Wang, C. J. Pozniak, Y. Ruan, a B. X. Fu, „Unveiling the impact of durum wheat protein quantity and quality on textural properties and microstructure of cooked pasta", *Cereal Chem*, roč. 100, č. 2, s. 484–499, bře. 2023, doi: 10.1002/cche.10627.
[59] G. Kaur, S. Sharma, H. P. S. Nagi, a P. S. Ranote, „Enrichment of pasta with different plant proteins", *J Food Sci Technol*, roč. 50, č. 5, s. 1000–1005, říj. 2013, doi: 10.1007/s13197-011-0404-2.
[60] A. A. Zaky, A. S. Hussein, S. Mostafa, a A. M. Abd El-Aty, „Impact of Sunflower Meal Protein Isolate Supplementation on Pasta Quality", *Separations*, roč. 9, č. 12, s. 429, pro. 2022, doi: 10.3390/separations9120429.
[61] M. C. Messia, F. Cuomo, L. Falasca, M. C. Trivisonno, E. De Arcangelis, a E. Marconi, „Nutritional and Technological Quality of High Protein Pasta", *Foods*, roč. 10, č. 3, s. 589, bře. 2021, doi: 10.3390/foods10030589.
[62] I. S. Roland, M. Aguilera-Toro, S. D.-H. Nielsen, N. A. Poulsen, a L. B. Larsen, „Processing-Induced Markers in Proteins of Commercial Plant-Based Drinks in Relation to Compositional Aspects", *Foods*, roč. 12, č. 17, s. 3282, zář. 2023, doi: 10.3390/foods12173282.
[63] C. T. Arbach, I. A. Alves, M. R. Serafini, R. Stephani, Í. T. Perrone, a J. De Carvalho Da Costa, „Recent patent applications in beverages enriched with plant proteins", *npj Sci Food*, roč. 5, č. 1, s. 28, lis. 2021, doi: 10.1038/s41538-021-00112-4.

[64] M. Appiani, C. Cattaneo, a M. Laureati, „Sensory properties and consumer acceptance of plant-based meat, dairy, fish and eggs analogs: a systematic review", *Front. Sustain. Food Syst.*, roč. 7, s. 1268068, říj. 2023, doi: 10.3389/fsufs.2023.1268068.
[65] H. Staroszczyk a Z. E. Sikorski, Ed., *Chemical and functional properties of food components*, Fourth edition. in Chemical and Functional Properties of Food Components Series. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2023.
[66] A. Cosson, I. Souchon, J. Richard, N. Descamps, a A. Saint-Eve, „Using Multiple Sensory Profiling Methods to Gain Insight into Temporal Perceptions of Pea Protein-Based Formulated Foods", *Foods*, roč. 9, č. 8, s. 969, čvc. 2020, doi: 10.3390/foods9080969.
[67] E. Curti, E. Carini, G. Bonacini, G. Tribuzio, a E. Vittadini, „Effect of the addition of bran fractions on bread properties", *Journal of Cereal Science*, roč. 57, č. 3, s. 325–332, kvě. 2013, doi: 10.1016/j.jcs.2012.12.003.
[68] N. T. Alzuwaid, M. Sissons, B. Laddomada, a C. M. Fellows, „Nutritional and functional properties of durum wheat bran protein concentrate", *Cereal Chem*, roč. 97, č. 2, s. 304–315, bře. 2020, doi: 10.1002/cche.10246.
[69] G.-W. Jung, S. Uddin, K.-T. Kwon, a B.-S. Chun, „Comparison of supercritical and near-critical carbon dioxide extraction of carotenoid enriched wheat bran oil".
[70] M. P. Yadav *et al.*, „Extraction and characterization of lipids and phenolic compounds from the brans of different wheat varieties", *Food Hydrocolloids*, roč. 117, s. 106734, srp. 2021, doi: 10.1016/j.foodhyd.2021.106734.
[71] C. Li, M. Stump, W. Wu, a Y. Li, „Exploring the chemical composition, antioxidant potential, and bread quality effects of the nutritional powerhouse: Wheat bran – A mini-review", *Journal of Agriculture and Food Research*, roč. 14, s. 100898, pro. 2023, doi: 10.1016/j.jafr.2023.100898.
[72] Q. Li, R. Liu, T. Wu, M. Wang, a M. Zhang, „Soluble Dietary Fiber Fractions in Wheat Bran and Their Interactions with Wheat Gluten Have Impacts on Dough Properties", *J. Agric. Food Chem.*, roč. 64, č. 46, s. 8735–8744, lis. 2016, doi: 10.1021/acs.jafc.6b03451.
[73] A. N. Uttam, S. Padte, G. J. V. Raj, K. Govindaraju, a S. Kumar, „Isolation, characterization, and utilization of wheat bran protein fraction for food application", *J Food Sci Technol*, roč. 60, č. 2, s. 464–473, úno. 2023, doi: 10.1007/s13197-022-05617-8.
[74] P. Socha *et al.*, „Comparable efficiency of different extraction protocols for wheat and rye prolamins", *Potr. S. J. F. Sci.*, roč. 10, č. 1, s. 139–144, led. 2016, doi: 10.5219/540.
[75] B. Brzozowski, K. Stasiewicz, M. Ostolski, a M. Adamczak, „Reducing Immunoreactivity of Gliadins and Coeliac-Toxic Peptides Using Peptidases from L. acidophilus 5e2 and A. niger", *Catalysts*, roč. 10, č. 8, s. 923, srp. 2020, doi: 10.3390/catal10080923.
[76] S. Duttagupta, N. Krishna Roy, a G. Dey, „Efficacy of amino acids in sports nutrition-review of clinical evidences", *Food Research International*, roč. 187, s. 114311, čvc. 2024, doi: 10.1016/j.foodres.2024.114311.
[77] P. J. Davis a S. C. Williams, „Protein modification by thermal processing", *Allergy*, roč. 53, č. s46, s. 102–105, říj. 1998, doi: 10.1111/j.1398-9995.1998.tb04975.x.
[78] A. M. M. D. Silva, F. S. Almeida, M. F. D. Silva, R. Goldbeck, a A. C. K. Sato, „How do pH and temperature influence extraction yield, physicochemical, functional, and rheological characteristics of brewer spent grain protein concentrates?", *Food and Bioproducts Processing*, roč. 139, s. 34–45, kvě. 2023, doi: 10.1016/j.fbp.2023.03.001.
[79] Y. Z. Na *et al.*, „Antioxidant and Anti-inflammatory Capacity of Ferulic Acid Released from Wheat Bran by Solid-state Fermentation of Aspergillus niger".
[80] A. G. A. Sá a J. D. House, „Protein quality of cereals: Digestibility determination and processing impacts", *Journal of Cereal Science*, roč. 117, s. 103892, kvě. 2024, doi: 10.1016/j.jcs.2024.103892.

[81] S. Y. Lee *et al.*, „Methods for improving meat protein digestibility in older adults", *J Anim Sci Technol*, roč. 65, č. 1, s. 32–56, led. 2023, doi: 10.5187/jast.2023.e6.
[82] G. J. Hughes, D. J. Ryan, R. Mukherjea, a C. S. Schasteen, „Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scores (PDCAAS) for Soy Protein Isolates and Concentrate: Criteria for Evaluation", *J. Agric. Food Chem.*, roč. 59, č. 23, s. 12707–12712, pro. 2011, doi: 10.1021/jf203220v.
[83] A. Y. Tamime a H. C. Deeth, „Yogurt: Technology and Biochemistry", *Journal of Food Protection*, roč. 43, č. 12, s. 939–977, pro. 1980, doi: 10.4315/0362-028X-43.12.939.
[84] C. Cueva *et al.*, „Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria", *Research in Microbiology*, roč. 161, č. 5, s. 372–382, čer. 2010, doi: 10.1016/j.resmic.2010.04.006.
[85] K. Maehashi a L. Huang, „Bitter peptides and bitter taste receptors", *Cell. Mol. Life Sci.*, roč. 66, č. 10, s. 1661–1671, kvě. 2009, doi: 10.1007/s00018-009-8755-9.
[86] M. Gómez, S. Jiménez, E. Ruiz, a B. Oliete, „Effect of extruded wheat bran on dough rheology and bread quality", *LWT - Food Science and Technology*, roč. 44, č. 10, s. 2231–2237, pro. 2011, doi: 10.1016/j.lwt.2011.06.006.