



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

AUTHOR

Ing. Zuzana Slavíková

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.

BRNO 2024

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 lignocelulóзовého materiálu z potravinářského průmyslu

Zadání dizertační práce:

1. zpracujte literární rešerši zabývající se problematikou lignocelulóзовých materiálů a rostlinných proteinů
2. navrhnete a ověrite možnosti izolace proteinů z pšeničných otrub v laboratorním měřítku
3. ověrite možnost provedení navrženého izolačního postupu v poloporovozním nebo jiném velkoobjemovém měřítku
4. charakterizujte připravený izolát, provedte chemické analýzy (aminokyselinové složení)
5. otestujte možnosti využití proteinového izolátu z pšeničných otrub v potravinářském průmyslu, provedte základní chemické i fyzikální analýzy připravených produktů
6. provedte sensorické hodnocení nově připravených potravin obsahující proteinový izolát
7. zpracujte získané výsledky, prezentujte je na vybraných odborných akcích a formou článku v odborných časopisech

Termín odevzdání dizertační práce: 31.10.2024:

Ing. Zuzana Slavíková
studentka

doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.9.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

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. Výťažnost 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 odstředování 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

ABSTRACT

This dissertation thesis is focused on the sustainable evaluation of wheat bran, specifically on the isolation of its protein fraction and its subsequent use in the production of foods with a high protein content. Wheat bran is a lignocellulosic material composed primarily of polysaccharides, containing approximately 18 % protein. A technology for protein isolation using the pH-shift method was developed and verified, with which it was possible to obtain a protein concentrate with 83% purity. The yield of the technology was around 9 g/100 g of bran. The conditions of the isolation process did not affect the fractionation of the proteins, their molecular weight was the same as the proteins in wheat bran. The isolated protein has a complete amino acid profile, lower levels of essential amino acids (especially lysine) compared to animal proteins were observed. By isolating proteins, a significant increase in their digestibility (93 %) was achieved compared to proteins in wheat bran. Furthermore, the applications of protein isolated from wheat bran in the production of high-protein yogurt and baked goods were verified, in which changes in the texture of the product, taste and acceptance by consumers were mainly monitored. Large-scale validation of the isolation technology revealed the necessity of efficient centrifugation to produce protein powders of maximum purity. The findings support the potential of wheat bran as an alternative protein source that can contribute to both economic growth and environmental sustainability in food production.

KEY WORDS

Wheat bran, protein concentrate, high-protein food

SLAVÍKOVÁ, Zuzana. Využití odpadních lignocelulózových materiálů z potravinářského průmyslu [online]. Brno, 2025 [cit. 2024-10-22]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/137650>. Pojednání. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Pavel Diviš.

Prohlášení

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

.....
podpis studenta

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
	2.1 Lignocelulózové materiály.....	8
	2.1.1 Biosyntéza lignocelulózového materiálu	9
	2.1.2 Degradace lignocelulózového materiálu	12
	2.1.3 Nakládání s lignocelulózovými odpady	15
	2.2 Pšeničné otruby	18
	2.2.1 Složení pšeničných otrub	18
	2.2.2 Biorafinace pšeničných otrub.....	22
	2.3 Rostlinné proteiny	25
	2.3.1 Metody izolace proteinů.....	26
	2.3.2 Nutriční význam rostlinných proteinů.....	29
	2.3.3 Funkční vlastnosti rostlinných proteinů	33
	2.3.4 Využití rostlinných proteinů v potravinářství	36
	2.4 Analytické metody používané pro charakterizaci proteinů.....	39
	2.4.1 Metody stanovení celkového množství proteinů.....	40
	2.4.2 Charakterizace proteinových frakcí	42
	2.4.3 Analýza aminokyselinového profilu	43
	2.4.4 Charakterizace senzorických vlastností	49
3	Cíle dizertační práce	51
4	Experimentální část	52
	4.1 Laboratorní vybavení	52
	4.1.1 Pomůcky, chemikálie a přístroje	52
	4.1.2 Vzorky a použité suroviny	53
	4.2 Izolace proteinové frakce pšeničných otrub.....	53
	4.3 Charakterizace pšeničných otrub a proteinových izolátů z pšeničných otrub	55
	4.3.1 Celkový obsah bílkovin a aminokyselinový profil	56
	4.3.2 SDS-PAGE.....	56
	4.3.3 Stanovení vody	58
	4.3.4 Stanovení minoritních složek	59
	4.3.5 Stanovení stravitelnosti proteinů.....	61
	4.4 Velkoobjemové izolace proteinové frakce z pšeničných otrub	61
	4.5 Aplikace proteinového koncentráту z pšeničných otrub v potravinářství.....	65
	4.5.1 Příprava a charakterizace vysokoproteinových jogurtů	65
	4.5.2 Příprava a charakterizace vysokoproteinového pečiva	69
5	Výsledky a diskuze.....	72

5.1	Izolace proteinů z pšeničných otrub	72
5.1.1	Charakterizace pšeničných otrub.....	72
5.1.2	Izolace proteinové frakce z pšeničných otrub	74
5.1.3	Charakterizace proteinového materiálu z pšeničných otrub.....	80
5.1.4	Transfer technologie izolace proteinů z pšeničných otrub do poloprovozních podmínek.....	84
5.2	Aplikace proteinového koncentráту z pšeničných otrub v potravinářství.....	88
5.2.1	Vysokoproteinové jogurty.....	88
5.2.2	Vysokoproteinové pečivo.....	100
6	Závěr.....	108
7	Seznam použité literatury	110
8	Seznam zkratk	136
9	Seznam obrázku	137
10	Seznam tabulek	138
11	Vědecké aktivity.....	140
12	Přílohy	142

1 Úvod

Udržitelný rozvoj je základní ideologií pro zajištění ekonomického růstu, ochrany životního prostředí a sociální spravedlnosti. Jednou z aktuálních priorit udržitelného rozvoje je šetrné, 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 redukcí množství vznikajícího odpadu.

Lignocelulózové materiály jsou tvořeny převážně ligninem, celulózu 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 biorafinérií. 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. Izolaci 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.

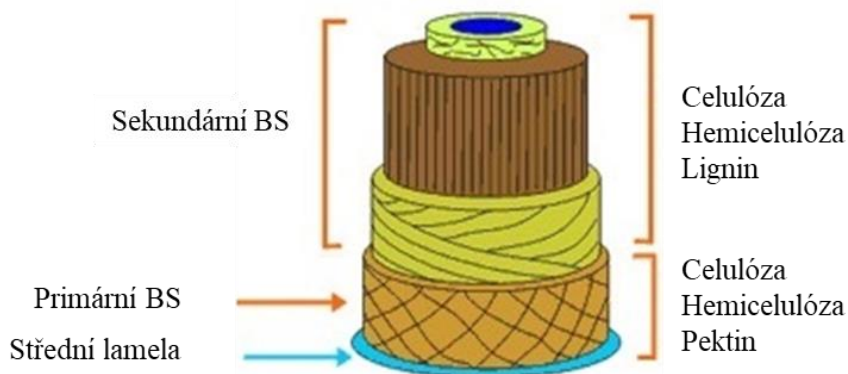
2 Teoretická část

Lignocelulóza je jedním z nejzastoupenějších organických materiálů na Zemi, neboť je součástí dřeva i nižších rostlin. Existuje řada postupů zpracování lignocelulózy buď jako celku nebo jejích jednotlivých složek. Lignocelulóza tvoří i podstatnou část materiálů, které jsou produkovány potravinářským průmyslem, jsou to zejména mořské řasy nebo zemědělské a jiné odpady (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. Rostlinné proteiny lze využít například pro produkci masových analogů nebo vysokoproteinových potravin.

2.1 Lignocelulózové materiály

Lignocelulóza je nejvíce zastoupená ve dřevě či slámě, její jednotlivé složky však můžeme nalézt v každé rostlinné hmotě. Každoročně celosvětově přibude přes 180 miliard tun lignocelulózového materiálu, přičemž okolo 8 miliard 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. Jako nevýhoda se však prozatím jeví složitá struktura lignocelulózy [1].

Lignocelulóza je tvořena třemi základními složkami – ligninem, celulózou a hemicelulózami, jejich poměrné zastoupení závisí na původu rostlin a na typu buněčné stěny. Například v travinách převládá obsah hemicelulóz, v tvrdém dřevě celulóz [2]. Primární buněčná stěna, kterou jsou vybaveny všechny rostliny, bakterie, houby, řasy i archea, je tvořena hlavně celulózou, hemicelulózami a pektinem. Oproti tomu, sekundární buněčná stěna je často inkrustována (anorganické) či impregnována (organické) dalšími sloučeninami, což ji mechanicky zpevňuje. Tvoří se mezi primární buněčnou stěnou a cytoplazmatickou membránou sklerenchymatických rostlinných pletiv, pokud byl vývoj jejich buněk již ukončen. V případě lignocelulózových materiálů je impregnace sekundární buněčné stěny zajištěna ligninem [2]. Schéma a základní složky buněčných stěn rostlin jsou zobrazeny na obr. 1.



Obr. 1 Struktura a složení buněčné stěny lignocelulózové biomasy

Kromě těchto tří základních složek může lignocelulóza obsahovat také sacharidy, proteiny, fenolické látky, minerální látky a tuky. Zastoupení těchto složek v lignocelulóze je závislé na environmentálních faktorech, zejména na teplotě, množství srážek a složení půdy [1, 2]. Komplexní struktura lignocelulózového materiálu zajišťuje rostlinám integritu, a tím voděodolnost a mikrobiální rezistenci.

Celulóza je tzv. páteří této struktury. Tisíce monomerních jednotek D-glukopyranosy (β -1,4 glykosidické vazby) tvoří dlouhé řetězce, které se vodíkovými můstky mohou spojovat v mikrofibrily, dále v makrofibrily a celulózová vlákna [5]. Rezistence celulózy vůči enzymatické hydrolýze souvisí se stupněm polymerizace. Obecně platí, že delší celulózová vlákna obsahují více vodíkových vazeb a jsou tedy vůči hydrolýze odolnější [5]. Celulóza se může vyskytovat v několika různých krystalických strukturách, v přírodě se ovšem vyskytují pouze dvě (I a II). Jádra celulózových vláken jsou krystalická, vnější mikrofibrily se stávají více amorfními a přechází až ke zcela amorfnímu matrixu, který je tvořen pektinem, hemicelulózami, ligninem, či jinými polymery [4, 5].

Hemicelulózy mají složitou rozvětvenou strukturu, kterou tvoří různé monosacharidové jednotky. Jejich stupeň polymerace je oproti celulóze výrazně nižší (100-200 jednotek), což má za následek jejich hydrolyzovatelnost kyselinami, zásadami či hemicelulázami [5]. Hemicelulózy lze klasifikovat podle převládajícího typu sacharidu, kterými jsou nejčastěji xylany, glukany či manany [6].

Lignin má ze všech hlavních složek nejsložitější, nechirální 3D strukturu. Opakují se v ní tři jednotky – koniferylalkohol, sinapylalkohol a kumarylalkohol spojené etherovými a kovalentními vazbami [8]. Díky téměř náhodné polymerizaci těchto tří jednotek je možné objevit bezpočet různých struktur ligninu. Lignin je zodpovědný za hydrofobicitu a tuhost celé struktury. Díky své hydrofobní povaze zabraňuje lignin přístupu enzymů k celulóze, čímž ji chrání před hydrolytickým působením [3, 4].

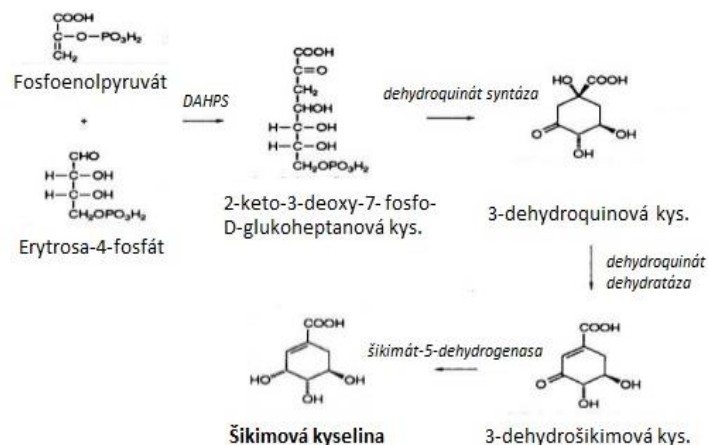
Celulóza a hemicelulózy jsou k sobě vázány vodíkovými můstky. Mezi hemicelulózami a ligninem můžeme nalézt 5 různých kovalentních vazeb, které tak vytvářejí lignin-sacharidový komplex [5].

2.1.1 Biosyntéza lignocelulózového materiálu

Pochopením syntézy či degradace složitých organických materiálů lze lépe využít jejich potenciál. Při aplikaci vhodných úprav materiálu [9], či jeho biotechnologickou modifikací [10] je možné zvýšit nebo snížit zastoupení některé jeho složky. Biosyntéza lignocelulózového materiálu je posuzována jako soubor biosyntéz jeho jednotlivých komponent – ligninu, celulózy a hemicelulóz.

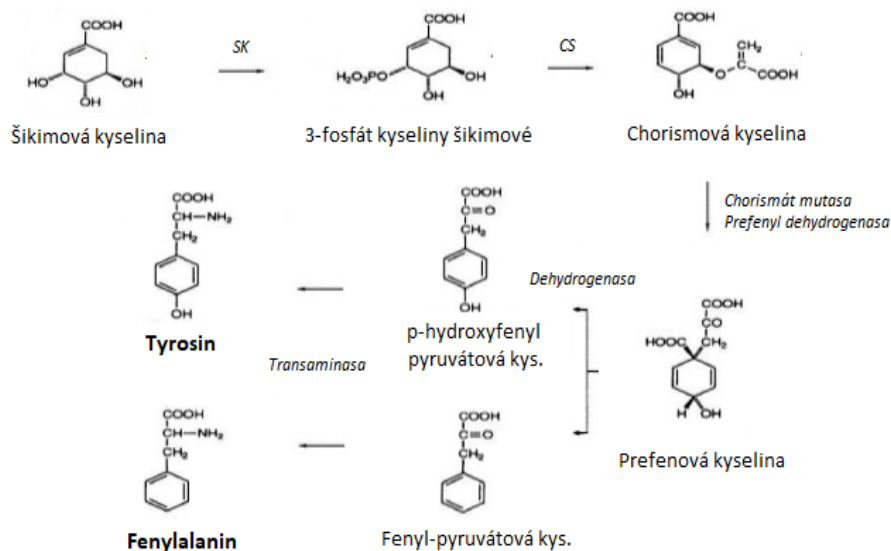
Lignin

Tři hlavní jednotky ligninu – koniferylalkohol, sinapylalkohol a kumarylalkohol jsou syntetizovány dráhou kyseliny šikimové v cytoplasmě, odkud jsou transportovány do apoplastu [8]. Prekurzory jsou fosfoenolpyruvát, poskytovaný glykolýzou, a erytroza-4-fosfát z pentosafosfátového cyklu. Tato dráha je nejběžnějším způsobem syntézy aromatických sloučenin u rostlin. Jejimi meziprodukty jsou mimo kyselinu šikimovou (obr. 2) také aromatické aminokyseliny tyrosin, fenylalanin a tryptofan (obr. 3) [11].



Obr. 2 Biosyntéza kyseliny šikimové

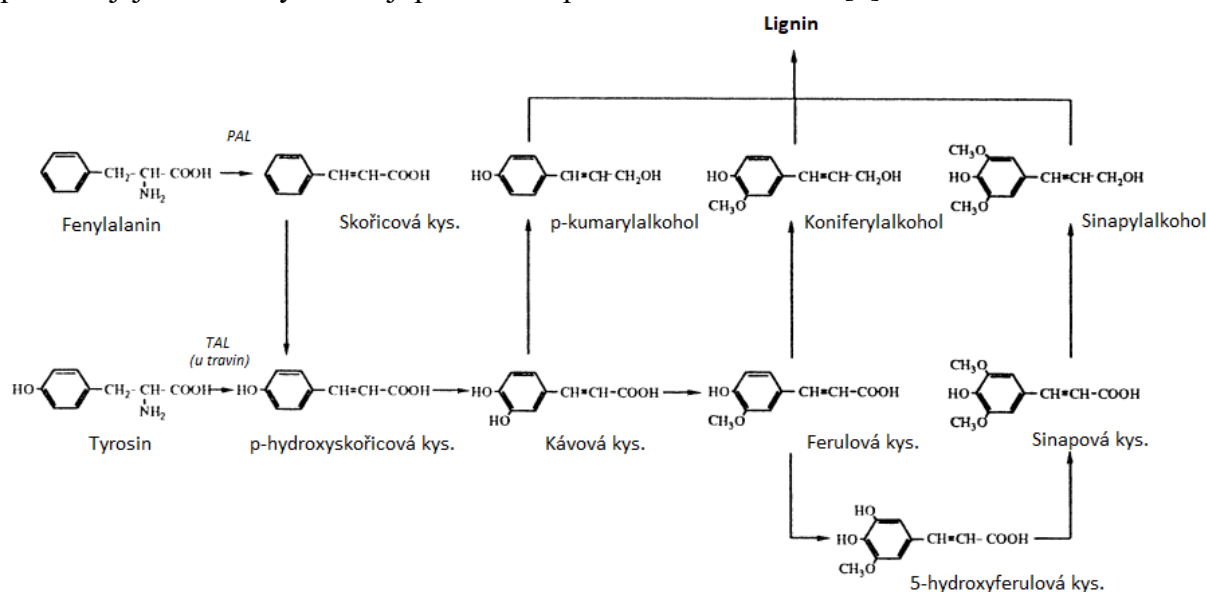
Šikimová dráha se skládá ze 7 po sobě jdoucích enzymatických kroků, jejím finálním produktem je chorismát, který je společným prekurzorem pro isoprenoidní chinony, aromatické kyseliny a folátové kofaktory. V prvním kroku spolu kondenzují fosfoenolpyruvát a erytroza-4-fosfát za katalýzy 3-deoxy-D-arabinoheptulosonát-7-fosfát syntázy (DAHPS) a vzniku 3-deoxy-D-arabinoheptulosonát-7-fosfátu. Ve druhém kroku se syntetizuje 3-dehydroquinát (dehydroquinát syntáza) a ve třetím dále 3-dehydrošikimát (dehydroquinát dehydratáza). Šikimát vzniká ve čtvrtém kroku po katalýze šikimát dehydrogenázou. Dále se syntetizuje šikimát-3-fosfát a 3-enolpyruvylšikimát-3 fosfát, který v posledním kroku za katalýzy chorismát syntázou přechází na chorismát [11].



Obr. 3 Biosyntéza tyrosinu a fenylalaninu, prekurzorů ligninu

Různé rostlinné druhy disponují enzymy, díky kterým jsou schopné odštěpit amino skupinu dané aminokyseliny a vytvořit tak kyselinu skořicovou či hydroxyskořicovou. U krytosemenných a některých nahosemenných rostlin tento proces zajišťuje enzym fenylalaninamonium lyasa (PAL), u travin tyrosinamonium lyasa (TAL) [2]. Sérií hydroxylačních a methylačních reakcí za katalýzy hydroxyláz, ligáz a transferáz pak získáváme významné meziproducty – kyselinu kávovou, ferulovou či sinapovou, po jejichž redukci (reduktázy, dehydrogenázy) vznikají dané tři hlavní monolignoly (obr. 4) [8]. Ty jsou pak

spojovány radikálovou polymerizací v závislosti na jejich dostupnosti a poločasu rozpadu, přičemž jejich radikály vznikají působením peroxidáz nebo lakáz [8].

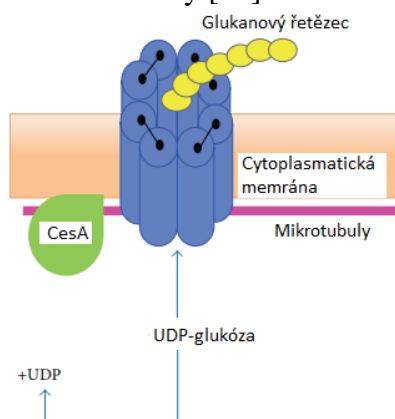


Obr. 4 Biosyntéza monolignolů (p-kumarylalkohol, koniferylalkohol, sinapylalkohol)

Celulóza

Rostlinná celulóza a její vlastnosti hrají významnou roli v papírenském a dřevařském průmyslu, neboť je zásadní pro výrobu buničiny a dalších produktů. Znalost mechanismu její biosyntézy je proto velice důležitá [7]. Celulózové řetězce jsou syntetizovány na cytoplazmatické membráně buněk rostlin, pomocí vodíkových můstků a Van der Waalových sil jsou dále spojovány a vytvářejí mikro fibrily [12].

Prekurzorem celulózy je UDP-glukóza. K biosyntéze je nezbytný také celulóza syntáza enzymový komplex, který je na cytoplazmatickou membránu dopravován podél kortikálních mikrotubulů. Jejich orientace je poté shodná s orientací nově vznikajícího celulózového řetězce. Tvořící se glukonový řetězec prochází membránovým tunelem (obr. 5), za kterým se spojuje s dalšími membránovými řetězci v mikro fibrily [13].



Obr. 5 Schéma biosyntézy celulózy

Na cytoplazmatické membráně se může na úkor celulózy syntetizovat také kalóza – polysacharid skládající se z glukózových zbytků, které jsou ovšem spojeny vazbou β -1,3, a patříci do skupiny β -glukanů. K tomu dochází v rámci reakce rostliny na stres či

poškození, kdy kalóza vytváří dočasnou buněčnou stěnu [2, 13]. K syntéze kalózy je zapotřebí kalóza syntáza, ovšem objevily se i případy in vitro, kdy se kalóza tvořila pouze za přítomnosti celulóza syntázy [14]. Zásadní je zřejmě obsah Ca^{2+} iontů v cytosolu, přičemž jejich zvýšená koncentrace vede k upřednostnění syntézy celulózy [2, 14].

Hemicelulóza

Za hemicelulózu jsou považovány různé heterogenní polysacharidy amorfni struktury, které v buněčné stěně spolu s ligninem či jinými složkami obklopují celulózová vlákna [2, 13]. Dle povahy jejich struktury je lze rozdělit do 4 skupin – manany, xyloglukany, xylany a glukany s různým typem vazeb [11, 13].

Všechny polysacharidy buněčné stěny jsou syntetizovány z odpovídajících aktivovaných cukerných nukleotidů a za přítomnosti příslušných enzymů v Golgiho aparátu (tabulka 1). Zde lokalizovaná glykosyltransferáza poté usnadňuje tvorbu specifických vazeb mezi jednotlivými nukleotidy, čímž dochází k syntéze polymeru [16]. Poté je vzniklý polysacharid pomocí sekrečních vezikul transportován a uvolněn do buněčné stěny [17].

Tabulka 1 Sloučeniny účastníci se biosyntézy hemicelulóz

	MANANY	XYLANY	GLUKANY
Prekurzor	NDP-manóza	NDP-xylóza	NDP-glukóza
Enzym	Manóza syntáza	Xylóza syntáza	Glukan syntáza
Deriváty	Galaktomanan Glukomanan Galaktoglukomanan	Arabinoxylany Glukuronoxylany Glukuronoaribinoxylany	Xyloglukany

2.1.2 Degradace lignocelulóзовého materiálu

Degradace lignocelulózy je možná pouze za takových podmínek, které jsou schopny narušit její velmi pevnou, 3D strukturu. V přírodě k tomuto dochází přirozeně pomocí enzymů, kterými disponují například některé dřevokazné houby nebo mikroorganismy, dlouhodobým působením povětrnostních vlivů nebo jejich kombinací. Degradace lignocelulózy je však zásadním procesem nutným pro její valorizaci (viz kap. 2.1.3). Způsoby degradace se liší dle typů produktů a jejich dalšího uplatnění. Nejčastěji jsou používány biologické (enzymatické), termální nebo termochemické metody degradace lignocelulózy [18], v průmyslu se navíc využívá řada nejrůznějších typů předúprav lignocelulózy, které vedou k tvorbě přesně definovaných látek, nejčastěji cukrů.

Biologická degradace lignocelulózy

Nejčastějším způsobem biologické degradace lignocelulózy je její enzymatická hydrolýza. Může být provedena buď odpovídajícími druhy enzymů, nebo působením mikroorganismů s danou enzymovou výbavou. K úplnému rozkladu lignocelulóзовých materiálů je dokonce nezbytné synergického působení několika různých enzymů, či fyzikálně-chemického účinku. Žádaným produktem tohoto typu degradace jsou glukozové jednotky, které poté slouží mikroorganismům jako zdroj energie, v průmyslu mohou být například surovinou pro výrobu ethanolu [19].

Pro degradaci každé z hlavních komponent – ligninu, celulózy a hemicelulóz, jsou nezbytné konkrétní druhy enzymů [6, 16]. Například k úplné degradaci **celulózy** je nezbytné synergické působení 3 tříd enzymů – β -1,4–endoglukanáz (EGL), exoglukanáz nebo celobiohydroláz (CBH) a β -glukosidáz (BGL), přičemž každá z nich narušuje celulóзовý řetězec jiným způsobem. EGL odštěpují celé vnější řetězce amorfni struktury, z jejichž konce jsou dále působením CBD uvolňovány jednotky celobiózy. Nakonec je celobióza hydrolyzována na celulózu pomocí β -glukosidáz [19].

Rozvětvená a heterogenní struktura **hemicelulóz** ke své degradaci vyžaduje působení endo-enzymů, které odštěpují hlavní řetězec, a exo-enzymů uvolňující jednotlivé cukry. Další doprovodné enzymy poté štěpí postranní řetězce, v závislosti pak na typu hemicelulózy vzniká řada různých mono a oligosacharidů. Konkrétní enzymy pro dané typy hemicelulóz jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2 Konkrétní enzymy účastníci se degradace hemicelulóz [19]

	<i>Endo-enzymy</i>	<i>Exo-enzymy</i>
Manany	β -endomananáza	β -manosidáza
Xylany	β -(1,4)-endoxylanáza	β -(1,4)-xylosidáza
Glukany	Endoglukanáza	Glukosidáza

Pro degradaci **ligninu** je nutné překonat řadu překážek, které jsou dané jeho komplikovanou strukturou. Jelikož se jedná o velký, větvený polymer, účinkující enzymy musí být extracelulární. Kvůli kovalentním vazbám mezi jednotlivými jednotkami ligninu je nezbytný oxidativní mechanismus degradace jeho struktury, na rozdíl od hydrolytického rozkladu celulózy a hemicelulóz. Stereochemie ligninu je velice nepravidelná, a proto jsou i rozkladné enzymy méně specifické [19]. Enzymy, potřebné pro degradaci ligninu, lze rozdělit do dvou základních skupin – lignin modifikující (LME) a pomocné degradační enzymy (LDA). LME zastupují fenoloxidázy (lakázy) a lignin, mangan a univerzální peroxidázy. Pomocné LDA jsou zodpovědné za procesy umožňující degradaci ligninu, jako je například oxidativní tvorba H_2O_2 redukcí molekulárního kyslíku oxidázami. Ten je využíván pro oxidaci LME peroxidáz. Z LDA enzymů jsou nejvýznamnější glyoxal oxidázy a arylalkohol oxidázy [15, 17]. Každý jednotlivý typ LME enzymu štěpí konkrétní část lignocelulóзовé struktury. Lakázy oxidují aromatické sloučeniny, které zahrnují fenolické látky, aromatické aminy, thiofenoly a hydroxyindoly. O lignin a mangan peroxidázách je známo, že jsou schopné oxidovat jak aromatické fenolické, nefenolické sloučeniny, tak i další organické molekuly. Univerzální peroxidázy poté kombinují působení dvou předešlých [21].

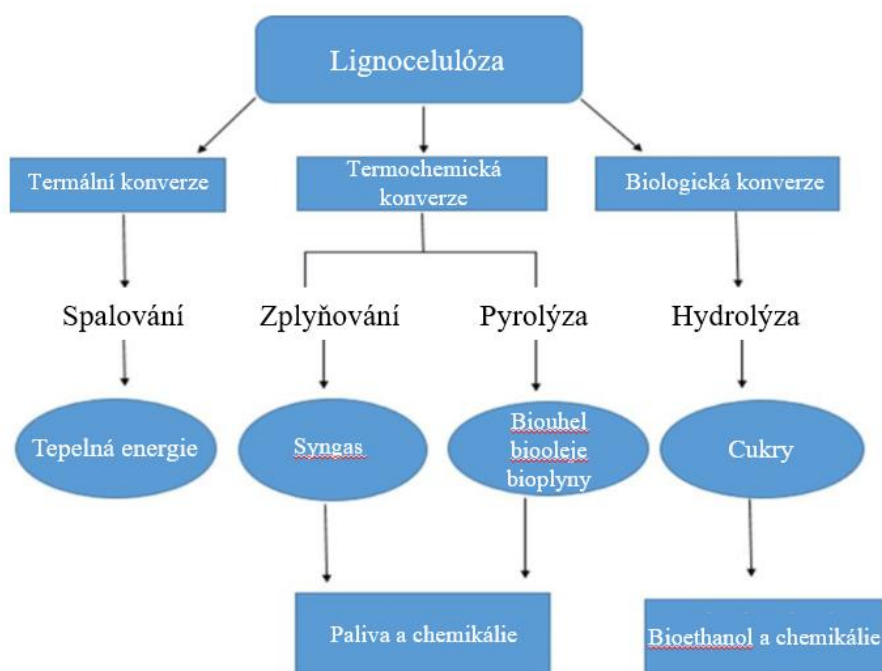
Na degradaci celé lignocelulóзовé struktury se často podílí více různých mikroorganismů. Každý z nich disponuje rozdílnou enzymovou výbavou, která rozkládá danou lignocelulóзовou složku. Celulytické enzymy produkují různé druhy bakterií, jako například *Clostridium*, *Cellulomonas* nebo *Ruminococcus*. Jelikož jsou ale bakterie obecně špatným producentem lignanáz, rozkládají zejména materiál s nižším podílem ligninu. Takový lze nalézt v prostředí s vyšší vlhkostí, na které jsou bakterie uzpůsobené mnohem lépe než houby a plísně. Nejvýznamnější houbou rozkládající celulózu je *Trichoderma reesei*. Pro produkci enzymů degradujících hemicelulózy je i v industriálním prostředí často využíván *Aspergillus niger* [15, 17]. Jedinými organismy, které jsou schopné zcela rozkládat lignin, jsou dřevokazné

houby. Potřebné enzymy jsou produkovány jako sekundární metabolity při nedostatku nutrientů [22]. Mezi takovéto houby patří například *Phanerochaete chrysosporium* nebo *Pleurotus ostreatus* [19].

Termální a termochemické metody degradace lignocelulózy

Mezi další způsoby degradace lignocelulóзовého materiálu patří termální a termochemická konverze. Termální degradace je provedena nejčastěji *spalováním* lignocelulózy při teplotách 800-1600 °C, produktem je zejména tepelná energie, spaliny a voda (pára) [23]. Tato metoda se využívá zejména v souvislosti se spalováním pelet, tvořených právě lignocelulóзовou biomasou. Její zásadní nevýhodou je však produkce emisí a znečišťování ovzduší [24].

Termochemická konverze pak přeměňuje biomasu buď na kapalinu nebo plyn, kromě vysoké teploty vyžaduje také použití chemikálií. *Zplyňováním* lignocelulóзовé biomasy je po reakci s kyslíkem, vzduchem nebo párou produkována směs plynů (např. CO₂, CO, CH₄, H₂, N₂) v různých poměrech [25]. Cílem této metody je produkce co největšího množství bioplynů a minimalizace množství vznikajícího biouhlu nebo kondenzovaných uhlovodíků [26]. Produkt zplyňování biomasy, často označován jako syngas nebo syntézní plyn, má širokou škálu využití, syngas je nezbytný pro produkci vodíku, nebo pro syntézu chemikálií a paliv [24]. Ve světě se pro jeho výrobu používají jak dřevěná residua, tak například sláma nebo obalové vrstvy rýže [27]. *Pyrolýza* je také metodou termochemické konverze, která může být použita jak samostatně, tak jako předúprava biomasy pro spalování nebo zplyňování. Pyrolýzou je provedena degradace lignocelulózy bez přístupu kyslíku při teplotě mezi 300–900 °C. Produktem je zejména biouhel, ale také biooleje a bioplyny. Složení produktů je však ovlivňováno rychlostí a teplotou pyrolýzy [28]. Všechny tři produkty mohou být použity jako biopaliva [29]. Popularita produkováného biouhlu, který je tvořen převážně uhlíkem, vzrůstá také v oblasti životního prostředí, neboť tento materiál může být využit pro zemědělské účely jako hnojivo, nebo jako adsorbent nejrůznějších druhů kontaminantů [30, 31]. Schéma možností degradace lignocelulóзовého materiálu je zobrazeno na obr. 6.



Obr. 6 Schéma možností degradace lignocelulózy [18]

Další možnosti degradace lignocelulózy

Lignocelulóзовou strukturu lze narušit také různými chemickými, fyzikálními či biologickými metodami (viz obr. 6) a získat tak řadu významných residuí. Výhodami použití těchto metod je zejména zvýšení výtěžnosti cukrů, univerzální použití pro různé lignocelulóзовé materiály, cílená degradace určité složky lignocelulózy, snížení tvorby nežádoucích produktů nebo snížení výrobních a energetických nákladů. Tyto metody se často zařazují jako předúprava lignocelulóзовého materiálu za účelem produkce cukrů, které jsou dále fermentovány mikroorganismy.

Nejběžnějšími způsoby předúpravy je alkalická nebo kyselá hydrolyza lignocelulózy. Jedná se o jednoduché, účinné a spolehlivé metody. Nejběžněji se pro alkalickou hydrolyzu používá hydroxid sodný, neboť se jedná o účinné delignifikační činidlo (zvyšuje porozitu materiálu), zároveň však jeho působením nedochází k degradaci sacharidů [32]. V porovnání s používanými kyselinami je hydroxid sodný méně agresivní [33, 34]. Kyselá hydrolyza lignocelulózy vede zejména k degradaci hemicelulóz na redukující cukry, narušení vazeb s ligninem, a tím pádem celé lignocelulóзовé struktury. Často bývá její výtěžnost podpořena zvýšením teploty. Používá se zejména kyselina sírová, fosforečná nebo octová [35, 36].

Mezi další možné úpravy lignocelulózy patří například použití organických rozpouštědel (alkoholy, fenoly, aceton atd.) nebo iontových kapalin (komplexy na bázi pyridinia, imidazolu, pyrrolidinia atd.), ozonolýza, působení horké vody, páry nebo superkritického CO₂, elektrického pole nebo mikrovlnného záření. Zásadní nevýhodou těchto postupů jsou však vysoké finanční náklady spojené s použitím chemikálií nebo na vybavení [18].

2.1.3 Nakládání s lignocelulóзовými odpady

Mezi tuhý komunální odpad se řadí také lignocelulóзовé materiály, které vznikají jako odpadní materiál při zpracování dřeva, v potravinářském průmyslu, nebo zemědělství. Mezi nejčastější způsoby zpracování tuhého komunálního odpadu patří umístování na skládky, spalování, kompostování, nebo, dle složení, jeho opětovné využití. Lignocelulóзовé odpady pocházející ze dřeva jsou v USA nejčastěji skládkovány (cca 12 milionů tun), recyklovány (3,1 mil. tun) nebo spalovány (2,8 mil. tun) [37].

Nejvýznamnějším potravinářským lignocelulóзовým odpadem je sláma. Množství vznikající slámy je závislé na typu plodiny – například největší množství ročně vzniká při pěstování cukrové třtiny (18,5 mld. tun), rýže (1,2 mld. tun) nebo kukuřice (0,5 mld. tun). Jelikož má sláma malou nutriční hodnotu, pouze malá část této produkce se využívá dále ke krmným účelům [38]. Zbytek produkce se buď spaluje nebo skládkuje. Ke spalování slámy nejvíce dochází v Číně (68,2 mil. tun), Indii (48,1 mil. tun) a USA (39,8 mil. tun). Spalování lignocelulóзовého materiálu je přitom jedním z hlavních původců znečištění ovzduší, vzniku skleníkových plynů nebo snižování úrodnosti půd. Spalování lignocelulóзовého materiálu je navíc považováno za velice neefektivní způsob zpracování odpadu, a proto jsou zejména v posledních letech vytvářeny strategie pro valorizaci nejen slámy, ale i dalších lignocelulóзовých odpadů, které nebudou zátěžovat životní prostředí [38, 39].

Hlavním celosvětovým cílem v oblasti odpadového hospodářství je přechod na cirkulární ekonomiku. Jejím principem je minimalizace jak vstupních surovin, tak odpadu díky uzavřenému výrobnímu cyklu. Pracuje s myšlenkou, že nic není odpad, ale sekundární surovina, kterou je možné dále využít. V souladu s principem cirkulární ekonomiky byly navrženy také postupy pro zpracování lignocelulóзовých materiálů. Jejich strategie lze rozdělit

na snahu o redukcii množství vznikající lignocelulózy a na metody opětovného využívání lignocelulózy [41].

Předcházení vzniku lignocelulózy

Nakládání se slámou a dalšími lignocelulóзовými residui má zásadní vliv také na kvalitu půdy, obsah minerálních látek v půdě, schopnost půdy zadržovat vodu, na erozi půdy nebo na kontrolu setí. Do kategorie předcházení vzniku lignocelulóзовého materiálu je možné zařadit metody zkracování stébel píce (zejména pšenice a ječmene) pomocí syntetických regulátorů růstu. Ty v rostlině způsobují snížení aktivity hormonů způsobujících růst rostliny do výšky – auxinů a gibberelinů nebo uvolňování ethylenu, čímž dochází ke zpomalení růstů jednotlivých internodií [42]. Prvotní motivací použití regulátorů růstu je ochrana rostlin proti polehání a tím zvýšení jejich výnosnosti. Proto je jejich dalším častým účinkem stimulace tvorby ligninu a celulózy, a tím zpevnění stébel. Aktuálně se pro obilniny používají tři různé druhy růstových regulátorů – ethephon, chlormequat chlorid a trinexapax-ethyl, jejich účinnost závisí jak na stavu půdy, tak druhu a kultivaru obilniny [43]. Jejich použití je nejvíce žádoucí v prostředí disponující vyšší vlhkostí a úrodností, kde hrozí vysoké riziko polehávání stébel [43].

Podmínky použití růstových regulátorů se ovšem může v různých zemích lišit, a to zejména kvůli jejich detekci v obilovinách. Z tohoto důvodu je například ve Švédsku použití růstových regulátorů pro pšenici, žito, ječmen a oves zakázané [44]. Evropská Unie je v jejich používání benevolentnější. V Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh a v Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (EU) 2019/1009 jsou definována pravidla pro povolené přípravky na ochranu rostlin, včetně látek ovlivňujících růst, ovšem jinak než živiny nebo rostlinné biostimulanty [42, 45, 46].

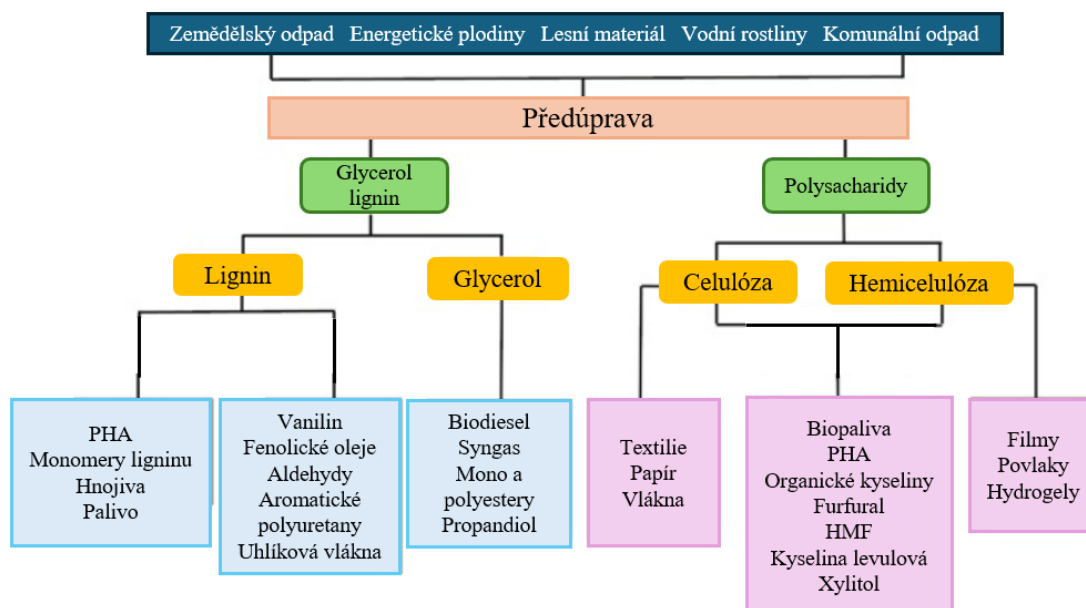
Opětovné využití lignocelulóзовých materiálů

Pokud je materiál vzniklý v průběhu daného výrobního procesu dále zpracováván a valorizován, neoznačuje se již jako odpad, ale jako sekundární produkt. V případě valorizace, tedy opětovného využití lignocelulózy, byla navržena celá řada procesů, z nichž vzešly různé koncepty biorafinerie. V Evropě se aktuálně nachází 25 biorafinerií na zpracování dřevné biomasy (produkce biopaliv, chemikálií a energie) a 5 biorafinerií na zpracování lignocelulóзовých materiálů (produkce proteinů, chemikálií, biopaliv, energie) [47].

Pro lignocelulóзовé biorafinerie je možné využívat jak samotné lignocelulózy (dřevo), tak organické materiály mořských řas a odpady potravinářského průmyslu nebo zemědělství [48]. Dle vstupních surovin, konkrétně jejich složení, je pak celý koncept biorafinerie navržen. Důležitým aspektem pro biorafinerie je však profitabilita produktů, která musí převyšovat náklady spojené s jejich výrobou.

Obecný postup pro valorizaci **lignocelulózy** zahrnuje (1) její předúpravu, která vede k narušení struktury a uvolnění celulóзовých vláken, (2) enzymatickou hydrolyzu celulózy a hemicelulózy pomocí celuláz, čímž se získají fermentovatelné cukry, a (3) fermentaci a získání produktů, například bioethanolu nebo jiných biochemikálií (kyselina mléčná, jantarová) [49]. Při tomto postupu má zásadní vliv na výtěžnost produktu sacharifikace celulózy a hemicelulózy na monomerní cukry [50]. Residua, vzniklá v průběhu technologie (např. lignin, residuální celulóza) jsou většinou zpracovávána jako paliva. Ovšem byly navrženy i strategie pro využití ligninu například pro výrobu polymerů jako jsou fenolické pryskyřice, polyuretan nebo polyisokyanurát, adsorbentů nebo půdních kondicionérů [51]. V současnosti však náklady spojené s valorizací ligninu převyšují cenu již dostupných alternativ [52]. Kromě produktů vzniklých fermentací uvolněných cukrů se v souladu s cirkulární ekonomikou je možné

celulózu využít také pro tvorbu textilií nebo papírenských produktů [53], hemicelulózy je možné použít pro přípravu hydrogelů [54]. Shrnutí možností valorizace lignocelulóзовé biomasy je uvedeno na obr. 7.



Obr. 7 Schéma valorizace lignocelulóзовých materiálů [55]

Využití řas v konceptu biorafinerie není natolik rozšířené, jako využití lignocelulózy zejména kvůli různorodosti jejich jednotlivých typů. Řasy však na rozdíl od samotné celulózy obsahují značná množství různých významných bioaktivních látek, které mohou být extrahovány a dále použity jako aditiva, hnojiva, kosmetické nebo medicínské přípravky a biopaliva. Tyto metody se ovšem musí aplikovat v součinnosti, aby extrakcí jednoho produktu nedocházelo k degradaci suroviny vhodné pro získání produktu dalšího [50, 51]. Jedna z dalších variant využití mikrořas je za účelem čištění vod, při kterém může docházet přímo i ke kultivaci řas [52, 53].

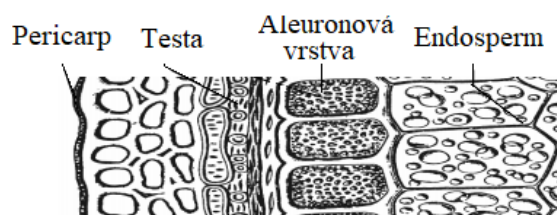
Potravinářské a zemědělské odpady jsou častěji kompostovány, skládkovány, použity jako krmivo pro zvířata, jako hnojivo nebo jako zdroj energie. Všechna tato využití jsou však považována za méně hodnotná [60, 61]. Jelikož je i řada těchto materiálů v základě lignocelulóзовá, hledají se postupy, jak je valorizovat tvorbou bioproduktů. Tyto produkty musí být však buď velmi ceněné, nebo musí být získány relativně jednoduchými procesy, aby byla zajištěna ekonomická rentabilita navržené biorafinerie [62]. Mezi nejzastoupenější lignocelulóзовý odpad potravinářského a zemědělského průmyslu se řadí materiály pocházející z obilovin, které tvoří přibližně 12,9 % z veškerého množství potravinářského odpadu [63]. Řadu z těchto cereálních odpadů lze však díky jejich složení využít jako sekundární produkt pro získání významných bioaktivních látek.

Biorafinerie, využívající cereální odpad, nejčastěji produkují bio-diesel nebo bioethanol. Jako surovina jsou přitom používány zemědělské odpady, ovesné obalové vrstvy, nebo odpad z pekárenských a cukrárenských procesů. Ve většině zemí EU se z residuí vzniklých v zemědělství získávají přísady do potravin nebo léčiv, organická hnojiva nebo půdní koncionéry nebo proteiny vhodné pro krmné účely mikroorganismů [64].

2.2 Pšeničné otruby

Značné množství lignocelulóзовého materiálu vzniká také v potravinářském průmyslu. Jelikož je lignocelulóza pro člověka nestravitelná, stává se často odpadním materiálem, který je dále spalován či ukládán na skládky nebo kompostován [32]. Může být také přidáván do krmných směsí zvířat, nebo být součástí lidské výživy, kde plní funkci vlákniny.

Mezi jeden z nejvíce zastoupených lignocelulóзовých 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, neboť tvoří asi 13–17 % hm. zrna. Skládají se z aleuronové a hyalinní vrstvy, testy a vnitřního a vnějšího perikarpu, mohou obsahovat také zbytky klíčků [64]. Tyto vrstvy se mezi sebou liší svou mikrostrukturou (obr. 8) a také chemickým složením. Zatímco perikarp je tvořen zejména nerozpustnou vlákninou, aleuronová vrstva je bohatá na proteiny, rozpustné oligosacharidy a mnohé bioaktivní látky [99].



Obr. 8 Obalové vrstvy pšeničného zrna [99]

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 [101]. Zrna se před mletím také často kondiciují – namáčí, což vede ke zvýšení elasticity obalových vrstev, které poté lépe odolávají mechanickému tlaku [64].

2.2.1 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 [102]. 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 [64]. 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 [103, 104]. Procentuální zastoupení jednotlivých složek je uvedené v tabulce 3, rozmezí hodnot je dáno rozdíly ve složení jednotlivých vrstev pšeničných otrub [105].

Tabulka 3 Procentuální zastoupení jednotlivých složek pšeničných otrub [103, 105–107]

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

Polysacharidy

Zastoupení a složení polysacharidů pšeničných otrub je závislé na mnoha faktorech, od genetických vlastností, způsobu a podmínkách pěstování, přes proces jejich zpracování a mletí. Celkový obsah sacharidů v sušině otrub je okolo 58 % (cca 65 g/100 g pšeničných otrub), toto procento ovšem velmi závisí na zastoupení škrobu. Škrob je hlavní složkou endospermu a v procesu mletí je cílem veškerý jeho podíl z otrub vymlet [65]. Jelikož se jedná o lignocelulózový materiál, významné zastoupení zde mají také celulóza a hemicelulózy [66]. Procentuální složení sacharidů v sušině pšeničných otrub je uvedeno v tabulce 4.

Tabulka 4 Složení sacharidového podílu pšeničných otrub [66]

Složka	Obsah (% sušiny)
Celkové sacharidy	57-58,5
Škrob	20,3-22,5
Celulóza	19,5-20,3
Hemicelulózy	18,2-18,9
Oligosacharidy	3,7-4,0

Nejzastoupenějšími polysacharidy (mimo škrob) jsou arabinoxylany, které tvoří až 64 % buněčné stěny pšeničných otrub. Většina je jich nerozpustná ve vodě, pouze určitý poměr arabinanů ku xylanům tvoří rozpustnou strukturu [67]. Kovalentně jsou k arabinoxylanům vázané různé bioaktivní látky, které jsou po degradaci tohoto materiálu uvolněny a je tak snadnější je extrahovat [68]. Mimo arabinoxylany jsou v lignocelulózové struktuře zastoupené také glukany a galaktany, jejichž množství je zobrazeno v tabulce 5.

Tabulka 5 Procentuální zastoupení jednotlivých polysacharidů [69]

Neškrobové polysacharidy	Obsah [g/100 g pšeničných otrub]
Glukany	10,5
Xylany	18,3
Arabinany	10,1
Galaktany	1,1

Z dietárního pohledu lze polysacharidy považovat za vlákninu, která dle své rozpustnosti může mít v těle významné funkce [70]. Její zastoupení v pšeničných otrubách je okolo 50 %. Rozpustná vláknina se skládá hlavně z glukanu a xylanu a její množství je do 5 % [56, 60]. Přítomnost rozpustné vlákniny ve stravě zpomaluje uvolňování glukózy z potravin, což je prospěšné pro lidi s diabetem II typu. Rozpustná vláknina navíc redukuje množství krevního cholesterolu, pozitivně ovlivňuje střevní mikroflóru, čímž předchází kolorektálním nádorovým

onemocněním [71]. Nerozpustná vláknina v pšeničných otrubách převažuje, svými laxativními účinky pomáhá udržovat zdraví tlustého střeva a podporuje peristaltiku [65]. Vláknina pšeničných otrub je také slibným prebiotikem, která navíc disponuje také antioxidační aktivitou [56, 62]. Procentuální zastoupení jednotlivých typů vlákniny je uvedeno v tabulce 6.

Tabulka 6 Procentuální zastoupení jednotlivých druhů vlákniny [66]

Vláknina	Obsah [g/100 g]
Celková	36,5-52,4
Nerozpustná	35,0-48,4
Rozpustná	1,5-4,0

Kromě zdravotních benefitů, které vláknina pšeničných otrub poskytuje, může být významnou ingrediencí v pekárenském průmyslu také z hlediska technologického. Bylo zjištěno, že její přídavek významně zvýšil elasticitu a křehkost těsta [73]. Rozpustná vláknina navíc zvyšuje retenční kapacitu vody i oleje a kapacitu bobtnání [74].

Proteiny

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 [65]. Pomocí dvoudimenzionální elektroforézy na gelu bylo ve vnější vrstvě zaznamenáno 35, ve střední 119 a ve vnitřní 672 různých proteinů. Opakovatelnost proteinů mezi jednotlivými vrstvami byla minimální [75]. Osborneova klasifikace extrahovatelnosti dělí proteiny na frakce rozpustné ve vodě, NaCl, ethanolu a NaOH. Dle Idris et al. [76] jsou proteiny pšeničných otrub tvořeny albuminy, globuliny, prolaminy, gluteliny a proteiny, které nejsou rozpustné žádným z výše uvedených extrakčních činidel. Konkrétní procentuální obsah jednotlivých frakcí je uveden v tabulce 7.

Tabulka 7 Procentuální obsah jednotlivých typů proteinů pšeničných otrub [76]

Typ proteinu	Obsah [%]
Albuminy	23,5
Globuliny	15,5
Prolaminy	18,5
Gluteliny	25,5
Nerozpustné proteiny	17,5

Z nutričního hlediska charakterizuje proteiny poměr jejich účinnosti (PER), který je definován jako získaná váha ku množství přijatého proteinu. Pro proteiny pšeničných otrub je jeho hodnota srovnatelná se sojovými proteiny, a dokonce vyšší než hodnota PER pšeničné mouky [65]. Nutriční kvalita proteinů je také 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 cereálií, limitující aminokyselinou lysin [77]. V porovnání s proteiny pšeničného endospermu obsahují pšeničné otruby vyšší množství argininu a glycinu [69, 70]. Konkrétní množství jednotlivých aminokyselin proteinů

izolovaných z pšeničných otrub jsou uvedeny v tabulce 8. Obsah esenciálních aminokyselin tvoří přes 22 % proteinového izolátu, přičemž jejich denní příjem pro dospělého člověka je 84 mg/kg tělesné váhy [80].

Tabulka 8 Zastoupení jednotlivých aminokyselin v pšeničných otrubách [79]

Esenciální aminokyseliny [g/100 g proteinového izolátu]								
Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Thr	Val	His	Trp
2,4	4,66	3,53	1,03	2,89	2,16	3,91	2,15	-
Neesenciální aminokyseliny [g/100 g proteinového izolátu]								
Ala	Arg	Asp	Cys	Glu	Gly	Tyr	Ser	Pro
3,40	7,08	5,10	-	10,37	3,74	1,84	3,01	2,78

Významné bioaktivní látky

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 a je uvedeno v tabulce 9 [71]. Nejméně zastoupenější 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 vázány na strukturální složky buněčné stěny [81].

Tabulka 9 Zastoupení bioaktivních látek v pšeničných otrubách [62, 73]

Bioaktivní látka	Množství	Jednotky
Kyselina ferulová	500-1500	mg/100 g
Foláty	79-200	µg/100 g
Niacin	14-18	mg/100 g
Kyselina pantotenová	2,2-3,9	mg /100 g
Riboflavin	0,4 – 0,75	mg/100 g
Lutein	97-140	µg/100 g
β-karoten	940	µg/100 g

Kyselina ferulová je nejméně zastoupenější fenolickou kyselinou pšeničných otrub. Díky schopnosti eliminace superoxidových radikálů významně inhibuje oxidaci lipidů, například lipoproteinů o nízké hustotě, které jsou hlavními nosiči cholesterolu v krvi [62, 74]. Mimo prevenci lipidové oxidace působí také proti nemocem způsobenými volnými radikály (rakovina, ateroskleróza) nebo stárnutí vlivem oxidativní degenerace tkáně [83]. Kyselina ferulová či její estery jsou také schopné snižovat množství některých zánětlivých mediátorů, svým působením může přispět ke snížení obsahu glukózy v krvi, nebo může jejich příjem chránit játra proti toxickému působení alkoholu nebo polynenasycených mastných kyselin [75, 76].

Mezi další významné bioaktivní látky pšeničných otrub patří vitaminy skupiny B, zejména foláty, niacin, pantotenová kyselina nebo riboflavin. Foláty se v těle podílí na tvorbě oxidu dusnatého, který je významnou signální molekulou, může působit proti disfunkci a rozpadu mitochondrií díky odchytu superoxidových radikálů [71]. Niacin je vitamin rozpustný ve vodě, používá se pro léčbu dyslipidemie a aterosklerózy. Kyselina pantotenová a riboflavin jsou významné, jelikož slouží jako prekurzory různých látek (koenzym A, FAD) se značnou antioxidační aktivitou [71].

Přestože je obsah karotenoidů v pšenici obecně nízký, vysoké množství konzumovaných pšeničných potravin z ní dělá pro lidi významný zdroj karotenoidů [86]. Karotenoidy jsou C40 isoprenoidy syntetizované rostlinami a v případě cereálií jsou zodpovědné za charakteristické žluté zbarvení. Bylo pozorováno, že u novějších odrůd pšenice je obsah karotenoidů vyšší, než u starších [87]. Jsou zastoupeny zejména luteinem, zeaxantinem a β -karotenem [73, 77]. Díky struktuře s konjugovanými dvojnými vazbami mohou reagovat s velmi reaktivními kyslíkovými radikály, inhibují lipid peroxidázu [71].

Anorganická frakce

S ohledem na relativně vysoké nutriční kvality pšeničných otrub se upřednostňuje jejich využití spíše pro dietární účely [88]. Ovšem většina minerálních látek pšeničných otrub nemá pro člověka žádný výživový význam, jelikož je vázaná ve formě obtížně stravitelných fytátů [67]. Otruby tak ve své nativní formě nejsou pro člověka dobrým zdrojem minerálních látek i přesto, že je jejich zastoupení zde významné. 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 mají relativně vysoký obsah draslíku a fosforu, což jsou základní rostlinné nutrienty nezbytné pro správný vývoj rostlin [89]. Do půdy jsou spolu s dusíkem běžně dodávány ve formě minerálního hnojiva NPK, avšak organická hnojiva, kterým mohou být i pšeničné otruby, mají oproti nim výhodu v dlouhotrvajícím uvolňování minerálních látek z důvodu pozvolného rozkladu rostlinného materiálu [90, 151]. Celková množství minerálních prvků v pšeničných otrubách jsou uvedena v tabulce 10.

Tabulka 10 Zastoupení minerálních látek v pšeničných otrubách [mg/100 g] [61, 80]

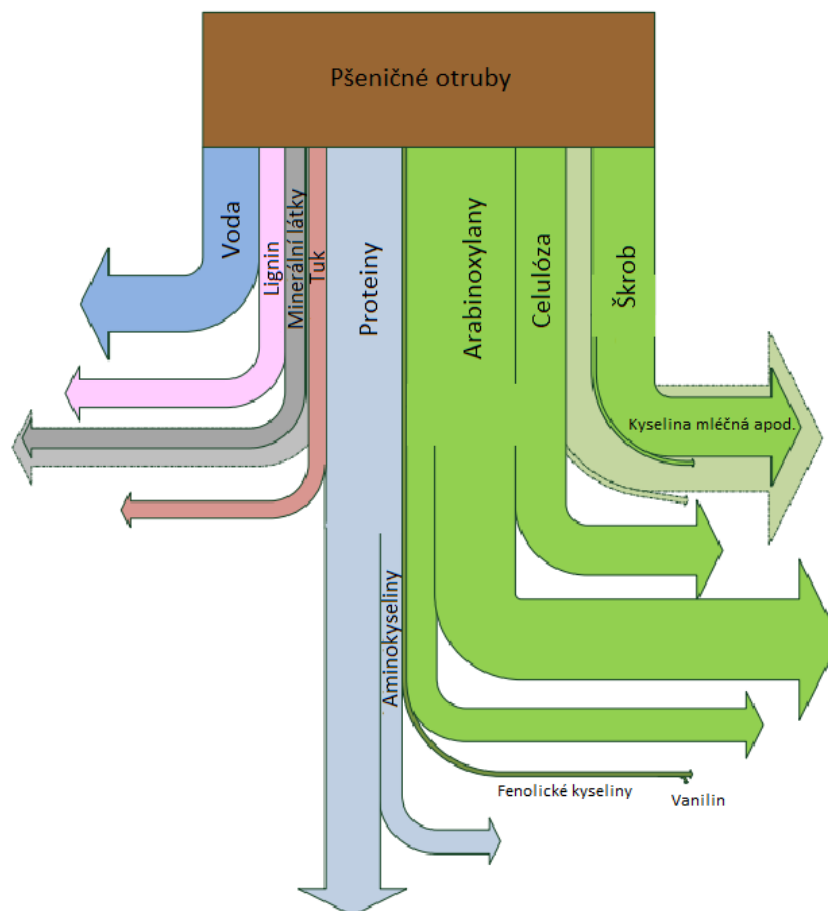
Popel	K	P	Mg	Ca	Mn	Fe	Zn	Na	Cu
5,8 g	1182	1013	611	73	11,5	10,6	7,3	2	1

Kvůli ubývajícimu množství organické hmoty na polích a vzrůstajícímu zájmu o ekologičtější a bio zemědělství se přikládá větší význam organickým hnojivům. Jednou z jejich možných surovin pro přípravu biohnojiv jsou vedlejší produkty potravinářské výroby, které disponují vhodnými vlastnostmi. Mimo vysokého množství minerálních látek často tyto produkty pozitivně ovlivňují fyzikálně-chemické vlastnosti půdy, či podporují působení mikroorganismů [89].

2.2.2 Biorafinace pšeničných otrub

Trendem nejen dnešní doby je maximální využití sekundárních produktů výroby a tím eliminace 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 nejpříjemnějších podmínek. To platí i v případě pšeničných otrub, které mají řadu vlastností, jež se dají velmi dobře dále zúročit. Proces plného využití PO se označuje jako biorafinace, příklad biorafinace PO je zobrazen na obr. 9 [91].



Obr. 9 Příklad biorafinace pšeničných otrub [91]

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 [92].

Některé způsoby využití lignocelulózového materiálu byly zmiňovány již v kap. 2.1.3. Pšeničné otruby jsou také vhodným materiálem pro krmné účely, zlepšují nutriční i technologické vlastnosti potravin, jejich konzumace poskytuje řadu zdravotních benefitů, mohou sloužit jako bioadsorbent těžkých kovů, nebo jako surovina pro produkci biopaliv.

Produkce biopaliv z pšeničných otrub

Jedna z aktuálně nepoužívanějších technologií zhodnocení lignocelulózového materiálu je jejich konverze na bioethanol. Za tímto účelem je nejprve nutné polysacharidy hydrolyzovat na

jednoduché cukry, které mohou dále sloužit mikroorganismům jako substrát pro konverzi. Také výroba bioethanolu z PO je v současné době dobře známa [93].

Výtěžnost sacharifikace pšeničných otrub ovlivňuje jak jejich složení, tak podmínky procesu. Zastoupení, vlastnosti a typy vazeb mezi 3 hlavními polymery – celulózu, hemicelulózy a ligninem mají vliv na enzymatickou a mikrobiální degradaci polysacharidů. Byla pozorována rozdílná výtěžnost procesu mikrobiální sacharifikace pšeničných otrub při použití rozdílných mikroorganismů. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití více plísňových kultur (*A. niger*, *P. chrysogenum*, *T. viride*) – 588,1 mg/g [94]. Podobných výtěžností cukrů bylo dosaženo při sacharifikaci pšeničných otrub kombinací alkalické/kyselé (NaOH/H₂SO₄) a enzymatické hydrolýzy (celulázy a amyloglukosidázy). Za těchto podmínek však značný podíl uvolněných cukrů tvořila kromě glukózy také xylóza a arabinoxylóza (cca 30 %) [95].

Pro konverzi získaného tekutého cukerného roztoku z pšeničných otrub na bioethanol lze použít různé typy mikroorganismů, např. *S. cerevisiae* (*diastaticus*), *Pichia stipitis*, *Candida brassicae*, *Zymomonas moilis* nebo jejich kombinace [93]. Literatura uvádí, že z 1 kg PO lze vyrobit až 70 g bioethanolu (fermentace pomocí *S. cerevisiae* při suplementaci celulázami), což je asi poloviční množství, než jakého je možné dosáhnout při konverzi samotné glukózy [96].

Biotechnologické zpracování pšeničných otrub

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. Uvolnění a získání kyseliny ferulové z pšeničných otrub může být dosaženo např. po alkalické hydrolýze nebo enzymatické hydrolýze pomocí hub (např. *Hericium erinaceum*). Kromě kyseliny ferulové pšeničné otruby obsahují také kyselinu kumarovou a vanilin. Zejména vanilin je významná bioaktivní látka používaná v potravinářském průmyslu jako přírodní aroma. Lze ho získávat také biotechnologickou konverzí kyseliny ferulové získané z pšeničných otrub [97].

Hnojiva a bioadsorbenty z pšeničných otrub

Vliv použití pšeničných otrub jako složky organického hnojiva na růst byl prověřen na několika různých typech hub a rostlin. V případě kultivace houby *Psathyrella atroumbonata*, která disponuje schopností rozkládat lignocelulózu, byl pozorován nejlepší myceliální vývoj a nárůst sporoforů na substrátu tvořeném pilinami s 5% přídatkem pšeničných otrub [98]. Z krátkodobého hlediska neobohacují rostlinná organická hnojiva půdu tolik, jako hnojiva živočišného původu, jejich účinek v půdě se často projevuje až po 5 letech [99]. Kompostováním tohoto materiálu může dojít k urychlení přístupu obsažených minerálních látek pro rostliny. Obohacování půdy kompostovanými pšeničnými otrubami vedlo ke zvýšení obsahu fosforu ve slunečnicích až o 133 % [100].

Díky složité struktuře mají pšeničné otruby využití jako absorbent různých látek, které znečišťují životní prostředí. Oproti nejčastěji používanému aktivnímu uhlí je výhodou tohoto materiálu zejména jeho nízká cena a ekologičnost. Lze ho použít jak neupravený, tak modifikovaný dalšími funkčními skupinami [91, 92].

Pšeničné otruby do velikosti 0,6 mm byly schopné zmírnit znečištění vodného prostředí krystalovou violetí, která je často původcem toxicity a průmyslového znečištění životního prostředí [103]. Za určitých podmínek byla z vodného roztoku odstraněna také reaktivní modř, červeně a žluť [101]. Pšeničné otruby se jeví také jako přirozený adsorbent kovů, přičemž vykazují větší specifitu pro ionty těžkých kovů než například pro sodíkové nebo draslíkové ionty [104].

Modifikace pšeničných otrub se provádí s ohledem na typ látky, která má být absorbována. Například jejich termochemická modifikace kyselinou citrónovou vedla ke zlepšení adsorpce měďnatých iontů, aniž by byla narušena ekologičnost absorbentu [105]. Modifikace kyselinou vinou za určitých podmínek zvýšila schopnost odstraňovat ionty chromu z vodného prostředí [102].

Pšeničné otruby jako zdroj proteinů

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 [106]. 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 proteiny PO nutričně mnohem pestřejší aminokyselinový profil, jsou bohatým zdrojem argininu, kyseliny glutamové i některých esenciálních aminokyselin.

Použití proteinů pšeničných otrub jako ingredience v pekárenských aplikacích může mít řadu nutričních, ale i technologických výhod. Dle O'Connora [107] jsou tyto proteiny zodpovědné za inhibici funkce pregastrických lipáz, což vede k prevenci obezity či přímo k redukci váhy. V porovnání s ostatními proteiny mají vysokou emulzifikační a pěnicí aktivitu, které souvisí s jejich rozpustností [108]. Pro pekárenské účely je uspokojivá také jejich vazebná kapacita tuků a vody [76].

Proteiny pšeničných otrub mohou být také použity pro kontrolu enzymatického hnědnutí [65]. Hydrolyzáty albuminové frakce o 40 % inhibují působení jablečných polyfenol oxidáz [109], u globulinové frakce byla prokázána 24% inhibice funkce tyrosináz hub [110].

Vyšší hodnotu lze proteinům pšeničných otrub přidat také jejich hydrolýzou na aminokyseliny a poté dekarboxylací kyseliny glutamové na kyselinu γ -aminobutyrovou (GABA). Toho lze docílit působením proteolytických enzymů a glutamát dekarboxylázy [65]. Přestože bylo dosaženo až 60% účinnosti konverze, bylo zjištěno, že použití ječmenných produktů dosahuje ještě mnohem vyšších výtěžností [111].

Potenciální uplatnění proteinů pšeničných otrub je také v oboru nanotechnologií, konkrétně jako nosiče nebo enkapsulační materiál pro různé významné nutrienty nebo bioaktivní látky. Výhodou těchto proteinů je vysoká funkční diverzita, a tedy jejich struktura [65]. Z cereálních proteinů mohou za tímto účelem být použity gliadiny nebo kukuřičný zein [102, 103].

2.3 Rostlinné proteiny

Proteiny jsou dusíkaté organické sloučeniny složené z dlouhého řetězce aminokyselin, které jsou nezbytné pro správné fungování všech žijících organismů. V dnešní době roste popularita rostlinných proteinů 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) [114]. 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 vlastnostmi rostlinných proteinů [115].

2.3.1 Metody izolace proteinů

Existuje řada různých technik izolace či extrakce proteinů z rostlinných materiálů a další se nově vyvíjejí. 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 [116].

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 [117]. Pro precipitaci je poté pH upraveno na hodnotu pI, která se u rostlinných proteinů běžně pohybuje mezi 4–5 [61, 67, 70, 108]. Použitím různých extrakčních činidel je také možné postupně vyizolovat jednotlivé proteinové frakce [65]. Extrakcí materiálu vodou za daných podmínek se po oddělení nerozpustného získává albuminová frakce. Globuliny jsou rozpustné v 50 mM tris-HCl, prolaminy lze extrahovat 70% propanolem a glutelinovou frakci získáme suspenzací materiálu v 0,05 M NaOH [78]. Konkrétní podmínky analýzy jsou uvedeny v tabulce 11.

Tabulka 11 Podmínky extrakce jednotlivých proteinových frakcí pšeničných otrub [78]

Proteinová frakce	Extrakční činidlo	Podmínky extrakce
Albumin	Voda	Poměr 1:10, 2 h za stálého míchání
Globulin	50 mM tris-HCl	Přídavek 0,5 M NaCl, pH 8, 2 h za stálého míchání
Prolamin	70% 2-propanol (aq)	Poměr 1:10, 2 h za stálého míchání
Glutelin	0,05 M NaOH	Poměr 1:10, 2 h za stálého míchání

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 získané proteinové koncentráty disponují vyšším zastoupením proteinů díky odstranění nežádoucí vlákniny [119].

Další metodou izolace proteinů z rostlinných materiálů je **vysolování**. Přídavkem soli se zvyšuje iontová síla extrakčního činidla, a tím hydratovatelnost proteinů vodou a 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 [120].

Proteiny lze z rostlinného materiálu 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 [119], [121].

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 [122]. Mezi tyto metody patří například extrakce za pomoci enzymů, eutektického rozpouštědla, reverzních micel, mikrovlnného záření, ultrazvuku, vysokého tlaku, subkritické vody, nebo pulsního elektrického pole [116].

Použitím **enzymů** v procesu izolace proteinů z rostlinného materiálu se dosahuje účinnějšího rozrušení nebo hydrolýzy ostatních komponent. Nejčastěji se používají proteázy nebo celulázy, jejichž působením dochází k rozpadu lignocelulózového materiálu, a tedy uvolnění proteinů. Výtěžnost proteinu je nakonec ovlivněna zejména mírou degradace rostlinného materiálu, která je u konkrétního materiálu závislá jak na typu použitého enzymu a jeho koncentraci, tak na teplotě a času. Proteiny se po uvolnění z enzymaticky narušené struktury rostlinného materiálu často extrahují alkalicky [123]. Díky použití enzymů bylo dosaženo prokazatelného zlepšení funkčních vlastností extrahovaných proteinů [124].

Poptávka po udržitelných a „zelených“ technologiích v potravinářství vede ke snaze o omezení využívání organických rozpouštědel (methanol, hexan atd.). Nahradit by je mohla **hluboce eutektická rozpouštědla** (HER), směsi dvou nebo více látek, jejichž teplota tání je mnohem nižší než teplota tání jejich jednotlivých složek. Využití HER při extrakci proteinů spočívá v tvorbě dvou vodných fází při konkrétních koncentracích jednotlivých složek. Hlavní mechanismus je pak spojen se zvýšením iontové síly. Výhodou je také nízké povrchové napětí HER, díky kterému se snižuje riziko degradace proteinů. Pro extrakci proteinů z různých potravinářských materiálů byly jako HER použity například směsi glycerolu a cholinu (výlisky řepky olejné), sůl karboxylových kyselin a močoviny nebo cholinchloridu a močoviny (mláto) [115, 116, 117].

Solubilizace proteinů může být provedena také jejich uzavřením do micel. **Obrácené micely** (jádro tvoří polární skupiny, obal nepolární skupiny) proteiny enkapsulují, čímž jsou z matrice extrahovány. Hodnota pH a iontová síla rozpouštědla mají zásadní vliv na vznik elektrostatických interakcí mezi povrchově aktivními látkami a proteiny, a tím umožňují proces extrakce. Proces je ale ovlivňován i řadou dalších parametrů, jako například obsahem vody, teplotou, typem a koncentrací povrchově aktivní látky a rozpouštědla nebo časem. Zároveň je zásadní také velikost, tvar a struktura tvořených micel. Proteiny jsou poté z micel opětovně uvolňovány zpětnou extrakcí [128]. Proteiny byly pomocí reverzních micel úspěšně extrahovány například ze sóji, arašídového prášku nebo mouky z žakie (jackfruit) [119, 120, 121].

Mikrovlnné záření a jím produkované teplo způsobuje v biologickém materiálu vypařování vody a zvyšování tlaku, čímž dochází k rozpadu jeho buněčných stěn a k uvolňování různých bioaktivních látek, včetně proteinů. Účinnost degradace je závislá na teplotě, obsahu tekutiny, čase, výkonu nebo typu materiálu [132]. Výhodou použití mikrovlnného záření je významné snížení doby potřebné pro rozpad buněčných stěn a možné zlepšení některých funkčních vlastností (např. absorpce vody, pěnivost, emulzifikační aktivita apod.) oproti konvenčním metodám [133]. Zařazení mikrovlnného záření do procesu zvýšilo účinnost oproti konvenčním metodám izolace například při extrakci proteinů ze semínek vodního melounu, [134], rýžových otrub [135], arašídů [133] nebo stříbrných kávových slupek [136].

Alternativou pro mikrovlnné záření je použití **ultrazvuku**, jehož působením také dochází k degradaci buněčných stěn a uvolnění bioaktivních sloučenin. Ultrazvukové vlny vyšší než 20 kHz mají energii, která je schopna procházet a narušovat biologickým materiálem. Účinnost ultrazvuku může být navíc podpořena kavitací, které do systému uvolňuje ještě více energie

[137]. Extrakci proteinů za pomoci ultrazvuku ovlivňuje například výkon, čas extrakční poměr, a teplota, tyto parametry musí být v závislosti na materiálu optimalizovány. U řady rostlinných materiálů dosahovala metoda extrakce proteinů za pomoci ultrazvuku vyšší výtěžnosti jak než metody konvenční, tak dokonce než extrakce za pomoci mikrovln – např. u kokosu [138].

Využití **subkritické vody** pro extrakci proteinů je nízkonákladová technologie, která nevyžaduje použití žádných chemikálií. Je pouze nezbytné udržovat vodu v tekutém skupenství nad hodnotou jejího varu (100–374 °C) snížením tlaku (1–22,1 MPa) [139]. To způsobí rozpad vodíkových vazeb, snížení viskozity a povrchového napětí, a naopak zvýšení difuzivity, která je klíčová pro zlepšení extrahovatelnosti proteinů z rostlinných materiálů. Výtěžnost extrakce proteinů pomocí subkritické vody z různých rostlinných materiálů (mláto, len, dýně) je srovnatelná s alkalickou nebo vodnou extrakcí [130, 131]. Podmínky extrakce, zejména teplota a tlak se musí dle materiálu optimalizovat. Subkritická extrakce také ovlivňuje funkční vlastnosti extrahovaných proteinů – u izolovaných sojových proteinů byla například pozorována vyšší rozpustnost při teplotách nad 120 °C, emulzifikační aktivita, pěnivost a stabilita pěny [129]. U proteinů extrahovaných subkritickou extrakcí z červených mořských řas byly oproti klasicky extrahovaným proteinům pozorovány také lepší antioxidační účinky [142].

Aplikace **vysokého tlaku** se nepoužívá pouze jako metoda konzervace potravin, ale i pro jejich zpracování. Jedná se o energeticky nenáročný, netoxický proces, který generuje pouze minimální množství tepla, tudíž nejsou extrahované látky vystavovány termální degradaci. Většinou je na potraviny aplikován tlak v rozmezí 100 a 1000 MPa po dobu od několika milisekund po 20 minut. Jeho působením dochází k rozbití kovalentních i nekovalentních vazeb, což může způsobit změny ve struktuře. Buňky se stávají pružnější, čímž umožňují extrakci látek z rostlinných tkání [143]. Účinnost ovlivňuje jak velikost tlaku, tak teplota, typ a množství rozpouštědla, počet opakování a čas [144]. Vyšší výtěžnosti extrakcí proteinu za vysokého tlaku byly v porovnání s konvenčními metodami extrakce pozorovány například u sóji nebo řas [135, 136]. Funkční vlastnosti sojových proteinů byly, stejně jako u předchozích metod, lepší než u proteinů extrahovaných bez použití vysokého tlaku [147].

Pulsní elektrické pole (PEL) lze v potravinářství využít jak za účelem konzervace, tak pro extrakci biomolekul. Tato metoda nevyžaduje použití žádných chemikálií, je energeticky a časově nenáročná a neprodukuje žádné teplo [148]. PEL se většinou aplikuje v rozmezí napětí od 10 do 80 kV/cm po dobu pouze několika mikro až milisekund, to způsobí rozpad buněčné membrány a usnadní extrakci proteinů [139, 140]. Účinnost extrakce pak závisí také na pulsní frekvenci, šířce a vlně [149]. PEL se často zařazuje v kombinaci s konvenčními metodami extrakce proteinů, např. při extrakci proteinů z natě a listů řepky olejné bylo dosaženo 80% zvýšení její výtěžnosti [151]. Vystavení proteinů PEL může vést k jejich zvýšené rozpustnosti vlivem částečného rozbalení jejich řetězce, zlepšuje se i jejich zadržnost vody a oleje, emulzifikační a pěnicí vlastnosti [150].

2.3.1.1 Sušení proteinů po izolaci

Proteinové prášky jsou v potravinářství ceněné zejména díky jejich chemické a mikrobiální stabilitě a nízkým přepravním nákladům. Způsob sušení proteinů však také může ovlivňovat jejich nutriční a technologicko-funkční vlastnosti, kromě proteinů může být metodou sušení ovlivňován také škrob nebo vláknina. Funkční vlastnosti proteinů jsou spojené s jedinečnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi proteinů, které jsou dané jejich strukturou. Při procesu sušení může docházet k denaturaci proteinů, degradaci struktury a tím změně jejich vlastností [142, 143].

K sušení proteinů se nejčastěji využívá lyofilizace, vakuové sušení nebo sprejové sušení, výběr metody v závislosti na složení sušeného materiálu má zásadní vliv na jeho vlastnosti. Například při sprejovém sušení proteinových izolátů může docházet ke shlukování proteinů, zvýšení hydrofobicity a zhoršení jejich emulzifikačních vlastností. Těmto nedostatkům lze však předcházet přidávkou jednoduchých cukrů nebo polysacharidů do procesu sprejového sušení [154]. Za účelem zachování nutričních a technologicko-funčních vlastností proteinů jsou testovány metody infračerveného, ultrazvukového nebo mikrovlnného sušení, které by nemělo zásadně narušovat strukturu proteinů [155].

2.3.2 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 [117]. Zvýšený příjem bílkovin (až 2 g/kg/den) je pak doporučován sportovcům, ale také starším lidem [146, 147]. 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.

Pro zhodnocení nutričního významu proteinů je nutné zohlednit také jejich aminokyselinové složení, absorpci a stravitelnost. Nutriční kvalitu proteinů je poté možné vyjádřit pomocí různých metod (např. PDCAAS, DIAAS nebo PER), kterými lze jednoduše porovnávat potraviny mezi sebou [115].

Aminokyselinové složení

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, jeho hodnoty jsou zobrazeny v tabulce 12 [158].

Tabulka 12 Doporučený denní příjem esenciálních aminokyselin [mg/kg jedince] [158]

	Novorozenci (3-4 měsíce)	Batolata (2 roky)	Děti (10-12 let)	Dospělí
Isoleucin	70	31	28	10
Leucin	161	73	42	14
Lysin	103	64	44	12
Methionin + cystein	58	27	22	13
Phenylalanin + tyrosin	125	69	22	14
Threonin	87	37	28	7
Tryptofan	17	12,5	3,3	3,5
Valin	93	38	25	10

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 [118]. I přesto mohou být tyto proteiny ceněné pro obsah některých aminokyselin, které pozitivně ovlivňují procesy v těle [117]. Navíc jsou jedinou přijatelnou volbou pro vegany.

Proteiny z různých rostlinných zdrojů mají mezi sebou relativně malé rozdíly v zastoupení isoleucinu, valinu, histidinu, phenylalaninu a threoninu. Významně rozdílné koncentrace byly však stanoveny pro lysin, methionin a leucin. Dostatečná množství (dle WHO [159]) všech těchto aminokyselin byly stanoveny pouze v bramborovém proteinu a proteinu z chlebovníku [160]. U sojového a hrachového proteinu bylo stanoveno nízké množství methioninu, který je naopak v dostatečné koncentraci zastoupen v proteinu kukuřice, konopí nebo hnědé rýže. Tyto rostlinné proteiny jsou však neoptimální zdroj lysinu, stejně jako pšeničný nebo ovesný protein. Protein z konopí a lupiny má pak dle FAO nedostatečný obsah leucinu [161].

Kombinací rostlinných proteinů z různých zdrojů lze však napodobit aminokyselinový profil živočišných bílkovin, a tím eliminovat jejich individuální nutriční nedostatky [160], [161]. Jak již bylo zmíněno, referenčnímu proteinu definovanému WHO svým složením nejvíce odpovídá protein z brambor nebo chlebovníku, jeho aminokyselinové složení je však možné napodobit také kombinací hrachového albuminu (86,6 %) a proteinu z goa fazolí (13,4 %). Aminokyselinové složení kuřecího masa by pak obdobně mohlo být napodobeno směsí proteinů z bílé ředkve (87,3 %), brambor (16,3 %) a goa fazolí (5,4 %), náhražka aminokyselin kravského mléka by mohla být tvořena kombinací proteinů fazolí adzuki, (45,9 %), brambor (28,4 %), goa fazolí (18,3 %), hrachového albuminu (4,7 %) a napinu (2,7 %) [160].

Stravitelnost

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 [162].

V průběhu trávení jsou proteiny působením proteáz postupně rozloženy na peptidy a aminokyseliny, které jsou vstřebávány v tenkém střevě. Celý proces trávení je rozdělený do 4 fází (tabulka 13) – (1) orální trávení, kdy dochází zejména k mechanické dezintegraci materiálu, (2) žaludeční trávení pepsinem v kyselém prostředí, (3) pankreatické trávení za účasti trypsinu, chymotrypsinu, elastázy či karboxypeptidáz a (4) trávení tenkého střeva, kde dochází k odštěpování aminokyselin aminopeptidázami [152, 153].

Tabulka 13 Podmínky jednotlivých fází trávení [152, 153]

Fáze trávení	Enzymy	pH	Odštěpované struktury
Orální	Amylázy	7	3 mm částice
Žaludeční	Pepsin	2	Velké i malé polypeptidy, volné aminokyseliny
Pankreatická	Trypsin, chymotrypsin, elastázy, karboxypeptidázy	7	Oligopeptidy, volné aminokyseliny
Tenkého střeva	Aminopeptidázy	7	Volné aminokyseliny

Aminokyseliny nebo krátké peptidy uvolněné při procesu trávení v gastrointestinálním traktu mohou poté být absorbovány epiteliálními buňkami. Pokud není protein v průběhu

trávení dostatečně naštěpen, může dojít ke snížení absorpce aminokyselin, a tím k jejich deficiencím ve výživě. Ne strávené proteiny mohou navíc v dalších částech trávicího traktu způsobovat nežádoucí zdravotní projevy [164].

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 trávicím traktu [165]. Hydrofóbní β -struktury navíc způsobují shlukování proteinů, což také snižuje jejich stravitelnost [155, 156]. Další faktorem, který může snižovat stravitelnost rostlinných proteinů, je přítomnost neškrobových polysacharidů nebo vlákniny, které brání působení trávicích enzymů [167].

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 [158, 159, 160]. V syrových luštěninách, obilovinách, bramborách nebo rajčatech se přirozeně vyskytují inhibitory proteáz, které narušují působení trávicích enzymů trypsinu a chymotrypsinu, jejich obsah lze však významně zredukovat tepelným opracováním [161, 162].

Vstřebatelnost aminokyselin a krátkých peptidů je také závislá na rychlosti stravitelnosti proteinů. Syrovátkový protein je považovaný za rychle stravitelný díky dobré rozpustnosti v kyselém prostředí žaludku, je pak vstřebáván již ve dvanáctníku tenkého střeva. Naopak kaseiny jsou tráveny pomalu a vstřebávány v nižší části tenkého střeva, jelikož mají často tendenci koagulovat [173]. Sojové proteiny jsou vzhledem ke svým vlastnostem tráveny rychleji než kaseiny, ale pomaleji než syrovátkové proteiny [164, 165].

Hodnocení kvality proteinů

Hlavním ukazatelem kvality proteinů je právě jejich aminokyselinové složení, zejména obsah esenciálních aminokyselin a míra jejich stravitelnosti. Ke zhodnocení těchto parametrů byla navržena řada různých metod, díky kterým je možné potravinám udělovat skóre, které přesně definuje jejich proteinový přínos [105, 166].

PDCAAS (protein digestibility corrected amino acid score), neboli *proteinová stravitelnost vzhledem k aminokyselinovému spektru*, porovnává obsah esenciálních aminokyselin testované potravině vůči jejímu množství v teoreticky sestaveném proteinu, který pokrývá aminokyselinové nároky dané věkové skupiny. Aminokyselina s nejnižším poměrem je označována jako limitující. Tento poměr vynásobený fekální stravitelností dané potravině vyjadřuje PDCAAS skóre (viz rovnice 1). Fekální stravitelnost je stanovena jako rozdíl množství dusíku v testovaném proteinu a v exkrementech myši, které jsou krmeny jeho definovaným množstvím. PDCAAS skóre potravin, které je vyšší než 1, je zaokrouhlováno na 1, nižší hodnoty indikují neoptimální aminokyselinové složení proteinů [177].

$$\text{PDCAAS} = \frac{\text{mg limitující aminokyseliny v 1 g vzorku}}{\text{mg stejné aminokyseliny v 1 g teoretickém proteinu}} \cdot \text{stravitelnost vzorku} \quad (1)$$

Živočišné bílkoviny mají obecně PDCAAS skóre rovné nebo velmi blízké 1, jsou tak považovány za kompletní, protože obsahují všechny esenciální aminokyseliny v dostatečných množstvích pro správný růst a vývoj. Z rostlinných jsou s živočišnými srovnatelné zejména proteiny sóji. Většina z nich má však často obsah jedné nebo více esenciálních aminokyselin

nedostatečný. Například pro luštěniny jsou limitujícími aminokyselinami cystein a methionin, pro obiloviny je to lysin a threonin, u kukuřice je nízké množství tryptofanu [115].

S ohledem na složení proteinů potraviny, která není považována za jejich jediný zdroj ve stravě, by PDCAAS skóre mělo pro dospělého člověka být vyšší než 0,2. Úpravou PDCAAS skóre, konkrétně jeho vynásobením referenčním příjmem proteinů (RPP), lze daný zdroj zhodnotit také z hlediska přínosu proteinů ve stravě. Pokud je tato hodnota mezi 5 a 10 g ku RPP, je potravina považována za dobrý zdroj proteinů, při hodnotě vyšší než 10 g za excelentní zdroj proteinů [178].

Novější metodou hodnocení kvality proteinů je **DIAAS** (*digestible indispensable amino acid score*), která se podobá metodě PDCAAS, ovšem zohledňuje pokročilé znalosti nutričních potřeb esenciálních aminokyselin. Pro výpočet je použita ileální stravitelnost vzorků místo fekální, která lépe vyjadřuje množství stravitelných aminokyselin v kyčelníku – spodní části tenkého střeva. Nevýhodou této metody je nezbytný odběr vzorků ileostomií, který se provádí jak u zvířat, tak lidí. Skóre DIAAS metody může dosahovat hodnoty vyšší než 1, čímž poukazuje na potenciální zdravotní benefity poskytované potravinou [115]. DIAAS skóre potraviny považované za zdroj proteinů by mělo být vyšší než 75, proteinový přínos této potraviny ve stravě je poté vyhodnocován stejně jako u PDCAAS metody [178].

Další z možných metod hodnocení kvality proteinů je **PER** (*protein efficiency ratio*), která zohledňuje růst a přírůstek váhy myši v závislosti na množství přijatého proteinu. Myši jsou krmeny po 4 týdny krmivem, které obsahuje 10 % daného proteinu, přírůstek váhy je průběžně sledován. Jako kontrolní protein se v této metodě využívá kasein. Ze stanovených PER hodnot různých proteinů v potravinách bylo hrubým odhadem navrženo, že by PER mohl odpovídat 2,5násobku PDCAAS hodnoty daného proteinu. Porovnání PDCAAS, DIAAS a PER skóre uděleného různým proteinovým zdrojům je uvedeno v tabulce 14.

Tabulka 14 Porovnání skóre jednotlivých metod u vybraných potravin [171, 172]

	PDCAAS	DIAAS	PER
Mléko	1	114	2,50
Veje	1	113	3,10
Kuře	1	108	2,70
Tofu	0,56	52	2,30
Černé fazole	0,53	49	1,61
Bílý chléb	0,28	29	1,00
Ovesné vločky	0,82	84	1,80

Zásadní nevýhodou všech dříve uvedených metod hodnocení kvality proteinů je nezbytnost experimentů na zvířatech. Alternativními metodami je uvádění energetické hodnoty – kalorií (EU) nebo celkového množství proteinu v potravine (Austrálie a Nový Zéland). Za zdroj proteinu je považována potravina, jejíž energetická hodnota je tvořena alespoň z 12 % proteiny, nebo obsahují 5 a 9,9 g proteinu v jedné porci. Vysokoproteinové potraviny mají energetickou hodnotu tvořenou proteiny z více než 20 %, nebo jich obsahují více než 10 %. Možností je také stanovování stravitelnosti proteinů in vitro za pomoci simulace podmínek trávicího traktu [178].

2.3.3 Funkční vlastnosti rostlinných proteinů

Před použitím rostlinných proteinů v potravinářství je nutné zohlednit také jejich funkční vlastnosti, ve kterých se mohou zásadně lišit oproti proteinům živočišným. Jsou závislé na odrůdě rostliny, jejím genotypu a konformaci, obsahu proteinů a podmínkách pěstování dané rostliny, ale i na způsobu jejího zpracování – na metodách extrakce a sušení proteinů, zejména použité teplotě a tlaku [181]. Mezi hlavní funkční vlastnosti proteinů patří vaznost vody a oleje, pěnotvorné, emulzifikační a gelotvorné vlastnosti. Tyto funkce hrají významnou roli při vývoji a výrobě potravin na bázi rostlinných proteinů, jako jsou například náhražky masa, pečivo, těstoviny nebo různé nápoje [182].

Kromě nutričního významu mohou tedy potraviny potravinám poskytovat jejich charakteristické vlastnosti. Například gelující vlastnosti sojových proteinů umožňují zesíťování a tvorbu struktury tofu, pěnotvorné vlastnosti jsou zodpovědné za nadýchanou a porózní texturu zmrzlin, mražených, ale i pečených výrobků, díky dobré rozpustnosti proteinů je možná výroba rostlinných mlék [182].

Vaznost vody a oleje

Vaznost vody (VV) a oleje (VO) jsou vlastnosti proteinů, které ovlivňují kvalitu řady potravin, mohou být zodpovědné za synerezi, vařitelnost nebo šťavnatost. Udávají, kolik vody, respektive oleje je dané množství proteinů schopné vázat. Tyto vlastnosti jsou většinou stanoveny dispergací proteinů ve vodě/oleji, sediment oddělený centrifugací je zvážen. Vaznost je definována jako rozdíl původní navážky proteinu a hmotnosti sedimentu [181]. Proteiny mohou interagovat s vodou nebo tuky díky hydroxylovým skupinám. Vazbou vody proteiny ovlivňují řadu sensorických vlastností potraviny, například chuť, plnost nebo šťavnatost, ale také kvalitu těsta, nebo rychlost kažení. Hydrofobicita proteinů může mít za následek prodloužení doby míchání jednotlivých ingrediencí, v případě pečiva ovlivňuje objem výrobků [183].

Hodnoty VV i VO se u proteinů z různých rostlinných zdrojů liší, což může být způsobeno jejich rozdílnou povrchovou hydrofobicitou. Působení vysoké teploty nebo tlaku mělo za následek zvýšení VV i VO v porovnání s neupravenými proteiny [184]. Rostlinné proteiny s dobrou vazností vody a oleje jsou častou používány jako masové náhražky nebo analogy. Dobrá vaznost vody rostlinných proteinů se projevila po jejich přidavku do masných výrobků, například hovězích klobás nebo boloňského salámu [175, 176]. Vaznost vody a olejů proteiny také zabraňuje ztrátám a smršťování potravin při jejich tepelné úpravě. Například u kuřecích nugetek s přidavkem hrachového proteinů došlo ke snížení ztrát o více než 7 % [187]. VV ovlivňuje také porozitu a velikost vzduchových částic u texturovaných rostlinných proteinů produkovaných extruzí [188].

Rozpustnost

Rozpustnost je vlastnost proteinů, která umožňuje jejich solubilizaci ve daném prostředí. Je závislá na nativní struktuře proteinů, kdy jsou nepolární a hydrofobní skupiny lokalizovány v jádře proteinů. Hydrofilní skupiny jsou orientovány na povrchu proteinů, čímž je umožněna jejich interakce s rozpouštědlem, vznikají mezi nimi iontové vazby. Pokud proteiny nesou pozitivní nebo negativní náboj, nabité aminokyselinové skupiny na jejich povrchu interagují s iontovými skupinami rozpouštědla, což vede k dispergaci a solubilizaci proteinů. Pokud však elektrostatický náboj příliš zeslábné, proteiny se začnou shlukovat a srážet – přestanou být

v daném prostředí rozpustné. Nejmenší rozpustnosti proteiny dosahují ve svém izoelektrickém bodě, kde je náboj molekuly nulový [172, 179].

Rozpustnost proteinů je významná například při výrobě funkčních nápojů, u kterých je žádoucí vyhnout se jakékoliv sedimentaci nebo vzniku gelu. Pro takové účely je nutné použít pouze proteiny, které jsou v prostředí nápoje rozpustné. Během konzumace potravin ovlivňuje rozpustnost proteinů pocit v ústech a následnou stravitelnost [190]. Často se této aplikaci přizpůsobují již extrakční metody proteinů [182].

Osborne rozdělil proteiny do 4 skupin, dle jejich rozpustnosti v kyselém a alkalickém prostředí, (úprava 0,1M NaOH nebo HCl), v prostředí solí nebo alkoholu. Přítomnost solí do určité koncentrace se zlepšuje rozpustnost proteinů, závisí na iontové síle rozpouštědla. Například rostlinné globuliny nejsou rozpustné ve vodě, ale jejich solubilizace se může zvýšit v přítomnosti zředěných solí. Toho se využívá v metodách extrakce proteinů vysolováním. Optimální koncentrace solí pro maximální solubilizaci proteinů je závislá na jejich původu [181, 182, 183].

Rozpustnost proteinů může být ovlivněna v průběhu tepelné úpravy, která způsobuje jejich denaturaci, zejména rozbalení proteinových řetězců. Odhalením hydrofobních skupin, které jsou v nativním stavu proteinu umístěny v jeho jádře, se protein stává méně rozpustným a má tendenci se shlukovat. U většiny proteinů k tomuto dochází již při teplotě do 100 °C. Rozpustnost proteinů lze také zvýšit jejich chemickou nebo enzymatickou úpravou – např. enzymatickou hydrolýzou na kratší peptidy, nebo acylací, deaminací a fosforylací funkčních skupin. Tyto postupy byly úspěšně aplikovány při modifikování rozpustnosti rostlinných proteinů sóji, sametových fazolí nebo čočky [184, 185, 186]. Zvýšení rozpustnosti následkem denaturace rostlinných proteinů (sója, slunečnice, černé fazole) bylo dosaženo také aplikací ultrazvuku, pulsního elektrického pole nebo vysokého tlaku [189, 190, 191].

Tvorba pěny

Pěnivost je významná vlastnost například u krémů, zmrzlin nebo kynutého pečiva, mění se jejich hustota, textura a reologie, což přispívá ke zlepšení jejich sensorické kvality. Pěnění však může být i problematické vzhledem k výrobním zařízením (filtry, čerpadla apod.), které jsou tak více náchylné na ucpávání [182]. Pěny jsou koloidní systémy, ve kterých je plyn (vzduch) dispergován v kapalně fázi. Proteiny jsou povrchově aktivní látky s hydrofilní a hydrofobní částí. Na rozhraní fází se rozbalují a orientují se dle své polaritě – hydrofilní část k vodné fázi, hydrofobní směrem k plynné, čímž snižují povrchové napětí. Na povrchu plynných bublin tak vzniká vrstva polypeptidů, která elektrostatickými a hydrofobickými vazbami a vodíkovými můstky stabilizují pěnu [200].

Vlastnosti pěn tvořených proteiny jsou nejčastěji posuzovány kapacitou (KP) a stabilitou pěn (SP). KP představuje objem pěny, který je daným množstvím proteinu dosažen, SP je schopnost pěny udržet si svou strukturu v čase. Tyto parametry jsou závislé na možnostech konformačních změn proteinů na rozhraní fází. Rychlejší rozbalení proteinové struktury vede k nižšímu povrchovému napětí a tvorby elastické sítě, a tedy stabilní pěny [201].

Na kapacitu dané pěny se podílí také faktory ovlivňující rozpustnost proteinu v daném prostředí, jako je obsah různých dalších složek nebo iontů, pH, teplota nebo způsob míchání. Čím rozpustnější protein je, tím vyšší má kapacitu pěny [202], jelikož lépe difunduje vodným prostředím a enkapsuluje vzduchové částice [203]. Například protein z pšeničných otrub je nejrozpustnější při pH okolo 11,5, nejméně při 5,5 [76]. Přídavkem vápenatých iontů vznikají ve struktuře iontové vazby, které vedou nejen ke zvýšení kapacity pěny, ale také její stability.

Kapacita pěny proteinů izolovaných z pšeničných otrub po 0,5% přidavku CaCl_2 byla téměř 2,5 ml pěny/ml kapaliny [202], což je srovnatelné s pěnicí kapacitou proteinů rýžových otrub [204].

Neupravé rostlinné proteiny mají kvůli nerozbalené struktuře pouze omezenou schopnost tvořit pěnu. Tuto vlastnosti lze však zlepšit strukturálními změnami proteinů, konkrétně zpřístupněním hydrofobních a hydrofilních částí molekuly. Zlepšení jak KP tak SP bylo pozorováno po enzymatické hydrolýze proteinů na kratší peptidy například u hrachu [205], slunečnice [206] nebo sóji [207]. Byl testován také vliv termálního, ultrazvukového nebo chemického působení na pěnотvorné vlastnosti proteinů [198, 199, 200]. Takto modifikované proteiny většinou vykazovaly zlepšení kapacity pěny, ale často také sníženou schopnost tvorby silných, elastických a stabilních pěn. Proto se v pro stabilizování pěn v potravinářství stále používají polysacharidy jako ztužovačla nebo želírovací prostředky [211].

Emulzifikační vlastnosti

Emulze jsou disperze dvou nemísitelných kapalin, mikročástice jedné z nich jsou homogenně dispergované v té druhé. V potravinářství jsou dva základní typy emulzí – voda v oleji (margarín) a olej ve vodě (majonéza, omáčky). Proteiny jsou schopné tvořit emulze díky svým amfifilním vlastnostem a schopností tvořit filmy. Na rozhraní fází se rozbalí, orientují se hydrofobními skupinami k olejové fázi a hydrofilními vazbami směrem k vodné fázi, a tím snižují povrchové napětí, což umožní vznik emulze [212].

Emulze jsou teplotně nestabilní a postupem času se rozpadají například vlivem vzniku krému, flokulací nebo koalescencí. Vlastnosti emulzí jsou nejčastěji popisována emulzifikační kapacitou (EC) a stabilitou (ES). EC proteinů vyjadřuje množství oleje, které může být emulzifikován, ES popisuje stabilitu vzniklé emulze v čase. Na tyto parametry má zásadní vliv rozpustnost proteinu ve vodě. Méně rozpustné nebo hydrofóbní proteiny často způsobují vznik nestabilních emulzí [213].

Emulzifikační schopnost proteinů, stejně jako pěnivost, ovlivňuje hodnota pH a obsah solí v roztocích nebo suspenzích [76]. Proteiny se za daných podmínek účastní tvorby emulze a stabilizují ji [183]. Dle Idris et al. [76] alkalické prostředí zlepšuje emulzifikační kapacitu proteinů více než kyselé, nejnižší EC daných proteinů je při pH 5,5 (viz obr. 8), při nižších hodnotách pH také rychleji klesá stabilita emulze. EC se s přidavkem NaCl zvyšuje až do koncentrace 1,8 M (obr. 8). Například proteiny rýžových otrub vykazují minimální EC při téměř totožném pH jako proteiny pšeničné (pH 5), avšak maximální EC se jeví při hodnotě 9 [133]. Tato vlastnost není významnou pouze z technologického hlediska, díky ní se mohou proteiny využít také jako enkapsulátory a přenašeči významných nutričních látek (např. omega mastných kyselin) [214].

Termální, enzymatická nebo chemická modifikace struktury proteinů, které vedou k jejich rozbalení a denaturaci, mohou vést také ke změnám v emulzifikačních vlastnostech rostlinných proteinů. Například zahříváním sojových proteinů (95 °C, 30 min, pH 7) bylo dosaženo zlepšení emulzifikační aktivity i stability. Emulgace byla podpořena ve vzorku proteinu, který tvořil rozpustné agregáty >1000 kDa, stabilita emulzí byla podpořena středně velkými rozpustnými agregáty (670 až 1000 kDa) [130]. Stejně tak byly termálními, chemickými nebo enzymatickými modifikacemi emulzifikační vlastnosti zlepšeny například u proteinů hrachu [205, 206], čočky [196], nebo rýžových otrub [217].

Gelotvorné vlastnosti

Gelovatění proteinů je vlastnost významná a hojně využívaná v potravinách jako jsou například jogurty, džemy, želé nebo jiné dezerty. Gelovatění proteinů ovlivňuje hustotu, zádržnost vody, stabilitu a synerezi daného systému [182].

Gel je trojrozměrná síť tvořená rozbalenými a disociovanými proteiny. Gelovatění proteinů lze dosáhnout například působením teploty, tlaku, iontů, kyselin nebo enzymů [218]. Vyšší teplota způsobuje rozbalení proteinů, vysoký tlak vede ke konformačním změnám v sekundární, terciární a kvartérní struktuře proteinů, přičemž v obou případech dojde k denaturaci, agregaci a gelovatění proteinů [219]. Přídavek iontů (např. Ca^{2+} nebo Na^+), nebo snížení pH snižuje elektrostatický náboj proteinu, zmenšení odpudivých sil mezi molekulami, a tím jejich agregaci a gelovatění. Enzymatickou hydrolyzou proteinů jsou získány malé peptidy nebo jejich fragmenty, jejichž odhalené hydrofobní skupiny vedou k tvorbě hydrofobních vazeb a gelovatění [220].

Mezi rostlinnými proteiny je gelovatění nejvíce probádáno u proteinů sojových kvůli jejich využití při produkci tofu. Gel se získává koagulací sojového mléka působením iontů solí nebo kyselin. Gelotvorné vlastnosti sojových proteinů jsou ovlivněny jak druhem a složením sóji, tak procesem gelovatění, použitými koagulanty nebo dalšími aditivami [211, 212].

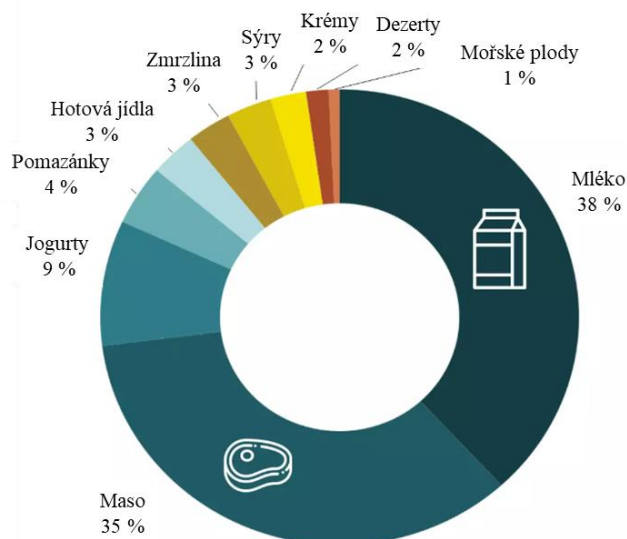
Za gelovatění proteinů luštěnin jsou zodpovědné globuliny. Sojové proteiny obecně vykazují nejlepší gelotvorné vlastnosti. Proteiny hrachu nebo lupiny jsou více termorezistentní, jejich struktura se, v porovnání se sojovými, nerozbaluje tak rychle [223]. Gelotvorné globuliny však byly identifikovány v řadě rostlinných proteinů, jako je například quinoa [224], oves [225] nebo chia [226].

2.3.4 Využití rostlinných proteinů v potravinářství

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) [227]. 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 [228], tj. o více 366 %.

Je zde hned několik důvodů pro růst trhu s plant-based potravinami. Se zvyšující se světovou populací je nutné hledat alternativní zdroje živin. Živočišná produkce, zahrnující maso a mléčné výrobky, je mnohem náročnější na suroviny (voda, krmivo, pastviny) než produkce plant-based potravin [229]. Dalším důvodem pro rozvoj rostlinných potravin je rostoucí počet veganů, vegetariánů, ale i flexitariánů, jejichž strava je tvořena převážně rostlinnými potravinami.

Mezi nejzastoupenější plant-based potraviny patří rostlinná mléka, masové analogy a rostlinné jogurty (viz obr. 10) [227]. Všechny rostlinné potraviny by měly mít vyvážený poměr nutrientů, aby jejich konzumace pokryla výživové nároky jedinců. Za účelem zvýšení příjmu proteinů ve stravě se na trhu čím dál častěji objevují potraviny s jejich zvýšeným obsahem, jsou to zejména mléčné výrobky nebo pečivo. I pro tyto aplikace lze nalézt vhodné rostlinné proteiny a vytvořit tak plant-based potraviny se zvýšeným obsahem proteinů.



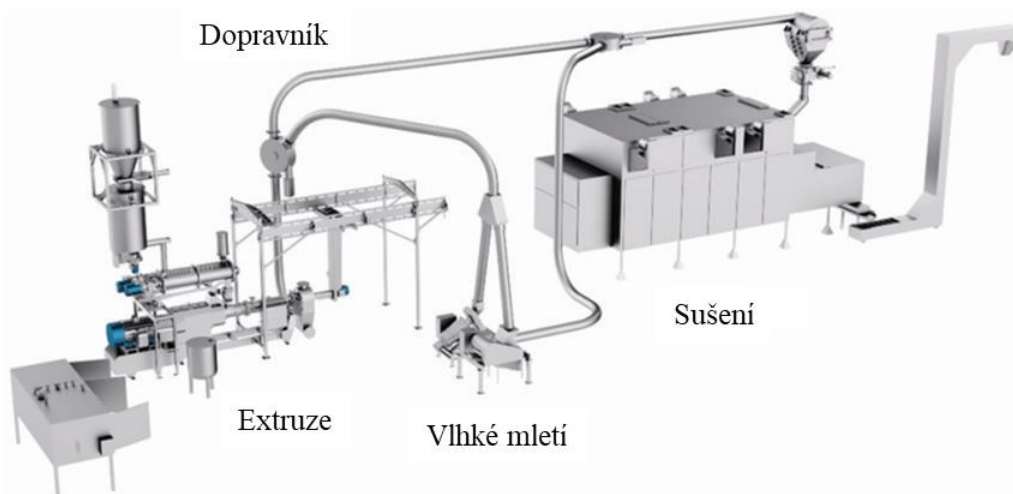
Obr. 10 Zastoupení jednotlivých potravin mezi plant-based výrobky [227]

Masové analogy

Masové analogy jsou produkty, které jsou vyrobeny pouze z rostlinných proteinů tak, aby se jejich nutriční i funkční vlastnosti co nejvíce podobaly masu nebo masným výrobkům. Mezi nepoužívanější výrobní techniky masových analogů patří tkáňové inženýrství, extruze nebo produkce mykoproteinů, přičemž druhé dvě zmiňované se využívají komerčně. Masové analogy běžně obsahují koncentráty nebo izoláty rostlinných proteinů (zejména sojové nebo hrachové), vlákninu, škrob, ochucovadla, barviva, případně další suroviny, které jim poskytují chuť, texturu a vzhled odpovídající masu [182].

Při výrobě masového analogu pomocí **extruze** se nejprve připraví sypká směs všech ingrediencí, která se před převedením do extrudéru může lehce zvlhčovat. Po přidání vody se dílo umístí do extrudéru, kde dochází k hydrataci podporované mícháním, zahříváním, vařením a působením střižných sil vytlačovacích šneků. Kombinací tepelného a mechanického namáhání je dosaženo plastifikace a texturizace směsi do vrstvených nebo vláknitých struktur, které jsou podobné masu. Tyto výrobky se často dodatečně suší nebo chladí, případně se upravují do podoby různých masných výrobků [172, 218]. Příklad procesu výroby masových analogů pomocí extruze je zobrazen na obr. 11.

Kromě tvorby textury masových analogů má proces extruze řadu dalších významných funkcí. V jeho průběhu jsou působením teploty proteiny denaturovány, a tím jsou lépe stravitelné. Zároveň mohou být zvýšením teploty deaktivovány inhibitory trypsinu [231], snížena nebo eliminována hořkost nebo syrové (rostlinné) aroma. Výhodou extruze je také řádná homogenizace všech surovin, díky které jsou tvořeny struktury s rovnoměrně dispergovanými nutrienty. U této techniky lze také jednoduše měnit tvar a velikost extrudovaných produktů [232].



Obr. 11 Schéma procesu extruze masových analogů [232]

Charakter masových analogů je ovlivněn zastoupením proteinů a jejich kvalitou, obsahem tuků, vlákniny a polysacharidů a velikostí částic. Obecně jsou suroviny s vyšším zastoupením proteinů schopny snadněji měnit strukturu a vedou ke vzniku silnější a tužší textury. Kvalita proteinů se může vyhodnocovat například pomocí gelového testu – protein je hydratován definovaným množstvím vody a zahříván ve vodě za účelem jeho denaturace. Po ochlazení se stanovuje síla vytvořeného gelu pomocí textuometru. Sojové nebo hrachové bílkoviny jsou díky svým funkčním vlastnostem považovány za nejideálnější pro produkci masových analogů extruzí [182]. Vyšší množství olejů ve směsi může vyžadovat změnu vytlačovacího šneku, zastoupení vlákniny vyšší než 3–4 % vede k tvorbě hrubé textury. Přítomnost šrobu je riziková zejména kvůli možnosti jeho expanze v průběhu extruze, čímž může dojít k narušení vláknité struktury proteinů [232].

Za masové analogy jsou považovány také **mykoproteiny** vláknitých hub, které jsou produkovány kontinuální fermentací v bioreaktorech. Podmínky fermentace, jako je teplota, pH jsou pro produkci této houby zásadní. Po fermentaci je biomasa zahřívána a centrifugována tak, aby byla získána pasta s 20% sušinou. Zároveň je při zahřívání tepelně degradována RNA houby. Jelikož je centrifugací narušena vláknitá struktura, je nutné ji obnovit například tvarováním, vařením v páře nebo ochlazováním. Tento proces výroby masového analogu je považován za tradiční, ovšem v porovnání s jinými technikami je náročnější jak na energii, tak suroviny [230].

Obecně se využívají dva typy fermentací těchto vláknitých hub – kultivace v tekutém médiu a kultivace na pevném médiu. Výtěžnost postupu se odvíjí od typu použitého mikroorganismu a substrátu pro jeho kultivaci. Vyššího zastoupení proteinů bylo však obecně dosahováno při kultivacích v tekutém médiu. Například fermentace mořských řas a jejich residuí pomocí *Paradendryphiella salina* vedla k produkci mykoproteinu s 48% obsahem proteinu [233]. Naopak kultivací *Pleurotus albidus* na pevném substrátu – mlátě byl získán mykoprotein s 23 % proteinů [234].

Vzhledem k vysokému zastoupení proteinů, vlákniny a nižšímu obsahu nasycených mastných kyselin jsou mykoproteiny považovány za zdravé. Obsahují všechny esenciální aminokyseliny i několik typů vitamínu B (pyridoxin, kobalamin) [235]. Konzumentům mohou poskytovat řadu zdravotních benefitů, jako je například kontrola hladiny cholesterolu nebo cukru v krvi nebo pocitu sytosti [224, 225].

Potraviny se zvýšeným obsahem bílkovin

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. 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, sojové nebo hrachové proteiny [182].

V **pečivu** je zdrojem rostlinných proteinů zejména mouka – pšeničná obsahuje okolo 10 % proteinů. Její nevýhodou je však relativně nízké zastoupení esenciální aminokyseliny lysinu [238]. Přídavkem rostlinných proteinů jiného původu lze vylepšit aminokyselinový profil, a tím i nutriční hodnotu pečiva, konzumentovi umožňuje zvýšit příjem bílkovin [239]. Do pečiva se nejčastěji přidává sojový nebo pšeničný protein, pozornost se ovšem upíná také k hrachovému, cizrnovému nebo fazolovému proteinu zejména kvůli jejich aminokyselinovému profilu [239]. 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 [240]. 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 [241].

Těstoviny jsou dalším typem potraviny, která je běžně obohacována o proteiny, čímž je dosaženo zlepšení aminokyselinového profilu, a tím zvýšení jejich nutriční hodnoty [242]. 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) [243]. 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 [244]. 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 [245], alternativní zdrojů bílkovin, jako jsou luštěniny, mohou způsobit nepříjemnou chuť či aroma [246].

Obohacování různých typů **nápojů** o proteiny s sebou přináší nezbytné úpravy technologie výroby, které zajistí senzorickou i nutriční kvalitu výrobku [247]. Zdroj proteinů je pro tuto kvalitu zásadní jak ze senzorického, tak technologického hlediska [248]. Historicky jsou nejvíce vyvíjeny ovesné nápoje [249], ovšem v poslední době roste využívání luštěnin, ořechů a semínek jako ingredience v různých typech nápojů [248]. Pro inkorporaci rostlinných proteinů do nápojů je nutné nejprve vyhodnotit jejich funkční vlastnosti, zejména hydrofobicitu, rozpustnost, vaznost vody, gelovatění, pěnotvornost a emulzifikační vlastnosti [250], na základě kterých lze poté odhadnout možné aplikace. Přídavek rostlinných proteinů však může způsobit také řadu negativních senzorických vjemů, například hořkost nebo svíravost. U nápojů obohacených fazolových proteinovým izolátem přetrvávala nepřírozená fazolová chuť [251].

2.4 Analytické metody používané pro charakterizaci proteinů

Charakterizace proteinů pomocí různých analytických metod slouží k určení jejich nutričních vlastností, ale i možností jejich uplatnění. Analýza proteinů je nejen v potravinářství jednou z nejvyužívanějších, nejčastěji se stanovuje celkové množství proteinů ve vzorku/potravině. Díky charakterizaci proteinů lze určit jak jejich nutriční, tak funkční a

senzorické vlastnosti. Analýza aminokyselinového profilu je jednou z nejvýznamnějších nutričních charakterizací proteinů. Vývoj žádné potraviny se neobejde bez senzorické analýzy jejích deskriptorů.

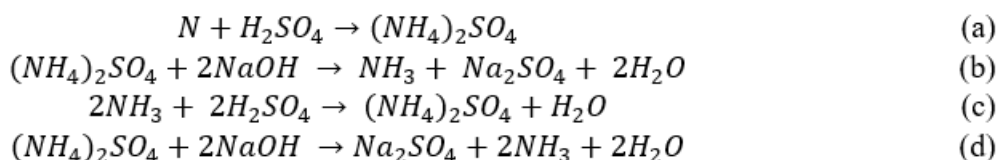
2.4.1 Metody stanovení celkového množství proteinů

Stanovení celkového množství proteinů ve vzorku je v potravinářství jednou ze základních a zároveň nejvýznamnějších typů analýz. Proteiny v potravinách mají totiž význam jak nutriční, tak ekonomický. Existuje řada různých metod pro stanovení proteinů, které se od sebe liší citlivostí, robustností nebo použitelností. Porovnávání množství proteinů v potravinách, která byla stanovena různými metodami, může pak být problematické a nepřesné. Nejvíce používanými metodami jsou Kjeldahlova metoda, Dumasova metoda, nebo spektroskopické a refraktometrické metody.

Kjeldahlova metoda

Kjeldahlova metoda slouží ke stanovení množství dusíku po rozkladu a mineralizaci vzorku silnou kyselinou. Pomocí konverzního faktoru lze z množství dusíku ve vzorku vypočítat obsah hrubé bílkoviny, který však zahrnuje také dusíkaté látky nebílkovinné povahy (např. močovinu). Obsah pouze bílkovinných molekul je pak označován jako obsah čistých bílkovin [252].

K mineralizaci se nejčastěji používá koncentrovaná kyselina sírová, po jejím varu se vzorkem obsahující proteiny vzniká síran amonný. K urychlení a zvýšení účinnosti mineralizace se často používá katalyzátor, který obsahuje například měď, selen nebo rtuť [252]. Následně je síran amonný přidávkem hydroxidu sodného převeden na amoniak, který je ze směsi oddělen destilací a jímán do předlohy například s kyselinou sírovou nebo boritou, které jsou musí být v nadbytku. Obsah amoniaku se nakonec stanoví zpětnou titrací dané kyseliny pomocí hydroxidu. Celý proces je popsán reakčními rovnicemi na obr. 12.



Obr. 12 Reakční rovnice Kjeldahlovy metody stanovení proteinů, (a) – mineralizace, (b) – neutralizace, (c) – destilace, (d) – zpětná titrace

Zastoupení hrubých bílkovin se nakonec vypočítá vynásobením obsahu dusíku konverzním faktorem, jehož univerzální hodnota je 6,25, což je množství ekvivalentní 0,16 g dusíku na 1 g proteinu. Tento přepočet je však často kritizován, protože není vhodný pro všechny typy proteinů. Konverzní faktor by měl být pro proteiny dané potraviny stanoven individuálně podle jejich aminokyselinového profilu [253]. Aktualizaci hodnot konverzních faktorů se věnovala řada výzkumů, například Jones et al. stanovil konverzní faktory s předpokladem, že ne všechny dusíkové sloučeniny v potravinách jsou proteiny [254]. Další byly založeny na stanovení aminokyselinového složení, sekvence aminokyselin, purifikaci izolovaných proteinů [148, 243, 244]. Nicméně se uvádí, že metody stanovení proteinů založené na konverzních faktorech nadhodnocují obsah proteinů ve vzorcích [257]. Příklady upravených konverzních faktorů pro konkrétní typy potravin jsou uvedeny v tabulce 15.

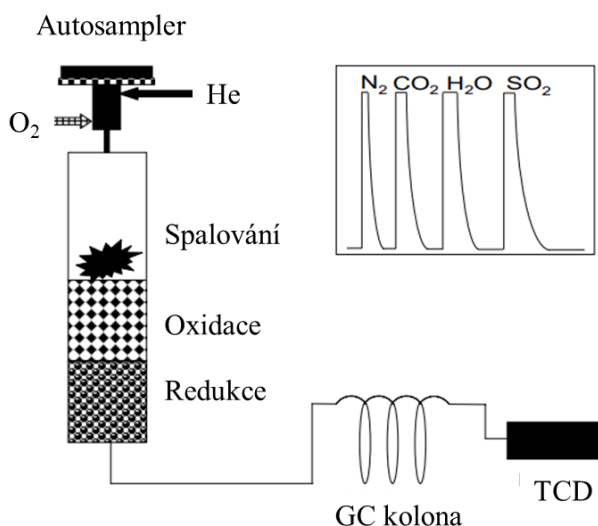
Tabulka 15 Příklady konverzních faktorů pro přepočet množství dusíku na proteiny [254]

Rostlinné zdroje	Konverzní faktor	Živočišné zdroje	Konverzní faktor
Pšeničný endosperm	5,70		
Pšeničné otruby	6,31	Mléko	6,38
Oves	5,83	Večce	6,25
Rýže	5,95	Maso	6,25
Kukuřice	6,25	Želatina	5,55
Mandle	5,18		

Dumasova metoda

Principem Dumasovy metody stanovení proteinů je konverze přítomného dusíku na plynné oxidy dusíku v průběhu spalování vzorků v peci, většinou při teplotě 950–1100 °C. Oxidy dusíku jsou pak redukovány na N₂, jehož koncentrace je stanovena pomocí tepelně vodivostního detektoru. Jedná se o rychlou metodu, která nevyžaduje používání chemikálií, nákladná jsou však potřebná zařízení. Jelikož je pro stanovení množství proteinů nutný přepočet pomocí konverzního faktoru, může být Dumasova metoda také často považována za nepřesnou [253].

CHNS/O elementární analyzátoři pracují na principu Dumasovy metody – lze jimi kromě dusíku stanovit také zastoupení uhlíku, vodíku, síry nebo kyslíku, jejichž oxidy jsou v průběhu spalování generovány reakcí s reakčním plynem – O₂. Tyto oxidy jsou pak dále nesený inertním plynem (většinou helium) skrz komoru s mědí, kde je odstranován nezreagovaný kyslík, a absorpční pasti, ze kterých se uvolňují pouze CO₂, H₂O, N₂ a SO₂. Detekce může být v elementárních analyzátořích může zahrnovat například separaci pomocí GC s tepelně vodivostní detekcí (TCD). Schéma elementárního analyzátoři je zobrazeno na obr. 13. Výhodou těchto analyzátoři je schopnost analýzy různorodých typů vzorků [258].



Obr. 13 Schéma elementárního analyzátoři [258]

Spektrofotometrické stanovení bílkovin

Množství bílkovin ve vzorku lze kvantifikovat také pomocí různých spektrofotometrických metod. Pro stanovení bílkovin lze využít například schopnost tyrosinu a tryptofanu absorbovat UV záření (280 nm). Další metody (např. Biuretova metoda nebo Lowryho metoda) pak pro kvantifikaci bílkovin vyžadují reakci s chromogenním substrátem. Liší se od sebe absorpčním maximem, ale také senzitivitou stanovení bílkovin [275].

Biuretova metoda využívá reakce bílkovin s ionty mědi za vzniku fialového zbarvení roztoku. Intenzita zbarvení se stanovuje při vlnové délce 540 nm a přímo odpovídá koncentraci bílkovin v roztoku. Při Lowryho metodě stanovení dochází ke zmodrání roztoku proteinů po reakci bílkovinných řetězců s ionty mědi v alkalickém prostředí a následné redukci Folin-Ciocalteuova činidla. Barevná změna se měří spektrofotometricky v rozmezí vlnových délek od 650 do 750 nm [275].

2.4.2 Charakterizace proteinových frakcí

Proteiny jsou biopolymery tvořené řetězcem aminokyselin sbalené do specifických konformací. Posttranslačními modifikacemi na ně mohou být připojeny další chemické skupiny, které ovlivňují molekulovou hmotnost proteinů, a tím následně i jejich biologickou aktivitu. Proto je stanovení molekulové hmotnosti jednou ze základních charakterizací proteinů. Jednou ze základních technik, která umožňuje jak kvalitativní, tak kvantitativní stanovení proteinů o dané molekulové hmotnosti, je elektroforéza v polyakrylamidovém gelu, někdy označována jako SDS-PAGE.

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Metoda charakterizace proteinů pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) byla vynalezena Ulrichem Laemmiliem, který ji použil pro analýzu proteinů bakteriofágů [259]. Principem SDS-PAGE je rozdělení proteinů v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného na základě jejich elektroforetické pohyblivosti, velikosti (délce řetězce) nebo stupně rozbalení. Velké, méně nabitě částice migrují gelem pomaleji než malé [248, 249].

Polyakrylamidový gel, který vzniká polymerizací akrylamidu v přítomnosti katalyzátoru (persíran amonný, TEMED) a síťovacího činidla (bisakrylamid), se používá ve většině elektroforetických analýz proteinů. Koncentrace akrylamidu pro SDS-PAGE se většinou pohybuje mezi 4–20 %, gely mimo toto rozmezí jsou příliš křehké pro manipulaci potřebnou k vizualizaci rozdělených proteinů. Méně koncentrované gely jsou použity pro rozdělení větších proteinů [261].

Dodecylsírany sodný je detergent, který při vysoké teplotě způsobuje rozbalení sekundární struktury proteinů [262]. Vzniklý protein-SDS komplex má po rozbalení negativní náboj a elektrickým polem pak migruje v gelu směrem ke kladné elektrodě. Vizualizace proteinů se provádí po ukončení elektroforézy jejich barvením, například pomocí Coomassie blue. Kvantitativní odhad molekulové hmotnosti je proveden porovnáním s markery proteinových standardů o známých molekulových hmotnostech [263]. Aparatura pro SDS-PAGE a příklad gelu s rozdělenými proteiny jsou uvedeny na obr. 14.



Obr. 14 Aparatura pro SDS-PAGE elektroforézu [264]

SDS-PAGE bylo využito pro charakterizaci proteinů v řadě různých biologických materiálů. Nejvhodnějším postupem je prvotní izolace proteinů z materiálu, čímž se omezí vliv matrice na analýzu a vznik interferencí. Zejména je nezbytné izolovat proteiny z rostlinných vzorků, jelikož často obsahují řadu nerozpustných složek. Takto byly pomocí SDS-PAGE charakterizovány například proteinové izoláty olejnatých semen (sezamu, lnu a kanoly) nebo různých druhů mikrořas [252, 253]. Pro přesnější kvantifikaci se po rozdělení proteinů pomocí SDS-PAGE používá jejich analýza pomocí hmotnostní spektrometrie. Takto byl například charakterizován profil proteinů cizrnových semen [267].

2.4.3 Analýza aminokyselinového profilu

Analýzou aminokyselinového profilu se získá zastoupení všech aminokyselin ve vzorku, jak volných, tak vázaných v proteinech. Má velký význam pro stanovení nutričních vlastností potravin, může však sloužit také jako nástroj pro odhalení falšování potravin nebo použití rekombinantních technik [268]. Analýza aminokyselin vyžaduje volbu dostatečně citlivých separačních a detekčních technik, kterými je možné stanovit i relativně malé molekuly aminokyselin efektivně stanoveny. Před samotnou separací je navíc nutné aminokyseliny uvolnit z proteinového řetězce rozbitím peptidové vazby. Pro zvýšení citlivosti separace nebo detekce aminokyselin je možné do analýzy zahrnout také různé derivatizační techniky [269].

Rozklad proteinu

Rozklad proteinů na jednotlivé aminokyseliny by měl vždy předcházet stanovení aminokyselinového profilu dané potravin. Existuje řada postupů, které se od sebe liší časovou náročností, použitými chemikáliemi nebo přístrojovým vybavením. Kromě účinné hydrolýzy proteinů je v průběhu rozkladu také nutné minimalizovat oxidaci a degradaci uvolňovaných aminokyselin, které vedou k nepřesnostem ve stanovení. Proto je za účelem stanovení labilnějších aminokyselin často nezbytné použití alternativních postupů rozkladu peptidových vazeb proteinů.

Nejběžněji používanou metodou rozkladu proteinů na aminokyseliny je **kyselé hydrolýza** pomocí 6M kyseliny chlorovodíkové při teplotě 110 °C po dobu 24 h. Při této metodě podléhají částečné oxidaci zejména sírné aminokyseliny, které lze však zabránit jejich reakcí s kyselinou permravnčí. Degradován je také tryptofan, který je velmi náchylný k oxidaci. Ke ztrátě aminokyselin může dojít také v důsledku přítomnosti těžkých kovů nebo oxidačních činidel. Za účelem stanovení tryptofanu se používá zejména kyselé hydrolýza proteinu kyselinou

sulfonovou, případně methansulfonovou (MSA) za přítomnosti 3-(2-aminoethyl)indolu, jelikož se jedná o silné neoxidující kyseliny [270].

Stejně tak **alkalickou hydrolyzu** lze využít pro stanovení tryptofanu, který je během kyselé hydrolyzy kyselinou chlorovodíkovou často degradován. Tento postup se upřednostňuje zejména u vzorků s vysokým obsahem polysacharidů, jelikož jejich struktury nejsou hydrolyzovány jako za podmínek kyselé hydrolyzy. Kromě tryptofanu lze po alkalické hydrolyze proteinů stanovit také fosfoaminokyseliny, například fosfohistidin nebo fosforylovaný tyrosin. Jako hydrolyzační činidlo se používá zejména hydroxid sodný, draselný nebo barnatý [271].

Výhodou **enzymatické hydrolyzy** proteinů je možnost stanovení glutaminu a asparaginu, které jsou při kyselé hydrolyze běžně konvertovány na kyselinu glutamovou a asparagovou. Nejčastěji se používají proteolytické enzymy pankreasu, které jsou schopny rozložit většinu peptidových vazeb v proteinech. Negativum této metody rozkladu proteinů může být potenciální kontaminace vzorku proteiny, které jsou vázány na proteolytické enzymy [257, 258].

Pro rozklad proteinů lze využít také kyselé hydrolyzy v kombinaci s působením **mikrovlnného záření**, čímž je dosaženo významného zkrácení doby rozkladu. Používá se mikrovlnné záření o frekvenci 2,45 GHz, které má v kombinaci s působením kyseliny chlorovodíkové a zvýšené teploty dostatečnou energii pro narušení peptidových vazeb a uvolnění aminokyselin z řetězce. Teplota se v této metodě optimalizuje dle typu a množství rozkládaného proteinu tak, aby docházelo k co nejnižším ztrátám aminokyselin v co nejlepším čase. Například pšeničný protein bylo nejvýhodnější rozkládat při teplotě 150 °C po dobu 3 hodin [274]. Stejně jako u kyselé hydrolyzy dochází i při této metodě ke ztrátě tryptofanu, případně jiných labilních aminokyselin. Shrnutí možných metod rozkladu proteinů je uvedeno v tabulce 16.

Tabulka 16 Příklady způsobu rozkladu proteinů

Hydrolyzační činidlo	Podmínky	Úpravy, aditiva	Stanovitelné aminokyseliny
6M HCl	110 °C, 24 h		Všechny aminokyseliny (kromě Cys, Trp)
6M HCl	145 °C, 4 h	Oxidace vzorku kys. permravenčí	Cys, Met, Lys
6M MSA	110 °C, 24 h	Přídavek 3-(2-aminoethyl)indolu	Trp, methionin sulfoxid
4,2M NaOH/ 4,2M KOH/ 2M Ba(OH) ₂	110 °C, 22 h		Trp, fosfoaminokyseliny
Proteázy	18–24 h		Všechny aminokyseliny
6M HCl + Mikrovlnné záření	150 °C, 3 h		Všechny aminokyselin (kromě Cys, Trp)

Separace aminokyselin

Volné aminokyseliny ve vzorku je možné od sebe různými technikami separovat. Většinou se využívají elektroforetické nebo chromatografické techniky, přičemž jejich výběr úzce

souvísí s následnou detekcí aminokyselin. Pro zlepšení separace aminokyselin je možné do analýzy zařadit předkolumnovou derivatizaci.

Elektroforéza je separační metoda, která je založená na pohybu nabitých koloidních částic nebo iontů v prostředí elektrického pole. V potravinářství se používá zejména k analýze proteinů nebo aminokyselin jejichž náboj závisí na pH rozpouštědla. V prostředí s vyšším pH, než je pI daného proteinu/aminokyseliny, se chová jako aniont, v prostředí s vyšším pH jako kationt. Rychlost pohybu iontů se odvíjí od velikosti rozdílu pH a pI.

Pro separaci aminokyselin se nejčastěji používá kapilární elektroforéza. Za podmínek konstantního elektrického pole dochází k rozdílným rychlostem pohybu složek analytu dle velikosti jejich náboje, a tím k jejich separaci [260, 261]. Přístroj pro kapilární elektroforézu je vybaven zdrojem vysokého napětí, dvěma elektrodami ponořenými do elektrolytu. Separace analytu probíhá v křemenné kapiláře umístěné v elektrolytu. Její délka je 25-75 cm a průměr 20-100 μm . Detektor je zařazen před jedním z konců kapiláry [260, 261]. Kapilární elektroforéza má oproti dalším separačním metodám řadu výhod. Pro separaci stačí nižší množství analytu (<1 μl), díky vysoké rozdělovací účinnosti je možné oddělit a detekovat velké množství elektroaktivních sloučenin během jediné separace. Zároveň je tato metoda nenáročná na množství potřebných chemikálií [276].

Další možností separace aminokyselin je použití **kapalinové chromatografie**, například iontově výměnné nebo chromatografie na reverzní fázi. Tyto metody jsou často spojeny s předkolumnovou nebo postkolumnovou derivatizací aminokyselin. Separace volných aminokyselin pomocí **iontově výměnné chromatografie** se nejčastěji provádí na pryskyřicovém katexu tvořeném kopolymerem divinyl-benzen styrenu s imobilizovanými sulfonovými ionty. Jako mobilní fáze se využívají sodné nebo lithné pufrů o přesně definovaném pH. Pro uspokojivé rozdělení aminokyselin je dostatečné 4-5 sodných pufrů o vzrůstající hodnotě pH. Lithné pufrů je více citlivý ke změnám náboje, a proto se používají pro v případě potřeby lepší separace kyseliny aspartové, asparaginu, kyseliny glutamové a glutaminu [262, 263]. Do pufru se dále přidávají různá aditiva ke zlepšení separovatelnosti aminokyselin nebo k ochraně systému. Například thioglykol předchází oxidaci methioninu, organická rozpouštědla, jako je ethanol nebo propanol, mohou zlepšit separovatelnost threoninu a serinu a přídavek konzervačních prostředků zpomaluje růst mikroorganismů [277]. Při separaci aminokyselin tedy probíhá gradientová eluce, při které postupně vzrůstá pH mobilní fáze, dle kterého aminokyseliny z kolony eluují. Při vstupu analytu do kolony je hodnota pH mobilní fáze okolo 2, všechny aminokyseliny mají tedy záporný náboj a na katexu jsou pevně vázány. Se zvyšujícím se pH, a tedy ionizační silou pufru se postupně dosahuje izoelektrických bodů jednotlivých aminokyselin, při kterých nemají žádný náboj. Následně získávají aminokyseliny náboj kladný, kolonou migrují, a nakonec eluují z kolony [277].

Dále je možné separovat aminokyseliny pomocí **vysokotlaké kapalinové chromatografie s reverzní fázi**. Na rozdíl od IEC je v souvislosti s touto metodou častěji používaná předkolumnová derivatizace. Tento typ rozdělovací chromatografie je založen na rozdělení složek analytu mezi dvě kapalně fáze, které jsou mezi sebou dokonale nemísitelné. Stacionární fáze je tedy k povrchu, nejčastěji silikagelu, vázána chemicky. Při reverzním uspořádání fází rozdělovací chromatografie je stacionární fáze nepolární, mobilní fáze polární [276]. Samotný silikagel je látkou polární, avšak v reverzním uspořádání HPLC stacionární fázi obvykle tvoří silikagel s chemicky vázanými řetězci sloučenin, díky nimž získá nepolární charakter. Vzniká tak například oktadecylovaný silikagel nebo silikagel hydrofobizovaný vazbou fenylové skupiny [261, 264].

Výhodou RP-HPLC je nižší čas analýzy (do 60 min) a vyšší detekční limity, v řádu pmol nebo fmol [280]. Je také pro laboratoře lépe dostupná, jelikož nevyžaduje tak nákladné vybavení, avšak iontově výměnná chromatografie s postkolonovou derivatizací je považována za preciznější, jelikož dochází k nižším prodlevám mezi derivatizací a separací vzorku. Prodlevy mohou snižovat stabilitu analytů, které mohou následně degradovat [281]. S automatizací procesů ovšem dochází k minimalizování těchto rizik. Automatizace derivatizace vzorku před nastříknutí vzorku zajišťuje, že doba mezi reakcí a separací je při všech analýzách konstantní [281].

Aminokyseliny lze tedy snadno rozdělit podle polaritativy jejich postranního řetězce, a tak je snadno separovat pomocí HPLC-RP. V neutrálním prostředí se jako nepolární, tedy hydrofobní, chová valin, leucin, isoleucin, phenylalanin, tyrosin, methion a prolin. Naopak jako polární se jeví serin, threonin, cystein, asparagin, glutamin, kyseliny asparagová a glutamová, lysin, arginin a histidin. Amfifilní povahu (hydrofilní i hydrofobní vlastnosti) mají glycin, alanin a tryptofan. V této metodě se tedy také volí gradientová eluce, při které se však mění polarita mobilní fáze. Jako polární se většinou používá acetonitril, isopropanol nebo methanol v různém poměru s vodou. Na začátku separace jsou aminokyseliny na nepolární stacionární fázi zachycovány díky svým hydrofobním skupinám, ovšem se zvyšující se koncentrací organického rozpouštědla nakonec všechny postupně eluují z kolony [282].

Jednou z dalších možných technik pro separaci aminokyselin je **plynová chromatografie**. Principem metody je rozdělení složek analytu inertní, plynnou mobilní fází a pevnou stacionární fází. Podmínkou jejího použití je těkavost vzorku, který ovšem nesmí podléhat tepelné degradaci. Celá separace probíhá v tepelném termostatu, díky kterému lze v průběhu měnit teplotu [276]. Vzorek pro analýzu musí mít buď plynné nebo kapalné skupenství. Kapalné vzorky se neprodleně před separací zplyňují ve vyhřívací komoře, která předchází koloně. Pokud je však vzorek málo těkavý, jako v případě aminokyselin, je nutné před analýzou provést jeho [276].

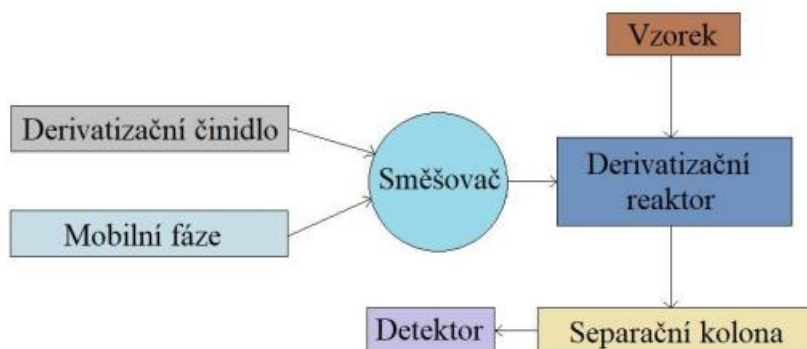
Na rozdíl od kapalinové chromatografie se u plynové používá izokratická eluce, separace složek analytu může být ovlivňována volbou teplotního programu termostatu, ve kterém je umístěna kolona. Pro konkrétní stanovovanou aminokyselinu je také vhodné použití specifické kolony, případně více sériově zapojených kolon [283]. Oproti vysokotlaké kapalinové chromatografii je samotná separace plynovou chromatografií metodou rychlejší a levnější, ovšem ne tak účinnou. Je nezbytné ovšem počítat s nutností derivatizace většiny analytů, kvůli čemuž se doba analýzy prodlužuje [278].

Způsoby derivatizace aminokyselin

Pojmem derivatizace se rozumí reakce derivatizačního činidla se složkami analytu, která vede ke zlepšení jejich vlastností pro analýzu danou metodou. Způsoby derivatizace se mezi jednotlivými analytickými metodami liší, ovšem cíl mají stejný – zlepšení detekovatelnosti a separovatelnosti jednotlivých složek analytu. Základní rozdělení je na předkolonovou a postkolonovou derivatizaci podle toho, zda probíhá před nebo po separaci [284]. Vyvinuly se ovšem už i metody, díky kterým je možné analyzovat také nezderivatizované vzorky. Příkladem takové metody je kapalinová chromatografie či kapilární elektroforéza ve spojení s hmotnostním spektrometrem, který k ionizaci vzorku využívá elektrosprej [285].

Předkolonová derivatizace se provádí před separací složek analytu (viz obr. 15). Používá se při plynové chromatografii nebo vysokotlaké kapalinové chromatografii s reverzní fází. Předkolonová derivatizace má oproti postkolonové řadu výhod. Spotřeba derivatizačního

činnidla může být minimalizována díky konkrétnímu a malému reakčnímu systému. Citlivost metody může být zvýšena použitím dražších činnidel, která méně ruší baselinu [286].



Obr. 15 Schéma předkolonové derivatizace

Pro separaci pomocí plynové chromatografie se analyt derivatizuje za účelem zvýšení těkavosti, separovatelnosti a detekovatelnosti. Způsoby derivatizace lze rozdělit dle probíhající chemické reakce a vzniklých derivátů na silylaci, alkylaci, arylaci, acylaci, cyklizaci a další méně používané. Vzniklé deriváty se mezi sebou liší typem a délkou přidané části, která je následně zodpovědná za charakteristické vlastnosti složek analytu. Proto je výběr způsobu derivatizace pro analýzu aminokyselin velice zásadní [284].

Předkolonová derivatizace pro HPLC-RP nebo CE se provádí za účelem zvýšení separovatelnosti a detekovatelnosti složek analytů pomocí různých spektrálních metod. Pro zvýšení detekovatelnosti UV-detekcí se používá například 5-dithio-bisnitrobenzoová kyselina (DTBN) nebo 9-isothiocyanatoacridin. Získané deriváty aminokyselin pak absorbují UV záření o dané vlnové délce. Pro stanovení všech aminokyselin fluorescenčním detektorem je výhodné je derivatizovat například pomocí o-ftalaldehydu (OPA) nebo 9-fluorenylmethylchloroformátu (FMOC). Ionizovatelnost, a tím i separovatelnost a detekovatelnost aminokyselin v hmotnostním spektrometru lze zvýšit například derivatizací 2,3-dikarboxaldehydu (NDA) [270, 271, 272].

Postkolonová derivatizace se provádí po separaci složek analytu na koloně (viz obr. 16), používá se zejména při iontové výměnné chromatografii. Oproti předkolonové derivatizaci má řadu výhod. Je považována za jednodušší, lze ji snadněji zautomatizovat a propojit se separační technikou. Druh derivatizačního činidla není tak zásadní, jelikož nemá vliv na separovatelnost složek analytu. Mohou být použito více detekčních technik zároveň, současně není detektor ovlivňován interferencemi způsobenými maticí vzorku [290]. Existuje ovšem i řada nevýhod postkolonové derivatizace, například mobilní fáze nemusí být vždy kompatibilní s postkolonovým derivatizačním činidlem. Kvůli kontinuálnímu průtoku jsou zde vyšší nároky na množství derivatizačního činidla, ale naopak jeho přebytek může způsobit zvýšení šumu analýzy, a tím snížit signál derivátů aminokyselin [290].



Obr. 16 Schéma postkolonové derivatizace

Pro postkolonovou derivatizaci se používají taková činidla, jejichž deriváty aminokyselin lze následně jednoduše stanovit spektrofotometricky či fluorometricky. Například ninhydrin slouží také ke kvalitativnímu důkazu aminokyselin ve vzorku, po reakci s primárními aminokyselinami tvoří modrý komplex, se sekundárními žlutý. OPA lze použít i pro předkolonovou derivatizaci, s aminokyselinami tvoří vysoce fluorescenční deriváty isoindolu. Fluorescamin po reakci s aminokyselinami produkuje modrozelený fluorescenční derivát [270, 271].

Detekce aminokyselin

Způsob detekce aminokyselin, případně jejich derivátů, úzce souvisí se způsobem jejich předchozí derivatizace. Existuje řada různých detekčních metod, založených na spektrofotometrii či elektroanalytických reakcích, v poslední době byly vyvinuty a zdokonaleny techniky hmotnostní spektrometrie, přičemž některé z nich nevyžadují ani derivatizaci analytu. Pro detekci aminokyselin je nejjednodušší využít absorpčních vlastností jejich karboxylových skupin při vlnové délce v rozmezí 200–210 nm, u aminokyselin s benzenovým jádrem v 250–280 nm. Detekovatelnost aminokyselin lze případně zvýšit derivatizací (viz dříve) [292].

Spektrofotometrický detektor je nejjednodušším typem detekce po chromatografické separaci složek analytu. Po chromatografické separaci se nejčastěji používají detektory s diodovým polem. Ty umožňují snímat celé absorpční spektrum v reálném čase. Záření neabsorbované složkami analytu dopadá na sérii fotodiod, čímž vzniká elektrický proud. Ke každé fotodiodě je připojen kondenzátor, který se vlivem vzniklého elektrického pole vybíjí adekvátně k intenzitě dopadajícího záření. V dalším kroku je kondenzátor opět nabit, míra k tomu potřebného proudu se zaznamenává [279].

Principem **fluorescenčního detektoru** je měření fluorescence, což je emise energie sloučeninou po její excitaci světlem nebo elektromagnetickým zářením. Fluorescenční detektory mají oproti UV/VIS detektorů lepší citlivost (1000x) a nižší limity detekce. Jejich nevýhodou je použitelnost pouze pro látky, které mají fluorescenční vlastnosti, ostatní je nutné derivatizovat [293]. Přírodně fluoreskující aminokyseliny jsou díky svým aromatickým jádrům pouze tryptofan, tyrosin a fenylalanin. Základní části fluorimetru jsou stejné jako u UV/VIS detektoru. Jako zdroj záření se využívají lampy s ultrafialovým zářením (vodíkové, rtuťové, xenonové). I při použití fluorescenčního detektoru se často využívá jeho spojení s diodovým polem, což umožní snímat celé fluorescenční spektrum [279].

Použitím **detektoru cirkulárního dichroismu (CCD)** lze rozlišovat L a D enantiomery aminokyselin. Jedná se o speciální typ absorpčního spektrofotometru, který zaznamenává změny v optické otáčivosti. Kromě klasické konstrukce spektrofotometru je tento detektor vybaven fotoelastickým modulátorem, který je umístěn za monochromátorem a slouží k vytvoření silnějšího paprsku. Pokud se na modulátor vloží střídavé napětí, je možné zaznamenávat L a D enantiomery [294].

Jednou z nejnovějších a také nejpropracovanějších metod pro detekci aminokyselin je **hmotnostní spektrometrie** a její **tandemové techniky**. Hmotnostní spektrometrii lze propojit s jakoukoliv separační technikou (CE, GC, HPLC), která se běžně používá k analýze aminokyselin. Pro ionizaci biologických vzorků se nejčastěji využívá elektrosprej (ESI) nebo MALDI [276]. Jako velice efektivní tandemové techniky pro analýzu aminokyselin se osvědčily MALDI/TOF/TOF/MS, jejíž hlavní výhodou je, že nevyžaduje žádnou předúpravu vzorku, nebo LC/ESI-MS/MS a HILIC MS/MS, při kterých nebylo nutné vzorky aminokyselin derivatizovat [269, 276].

2.4.4 Charakterizace sensorických vlastností

Senzorické vlastnosti jsou jedny z nejvýznamnějších vlastností potravin, jelikož slouží k posuzování jejich kvality, čerstvosti nebo lákavosti. Zahrnují hodnocení barvy, textury, aroma, chuti a vzhledu [296]. Sensorická analýza je disciplína, která se zabývá sensorickými podněty vyjadřované různými typy potravin nebo nápojů a jejich vyhodnocováním pomocí lidských smyslů – zraku, čichu, hmatu, chuti i sluchu. Lidské smyslové orgány v této metodě fungují jako detektory, díky kterým je možné popsat vlastnosti testovaných vzorků.

Podmínky sensorické analýzy

Pro získání objektivních výsledků sensorické analýzy musí být dodržovány předem psané požadavky na členy sensorického panelu a jeho velikost v závislosti na počtu vzorků, přípravu a prezentaci vzorků nebo vybavení sensorické laboratoře. Hodnotitelé pro sensorickou analýzu by měli být zdraví, bez alergií, barvosleposti, ztrát chuti nebo čichu. Hodnotitelé mohou získat odbornost v sensorickém testování po absolvování školení [297]. Sensorický panel by měl mít tolik členů, aby byly hodnocením získány statisticky významné výsledky. Počet hodnotitelů je závislý na úrovni jejich odbornosti, ale i na metodě sensorické analýzy [257, 258]. Množství vzorků je pak závislé na analyzovaných atributech – vizuálně lze hodnotit více vzorků, chuťové a čichové receptory mohou být lehce nasyceny, a tím ztrácí citlivost vnímání [297].

Testované vzorky by měly být připraveny podle hygienických pravidel. Porce by měla být dostatečná pro provedení sensorické analýzy, avšak ne příliš velká, což často hodnotitele svádí k testování větších soust nebo doušků. Technika prezentace vzorků je závislá na typu vzorku, nepoužívanějšími jsou simultánní prezentace (všechny vzorky jsou představeny najednou) a sekvenční prezentace (vzorky jsou předloženy postupně) [298]. Vzorky by měly být předkládány randomizovaně s náhodným označením, aby nedošlo k nechtěnému ovlivňování sensorického panelu. Výskyt paralelních vzorků v jedné sadě je závislý na typu metody sensorické analýzy, má významný podíl na zvýšení spolehlivosti a statistické významnosti získaných výsledků [258, 259]. K sensorickému testování daných vzorků by vždy měly být k dispozici odpovídající neutralizátory chuti. Ústní dutina by měla být po každém vzorku vypláchnuta minerální neperlivou vodou, aby se odstranila zbytková chuť. Jako neutralizátory vzorků s vysokým množstvím olejů se používá plátek jablka nebo hrušky, pálivou chuť lze zneutralizovat mlékem nebo jogurtem a pro neutralizaci svíravých jídel se používá meloun [298].

Metody sensorické analýzy

Metody sensorické analýzy lze rozdělit do dvou základních skupin podle jejich podstaty a typu získaných výsledků – rozdílové metody jsou založeny na odhalení přítomnosti rozdílu mezi analyzovanými vzorky, deskriptivní metody slouží k popisu míry odlišnosti jednotlivých vzorků [298].

Rozdílové metody sensorické analýzy dohalují přítomnost rozdílu mezi vzorky jejich porovnáváním mezi sebou nebo porovnáním se standardem. Není vhodné tímto způsobem porovnávat vzorky, které jsou zřetelně odlišné. Například při trojúhelníkovém testu statistický panel stanovuje rozdíl mezi dvěma vzorky, přičemž je jeden z nich předložen paralelně. Duo-trio test také slouží k porovnání 2 vzorků. První ze 3 vzorků je uveden jako standard, zbylé dva mají kódované označení. Při testu „2 z 5“ je počet testovaných vzorků zvýšen na 5 – jeden z nich se vyskytuje v sadě vyskytuje 2x, druhý 3x [257, 258, 260].

Deskriptivní metody popisují vzorky podle jejich sensorických vjemů – vzhledu, aroma, textury a chuti. Intenzitě daného vjemu se přiřazuje skóre, nebo se zaznamenává do stupnice, čímž se dosáhne číselného popisu rozdílu mezi vzorky. Pro tyto metody je zásadní správné definování sensorických vjemů, aby bylo dosaženo jednotnosti v jejich hodnocení [301]. Před těmito metodami je vhodné podmínky hodnocení slovně uvést zkušeným vedoucím sensorické analýzy, který tak jasně stanoví pravidla a standardy. Zásadní vliv na hodnocení má také rozsah měřítka pro zaznamenávání intenzity vjemů – jako dostatečně široké jsou považovány stupnice s 10-15 bodovým skóre, slovní hodnocení by mělo obsahovat alespoň 5 bodovou stupnici [301]. Nejpoužívanějším deskriptivní metodou je profilová zkouška, během které jsou hodnoceny vybrané deskriptory postupně u každého z předložených vzorků [260, 262].

Metody sensorické analýzy, které se spoléhají na lidské smysly, jsou však často považovány za nedokonalé [303]. Proto byly navrženy alternativní techniky, kterými je možné sensorické vlastnosti potravin a nápojů objektivněji posuzovat a porovnávat. Například se v rámci sensorické analýzy využívají biometrická měření, jež monitorují výrazy obličeje, srdeční frekvenci, vodivost kůže, tělesnou teplotu nebo pohyby očí. Lidský faktor je pak zcela eliminován při analýzách pomocí elektronických nosů nebo elektronických jazyků, které umí napodobit lidské odezvy na sensorické podněty [304]. Jsou používány například pro hodnocení kvality ovoce [305], masa [306] nebo olivových olejů [307].

3 Cíle dizertační práce

V rámci dizertační práce byly valorizovány pšeničné otruby, které jsou považovány za sekundární produkt při zpracování pšeničných zrn. Pšeničné otruby byly využity jako alternativní zdroj proteinů. Izolovaná proteinová frakce byla použita pro dietární účely, konkrétně pro vývoj vysokoproteinových potravin.

V rámci dizertační práce byly řešeny konkrétně tyto dílčí úlohy:

- Charakterizace pšeničných otrub
 - Zastoupení majoritních i minoritních složek pšeničných otrub
- Navržení procesu izolace proteinové frakce pšeničných otrub a její optimalizace
 - Zvýšení výtěžnosti izolace
 - Zvýšení čistoty proteinů v izolátu
- Charakterizace proteinového izolátu z pšeničných otrub
 - Zastoupení majoritních i minoritních složek izolátu
 - Stanovení molekulové hmotnosti zastoupených proteinů
- Charakterizace a stanovení nutričních vlastností proteinového izolátu z pšeničných otrub
 - Aminokyselinový profil
 - Stravitelnost
 - PDCAAS
- Velkoobjemová izolace proteinu z pšeničných otrub
 - Ověření a optimalizace navržené technologie
- Aplikace proteinového izolátu z pšeničných otrub v potravinářství
 - Vysokoproteinové pečivo
 - Vysokoproteinové jogurty

4 Experimentální část

4.1 Laboratorní vybavení

Experimentální činnost byla provedena v laboratořích Ústavu technologie potravin a biotechnologií Fakulty Chemické VUT v Brně. Část práce byla uskutečněna na Univerzitě přírodních věd v Polské Poznani, v laboratořích prof. Magdaleny Montowské a prof. Wojciecha Bialase.

4.1.1 Pomůcky, chemikálie a přístroje

Běžné laboratorní sklo, automatické pipety (), plastové zkumavky, centrifugační zkumavky, kolona Kinetex 2.6u C18 100A; 100x 4.60um, filtry 0,45 µm.

K přípravě roztoků byla vždy použita destilovaná voda. Hydroxid sodný (Merck, Německo), kyselina sírová (Penta chemicals, Česká republika), kyselina citronová (Merck, Německo), hexan (Penta chemicals, Česká republika), celulózy (Sigma Aldrich, Cellulase from *Penicillium funiculosum*), amyloglukosidázy (AMG, Sigma Aldrich, Amyloglucosidase from *Aspergillus niger*), Weiningerův katalyzátor (VWR, USA), akrylamid (Merck, Německo), glycerol (Penta chemicals, Česká republika), Tris HCl (Merck, Německo), SDS (Biorad, USA), fosfát amonný (Merck, Německo), TEMED (Merck, Německo), bromfenolová modř (Merck, Německo), dithiotreitol (Biorad, USA) isopropanol (Penta chemicals, Česká republika), kyselina chlorovodíková (Penta chemicals, Česká republika), močovina (Penta chemicals, Česká republika), thiomčovina (Penta chemicals, Česká republika), adsorbent Resin 300 (Merck, Německo), Tris báze (Merck, Německo), proteinový standard Prec Plus Protein Unstained Stds (10-250 kDa, Biorad, USA), glycin (Merck, Německo), ninhydrin (Merck, Německo), Commasee blue R-250 (Merck, Německo), bezvodý methanol (Penta chemicals, Česká republika), kyselina octová (Penta chemicals, Česká republika), acetonitril (Penta chemicals, Česká republika), ethanol 96 % (Penta chemicals, Česká republika), pepsin (Merck, Německo), monohydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Merck, Německo), heptahydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (Merck, Německo), pankreatin (Merck, Německo), propidium jodid (Thermo Fisher Scientific), jogurtová kultura YF-L812 (Chr. Hansen, Dánsko).

Analytické váhy (Sartorius), předvážky (AND EK-600H), pH metr (WTW 3210), třepačka (GFL 3006), hřidelová míchačka (MM-1000 Biosan), centrifuga (Hermle Z 36 HK), stolní lyofilizátor (FreeZone 1L Labconco), elektrický mlýnek (Sencor SCG 1050BK), vyhřívaná třepačka (IKA KS 3000), automatická mineralizační jednotka (Kjeldatherm KT 8S), automatický destilační přístroj (Vapodest VAP200, Gerhardt, Německo), Karl-Fisherův titrátor (Metrohm 701 KF Titrino), optický emisní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem (Horiba Jobin Yvonne Ultima 2), kapalinový chromatograf (Waters HPLC Systém, 515 HPLC pump, UV-VIS detektor Waters 2487, Waters 717 autosampler), prvkový analyzátor (Euroconverter EA 3100), plynový chromatograf (Thermo Fisher TRACETM GC), aminokyselinový analyzátor (AAA-400 Ingos, Česká republika), aparatura pro SDS-PAGE analýzu (Mighty small II deluxe, Hoefer, USA), termoblok (Benchmark BSH5001-1B-E), vortex (Yellow line TTS 2), zobrazovací systém (Gel Doc XR+, BioRad, USA), pístové čerpadlo (kapacita m³/h, Johnson, Švédsko), dekantérová odstředivka (Aldec 10, USA), disková odstředivka (Clara 10, Alpha Laval, Švédsko), bioreaktor (IKA CSTR IF-1500), průmyslový lyofilizátor (Lyo-Tech, USA), sprejová sušárna (Gea Niro Atomizér, Itálie), jogurtovač (Klarstein, Německo), kulový mlýn, (HK 40, HK Laboratory equipment, Turnov, Česká republika), disperzní jednotka s laserovou difrakcí (Helos, Sympatec, Clausthal,

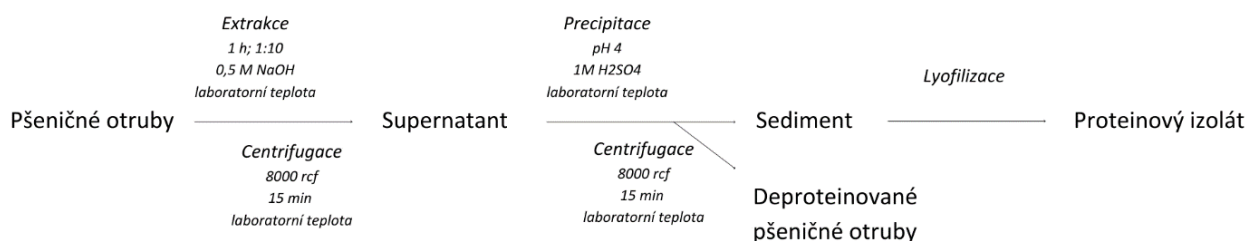
Německo), vyhřívaná magnetická míchačka (Heidolph MR Hei-standard), vibrační síťová třepačka (Retsch, Haan, Německo), extenzograf (E, Brabender, Německo), farinograf (E, Brabender, Německo).

4.1.2 Vzorky a použité suroviny

Pšeničné otruby (Mlýny J. Voženílek, Česká republika), čerstvé, plnotučné mléko (Moravia Lacto, Česká republika), syrovátkový protein neochucený (Vilgain Aktin, Česká republika), Předměřická mouka pšeničná světlá, hladká (Mlýny J. Voženílek, Česká republika)

4.2 Izolace proteinové frakce 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 lignocelulózy 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 obr. 17.



Obr. 17 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 17. 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 17. Modifikace v procesu izolace proteinů z pšeničných otrub

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

Pšeničné otruby byly předupraveny různými způsoby. Pomocí mlýnku (Sencor SCG 1050BK) vybaveného tříštivým nožem byla zmenšena velikost pšeničných otrub pod 0,2 mm. Odtučnění pšeničných otrub bylo provedeno extrakcí jejich nepolárních látek pomocí hexanu v poměru 1:3 po dobu 30 min při různých teplotách (30, 45 a 60 °C). Odtučněné pšeničné otruby byly filtrací odděleny od hexanu, vysušeny a použity pro izolaci proteinů dle původně navrženého postupu.

Pro enzymatickou hydrolýzu byly použity dva typy enzymů – celulázy (Sigma Aldrich, Cellulase from *Penicillium funiculosum*) a amyloglukosidázy (AMG, Sigma Aldrich, Amyloglucosidase from *Aspergillus niger*). Hydrolýza probíhala v poměru 1:10 za stálého třepání. Podmínky hydrolýzy jsou uvedeny v tabulce 18. Po enzymatické hydrolýze byl pomocí centrifugace (8000 rcf, 15 min, pokojová teplota) oddělen sediment, který byl okamžitě použit pro izolaci proteinů dle původně navrženého postupu.

Tabulka 18. Podmínky enzymatické hydrolýzy pšeničných otrub

	Celulázy	AMG
Koncentrace	2 g/100ml	2 ml/l
Doba [h]	2	24
Teplota [°C]	37	50

Průběh extrakce proteinů z pšeničných otrub byl modifikován změnou hned několika parametrů. Byl ověřen vliv zvýšení množství extrakčního činidla ku množství otrub (poměr 1:20 a 1:30) na výtěžnost a čistotu izolovaných proteinů, prodloužení doby extrakce (2 a 3 hodiny) a zvýšení teploty (40 a 50 °C). Proteiny byly také extrahovány koncentrovanějším hydroxidem sodným (0,35 M) namísto původně použitého 0,05 M. Dále pak byla provedena opakovaná extrakce pšeničných otrub (2x a 3x) extrakčním činidlem.

Úpravy průběhu precipitace proteinů byly zaměřeny na změnu pH a teplotu. Původně navržené srážení proteinů při pH 4 bylo modifikováno na hodnoty 3 a 5. Stejně tak byl testován vliv změny teploty na srážení proteinů, srážení proteinů při 4 °C bylo provedeno zchlazením vzorků v lednici, pro dosažení teploty -4 °C prošly vzorky přemražením v mrazáku. Označení vzorků proteinových materiálů a charakterizace jejich izolace je uvedena v tabulce 19.

Tabulka 19 Označení vzorků proteinových materiálů a charakterizace jejich izolace

Označení vzorku	Modifikovaná fáze izolace	Charakterizace
Původní postup	-	-
Ml	Předúprava	Pomletí pšenčných otrub na částice menší než 0,2 mm
Cel	Předúprava	Enzymatická hydrolýza pšeničných otrub pomocí celuláz
AMG	Předúprava	Enzymatická hydrolýza pšeničných otrub pomocí amyloglukosidázy
Odt	Předúprava	Odtučnění pšeničných otrub pomocí hexanu
1:20	Extrakce	Zvýšení poměru otrub ku extrakčnímu činidlu na 1:20
1:30	Extrakce	Zvýšení poměru otrub ku extrakčnímu činidlu na 1:30
40 °C	Extrakce	Extrakce proteinů při teplotě 40 °C
50 °C	Extrakce	Extrakce proteinů při teplotě 50 °C
0,35 M	Extrakce	Extrakce proteinů pomocí 0,35 M NaOH
2 h	Extrakce	Extrakce proteinů po dobu 2 h
3 h	Extrakce	Extrakce proteinů po dobu 3 h
2 x	Extrakce	Dvakrát opakovaná extrakce proteinů
3 x	Extrakce	Třikrát opakovaná extrakce proteinů
pH 3	Precipitace	Precipitace extrahovaných proteinů při pH 3
pH 5	Precipitace	Precipitace extrahovaných proteinů při pH 5
4 °C	Precipitace	Podpoření precipitace proteinů zchlazením precipitátu na 4 °C
-4 °C	Precipitace	Podpoření precipitace proteinů přemražením precipitátu na 4 °C

4.3 Charakterizace pšeničných otrub a proteinových izolátů z pšeničných otrub

Pro charakterizování pšeničných otrub a proteinových izolátů byly provedeny stanovení jejich nejzastoupenějších komponent. V pšeničných otrubách bylo stanoveno množství bílkovin (Kjeldahlova metoda) a jejich molekulová hmotnost (SDS-PAGE), obsah vody (metoda dle Karl-Fishera), tuků a jednotlivých mastných kyselin (plynová chromatografie), fenolických (kapalinová chromatografie) a minerálních látek (ICP-OES). 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) 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 neoptimálnějším postupem, byl kromě množství a molekulové velikosti bílkovin

stanoven také obsah tuků a mastných kyselin (plynová chromatografie), fenolických (kapalinová chromatografie) a minerálních látek (ICP-OES) a aminokyselinový profil (AAA analyzátor) vždy ve třech stanoveních.

4.3.1 Celkový obsah bílkovin a aminokyselinový profil

Obsah hrubé bílkoviny byl stanoven metodou dle Kjeldahla. 1 g vzorku pšeničných otrub byl navážen do mineralizačních trubic a s 10 ml koncentrované kyseliny sírové a 2 g Weiningerova katalyzátoru mineralizován v mineralizačním bloku (Kjeldatherm KT 8S, Gerhardt) při teplotě 410 °C po dobu 30 min. Vzniklý síran amonný byl poté alkalizací 80 ml 33% hydroxidu sodného převeden na amoniak, který byl dále destilován s vodní parou do předlohy 0,05 M kyseliny. Přebytek kyseliny se nakonec stanovil titračně pomocí 0,1 M hydroxidu sodného (Tashirův indikátor). Stanovené množství dusíku bylo násobeno faktorem 6,31 definovaným dle aminokyselinové složení pro pšeničné otruby pro získání množství hrubých bílkovin. Stanovení bylo provedeno ve třech opakováních.

Zastoupení proteinů v izolátech bylo stanoveno ve třech opakování pomocí prvkového analyzátoru Euroconverter EA 3100. Množství dusíku v proteinových izolátech z pšeničných otrub bylo také násobeno přepočítávacím faktorem 6,31. Zastoupení bílkovin v izolátech bylo vyjádřeno v g na 100 g izolátu [g/100 g].

Aminokyselinový profil byl stanoven dle Nařízení komise 152/2009 ze dne 27. ledna 2009, kterým se stanoví metody odběru vzorků a laboratorního zkoušení pro úřední kontrolu krmiv [308]. Analýza hydrolyzovaného proteinového izolátu z pšeničných otrub byla provedena na automatickém aminokyselinovém analyzátoru AAA-400 (Ingos, Česká republika) s postkolonovou derivatizací ninhydrinem a spektrofotometrickou detekcí.

4.3.2 SDS-PAGE

SDS-PAGE elektroforéza byla provedena na aparatuře Mighty Small II Deluxe (Hoefler, USA) s maximální velikostí gelu 10x10,5 cm. Byl analyzován proteinový extrakt pšeničné mouky, otrub a proteinových izolátů z pšeničných otrub.

Separční gel byl připraven vždy jeden den před analýzou dle složení uvedeném v tabulce 20. Jednotlivé složky byly přidávány postupně dle pořadí v tabulce, po přidání 10% SDS byla směs začala promíchávat pomocí magnetického míchadla. Nakonec byla směs pomocí pipety nalita do formy s připravenými skly a převrstvena cca 1 ml isopropanolu, který podpořil zacelení horní vrstvy gelu. Po 40 minutách polymerizace separčního gelu při pokojové teplotě byla skla s gelem vyjmuta z formy, očištěna od isopropanolu a přebytečného gelu a umístěna do lednice.

Tabulka 20. Složení separčního gelu pro SDS-PAGE analýzu

Separční gel	100 ml	Jednotky
Voda	10,0	ml
30% akrylamid	50,2	ml
75% glycerol	13,4	ml
3M Tris (pH 8,8)	25,1	ml
10% SDS	0,84	ml
10% fosfát amonný	0,42	ml
TEMED	67	μl

Koncentrační gel byl připraven a aplikován na separační gel v den analýzy dle složení uvedeném v tabulce 21, přičemž byly jednotlivé složky opět dávkovány postupně a směs se po přidavku 10% SDS začala promíchávat stejně, jako v případě přípravy separačního gelu. Koncentrační gel byl napipetován na separační gel umístěný ve vyvíjecí aparatuře. Sloupečkovač byl vložen do stále tekutého koncentračního gelu cca 3 mm nad okraj separačního gelu. Polymerizace koncentračního gelu trvala cca 40 min. Po uplynutí doby potřebné k polymeraci gelu byl sloupečkovač vyjmut, do aparatury byl nalit vyvíjecí pufr a na gely byly nanášeny připravené vzorky.

Tabulka 21. Složení koncentračního gelu pro SDS-PAGE analýzu

Koncentrační gel	10 ml	Jednotky
10% akrylamid	2,96	ml
0,125M Tris (pH 6,8)	2,56	ml
Voda	2,27	ml
50% glycerol	1,97	ml
10% SDS	98	μl
Barvicí roztok – bromfenol	39	μl
10% fosfát amonný	59	μl
TEMED	49	μl

Příprava vzorků

Proteiny byly ze vzorků extrahovány pufrem A, který byl připraven dle složení uvedeném v tabulce 22. Ve 150ml kádince byla při laboratorní teplotě a za stálého míchání ve 40 ml destilované vody rozpuštěna močovina a thiomočovina. Pro odstranění minerálních látek lze do roztoku přidat 10 g adsorbentu (např. Rexist 300, Fisher Scientifics, míchání cca 15 min, filtrace). Poté se do roztoku přidá tris base a SDS, směs je míchána do rozpuštění všech složek. Hodnota pH je upravena na 7,5 pomocí 1M kyseliny chlorovodíkové. Nakonec se do stále promíchávaného roztoku přidá DTT, po jehož rozpuštění se pH upraví na konečnou hodnotu 6,8 (1 M HCl), přidá se bromfenolová modř. Objem roztoku se v odměrné baňce doplní na konečných 100 ml a celý se zfiltruje (0,45 μm). Do dalšího použití je pufr A skladován v mikrozkuřkách eppendorf po 2 ml v mrazáku.

Tabulka 22. Složení pufru A pro extrakci proteinů (celkový objem 100 ml)

Složka	m [g]
Močovina	48
Thiomočovina	15,2
Adsorbent	10
Tris base	0,605
SDS	3
DTT	1,155
Bromfenolová modř	0,003

Všechny vzorky proteinů byly před nanesením na SDS gely extrahovány pufrem A v poměru 1:50 w/v. Suspenze byly umístěny na 10 min na vortex do úplného rozpuštění extrahovatelných proteinů. Balastní a neextrahovatelné látky byly od extraktu odděleny pomocí centrifugy

(10000 rpm, 5 min, 10 °C). Vzorky proteinů extrahované pufrém A byly nakonec umístěny do termobloku (98 °C, 4 min), opět promíchány na vortexu a rovnou dávkovány na gel.

Standard proteinů byl připraven smícháním 38 μ l standardu s 2 μ l β -mercaptoethanolu. Směs byla promíchána na vortexu a umístěna do termobloku nejprve na 5 min při teplotě 95 °C a poté spolu s ostatními vzorky na 4 min při teplotě 98 °C. Před aplikací na gel byl také vzorek standardu promíchán na vortexu.

Separace a zobrazení proteinů pomocí SDS-PAGE

Před aplikací vzorků bylo nejprve do připravené aparatury se separačním i koncentračním gelem nalito cca 200 ml 5x zředěného vyvíjecího pufru (destilovaná voda), který byl připraven dle tabulky 23. Následně bylo do jamek koncentračního pufru dávkováno 20 μ l připraveného vzorku, první sloupeček byl vyhrazen pro připravený standard proteinů.

Tabulka 23. Složení 5x koncentrovaného vyvíjecího pufru do elektroforézy

	m [g]	
Tris base	30,275	Doplnění destilovanou vodou do 1000 ml
Glycin	144,92	
SDS	5	

Aparatura pro elektroforézu byla připojena ke zdroji, kterým bylo následně na aparaturu vložen proud 40 mA, čímž došlo k zahájení separace proteinů. Po 40 minutách byla separace přerušena, aby mohla být doplněna hladina vyvíjecího pufru. Separace byla ukončena přibližně po 90 minutách (eluát 2-3 mm od konce gelu), kdy byl vypnut zdroj proudu. Z aparatury byl vylit vyvíjecí pufr, skla se separačním gelem byla vyjmuta z aparatury. Gely byly opatrně seškrábnuty se skel, aby nedošlo k jejich poškození. Zobrazení jednotlivých frakcí proteinů bylo provedeno umístěním a třepáním gelu v barvicím roztoku po dobu cca 40 min a následném vložení gelu do odbarvovacího roztoku za stálého třepání přes noc. Složení obou roztoků je uvedeno v tabulce 24.

Tabulka 24. Složení barvicího a odbarvujícího roztoku

	Barvicí roztok	Odbarvující roztok
Commassee R-250	0,5 g	-
Methanol	500 ml	100 ml
Kyselina octová (ledová)	100 ml	75 ml
Destilovaná voda	400 ml	825 ml

Separací gely se zobrazenými bandy proteinů byly po vyjmutí z odbarvovacího roztoku opláchnuty a uchovány v lednici v igelitovém sáčku s malým množstvím destilované vody, která zabraňovala jejich vysychání. Intenzita a velikost proteinových bandů byla vyhodnocena jejich skenováním pomocí BioRad Gel Doc XR Imaging systems a porovnáním s definovanými molekulovými hmotnostmi proteinů obsažených ve standardu. Pro každý vzorek byly získány chromatogramy, jejichž integrací byly získány molekulové hmotnosti a procentuální zastoupení dané proteinové frakce ve vzorku.

4.3.3 Stanovení vody

Stanovení vody a vlhkosti pšeničných otrub bylo provedeno metodou dle Karl-Fishera. Celkem ve třech opakování bylo do odměrných baněk naváženo přibližně 0,5 g pšeničných

otrub, baňky byly i se zátkou zváženy na 4 desetinná místa na analytických vahách. Poté bylo ke vzorku přidáno 20 ml bezvodého methanolu a zavřené baňky byly opět zváženy. Voda a vlhkost ze vzorku pšeničných otrub byly methanolem extrahovány po dobu 15 min ve v lázni, vyhříváné na 50 °C. Blank byl připraven stejným způsobem, jen bez navážky vzorku.

Po ochlazení baněk bylo asi 5 ml extraktu pšeničných otrub přefiltrováno přes stříkačkový filtr do suchých vialek. Do titrátoru bylo poté mikrostríkačkou Hamilton dávkováno přesně odvážené množství extraktu, jehož hodnota byla vložena do měřicí cely přístroje. Titrovaný obsah vody v nadávkovaném extraktu se nakonec přepočítá na obsah vody ve vzorku pšeničných otrub dle rovnice:

$$w_{H_2O} = \frac{(w_{H_2O\ ex} - w_{H_2O\ bl}) \cdot (m_{bvzOH} - m_b)}{m_{bvz} - m_b},$$

kde

w_{H_2O} je celkový obsah vody ve vzorku,

$w_{H_2O\ ex}$ je obsah vody v dávkovaném extraktu,

$w_{H_2O\ bl}$ je obsah vody v blanku,

m_{bvzOH} je hmotnost baňky se vzorkem a methanolem.

m_b je hmotnost baňky,

m_{bvz} je hmotnost baňky se vzorkem.

4.3.4 Stanovení minoritních složek

Za minoritní látky v pšeničných otrubách a proteinovém izolátu z pšeničných otrub jsou považovány fenolické kyseliny, tuky a konkrétní mastné kyseliny a anorganická frakce, která je charakterizovaná množstvím nespalitelného popela PO a PKPO a zastoupením jednotlivých minerálních látek.

4.3.4.1 Obsah popela a minerálních látek

Popel byl stanoven gravimetricky spálením 1 g vzorku pšeničných otrub a proteinového izolátu z pšeničných otrub. Množství bylo nejprve naváženo do předem vyžíhaných a zvážených keramických kelímku s přesností na 4 desetinná místa. Na elektrickém vařiči byly vzorky zuhelnatěny, kelímky byly následně přemístěny na 3 hodiny do elektrické pece vyhřáté na teplotu 800 °C. Po vychladnutí kelímků v exikátoru byly opět zváženy. Zastoupení popela bylo stanoveno dle rovnice:

$$w_{popel} = \frac{m_{p+k} - m_k \cdot 10^3}{m_{vz}} [mg/g]$$

přičemž m_{p+k} je hmotnost popela a kelímku po spálení vzorku, m_k je hmotnost kelímku a m_{vz} je původní hmotnost vzorku. Stanovení popela ve vzorcích bylo provedeno v duplikátech.

Obsah minerálních látek v pšeničných otrubách a proteinovém izolátu byl stanoven metodou ICP-OES po mikrovlnném rozkladu vzorků na mokré cestě. Byly analyzovány makroprvky vápník, draslík, hořčík, sodík a fosfor a mikroprvky hliník, chrom, měď, železo, mangan a zinek. Do teflonových nádob bylo naváženo 100 mg daného vzorku a přidáno 5 ml koncentrované kyseliny dusičné a 1 ml peroxidu vodíku. Suspenze byla vložena do rozkladného mikrovlnného systému MLS 1200 (Mega Milestone), podmínky rozkladu jsou uvedeny v tabulce 25.

Tabulka 25 Podmínky mikrovlnného rozkladu vzorků na mokré cestě

Fáze	Čas [min]	Výkon [W]
1	2	250
2	2	0
3	6	200
4	5	400
5	5	600

Po rozkladu byly vzorky kvantitativně převedeny do 25 ml odměrné baňky a doplněny destilovanou vodou po rysku. Stanovení jednotlivých minerálních látek bylo provedeno na přístroji Horiba Jobin Yvonne Ultima 2 dle nastavení uvedeném v tabulce 26.

Tabulka 26 Nastavení analýzy minerálních látek pomocí ICP-OES

Výkon radiofrekvenčního generátoru	1300 W
Průtok plazmového plynu	12 l/min
Průtok stínícího plynu	0,28 l/min
Průtok zmlžovacího plynu	0,8 l/min
Tlak na zmlžovači	3 bar

4.3.4.2 Obsah fenolických látek

Obsah fenolických látek v proteinových izolátech byl stanoven pomocí kapalinové chromatografie. 1 g vzorku proteinového izolátu z pšeničných otrub byl extrahován 10 ml 96% ethanolu za stálého třepání po dobu 30 min. Suspenze byla centrifugována (5 min, 6000 rcf, laboratorní teplota) a následně byl získaný supernatant přefiltrován přes stříkačkový filtr (0,45 μ m). Extrahované fenolické látky byly ihned stanoveny na kapalinovém chromatografu dle nastavení uvedeném v tabulce 27.

Tabulka 27. Podmínky analýzy fenolických kyselin pomocí kapalinového chromatografu

Mobilní fáze	Acetonitril:1% kyselina octová (10:90)
Průtok	0,7 ml/min
Detektor	Waters 2487 Dual λ Absorption detector
Vlnová délka	330nm
Kolona	Kinetex 2.6u C18 100A; 100x 4.60um
Teplota na koloně	35 °C

4.3.4.3 Obsah tuků a mastných kyselin

Zastoupení mastných kyselin a celkový obsah tuků v pšeničných otrubách a v proteinovém izolátu byl stanoven pomocí plynové chromatografie. Pro jejich stanovení byly tyto mastné kyseliny ve vzorcích před analýzou transesterifikovány na methylestery konkrétních mastných kyselin.

K 10-20 mg namletých otrub nebo proteinového izolátu odvážených do skleněných krimpovacích vialek bylo přidáno 1,8 ml transesterifikační směsi (0,5 mg/ml interního standard C17, 15% roztok kyseliny sírové v methanolu). Transesterifikace tuků ve vzorcích proběhla v zakrimpovaných vialkách umístěných do termobloku předehřátém na teplotu 85 °C po dobu 2 hodin. Po uplynutí této doby byly vialky ochlazeny na laboratorní teplotu, transesterifikované vzorky byly kvantitativně převedeny do 4 ml skleněných vialek s 0,5 ml 0,05 M NaOH. Dále

byl do těchto vialek přidán 1 ml hexanu. Celý obsah vialek byl důkladně promíchán na vortexu (6 minut), přičemž došlo k rozdělení fází. Z horní, bezbarvé fáze bylo odpipetováno 0,1 ml vzorku do nové vialky, bylo přidáno 0,9 ml hexanu () a promícháno třepáním. Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí plynového chromatografu Thermo Fisher TRACETM GC. Podmínky analýzy jsou uvedeny v tabulce 28.

Tabulka 28 Podmínky analýzy celkových tuků a methylesterů mastných kyselin

Dávkování	Autosampler Thermo Scientific A1 1310
Kolona	Zebtron ZB-FAME; 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm
Detektor	FID
Nosný plyn, průtok	H ₂ ; 1 ml/min
Objem nástřiku	1 μl
Teplota (injektor) / teplota (detektor)	250 °C/260 °C
Průtok	Vzduch – 350 ml/min; N ₂ – 30 ml/min; H ₂ – 35 ml/min

4.3.5 Stanovení stravitelnosti proteinů

Byla ověřena stravitelnost proteinů obsažených ve vzorku pšeničných otrub a proteinového izolátu z pšeničných otrub pomocí simulace podmínek trávicího traktu. Stanovení stravitelnosti bylo provedeno vždy ve 2 opakování.

1 g daného vzorku bylo nejprve smícháno s 15 ml 0,03 M HCl a po dobu 5 min třepáno při teplotě 37 °C. Poté byla hodnota pH této suspenze upravena na hodnotu $1,9 \pm 0,05$ (1M NaOH/1M HCl) a byl přidán 1 ml roztoku pepsinu (4 mg/ml; 2000 U/g) a suspenze byla třepána a inkubována dalších 30 min v třepacím inkubátoru IKA KS 3000. Následně bylo pH suspenze upraveno na 7,5 pomocí 1M NaOH, bylo přidáno 4,5 ml fosfátového pufru a 1 ml roztoku pankreatinu (5 mg/ml, 4 USP). Suspenze byla dále opět inkubována a třepána při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Po uplynutí dané doby byla suspenze zcentrifugována (8000 rcf, 10 min, laboratorní teplota), obsah nestrávených proteinů v sedimentu byl stanoven pomocí Kjeldahlovy metody (viz kap. 4.3.1).

4.4 Velkoobjemové 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 m³/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 disk 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 $4 \pm 0,1$ pomocí 2M H₂SO₄ 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 disk 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). Parametry celého procesu velkoobjemového procesu izolace proteinů z pšeničných otrub jsou zobrazeny v tabulce 29.

Tabulka 29 Parametry 1. varianty velkoobjemové izolace proteinů z pšeničných otrub

Extrakce		
Extrakční objem (0,05 M NaOH)	[l]	1000
Navážka otrub	[kg]	50
Doba extrakce	[h]	2
Rychlost míchání	[ot/min]	300
1. odstředivka		Aldec 10
Otáčky bubnu	[ot/min]	5000
Otáčky šnekového dopravníku	[ot/min]	3–5
Objemový průtok suroviny	[l/h]	660
2. odstředivka		Clara 80
Otáčky bubnu	[ot/min]	8000
Doba mezi cykly	[min]	30
Objemový průtok suroviny	[l/h]	450
Precipitace		pH 4
Objem konc. H ₂ SO ₄	[ml]	400
Doba precipitace	[min]	30
Rychlost míchání	[ot/min]	100
Teplota	[°C]	25
3. odstředění		Clara 80
Otáčky bubnu	[ot/min]	8000
Doba mezi cykly	[min]	15
Objemový průtok suroviny	[l/h]	500
Lyofilizace		Lyo-tech
Teplota zmrazení	[°C]	-35
Doba zmrazení	[h]	6
Doba sušení	[h]	24
Tlak v komoře	[Pa]	30
Teplota polic	[°C]	20

Ve **druhé variantě** byla testována izolace proteinů z pšeničných otrub za stejných podmínek, ovšem s dvojnásobnou navázkou 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. Nastavené parametry této varianty jsou uvedeny tabulce 30.

Tabulka 30 Parametry 2. varianty velkoobjemové izolace proteinů z pšeničných otrub

Extrakce		
Extrakční objem (0,05 M NaOH)	[l]	1000
Navážka otrub	[kg]	100
Doba extrakce	[h]	2
Rychlost míchání	[ot/min]	300
1. odstředivka		Aldec 10
Otáčky bubnu	[ot/min]	4795
Otáčky šnekového dopravníku	[ot/min]	3–5
Objemový průtok suroviny	[l/h]	480
2. odstředivka		Clara 80
Otáčky bubnu	[ot/min]	8000
Doba mezi cykly	[min]	30
Objemový průtok suroviny	[l/h]	450
Precipitace		pH 4
Objem konc. H ₂ SO ₄	[ml]	880
Doba precipitace	[min]	30
Rychlost míchání	[ot/min]	100
Teplota	[°C]	25
3. odstředění		Clara 80
Otáčky bubnu	[ot/min]	8000
Doba mezi cykly	[min]	15
Objemový průtok suroviny	[l/h]	500
Lyofilizace		Lyo-tech
Teplota zmrazení	[°C]	-35
Doba zmrazení	[h]	6
Doba sušení	[h]	24
Tlak v komoře	[Pa]	30
Teplota polic	[°C]	20

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 odstředování. 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 disk 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. Parametry této varianty jsou zobrazeny v tabulce 31.

Tabulka 31 Parametry 3. varianty velkoobjemové izolace proteinů z pšeničných otrub

Extrakce		
Extrakční objem (0,05 M NaOH)	[l]	1000
Navážka otrub	[kg]	100
Doba extrakce	[h]	2
Rychlost míchání	[ot/min]	300
1. odstředění		Aldec 10
Otáčky bubnu	[ot/min]	5000
Otáčky šnekového dopravníku	[ot/min]	3–5
Objemový průtok suroviny	[l/h]	5480
Precipitace		pH 4
Objem konc. H ₂ SO ₄	[ml]	900
Doba precipitace	[min]	30
Rychlost míchání	[ot/min]	100
Teplota	[°C]	25
2. odstředění		Clara 80
Otáčky bubnu	[ot/min]	8000
Doba mezi cykly	[min]	15
Objemový průtok suroviny	[l/h]	431
Lyofilizace		Lyo-tech
Teplota zmrazení	[°C]	-35
Doba zmrazení	[h]	6
Doba sušení	[h]	24
Tlak v komoře	[Pa]	30
Teplota polic	[°C]	20

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/m²xh. 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). Podmínky čtvrté varianty velkoobjemové extrakce proteinů jsou uvedeny v tabulce 32.

Tabulka 32 Parametry 4. varianty velkoobjemové izolace proteinů z pšeničných otrub

Extrakce					
Extrakční objem (0,05 M NaOH)	[l]	1000			
Navážka otrub	[kg]	100			
Doba extrakce	[h]	2			
Rychlost míchání	[ot/min]	300			
Sedimentační tank s filtrační přepážkou					
Rozměry	[m]	1,4x0,7x0,6			
Kapacita	[l/m ² xh]	151			
Čas separace	[h]	6,62			
Precipitace		pH 4			
Objem konc. H ₂ SO ₄	[ml]	900			
Doba precipitace	[min]	30			
Rychlost míchání	[ot/min]	100			
Teplota	[°C]	25			
3. odstředění		Clara 80			
Otáčky bubnu	[ot/min]	8000			
Doba mezi cykly	[min]	15			
Objemový průtok suroviny	[l/h]	431			
Lyofilizace		Lyo-tech	Sprejové sušení		
Objem vlhkého izolátu	[l]	35	Objem vlhkého izolátu	[l]	18
Teplota zmrazení	[°C]	-35	Vstupní teplota vzduchu	[°C]	185
Doba zmrazení	[h]	6	Výstupní teplota vzduchu	[°C]	80
Doba sušení	[h]	24	Účinnost odpařování	[kg/h]	18,2
Tlak v komoře	[Pa]	30	Doba sušení	[h]	1
Teplota polic	[°C]	20			

4.5 Aplikace proteinového koncentráту z pšeničných otrub v potravinářství

Proteinový koncentrát z pšeničných otrub získaný a charakterizovaný dle postupů uvedených v kapitolách 4.2 a 4.3 byl následně testován jako proteinový fortifikant různých druhů potravin. Jeho přidavek byl proveden za účelem zvýšení nutriční hodnoty dané potraviny, ovšem za současného zachování jejich sensorických a funkčních vlastností. Vliv přidavku na kvalitu a vlastnosti potraviny byl porovnáván s přidavkem proteinového materiálu, který je v potravinářství běžně využíván pro přípravu vysokoproteinových potravin. U každého typu fortifikované potraviny byly provedeny analýzy, které dostatečně charakterizují vliv přidavku proteinu na její vlastnosti.

4.5.1 Příprava a charakterizace vysokoproteinových jogurtů

Vysokoproteinové jogurty se stávají velice populární a nutričně přínosnou potravinou. Přidavek proteinů nesmí negativně ovlivňovat typické vlastnosti jogurtu, jako je hladká textura nebo sladkokyselá chuť, proto musí být vývoj jogurtu s obsahem proteinového izolátu z pšeničných otrub optimalizován.

Výroba vysokoproteinového jogurtu

Pro výrobu všech vzorků jogurtů bylo použito čerstvé, plnotučné, pasterizované mléko (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 přídatkem proteinového koncentrátu z pšeničných otrub nebo syrovátkového proteinu (Vilgain Aktin). Za účelem zlepšení sensorických vlastností vysokoproteinových jogurtů pak byly připraveny jogurty s 5% a 10% hmotnostním přídatkem 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 s 2 a 5% OP byla stanovena kapacita zadržování vody (KZV), jejich reologické vlastnosti a životaschopnost jogurtových bakterií. Pro sensorickou analýzu byly připraveny jogurty s 5 a 10% obsahem bílkovin, jejichž zdrojem bylo buď mléko, OP nebo sušené mléko. Jako reference sloužil vzorek jogurtu bez přídatku proteinů. Všechny vzorky byly připraveny v duplikátech. Označení a složení připravených a dále testovaných vzorků je uvedeno v tabulce 33.

Tabulka 33 Označení a složení vzorků připravených vysokoproteinových jogurtů

	OP [g]	Sušené mléko [g]	Enkapsulovaný OP [g]	Celkový obsah bílkovin [%]
Reference	-	-	-	3,3
<i>KZV, reologické vlastnosti, životaschopnost bakterií</i>				
2% OP	2,0	-	-	4,6
5% OP	5,0	-	-	6,8
<i>Senzorická analýza</i>				
5% OP	2,01	-	-	5
10% OP	7,91	-	-	10
5% MIX1	1,00	2,74	-	5
5% MIX2	1,33	1,84	-	5
10% MIX1	3,96	10,8	-	10
10% MIX2	5,27	7,19	-	10
5% E-OP	-	-	3,15	5
10% E-OP	-	-	12,4	10

Stanovení sušiny, kapacity zadržování vody a synereze jogurtů

Obsah sušiny, kapacita zadržování vody a synereze jsou fyzikálně-chemické vlastnosti, které jsou významnými ukazateli kvality jogurtů. Tyto vlastnosti byly ve všech připravených vzorcích stanoveny v duplikátech.

Sušina vzorků byla stanovena sušením jeho definovaného množství v předem vysušené a zvážené hliníkové nádobce v sušárně při teplotě 105 °C do konstantní hmotnosti (přibližně 3,5 hodiny). Za účelem stanovení kapacity zadržování vody (KZV) bylo do 50 ml centrifugační zkumavky odváženo přibližně 10 g (m_0) každého vzorku jogurtu, které byly následně

centrifugovány (10000 rcf, 10 min, laboratorní teplota). Oddělený supernatant byl slit a zbylý sediment opět zvážen (m_{sed}). Kapacita zadržování vody každého vzorku byla stanovena dle rovnice:

$$KZV = \frac{m_{sed}}{m_0} \cdot 100.$$

Synereze byla stanovena duplicitně u vzorků jogurtů určených pro senzorickou analýzu po 7 dnech skladování při 4 °C. Definované množství jogurtu bylo naváženo na předem navlhčený filtrační papír a umístěno do nálevky ve stojanu. Uvolněná syrovátka byla po dobu 3 hodin sbírána do odměrného válce. Míra synereze byla následně stanovena jako objem uvolněné syrovátky (ml) na 100 g jogurtu.

Stanovení celkového počtu mikroorganismů

Celkový počet a viabilita mikroorganismů ve vzorcích jogurtů byly stanoveny pomocí průtokového cytometru s fluorescenční detekcí Cytex Aurora (Cytex Biosciences Inc., USA). Stanovení proběhlo po 8 dnech skladování připravených vzorků jogurtů vždy v triplikátech.

1 ml každého vzorku bylo pomocí vortexu rozsuspendováno v 10 ml citrátového pufru (100 mM, pH 4,4) a zředěno na konečnou koncentraci přibližně 10^6 buněk na 1 ml. Následně byly k 1 ml zředěného vzorku přidány 2 μ l roztoku propidium jodidu (2 mg/ml, Thermo Fisher Scientific). Poté byla bakteriálně suspenze inkubována na temném místě, při laboratorní teplotě po dobu 5 min. Takto připravené vzorky byly pak neprodleně změřeny, pozorovaný signál byl stanoven na kanálu B6 (617 ± 15 nm).

Stanovení reologických vlastností jogurtů

Pomocí rotačního reometru DHR-2 (TA Instruments, Inc, USA) byly stanoveny tokové vlastnosti (viskozita, smyková rychlost, smykové napětí) testovaných vzorků jogurtů. Pro měření těchto typů vzorků byly použity soustředné ocelové válečky s průměrem 40 mm, přičemž výška měřicí štěrby byla 5917 μ m. Měření byla provedena vždy alespoň v duplikátech při teplotě 10 °C.

Po umístění dostatečného množství vzorku do měřicího válečku se vzorek nejprve nechal 3 minuty odležet a vytemperovat na teplotu měření 10 °C. Vložená axiální síla, působící na vzorek v mezeře (1000 μ m), nepřesáhla při měření 5 N. Smyková rychlost byla zvyšována logaritmicky od $0,1$ s⁻¹ do 10 s⁻¹, přičemž hodnota měřené zdánlivé viskozity při dané smykové rychlosti musela být ustálena alespoň po dobu 5 sekund. Po dosažení maximální hodnoty smykové rychlosti bylo zahájeno měření zdánlivé viskozity v průběhu klesajících hodnot smykové rychlosti ($10 - 0,1$ s⁻¹).

Senzorická analýza vysokoproteinových jogurtů

Senzorická analýza jogurtů proběhla 1 den po přípravě daných vzorků v laboratoři senzorické analýzy (Fakulta Chemické, Vysoké učení Technické Brno), která svým vybavením odpovídá normě ISO 8599. Analýzy se zúčastnilo celkem 20 hodnotitelů s relevantními zkušenostmi a znalostmi mléčných výrobků a dostatečným vzděláním v oblasti senzorické analýzy různých druhů potravin. Všechny hodnocené senzorické parametry vzorků byly porovnány s referenčním vzorkem. Jako neutralizátory při hodnocení byla hodnotitelům k dispozici voda a bílý rohlík. Hodnocené vzorky měly teplotu okolo 5 °C, což odpovídá teplotě běžně konzumovaných jogurtů. Označení jednotlivých vzorků bylo šifrované.

Senzorický dotazník byl rozdělen na 3 části – hodnocení textury (1), aroma a chuti jednotlivých vzorků. Mezi hodnocené texturní vlastnosti byly zařazeny deskriptory

homogenity, tuhosti, hustoty a krémovitosti, které byly hodnoceny vizuálně, mechanicky pomocí čajové lžičky, či při poválení vzorku na jazyku. Aroma (2) vzorků bylo hodnoceno čichovými receptory. Sladkost, kyselost a hořkost byly zařazeny mezi chuťové deskriptory, jejich vnímání bylo vyhodnoceno po vložení a několikanásobném převálení vzorku v ústech. Skóre pro celkový dojem bylo hodnotiteli uděleno dle jejich osobních preferencí a požadavků na jogurt.

Hodnocení bylo provedeno pomocí 5bodové stupnice, se slovně definovaným skóre 1, 3 a 5 charakteristicky pro každý deskriptor (tabulka 34). Mediány skóre jednotlivých deskriptorů byly použity pro vyhodnocení pomocí softwaru Statistica (Tibco, Palo Alto, USA, version 14.1).

Tabulka 34 Slovní charakteristika bodového skóre pro jednotlivé deskriptory sensorické analýzy jogurtů

Deskriptor	1	3	5
Homogenita	Nehomogenní, velké hrudky	Nehomogenní, malé hrudky	Homogenní, bez hrudek
Tuhost	Lehce míchatelné, lžička nestojí	Tužší, lžička nestojí	Tuhé, lžička stojí
Hustota	Řídké, tekuté	Řídké, kompaktní	Celistvé, kompaktní
Krémovitost	Písčité	Krémovité, občasné hrudky	Krémovité, bez hrudek
Aroma	Nepříjemné, nepřírozené	Neznatelné	Příjemné, jogurtové
Sladkost	Neznatelné	Příjemné	Velmi intenzivní
Kyselost	Neznatelné	Příjemné	Velmi intenzivní
Hořkost	Neznatelné	Středně intenzivní	Velmi intenzivní
Celkový dojem	Vůbec mi nechutnalo	Přijatelné	Moc mi chutnalo

Za účelem zlepšení sensorických vlastností vysokoproteinových jogurtů bylo otestováno mletí (M-OP), různý poměr míchání OP se sušeným mlékem (MIX) a enkapsulace OP (E-OP). Mletí bylo provedeno pomocí kulového mlýnu (HK 40, Česká republika) za účelem zmenšení velikosti proteinových částic a následně písčitosti vysokoproteinových jogurtů. Velikost výsledných částic byla měřena pomocí disperzní jednotky (Rodos, Sympatec, Německo) a laserové difrakce (Helos, Sympatec, Německo).

Enkapsulace OP do alginátu sodného byla provedena za účelem snížení hořkosti proteinu. Alginát byl rozpustěn v destilované vodě za stálého míchání a zahřívání (60 °C) na vyhřívané magnetické míchače po 1 hodině. Vzniklý roztok byl následně ochlazen na 35 °C a za stálého míchání byl přidán OP, suspenze se dále homogenizovala další hodinu. Poměr alginátu a OP ve výsledné suspenzi byl 1:5.

Suspenze byla poté přečerpána pomocí peristaltické pumpy hadičkou o průměru 2 mm do 10% roztoku CaCl₂, kde se začaly tvořit enkapsulované částice. Ty byly pomocí síta zfiltrovány, 3krát promyty destilovanou vodou a sušeny při laboratorní teplotě na filtračním papíře po dobu 12 hodin. Před použitím za účelem výroby vysokoproteinového jogurtu byly částice skladovány v suchu a temnu. Účinnost enkapsulace byla ověřena stanovením obsahu bílkovin v částicích pomocí metody dle Kjeldahla (viz kap. 4.3.1). Velikost enkapsulovaných

proteinových částic byla stanovena pomocí vibračního sítové třepačky a série sít (Retsch, Haan, Německo).

4.5.2 Příprava a charakterizace vysokoproteinového pečiva

Jako jedna z dalších možných aplikací proteinového izolátu z pšeničných otrub v potravinářství byl testován jeho přídavek do pekařských směsí za účelem přípravy vysokoproteinového pečiva. Pomocí farinografického a extenzografického stanovení vlastností připravených těst a senzorické analýzy hotového vysokoproteinového pečiva byly definovány rozdíly mezi neobohaceným pečivem a pečivem obohaceným proteinovým izolátem z pšeničných otrub nebo komerčním syrovátkovým proteinem (Vilgain Aktin, Česká republika).

Výroba vysokoproteinového těsta a pečiva

Za účelem ověření vlastností vysokoproteinového pečiva bylo nejprve připraveno několik směsí světlé, hladké pšeničné mouky (Mlýny J. Voženílek, Česká republika) s proteinovým koncentrátem z pšeničných otrub nebo se syrovátkovým proteinem (Vilgain Aktin, Česká republika). Bylo testováno několik procentuálních substitucí pšeničné mouky daným proteinovým materiálem, konkrétně byly vytvořeny směsi s 5, 10 a 15% obsahem daného proteinového materiálu. Seznam připravených vzorků směsí je uveden v tabulce 35. Jako reference sloužila neobohacená hladká pšeničná mouka.

Tabulka 35 Složení a označení vzorků směsí mouky a proteinového materiálu

Označení vzorku	Pšeničná mouka [g]	Proteinový materiál [g]
Reference	100	-
5% OP	5	95
10% OP	10	90
15% OP	15	85
5% SP	5	95
10% SP	10	90
15% SP	15	85

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.

Stanovení farinografických vlastností vysokoproteinových těst

Farinografické vlastnosti těst vytvořených z výše uvedených směsí hladké mouky a proteinového materiálu byly testovány na farinografu-E (Brabender, Německo) vybaveným hnětačem r S 300 H pro 300 g mouky. Rychlost otáček lopatek hnětače byla 63 ot/min. Teplota v průběhu experimentu byla 29,9 °C, její stálost byla korigována pomocí termostatu.

Dle aktuální vlhkosti vzorku směsi bylo její dané množství s přesností na jedno desetinné místo odváženo do hnětače. K tomuto množství bylo pomocí byrety přidáno takový objem vody, který způsobil vznik těsta s požadovanou hodnotou krouticího momentu a konzistence. Tyto parametry jsou závislé na vaznosti vody konkrétní směsi.

Hned po přidání vody dochází ve hnětači k tvorbě těsta, měření je započato při hodnotě krouticího momentu 40 FE. Konzistence vznikajícího těsta by neměla přesáhnout hodnotu

500 FJ. Objem přidané vody k získání požadované konzistence se u jednotlivých vzorků směsí lišilo kvůli rozdílným hodnotám jejich vaznosti vody. Pro testované směsi jsou tato množství uvedena v tabulce 36. Farinografické stanovení trvalo 20 min a bylo provedeno u referenčního vzorku mouky, a vzorků 5% OP, a 5 % SP.

Tabulka 36 Objem vody přidávaný ke vzorkům směsí pro stanovení jejich farinografických vlastností

	Objem vody [ml]
Reference	55,8
5% OP	52,6
5% SP	56,4

Stanovení extenzografických vlastností vysokoproteinových těst

Extenzografické vlastnosti těst připravených ze vzorků směsí byly stanoveny na extenzografu-N (Brabender, Německo). Těsto bylo pomocí farinografu-N dle popisu a požadavků na stanovování farinografických vlastností v kap. 4.5.2.2. Místo destilované vody byl ovšem k navážené směsi ve hnětači byretou přidáván 0,1 M roztok NaCl. Aby bylo po 5 minutách dosaženo optimální konzistence těsta 500 FJ, musel být přídavek roztoku NaCl ke směsi optimalizován, tyto objemy jsou pro jednotlivé vzorky uvedeny v tabulce 37.

Tabulka 37 Objem 0,1M NaCl přidávaný ke vzorkům směsí pro stanovení jejich extenzografických vlastností

	Objem 0,1M roztoku NaCl [ml]
Reference	54,6
5% OP	52,6
10% OP	54,9
15% OP	57,7
5% SP	47,9

Z hnětače bylo těsto přesunuto do skulovače, kde došlo k vytvoření klonku. Ten byl dále vložen do vyvalovače pro vytvoření tvaru válečku. Válečky se následně na 30 minut umístily do vytemperované komory (30,4 °C) na odležení.

Extenzografické vlastnosti těsta byly testovány natahováním vzniklého válečku pomocí háku až do jeho přetržení. Odpor kladený těstem při jeho natahování byl zaznamenávám pomocí registračního zařízení. Po přetržení těsta byl tento vzorek těsta opět umístěn do skulovače a celý extenzografický experiment byl zopakován. Nastavení extenzografu je zobrazeno v tabulce 38.

Tabulka 38 Nastavení extenzografu-N (Brabender, Německo)

Počet otáček skulovače [min ⁻¹]	83 ± 3
Počet otáček vyvalovače [min ⁻¹]	15 ± 1
Rychlost otáček [cm.s ⁻¹]	1,50 ± 0,05
Rychlost posuvu registračního papíru [cm.s ⁻¹]	0,70 ± 0,01
Síla, vynaložení na extenzografickou jednotku [mN.EJ ⁻¹]	12,3 ± 0,3

Senzorická analýza vysokoproteinového pečiva

Senzorická analýza pečiva proběhla 1 den po jeho přípravě v laboratoři senzorické analýzy (Fakulta Chemické, Vysoké učení Technické Brno), která svým vybavením odpovídá normě ISO 8599. Analýzy se zúčastnilo celkem 20 hodnotitelů s relevantními zkušenostmi a znalostmi pekařských výrobků a dostatečným vzděláním v oblasti senzorické analýzy různých druhů potravin. Jako neutralizátor chuti při samotné analýze byla k dispozici voda.

Bylo hodnoceno celkem 7 vzorků pečiva. K hodnocení bylo předloženo kolečko každého vzorku pečiva, na kterém bylo možné posoudit jak vlastnosti kůrky, tak střídý.

Byly hodnoceny texturní, chuťové vlastnosti a aroma každého vzorku. Mezi hodnocené texturní vlastnosti patřil deskriptor struktury, povrchu, tvrdosti a žvýkatelnosti. Slanost a hořkost byly zařazeny mezi významné chuťové deskripty. Hodnotitelé mohli také definovat konkrétní chuť (např. máselná, obilná, oříšková) či vůni (např. máselná, obilná, oříšková) daného vzorku. Skóre pro celkový dojem bylo hodnotiteli uděleno dle jejich osobních preferencí a požadavků na pečivo.

Hodnocení bylo provedeno pomocí 5bodové stupnice, se slovně definovaným skóre 1, 3 a 5 charakteristicky pro každý deskriptor (tabulka 39). Mediány skóre jednotlivých deskriptorů byly použity pro vyhodnocení pomocí softwaru Statistica (Tibco, Palo Alto, USA, version 14.1).

Tabulka 39 Slovní charakteristika bodového skóre pro jednotlivé deskripty senzorické analýzy pečiva

Deskriptor	1	3	5
Struktura	Velmi drolivá, písčitá	Mírně drolivá	Soudržná
Povrch	Drsný	Polohladký	Hladký
Tvrdost	Obtížně stlačitelný	Středně tvrdý	Měkký
Žvýkatelnost	Tvrký, obtížně žvýkatelný	Středně žvýkatelný	Snadno žvýkatelný, v ústech se rozpadá
Aroma	Nepříjemná	Nezratelná	Příjemná
Hořkost	Nevýrazný	Středně výrazný	Výrazný
Slanost	Nevýrazný	Středně výrazný	Výrazný
Chuť – celkový vjem	Nedostatečná	Průměrná	Výborná
Celkový dojem	Vůbec mi nechutnal	Přijatelné	Moc mi chutnalo

5 Výsledky a diskuze

5.1 Izolace proteinů z pšeničných otrub

5.1.1 Charakterizace pšeničných otrub

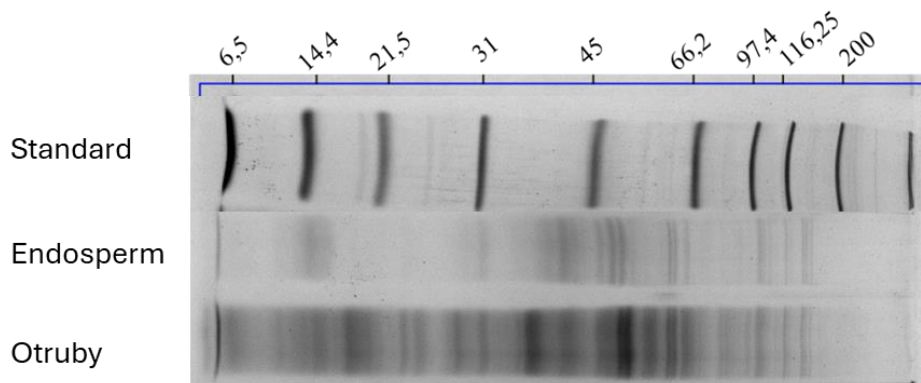
Pro veškeré experimenty provedené v rámci této dizertační práce byly použity pšeničné otruby (PO) z Mlýnu J. Voženílek (Česká republika). Za účelem jejich valorizace bylo nejprve pomocí různých analytických technik charakterizováno složení pšeničných otrub, a to jak jejich majoritně, tak i minoritně zastoupených komponent. Mezi majoritně zastoupené složky patří polysacharidy, bílkoviny a voda, v menších množstvích pšeničné otruby obsahují také tuky, fenolické látky a anorganické složky. Všechny komponenty byly stanoveny dle postupů uvedených v kapitole 4.3. Zastoupení jednotlivých složek PO z Mlýnu J. Voženílek je uvedeno a porovnáno se zahraniční literaturou v tabulce 40.

Tabulka 40 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

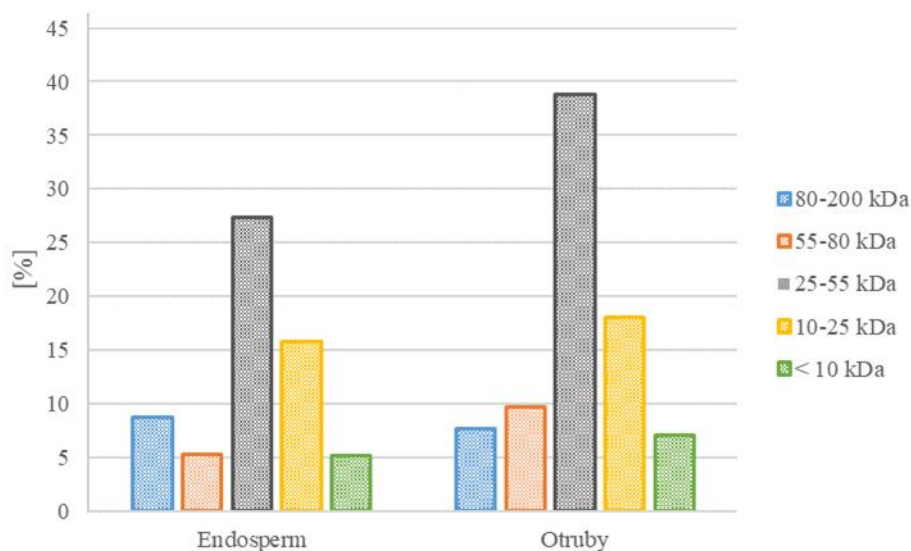
Dle údajů v tabulce 40 se složení PO z Mlýnu Voženílek výrazně neliší od složení PO uváděném Apprichem et al. [91] nebo Curtiem et al [309]. Celkový obsah **bílkovin** v PO Mlýny J. Voženílek byl necelých 19 %. Množství bílkovin v otrubách je závislé na způsobu a stupni vymletí pšeničného zrna [79]. 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 (viz kap. 4.3.2) byly separovány jednotlivé frakce bílkovin pšeničných otrub dle jejich molekulové velikosti. Tyto frakce byly zároveň porovnány s bílkovinnými frakcemi pšeničné endospermu, jež jsou snadněji definovatelné. SDS-PAGE elektroforeogram bílkovin pšeničných otrub a pšeničného endospermu vyhodnocený pomocí zobrazovacího systému Gel Doc XR+ (BioRad, USA) je zobrazen na obr. 18.



Obr. 18 Porovnání SDS-PAGE elektroforeogramů proteinů pšeničného endospermu a otrub

Dle přiložených elektroforeogramů (obr. 18) 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. Dle velikosti a intenzity pásů bylo dále určeno procentuální zastoupení bílkovin o dané molekulové hmotnosti ve vzorcích endospermu a otrub, vyhodnocení je zobrazeno v grafu na obr. 19.



Obr. 19 Procentuální zastoupení bílkovin o dané molekulové hmotnosti ve vzorku pšeničného endospermu a otrub

Proteiny pšenice jsou tvořeny zejména gluteliny, prolaminy, albuminy a globuliny. Jejich molekulová hmotnost a zastoupení se liší dle odrůdy, způsobu kultivace nebo části rostliny, ze které pochází [310]. Je zřejmé, že existují rozdíly ve složení proteinových frakcí pšeničného endospermu a pšeničných otrub pocházejícího z jednoho pšeničného kultivaru. Procentuální složení jednotlivých bílkovinných frakcí v pšeničných otrubách a pšeničném endospermu se výrazně neliší. U obou vzorků tvoří nejzastoupenější frakcí bílkoviny s molekulovou hmotností od 25 do 55 kDa, což je rozmezí, které odpovídá prolaminům, konkrétně α , β a γ -gliadinům [311]. Množství bílkovin s molekulovou hmotností mezi 10 a 25 kDa mírně převládá u pšeničného endospermu, stejně jako bílkovin s hmotností v rozmezí 80-200 kDa. Tato rozmezí mohou být typická pro globuliny nebo některé nízkomolekulární gluteliny [312]. Pšeničné otruby disponují vyšším zastoupením bílkovin o hmotnosti 55-80 kDa odpovídající například molekulové hmotnosti ω -gliadinům nebo vysokomolekulárním glutelinům [311]. Na základě výsledků lze konstatovat, že proteinové izoláty z pšeničného endospermu a z otrub mohou mít jiné zastoupení bílkovin a tím i jiné nutriční a funkční vlastnosti.

Většina **lipidů** v pšenici se nachází v klíčku a plní zásobní funkci. Lipidy pšeničných otrub se vyskytují převážně v aleuronové vrstvě ve formě triacylglycerolů. Lipidy v aleuronové vrstvě plní funkci zásobárny energie, jsou součástí buněčných membrán nebo se účastní regulačních a signalizačních procesů. PO běžně obsahují okolo 3 % lipidů v závislosti na odrůdě a způsobu zpracování pšeničného zrna [313]. Testované pšeničné otruby obsahovaly $2,99 \pm 0,47$ celkových lipidů, jejich bližší charakterizací bylo určeno také zastoupení jednotlivých mastných kyselin v PO, které je uvedeno v tabulce 41.

Tabulka 41 Zastoupení mastných kyselin pšeničných otrub

Složka	PO Mlýny J. Voženílek [%]	PO dle Yadav et al. [%] [314]
PUFA	61,2 ± 0,9	63,1 – 64,9
C18:2	57,7 ± 0,9	52,8 – 60,7
C18:3	2,6 ± 1,0	3,3 – 4,2
MUFA	22,2 ± 0,3	15,9 – 20,3
SFA	16,6 ± 0,5	17,76 – 24,0

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), obzvláště kyselina palmitová. Obdobné poměry zastoupených mastných kyselin byly uvedeny také Uddinem et al. v superkriticky extrahovaném oleji z pšeničných otrub [315] a Yadavem et al. v hexanovém extraktu PO [314].

Obsah **popela** v pšeničných otrubách byl podle návodu uvedeného v kap 4.3.4.1, stanoven na 6,03 ± 0,58 %. Mezi **prvky** byly nejzastoupenější fosfor a draslík, PO obsahují také relativně vysoké množství hořčíku, což je uvedeno v tabulce 42. Při porovnání výsledků s dostupnou literaturou se otruby produkované v mlýnech Voženílek zásadně neodchylují od publikovaných dat [91, 316].

Tabulka 42 Prvkové složení pšeničných otrub

Prvek	PO Mlýny J. Voženílek [mg/g]	PO dle Li et al. [mg/g] [316]
Sodík	0,09 ± 0,01	0,02
Vápník	0,75 ± 0,1	0,73
Draslík	12,7 ± 2,1	11,8
Hořčík	4,5 ± 0,9	6,10
Fosfor	13,7 ± 0,7	10,1

5.1.2 Izolace proteinové frakce z pšeničných otrub

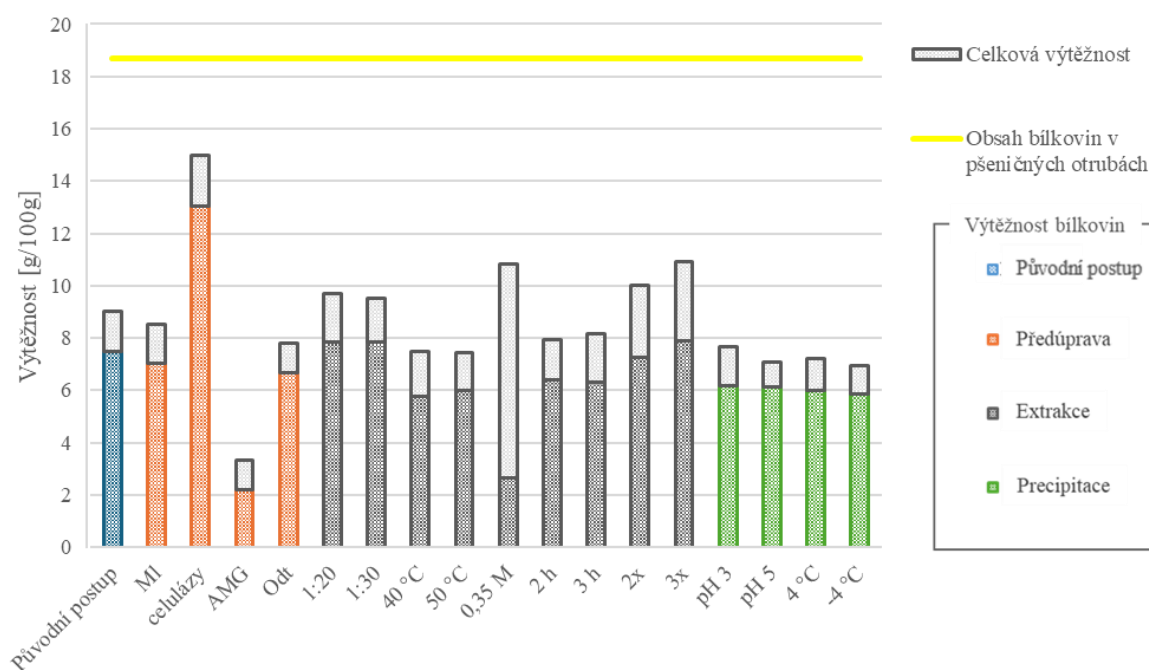
Dle provedené charakterizace pšeničných otrub lze za jednu z nejhodnotnějších komponent PO považovat proteiny, které tvoří téměř 19 % celkového obsahu. Proto byl za účelem valorizace pšeničných otrub navržen postup izolace proteinové frakce z jejich lignocelulózové struktury. Izolace byla provedena pomocí metody pH-shift (postup viz kap. 4.2), kterou lze považovat za univerzální pro extrakci všech typů proteinů. Pomocí SDS-PAGE analýzy byl také ověřen vliv každého testovaného procesu izolace na fragmentaci řetězců izolovaných bílkovin.

Základní postup izolace proteinů z pšeničných otrub byl postupně modifikován různými způsoby, které měly vést k efektivnějšímu uvolnění bílkovin z lignocelulózové struktury působením extrakčního činidla a následnému podpoření precipitace vyextrahovaných proteinů. Typy modifikací izolačního procesu byly rozděleny do tří skupin – (1) předúprava otrub, (2) změna podmínek extrakce proteinů a (3) změna podmínek precipitace proteinů. Vliv všech aplikovaných modifikací na výtěžnost izolace, zastoupení bílkovin v izolátech a fragmentaci bílkovinných řetězců byl porovnán s referenčním postupem izolace (viz obr. 17).

Vliv podmínek izolace na výtěžnost proteinového izolátu

I přesto, že byla zvolená metoda zaměřena pouze na izolaci proteinů, v průběhu procesu mohly být spolu s nimi extrahovány a následně izolovány také další balastní látky. Přítomnost těchto látek v konečném proteinovém izolátu snižuje celkové zastoupení bílkovin a tím i jeho kvalitu. Některé látky se mohou v izolátech vyskytovat přirozeně (např. voda), některé jsou z pšeničných otrub izolovány společně s proteiny (např. polysacharidy). Izolaci těchto látek lze omezit nastavením takových podmínek procesu, které minimalizují jejich extrahovatelnost spolu s proteiny, či případně zajistí odstranění této jemně dispergované pevné frakce z extraktu (např. pomocí centrifugace). Výtěžnost procesu izolace bílkovin z pšeničných otrub byla rozdělena na dva typy – celková výtěžnost a výtěžnost samotných bílkovin.

Celková výtěžnost procesu izolace bílkovin z pšeničných otrub byla vyhodnocena jako hmotnost izolovaného proteinového materiálu (g) ze 100 g pšeničných otrub. **Výtěžnost bílkovin** byla definována jako hmotnost izolovaných, čistých bílkovin ze 100 g pšeničných otrub. Oba parametry efektivity izolační technologie jsou zobrazeny na obr. 21. Obsah bílkovin v použitých PO a zároveň maximální možná výtěžnost bílkovin činí 18,7 g/100 g, na obr. 20 je zobrazena pomocí žluté čáry. Konkrétní hodnoty výtěžností včetně směrodatných odchylek jsou uvedeny v příloze 1.



Obr. 20 Výtěžnost různých způsobů 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 [317]. V takovém případě nedochází k jejich extrakci při použití slabých zásad, ale až po narušení lignocelulózy. Z výsledků celkové výtěžnosti izolace lze také vyčíst, že na extrahovatelnosti proteinů z pšeničných otrub se nepodílí škrobová frakce, jelikož její

enzymatická hydrolýza pomocí AMG měla na výtěžnost izolace proteinů naopak negativní vliv, podmínky enzymatické hydrolýzy PO pomocí AMG (50 °C, 24 h) zřejmě nezpůsobily jen hydrolýzu škrobu, ale také narušení struktury proteinů vlivem působení zvýšené teploty [318]. Mletí ani odtučňování pšeničných otrub nemělo na celkovou výtěžnost procesu izolace proteinů signifikantní vliv.

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. Tento postup sice vedl ke zvýšení celkové výtěžnosti, ale také zásadním snížením výtěžnosti bílkovin oproti původnímu postupu. Zvýšení poměru navážky pšeničných otrub ku objemu extrakčního činidla na 1:20 a 1:30 ani prodloužení doby extrakce na 2 a 3 hodiny nemělo na celkovou výtěžnost izolace proteinů signifikantní vliv. Opakování fáze extrakce sice mělo za následek zvýšení celkové výtěžnosti procesu izolace, ovšem opakováním docházelo k extrakci a izolaci zejména neproteinové frakce. Ani zvýšení teploty extrakce na 40 °C nezpůsobilo uvolnění proteinů z lignocelulóзовé struktury i přes to, že se proteiny za zvýšené teploty stávají rozpustnější [319].

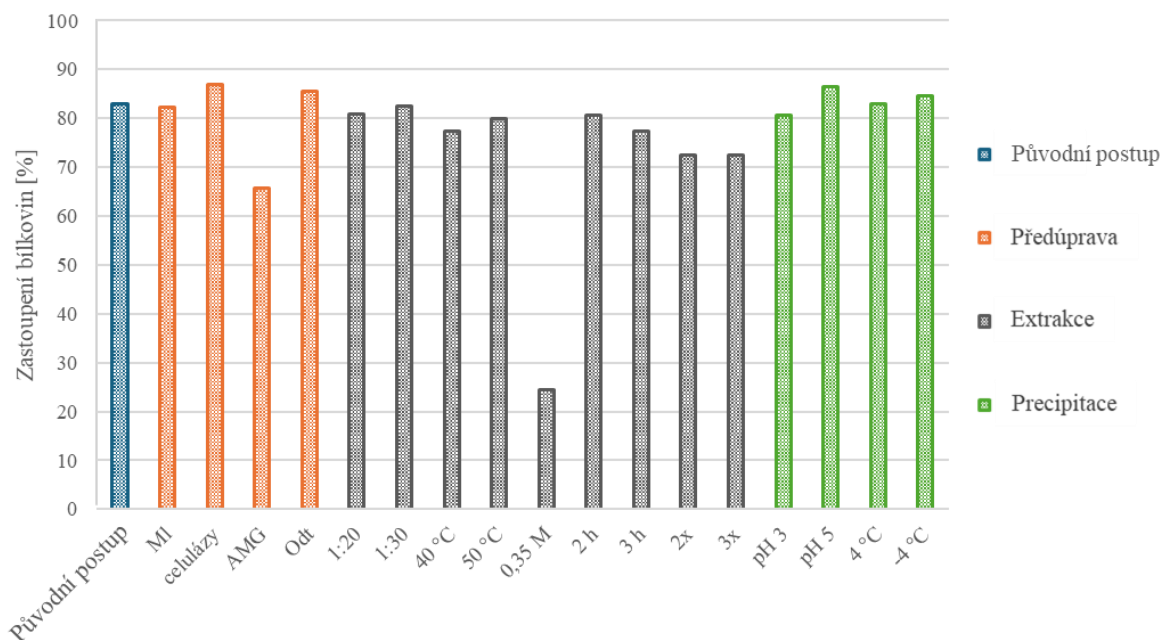
Stejně tak ke zvýšení výtěžnosti izolace nepomohly modifikace fáze precipitace. Snížení teploty významněji nepodpořilo precipitaci proteinů z extraktu, což poukazuje na fakt, že precipitace proteinů vyextrahovaných z pšeničných otrub probíhala velmi dobře i při pokojové teplotě. Změna pH pro srážení proteinů vedla naopak ke snížení celkové výtěžnosti i výtěžnosti bílkovin. Je tedy zřejmé že hodnota izoelektrického bodu extrahovaných bílkovin se pohybuje okolo pH 4, což je srovnatelné s hodnotou stanovenou Uttamem et al. [320]. Tato hodnota pH je obdobná u řady rostlinných proteinů, v takovém roztoku jsou pak proteiny nejméně solubilizovatelné [321].

Vliv podmínek izolace na čistotu bílkovin

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 izolovaném proteinovém materiálu úzce souvisí s podmínkami jeho izolace. K zajištění čistoty proteinového materiálu je nezbytné předcházet hydrolýze lignocelulóзовé struktury pšeničných otrub, jejíž produkty by následně mohly být spolu s proteiny extrahovány. V případě pšeničných otrub je také nezbytné účinně odstranit škrobové částice například pomocí centrifugace nebo filtrace.

V ideálním případě je izolace proteinového materiálu o daném zastoupení proteinů jednostupňová, bez nutnosti dodatečného přečišťování produktu. Proto byl vliv modifikací provedených v původním postupu izolace proteinů z pšeničných otrub ověřen také na zastoupení proteinů v konečném izolovaném proteinovém materiálu (Obr. 21).



Obr. 21 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, jelikož jsou hygroskopické. Vodu a vlhkost by bylo z materiálu možné odstranit prodloužením doby lyofilizace, ovšem velmi nízký obsah vody v proteinových materiálech může mít za následek změnu jeho fyzikálně chemických vlastností, například schopnost opětovně vázat vodu po delší době skladování [321, 322]. Další složky proteinových koncentrátů mohou být nejčastěji polysacharidy, v případě proteinového koncentrátu z PO je to škrob.

Změna v zastoupení bílkovin v proteinových materiálech oproti původnímu postupu byla pozorována jen u několika modifikovaných způsobů izolace. Jelikož byla většina neproteinové frakce oddělena spolu s deproteinovanými otrubami pomocí centrifugace (8000 rcf, 10 min, laboratorní teplota) v průběhu izolace, byly odhaleny spíše modifikace původního postupu izolace, které způsobily významný pokles v zastoupení bílkovin.

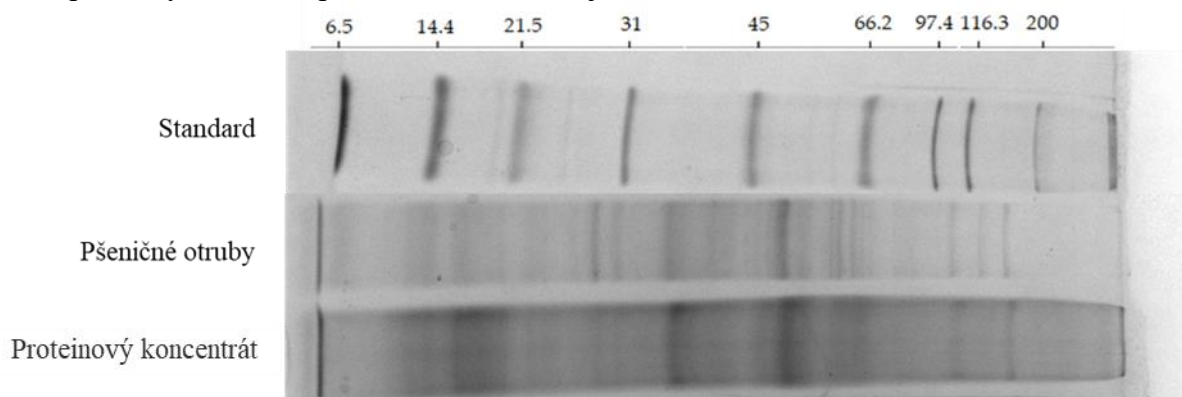
Mírný nárůst v zastoupení bílkovin oproti původnímu postupu byl pozorován pouze v případě předúpravy pšeničných otrub enzymatickou hydrolyzou pomocí celuláz (87 %), v proteinovém materiálu precipitovaném při pH 5 (86,4 %) a v materiálu, v kterém byla precipitace proteinů podpořena jednorázovým zchlazením na -4 °C (84,5 %). Nárůst v zastoupení proteinů v proteinovém izolátu z pšeničných otrub předupravenými enzymatickou hydrolyzou pomocí celuláz může mít spojitost obecně s nárůstem výtěžnosti bílkovin tohoto postupu izolace. Změnou podmínek fáze precipitace byly ovšem ovlivněny také vlastnosti neproteinogenní frakce, zejména škrobu. Nativní škrob je nejméně rozpustný při pH 4 [301, 302]. Pokud se hodnota pH roztoku zvýší, stává se škrob rozpustnější a v průběhu procesu izolace proteinů je odstraněn. Snížení teploty, případně přemrazení roztoku, může mít za následek degradaci a rozpad škrobových zrn a tím jejich solubilizovatelnost v roztoku [326].

Modifikace fáze extrakce nejčastěji vedly ke snížení zastoupení bílkovin v izolovaném proteinovém materiálu. Zejména extrakce proteinů koncentrovanějším roztokem NaOH (0,35 M) způsobila rozklad jak lignocelulózy, tak proteinových řetězců (viz *Vliv*

podmínek izolace na fragmentaci bílkovin), proto bylo zastoupení proteinů v takto získaném vzorku pouze okolo 25 %. Snížení zastoupení bílkovin oproti původnímu postupu izolace nebylo u ostatních modifikací tak výrazné. Bylo to nejčastěji zapříčiněno zvýšením extrahovatelnosti škrobu ať už prodloužením doby, zvýšením teploty či opakovanou extrakcí proteinů z PO.

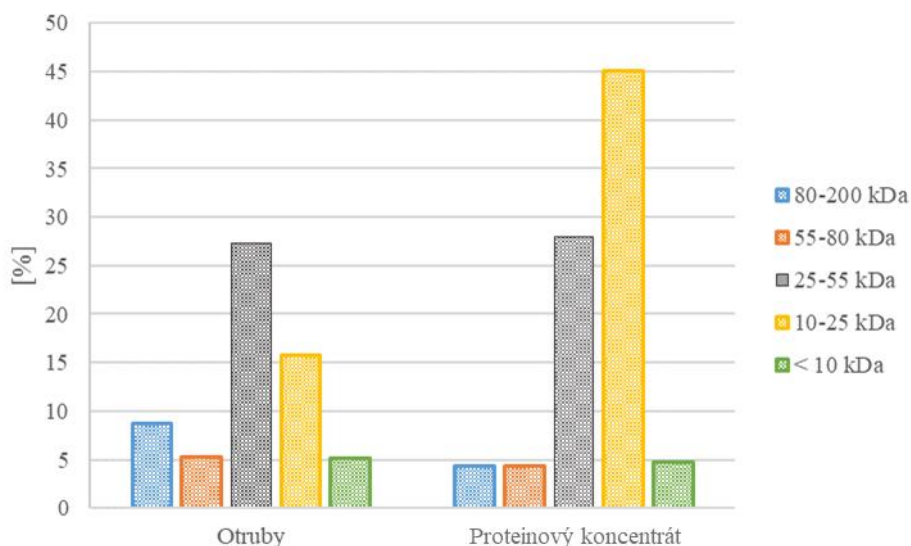
Vliv podmínek izolace na fragmentaci bílkovin

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.



Obr. 22 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. Kvantitativní zastoupení bílkovinných frakcí v otrubách a proteinovém koncentrátu je zobrazeno v grafu na obr. 23.

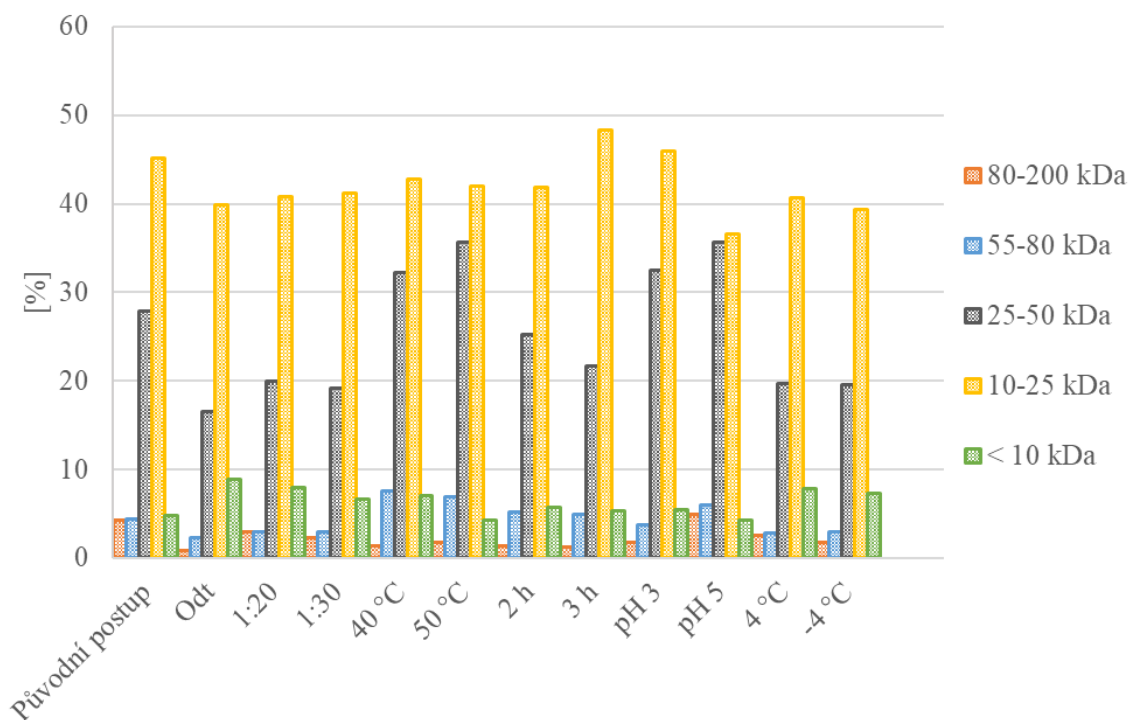


Obr. 23 Zastoupení bílkovinných frakcí v otrubách a proteinovém izolátu

Největší rozdíl v zastoupení bílkovin u pšeničných otrub a proteinovém koncentrátu je u frakcí o molekulové hmotnosti 10-25 kDa. Tato frakce tvoří v proteinovém izolátu až 45 % veškerých bílkovin, kdežto v pšeničných otrubách pouze něco přes 15 %. Důvodem může být

štěpení vysokomolekulárních proteinů (80-200 kDa), kterých je v pšeničných otrubách o přibližně 5 % více, na menší frakce v průběhu jejich izolace. Rozdílné jsou také nejzastoupenější bílkoviny v těchto vzorcích – u pšeničných otrub mají molekulovou velikost okolo 50 kDa, v proteinovém izolátu jsou to bílkoviny s velikostí okolo 17 kDa.

Dále bylo ověřeno, zda má daný typ modifikace základního postupu izolace vliv na zastoupení či štěpení bílkovinných řetězců. Zastoupení jednotlivých frakcí bílkovin ve vzorcích izolátů je zobrazeno v grafu na obr. 24.



Obr. 24 Zastoupení frakcí bílkovin ve vzorcích izolátů

Ve všech vzorcích proteinových koncentrátů uvedených na obrázku 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 [311]. Právě tyto typy proteinů jsou zodpovědné za imunitní reakce spojené s autoimunitním onemocněním – celiakií. Inaktivace a degradace gliadinů v pšeničných materiálech je intenzivně zkoumána [327].

Odtučňování otrub výrazně snížilo zastoupení vysokomolekulárních bílkovin a zejména frakce o hmotnosti 25–50 kDa, kam patří také gliadiny. Monomerní gliadiny jsou považovány za povrchově aktivní nepolární látky [130], je možné je adsorbovat na hydrofobní povrchy [328]. Při odtučňování pšeničných otrub pomocí hexanu byly zřejmě extrahovány lipidy spolu s gliadiny, což se následně projevilo na zastoupení bílkovinných frakcí v získaném izolátu. Zvýšení zastoupení bílkovinné frakce menší než 10 kDa naopak indikuje štěpení některých bílkovinných řetězců v průběhu tohoto postupu izolace.

K snížení zastoupení frakce o hmotnosti 25–50 kDa oproti původnímu postupu izolace proteinů z pšeničných otrub došlo také vlivem zvýšení poměru extrakčního činidla, prodloužením doby extrakce či snížením teploty v průběhu precipitace proteinů. S tím většinou souviselo také zvýšení zastoupení bílkovin menších než 10 kDa. Tyto změny mohly být

způsobeny štěpením bílkovinných řetězců na kratší fragmenty. Zkracování bílkovinných řetězců a vznik nových peptidů v důsledku působení alkalického pH bylo pozorováno například u bílkovin vaječných bílků [329].

Zvýšení zastoupení bílkovinné frakce o hmotnosti 25–50 kDa bylo pozorováno u vzorků izolátů extrahovaných za zvýšené teploty, což naznačuje zvýšení rozpustnosti gliadinů za vyšších teplot [330]. Zvýšená koncentrace bílkovinné frakce o hmotnosti 25–50 kDa v případě izolátu precipitovaném při pH 5 může pak souviset s hodnotou izoelektrického bodu gliadinů, který se pohybuje mezi pH 5-8 [331].

Proteinové materiály extrahované z pšeničných otrub hydroxidem sodným o koncentraci 0,35 M nebylo možné charakterizovat pomocí SDS-PAGE stejnou metodou. Všechny proteinové frakce tohoto vzorku proteinového izolátu byly menší než 6 kDa a na připraveném gelu tak nebyly separovány. Použití vyšší koncentrace hydroxidu sodného pro extrakci proteinu nejen že uvolňuje škrob, ale také výrazně hydrolyzuje a štěpí proteinové řetězce. Krátké bílkovinné řetězce rostlinného původu přitom mohou při použití v potravinářství být příčinou nežádoucích sensorických vjemů, zejména hořké chuti [332].

5.1.3 Charakterizace proteinového materiálu z pšeničných otrub

Proteinový materiál, připravený dle postupu popsaného v kapitole 4.2, byl podrobně analyzován s cílem následně najít aplikační potenciál v potravinářském průmyslu.

Obsah bílkovin a aminokyselinový profil

Celkový obsah bílkovin v proteinovém materiálu získaném izolací bílkovin z pšeničných otrub byl stanoven na $83,0 \pm 1,6$ %. 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). Na trhu se ovšem objevuje jen málo proteinových produktů (izolátů), které mají vyšší zastoupení bílkovin. Většina proteinových izolátů pochází ze sóji nebo ze syrovátky a vykazují v některých případech čistotu přes 90 %. Zároveň jsou na trhu dostupné také proteinové hydrolyzáty, většinou živočišného původu (kolagen). I tyto materiály mohou mít velice vysoký podíl bílkovin. Výhodou může být i velmi dobrá rozpustnost daná krátkými řetězci bílkovin.

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. Oproti živočišným proteinům obsahují RP významně nižší množství methioninu, lysinu a tryptofanu [333]. Nedostatek methioninu v krmivu rostlinného původu určeného pro hospodářská zvířata musí být dokonce často kompenzován fortifikací syntetickým methioninem, aby nedocházelo k omezení růstu zvířat, a tím snížení živočišné produkce (např. mléka, masa nebo ovčí vlny) [334]. Lysin je prekurzorem kyseliny glutamové v rostlinách [335] a je limitující aminokyselinou zejména v cereáliích. Pro dostatečný příjem lysinu je proto doporučována konzumace cereálních a luštěninových proteinů (např. sóji), které jsou na lysin bohaté [336]. Tryptofan v rostlinách slouží jako prekurzor růstových hormonů, v malém množství se tryptofan nachází např. v kukuřici [337]. U živočichů je tryptofan jedním z prekurzorů neurotransmiterů serotoninu a melatoninu nebo vitamínu B3. Jeho dostatečný příjem má tedy velký vliv na psychiku či imunitní systém jedince [338].

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 43.

Tabulka 43 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

Rostlinné proteiny mají oproti živočišným proteinům výrazně nižší zastoupení esenciálních aminokyselin (62–81 %), ale naopak je převyšují v obsahu neesenciálních aminokyselin (111–129 %) [333]. Izolovaný proteinový materiál z pšeničných otrub obsahuje všechny esenciální aminokyseliny, které tvoří přes 28 % proteinů, což vyhovuje požadavkům WHO/FAO/UNU na zastoupení esenciálních aminokyselin [339]. Mezi další vyhovující rostlinné proteiny patří také sojový, hráškový, kukuřičný, bramborový nebo protein z hnědé rýže. Naopak z hlediska obsahu esenciálních aminokyselin jsou nevyhovujícími například proteiny ovesné, pšeničné, konopné, nebo proteiny z řas [161].

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 [340]. 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 [238].

K posouzení nutričních benefitů tohoto proteinového materiálu je ovšem nezbytné vztáhnout zastoupení konkrétní aminokyseliny k jejich doporučeným denním příjmům. Procentuální pokrytí DDP aminokyselin pro 70 kg jedince jednou dávkou (30 g) izolovaného proteinového materiálu z pšeničných otrub je vyjádřeno v tabulce 44.

Tabulka 44 Doporučený denní příjem aminokyselin a jeho pokrytí jednou dávkou (30 g) PKPO [159]

Aminokyselina	DDP [mg/70 kg]	Složení OP [mg/30 g]	[% DDP]
Histidin	700	990	141
Isoleucin	1400	840	60
Leucin	2730	2040	75
Lysin	2100	1200	57
Methionin + cystein	1050	1020	97
Fenylalanin + tyrosin	1750	2340	134
Threonin	1050	990	94
Tryptofan	280	270	96
Valin	1820	1380	76

Dle očekávání byl v proteinovém materiálu z pšeničných otrub limitující aminokyselinou lysin, stejně jako u většiny cereálií [336]. Ovšem i přesto by konzumace jedné dávky (tzn. 30 g) pokryla až 57 % DDP lysinu 70 kg jedince. Některé z aminokyseliny (např. histidin nebo fenylalanin s tyrosinem) jsou v proteinovém materiálu zastoupeny ve vyšších množstvích, konzumace jedné jeho dávky pak přesáhne DDP těchto aminokyselin. V dnešní době nejsou zatím definované maximální tolerovatelné dávky jednotlivých aminokyselin. Každopádně dále probíhají studie zaměřené na vliv příjmu daného množství aminokyseliny na fyziologii člověka [341].

Obsah minoritních složek

Minoritně zastoupené složky PKPO jsou voda, fenolické látky a anorganické složky. Obsah vody je závislý na procesu sušení proteinového koncentráту a ovlivňuje jeho trvanlivost. Tento typ materiálu lze srovnat s klasickou pšeničnou moukou. V České republice je dle vyhlášky č.18/2020 Sb. maximální povolený obsah vody v pšeničných moukách 15 %, poté se mouky nepovažují za stabilní při pokojové teplotě, jsou náchylné na mikrobiální kontaminaci. Zbytkový obsah vody v proteinovém izolátu z pšeničných otrub po lyofilizaci byl $8,04 \pm 0,20$ %, což ukazuje na efektivní způsob dehydratace a lze tak očekávat i relativně dlouhou dobu trvanlivosti proteinového prášku.

Množství popela v PKPO bylo $1,21 \pm 0,02$ %, 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 uhličitánů, fosforečnanů nebo síranů [318, 319, 320].

Rozpustnost minerálních látek se projevila také na prvkovém složení proteinového izolátu z pšeničných otrub. Oproti pšeničným otrubám vykazoval PKPO nižší koncentrace vápníku, draslíku a hořčíku, které se v průběhu izolace rozpustily a od proteinů tak byly separovány. Naopak došlo k výraznému zvýšení obsahu sodíku, zřejmě vlivem použití chloridu sodného pro extrakci proteinů. Proces izolace proteinů z pšeničných otrub nesnížil koncentraci fosforu, naopak došlo k jeho zakoncentrování v izolovaném materiálu pravděpodobně díky jeho vazbě na proteiny. V rostlinách se fosfor nachází zejména ve formě fosfátů, fytátů, nebo fosfolipidů. Fosfátové skupiny se běžně váží na proteiny procesem fosforylace, tvoří tak fosfoproteiny, také kyselina fytová může s proteiny vytvářet komplexy [345]. Prvkové složení proteinového izolátu je uvedeno v tabulce 45.

Tabulka 45 Prvkové složení proteinového izolátu z pšeničných otrub

Obsah [mg/g]		Obsah [mg/g]	
Ca	0,329 ± 0,044	Al	0,0220 ± 0,0010
K	0,457 ± 0,012	Cr	<DL
Mg	0,126 ± 0,002	Cu	0,0320 ± 0,0001
Na	0,290 ± 0,170	Fe	0,0850 ± 0,0020
P	22,207 ± 0,290	Mn	0,0020 ± 0,0001
		Zn	0,0040 ± 0,0001

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 $53,0 \pm 1,2$ $\mu\text{g/g}$. KF je jedním z prekurzorů ligninu. Během procesu přípravy proteinového koncentráту z PO není KF od proteinů zcela separována, její přítomnost může být však pozitivní. Pro své antioxidační účinky je KF velmi ceněnou látkou, používánou v kosmetice nebo ve zdravotnictví [346].

Stravitelnost a PDCAAS skóre

Kromě zastoupení bílkovin a aminokyselinového profilu jsou nutriční vlastnosti proteinového materiálu z pšeničných otrub definované také jeho stravitelností. Zhodnocení stravitelnosti pšeničných otrub a proteinového izolátu z pšeničných otrub bylo provedeno simulací podmínek trávicího traktu, jak je popsáno v kap. 4.3.5.

Stravitelnost a následná vstřebatelnost proteinů je ovlivněna jejich typem, matricí potravy a podmínkami jejího zpracování [347]. Rostlinné proteiny mají obecně nižší stravitelnost než živočišné, a to zejména kvůli antinutričním vlastnostem rostlinných materiálů. Nestravitelná buněčná stěna a specifická struktura rostlinných proteinů může vést k omezení jejich vstřebatelnosti [348].

Stravitelnost proteinů z PO byla za daných podmínek stanovena na $48,4 \pm 0,2$ %, z čehož vyplývá, že minimálně polovina proteinů obsažená v pšeničných otrubách je pro člověka nestravitelná. Tato skutečnost vyplývá ze samotné podstaty lignocelulóзовých materiálů, jejichž struktura je velmi pevná a odolává působení řadě chemických látek. Člověk nedisponuje enzymatickou výbavou, která by mu napomohla lignocelulózu, která má ve výživě většinou funkci vlákniny, trávít [349]. Pokud jsou pak v lignocelulóze pevně inkorporované také proteiny, mohou být tyto proteiny spolu s ní nestravitelné a pro člověka tedy nutričně nevyužitelné v porovnání s proteiny volnými. Při stanovování míry stravitelnosti proteinů různých druhů obilovin in vivo bylo však dosaženo výrazně vyšších hodnot, stravitelnost např. proteinů PO byla in vivo vyšší než 53 % [349].

Izolace proteinového materiálu, a tedy snížení zastoupení antinutričních látek v analyzovaném materiálu zvýšilo celkovou stravitelnost proteinů. In vitro stravitelnost PKPO byla $93,4 \pm 0,2$ %. Míra stravitelnosti úzce souvisí s výtěžností použité metody izolace. Jak bylo řečeno, proteiny inkorporované v lignocelulóze nelze jednoduše z matrice extrahovat. Takto inkorporovaných proteinů je v pšeničných otrubách přibližně 50 % (dle výsledků stravitelnosti pšeničných otrub).

Zvýšení stravitelnosti nejen rostlinných proteinů je předmětem současného výzkumu na celém světě. Kromě aplikace různých fyzikálních činitelů (např. vaření, autoklávování, klíčení nebo fermentace) [348], se často využívá také působení různých enzymů [350]. Například do

krmných směsí s vysokým obsahem nestravitelných látek jsou přidávány exogenní enzymy, které zlepšují složení krmiva a zvýší jeho stravitelnost [351]. Hlavním cílem těchto metod je inaktivace antinutričních faktorů zpracováním a úpravou zdrojů proteinů, čímž dochází ke zvýšení jejich stravitelnosti [153, 322].

Kromě nestravitelných polysacharidů obsahují pšeničné otruby také antinutriční kyselinu fytovou [352]. Kyselina fytová tvoří 50–85 % veškerého fosforu v rostlinách. V pšeničných otrubách se nachází zejména v aleuronové vrstvě a je zastoupena přibližně v 5 % [353]. Byly popsány případy, kdy vazba kyseliny fytové na proteiny vede ke snížení jejich stravitelnosti [354], případně může dojít k inhibici jejich enzymatické funkce (např. štěpení škrobu α -amylázami) [335, 336]. Avšak v případě testování stravitelnosti loupané rýže nebyl negativní účinek kyseliny fytové na stravitelnost proteinů prokázán [357]. Zásadnější je vliv kyseliny fytové na vstřebatelnost řady minerálních látek (např. Fe, Zn a Ca), s nimiž tvoří nerozpustné soli [358].

Na základě stravitelnosti a aminokyselinového profilu bylo vypočteno PDCAAS skóre. Toto skóre definuje nutriční kvalitu obsažených proteinů a je určeno následovně:

$$\text{PDCAAS} = \frac{\text{mg limitující aminokyseliny v 1 g vzorku}}{\text{mg stejné aminokyseliny v 1 g teoretickém proteinu}} \cdot \text{stravitelnost vzorku}$$

Limitující aminokyselinou v PKPO je lysin, který jediný není zastoupen v množství, které pokrývá jeho denní nutriční nároky. PDCAAS skóre proteinového koncentráту z PO má proto hodnotu 0,73. Mezi rostlinnými proteiny jsou z hlediska PDCAAS skóre nejvýznamnější izolované sójové proteiny, jejichž hodnoty se blíží 1 [359]. Mezi obilnými proteiny je lysin obvyklou limitující aminokyselinou, která zásadně snižuje PDCAAS skóre. Například proteiny ječmene mají PDCAAS skóre mezi 0,5–0,76 [115], negativním faktorem je i nižší stravitelnost neizolovaných proteinů. Nízkým PDCAAS skórem však disponuje také pšeničný lepek (PDCAAS = 0,25), a to zejména kvůli nízkému zastoupení limitujícího lysinu [339]. Hodnota PDCAAS může být ovlivněna metodou stanovení stravitelnosti proteinů – běžně se pro výpočet PDCAAS používá hodnota fekální stravitelnosti stanovená v exkrementech myši po konzumaci daného proteinu. V případě této dizertační práce byla stravitelnost stanovena *in vitro* [115].

5.1.4 Transfer technologie izolace proteinů z pšeničných otrub do poloprovozních podmínek¹

Výtěžnost postupu izolace proteinů z pšeničných otrub navrženého v laboratorních podmínkách byla ověřena jeho transferem do poloprovozních podmínek. Byl proveden transfer původně navržené technologie, ovšem byla zde použita jiná zařízení pro oddělování suspenzí. Aplikované postupy měly za cíl maximalizovat jak celkovou výtěžnost, tak výtěžnost izolace proteinů, a tím zvýšit potenciální profitabilitu této technologie. Proto byl už na počátku, i přes nejvyšší hodnotu výtěžnosti, zamítnut transfer postupu izolace za použití enzymů (celuláz), které by navrženou technologii velice prodražovaly.

¹ Ověřená technologie izolace pšeničných otrub podléhá utajení a je majetkem výzkumného partnera Mlýny J. Voženílek s.r.o. V této části jsou proto prezentovány pouze výsledné hodnoty výtěžnosti a čistoty proteinů v izolovaném materiálu z PO. Veškeré výsledky jsou uvedeny v:

POŘÍZKA, J.; DIVIŠ, P.; SLAVÍKOVÁ, Z.; VYMĚTALOVÁ, M.: Ověřená technologie pro produkci proteinových koncentrátů z otrub, 2024.

Celkem byly provedeny 4 varianty transferu technologie izolace z PO do poloprovozních podmínek. Parametry transferu byly nastaveny s ohledem na maximalizaci výtěžnosti izolace, zastoupení proteinů v izolátu, ale také množství zpracovaných otrub nebo délku jednoho cyklu izolace proteinů z PO. Provedené varianty izolace na sebe postupně navazovaly, jejich nastavení bylo přitom modifikováno v závislosti na snaze o zlepšení konkrétního ukazatele.

První varianta (kap. 4.4) zahrnovala přímý transfer izolace proteinů se zvýšeným poměrem otrub ku extrakčnímu činidlu (1:20) a prodlouženou dobou extrakce na 2 h, jelikož tyto modifikace postupu vedly ke zvýšení výtěžnosti. V této variantě byla laboratorně využívaná centrifugace (8000 ref, 15 min, lab. teplota) nahrazena použitím dvou odstředivek, nejprve dekantérové odstředivky Aldec 10 a dále, pro dodatečné přečištění supernatantu od zbytku otrub, diskovou odstředivkou Clara 80.

Celková výtěžnost této testované varianty izolace proteinů z pšeničných otrub byla 8,42 g/100 g (4,21 kg proteinového materiálu z 50 kg pšeničných otrub), což je srovnatelné s výtěžností postupu izolace provedeném v laboratorních podmínkách. Došlo ovšem k významnému snížení zastoupení bílkovin v izolátu na 58,5 % (původně 83 % izolovaných v laboratoři. I přesto lze získaný proteinový materiál označit jako proteinový koncentrát. Snížení obsahu proteinů může být na základě poznatků způsobeno buď hydrolyzou proteinového řetězce a následnou solubilizací vzniklých peptidů při fázi precipitace, nebo nedokonalým odstředěním zbytků otrub po fázi extrakce. Při velkoobjemovém ověřování postupu dané technologie lze také předpokládat vyšší ztráty v průběhu procesu.

Jelikož byl pro extrakci proteinů použit roztok NaOH o koncentraci 0,05 M a pH $11,0 \pm 0,5$ (v průběhu extrakce mírně klesá), lze předpokládat, že nižší zastoupení proteinů v izolovaném materiálu získaného podle varianty 1 nebylo způsobeno hydrolyzou proteinů. Pravděpodobnějším důvodem nižší výtěžnosti proteinů je použití odstředivacích zařízení, jejichž výkon neodpovídá výkonu kapacitně menších, laboratorních odstředivek.

Použití účinných odstředivacích zařízení je zásadní pro získání proteinového materiálu s vysokým zastoupením bílkovin. Při nedokonalém odstředění zbytků otrub po fázi extrakce proteinů (1. a 2. odstředivka v první variantě) dochází ke zvyšování zastoupení polysacharidů, zejména škrobu, ve finálním proteinovém materiálu.

Parametry velkoobjemové izolace proteinů z pšeničných otrub ve **druhé variantě** byly totožné s variantou první, byl však ověřen vliv změny poměru navážky otrub a objemu extrakčního činidla na 1:10 na výtěžnost a zastoupení bílkovin v izolovaném materiálu. V tomto případě byly tedy proteiny ze 100 kg otrub extrahovány 1000 l roztoku NaOH (0,05 M). Kvůli změně tohoto poměru, a tedy zvýšení hustoty suspenze muselo být upraveno nastavení dekantéru, konkrétně snížením otáček bubnu (4795 ot/min) a průtoku suspenze (480 l/h).

Tato varianta izolace proteinů z pšeničných otrub vykazovala v porovnání s první variantou pouze minimální snížení výtěžnosti (8,1 g/100 g) a zastoupení proteinů (58,35 %) v izolovaném materiálu. Díky změně poměru otrub a extrakčního činidla byla tudíž ověřena možnost bezkompromisního zpracování dvojnásobku pšeničných otrub v jednom cyklu izolace proteinů, a tím i získání dvojnásobku produktu. Tato modifikace procesu izolace by měla zásadní vliv na zvýšení ekonomické profitability jednoho cyklu izolace proteinů.

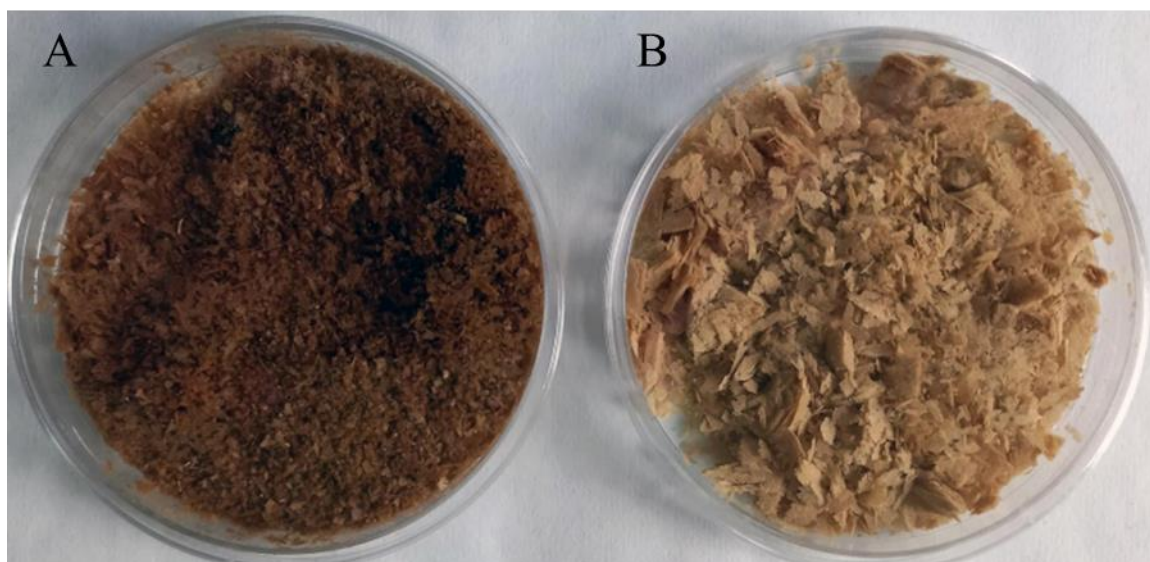
Ve **třetí variantě** velkoobjemového ověřování technologie izolace proteinů z pšeničných otrub se již pokračovalo s poměrem 1:10 (PO : extrakční činidlo), ale byly optimalizovány průtoky suspenze skrz dekantérovou odstředivku Aldec 10 za účelem zvýšení účinnosti odstředění, a tím i zastoupení proteinů v izolovaném materiálu. Úprava průtoku suspenze na

580 l/hodinu při otáčkách bubnu 5000 ot/min byla z testovaných variant vyhodnocena jako neúčinnější. Jelikož se supernatant, získaný odstředěním pevného podílu na odstředivce Aldec 10, jevil jako čistý a s minimálním množstvím balastních látek, byla zároveň v této variantě vyražena druhá fáze odstředování pomocí odstředivky Clara 80. Po fázi precipitace byly proteiny od supernatantu odstředěny za sníženého průtoku – 431 l/hod.

Výtěžnost třetí varianty velkoobjemové izolace proteinu z pšeničných otrub byla v porovnání s první i druhou variantou mírně vyšší – 8,68 g/100 g. Tímto postupem bylo však dosaženo zásadního zvýšení zastoupení proteinů v izolovaném materiálu na 68,39 %. Další neopomenutelnou výhodou této varianty je zkrácení celkového času izolace z původních 42 hodin na 38,7.

V poslední, **čtvrté variantě** bylo ověřeno nahrazení dekantérové odstředivky sedimentačním tankem s filtrační přepážkou. Toto řešení by zásadně snížilo počáteční náklady na provozní zařízení. V této variantě byl zároveň ověřen alternativní způsob dehydratace produktu – sprejové sušení, které bylo použito pro 18 l vlhkého proteinového izolátu. Zbylých 35 l bylo, stejně jako v předchozích variantách, lyofilizováno.

Tato varianta se z hlediska celkové výtěžnosti materiálu, která dosahovala 10 g/100 g, jevila jako nejvýhodnější, avšak dlouhá doba separace extraktu proteinů (6,62 hodiny) pomocí sedimentační nádrže způsobila uvolnění škrobu z pšeničných otrub a jeho štěpení na kratší sacharidy. Díky vysoké porozitě filtrační přepážky pak tyto sacharidy nemohly být od filtrátu účinně odděleny, což se projevilo zásadním snížením zastoupení bílkovin v konečném proteinovém materiálu až na hodnotu přibližně 40 %. Oproti variantám, při kterých byla použita dekantérová odstředivka, byl při zahrnutí procesu sedimentace získán proteinový materiál výrazně světlejší barvy (obr. 25), což zřejmě souvisí právě s vyšším zastoupením škrobů.



Obr. 25 Proteinový izolát získaný separací pomocí dekantéru (A) a sedimentací (B)

Alternativní způsob sušení proteinového materiálu neměl na zastoupení bílkovin téměř žádný vliv. Izolát sušený lyofilizací obsahoval 39,2 % bílkovin, sprejovým sušením byl získán produkt s obsahem 40,3 % bílkovin. Sprejové sušení takového typu materiálu probíhalo bez problémů, konečný obsah vody v proteinovém materiálu tvořil 4 %. Sprejové sušení ovšem způsobilo zvýšení jeho hygroskopicity a lepivosti, což se děje právě u materiálů s vyšším zastoupením sacharidů s nižší molekulovou hmotností nebo organických kyselin [360]. I přesto je v tomto

případě sprejové sušení považováno za levnější a výrazně rychlejší metodu sušení, než je lyofilizace.

5.1.4.1 Shrnutí

Proces izolace proteinů z pšeničných otrub navržený v laboratoři byl tedy ověřen ve velkoobjemovém měřítku celkem ve 4 variantách. Shrnutí výtěžnosti a zastoupení proteinů u jednotlivých variant je uvedeno v tabulce 46.

Tabulka 46 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
	1. varianta	8,42	58,49
Velkoobjemová izolace	2. varianta	8,10	58,35
	3. varianta	8,68	68,39
	4. varianta	10,1	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 %. Ztráty materiálu mohly být způsobeny manipulací prostřednictvím potrubí, usazováním v extrakčních zařízeních 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.

Nejllepší testovanou velkoobjemovou variantou byla varianta třetí, při které byl získán proteinový materiál s 68,4% obsahem bílkovin a jejíž celková výtěžnost byla 8,68 %. 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 získání 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.

Z provedených velkoobjemových testů a získaných poznatků byla navržena technologie, která kombinuje optimální nastavení předchozích variant. Její podmínky jsou uvedeny v tabulce 47. Pro zhodnocení použitelnosti navržené technologie pro izolaci proteinů z pšeničných otrub v praxi je nezbytné ověřit i tuto optimalizovanou variantu.

Tabulka 47 Parametry optimalizované varianty velkoobjemové izolace proteinů z pšeničných otrub

Extrakce		
Extrakční objem (0,05 M NaOH)	[l]	1000
Navážka otrub	[kg]	100
Doba extrakce	[h]	1
Rychlost míchání	[ot/min]	300
1. odstředivka		Aldec 10
Otáčky bubnu	[ot/min]	5000
Otáčky šnekového dopravníku	[ot/min]	3–5
Objemový průtok suroviny	[l/h]	5480
Precipitace		pH 4
Objem konc. H ₂ SO ₄	[ml]	900
Doba precipitace	[min]	30
Rychlost míchání	[ot/min]	100
Teplota	[°C]	25
2. odstředění		Clara 80
Otáčky bubnu	[ot/min]	8000
Doba mezi cykly	[min]	15
Objemový průtok suroviny	[l/h]	431
Sprejové sušení		
Objem vlhkého izolátu	[l]	18
Vstupní teplota vzduchu	[°C]	185
Výstupní teplota vzduchu	[°C]	80
Účinnost odpařování	[kg/h]	18,2
Doba sušení	[h]	1

5.2 Aplikace proteinového koncentráту z pšeničných otrub v potravinářství

Proteinový materiál izolovaný z pšeničných otrub při velkoobjemovém transferu navržené technologie byl dále aplikován v potravinářství za účelem zvýšení nutriční hodnoty potravin, konkrétně jogurtů a pečiva. Vzhledem k chemické povaze a zastoupení bílkovin je v následujících kapitolách izolovaný proteinový materiál z pšeničných otrub označován jako proteinový koncentrát z pšeničných otrub (PKPO).

5.2.1 Vysokoproteinové jogurty²

Jogurt je jedním z celosvětově nejrozšířenějších mléčných výrobků, který je populární jak díky své chuti, a také díky jeho nutričním a zdravotním benefitům. I přesto, vzhledem k tradičně používaným surovinám a definovaným fyzikálně-chemickým vlastnostem jogurtu, neexistuje jednotný postup pro výrobu jeho vysokoproteinových variant. Díky své kompatibilitě s mlékem

² Výsledky této kapitoly byly uveřejněny v publikacích:

Z. Slavíková, P. Diviš, W. Bialas, M. Montowska, M. Adamczykova, a J. Pořízka, „The study of relationship between taste and wheat bran protein isolate fortification during high-protein yogurt manufacturing”, *Journal of Agriculture and Food Research*, roč. 16, s. 101185, čer. 2024, doi: 10.1016/j.jafr.2024.101185

Z. Slavíková, I. Smatana, P. Diviš, J. Smílek, E. Slaninová, a J. Pořízka, „Utilization of wheat bran protein isolate as a fortifier for production of high protein yoghurts”, *Mlékarstvo*, roč. 74, č. 4, 2024.

a mléčnými výrobky je nejčastěji používaným proteinem pro obohacování jogurtu protein syrovátkový. Za účelem diverzifikace aminokyselinového profilu je však možné využít i jiné, často rostlinné zdroje proteinů (např. sójový, hrachový apod.). Tyto proteiny nejenomže mají jiné funkční vlastnosti než protein mléčný, jejich přítomnosti navíc může ovlivňovat tvorbu typické viskoelastické struktury jogurtu, a proto je nutné ověřit vliv množství, ale i typu přidávaného proteinu na funkční i senzorické vlastnosti jogurtu [361].

Příprava a charakterizace vysokoproteinových jogurtů

Dle kapitoly 4.5.1.1 byly připraveny vzorky jogurtů se zvýšeným množstvím proteinu. Jako reference sloužil jogurt bez přídavku proteinů, ale připravený stejným postupem. Pro přípravu všech vzorků bylo použito mléko, jehož výživové údaje jsou uvedeny v tabulce 48.

Tabulka 48 Složení mléka použitého pro přípravu vysokoproteinových jogurtů

Složka	Obsah [g/100 g]
Tuk	3,5
Sacharidy	4,7
Proteiny	3,2
Sušina	12,5

Zvýšeného množství proteinu v jogurtu bylo docíleno fortifikací mléka PKPO před jeho fermentací. Byly vytvořeny vzorky jogurtů s 2 a 5% obsahem PKPO, u kterých byl ověřen vliv přídavku PKPO na kapacitu zadržování vody, reologické vlastnosti jogurtu a životaschopnost jogurtových bakterií. Složení těchto vzorků je uvedeno v tabulce 49. Tuk v těchto jogurtech pocházel pouze z mléka, měl tedy u všech vzorků stejnou hodnotu – 3,5 %.

Tabulka 49 Charakterizace vzorků jogurtů s přídavkem PKPO

	Obsah bílkovin [%]	Obsah sušiny [%]	Kapacita zadržování vody [%]
Reference	3,2	12,5 ± 0,6	24,6 ± 0,3
2% PKPO	4,6	13,8 ± 0,4	26,2 ± 0,3
5% PKPO	6,8	15,5 ± 0,1	28,3 ± 0,1

Kromě nutričních benefitů přispěl přídavek PKPO také ke zvýšení sušiny v jogurtech, což obecně vede ke snížení rizika vzniku synereze jogurtů. Podle Tamime 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.) [362]. Existují však i materiály (např. macha), které i přes zvýšení obsahu sušiny synerezi jogurtu neredukují [363]. Synereze souvisí s kapacitou zadržování vody daným materiálem, podle jejíž hodnoty se snadno odhalují defekty nebo změny v textuře a reologické vlastnosti daného výrobku.

Obohacení jogurtu pomocí PKPO o 2 a 5 % zvýšilo oproti referenci sušinu na 13,8, respektive 15,5 %. U jogurtu s 5% obsahem PKPO tak bylo dosaženo optimálního množství sušiny pro vznik typické jogurtové textury. Zároveň bylo u obou fortifikovaných vzorků jogurtu pozorováno zvýšení KZV v porovnání s referencí o 1,6 a 3,7 %, a tedy snížena synereze jogurtu. Z výsledků také vyplývá, že přídavek PKPO do jogurtu má na KZV podobný vliv jako přídavek sušeného mléka nebo syrovátky [364].

U další série vysokoproteinových jogurtů byla ověřena jejich senzorická jakost dle postupu popsáném v kap. 4.5.1.5. Tyto vzorky měly celkový obsah proteinů 5 a 10 %, jejich forma a

typ se však lišily. Proteiny ve výrobku pocházely jak z použitého mléka, tak z přidaného otrubového proteinu, případně sušeného mléka. Za účelem zlepšení sensorické jakosti výrobků byly připraveny i vzorky s enkapsulovaným PKPO. Charakterizace všech připravených vzorků je uvedena v tabulce 50.

Tabulka 50 Charakterizace vzorků vysokoproteinových jogurtů pro sensorickou analýzu

	Obsah bílkovin [%]	Obsah sušiny [%]	Synereze [ml/100 g]
Reference	3,2	12,5 ± 0,6	31,8 ± 1,6
5% PKPO	5	14,3 ± 0,6	36,9 ± 3,0
10% PKPO	10	19,3 ± 0,6	30,0 ± 3,0
5% MIX1	5	16,1 ± 0,5	32,4 ± 2,9
5% MIX2	5	15,5 ± 0,5	33,1 ± 1,3
10% MIX1	1	26,7 ± 0,3	8,8 ± 0,4
10% MIX2	10	24,2 ± 0,7	9,7 ± 0,9
5% E-PKPO	5	16,0 ± 0,5	35,9 ± 2,9
10% E-PKPO	10	24,9 ± 0,7	22,5 ± 2,2

U vzorků určených pro sensorickou analýzu byla dle kapitoly 4.5.1.2 stanovena sušina a přímo synereze, která je u jogurtů považována za jeden z hlavních sensorických defektů. Synereze syrovátky u referenčního jogurtu byla 31,8 ml/100 g, což je hodnota podobná synerezy jogurtu stanovené dle Erkaya et al. [365]. U vzorků s 5 % bílkovin v jakékoliv formě (5% PKPO, 5% MIX1, 5% MIX2 a 5% E-PKPO) se synereze v porovnání s referencí zvýšila. Některé rostlinné proteiny mohou mít nižší vaznost vody [366], v důsledku čehož se z jogurtů s jejich přidávkem může uvolňovat nadměrné množství vody. To ovšem nebylo při stanovení kapacity zadržování vody u jogurtů obohacených PKPO potvrzeno. Jelikož však byla synereze stanovena až po 7 dnech skladování, důvodem zvýšené synereze tak může být snižující se stabilita viskoelastické struktury jogurtů s přidávkem 5% PKPO v čase.

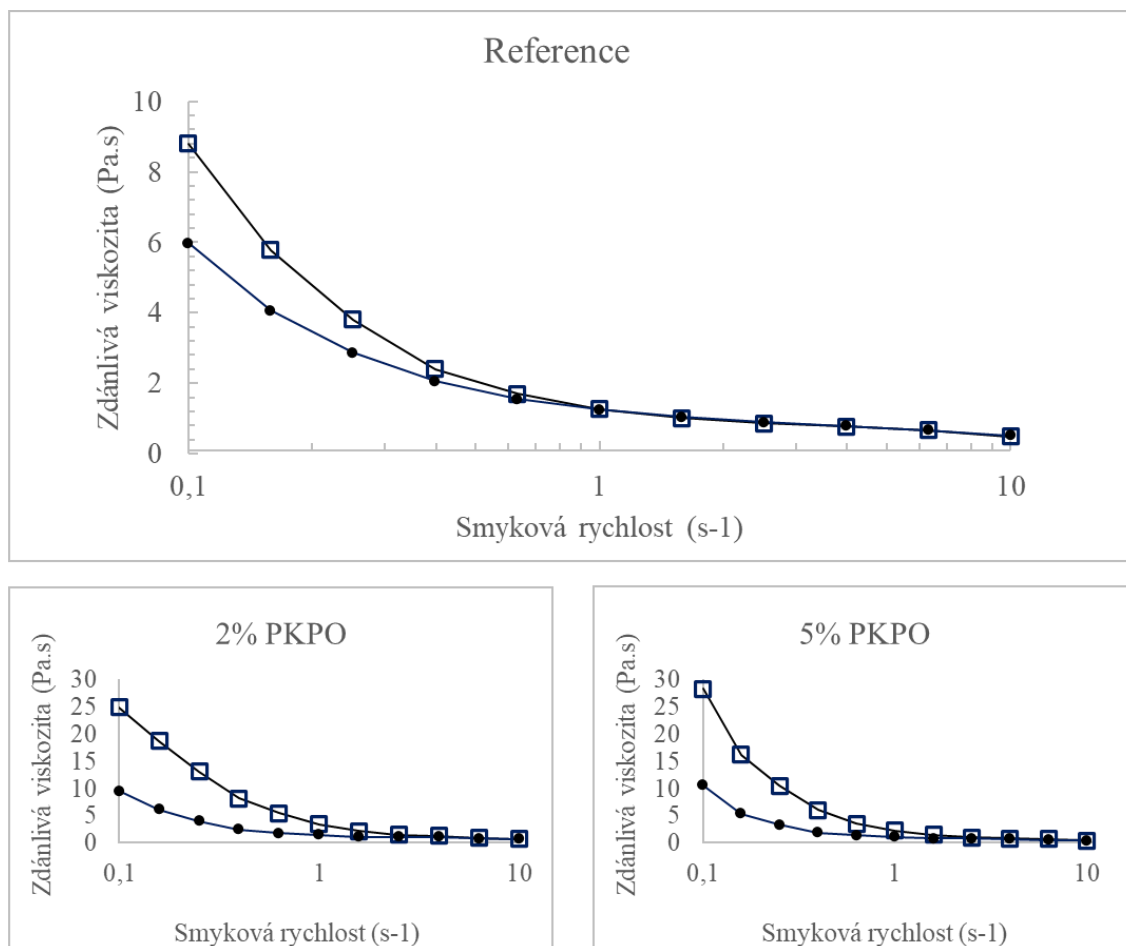
U vzorků jogurtů s 10 % bílkovin se synereze oproti referenci významně snížila. Nejnižší míra synereze (8,8 ml/100 g) byla stanovena u vzorku 10% MIX1, který obsahoval přídavek jak PKPO, tak i sušeného mléka. Tento vzorek disponoval také nejvyšším obsahem sušiny, kromě bílkovin měl oproti ostatním vzorkům i vyšší zastoupení sacharidů, které pocházely ze sušeného mléka. Získané výsledky se shodují s výsledky Delikanlia a Ozcana., kteří také popsali snížení synereze po přidávku syrovátkového proteinu [367].

Vyšší přídavek enkapsulovaného proteinu z otrub do jogurtu také způsobil snížení synereze, ovšem v porovnání s referencí pouze o 10 ml/100 g. Bílkovina se v tomto případě nemohla zapojit do tvorby jogurtové struktury a vázat v něm vodu, tuto roli v těchto vzorcích převzal alginát. Přítomnost alginátu může významně ovlivňovat synerezi jogurtu díky jeho vysoké kapacitě zadržování vody. Tento efekt byl také popsán Free-Manjarrezem et al. u jogurtů s přidávkem syrovátkového proteinového koncentrátu a proteinového hydrolyzátu z fazolí enkapsulovaného pomocí arabské gummy [368].

Mezi obsahem sušiny a mírou synereze byl zjištěn významný negativní korelační koeficient s hodnotou -0,891, který potvrzuje, že s narůstajícím množstvím sušiny u vzorků vysokoproteinových jogurtů klesá objem uvolněné syrovátky. Je také zřejmé, že výroba jogurtů pomocí rostlinných proteinů vysoké čistoty může být nevýhodná a může vést k nadměrnému uvolňování syrovátky. Přídavek rostlinných polysacharidů spolu s proteinem by v tomto případě mohl zlepšit pevnost jogurtové struktury.

Reologické vlastnosti vysokoproteinových jogurtů

Změny v reologických vlastnostech jogurtů s přidavkem PKPO nebyly popsány pouze stanovením kapacity zadržování vody či synerezi vzorků, ale také pomocí reometrie, měřením tokových vlastností referenčního jogurtu bez přidavku PKPO a jogurtů s 2% a 5% PKPO dle metodiky popsané v kap. 4.5.1.4. Byla stanovena a výjádřena závislost zdánlivé viskozity na smykové rychlosti. Výsledky pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v grafech na obr. 26.



Obr. 26 Závislosti zdánlivé viskozity na smykové rychlosti pro různé vzorky jogurtů s přidavkem PKPO, zvyšování smykové rychlosti (□), snižování smykové rychlosti (●)

Dle tvaru křivek získaných vyhodnocením závislosti zdánlivé viskozity na smykové rychlosti se všechny vzorky analyzovaných jogurtů, nezávisle na přidavku PKPO, chovaly jako typicky newtonovská tekutina, konkrétně pseudoplastická, jelikož hodnota zdánlivé viskozity klesala při zvyšování hodnoty smykové rychlosti. Tyto charakteristiky jsou typické jak pro jogurty, tak pro jejich rostlinné alternativy [369].

Všechny vzorky analyzovaných jogurtů také vykazovaly tixotropní chování, jelikož hodnota zdánlivé viskozity při zvyšování smykové rychlosti nedosáhla nulové hodnoty (referenční jogurt – 8,8 Pa·s). Zdánlivá viskozita měřená na konci cyklu (zvyšování a následné snižování smykové rychlosti působící na vzorek) byla ve všech případech výrazně nižší než zdánlivá viskozita na počátku měření.

K nalezení dalších souvislostí mezi přidavkem PKPO a tokovými vlastnostmi jogurtů byly vzorky porovnány z hlediska reologických parametrů, jako je mez kluzu, počáteční a konečná

viskozity a schopnost regenerace struktury. Mez kluzu byla pro dané vzorky jogurtu vyjádřena pomocí reologického modelu Herschel–Bulkley dle rovnice:

$$\tau = \tau_0 + K \cdot \dot{\gamma}^n ,$$

kde τ je smykové napětí, τ_0 je stanovovaná mez kluzu, K je konzistenční parametr a n je index toku. Počáteční viskozita je viskozita jogurtu před aplikací smykové rychlosti, konečná viskozita je hodnota při aplikaci maximální hodnoty smykové rychlosti (10 s^{-1}).

Schopnost regenerace byla vyjádřena jako poměr počáteční viskozity a viskozity na konci cyklu (snížení a opětovné zvýšení smykové rychlosti). Konkrétní hodnoty reologických parametrů pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v tabulce 51.

Tabulka 51 Reologické parametry vzorků jogurtů

	Mez toku [Pa]	Počáteční viskozita [Pa·s]	Konečná viskozita [Pa·s]	Regenerace [%]
Reference	0,94 ± 0,07	8,8 ± 0,4	0,50 ± 0,02	67,9
2% PKPO	2,83 ± 0,39	24,8 ± 1,2	0,82 ± 0,03	38,4
5% PKPO	2,64 ± 0,59	28,3 ± 1,4	0,53 ± 0,03	37,5

Mez toku jogurtu s 2% přídavkem PKPO se oproti referenci výrazně zvýšila (2,83 Pa), při vyšším přídavku PKPO se její hodnota téměř nemění, spíše se mírně snižuje. Výhodou vyšší meze toku je vyšší kinetická stabilita, a tím snížení rizika separace fází – synereze.

Hodnoty **počáteční** a **konečné viskozity** jogurtů s přídavkem PKPO se také oproti referenci zvýšily, což potvrzuje zvýšení kinetické stability těchto jogurtů. Oproti vzorku s 2% přídavkem PKPO byla ovšem struktura vzorku 5% PKPO méně stabilní, měla nižší viskozitu po aplikaci smykové rychlosti, a potvrzuje tak trend stanovený u meze toku. Podobně byla nižší viskozita pozorována u vzorku rostlinného jogurtu s 5% přídavkem konopného proteinu v porovnání s jogurtem s pouze 2% přídavkem [369]. Viskozita jogurtů se oproti referenci zvyšuje i při přidávání syrovátkových proteinových koncentrátů a izolátů [340, 341, 342]. Reologické vlastnosti jogurtů se dále odrážejí v jejich sensorických vlastnostech, závislost viskozity na smykové rychlosti lze sensoricky popsat jako žvýkatelnost (množství práce potřebné k rozmělnění výrobku tak, aby byl vhodný pro polknutí) [373]. Jogurty obohacené o PKPO naopak oproti referenci disponovaly pouze nízkou mírou **regenerace**. Struktura referenčního jogurtu byla vzhledem k tokovým vlastnostem obnovena z téměř 68 %, regenerace jogurtů s PKPO byla okolo 38 %.

S ohledem na tokové parametry vysokoproteinových jogurtu 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.

Analýza celkového počtu mikroorganismů

Jedním z benefitů konzumace jogurtů je jejich pozitivní vliv na zdraví střev díky přítomným bakteriím *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*. Tyto bakterie se například podílejí na tvorbě střevní sliznice, stimulují imunitní systém, redukují intoleranci laktózy a oxidaci lipidů [344, 345]. Důležité jsou také pro samotnou produkci jogurtů, růst a celkový počet těchto bakterií má vliv na jeho kvalitu.

Přídavek otrubového proteinu do jogurtu před fermentací může růst MO ovlivnit. Z tohoto důvodu byl pomocí cytometrie stanoven celkový počet buněk a jejich životaschopnost ve 2% a 5% PKPO jogurtu, výsledky byly porovnány s referencí a jsou uvedeny v tabulce 52.

Tabulka 52 Počet buněk ve vzorcích jogurtu

	Celkový počet buněk [ml^{-1}]	Životaschopné buňky [%]
Reference	$3,76 \cdot 10^9$	91,5
2% PKPO	$2,95 \cdot 10^9$	92,3
5% PKPO	$1,53 \cdot 10^9$	90,4

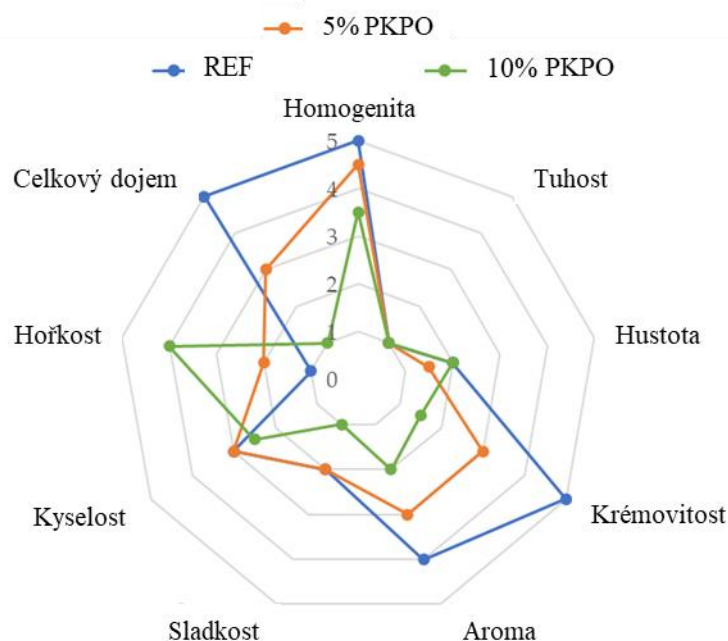
Výsledky cytometrické analýzy neprokázaly, že by měl přídavek PKPO signifikantní vliv na celkový počet nebo životaschopnost jogurtových bakterií v porovnání s referencí. Všechny vzorky obsahovaly více než 10^9 životaschopných buněk. U vzorků s přídavkem PKPO byl zaznamenán pouze malý pokles počtu buněk, což mohlo být způsobeno přítomností fenolických kyselin extrahovaných spolu s proteinem z pšeničných otrub. Je prokázáno, že fenolické kyseliny inhibují růst gram-pozitivních kmenů laktobacilů [376].

U jogurtu obohacených syrovátkovým proteinem bylo naopak prokázáno podpoření růstu jogurtových bakterií během dlouhodobého skladování, a to dokonce i při průchodu gastrointestinálním traktem [377]. Navíc bylo potvrzeno, že syrovátkový protein zpomaluje poškození proteinů probiotických buněk, zlepšuje regeneraci proteinů a zmírňuje účinky kyselého prostředí [347, 348].

Senzorická analýza vysokoproteinových jogurtů

Přídavek rostlinných proteinů do mléčných výrobků není příliš obvyklý kvůli jejich problematické kompatibilitě. Přirozeně jsou tak první volbou pro obohacení mléčných výrobků materiály stejného původu (mléčné proteiny, sušené mléko nebo syrovátka), avšak vzhledem ke zvýšení nejen aminokyselinové diverzity produktu se přídavky rostlinných surovin jeví jako nutričně výhodné [380]. Často vznikající senzorické nedostatky je poté však nutné vhodnou úpravou suroviny nebo technologie eliminovat.

Připravené vysokoproteinové jogurty byly podrobeny senzorické analýze, která probíhala dle postupu uvedeném v kapitole 4.5.1.5. V první fázi bylo do jogurtu před fermentací přidáno 5 a 10 % PKPO, senzorické vlastnosti těchto vzorků byly porovnány s referenčním jogurtem bez přídavku proteinu. Výsledky senzorické analýzy jsou zobrazeny v grafu na obr. 27.



Obr. 27 Senzorické deskriptory vzorků jogurtu s 5 a 10% přídavkem PKPO

Pomocí senzorické analýzy byla u jogurtů obohacených PKPO odhalena řada senzorických defektů. Fyzikální charakteristiky jogurtů, jako je **tuhost** nebo **hustota**, nebyly dle hodnotitelů přídavkem PKPO ovlivněny. Všechny vzorky, včetně referenčního jogurtu, tak byly hodnoceny jako lehce míchatelné, řídké jogurty. Ostatní senzorické deskriptory se přídavkem PKPO od reference lišily. Se zvyšujícím se obsahem PKPO v jogurtu se mírně snižovalo skóre **homogenity** vzorku, což potvrdilo vyhodnocení výsledků pomocí ANOVA, které ukázalo rozdíly mezi vzorky na hladině významnosti $P=0,0122$. Homogenita jogurtu s 10 % PKPO byla hodnocena jako spíše nehomogenní, s malými hrudkami (skóre 3,5). Skóre homogenity jogurtu s 5% PKPO bylo mírně vyšší, ale stále horší než hodnocení reference.

Senzorické hodnocení **krémovitosti** jogurtu je úzce spojeno s vnímáním homogenity. Referenční jogurt byl hodnocen jako krémovitý, bez hrudek (skóre 5). Přídavek PKPO do jogurtu způsobil zásadní pokles krémovitosti, vzorek 10% PKPO byl hodnocen jako písčité. P hodnota definující rozdílnost vzorků byla pro parametr krémovitosti 0,0001. Písčitost je jedním z charakteristických rysů rostlinných proteinů, je spojena s jejich nízkou rozpustností. Tu lze v daném prostředí ovlivnit úpravou skladovacích podmínek [381] nebo extrakční metody – extrakcí pouze určité, rozpustné frakce bílkovin [181]. Vznik písčitého vjemu v potravinách zásadně omezuje aplikovatelnost rostlinných proteinů. Detekce této vady v jogurtech obohacených PKPO vyžaduje optimalizaci receptury nebo vstupního materiálu za účelem eliminace nebo redukce jejich písčitosti.

Také **aroma** jogurtu bylo ovlivněno přítomností PKPO, jeho příjemnost se s jeho zvyšujícím se obsahem klesala. Statisticky signifikantní rozdíl oproti referenci nebyl stanoven u vzorku jogurtu s 5 % PKPO, u 10% PKPO už bylo evidováno statisticky významné zhoršení aroma. Většina rostlinných materiálů disponuje aroma pocházejícím z jejich surového materiálu. OP má vzhledem ke svému původu specifické obilné aroma, které zřejmě po fortifikaci jogurtů přetrvává. I přesto, že obilné aroma je méně intenzivní v porovnání s jinými rostlinnými proteinovými izoláty [382], hodnotiteli bylo vnímáno negativně – nepřírozně pro jogurt. Toto aroma mohlo být navíc v jogurtech znásobeno díky přítomnosti tuků.

Preferovaná chuť bílého jogurtu se může mezi jednotlivci lišit, ovšem obecně je přijímána vývážená sladkost a kyselost jogurtu. Tyto chuťové standardy byly dodrženy také v postupu přípravy referenčního jogurtu, hodnota sladkosti byla mírně nižší (skóre 2) než je hodnota preferovaná. Přídavkem PKPO se změnilo také chuťové vlastnosti jogurtů. Nejvýznamnější změny byly zaznamenány v deskriptoru **hořkosti** ($P=0,0004$), vzorek 5% PKPO byl hodnocen jako středně intenzivně hořký, 10% OP jako intenzivně hořký. **Kyselost** obohacených jogurtů byla téměř identická s referencí, vjem **sladkosti** byl částečně maskován hořkostí u vzorku 10% PKPO a hodnocen nejnižším možným skóre 1 – neznatelně sladké. Rostlinné proteinové materiály velmi často poskytují hořký či svýravý vjem. Sloučeniny zodpovědné za tato sensorická negativa se mohou mezi proteiny různého původu lišit [321]. Obecně je hořkost způsobována přítomností peptidů s nižší molekulovou hmotností [383] nebo fenolických látek [384].

Vyhodnocení deskriptoru celkového dojmu bylo provedeno pomocí Spearmanova korelačního testu s ostatními sensorickými deskriptory. Hodnoty jednotlivých korelačních koeficientů jsou uvedeny v tabulce 53.

Tabulka 53 Korelační koeficienty (r) mezi sensorickými deskriptory a celkovým dojmem u jogurtů obohacených PKPO

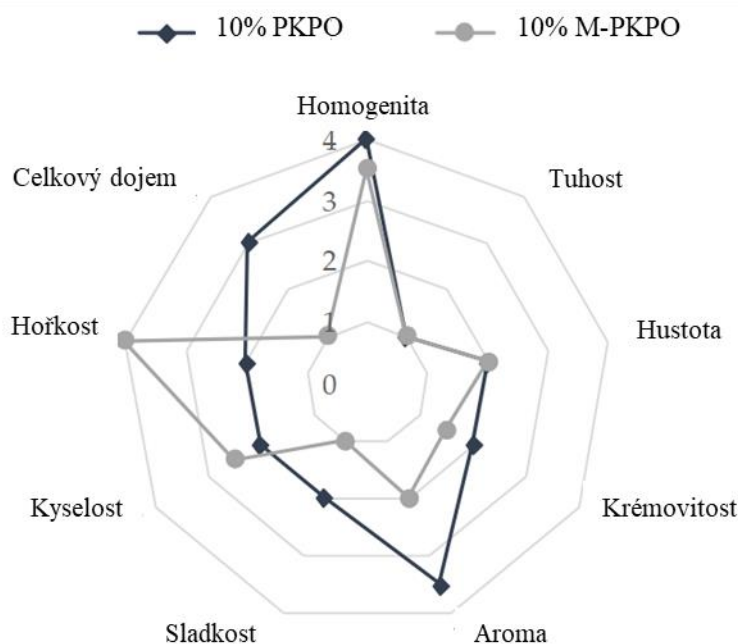
	Homogenita	Tuhost	Hustota	Krémovitost	
Celkový dojem	0,4905	0,0734	0,1054	0,7489	
	Aroma	Sladkost	Kyselost	Hořkost	Míra fortifikace
Celkový dojem	0,5789	0,4719	0,2366	-0,7933	-0,8294

Dle výsledků korelační analýzy byl celkový dojem vzorků jogurtů signifikantně ovlivněn 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 obohacených PKPO bylo dle výsledků sensorické analýzy nezbytné odstranit, nebo alespoň snížit intezitu vzniklých sensorických vad. Proto byly v další fázi vývoje provedeny úpravy vstupního materiálu (PKPO) či receptury. Snížení velikosti částic PKPO mletím, míchání PKPO s jiným materiálem mléčného původu a enkapsulace PKPO měly za cíl zlepšení krémovitosti, maskování obilného aroma a snížení hořkosti obohacených jogurtů.

5.2.1.1 Mletí otrubového proteinu

Záměrem mletí PKPO dle postupu uvedeném v kap. 4.5.1.1 bylo snížení písčitosti jogurtů obohacených právě tímto proteinem. Přídavek proteinového prášku s menší velikostí částic do jogurtu tak neměl zásadně snižovat skóre sensorického deskriptoru krémovitosti, skóre mělo být výrazně vyšší než pro jogurt s nemletým PKPO. Medián velikostí částic PKPO byl pomocí jeho mletí kulovým mlýnem snížen z původních 94,6 μm na 38,3 μm . Vliv přídavku mletého PKPO do jogurtů na sensorickou analýzu byl proveden porovnáním dvou vzorků – jogurtů s 10% přídavkem mletého (10% M-PKPO) a nemletého OP (10% PKPO). Výsledky jsou zobrazeny v grafu na obr. 28.



Obr. 28 Vyhodnocení vlivu mletí PKPO na sensorické deskriptory jogurtů s 10% přídatkem

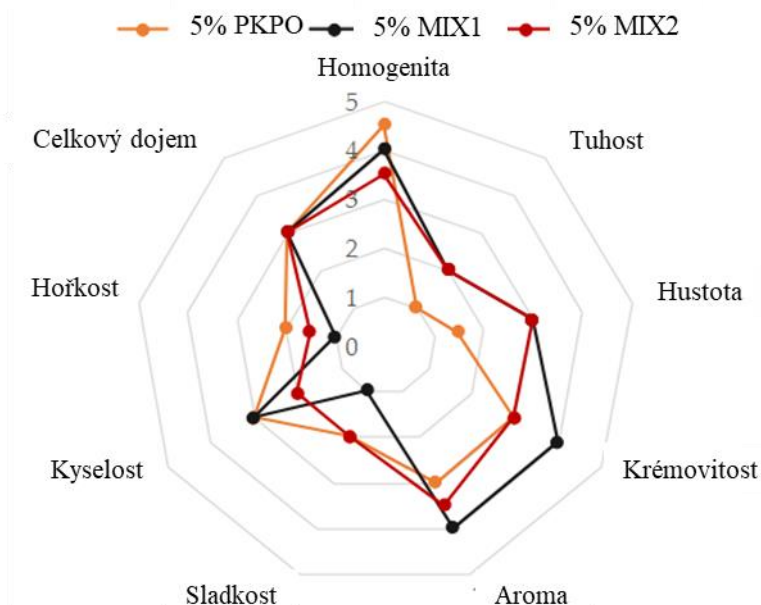
Snížením velikosti částic pod 40 μm nebylo dosaženo požadovaného snížení písčitosti jogurtů u vzorků s 10% přídatkem OP. Texturní sensorické deskriptory zůstaly téměř identické u vzorku s mletým a nemletým PKPO. Mletím PKPO se ale naopak zhoršilo aroma, které tak bylo hodnoceno hůř, než vzorek jogurtu s nemletým PKPO. Míra hořkosti tohoto vzorku dle hodnotitelů vzrostla v porovnání s jogurtem obsahujícím nemletý protein. Zvýšená hořkost vzorku pak mohla souviset také s maskováním sladkosti a následným udělením nižšího skóre jejímu deskriptoru.

Jak již bylo řečeno, písčitost je sensorická vada běžná u všech proteinových materiálů. I přesto, že bylo v řadě studií mletím proteinových prášků dosaženo snížení písčitosti cílové potraviny [356, 357], v případě jogurtů fortifikovaných PKPO tento trend nebyl potvrzen. Naopak mletí PKPO vedlo k významnému zhoršení jiných sensorických vlastností – hořkosti a sladkosti, a tak i celkového dojmu. Pro zachování krémovitosti jogurtu obohaceného PKPO se tak musí zvolit jiné strategie, například přídatek proteinů v alternativní formě, jako jsou proteinové kuličky.

5.2.1.2 Míchání otrubového proteinu

Fortifikace PKPO v kombinaci se sušeným mlékem byla další z variant použitých za účelem zlepšení sensorických vlastností vysokoproteinových jogurtů. U těchto vzorků byla část přídatku PKPO nahrazena sušeným mlékem tak, aby bylo dodrženo celkové 5, respektive 10% zastoupení proteinů v jogurtu. Míchání PKPO a sušeného mléka bylo provedeno v poměru 1:2 (vzorky MIX1) a 1:1 (vzorky MIX2). Kromě proteinů byly vzorky s přídatkem sušeného mléka obohaceny také o jeho další komponenty, jako je tuk nebo cukry, které mohly ovlivnit sensorické atributy vzorků.

Sensorická analýza jogurtů s přídatkem sušeného mléka byla provedena zvlášť pro vzorky s 5 % a s 10 % proteinů, aby byly odhaleny limity tohoto způsobu zlepšení jejich kvality. Jako reference byl použit jogurt s fortifikovaný samotným PKPO. Výsledky jsou zobrazeny v grafech na obr. 29, respektive obr. 30.

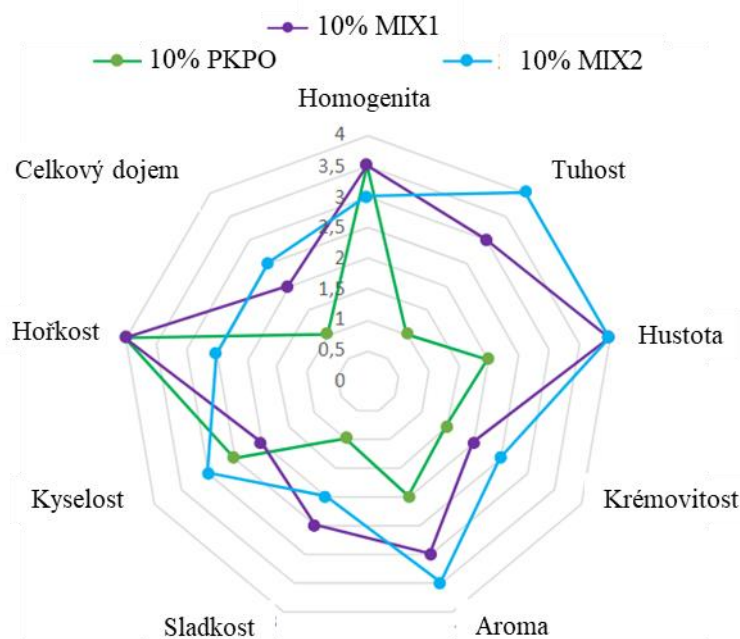


Obr. 29 Vyhodnocení vlivu míchání PKPO se sušeným mlékem u vzorků jogurtu s 5% přídavkem proteinu na sensorické deskriptory

Skóre jednotlivých deskriptorů se u vzorků s 5 a 10% obsahem proteinů lišila, ale jen málo z nich bylo pomocí vícenásobného srovnávacího testu vyhodnoceno jako statisticky rozdílných. U jogurtů s 5 % proteinů nebyly v chuti pozorovány signifikantní rozdíly, ovšem vzorky se sušeným mlékem měly dle hodnotitelů vyšší hustotu ($P = 0,0025$) a krémovitost ($P = 0,0486$). Přídavek PKPO a sušeného mléka do jogurtů tak vedl k tvorbě tužší a více kompaktní struktury. Pozitivní vliv na texturní vlastnosti byl popsán také v práci L. G. Lima Nascimento et al. [387] při použití kombinace mléčných a rostlinných proteinů pro stabilizování emulzí. Mléčné proteiny, zejména kaseiny, jsou navíc s kaseinovými micelami vznikajícími při zrání jogurtu přirozeně lépe kompatibilní. Rostlinné proteiny mají na druhou stranu odlišné vlastnosti, jako například nízkou rozpustnost a nekompatibilitu, které mohou být pro tvorbu kvalitních vysokoproteinových jogurtů omezující. Ve vodném prostředí však bylo pozorováno zvýšení rozpustnosti směsí mléčných a rostlinných proteinů [388].

Aroma jogurtů obsahujících sušené mléko v porovnání s jogurtem pouze s PKPO bylo hodnoceno rovněž jako více příjemné. Naopak byla u těchto vzorků pozorována snížená homogenita ($P = 0,0339$), což mohlo být způsobeno nedostatečnou hydratací a rozpuštěním sušeného mléka.

Rozdíly stanovené v sensorických deskriptorech však neměly zásadní vliv na celkový dojem ze vzorku. Je tedy evidentní, že pro vzorky s nižším obsahem proteinů není kombinování mléčných a rostlinných proteinů nezbytným nástrojem pro zlepšení sensorických ukazatelů jogurtů, které jsou pro hodnotitele relevantní.



Obr. 30 Vyhodnocení vlivu míchání PKPO se sušeným mlékem u vzorků jogurtu s 10% přídatkem proteinu na sensorické deskriptory

Přídavek směsi PKPO a sušeného mléka do jogurtů za účelem zvýšení koncentrace proteinů na 10 % se na skóre sensorických deskriptorů projevilo významněji než u jogurtů s 5% obsahem proteinů. Oproti jogurtu s přídatkem pouze PKPO byly pozorovány změny jak v textuře, tak v aroma a chuťových vlastnostech vzorků.

Homogenita byla u všech hodnocených vzorků vnímána téměř identicky, ale u dalších texturních vlastností, jako je tuhost nebo hustota, byly stanoveny signifikantní rozdíly mezi vzorky, a to na hladině významnosti $\alpha = 0,0001$, respektive $0,00001$. Jogurty obsahující sušené mléko byly dle hodnotitelů tužší a hustší. Tento trend byl pozorován i u jogurtů s 5% obsahem proteinů. Je to důsledek jak kompatibility přidávaných mléčných proteinů s jogurtovou strukturou, tak zvýšení sušiny jogurtů. Zvýšení viskozity bylo pozorováno také u jogurtů s přídatkem odtučněného sušeného mléka [389]. U přídatku samotných syrovátkových proteinů bylo ovšem pozorováno snížení tuhosti a hustoty [389]. To potvrzuje i vyšší skóre tuhosti u vzorku 10% MIX2, tedy vzorku s vyšším obsahem sušeného mléka.

Krémovitost byla také u těchto vzorků signifikantně ovlivněna přídatkem sušeného mléka ($P = 0,0444$), což bylo prokázáno také při přídatku 1–2 % syrovátkového proteinového koncentrátu do jogurtu [389] nebo odtučněného sušeného mléka [389]. I přes evidentní rozdíly v mediánech skóre udělených pro deskriptory aroma, sladkosti a kyselosti nebyly výsledky vyhodnoceny jako statisticky signifikantní. Pouze vjem hořkosti vykazoval mezi jednotlivými vzorky jogurtu statisticky významné rozdíly ($P = 0,0444$). Snížení hořkosti bylo zaznamenáno pouze u vzorku MIX2, tedy vzorku s vyšším přídatkem sušeného mléka. Ve vzorcích 10% PKPO a 10% MIX1 byla hořkost tak intenzivní, že měla zásadní vliv na skóre celkového dojmu ($r = -0,6966$). Míra fortifikace vzorků pomocí PKPO u vzorků s přídatkem směsi PKPO a sušeného mléka pak také silně korelovala s celkovým dojmem ($-0,5019$), ovšem ne tak signifikantně jako u jogurtů s přídatkem pouze samotného PKPO ($-0,8294$).

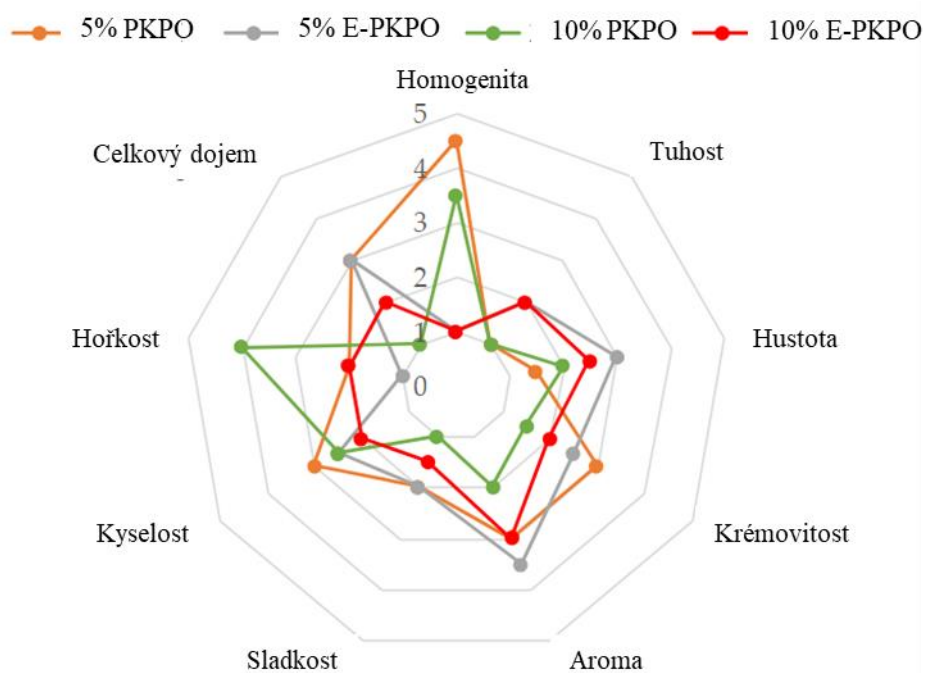
Z výsledků sensorické analýzy jogurtů vyplývá, že náhrada PKPO sušeným mlékem ve vysokoproteinových jogurtech pozitivně ovlivňuje jejich sensorické vnímání. Negativem této náhrady je ovšem snížení diverzity aminokyselin ve výrobku. Mléčné proteiny jsou přirozeně

vzhledem ke svým fyzikálním vlastnostem nejvhodnější pro zvýšení obsahu oprateinů v jogurtů se současným zachováním jeho funkčních a sensorických vlastností. Přídavek rostlinných proteinů do jogurtů v kombinaci s mléčnými proteiny se pro sensorickou kvalitu výrobku jeví jako vhodný postup pro maskování nedostatků vzniklých jejich přítomností. Je prokázáno, že složky mléka dokáží efektivně maskovat aroma a hořkost [390] a zlepšovat texturní vlastnosti jogurtu.

5.2.1.3 Enkapsulace otrubového proteinu

Enkapsulace PKPO alginátem byla provedena dle kap. 4.5.1 s cílem snížení písčitosti a hořkosti a zlepšení aroma jím fortifikovaných jogurtů. Zhang et al. prokázal, že alginát je materiálem vhodným pro enkapsulaci a zároveň uvolňování proteinů v trávicím traktu člověka [391]. Uvolnění proteinů z alginátu nastává v tenkém střevě v prostředí, které má slabě kyselé pH okolo 6,3. Tato hodnota je téměř ideální pro kompletní uvolnění proteinu z alginátových částic.

Také přídavek enkapsulovaného PKPO do jogurtu měl signifikantní vliv na některé jeho sensorické deskriptory. V rámci sensorické analýzy mezi sebou byly porovnávány vzorky jogurtu s enkapsulovaným i neenkapsulovaným PKPO s celkovým 5 a 10% obsahem proteinů. Výsledky jsou zobrazeny v grafu na obr. 31.



Obr. 31 Vyhodnocení vlivu enkapsulace PKPO na sensorické deskriptory jogurtů

Velikost enkapsulovaných alginátových částic s PKPO použitých pro fortifikaci jogurtů byla v rozmezí od 0,25 do 0,63 mm. Jejich přídavek ovlivnil zejména vnímání homogenity ($P = 0,0001$), jogurty s enkapsulovaným proteinem byly popisovány jako spíše nehomogenní s viditelnými velkými částicemi. Přítomnost velkých částic v jogurtu může na spotřebitele působit jako nežádoucí [392]. Rozdíly mezi dalšími texturními vlastnostmi (tuhost, hustota) u jednotlivých vzorků jogurtů nebyly vyhodnoceny jako statisticky významné.

Výhodou přídavku enkapsulovaných proteinových částic je prevence změny barvy a maskování obilného aroma PKPO. Aroma jogurtu s enkapsulovaným PKPO (5% E-PKPO a

10% E-PKPO) bylo hodnotiteli v rámci sensorické analýzy popisováno již jako přijatelné, přičemž aroma vzorku s 10% PKPO sejevilo jako méně příjemné a bylo jedním z deskriptorů ovlivňující celkový dojem.

U vnímání kyselosti jednotlivých vzorků hodnocených jogurtů nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly, ovšem přidavkem enkapsulovaného PKPO byly vyhodnoceny signifikantní změny ve sladkosti ($P = 0,0379$) a hořkosti ($P = 0,0122$). Enkapsulace PKPO snížila vjem hořkosti v jogurtech v porovnání se vzorek 10% OP, a proto byla u těchto vzorků také intenzivněji vnímána chuť sladká. Ve vzorku jogurtu 5% E-PKPO byla hořká chuť enkapsulací proteinu téměř úplně eliminována (skóre 4), hořkost 10% E-PKPO byla srovnatelná s 5% PKPO.

Celkový dojem byl ovlivněn zejména hořkostí, sladkostí vnímáním krémovitosti jogurtů (korelační koeficienty $-0,6471$, $0,6113$ a $0,6253$). Dle výsledků sensorické analýzy se vzorek 10% PKPO pro hodnotitele jevil jako nepříjemný v porovnání s jogurty s enkapsulovaným proteinem. Skóre celkového dojmu vzorku 10% E-PKPO bylo vyšší, ovšem stále nebyl hodnocen jako dostatečně dobrý pro spotřebitele. Vzorkům s 5% obsahem proteinů pak bylo uděleno stejné skóre celkového dojmu.

Sérií sensorických analýz jogurtů obohacených PKPO bylo odhaleno, že na jednotlivé deskriptory a celkový dojem má zásadní vliv forma přidávaného proteinu. Přídavek neupraveného PKPO do jogurtu se projevil na negativním hodnocení krémovitosti, hořkosti a aroma. 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 sensorické 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 vlastnosti 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. Přídavek enkapsulovaných částic sice zhoršil vnímání homogenity jogurtu, ale ostatní texturní vlastnosti ovlivněny nebyly.

5.2.2 Vysokoproteinové pečivo³

Mezi nejpopulárnější vysokoproteinové potraviny aktualně jednoznačně patří také vysokoproteinové pečivo. Fortifikace pekařských směsí proteiny ovšem může způsobovat změny jak v technologickém procesu výroby, tak ve vlastnostech vysokoproteinových produktů. Proces výroby ovlivňuje jak typ proteinu a jeho vlastnosti, tak i míra fortifikace.

Proteinový koncentrát z pšeničných otrub získaný navrženým postupem izolace byl použit pro výrobu vysokoproteinových směsí a následně také vysokoproteinového pečiva. Byly stanoveny farinografické a extenzografické vlastnosti vzniklých těst, vliv přídavku proteinového izolátu z pšeničných otrub na chuť pečiva byla ověřena sensorickou analýzou. Jako reference sloužily směsi a pečivo nefortifikované a fortifikované syrovátkovým proteinem (Vilgain Aktin, Česká republika).

³ Výsledky této kapitoly byly uveřejněny v publikaci:

Pořízka, J.; Slavíková, Z.; Bidmonová, K.; Vymětalová, M.; Diviš, P. Physicochemical and Sensory Properties of Bread Fortified with Wheat Bran and Whey Protein Isolates. *Foods*, 2023, roč. 12, č. 13, ISSN: 2304-8158.

5.2.2.1 Vysokoproteinové pekařské směsi

Pro zhodnocení reologických a senzorických vlastností byly vytvořeny směsi mouky typu T530 (hladká) s přídavkem 5, 10 a 15 % daného proteinového materiálu. Proteinový materiál izolovaný z pšeničných otrub použitý pro tento experiment obsahovat 67,6 % bílkovin, komerční syrovátkový protein 76,9 %. Vzniklé směsi s moukou se pak následně lišily jak v obsahu bílkovin a vody, tak v obsahu mokrého lepku a v sedimentačním objemu. Všechny tyto parametry, které byly stanoveny dle kap. 4.5.2.1, jsou pro jednotlivé vysokoproteinové směsi uvedeny v tabulce 54.

Tabulka 54 Charakterizace vysokoproteinových směsí

	Obsah bílkovin [%]	Obsah vody [%]	Obsah mokrého lepku [%]	Sedimentační index [ml]
T530	13,8	10,2 ± 0,6	38,6	21
5% PKPO	16,5	9,8	33,5	25
10% PKPO	19,2	9,4	31,2	28
15% PKPO	21,9	9,1	28,3	42
5% SP	16,9	10	33,1	23
10% SP	20,1	9,8	30,5	20
15% SP	23,3	9,7	19,6	17

Fortifikace pomocí proteinů vedla k přípravě proteinových směsí s obsahem bílkovin až přes 20 % (vzorky 15% OP a 15% SP). Jelikož se však jednalo o obohacení pomocí materiálu nepocházejícího z pšeničného endospermu, byl u těchto směsí zaznamenán postupný pokles v obsahu mokrého lepku. Lepek, který je tvořen ve vodě nerozpustnými bílkovinami (gliadiny a gluteliny) po namočení bobtná a tvoří plasticko-elastickou hmotu. Této vlastnosti lepku se v pekárenském průmyslu hojně využívá, zejména ve výrobě kynutých produktů.

Sedimentační index (SI) je pak ukazatelem retenční kapacity rozpouštědla (kyselina mléčná + isopropanol) dané směsi. Je závislý jak na hustotě, tak na bobtnavosti lepku. Lze z něho poté odvodit sílu vznikajícího těsta, jeho absorpci vody a zpracovatelnost při výrobě pečiva [393]. Zeleneho test sedimentace mouky, založený na měření jejího sedimentačního objemu ve zředěné kyselině mléčné, slouží zejména ke kontrole kvality a stability mouky v průběhu skladování [394]. Jeho výsledky ovšem mohou být využity také k definování funkčních vlastností nových, vysokoproteinových směsí. Hodnota sedimentačního indexu dané směsi může být určující pro výběr vhodného typu pečiva. Nižší hodnoty SI mouky vedou k tvorbě pečiva s plochým tvarem, menším objemem a slabou krustou. Naopak vysoké hodnoty SI mouky jsou příčinou kompaktního tvaru pečiva s malým objemem.

Na hodnotu sedimentačního indexu může mít vliv také obsah proteinů ve směsi, respektive složení těchto proteinů. Za bobtnání jsou zodpovědně zejména gliadiny a gluteniny tvořící lepek, ovšem vliv na sedimentační index může mít také retenční kapacita vody jiných bílkovin (např. albuminů nebo globulinů) [395].

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. Příkladově syrovátkového proteinu k mouce T530 naopak snižoval sedimentační index, jelikož fortifikované proteiny nedisponují

tak vysokou retenční kapacitou vody, jako bílkoviny obsažené v mouce nebo v izolátu z pšeničných otrub. Proto by tyto směsi byly vhodnější pro přípravu například litých těst [396]. Ke snížení bobtnavosti lepku došlo také při její fortifikaci konopnou moukou [397]. Naopak při přidavku různých druhů luštěninových proteinů k mouce nebyly pozorovány rozdíly v bobtnavosti těchto směsí [398].

5.2.2.2 Farinografická analýza vysokoproteinových směsí

Farinografická analýza byla provedena dle kapitoly 4.5.2.2 u směsí mouky s 5% přidavkem PKPO a SP za účelem definování vlivu substituovaných proteinů na reologické vlastnosti vytvořených těst. Farinografické indikátory jsou uvedeny v tabulce 55. Byly zaznamenány dvě hodnoty stupně změknutí – v čase 10 a 12 min od dosažení maxima točivého momentu.

Tabulka 55 Farinografické charakteristiky moučných směsí

	T530	5% PKPO	5% SP
Absorpce vody [%]	55,8	56,4	52,6
Doba vývoje [min]	1,8	1,7	6,8
Stabilita [min]	3,8	2,6	9,8
Stupeň změknutí (10) [FJ]	72	73	20
Stupeň změknutí (12) [FJ]	94	75	74
Farinografické číslo kvality	35	30	113

**FJ – farinografické jednotky*

Jedním z významných farinografických ukazatelů mouky nebo moučných směsí je **absorpce vody**. Mouky s vysokou retenční kapacitou vody (tzv. silné mouky) mají hodnotu absorpce vody v rozmezí 55-60 %, což vyjadřuje že 100 g této mouky je schopné zadržet 55–60 g vody [161]. Tato schopnost je dána jak obsahem, tak kvalitou lepku, která je předpokladem pro výrobu chleba. Referenční mouka T530 použitá pro všechny experimenty s absorpcí vody o hodnotě 55,8 % řadí mezi silné mouky. Přidavkem 5 % PKPO se hodnota absorpce vody mírně zvýšila (56,4 %), což může být způsobeno jak zvýšeným obsahem bílkovin, tak přítomností řady hydroxylových skupin, které reakcí s vodíkovými můstky ve vodě zvyšují absorpci vody. Zvýšení absorpce vody bylo pozorováno také po přidavku extrudovaných pšeničných otrub do chlebového těsta [399]. 5% substituce pomocí SP absorpci vody naopak snížila (52,6 %). Toto měření tak potvrzuje vliv přidavku daného typu proteinu na bobtnavost, respektive na sedimentační index směsí (viz kap.5.2.2.1)

Doba vývoje těsta a jeho **stabilita** jsou farinografické indikátory, které definují sílu vznikajícího těsta. Vyšší hodnoty těchto indikátorů poukazují na silnější těsta, která jsou tvořena trojdimensionální viskoelastickou strukturou vznikající díky vlastnostem lepku. Stabilita těsta pak představuje dobu, po kterou má těsto stejné viskoelastické vlastnosti, a tedy je možné ho dobře zpracovávat. V České republice se doba stability mouky většinou pohybuje mezi 3 a 5 minutami. Referenční mouka T530 měla dle stanovení doba vývoje 1,8 min a stabilitu 3,8 min. Přídavek 5 % PKPO neměl na dobu vývoje téměř žádný vliv (1,7 min), i přesto že byly pozorovány jevy, kdy se tato doba prodloužila vlivem interakcí lepku a vlákniny [399]. Tento přídavek ovšem způsobil signifikantní snížení stability těsta na 2,6 min, což vypovídá o oslabení lepkové viskoelastické struktury, a tedy snížení síly této směsi. Naopak 5% přídavek SP prodloužil oproti samotné referenční mouce T530 dobu vývoje těsta o 5 min (celkových 6,8 min) Přítomnost syrovátkového proteinu v pšeničné mouce snižuje hydratovatelnost a roztažitelnost této směsi, a tedy omezuje i vývoj typické viskoelastické

struktury lepku. 5 % SP v mouce ale zároveň prodloužila stabilitu připraveného těsta o 6 min, což bylo pozorováno také u Indrani et al. [400]. Zároveň Tang et al. popsal snížení stability těsta s přidavkem syrovátkového proteinu, které zdůvodňoval přítomností sulfhydrylových skupin SP a disulfidových vazeb lepku [401].

Stupeň změknutí je dán rozdílem konzistence těsta mezi maximem a hodnotou v čase 10, respektive 12 minut. Po 5% substituci pomocí PKPO byl do 10 min pozorován téměř totožný průběh měknutí těsta s průběhem stanoveným u referenční mouky T530, ovšem do 12 minuty došlo k jeho významnému zpomalení. Hodnota stupně změknutí u směsi s 5% přidavkem SP byla ovlivněna vysokou stabilitou těsta, po 10 minutách byla 20 FU, až poté začala výrazněji vzrůstat. Podle **farinografického čísla kvality**, které je definováno jako čas od počátku měření do doby poklesu o 30 FU od maxima, se přidavkem 5 % SP kvalita těsta přibližně trojnásobně zvýšila.

5.2.2.3 Extenzografická analýza vysokoproteinových směsí

Průběh analýzy je popsán v kapitole 4.5.2.3. Veškeré naměřené extenzografické charakteristiky jsou pro vzorky a referenční mouku T530 uvedeny v tabulce 56. Kromě energie, odporu, tažnosti a maximem odporu jsou uvedena také poměrová čísla, která jsou definována jako poměr odporu, respektive maxima odporu a energie. Směsi s 10 a 15% přidavkem SP nemohly být kvůli příliš lepkavé konzistenci těsta extenzografické analýze podrobeny.

Tabulka 56 Extenzografické charakteristiky moučných směsí

	T530		5% PKPO		10% PKPO		15% PKPO		5% SP	
Doba odležení [min]	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60
Energie [cm ²]	82	82	81	97	56	55	44	42	119	164
Odpor [FJ]	216	230	782	960	524	276	144	64	289	196
Tažnost [mm]	185	176	85	80	58	54	53	51	196	188
Maximum [FJ]	317	343	741	961	799	865	680	691	443	657
Poměrové číslo	1,2	1,3	8,6	12,0	9,0	4,6	2,7	2,1	1,5	2,2
Poměrové číslo (max)	1,7	2,0	8,8	12,0	13,9	16,1	12,9	13,6	2,3	3,5

Energie těsta je ukazatelem jeho zpracovatelnosti a kvality. Menší hodnoty energie poukazují na horší odolnost a stabilitu při zpracování, jsou typické pro mouky s tuhým a krátkým řetězcem lepku. Pro standardní české mouky má energie těsta typicky hodnotu okolo 90 cm². Referenční mouka T530 měla za podmínek metody po 30 minutách energii 82 cm² a po dalších 30 minutách zůstávala tato hodnota konstantní [402].

Přídavek 5 % PKPO ke pšeničné mouce neměl po 30 minutách na hodnotu energie významný vliv (81 cm²), avšak po 60 minutách došlo k nárůstu energie těsta na 97 cm². To znamená, že do 5% substituce mouky pomocí PKPO je hodnota energie těsta významně závislá na čase. Se zvyšujícím se přidavkem PKPO k mouce hodnota energie těsta naopak klesala, což vypovídá o zhoršení jeho kvality a stability. Energie těsta vzniklého ze vzorku s 15% přidavkem PKPO tak byla po 60 minutách téměř poloviční oproti energii samotné referenční mouky.

Těsto vytvořené ze směsi mouky a SP vykazovalo dle extenzografické analýzy vlastnosti, které se významně lišily jak od reference, tak směsí s PKPO. Přídavek 5 % PKPO způsobil nárůst energie těsta po 30 minutách (119 cm²) oproti referenci a po celkových 60 minutách tato energie ještě dále vzorstla (164 cm²). Toto měření koreluje i s výsledky farinografické analýzy a potvrzuje vysokou stabilitu tohoto těsta a jeho dlouhodobě dobrou zpracovatelnost.

Odpor těsta je další extenzografickou charakteristikou, která udává sílu lepku. Vyšší odpor při měření definuje těsta s tužší lepkovou strukturou, pevnější a mechanicky odolnější. Odpor generovaný těstem s 5% přídavkem PKPO byl po 60 minutách více než 4x vyšší (960 FU) než u referenční mouky (230 FU). Avšak zvyšující se přídavek PKPO k mouce vedl opět k poklesu hodnot odporu těst, při 15% přídavku PKPO až na pouhých 64 FU po 60 minutách. Tyto změny poukazují na křehnutí těsta v případě vyšší substituce PKPO a snížení jeho mechanické odolnosti.

Odpor těsta ze směsi mouky a SP byl po 30minutové temperaci jen mírně vyšší (289 FU), než odpor reference (216 FU), Poté ovšem začal odpor těsta výrazně klesat až na 196 FU v čase 60 minut, což vypovídá o jeho slábnutí a křehnutí.

Tažnost těsta je vlastnost charakterizující jeho pružnost při natahování udávanou v mm. Optimální tažnost těst určených pro pekařské aplikace je mezi 140 a 170 mm [403]. Referenční mouka vykazovala tažnost okolo 180 mm, přičemž byla tato hodnota po dobu 1 hodiny relativně stabilní. Přídavek 5 % PKPO měl okamžitý vliv na tažnost vzniklého těsta, která se po 30 minutách snížila oproti referenci o více než polovinu (85 mm). Těsta s vyššími přídavky PKPO (10 a 15 %) vykazovala v porovnání s referencí tažnost ještě nižší a jsou z tohoto pohledu více křehká než pružná. 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 [74]. Přídavek 5 % SP tažnost těsta nesnížil, naopak oproti referenci lehce zvýšil.

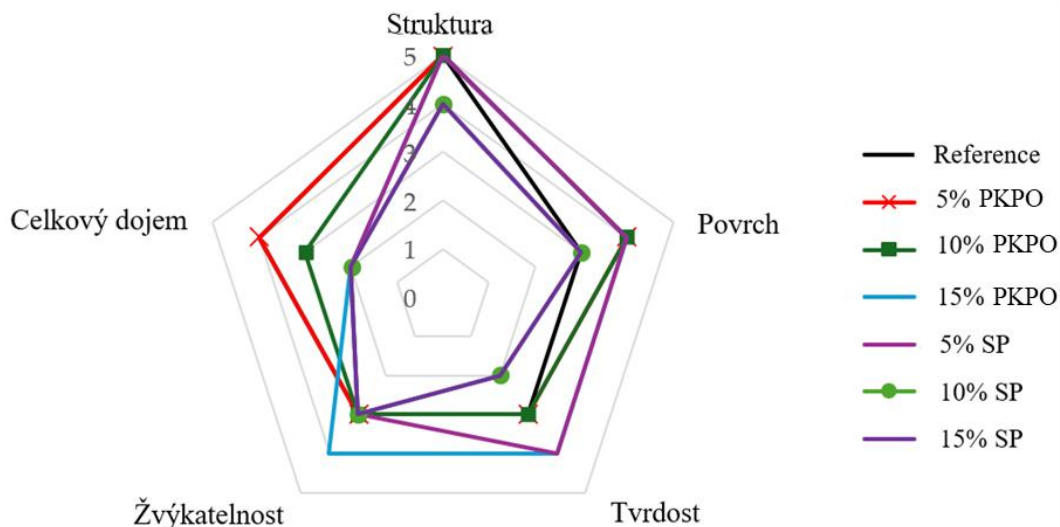
Kromě odporu těsta je dalším parametrem, které charakterizuje sílu lepku v těstě **maximum extenzografické křivky**. Stejně jako v případě odporu, také maximum bylo nejvyšší u vzorku těsta s 5 % PKPO, a to po 60 minutách temperace. Hodnoty maxima směsi s vyššími přídavky PKPO poté dosahovaly mírně nižších hodnot než těsto s 5% PKPO, ale v porovnání s referenční mokou byly tyto hodnoty dvojnásobné. Nárůst maxima oproti referenci byl pozorován i u vzorku těsta obohaceného 5 % SP, ovšem jeho hodnota byla také nižší, než hodnota maxima 5% PKPO.

Optimální hodnota **poměrového čísla** se má pohybovat v rozmezí 2–2,5 pro klasickou pšeničnou mouku, ovšem pro speciální mouky se může lišit. V České republice má poměrové číslo středně kvalitní mouky typicky hodnotu lehce menší než 2 [402], jak bylo stanoveno také v případě referenční mouky. 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. Naopak poměrové číslo neodhalilo signifikantní rozdíly mezi vlastnostmi reference a směsi s 5 % SP.

5.2.2.4 Senzorická analýza vysokoproteinového pečiva

Vnímání sensorické kvality potraviny je komplexní proces, který se vztahuje jak k chuťovým a aromatickým vlastnostem, tak vzhledu a vlastnostem texturním. Byla provedena sensorická analýza celkem 7 vzorků baget s různým přídavkem PKPO a SP, připravených dle kap. 5.4.4. Celkem 20 nezávislých hodnotitelů posuzovalo nejprve texturní a poté aromatické a chuťové vlastnosti předložených vzorků. Tyto kategorie byly také nakonec zvlášť vyhodnoceny určením mediánu pro každý sensorický ukazatel.

Texturní vlastnosti pečiva zahrnují posouzení jeho *struktury, povrchu, tvrdosti a žvýkatelnosti*. Zároveň byl v rámci sensorické analýzy vyhodnocen i parametr *celkový dojem*, který je ukazatelem toho, zda má daný vzorek texturní vlastnosti podobné komerčně dostupnému pečivu. Vyhodnocení texturních vlastností je uvedeno na obr. 32.



Obr. 32 Texturní parametry vzorků pečiva

Struktura pečiva je dána jeho pevností, soudržností nebo drobivostí. Na obrázku 31 lze vidět, že u vzorků s vyšším přídavek SP (10 a 15 %) došlo ke snížení hodnocení parametru *struktura* o jeden bod stupnice. Kvůli nižší vaznosti vody SP nevznikla u těchto vzorků tak pevná viskoelastická struktura lepku jako v případě reference a pečiva s přídavkem OP. Snížení koncentrace lepku a zhoršená redistribuce vody mezi lepkiem, škrobem a syrovátkovým proteinem vedlou k poklesu hodnocení sensorického vnímání struktury pečiva [404]. Těsta připravená ze směsí s vyššími přídávky SP (10 a 15 %) byla velmi vodnatá a těžko zpracovatelná již při jejich přípravě, což také naznačuje špatnou tvorbu lepkové struktury. Na tento trend v pečení poukazyvaly také nízké hodnoty sedimentačního indexu u vzorků obohacených syrovátkovým proteinem.

Senzorická analýza neodhalila signifikantní rozdíly mezi referencí a vzorky směsí s různým přídavkem OP, každopádně vizuálně je evidentní, že se zvyšujícím se přídavkem tohoto typu proteinu dochází během pečení k redukci velikosti vzduchových částic na řezu pečiva, a tedy ke vzniku hutnější struktury baget (viz obr. 33). Tuto hypotézu potvrzuje také Alzuwaid et al. [79].



Obr. 33 Porovnání expanze plynových buněk u vzorků pečiva s různým přídavkem PKPO

Dalším parametrem sensorického hodnocení texturních vlastností pečiva je jeho **povrch**. Také zde byl rozdíl v hodnocení jednotlivých vzorků maximálně jeden bod stupnice. Povrch reference byl nejčastěji charakterizován jako polohladký. Oproti referenci byl povrch připravených baget lépe hodnocen u vzorků obohacených PKPO, jehož přídavek ovlivňoval barvu výsledného pečiva – výraznější hnědé zbarvení, které tak mohlo v hodnotitelích vyvolat

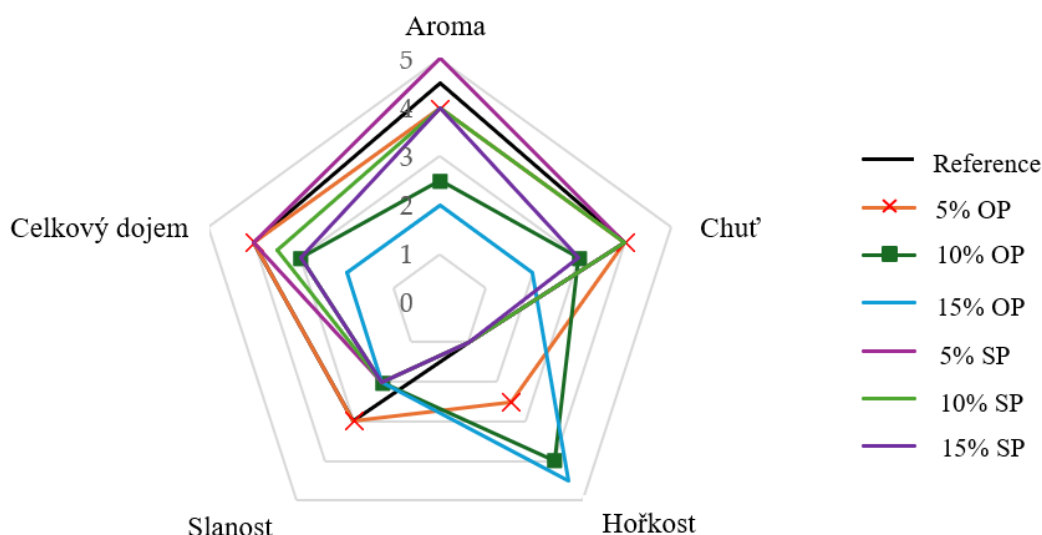
dojem zdravějšího, celozrnného pečiva [405]. Oproti referenci byl o jeden stupeň lépe hodnocen také vzorek s 5% přídavkem SP.

V **tvrdosti** se na základě výsledků sensorické analýzy mezi sebou jednotlivé vzorky pečiva statisticky významně lišily ($P = 0,0001$). Tento parametr byl u reference hodnocen jako známkou 3 – středně tvrdý. Bagety s 15% přídavkem PKPO vykazovaly snížení tvrdosti oproti referenci. Stejné hodnocení tvrdosti pak bylo přiřazeno také vzorku s 5% přídavkem SP. Naopak u vzorků s 10 a 15% přídavkem SP došlo ke zvýšení tvrdosti baget oproti referenci. Stejný trend byl pozorován při přípravě žitného chleba se syrovátkovým proteinovým koncentrátem, jehož tvrdost se do 4% přídavku snižovala a s přídavkem nad 4 % zvyšovala [406], [407]. Tvrdost baget s vyššími přídavky PKPO byla hodnocena stejně jako tvrdost reference.

Žvýkatelnost pečiva je dalším parametrem patřícím mezi texturní vlastnosti. Po přídavku proteinů byly dle sensorické analýzy hodnoty žvýkatelnosti jednotlivých vzorků pečiva a reference shodné, hodnocené jako středně žvýkatelné. Pouze u vzorku s 15% přídavkem PKPO došlo k zvýšení hodnoty tohoto paramteru, a tedy zhoršení žvýkatelnosti této bagety. Zhoršení žvýkatelnosti pečiva obohaceného pomocí PKPO byl zaznamenán také ve studii dle Alzuwaid et al [79], ale už po 5% substituci mouky. Zhoršení žvýkatelnosti bylo pozorováno také po přídavku syrovátkového proteinu do pečiva [408], což se u zkoumaných vzorků v této dizertační práci dle použité metodiky nepotvrdilo.

Pomocí korelační analýzy byl vyhodnocen také vliv texturních parametrů na skóre **celkového dojmu** jednotlivých baget. Z výsledků bylo patrné, že žádný z texturních parametrů nevykazoval signifikantní korelaci s parametrem celkového dojmu. Lze tedy shrnout, že hodnocené texturní vlastnosti nebyly pro hodnotitele při celkovém vnímání baget zásadním ukazatelem.

V další fázi sensorické analýzy bylo hodnotiteli posuzováno *aroma* a *chuťové vjemy*, konkrétně *hořkost* a *slanost* připravených vzorků baget. Také tyto parametry byly nakonec porovány s hodnotou *celkového dojmu*. Výsledky zpracované ve formě mediánů jsou uvedeny v pavučinovém grafu na obr. 34.



Obr. 34 Aromatické a chuťové vlastnosti vzorků pečiva

Aroma připravených baget je z velké míry dané procesem fermentace v průběhu jejich výroby, kdy dochází ke vzniku řady aromatických a chuťově aktivních látek. Delší doba

fermentace vede ke vzniku bohatšího aroma, ale zároveň může docházet také k okyselení pečiva [409]. Další významnou fází pro vznik aroma je poté Maillardova reakce při pečení. U vzorků baget z jednotlivých směsí byl dodržen stejný postup přípravy, hodnotiteli byly však odhaleny statisticky významné rozdíly ($P = 0,0003$) v aroma pečiva dané typem i množstvím přidaných proteinů. Aroma bylo negativně ovlivněno vyšším přídatkem PKPO. Hodnocení bagety s 15% substitucí PKPO kleslo oproti referenci o 2,5 bodu – slovně bylo definováno jako „spíše nepříjemné“. Přídavek 5 % PKPO tak zásadní vliv na aroma baget neměl, tento vzorek byl v tomto parametru hodnocen jako „spíše příjemný“. Syrovátkový protein měl obecně na aroma malý vliv, pouze v případě bagety s 5% přídatkem SP bylo zaznamenáno lépe hodnocené aroma oproti referenci, ale jen o 0,5 bodu stupnice.

Dále byla hodnocena komplexní **chuť** vzorků baget. U tohoto parametru byly také zaznamenány signifikantní rozdíly dané přítomností proteinů. Chuťová přijatelnost oproti referenci klesla zejména u bagety s 15% substitucí PKPO o 2 body stupnice a jevila se tak jaké „spíše nedostatečná“. Jako „průměrné“ (3 body) byly pak hodnoceny vzorky s 10% přídatkem PKPO a 15% přídatkem SP. Ke vzorkům s 10 a 15% přídatkem PKPO byla navíc často přiřazována nepříjemná obilná chuť, u 15% SP se dle hodnotitelů objevovala nepřirozená máselná chuť. Nižší přídatky proteinů k bagetám (5% PKPO, 5 a 10% SP) zhoršení chuťových vlastností baget nezpůsobily a byly hodnoceny stejně jako reference.

Míra **hořkosti** byla do senzorické analýzy zařazena kvůli riziku jejího zvýšení u potravin obohacených rostlinnými proteiny. Bohužel se tento negativní vliv projevil také u baget s přídatkem proteinového materiálu z otrub, a to na hladině statistické významnosti $P = 0,00001$. Zároveň bylo pozorováno zvýšení míry hořkosti úměrně se zvyšováním přídatku PKPO, u 10 a 15% byly bagety vnímány jako „spíše výrazně hořké“. Míra hořkosti bagety s 5% substitucí PKPO byla oproti referenci také vyšší, ale hodnocena již jen jako méně než „středně výrazná“ (2,5 bodu). Pšeničné otruby jsou surovina, jejíž specifické složky (např. kyselina ferulová, taniny) mohou způsobovat hořkou chuť. Bylo popsáno, že přídatky samotných otrub do pečiva způsobují zvýšení jeho hořkosti [383]. Příčinou ovšem může být také charakter přidávaných proteinů. Obecně je hořkost jedním z hlavních nedostatků rostlinných proteinů – je dána jejich aminokyselinovým složením, či přítomností krátkých peptidů, které ve vyšších koncentracích po požití způsobují hořký vjem [332]. Dle předpokladů se tak hořkost vůbec neprojevila u reference ani vzorků baget obohacených syrovátkovým, tedy živočišným proteinem.

Slanost baget nebyla přídatkem otrubového ani syrovátkového proteinu významně ovlivněna a její hodnota byla stejná, případně pouze o jeden bod nižší než hodnota slanosti reference. Ke slanosti vzorků tak bylo přiřazeno slovní hodnocení „středně výrazná“.

Celkový dojem byl posledním parametrem, který byl vyhodnocen na základě všech senzorických vjemů poskytnutých daným vzorkem. Bylo zjištěno, že fortifikované bagety se od reference liší, a to na hladině významnosti $P = 0,002$. Z grafu na obr. 33 je zřejmé, že nejméně přijatelnou byla bageta s 15% přídatkem PKPO. Negativní vnímání vyšší koncentrace PKPO bylo potvrzeno jejím korelačním koeficientem s celkovým dojmem, který měl hodnotu $r = -0,488$. To znamená, že se vzrůstající hořkostí se snižuje celkový dojem ze vzorku. Naopak nejlépe a shodně jako reference, byly hodnoceny bagety s nejnižším, 5% přídatkem jak PKPO, tak SP. Proto lze shrnout, že substituce mouky pomocí proteinů za účelem přípravy vysokoproteinového pečiva dle podmínek metody bez vzniku zásadních senzorických defektů je možná pouze do 5 hm. %. Ovšem i tato substituce zvýší obsah bílkovin o více než 2,5 %.

6 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 složený 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 $4 \pm 0,05$. 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 $83,0 \pm 1,6$ % 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 ($48,4 \pm 0,2$ %), ale proces izolace zvýšil stravitelnost na $93,4 \pm 0,2$ % 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 synerese, 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 sensorické vady, jako je snížená krémovitost a zvýšená zrnitost. Přídavek proteinů z otrub také vedl ke vzniku nežádoucí hořké chuti a obilného aroma jogurtů. Tyto sensorické 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 proteinu 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. Sensorická 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.

7 Seznam použité literatury

- [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] W. B. Betts, R. K. Dart, A. S. Ball, a S. L. Pedlar, „Biosynthesis and Structure of Lignocellulose“, in *Biodegradation*, W. B. Betts, Ed., in Springer Series in Applied Biology. , London: Springer London, 1991, s. 139–155. doi: 10.1007/978-1-4471-3470-1_7.
- [3] N. Dahmen, I. Lewandowski, S. Zibek, a A. Weidtmann, „Integrated lignocellulosic value chains in a growing bioeconomy: Status quo and perspectives“, *GCB Bioenergy*, roč. 11, č. 1, s. 107–117, led. 2019, doi: 10.1111/gcbb.12586.
- [4] R. Zhong, D. Cui, a Z. Ye, „Secondary cell wall biosynthesis“, *New Phytologist*, roč. 221, č. 4, s. 1703–1723, bře. 2019, doi: 10.1111/nph.15537.
- [5] R. Musule *et al.*, „Chemical composition of lignocellulosic biomass in the wood of *Abies religiosa* across an altitudinal gradient“, *J Wood Sci*, roč. 62, č. 6, s. 537–547, pro. 2016, doi: 10.1007/s10086-016-1585-0.
- [6] M. Prückler *et al.*, „Wheat bran-based biorefinery 1: Composition of wheat bran and strategies of functionalization“, *LWT - Food Science and Technology*, roč. 56, č. 2, s. 211–221, kvě. 2014, doi: 10.1016/j.lwt.2013.12.004.
- [7] M. D. Smith, „An Abbreviated Historical and Structural Introduction to Lignocellulose“, in *ACS Symposium Series*, roč. 1338, M. D. Smith, Ed., Washington, DC: American Chemical Society, 2019, s. 1–15. doi: 10.1021/bk-2019-1338.ch001.
- [8] A. Zoghalmi a G. Paës, „Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis“, *Front. Chem.*, roč. 7, s. 874, pro. 2019, doi: 10.3389/fchem.2019.00874.
- [9] S. S. Maleki, K. Mohammadi, a K. Ji, „Characterization of Cellulose Synthesis in Plant Cells“, *The Scientific World Journal*, roč. 2016, s. 1–8, 2016, doi: 10.1155/2016/8641373.
- [10] G. Guerriero, J. Hausman, J. Strauss, H. Ertan, a K. S. Siddiqui, „Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization“, *Engineering in Life Sciences*, roč. 16, č. 1, s. 1–16, led. 2016, doi: 10.1002/elsc.201400196.
- [11] S. Kocaman a G. Ahmetli, „Effects of Various Methods of Chemical Modification of Lignocellulose Hazelnut Shell Waste on a Newly Synthesized Bio-based Epoxy Composite“, *J Polym Environ*, roč. 28, č. 4, s. 1190–1203, dub. 2020, doi: 10.1007/s10924-020-01675-1.
- [12] Q. Li *et al.*, „Plant biotechnology for lignocellulosic biofuel production“, *Plant Biotechnology Journal*, roč. 12, č. 9, s. 1174–1192, pro. 2014, doi: 10.1111/pbi.12273.
- [13] J. Zucko *et al.*, „Global genome analysis of the shikimic acid pathway reveals greater gene loss in host-associated than in free-living bacteria“, *BMC Genomics*, roč. 11, č. 1, s. 628, pro. 2010, doi: 10.1186/1471-2164-11-628.
- [14] S. Li, L. Bashline, L. Lei, a Y. Gu, „Cellulose Synthesis and Its Regulation“, *The Arabidopsis Book*, roč. 12, s. e0169, led. 2014, doi: 10.1199/tab.0169.
- [15] O. Lerouxel, D. M. Cavalier, A. H. Liepman, a K. Keegstra, „Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides — a complex process“, *Current Opinion in Plant Biology*, roč. 9, č. 6, s. 621–630, pro. 2006, doi: 10.1016/j.pbi.2006.09.009.
- [16] D. P. S. Verma a Z. Hong, „Plant callose synthase complexes“.
- [17] B. Piršelová a I. Matušíková, „Callose: the plant cell wall polysaccharide with multiple biological functions“, *Acta Physiol Plant*, roč. 35, č. 3, s. 635–644, bře. 2013, doi: 10.1007/s11738-012-1103-y.

- [18] I. Haq *et al.*, „Advances in Valorization of Lignocellulosic Biomass towards Energy Generation", *Catalysts*, roč. 11, č. 3, s. 309, úno. 2021, doi: 10.3390/catal11030309.
- [19] M. Pauly *et al.*, „Hemicellulose biosynthesis", *Planta*, roč. 238, č. 4, s. 627–642, říj. 2013, doi: 10.1007/s00425-013-1921-1.
- [20] M. Compier, „Hemicellulose biosynthesis and degradation in tobacco cell walls".
- [21] W. R. De Souza, „Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass", in *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*, A. Chandel, Ed., InTech, 2013. doi: 10.5772/54325.
- [22] S. M. Cragg *et al.*, „Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life", *Current Opinion in Chemical Biology*, roč. 29, s. 108–119, pro. 2015, doi: 10.1016/j.cbpa.2015.10.018.
- [23] R. Brown, Ed., *Thermochemical Processing of Biomass: Conversion into Fuels, Chemicals and Power*, 1. vyd. Wiley, 2019. doi: 10.1002/9781119417637.
- [24] M. Patel, X. Zhang, a A. Kumar, „Techno-economic and life cycle assessment on lignocellulosic biomass thermochemical conversion technologies: A review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, roč. 53, s. 1486–1499, led. 2016, doi: 10.1016/j.rser.2015.09.070.
- [25] M. Puig-Arnavat, T. P. Thomsen, G. Ravenni, L. R. Clausen, Z. Sárossy, a J. Ahrenfeldt, „Pyrolysis and Gasification of Lignocellulosic Biomass", in *Biorefinery*, J.-R. Bastidas-Oyanedel a J. E. Schmidt, Ed., Cham: Springer International Publishing, 2019, s. 79–110. doi: 10.1007/978-3-030-10961-5_4.
- [26] S. Nanda, J. Mohammad, S. N. Reddy, J. A. Kozinski, a A. K. Dalai, „Pathways of lignocellulosic biomass conversion to renewable fuels", *Biomass Conv. Bioref.*, roč. 4, č. 2, s. 157–191, čer. 2014, doi: 10.1007/s13399-013-0097-z.
- [27] K. Zhang, J. Chang, Y. Guan, H. Chen, Y. Yang, a J. Jiang, „Lignocellulosic biomass gasification technology in China", *Renewable Energy*, roč. 49, s. 175–184, led. 2013, doi: 10.1016/j.renene.2012.01.037.
- [28] P. Ibarra-Gonzalez a B.-G. Rong, „A review of the current state of biofuels production from lignocellulosic biomass using thermochemical conversion routes", *Chinese Journal of Chemical Engineering*, roč. 27, č. 7, s. 1523–1535, čvc. 2019, doi: 10.1016/j.cjche.2018.09.018.
- [29] D. C. Elliott, „Transportation fuels from biomass via fast pyrolysis and hydroprocessing", *WIREs Energy & Environment*, roč. 2, č. 5, s. 525–533, zář. 2013, doi: 10.1002/wene.74.
- [30] H. Agarwal, V. H. Kashyap, A. Mishra, S. Bordoloi, P. K. Singh, a N. C. Joshi, „Biochar-based fertilizers and their applications in plant growth promotion and protection", *3 Biotech*, roč. 12, č. 6, s. 136, čer. 2022, doi: 10.1007/s13205-022-03195-2.
- [31] S. Jha, R. Gaur, S. Shahabuddin, a I. Tyagi, „Biochar as Sustainable Alternative and Green Adsorbent for the Remediation of Noxious Pollutants: A Comprehensive Review", *Toxics*, roč. 11, č. 2, s. 117, led. 2023, doi: 10.3390/toxics11020117.
- [32] J. S. Kim, Y. Y. Lee, a T. H. Kim, „A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass", *Bioresource Technology*, roč. 199, s. 42–48, led. 2016, doi: 10.1016/j.biortech.2015.08.085.
- [33] S. Rezania *et al.*, „Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for bioethanol production: An overview", *Energy*, roč. 199, s. 117457, kvě. 2020, doi: 10.1016/j.energy.2020.117457.
- [34] D. Batista Meneses, G. Montes De Oca-Vásquez, J. R. Vega-Baudrit, M. Rojas-Álvarez, J. Corrales-Castillo, a L. C. Murillo-Araya, „Pretreatment methods of lignocellulosic wastes into value-added products: recent advances and possibilities", *Biomass Conv. Bioref.*, roč. 12, č. 2, s. 547–564, úno. 2022, doi: 10.1007/s13399-020-00722-0.

- [35] J. C. Solarte-Toro, J. M. Romero-García, J. C. Martínez-Patiño, E. Ruiz-Ramos, E. Castro-Galiano, a C. A. Cardona-Alzate, „Acid pretreatment of lignocellulosic biomass for energy vectors production: A review focused on operational conditions and techno-economic assessment for bioethanol production", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, roč. 107, s. 587–601, čer. 2019, doi: 10.1016/j.rser.2019.02.024.
- [36] R. R. Gonzales, P. Sivagurunathan, a S.-H. Kim, „Effect of severity on dilute acid pretreatment of lignocellulosic biomass and the following hydrogen fermentation", *International Journal of Hydrogen Energy*, roč. 41, č. 46, s. 21678–21684, pro. 2016, doi: 10.1016/j.ijhydene.2016.06.198.
- [37] „National Overview: Facts and Figure on Materials, Wastes and Recycling". Environmental Protection Agency, 2023. [Online]. Dostupné z: <https://www.epa.gov/facts-and-figures-about-materials-waste-and-recycling/national-overview-facts-and-figures-materials>
- [38] Z. Gao *et al.*, „Advances in biological techniques for sustainable lignocellulosic waste utilization in biogas production", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, roč. 170, s. 112995, pro. 2022, doi: 10.1016/j.rser.2022.112995.
- [39] S. Bhuvaneshwari, H. Hettiarachchi, a J. N. Meegoda, „Crop Residue Burning in India: Policy Challenges and Potential Solutions", *IJERPH*, roč. 16, č. 5, s. 832, bře. 2019, doi: 10.3390/ijerph16050832.
- [40] R. Sawlani *et al.*, „The severe Delhi SMOG of 2016: A case of delayed crop residue burning, coincident firecracker emissions, and atypical meteorology", *Atmospheric Pollution Research*, roč. 10, č. 3, s. 868–879, kvě. 2019, doi: 10.1016/j.apr.2018.12.015.
- [41] K. Winans, A. Kendall, a H. Deng, „The history and current applications of the circular economy concept", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, roč. 68, s. 825–833, úno. 2017, doi: 10.1016/j.rser.2016.09.123.
- [42] S. C. Bhatla a M. A. Lal, „Plant Growth Regulators: An Overview", in *Plant Physiology, Development and Metabolism*, Singapore: Springer Nature Singapore, 2023, s. 391–398. doi: 10.1007/978-981-99-5736-1_14.
- [43] J. Boychyn, A. Ammeter, a C. Prang, „Straw Management in Western Canada Wheat and Barley Cropping Systems", *Production Resources*, [Online]. Dostupné z: <https://mbcropalliance.ca/directory/production-resources/pest-management-in-winter-wheat-diseases-and-insects-3/>
- [44] „L 2022 nr 10 - Kontroll av bekämpningsmedelsrester i livsmedel 2020".
- [45] „>Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2019/ ze dne 5. června 2019, kterým se stanoví pravidla pro dodávání hnojivých výrobků EU na trh a kterým se mění nařízení (ES) č. 1069/2009 a (ES) č. 1107/2009 a zrušuje nařízení (ES) č. 2003/2003".
- [46] „Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 ze dne 21. října 2009 o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh a o zrušení směrnic Rady 79/117/EHS a 91/414/EHS".
- [47] M. Mujtaba *et al.*, „Lignocellulosic biomass from agricultural waste to the circular economy: a review with focus on biofuels, biocomposites and bioplastics", *Journal of Cleaner Production*, roč. 402, s. 136815, kvě. 2023, doi: 10.1016/j.jclepro.2023.136815.
- [48] F. S. Neto *et al.*, „Research Progress and Trends on Utilization of Lignocellulosic Residues as Supports for Enzyme Immobilization via Advanced Bibliometric Analysis", *Polymers*, roč. 15, č. 9, s. 2057, dub. 2023, doi: 10.3390/polym15092057.
- [49] Y.-H. Percival Zhang, M. E. Himmel, a J. R. Mielenz, „Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies", *Biotechnology Advances*, roč. 24, č. 5, s. 452–481, zář. 2006, doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.03.003.

- [50] S. Haghghi Mood *et al.*, „Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, roč. 27, s. 77–93, lis. 2013, doi: 10.1016/j.rser.2013.06.033.
- [51] J. H. Lora a W. G. Glasser, „Recent Industrial Applications of Lignin: A Sustainable Alternative to Nonrenewable Materials".
- [52] Y.-H. P. Zhang, „Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries", *J Ind Microbiol Biotechnol*, roč. 35, č. 5, s. 367–375, kvě. 2008, doi: 10.1007/s10295-007-0293-6.
- [53] S. G. Karp *et al.*, „Lignocellulosic Biorefinery for Value-Added Products: The Emerging Bioeconomy", in *Biomass, Biofuels, Biochemicals*, Elsevier, 2021, s. 291–321. doi: 10.1016/B978-0-12-821878-5.00002-7.
- [54] Y. Xu *et al.*, „Hemicellulose-based hydrogels for advanced applications", *Front. Bioeng. Biotechnol.*, roč. 10, s. 1110004, led. 2023, doi: 10.3389/fbioe.2022.1110004.
- [55] N. Singh, R. R. Singhanian, P. S. Nigam, C.-D. Dong, A. K. Patel, a M. Puri, „Global status of lignocellulosic biorefinery: Challenges and perspectives", *Bioresource Technology*, roč. 344, s. 126415, led. 2022, doi: 10.1016/j.biortech.2021.126415.
- [56] 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, bř. 2019, doi: 10.3390/md17030174.
- [57] M. D. Torres, S. Kraan, a H. Domínguez, „Seaweed biorefinery", *Rev Environ Sci Biotechnol*, roč. 18, č. 2, s. 335–388, čer. 2019, doi: 10.1007/s11157-019-09496-y.
- [58] T. G. Walmsley, P. S. Varbanov, R. Su, B. Ong, a N. Lal, „Frontiers in process development, integration and intensification for circular life cycles and reduced emissions", *Journal of Cleaner Production*, roč. 201, s. 178–191, lis. 2018, doi: 10.1016/j.jclepro.2018.08.041.
- [59] E. Uggetti, J. García, J. A. Álvarez, a M. J. García-Galán, „Start-up of a microalgae-based treatment system within the biorefinery concept: from wastewater to bioproducts", *Water Science and Technology*, roč. 78, č. 1, s. 114–124, srp. 2018, doi: 10.2166/wst.2018.195.
- [60] G. Capson-Tojo, M. Rouez, M. Crest, J.-P. Steyer, J.-P. Delgenès, a R. Escudié, „Food waste valorization via anaerobic processes: a review", *Rev Environ Sci Biotechnol*, roč. 15, č. 3, s. 499–547, zář. 2016, doi: 10.1007/s11157-016-9405-y.
- [61] 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.
- [62] 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.
- [63] A. Baiano, „Recovery of Biomolecules from Food Wastes — A Review", *Molecules*, roč. 19, č. 9, s. 14821–14842, zář. 2014, doi: 10.3390/molecules190914821.
- [64] N. Belc, G. Mustatea, L. Apostol, S. Iorga, V.-N. Vlăduț, 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.
- [65] 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.
- [66] 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.
- [67] 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.
- [68] B. Palmarola-Adrados, P. Chotěborská, M. Galbe, a G. Zacchi, „Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran", *Bioresource Technology*, roč. 96, č. 7, s. 843–850, kvě. 2005, doi: 10.1016/j.biortech.2004.07.004.
- [69] 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.
- [70] 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.
- [71] 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.
- [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. Gunenc, C. Alswiti, a F. Hosseinian, „Wheat Bran Dietary Fiber: Promising Source of Prebiotics with Antioxidant Potential", *JFR*, roč. 6, č. 2, s. 1, led. 2017, doi: 10.5539/jfr.v6n2p1.
- [74] N. Liu, S. Ma, L. Li, a X. Wang, „Study on the effect of wheat bran dietary fiber on the rheological properties of dough", *Grain & Oil Science and Technology*, roč. 2, č. 1, s. 1–5, bře. 2019, doi: 10.1016/j.gaost.2019.04.005.
- [75] A. Jerkovic, A. M. Kriegel, J. R. Bradner, B. J. Atwell, T. H. Roberts, a R. D. Willows, „Strategic Distribution of Protective Proteins within Bran Layers of Wheat Protects the Nutrient-Rich Endosperm", *Plant Physiology*, roč. 152, č. 3, s. 1459–1470, bře. 2010, doi: 10.1104/pp.109.149864.
- [76] 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.
- [77] P. R. Shewry a S. J. Hey, „The contribution of wheat to human diet and health", *Food and Energy Security*, roč. 4, č. 3, s. 178–202, říj. 2015, doi: 10.1002/fes3.64.
- [78] K. Zhu, H. Zhou, a H. Qian, „Proteins Extracted from Defatted Wheat Germ: Nutritional and Structural Properties", *Cereal Chem*, roč. 83, č. 1, s. 69–75, led. 2006, doi: 10.1094/CC-83-0069.
- [79] 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.
- [80] Institute of Medicine (U.S.) a Institute of Medicine (U.S.), Ed., *Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids*. Washington, D.C: National Academies Press, 2005.
- [81] 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.

- [82] B. Laddomada, S. Caretto, a G. Mita, „Wheat Bran Phenolic Acids: Bioavailability and Stability in Whole Wheat-Based Foods", *Molecules*, roč. 20, č. 9, s. 15666–15685, srp. 2015, doi: 10.3390/molecules200915666.
- [83] K. Zhou, L. Su, a L. (Lucy) Yu, „Phytochemicals and Antioxidant Properties in Wheat Bran", *J. Agric. Food Chem.*, roč. 52, č. 20, s. 6108–6114, říj. 2004, doi: 10.1021/jf049214g.
- [84] H. Kikuzaki, M. Hisamoto, K. Hirose, K. Akiyama, a H. Taniguchi, „Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Related Compounds", *J. Agric. Food Chem.*, roč. 50, č. 7, s. 2161–2168, bře. 2002, doi: 10.1021/jf011348w.
- [85] M. Srinivasan, A. R. Sudheer, a V. P. Menon, „Ferulic Acid: Therapeutic Potential Through Its Antioxidant Property", *J. Clin. Biochem. Nutr.*, roč. 40, č. 2, s. 92–100, 2007, doi: 10.3164/jcfn.40.92.
- [86] R. Rukkumani, K. Aruna, P. S. Varma, a V. Menon, „INFLUENCE OF FERULIC ACID ON CIRCULATORY PROOXIDANT - ANTIOXIDANT STATUS DURING ALCOHOL AND PUFA INDUCED TOXICITY".
- [87] D. Trono, „Carotenoids in Cereal Food Crops: Composition and Retention throughout Grain Storage and Food Processing", *Plants*, roč. 8, č. 12, s. 551, lis. 2019, doi: 10.3390/plants8120551.
- [88] A. M. Digesù, C. Platani, L. Cattivelli, G. Mangini, a A. Blanco, „Genetic variability in yellow pigment components in cultivated and wild tetraploid wheats", *Journal of Cereal Science*, roč. 50, č. 2, s. 210–218, zář. 2009, doi: 10.1016/j.jcs.2009.05.002.
- [89] 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.
- [90] M. Káš, G. Mühlbachová, H. Kusá, a M. Pechová, „Soil phosphorus and potassium availability in long-term field experiments with organic and mineral fertilization", *Plant Soil Environ.*, roč. 62, č. 12, s. 558–565, pro. 2016, doi: 10.17221/534/2016-PSE.
- [91] S. Apprigh *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.
- [92] 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.
- [93] 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.
- [94] C. Farkas *et al.*, „Microbial saccharification of wheat bran for bioethanol fermentation", *Journal of Cleaner Production*, roč. 240, s. 118269, pro. 2019, doi: 10.1016/j.jclepro.2019.118269.
- [95] P. Diviš, J. Pořízka, J. Nábělek, V. Hrabalová, a Z. Slavíková, „COMPARISON OF SACCHARIFICATION METHODS FOR BIOTECHNOLOGICAL UTILIZATION OF WHEAT BRAN", *Agriculture & Food*, roč. 11, č. 1, s. 96–102, 2023, doi: 10.62991/AF1996280132.
- [96] 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.
- [97] 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.

- [98] Sukunya Yampracha, „Release of Various Elements from Organic Fertilizers Incubated in Organic and Non-organic Paddy Soils at Various Time Periods", *Current Applied Science and Technology*, roč. 19, s. 276288, 2019, doi: 10.14456/CAST.2019.23.
- [99] 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.
- [100] C. L. Thomas, G. E. Acquah, A. P. Whitmore, S. P. McGrath, a S. M. Haefele, „The Effect of Different Organic Fertilizers on Yield and Soil and Crop Nutrient Concentrations", *Agronomy*, roč. 9, č. 12, s. 776, lis. 2019, doi: 10.3390/agronomy9120776.
- [101] R. Badar a S. A. Qureshi, „Utilization of composted agricultural waste as organic fertilizer for the growth promotion of sunflower plants".
- [102] 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.
- [103] 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.
- [104] 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.
- [105] 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.
- [106] 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>
- [107] 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.
- [108] 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.
- [109] M. D. J. Campas-Ríos, J. N. Mercado-Ruiz, M. A. Valdéz-Covarrubias, A. R. Islas-Rubio, A. M. Mendoza-Wilson, a R. R. Balandrán-Quintana, „HYDROLYSATES FROM WHEAT BRAN ALBUMIN AS COLOR-ADDING AGENTS AND INHIBITORS OF APPLE POLYPHENOL OXIDASE: HYDROLYSATES FROM WHEAT BRAN ALBUMIN INHIBIT PPO", *Journal of Food Biochemistry*, roč. 36, č. 4, s. 470–478, srp. 2012, doi: 10.1111/j.1745-4514.2011.00553.x.
- [110] A. M. Ortiz-Estrada, J. N. Mercado-Ruiz, J. M. García-Robles, A. R. Islas-Rubio, A. M. Mendoza-Wilson, a R. R. Balandrán-Quintana, „Wheat bran globulins: Competitive inhibitors of mushroom tyrosinase", *Food Sci Biotechnol*, roč. 21, č. 3, s. 633–635, čer. 2012, doi: 10.1007/s10068-012-0082-5.
- [111] W. Jin, M. Kim, a K. Kim, „Utilization of Barley or Wheat Bran to Bioconvert Glutamate to γ -Aminobutyric Acid (GABA)", *Journal of Food Science*, roč. 78, č. 9, zář. 2013, doi: 10.1111/1750-3841.12234.
- [112] R. Paliwal a S. Palakurthi, „Zein in controlled drug delivery and tissue engineering", *Journal of Controlled Release*, roč. 189, s. 108–122, zář. 2014, doi: 10.1016/j.jconrel.2014.06.036.

- [113] I. Ezpeleta *et al.*, „Gliadin nanoparticles for the controlled release of all-trans-retinoic acid", *International Journal of Pharmaceutics*, roč. 131, č. 2, s. 191–200, dub. 1996, doi: 10.1016/0378-5173(95)04338-1.
- [114] 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.
- [115] 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.
- [116] 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.
- [117] 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.
- [118] 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.
- [119] 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.
- [120] A. K. Stone, A. Karalash, R. T. Tyler, T. D. Warkentin, a M. T. Nickerson, „Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars", *Food Research International*, roč. 76, s. 31–38, říj. 2015, doi: 10.1016/j.foodres.2014.11.017.
- [121] 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.
- [122] 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.
- [123] Y. W. Sari, M. E. Bruins, a J. P. M. Sanders, „Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean, and microalgae meals", *Industrial Crops and Products*, roč. 43, s. 78–83, kvě. 2013, doi: 10.1016/j.indcrop.2012.07.014.
- [124] M. N. Perović, Z. D. Knežević Jugović, a M. G. Antov, „Improved recovery of protein from soy grit by enzyme-assisted alkaline extraction", *Journal of Food Engineering*, roč. 276, s. 109894, čvc. 2020, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2019.109894.
- [125] R. Wahlström *et al.*, „High Yield Protein Extraction from Brewer's Spent Grain with Novel Carboxylate Salt - Urea Aqueous Deep Eutectic Solvents", *ChemistrySelect*, roč. 2, č. 29, s. 9355–9363, říj. 2017, doi: 10.1002/slct.201701492.
- [126] A. Grudniewska, E. M. De Melo, A. Chan, R. Gniłka, F. Boratyński, a A. S. Matharu, „Enhanced Protein Extraction from Oilseed Cakes Using Glycerol–Choline Chloride Deep Eutectic Solvents: A Biorefinery Approach", *ACS Sustainable Chem. Eng.*, roč. 6, č. 11, s. 15791–15800, lis. 2018, doi: 10.1021/acssuschemeng.8b04359.
- [127] Q. Zeng, Y. Wang, Y. Huang, X. Ding, J. Chen, a K. Xu, „Deep eutectic solvents as novel extraction media for protein partitioning", *Analyst*, roč. 139, č. 10, s. 2565, 2014, doi: 10.1039/c3an02235h.

- [128] S. S. Pawar, R. Iyyaswami, a P. D. Belur, „Reverse micellar extraction of lactoferrin from its synthetic solution using CTAB/n-heptanol system", *J Food Sci Technol*, roč. 54, č. 11, s. 3630–3639, říj. 2017, doi: 10.1007/s13197-017-2824-0.
- [129] Q.-T. Zhang *et al.*, „Functional properties and structure changes of soybean protein isolate after subcritical water treatment", *J Food Sci Technol*, kvě. 2014, doi: 10.1007/s13197-014-1392-9.
- [130] F. Guo, Y. L. Xiong, F. Qin, H. Jian, X. Huang, a J. Chen, „Surface Properties of Heat-Induced Soluble Soy Protein Aggregates of Different Molecular Masses", *Journal of Food Science*, roč. 80, č. 2, úno. 2015, doi: 10.1111/1750-3841.12761.
- [131] M. F. T. Reis, R. C. F. Bonomo, R. D. C. S. D. Sousa, C. M. Veloso, R. D. C. I. Fontan, a O. R. R. Gandolfi, „Optimization of protein extraction process from jackfruit seed flour by reverse micelle system", *Acta Sci. Technol.*, roč. 38, č. 3, s. 283, čer. 2016, doi: 10.4025/actascitechnol.v38i3.28111.
- [132] C.-H. Chan, R. Yusoff, G.-C. Ngoh, a F. W.-L. Kung, „Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants", *Journal of Chromatography A*, roč. 1218, č. 37, s. 6213–6225, zář. 2011, doi: 10.1016/j.chroma.2011.07.040.
- [133] A. Ochoa-Rivas, Y. Nava-Valdez, S. O. Serna-Saldívar, a C. Chuck-Hernández, „Microwave and Ultrasound to Enhance Protein Extraction from Peanut Flour under Alkaline Conditions: Effects in Yield and Functional Properties of Protein Isolates", *Food Bioprocess Technol*, roč. 10, č. 3, s. 543–555, bře. 2017, doi: 10.1007/s11947-016-1838-3.
- [134] M. Behere, S. S. Patil, a V. K. Rathod, „Rapid extraction of watermelon seed proteins using microwave and its functional properties", *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, roč. 51, č. 3, s. 252–259, bře. 2021, doi: 10.1080/10826068.2020.1808792.
- [135] S. Bedin, F. M. Netto, N. Bragagnolo, a O. P. Taranto, „Reduction of the process time in the achieve of rice bran protein through ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted extraction", *Separation Science and Technology*, roč. 55, č. 2, s. 300–312, led. 2020, doi: 10.1080/01496395.2019.1577449.
- [136] L. Wen *et al.*, „Optimisation and characterisation of protein extraction from coffee silverskin assisted by ultrasound or microwave techniques", *Biomass Conv. Bioref.*, roč. 11, č. 5, s. 1575–1585, říj. 2021, doi: 10.1007/s13399-020-00712-2.
- [137] Y. Picó, „Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, roč. 43, s. 84–99, úno. 2013, doi: 10.1016/j.trac.2012.12.005.
- [138] L. P. Martínez-Padilla, F. S. Hernández-Rojas, M. G. Sosa-Herrera, a P. Juliano, „Novel application of ultrasound and microwave-assisted methods for aqueous extraction of coconut oil and proteins", *J Food Sci Technol*, roč. 59, č. 10, s. 3857–3866, říj. 2022, doi: 10.1007/s13197-022-05409-0.
- [139] H. Wijngaard, M. B. Hossain, D. K. Rai, a N. Brunton, „Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin", *Food Research International*, roč. 46, č. 2, s. 505–513, kvě. 2012, doi: 10.1016/j.foodres.2011.09.027.
- [140] J. Švarc-Gajić, S. Morais, C. Delerue-Matos, E. F. Vieira, a G. Spigno, „Valorization Potential of Oilseed Cakes by Subcritical Water Extraction", *Applied Sciences*, roč. 10, č. 24, s. 8815, pro. 2020, doi: 10.3390/app10248815.
- [141] L. Du, P. J. Arauzo, M. F. Meza Zavala, Z. Cao, M. P. Olszewski, a A. Kruse, „Towards the Properties of Different Biomass-Derived Proteins via Various Extraction Methods", *Molecules*, roč. 25, č. 3, s. 488, led. 2020, doi: 10.3390/molecules25030488.
- [142] C. R. N. Gereniu, P. S. Saravana, A. T. Getachew, a B.-S. Chun, „Characteristics of functional materials recovered from Solomon Islands red seaweed (*Kappaphycus alvarezii*) using pressurized hot water extraction", *J Appl Phycol*, roč. 29, č. 3, s. 1609–1621, čer. 2017, doi: 10.1007/s10811-017-1052-3.

- [143] S. A. Khan, R. Aslam, a H. A. Makroo, „High pressure extraction and its application in the extraction of bio-active compounds: A review", *J Food Process Engineering*, roč. 42, č. 1, s. e12896, úno. 2019, doi: 10.1111/jfpe.12896.
- [144] R. Chen, F. Meng, S. Zhang, a Z. Liu, „Effects of ultrahigh pressure extraction conditions on yields and antioxidant activity of ginsenoside from ginseng", *Separation and Purification Technology*, roč. 66, č. 2, s. 340–346, dub. 2009, doi: 10.1016/j.seppur.2008.12.026.
- [145] G. Fayaz, S. Plazzotta, S. Calligaris, L. Manzocco, a M. C. Nicoli, „Impact of high pressure homogenization on physical properties, extraction yield and biopolymer structure of soybean okara", *LWT*, roč. 113, s. 108324, říj. 2019, doi: 10.1016/j.lwt.2019.108324.
- [146] 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.
- [147] 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.
- [148] M. M. A. N. Ranjha *et al.*, „A Critical Review on Pulsed Electric Field: A Novel Technology for the Extraction of Phytoconstituents", *Molecules*, roč. 26, č. 16, s. 4893, srp. 2021, doi: 10.3390/molecules26164893.
- [149] O. O. Olatunde a S. Benjakul, „Nonthermal Processes for Shelf-Life Extension of Seafoods: A Revisit", *Comp Rev Food Sci Food Safe*, roč. 17, č. 4, s. 892–904, čvc. 2018, doi: 10.1111/1541-4337.12354.
- [150] Y. Li, Z. Chen, a H. Mo, „Effects of pulsed electric fields on physicochemical properties of soybean protein isolates", *LWT - Food Science and Technology*, roč. 40, č. 7, s. 1167–1175, zář. 2007, doi: 10.1016/j.lwt.2006.08.015.
- [151] X. Yu, O. Bals, N. Grimi, a E. Vorobiev, „A new way for the oil plant biomass valorization: Polyphenols and proteins extraction from rapeseed stems and leaves assisted by pulsed electric fields", *Industrial Crops and Products*, roč. 74, s. 309–318, lis. 2015, doi: 10.1016/j.indcrop.2015.03.045.
- [152] A. N. A. Aryee, D. Agyei, a C. C. Udenigwe, „Impact of processing on the chemistry and functionality of food proteins", in *Proteins in Food Processing*, Elsevier, 2018, s. 27–45. doi: 10.1016/B978-0-08-100722-8.00003-6.
- [153] S. Miao a Q. Tang, „Plant protein powders", in *Handbook of Food Powders*, Elsevier, 2024, s. 521–542. doi: 10.1016/B978-0-323-98820-9.00016-8.
- [154] Z. Liu *et al.*, „The properties of plant-based protein particles with co-spray drying agents", *Journal of Food Engineering*, s. 111961, led. 2024, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2024.111961.
- [155] 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.
- [156] 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.
- [157] F. Mariotti a C. D. Gardner, „Dietary Protein and Amino Acids in Vegetarian Diets—A Review", *Nutrients*, roč. 11, č. 11, s. 2661, lis. 2019, doi: 10.3390/nu11112661.

- [158] 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.
- [159] 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.
- [160] 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.
- [161] 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.
- [162] I. Joye, „Protein Digestibility of Cereal Products”, *Foods*, roč. 8, č. 6, s. 199, čer. 2019, doi: 10.3390/foods8060199.
- [163] A. Torcello-Gómez *et al.*, „Human gastrointestinal conditions affect *in vitro* digestibility of peanut and bread proteins”, *Food Funct.*, roč. 11, č. 8, s. 6921–6932, 2020, doi: 10.1039/D0FO01451F.
- [164] Y. Xie *et al.*, „Real meat and plant-based meat analogues have different *in vitro* protein digestibility properties”, *Food Chemistry*, roč. 387, s. 132917, zář. 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.132917.
- [165] 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.
- [166] T. T. P. Nguyen, B. Bhandari, J. Cichero, a S. Prakash, „Gastrointestinal digestion of dairy and soy proteins in infant formulas: An *in vitro* study”, *Food Research International*, roč. 76, s. 348–358, říj. 2015, doi: 10.1016/j.foodres.2015.07.030.
- [167] 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.
- [168] M. Cheryan a J. J. Rackis, „Phytic acid interactions in food systems”, *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, roč. 13, č. 4, s. 297–335, pro. 1980, doi: 10.1080/10408398009527293.
- [169] S. Multari, D. Stewart, a W. R. Russell, „Potential of Fava Bean as Future Protein Supply to Partially Replace Meat Intake in the Human Diet”, *Comp Rev Food Sci Food Safe*, roč. 14, č. 5, s. 511–522, zář. 2015, doi: 10.1111/1541-4337.12146.
- [170] A. Chouchene, V. Micard, a V. Lullien-Pellerin, „Evidence of a Synergistic Effect between Pea Seed and Wheat Grain Endogenous Phytase Activities”, *J. Agric. Food Chem.*, roč. 66, č. 45, s. 12034–12041, lis. 2018, doi: 10.1021/acs.jafc.8b03803.
- [171] G. Sarwar, „The Protein Digestibility–Corrected Amino Acid Score Method Overestimates Quality of Proteins Containing Antinutritional Factors and of Poorly Digestible Proteins Supplemented with Limiting Amino Acids in Rats”, *The Journal of Nutrition*, roč. 127, č. 5, s. 758–764, kvě. 1997, doi: 10.1093/jn/127.5.758.
- [172] G. S. Gilani, K. A. Cockell, a E. Sepehr, „Effects of Antinutritional Factors on Protein Digestibility and Amino Acid Availability in Foods”, *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, roč. 88, č. 3, s. 967–987, kvě. 2005, doi: 10.1093/jaoac/88.3.967.
- [173] Y. Boirie, M. Dangin, P. Gachon, M.-P. Vasson, J.-L. Maubois, a B. Beaufrère, „Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion”, *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. U.S.A.*, roč. 94, č. 26, s. 14930–14935, pro. 1997, doi: 10.1073/pnas.94.26.14930.
- [174] C. Bos *et al.*, „Postprandial Kinetics of Dietary Amino Acids Are the Main Determinant of Their Metabolism after Soy or Milk Protein Ingestion in Humans“, *The Journal of Nutrition*, roč. 133, č. 5, s. 1308–1315, kvě. 2003, doi: 10.1093/jn/133.5.1308.
- [175] J. E. Tang, D. R. Moore, G. W. Kujbida, M. A. Tarnopolsky, a S. M. Phillips, „Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men“, *Journal of Applied Physiology*, roč. 107, č. 3, s. 987–992, zář. 2009, doi: 10.1152/jappphysiol.00076.2009.
- [176] G. Schaafsma, „The Protein Digestibility–Corrected Amino Acid Score“, *The Journal of Nutrition*, roč. 130, č. 7, s. 1865S–1867S, čvc. 2000, doi: 10.1093/jn/130.7.1865S.
- [177] S. M. Hodgkinson a A. J. Darragh, „Quantifying the Digestibility of Dietary Protein“, *The Journal of Nutrition*, roč. 130, č. 7, s. 1850S–1856S, čvc. 2000, doi: 10.1093/jn/130.7.1850S.
- [178] M. G. Nosworthy, G. Medina, Z.-H. Lu, a J. D. House, „Plant Proteins: Methods of Quality Assessment and the Human Health Benefits of Pulses“, *Foods*, roč. 12, č. 15, s. 2816, čvc. 2023, doi: 10.3390/foods12152816.
- [179] M. G. Nosworthy, J. Neufeld, P. Frohlich, G. Young, L. Malcolmson, a J. D. House, „Determination of the protein quality of cooked Canadian pulses“, *Food Science & Nutrition*, roč. 5, č. 4, s. 896–903, čvc. 2017, doi: 10.1002/fsn3.473.
- [180] C. P. F. Marinangeli a J. D. House, „Potential impact of the digestible indispensable amino acid score as a measure of protein quality on dietary regulations and health“, *Nutrition Reviews*, roč. 75, č. 8, s. 658–667, srp. 2017, doi: 10.1093/nutrit/nux025.
- [181] K. K. Ma, M. Greis, J. Lu, A. A. Nolden, D. J. McClements, a A. J. Kinchla, „Functional Performance of Plant Proteins“, *Foods*, roč. 11, č. 4, s. 594, úno. 2022, doi: 10.3390/foods11040594.
- [182] 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.
- [183] J. F. Zayas, *Functionality of proteins in food: with 86 figures and 21 tables*, Softcover reprint of the hardcover 1st edition 1997. Berlin Heidelberg: Springer Berlin, 1997.
- [184] A. E. Hall a C. I. Moraru, „Structure and function of pea, lentil and faba bean proteins treated by high pressure processing and heat treatment“, *LWT*, roč. 152, s. 112349, pro. 2021, doi: 10.1016/j.lwt.2021.112349.
- [185] T. Dzudie, J. Scher, a J. Hardy, „Common bean flour as an extender in beef sausages“, *Journal of Food Engineering*, roč. 52, č. 2, s. 143–147, dub. 2002, doi: 10.1016/S0260-8774(01)00096-6.
- [186] W. G. Thushan Sanjeeva, J. P. D. Wanasundara, Z. Pietrasik, a P. J. Shand, „Characterization of chickpea (*Cicer arietinum* L.) flours and application in low-fat pork bologna as a model system“, *Food Research International*, roč. 43, č. 2, s. 617–626, bř. 2010, doi: 10.1016/j.foodres.2009.07.024.
- [187] A. Shoaib, A. Sahar, A. Sameen, A. Saleem, a A. T. Tahir, „Use of pea and rice protein isolates as source of meat extenders in the development of chicken nuggets“, *J Food Process Preserv*, roč. 42, č. 9, s. e13763, zář. 2018, doi: 10.1111/jfpp.13763.
- [188] S. Samard a G. Ryu, „Physicochemical and functional characteristics of plant protein-based meat analogs“, *J Food Process Preserv*, roč. 43, č. 10, říj. 2019, doi: 10.1111/jfpp.14123.
- [189] B. W. Matthews, „Hydrophobic Interactions in Proteins“, in *Encyclopedia of Life Sciences*, 1. vyd., Wiley, 2001. doi: 10.1038/npg.els.0002975.

- [190] L. Grossmann a D. J. McClements, „Current insights into protein solubility: A review of its importance for alternative proteins", *Food Hydrocolloids*, roč. 137, s. 108416, dub. 2023, doi: 10.1016/j.foodhyd.2022.108416.
- [191] L. Jiang *et al.*, „Relationship Between Surface Hydrophobicity and Structure of Soy Protein Isolate Subjected to Different Ionic Strength", *International Journal of Food Properties*, roč. 18, č. 5, s. 1059–1074, kvě. 2015, doi: 10.1080/10942912.2013.865057.
- [192] H.-N. Xu, Y. Liu, a L. Zhang, „Salting-out and salting-in: competitive effects of salt on the aggregation behavior of soy protein particles and their emulsifying properties", *Soft Matter*, roč. 11, č. 29, s. 5926–5932, 2015, doi: 10.1039/C5SM00954E.
- [193] Y. J. Yuan, O. D. Velev, K. Chen, B. E. Campbell, E. W. Kaler, a A. M. Lenhoff, „Effect of pH and Ca²⁺-Induced Associations of Soybean Proteins", *J. Agric. Food Chem.*, roč. 50, č. 17, s. 4953–4958, srp. 2002, doi: 10.1021/jf025582d.
- [194] S. E. Molina Ortiz a J. R. Wagner, „Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties", *Food Research International*, roč. 35, č. 6, s. 511–518, led. 2002, doi: 10.1016/S0963-9969(01)00149-1.
- [195] O. S. Lawal a K. O. Adebowale, „Effect of acetylation and succinylation on solubility profile, water absorption capacity, oil absorption capacity and emulsifying properties of mucuna bean (*Mucuna pruriens*) protein concentrate", *Nahrung*, roč. 48, č. 2, s. 129–136, dub. 2004, doi: 10.1002/food.200300384.
- [196] P. S. Bora, „Functional properties of native and succinylated lentil (*Lens culinaris*) globulins", *Food Chemistry*, roč. 77, č. 2, s. 171–176, kvě. 2002, doi: 10.1016/S0308-8146(01)00332-6.
- [197] C. Puppo *et al.*, „Physicochemical Modifications of High-Pressure-Treated Soybean Protein Isolates", *J. Agric. Food Chem.*, roč. 52, č. 6, s. 1564–1571, bre. 2004, doi: 10.1021/jf034813t.
- [198] M. A. Malik, H. K. Sharma, a C. S. Saini, „High intensity ultrasound treatment of protein isolate extracted from dephenolized sunflower meal: Effect on physicochemical and functional properties", *Ultrasonics Sonochemistry*, roč. 39, s. 511–519, lis. 2017, doi: 10.1016/j.ultsonch.2017.05.026.
- [199] L. Jiang *et al.*, „Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates", *Food Research International*, roč. 62, s. 595–601, srp. 2014, doi: 10.1016/j.foodres.2014.04.022.
- [200] S. Damodaran, „Protein Stabilization of Emulsions and Foams", *Journal of Food Science*, roč. 70, č. 3, s. R54–R66, kvě. 2006, doi: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb07150.x.
- [201] P. A. Wierenga a H. Gruppen, „New views on foams from protein solutions", *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, roč. 15, č. 5, s. 365–373, říj. 2010, doi: 10.1016/j.cocis.2010.05.017.
- [202] M. Ahmedna, W. Prinyawiwatkul, a R. M. Rao, „Solubilized Wheat Protein Isolate: Functional Properties and Potential Food Applications", *J. Agric. Food Chem.*, roč. 47, č. 4, s. 1340–1345, dub. 1999, doi: 10.1021/jf981098s.
- [203] R. E. Aluko a R. Y. Yada, „Some Physicochemical and Functional Properties of Cowpea (*Vigna Unguiculata*) Isoelectric Protein Isolate as a Function of PH and Salt Concentration", *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, roč. 48, č. 1, s. 31–39, led. 1997, doi: 10.3109/09637489709006961.
- [204] R. Sousa, R. Portmann, S. Dubois, I. Recio, a L. Egger, „Protein digestion of different protein sources using the INFOGEST static digestion model", *Food Research International*, roč. 130, s. 108996, dub. 2020, doi: 10.1016/j.foodres.2020.108996.
- [205] M. Barać *et al.*, „Functional Properties of Pea (*Pisum sativum*, L.) Protein Isolates Modified with Chymosin", *IJMS*, roč. 12, č. 12, s. 8372–8387, lis. 2011, doi: 10.3390/ijms12128372.

- [206] J. Ren, C.-L. Song, H.-Y. Zhang, N.-K. Kopparapu, a X.-Q. Zheng, „Effect of Hydrolysis Degree on Structural and Interfacial Properties of Sunflower Protein Isolates: STRUCTURAL AND INTERFACIAL PROPERTIES OF SUNFLOWER PROTEIN ISOLATES HYDROLYSATES", *Journal of Food Processing and Preservation*, roč. 41, č. 1, s. e13092, úno. 2017, doi: 10.1111/jfpp.13092.
- [207] K. D. Martínez, C. Carrera Sánchez, J. M. Rodríguez Patino, a A. M. R. Pilosof, „Interfacial and foaming properties of soy protein and their hydrolysates", *Food Hydrocolloids*, roč. 23, č. 8, s. 2149–2157, pro. 2009, doi: 10.1016/j.foodhyd.2009.03.015.
- [208] R. Morales, K. D. Martínez, V. M. Pizones Ruiz-Henestrosa, a A. M. R. Pilosof, „Modification of foaming properties of soy protein isolate by high ultrasound intensity: Particle size effect", *Ultrasonics Sonochemistry*, roč. 26, s. 48–55, zář. 2015, doi: 10.1016/j.ultsonch.2015.01.011.
- [209] Q. Zhang *et al.*, „Protein glycosylation: a promising way to modify the functional properties and extend the application in food system", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, roč. 59, č. 15, s. 2506–2533, srp. 2019, doi: 10.1080/10408398.2018.1507995.
- [210] Y. Shao, K. Lin, a Y. Kao, „Modification of Foaming Properties of Commercial Soy Protein Isolates and Concentrates by Heat Treatments", *Journal of Food Quality*, roč. 39, č. 6, s. 695–706, pro. 2016, doi: 10.1111/jfq.12241.
- [211] K. D. Martínez, M. E. Farías, a A. M. R. Pilosof, „Effects of soy protein hydrolysis and polysaccharides addition on foaming properties studied by cluster analysis", *Food Hydrocolloids*, roč. 25, č. 7, s. 1667–1676, říj. 2011, doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.03.005.
- [212] R. S. H. Lam a M. T. Nickerson, „Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure–function approach", *Food Chemistry*, roč. 141, č. 2, s. 975–984, lis. 2013, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.04.038.
- [213] D. J. McClements, „Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, roč. 47, č. 7, s. 611–649, zář. 2007, doi: 10.1080/10408390701289292.
- [214] M. Padial-Domínguez, F. J. Espejo-Carpio, R. Pérez-Gálvez, A. Guadix, a E. M. Guadix, „Optimization of the Emulsifying Properties of Food Protein Hydrolysates for the Production of Fish Oil-in-Water Emulsions", *Foods*, roč. 9, č. 5, s. 636, kvě. 2020, doi: 10.3390/foods9050636.
- [215] W. Peng, X. Kong, Y. Chen, C. Zhang, Y. Yang, a Y. Hua, „Effects of heat treatment on the emulsifying properties of pea proteins", *Food Hydrocolloids*, roč. 52, s. 301–310, led. 2016, doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.06.025.
- [216] D. Chao a R. E. Aluko, „Modification of the structural, emulsifying, and foaming properties of an isolated pea protein by thermal pretreatment", *CyTA - Journal of Food*, roč. 16, č. 1, s. 357–366, led. 2018, doi: 10.1080/19476337.2017.1406536.
- [217] K. Bandyopadhyay, G. Misra, a S. Ghosh, „Preparation and Characterisation of Protein Hydrolysates from Indian Defatted Rice Bran Meal", *J. Oleo Sci.*, roč. 57, č. 1, s. 47–52, 2008, doi: 10.5650/jos.57.47.
- [218] A. Totosaus, J. G. Montejano, J. A. Salazar, a I. Guerrero, „A review of physical and chemical protein-gel induction", *Int J of Food Sci Tech*, roč. 37, č. 6, s. 589–601, srp. 2002, doi: 10.1046/j.1365-2621.2002.00623.x.
- [219] F. Speroni, S. Jung, a M. De Lamballerie, „Effects of Calcium and Pressure Treatment on Thermal Gelation of Soybean Protein", *Journal of Food Science*, roč. 75, č. 1, led. 2010, doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01390.x.
- [220] A. G. B. Wouters, I. Rombouts, E. Fierens, K. Brijs, a J. A. Delcour, „Relevance of the Functional Properties of Enzymatic Plant Protein Hydrolysates in Food Systems", *Comp*

- Rev Food Sci Food Safe*, roč. 15, č. 4, s. 786–800, čvc. 2016, doi: 10.1111/1541-4337.12209.
- [221] N. Murekatete, Y. Hua, M. V. M. Chamba, O. Djakpo, a C. Zhang, „Gelation Behavior and Rheological Properties of Salt- or Acid-Induced Soy Proteins Soft Tofu-Type Gels", *Journal of Texture Studies*, roč. 45, č. 1, s. 62–73, úno. 2014, doi: 10.1111/jtxs.12052.
- [222] N. Chen, M. Zhao, F. Niepceron, T. Nicolai, a C. Chassenieux, „The effect of the pH on thermal aggregation and gelation of soy proteins", *Food Hydrocolloids*, roč. 66, s. 27–36, kvě. 2017, doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.12.006.
- [223] A. P. Batista, C. A. M. Portugal, I. Sousa, J. G. Crespo, a A. Raymundo, „Assessing gelling ability of vegetable proteins using rheological and fluorescence techniques", *International Journal of Biological Macromolecules*, roč. 36, č. 3, s. 135–143, srp. 2005, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2005.04.003.
- [224] N. Montellano Duran, D. Spelzini, a V. Boeris, „Characterization of acid – Induced gels of quinoa proteins and carrageenan", *LWT*, roč. 108, s. 39–47, čvc. 2019, doi: 10.1016/j.lwt.2019.03.052.
- [225] T. V. Nieto-Nieto, Y. X. Wang, L. Ozimek, a L. Chen, „Inulin at low concentrations significantly improves the gelling properties of oat protein – A molecular mechanism study", *Food Hydrocolloids*, roč. 50, s. 116–127, srp. 2015, doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.03.031.
- [226] R. Coorey, A. Tjoe, a V. Jayasena, „Gelling Properties of Chia Seed and Flour", *Journal of Food Science*, roč. 79, č. 5, kvě. 2014, doi: 10.1111/1750-3841.12444.
- [227] „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
- [228] 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>
- [229] M. Berners-Lee, C. Kennelly, R. Watson, a C. N. Hewitt, „Current global food production is sufficient to meet human nutritional needs in 2050 provided there is radical societal adaptation", *Elementa: Science of the Anthropocene*, roč. 6, s. 52, led. 2018, doi: 10.1525/elementa.310.
- [230] B. L. Dekkers, R. M. Boom, a A. J. Van Der Goot, „Structuring processes for meat analogues", *Trends in Food Science & Technology*, roč. 81, s. 25–36, lis. 2018, doi: 10.1016/j.tifs.2018.08.011.
- [231] S. Avilés-Gaxiola, C. Chuck-Hernández, a S. O. Serna Saldívar, „Inactivation Methods of Trypsin Inhibitor in Legumes: A Review", *Journal of Food Science*, roč. 83, č. 1, s. 17–29, led. 2018, doi: 10.1111/1750-3841.13985.
- [232] B. Plattner, „Extrusion Techniques for Meat Analogues", *CFW*, roč. 65, č. 4, 2020, doi: 10.1094/CFW-65-4-0043.
- [233] C. L. Salgado, R. Muñoz, A. Blanco, a M. E. Lienqueo, „Valorization and upgrading of the nutritional value of seaweed and seaweed waste using the marine fungi *Paradendryphiella salina* to produce mycoprotein", *Algal Research*, roč. 53, s. 102135, bře. 2021, doi: 10.1016/j.algal.2020.102135.
- [234] F. Stoffel, W. D. O. Santana, J. G. N. Gregolon, T. B. L. Kist, R. C. Fontana, a M. Camassola, „Production of edible mycoprotein using agroindustrial wastes: Influence on nutritional, chemical and biological properties", *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, roč. 58, s. 102227, pro. 2019, doi: 10.1016/j.ifset.2019.102227.

- [235] F. Saeed *et al.*, „Role of mycoprotein as a non-meat protein in food security and sustainability: a review", *International Journal of Food Properties*, roč. 26, č. 1, s. 683–695, zář. 2023, doi: 10.1080/10942912.2023.2178456.
- [236] R. Majumder, S. Miatur, A. Saha, a S. Hossain, „Mycoprotein: production and nutritional aspects: a review", *Sustainable Food Technol.*, roč. 2, č. 1, s. 81–91, 2024, doi: 10.1039/D3FB00169E.
- [237] M. I. Ahmad, S. Farooq, Y. Alhamoud, C. Li, a H. Zhang, „A review on mycoprotein: History, nutritional composition, production methods, and health benefits", *Trends in Food Science & Technology*, roč. 121, s. 14–29, bře. 2022, doi: 10.1016/j.tifs.2022.01.027.
- [238] 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.
- [239] 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.
- [240] 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.
- [241] 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.
- [242] 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.
- [243] 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.
- [244] 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.
- [245] 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.
- [246] 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.
- [247] 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.
- [248] 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.
- [249] 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.
- [250] 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.

- [251] 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.
- [252] P. L. Kirk, „Kjeldahl Method for Total Nitrogen", *Anal. Chem.*, roč. 22, č. 2, s. 354–358, úno. 1950, doi: 10.1021/ac60038a038.
- [253] M. Hayes, „Measuring Protein Content in Food: An Overview of Methods", *Foods*, roč. 9, č. 10, s. 1340, zář. 2020, doi: 10.3390/foods9101340.
- [254] B. D. Jones, „Factors for converting percentage of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins", *DC US Department of Agriculture-circ.*, č. 183, 1941.
- [255] S. Fujihara, H. Sasaki, Y. Aoyagi, a T. Sugahara, „Nitrogen-to-Protein Conversion Factors for Some Cereal Products in Japan", *Journal of Food Science*, roč. 73, č. 3, dub. 2008, doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00665.x.
- [256] S. Fujihara, A. Kasuga, a Y. Aoyagi, „Nitrogen-to-Protein Conversion Factors for Common Vegetables in Japan", *Journal of Food Science*, roč. 66, č. 3, s. 412–415, dub. 2001, doi: 10.1111/j.1365-2621.2001.tb16119.x.
- [257] W. C. MacLean, P. Warwick, a Food and Agriculture Organization of the United Nations, Ed., *Food energy: methods of analysis and conversion factors: report of a technical workshop, Rome, 3-6 December 2002*. in FAO food and nutrition paper, no. 77. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2003.
- [258] J. Price, „CHNS Elemental Analysers", *TB v*, 2008.
- [259] U. K. Laemmli, „Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", *Nature*, roč. 227, č. 5259, s. 680–685, srp. 1970, doi: 10.1038/227680a0.
- [260] L. Garca-Descalzo, E. Garca-Lpez, A. Alczar, F. Baquero, a C. Ci, „Gel Electrophoresis of Proteins", in *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*, S. Magdeldin, Ed., InTech, 2012. doi: 10.5772/37514.
- [261] A. Rath, F. Cunningham, a C. M. Deber, „Acrylamide concentration determines the direction and magnitude of helical membrane protein gel shifts", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, roč. 110, č. 39, s. 15668–15673, zář. 2013, doi: 10.1073/pnas.1311305110.
- [262] M. M. Nielsen, K. K. Andersen, P. Westh, a D. E. Otzen, „Unfolding of β -Sheet Proteins in SDS", *Biophysical Journal*, roč. 92, č. 10, s. 3674–3685, kvě. 2007, doi: 10.1529/biophysj.106.101238.
- [263] S. F. De St. Groth, R. G. Webster, a A. Datyner, „Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips", *Biochimica et Biophysica Acta*, roč. 71, s. 377–391, 1963, doi: 10.1016/0006-3002(63)91092-8.
- [264] „Protein Electrophoresis and Blotting Instruments". BioRad, 2024. [Online]. Dostupné z: <https://www.bio-rad.com/en-cz/category/protein-electrophoresis-blotting-instruments?ID=f0b23a76-b8f1-4cd0-aaa0-1a88d7dab136>
- [265] M. Sibte-Abbas, M. Sadiq Butt, M. N. Riaz, T. Fikre Teferra, a I. Ul-Haq, „Amino Acid Profiling and SDS-PAGE Analysis of Protein Isolates Obtained from Nonconventional Sources", *Journal of Food Quality*, roč. 2022, s. 1–7, srp. 2022, doi: 10.1155/2022/1926527.
- [266] M. Gordalina, H. M. Pinheiro, M. Mateus, M. M. R. Da Fonseca, a M. T. Cesário, „Macroalgae as Protein Sources—A Review on Protein Bioactivity, Extraction, Purification and Characterization", *Applied Sciences*, roč. 11, č. 17, s. 7969, srp. 2021, doi: 10.3390/app11177969.
- [267] A. Di Francesco *et al.*, „Mass Spectrometry Characterization of the SDS-PAGE Protein Profile of Legumins and Vicilins from Chickpea Seed", *Foods*, roč. 13, č. 6, s. 887, bř. 2024, doi: 10.3390/foods13060887.

- [268] E. A. Wistaff, S. Beller, A. Schmid, J. J. Neville, a T. Nietner, „Chemometric analysis of amino acid profiles for detection of fruit juice adulterations – Application to verify authenticity of blood orange juice", *Food Chemistry*, roč. 343, s. 128452, kvě. 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128452.
- [269] B. P. Ismail a S. S. Nielsen, Ed., *Nielsen's Food Analysis*. in Food Science Text Series. Cham: Springer International Publishing, 2024. doi: 10.1007/978-3-031-50643-7.
- [270] R. J. Simpson, M. R. Neuberger, a T. Y. Liu, „Complete amino acid analysis of proteins from a single hydrolysate.", *Journal of Biological Chemistry*, roč. 251, č. 7, s. 1936–1940, dub. 1976, doi: 10.1016/S0021-9258(17)33637-2.
- [271] R. McGrath, „Protein measurement by ninhydrin determination of amino acids released by alkaline hydrolysis", *Analytical Biochemistry*, roč. 49, č. 1, s. 95–102, zář. 1972, doi: 10.1016/0003-2697(72)90245-X.
- [272] B. Caballero, L. C. Trugo, a P. M. Finglas, *Encyclopedia of food sciences and nutrition*, 2nd ed. Amsterdam New York: Academic Press, 2003.
- [273] J. J. Kaneko, J. W. Harvey, a M. Bruss, *Clinical biochemistry of domestic animals*, 6th ed. Amsterdam Boston: Academic Press/Elsevier, 2008.
- [274] K. Kabaha, A. Taralp, I. Cakmak, a L. Ozturk, „Accelerated Hydrolysis Method To Estimate the Amino Acid Content of Wheat (*Triticum durum* Desf.) Flour Using Microwave Irradiation", *J. Agric. Food Chem.*, roč. 59, č. 7, s. 2958–2965, dub. 2011, doi: 10.1021/jf103678c.
- [275] Y. Pomeranz a C. E. Meloan, *Food analysis: theory and practice*, 3. ed. Gaithersburg, MD: Aspen Publ.
- [276] K. Záruba, *Analytická chemie*, Vydání první. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016.
- [277] J. Csapó, Cs. Albert, K. Lóki, a Zs. Csapó-Kiss, „Separation and determination of the amino acids by ion exchange column chromatography applying postcolumn derivatization", *Acta univ. sapientiar, alimentaria*, roč. 1, č. 5, s. 29, 2008.
- [278] C. Singh, C. S. Sharma, a P. R. Kamble, „Amino acid analysis using ion-exchange chromatography: a review", *IJP*, roč. 1, č. 9, doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.IJP.1(9).572-78.
- [279] J. W. Robinson, E. M. S. Frame, a G. M. Frame, *Instrumental analytical chemistry: an introduction*, First edition. Boca Raton: CRC Press, 2021.
- [280] L. Bosch, A. Alegria, a R. Farré, „RP-HPLC Determination of Tiger Nut and Orgeat Amino Acid Contents", *Food sci. technol. int.*, roč. 11, č. 1, s. 33–40, úno. 2005, doi: 10.1177/1082013205051266.
- [281] M. P. Bartolomeo a F. Maisano, „Validation of a Reversed-Phase HPLC Method for Quantitative Amino Acid Analysis", roč. 17, č. 2, 2006.
- [282] M. Kodíček, *Biochemické pojmy: výkladový slovník*, Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2004.
- [283] T. Alvarez-Segura, C. Camacho-Moliner, J. R. Torres-Lapasió, a M. C. García-Alvarez-Coque, „Analysis of amino acids using serially coupled columns", *J of Separation Science*, roč. 40, č. 13, s. 2741–2751, čvc. 2017, doi: 10.1002/jssc.201700334.
- [284] S. C. Moldoveanu a V. David, „Derivatization Methods in GC and GC/MS", in *Gas Chromatography - Derivatization, Sample Preparation, Application*, P. Kusch, Ed., IntechOpen, 2019. doi: 10.5772/intechopen.81954.
- [285] M. A. Alterman, Ed., *Amino acid analysis: methods and protocols*, Second edition. in *Methods in molecular biology*, no. 2030. New York: Humana Press, 2019.
- [286] J. Chow, J. B. Orenberg, a K. D. Nugent, „Comparison of automated pre-column and post-column analysis of amino acid oligomers", *Journal of Chromatography A*, roč. 386, s. 243–249, led. 1987, doi: 10.1016/S0021-9673(01)94601-1.

- [287] D. P. Manica, J. A. Lapos, A. Daniel Jones, a A. G. Ewing, „Analysis of the stability of amino acids derivatized with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde using high-performance liquid chromatography and mass spectrometry", *Analytical Biochemistry*, roč. 322, č. 1, s. 68–78, lis. 2003, doi: 10.1016/j.ab.2003.07.002.
- [288] D. Mou, „[Determination of amino acids by precolumn derivatization with o-phthaldialdehyde (OPA) and reversed-phase high performance liquid chromatography]", *Se Pu*, roč. 15, č. 4, s. 319–321, čvc. 1997.
- [289] A. Jámboř a I. Molnár-Perl, „Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride", *Journal of Chromatography A*, roč. 1216, č. 15, s. 3064–3077, dub. 2009, doi: 10.1016/j.chroma.2009.01.068.
- [290] P. G. Rigas, „REVIEW: LIQUID CHROMATOGRAPHY—POST-COLUMN DERIVATIZATION FOR AMINO ACID ANALYSIS: STRATEGIES, INSTRUMENTATION, AND APPLICATIONS", *Instrumentation Science & Technology*, roč. 40, č. 2–3, s. 161–193, bře. 2012, doi: 10.1080/10739149.2011.651669.
- [291] M. C. Miedel, J. D. Hulmes, a Y.-C. E. Pan, „The use of fluorescamine as a detection reagent in protein microcharacterization", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, roč. 18, č. 1, s. 37–52, úno. 1989, doi: 10.1016/0165-022X(89)90012-2.
- [292] J. Kaur, N. K. Rangra, a P. A. Chawla, „A comprehensive review on recent trends in amino acids detection through analytical techniques", *Separation Science Plus*, roč. 6, č. 11, s. 2300040, lis. 2023, doi: 10.1002/sscp.202300040.
- [293] A. Hesse a M. G. Weller, „Protein Quantification by Derivatization-Free High-Performance Liquid Chromatography of Aromatic Amino Acids", *Journal of Amino Acids*, roč. 2016, s. 1–8, čvc. 2016, doi: 10.1155/2016/7374316.
- [294] S. Eto, M. Yamaguchi, M. Bounoshita, T. Mizukoshi, a H. Miyano, „High-throughput comprehensive analysis of d- and l-amino acids using ultra-high performance liquid chromatography with a circular dichroism (CD) detector and its application to food samples", *Journal of Chromatography B*, roč. 879, č. 29, s. 3317–3325, lis. 2011, doi: 10.1016/j.jchromb.2011.07.025.
- [295] E. Tsochatzis, M. Papageorgiou, a S. Kalogiannis, „Validation of a HILIC UHPLC-MS/MS Method for Amino Acid Profiling in Triticum Species Wheat Flours", *Foods*, roč. 8, č. 10, s. 514, říj. 2019, doi: 10.3390/foods8100514.
- [296] Y. Liu *et al.*, „Recent advances in cyclodextrin-based films for food packaging", *Food Chemistry*, roč. 370, s. 131026, úno. 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2021.131026.
- [297] *Guidelines for Sensory Analysis in Food Product Development and Quality Control*. Cham: Springer International Publishing.
- [298] D. S. E. Kemp, D. T. Hollowood, a D. J. Hort, *Sensory Evaluation: A practical handbook*, 1. vyd. Wiley, 2009. doi: 10.1002/9781118688076.
- [299] S. Stolzenbach, W. L. P. Bredie, R. H. B. Christensen, a D. V. Byrne, „Impact of product information and repeated exposure on consumer liking, sensory perception and concept associations of local apple juice", *Food Research International*, roč. 52, č. 1, s. 91–98, čer. 2013, doi: 10.1016/j.foodres.2013.02.018.
- [300] M. C. Meilgaard, B. T. Carr, a B. T. Carr, *Sensory Evaluation Techniques*, 0 vyd. CRC Press, 2006. doi: 10.1201/b16452.
- [301] B. A. Rainey, „IMPORTANCE OF REFERENCE STANDARDS IN TRAINING PANELISTS", *Journal of Sensory Studies*, roč. 1, č. 2, s. 149–154, čer. 1986, doi: 10.1111/j.1745-459X.1986.tb00167.x.
- [302] J. F. Caul, „The Profile Method of Flavor Analysis", in *Advances in Food Research*, roč. 7, Elsevier, 1957, s. 1–40. doi: 10.1016/S0065-2628(08)60245-1.

- [303] 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.
- [304] D. D. Torrico, A. Mehta, a A. B. Borssato, „New methods to assess sensory responses: a brief review of innovative techniques in sensory evaluation“, *Current Opinion in Food Science*, roč. 49, s. 100978, úno. 2023, doi: 10.1016/j.cofs.2022.100978.
- [305] Z. Haddi *et al.*, „E-Nose and e-Tongue combination for improved recognition of fruit juice samples“, *Food Chemistry*, roč. 150, s. 246–253, kvě. 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.10.105.
- [306] Z. Zhu *et al.*, „Meat quality and flavor evaluation of Nanjing water boiled salted duck (NWSO) produced by different Muscovy duck (*Cairina moschata*) ingredients“, *Food Chemistry*, roč. 397, s. 133833, pro. 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.133833.
- [307] Í. M. G. Marx, S. Casal, N. Rodrigues, A. C. A. Veloso, J. A. Pereira, a A. M. Peres, „Estimating hydroxytyrosol-tyrosol derivatives amounts in cv. Cobrançosa olive oils based on the electronic tongue analysis of olive paste extracts“, *LWT*, roč. 147, s. 111542, čvc. 2021, doi: 10.1016/j.lwt.2021.111542.
- [308] *Nařízení Komise (ES) č. 152/2009 ze dne 27. ledna 2009, kterým se stanoví metody odběru vzorků a laboratorního zkoušení pro úřední kontrolu krmiv*. [Online]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=OJ:L:2009:054:FULL>
- [309] 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.
- [310] R. A. Siddiqi, T. P. Singh, M. Rani, a D. S. Sogi, „Electrophoretic characterization and proportion of different protein fractions in wheat cultivars of North-India“, *Journal of Agriculture and Food Research*, roč. 4, s. 100137, čer. 2021, doi: 10.1016/j.jafr.2021.100137.
- [311] 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.
- [312] M. Nadeem, F. M. Anjum, M. R. Khan, M. Sajjad, S. Hussain, a M. S. Arshad, „Electrophoretic Characteristics of Gluten Proteins as Influenced by Crop Year and Variety“, *International Journal of Food Properties*, roč. 19, č. 4, s. 897–910, dub. 2016, doi: 10.1080/10942912.2015.1045518.
- [313] I. González-Thuillier *et al.*, „Distribution of Lipids in the Grain of Wheat (cv. Hereward) Determined by Lipidomic Analysis of Milling and Pearling Fractions“, *J. Agric. Food Chem.*, roč. 63, č. 49, s. 10705–10716, pro. 2015, doi: 10.1021/acs.jafc.5b05289.
- [314] 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.
- [315] 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“.
- [316] 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.
- [317] H. Chen, „Chemical Composition and Structure of Natural Lignocellulose“, in *Biotechnology of Lignocellulose*, Dordrecht: Springer Netherlands, 2014, s. 25–71. doi: 10.1007/978-94-007-6898-7_2.
- [318] 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.
- [319] 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.
- [320] 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.
- [321] K. Jakobson *et al.*, „Techno-Functional and Sensory Characterization of Commercial Plant Protein Powders", *Foods*, roč. 12, č. 14, s. 2805, čvc. 2023, doi: 10.3390/foods12142805.
- [322] K. N. Fyfe, O. Kravchuk, T. Le, H. C. Deeth, A. V. Nguyen, a B. Bhandari, „Storage induced changes to high protein powders: influence on surface properties and solubility", *J Sci Food Agric*, roč. 91, č. 14, s. 2566–2575, lis. 2011, doi: 10.1002/jsfa.4461.
- [323] P. Zhou a T. P. Labuza, „Effect of Water Content on Glass Transition and Protein Aggregation of Whey Protein Powders During Short-Term Storage", *Food Biophysics*, roč. 2, č. 2–3, s. 108–116, zář. 2007, doi: 10.1007/s11483-007-9037-4.
- [324] K. O. Adebawale, B. I. Olu-Owolabi, a O. O. Olayinka, „Effect of heat moisture treatment and annealing on physicochemical properties of red sorghum starch".
- [325] O. O. Olayinka, K. O. Adebawale, a I. B. Olu-Owolabi, „Physicochemical properties, morphological and X-ray pattern of chemically modified white sorghum starch. (Bicolor-Moench)", *J Food Sci Technol*, roč. 50, č. 1, s. 70–77, úno. 2013, doi: 10.1007/s13197-011-0233-3.
- [326] J. Dear, „A rapid degradation of starch at hardening temperatures", *Cryobiology*, roč. 10, č. 1, s. 78–81, dub. 1973, doi: 10.1016/0011-2240(73)90010-2.
- [327] 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.
- [328] J. Örnebro, M. Wahlgren, A.-C. Eliasson, R. J. Fido, a A. S. Tatham, „Adsorption of α -, β -, γ - and ω -Gliadins onto Hydrophobic Surfaces", *Journal of Cereal Science*, roč. 30, č. 2, s. 105–114, zář. 1999, doi: 10.1006/jcrs.1999.0270.
- [329] T. Zhang *et al.*, „Effect of pH treatment on egg white protein digestion and the peptidomics of their in vitro digests", *Food Research International*, roč. 173, s. 113327, lis. 2023, doi: 10.1016/j.foodres.2023.113327.
- [330] D. Xiong *et al.*, „Mechanism of improving solubility and emulsifying properties of wheat gluten protein by pH cycling treatment and its application in powder oils", *Food Hydrocolloids*, roč. 135, s. 108132, úno. 2023, doi: 10.1016/j.foodhyd.2022.108132.
- [331] P. Shewry, „What Is Gluten—Why Is It Special?", *Front. Nutr.*, roč. 6, s. 101, čvc. 2019, doi: 10.3389/fnut.2019.00101.
- [332] 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.
- [333] M. Krajcovicova-Kudlackova, K. Babinska, a M. Valachovicova, „Health benefits and risks of plant proteins", *Bratisl Lek Listy*, roč. 106, č. 6–7, s. 231–234, 2005.
- [334] R. Amir, „Current understanding of the factors regulating methionine content in vegetative tissues of higher plants", *Amino Acids*, roč. 39, č. 4, s. 917–931, říj. 2010, doi: 10.1007/s00726-010-0482-x.
- [335] G. Galili, R. Amir, a A. R. Fernie, „The Regulation of Essential Amino Acid Synthesis and Accumulation in Plants", *Annu. Rev. Plant Biol.*, roč. 67, č. 1, s. 153–178, dub. 2016, doi: 10.1146/annurev-arplant-043015-112213.
- [336] I. Leinonen, P. P. M. Iannetta, R. M. Rees, W. Russell, C. Watson, a A. P. Barnes, „Lysine Supply Is a Critical Factor in Achieving Sustainable Global Protein Economy", *Front. Sustain. Food Syst.*, roč. 3, s. 27, dub. 2019, doi: 10.3389/fsufs.2019.00027.

- [337] A. Mustafa, M. Imran, M. Ashraf, a K. Mahmood, „Perspectives of Using L-Tryptophan for Improving Productivity of Agricultural Crops: A Review", *Pedosphere*, roč. 28, č. 1, s. 16–34, úno. 2018, doi: 10.1016/S1002-0160(18)60002-5.
- [338] D. M. Richard, M. A. Dawes, C. W. Mathias, A. Acheson, N. Hill-Kapturczak, a D. M. Dougherty, „L -Tryptophan: Basic Metabolic Functions, Behavioral Research and Therapeutic Indications", *Int J \blacklozenge Tryptophan \blacklozenge Res*, roč. 2, s. IJTR.S2129, led. 2009, doi: 10.4137/IJTR.S2129.
- [339] Food and Agriculture Organization of the United Nations, Ed., *Dietary protein quality evaluation in human nutrition: report of an FAO expert consultation, 31 March-2 April, 2011, Auckland, New Zealand*. in FAO food and nutrition paper, no. 92. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013.
- [340] 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.
- [341] R. Elango, „Tolerable Upper Intake Level for Individual Amino Acids in Humans: A Narrative Review of Recent Clinical Studies", *Advances in Nutrition*, roč. 14, č. 4, s. 885–894, čvc. 2023, doi: 10.1016/j.advnut.2023.04.004.
- [342] O. A. Diaz, K. R. Reddy, a P. A. Moore, „Solubility of inorganic phosphorus in stream water as influenced by pH and calcium concentration", *Water Research*, roč. 28, č. 8, s. 1755–1763, srp. 1994, doi: 10.1016/0043-1354(94)90248-8.
- [343] J. Shukla, V. P. Mohandas, a A. Kumar, „Effect of pH on the Solubility of $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in Aqueous NaCl Solutions and Physicochemical Solution Properties at 35 °C", *J. Chem. Eng. Data*, roč. 53, č. 12, s. 2797–2800, pro. 2008, doi: 10.1021/je800465f.
- [344] C. E. Martínez a H. L. Motto, „Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils", *Environmental Pollution*, roč. 107, č. 1, s. 153–158, led. 2000, doi: 10.1016/S0269-7491(99)00111-6.
- [345] S.-H. Seok, „Structural Insights into Protein Regulation by Phosphorylation and Substrate Recognition of Protein Kinases/Phosphatases", *Life*, roč. 11, č. 9, s. 957, zář. 2021, doi: 10.3390/life11090957.
- [346] Y. Z. Na *et al.*, „Antioxidant and Anti-inflammatory Capacity of Ferulic Acid Released from Wheat Bran by Solid-state Fermentation of *Aspergillus niger*".
- [347] Y. Reynaud *et al.*, „True ileal amino acid digestibility and digestible indispensable amino acid scores (DIAASs) of plant-based protein foods", *Food Chemistry*, roč. 338, s. 128020, úno. 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128020.
- [348] 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.
- [349] Y. Li, H. Wang, L. Wang, J. Qiu, Z. Li, a L. Wang, „Milling of wheat bran: Influence on digestibility, hydrolysis and nutritional properties of bran protein during in vitro digestion", *Food Chemistry*, roč. 404, s. 134559, bře. 2023, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.134559.
- [350] 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.
- [351] V. Ravindran, „Feed enzymes: The science, practice, and metabolic realities", *Journal of Applied Poultry Research*, roč. 22, č. 3, s. 628–636, říj. 2013, doi: 10.3382/japr.2013-00739.
- [352] S. J. Tanasković *et al.*, „Upgrading of valuable food component contents and anti-nutritional factors depletion by solid-state fermentation: A way to valorize wheat bran for nutrition", *Journal of Cereal Science*, roč. 99, s. 103159, kvě. 2021, doi: 10.1016/j.jcs.2020.103159.

- [353] A. B. Kasim a H. M. Edwards, „The analysis for inositol phosphate forms in feed ingredients", *J. Sci. Food Agric.*, roč. 76, č. 1, s. 1–9, led. 1998, doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(199801)76:1<1::AID-JSFA922>3.0.CO;2-9.
- [354] A. K. Kies, L. H. De Jonge, P. A. Kemme, a A. W. Jongbloed, „Interaction between Protein, Phytate, and Microbial Phytase. In Vitro Studies", *J. Agric. Food Chem.*, roč. 54, č. 5, s. 1753–1758, bre. 2006, doi: 10.1021/jf0518554.
- [355] J. Yoon, L. Thompson, a D. Jenkins, „The effect of phytic acid on in vitro rate of starch digestibility and blood glucose response", *The American Journal of Clinical Nutrition*, roč. 38, č. 6, s. 835–842, pro. 1983, doi: 10.1093/ajcn/38.6.835.
- [356] E. Feizollahi, R. S. Mirmahdi, A. Zoghi, R. T. Zijlstra, M. S. Roopesh, a T. Vasanthan, „Review of the beneficial and anti-nutritional qualities of phytic acid, and procedures for removing it from food products", *Food Research International*, roč. 143, s. 110284, kvě. 2021, doi: 10.1016/j.foodres.2021.110284.
- [357] H. H. Lee, S. P. Loh, C. F. J. Bong, S. R. Sarbini, a P. H. Yiu, „Impact of phytic acid on nutrient bioaccessibility and antioxidant properties of dehusked rice", *J Food Sci Technol*, roč. 52, č. 12, s. 7806–7816, pro. 2015, doi: 10.1007/s13197-015-1918-9.
- [358] G. Urbano, M. López-Jurado, P. Aranda, C. Vidal-Valverde, E. Tenorio, a J. Porres, „The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function?", *J Physiol Biochem*, roč. 56, č. 3, s. 283–294, zář. 2000, doi: 10.1007/BF03179796.
- [359] 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.
- [360] K. Muzaffar, „Stickiness Problem Associated with Spray Drying of Sugar and Acid Rich Foods: A Mini Review", *J Nutr Food Sci*, roč. s12, 2015, doi: 10.4172/2155-9600.S12-003.
- [361] G.-G. Hu, J. Liu, Y.-H. Wang, Z.-N. Yang, a H.-B. Shao, „Applications of Plant Protein in the Dairy Industry", *Foods*, roč. 11, č. 8, s. 1067, dub. 2022, doi: 10.3390/foods11081067.
- [362] 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.
- [363] I. O. Korkmaz, C. Bilici, a S. Korkmaz, „Sensory, pH, syneresis, water-holding capacity, and microbiological changes in homemade yogurt prepared with maca (*Lepidium meyenii*) powder and propolis extract", *International Journal of Gastronomy and Food Science*, roč. 23, s. 100291, dub. 2021, doi: 10.1016/j.ijgfs.2020.100291.
- [364] F. Remeuf, S. Mohammed, I. Sodini, a J. P. Tissier, „Preliminary observations on the effects of milk fortification and heating on microstructure and physical properties of stirred yogurt", *International Dairy Journal*, roč. 13, č. 9, s. 773–782, led. 2003, doi: 10.1016/S0958-6946(03)00092-X.
- [365] T. Erkaya a M. Şengül, „Comparison of volatile compounds in yoghurts made from cows', buffaloes', ewes' and goats' milks", *Int J of Dairy Tech*, roč. 64, č. 2, s. 240–246, kvě. 2011, doi: 10.1111/j.1471-0307.2010.00655.x.
- [366] Z. Akin a T. Ozcan, „Functional properties of fermented milk produced with plant proteins", *LWT*, roč. 86, s. 25–30, pro. 2017, doi: 10.1016/j.lwt.2017.07.025.
- [367] B. Delikanli a T. Ozcan, „Effects of various whey proteins on the physicochemical and textural properties of set type nonfat yoghurt", *Int J of Dairy Tech*, roč. 67, č. 4, s. 495–503, lis. 2014, doi: 10.1111/1471-0307.12142.
- [368] S. Free-Manjarrez, L. Mojica, H. Espinosa-Andrews, a N. Morales-Hernández, „Sensory and Biological Potential of Encapsulated Common Bean Protein Hydrolysates

- Incorporated in a Greek-Style Yogurt Matrix", *Polymers*, roč. 14, č. 5, s. 854, úno. 2022, doi: 10.3390/polym14050854.
- [369] J. Xu *et al.*, „Effect of hemp protein on the physicochemical properties and flavor components of plant-based yogurt", *LWT*, roč. 172, s. 114145, pro. 2022, doi: 10.1016/j.lwt.2022.114145.
- [370] M. Isleten a Y. Karagul-Yuceer, „Effects of Dried Dairy Ingredients on Physical and Sensory Properties of Nonfat Yogurt", *Journal of Dairy Science*, roč. 89, č. 8, s. 2865–2872, srp. 2006, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72559-0.
- [371] M.-A. Gantumur *et al.*, „Effect of modified fermented whey protein fortification on the functional, physical, microstructural, and sensory properties of low-fat yogurt", *Food Control*, roč. 155, s. 110032, led. 2024, doi: 10.1016/j.foodcont.2023.110032.
- [372] I. A. Gurskiy, „The texture of non-fat yogurt with proteins isolates and concentrates", *Food systems*, roč. 6, č. 1, s. 29–35, dub. 2023, doi: 10.21323/2618-9771-2023-6-1-29-35.
- [373] D. M. Prajapati, N. M. Shrigod, a R. J. Prajapati, „Textural and Rheological Properties of Yoghurt: A Review".
- [374] E. Dempsey a S. C. Corr, „Lactobacillus spp. for Gastrointestinal Health: Current and Future Perspectives", *Front. Immunol.*, roč. 13, s. 840245, dub. 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.840245.
- [375] R. Fuller, „Probiotics in man and animals", *Journal of Applied Bacteriology*, roč. 66, č. 5, s. 365–378, kvě. 1989, doi: 10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x.
- [376] 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.
- [377] A. Ranok, C. Kupradit, C. Khongla, S. Musika, S. Mungkalanan, a W. Suginta, „Effect of whey protein concentrate on probiotic viability and antioxidant properties of yogurt during storage and simulated gastrointestinal transit", *IFRJ*, roč. 28, č. 1, s. 110–119, úno. 2021, doi: 10.47836/ifrj.28.1.11.
- [378] M. Begley, C. G. M. Gahan, a C. Hill, „The interaction between bacteria and bile", *FEMS Microbiol Rev*, roč. 29, č. 4, s. 625–651, zář. 2005, doi: 10.1016/j.femsre.2004.09.003.
- [379] L. A. Vargas, D. W. Olson, a K. J. Aryana, „Whey protein isolate improves acid and bile tolerances of *Streptococcus thermophilus* ST-M5 and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB-12", *Journal of Dairy Science*, roč. 98, č. 4, s. 2215–2221, dub. 2015, doi: 10.3168/jds.2014-8869.
- [380] M. K. Sharif, M. Saleem, H. R. Sharif, a R. Saleem, „Enrichment and Fortification of Traditional Foods with Plant Protein Isolates", in *Plant Protein Foods*, A. Manickavasagan, L.-T. Lim, a A. Ali, Ed., Cham: Springer International Publishing, 2022, s. 131–169. doi: 10.1007/978-3-030-91206-2_5.
- [381] A. Mimouni, H. C. Deeth, A. K. Whittaker, M. J. Gidley, a B. R. Bhandari, „Rehydration of high-protein-containing dairy powder: Slow- and fast-dissolving components and storage effects", *Dairy Sci. Technol.*, roč. 90, č. 2–3, s. 335–344, kvě. 2010, doi: 10.1051/dst/2010002.
- [382] C. Rodríguez-García, C. Sánchez-Quesada, E. Toledo, M. Delgado-Rodríguez, a J. J. Gaforio, „Naturally Lignan-Rich Foods: A Dietary Tool for Health Promotion?", *Molecules*, roč. 24, č. 5, s. 917, bř. 2019, doi: 10.3390/molecules24050917.
- [383] R.-L. Heiniö, K.-H. Liukkonen, K. Katina, O. Myllymäki, a K. Poutanen, „Milling fractionation of rye produces different sensory profiles of both flour and bread", *LWT - Food Science and Technology*, roč. 36, č. 6, s. 577–583, zář. 2003, doi: 10.1016/S0023-6438(03)00063-X.

- [384] Y. Fu, J. Chen, K. H. Bak, a R. Lametsch, „Valorisation of protein hydrolysates from animal by-products: perspectives on bitter taste and debittering methods: a review", *Int J of Food Sci Tech*, roč. 54, č. 4, s. 978–986, dub. 2019, doi: 10.1111/ijfs.14037.
- [385] I. Lima, H. Guraya, a E. Champagne, „The functional effectiveness of reprocessed rice bran as an ingredient in bakery products", *Nahrung*, roč. 46, č. 2, s. 112–117, bř. 2002, doi: 10.1002/1521-3803(20020301)46:2<112::AID-FOOD112>3.0.CO;2-N.
- [386] M. Prückler *et al.*, „Comparison of homo- and heterofermentative lactic acid bacteria for implementation of fermented wheat bran in bread", *Food Microbiology*, roč. 49, s. 211–219, srp. 2015, doi: 10.1016/j.fm.2015.02.014.
- [387] L. G. Lima Nascimento *et al.*, „Combination of Milk and Plant Proteins to Develop Novel Food Systems: What Are the Limits?", *Foods*, roč. 12, č. 12, s. 2385, čer. 2023, doi: 10.3390/foods12122385.
- [388] A. Krentz, I. García-Cano, J. Ortega-Anaya, a R. Jiménez-Flores, „Use of casein micelles to improve the solubility of hydrophobic pea proteins in aqueous solutions via low-temperature homogenization", *Journal of Dairy Science*, roč. 105, č. 1, s. 22–31, led. 2022, doi: 10.3168/jds.2021-20902.
- [389] M. C. Karam, C. Gaiani, C. Hosri, J. Burgain, a J. Scher, „Effect of dairy powders fortification on yogurt textural and sensorial properties: a review", *Journal of Dairy Research*, roč. 80, č. 4, s. 400–409, lis. 2013, doi: 10.1017/S0022029913000514.
- [390] Liu Fengming, „Taste-masking technology by taking milk powder as taste-masking agent and application thereof"
- [391] Z. Zhang, R. Zhang, L. Zou, a D. J. McClements, „Protein encapsulation in alginate hydrogel beads: Effect of pH on microgel stability, protein retention and protein release", *Food Hydrocolloids*, roč. 58, s. 308–315, čvc. 2016, doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.03.015.
- [392] S. M. Olarte Mantilla, H. M. Shewan, R. Shingleton, J. R. Stokes, a H. E. Smyth, „Ability to detect and identify the presence of particles influences consumer acceptance of yoghurt", *Food Quality and Preference*, roč. 85, s. 103979, říj. 2020, doi: 10.1016/j.foodqual.2020.103979.
- [393] B. Eckert, T. Amend, a H.-D. Belitz, „The course of the SDS and Zeleny sedimentation tests for gluten quality and related phenomena studied using the light microscope", *Z Lebensm Unters Forch*, roč. 196, č. 2, s. 122–125, úno. 1993, doi: 10.1007/BF01185570.
- [394] M. Hrušková, V. Škodová, a J. Blažek, „Wheat sedimentation values and falling number", *Czech J. Food Sci.*, roč. 22, č. 2, s. 51–57, dub. 2004, doi: 10.17221/3406-CJFS.
- [395] Q. H. Muqaddasi *et al.*, „Genetic control and prospects of predictive breeding for European winter wheat's Zeleny sedimentation values and Hagberg-Perten falling number", *Theor Appl Genet*, roč. 136, č. 11, s. 229, lis. 2023, doi: 10.1007/s00122-023-04450-7.
- [396] L. Zeleny, W. T. Greenaway, G. M. Gurney, C. C. Fifield, a K. Lebsock, „Sedimentation value as an index of dough-mixing characteristics in early-generation wheat selections", *Cereal Chem*, roč. 37, 1960.
- [397] I. Švec, M. Hruskova, University of Chemistry and Technology Prague, Department of Carbohydrates and Cereals, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic, I. Jurinova, a University of Chemistry and Technology Prague, Department of Carbohydrates and Cereals, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic, „Technological and nutritional aspect of different hemp types addition: Comparison of flour and wholemeal effect", *Croat. J. Food Sci. Technol.*, roč. 7, č. 2, s. 68–75, pro. 2015, doi: 10.17508/CJFST.2015.7.2.01.
- [398] M. C. Cortez-Trejo, G. Loarca-Piña, J. D. Figueroa-Cárdenas, J. Manríquez, a S. Mendoza, „Gel properties of acid-induced gels obtained at room temperature and based on common bean proteins and xanthan gum", *Food Hydrocolloids*, roč. 132, s. 107873, lis. 2022, doi: 10.1016/j.foodhyd.2022.107873.

- [399] 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.
- [400] D. Indrani, P. Prabhasankar, J. Rajiv, a G. V. Rao, „Influence of whey protein concentrate on the rheological characteristics of dough, microstructure and quality of unleavened flat bread (parotta)", *Food Research International*, roč. 40, č. 10, s. 1254–1260, pro. 2007, doi: 10.1016/j.foodres.2007.08.005.
- [401] X. Tang a J. Liu, „A Comparative Study of Partial Replacement of Wheat Flour with Whey and Soy Protein on Rheological Properties of Dough and Cookie Quality", *Journal of Food Quality*, roč. 2017, s. 1–10, 2017, doi: 10.1155/2017/2618020.
- [402] D. Whitford, *Proteins: structure and function*. Hoboken, NJ: J. Wiley & Sons, 2005.
- [403] S. D. Arntfield a H. D. Maskus, „Peas and other legume proteins", in *Handbook of Food Proteins*, Elsevier, 2011, s. 233–266. doi: 10.1533/9780857093639.233.
- [404] J. Zhou, J. Liu, a X. Tang, „Effects of whey and soy protein addition on bread rheological property of wheat flour", *Journal of Texture Studies*, roč. 49, č. 1, s. 38–46, úno. 2018, doi: 10.1111/jtxs.12275.
- [405] A. Cappelli, N. Oliva, G. Bonaccorsi, C. Lorini, a E. Cini, „Assessment of the rheological properties and bread characteristics obtained by innovative protein sources (Cicer arietinum, Acheta domesticus, Tenebrio molitor): Novel food or potential improvers for wheat flour?", *LWT*, roč. 118, s. 108867, led. 2020, doi: 10.1016/j.lwt.2019.108867.
- [406] X. Song, F. J. A. Perez-Cueto, a W. L. P. Bredie, „Sensory-Driven Development of Protein-Enriched Rye Bread and Cream Cheese for the Nutritional Demands of Older Adults", *Nutrients*, roč. 10, č. 8, s. 1006, srp. 2018, doi: 10.3390/nu10081006.
- [407] M. Erben a C. A. Osella, „Optimization of mold wheat bread fortified with soy flour, pea flour and whey protein concentrate", *Food sci. technol. int.*, roč. 23, č. 5, s. 457–468, čvc. 2017, doi: 10.1177/1082013217701583.
- [408] M. R. Komerowski a V. R. D. Oliveira, „Influence of the Amount and Type of Whey Protein on the Chemical, Technological, and Sensory Quality of Pasta and Bakery Products", *Foods*, roč. 12, č. 14, s. 2801, čvc. 2023, doi: 10.3390/foods12142801.
- [409] J. Příhoda, M. Sluková, a J. Dřízal, „Jak Poznáme Kvalitu?", *Chléb a pečivo*.

8 Seznam zkratek

α – hladina významnosti

AAP – aminokyselinový profil

AMG – enzym amyloglukosidáza

BS – buněčná stěna

DDP – doporučený denní příjem

E-PKPO – enkapsulovaný proteinový koncentrát z pšeničných otrub do alginátu

FAO – Organizace pro výživu a zemědělství

FU – farinografické jednotky

ICP-OES – optická emisní spektrometrie s indukčně vázaných plazmatem

KF – kyselina ferulová

KZO – kapacita zadržování oleje

KZV – kapacita zadržování vody

MIX1/MIX2 – směs proteinového koncentráту z pšeničných otrub a syrovátkového proteinu

M-PKPO – mletý proteinový koncentrát z pšeničných otrub

P – pravděpodobnostní hodnota

PDCAAS – protein digestibility corrected amino acid score

PER – poměr účinnosti bílkovin (protein efficiency ratio) – metoda hodnocení nutriční kvality bílkovin

PKPO – proteinový koncentrát z pšeničných otrub

PO – pšeničné otruby

r – korelační koeficient

RP – rostlinný protein

RPP – referenční příjem proteinů

SDS-PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného

SP – syrovátkový protein

WHO – Světová zdravotnická organizace

ŽP – živočišný protein

9 Seznam obrázku

Obr. 1	Struktura a složení buněčné stěny lignocelulózové biomasy	8
Obr. 2	Biosyntéza kyseliny šikimové	10
Obr. 3	Biosyntéza tyrosinu a fenylalaninu, prekurzorů ligninu	10
Obr. 4	Biosyntéza monolignolů (p-kumarylalkohol, koniferylalkohol, sinapylalkohol)	11
Obr. 5	Schéma biosyntézy celulózy	11
Obr. 6	Schéma možností degradace lignocelulózy [18]	14
Obr. 7	Schéma valorizace lignocelulózových materiálů [55]	17
Obr. 8	Obalové vrstvy pšeničného zrna [99]	18
Obr. 9	Příklad biorafinace pšeničných otrub [91]	23
Obr. 10	Zastoupení jednotlivých potravin mezi plant-based výrobky [227]	37
Obr. 11	Schéma procesu extruze masových analogů [232]	38
Obr. 12	Reakční rovnice Kjeldahlovy metody stanovení proteinů, (a) – mineralizace, (b) – neutralizace, (c) – destilace, (d) – zpětná titrace	40
Obr. 13	Schéma elementárního analyzátoru [258]	41
Obr. 14	Aparatura pro SDS-PAGE elektroforézu [264]	43
Obr. 15	Schéma předkolonové derivatizace	47
Obr. 16	Schéma postkolonové derivatizace	47
Obr. 17	Schéma průběhu izolace proteinů z pšeničných otrub	53
Obr. 18	Porovnání SDS-PAGE elektroforeogramů proteinů pšeničného endospermu a otrub	72
Obr. 19	Procentuální zastoupení bílkovin o dané molekulové hmotnosti ve vzorku pšeničného endospermu a otrub	73
Obr. 20	Výtěžnost různých způsobů izolace proteinů z pšeničných otrub	75
Obr. 21	Zastoupení bílkovin v proteinovém materiálu z pšeničných otrub získaném různými způsoby izolace	77
Obr. 22	SDS-PAGE elektroforeogram bílkovin pšeničných otrub a proteinového izolátu	78
Obr. 23	Zastoupení bílkovinných frakcí v otrubách a proteinovém izolátu	78
Obr. 24	Zastoupení frakcí bílkovin ve vzorcích izolátů	79
Obr. 25	Proteinový izolát získaný separací pomocí dekantéru (A) a sedimentací (B)	86
Obr. 26	Závislosti zdánlivé viskozity na smykové rychlosti pro různé vzorky jogurtů s přídavkem PKPO, zvyšování smykové rychlosti (□), snižování smykové rychlosti (●)	91
Obr. 27	Senzorické deskriptory vzorků jogurtu s 5 a 10% přídavkem PKPO	94
Obr. 28	Vyhodnocení vlivu mletí PKPO na senzorické deskriptory jogurtů s 10% přídavkem	96
Obr. 29	Vyhodnocení vlivu míchání PKPO se sušeným mlékem u vzorků jogurtu s 5% přídavkem proteinu na senzorické deskriptory	97
Obr. 30	Vyhodnocení vlivu míchání PKPO se sušeným mlékem u vzorků jogurtu s 10% přídavkem proteinu na senzorické deskriptory	98
Obr. 31	Vyhodnocení vlivu enkapsulace PKPO na senzorické deskriptory jogurtů	99
Obr. 32	Texturní parametry vzorků pečiva	105
Obr. 33	Porovnání expanze plynových buněk u vzorků pečiva s různým přídavkem PKPO	105
Obr. 34	Aromatické a chuťové vlastnosti vzorků pečiva	106

10 Seznam tabulek

Tabulka 1 Sloučeniny účastníci se biosyntézy hemicelulóz.....	12
Tabulka 2 Konkrétní enzymy účastníci se degradace hemicelulóz [19]	13
Tabulka 3 Procentuální zastoupení jednotlivých složek pšeničných otrub [103, 105–107]	19
Tabulka 4 Složení sacharidového podílu pšeničných otrub [66].....	19
Tabulka 5 Procentuální zastoupení jednotlivých polysacharidů [69].....	19
Tabulka 6 Procentuální zastoupení jednotlivých druhů vlákniny [66].....	20
Tabulka 7 Procentuální obsah jednotlivých typů proteinů pšeničných otrub [76].....	20
Tabulka 8 Zastoupení jednotlivých aminokyselin v pšeničných otrubách [79]	21
Tabulka 9 Zastoupení bioaktivních látek v pšeničných otrubách [62, 73].....	21
Tabulka 10 Zastoupení minerálních látek v pšeničných otrubách [mg/100 g] [61, 80].....	22
Tabulka 11 Podmínky extrakce jednotlivých proteinových frakcí pšeničných otrub [78]..	26
Tabulka 12 Doporučený denní příjem esenciálních aminokyselin [mg/kg jedince] [158]..	29
Tabulka 13 Podmínky jednotlivých fází trávení [152, 153].....	30
Tabulka 14 Porovnání skóre jednotlivých metod u vybraných potravin [171, 172]	32
Tabulka 15 Příklady konverzních faktorů pro přepočítání množství dusíku na proteiny [254]	41
.....	41
Tabulka 16 Příklady způsobu rozkladu proteinů	44
Tabulka 17. Modifikace v procesu izolace proteinů z pšeničných otrub	54
Tabulka 18. Podmínky enzymatické hydrolýzy pšeničných otrub.....	54
Tabulka 19 Označení vzorků proteinových materiálů a charakterizace jejich izolace.....	55
Tabulka 20. Složení separačního gelu pro SDS-PAGE analýzu	56
Tabulka 21. Složení koncentračního gelu pro SDS-PAGE analýzu.....	57
Tabulka 22. Složení pufru A pro extrakci proteinů (celkový objem 100 ml)	57
Tabulka 23. Složení 5x koncentrovaného vyvíjecího pufru do elektroforézy.....	58
Tabulka 24. Složení barvicího a odbarvujícího roztoku.....	58
Tabulka 25 Podmínky mikrovlnného rozkladu vzorků na mokré cestě	60
Tabulka 26 Nastavení analýzy minerálních látek pomocí ICP-OES.....	60
Tabulka 27. Podmínky analýzy fenolických kyselin pomocí kapalinového chromatografu	60
.....	60
Tabulka 28 Podmínky analýzy celkových tuků a methylesterů mastných kyselin	61
Tabulka 29 Parametry 1. varianty velkoobjemové izolace proteinů z pšeničných otrub	62
Tabulka 30 Parametry 2. varianty velkoobjemové izolace proteinů z pšeničných otrub	63
Tabulka 31 Parametry 3. varianty velkoobjemové izolace proteinů z pšeničných otrub	64
Tabulka 32 Parametry 4. varianty velkoobjemové izolace proteinů z pšeničných otrub	65
Tabulka 33 Označení a složení vzorků připravených vysokoproteinových jogurtů	66
Tabulka 34 Slovní charakteristika bodového skóre pro jednotlivé deskriptory senzoričké analýzy jogurtů.....	68
Tabulka 35 Složení a označení vzorků směsí mouky a proteinového materiálu.....	69
Tabulka 36 Objem vody přidávaný ke vzorkům směsí pro stanovení jejich farinografických vlastností.....	70
Tabulka 37 Objem 0,1M NaCl přidávaný ke vzorkům směsí pro stanovení jejich extenzografických vlastností	70
Tabulka 38 Nastavení extenzografu-N (Brabender, Německo)	70
Tabulka 39 Slovní charakteristika bodového skóre pro jednotlivé deskriptory senzoričké analýzy pečiva	71

Tabulka 40 Složení pšeničných otrub.....	72
Tabulka 41 Zastoupení mastných kyselin pšeničných otrub	74
Tabulka 42 Prvkové složení pšeničných otrub	74
Tabulka 43 Zastoupení aminokyselin v PKPO [g/100 g].....	81
Tabulka 44 Doporučený denní příjem aminokyselin a jeho pokrytí jednou dávkou (30 g) PKPO [159]	82
Tabulka 45 Prvkové složení proteinového izolátu z pšeničných otrub	83
Tabulka 46 Srovnání výtěžnosti všech variant velkoobjemové izolace a laboratorní izolace proteinů z pšeničných otrub	87
Tabulka 47 Parametry optimalizované varianty velkoobjemové izolace proteinů z pšeničných otrub	88
Tabulka 48 Složení mléka použitého pro přípravu vysokoproteinových jogurtů	89
Tabulka 49 Charakterizace vzorků jogurtů s přidavkem PKPO.....	89
Tabulka 50 Charakterizace vzorků vysokoproteinových jogurtů pro senzorickou analýzu	90
Tabulka 51 Reologické parametry vzorků jogurtů	92
Tabulka 52 Počet buněk ve vzorcích jogurtu	93
Tabulka 53 Korelační koeficienty (r) mezi senzorickými deskriptory a celkovým dojmem u jogurtů obohacených PKPO	95
Tabulka 54 Charakterizace vysokoproteinových směsí	101
Tabulka 55 Farinografické charakteristiky moučných směsí	102
Tabulka 56 Extenzografické charakteristiky moučných směsí	103

11 Vědecké aktivity

Publikace v impaktovaných časopisech

ZHIVKOV, I.; VAŠÍČEK, Z.; SLAVÍKOVÁ, Z.; YORDANOV, R; EHLICH, J. Detection of the Yogurt Incubation Kinetics by Portable Impedance Converter. In *29th International Scientific Conference Electronics, ET 2020 – Proceedings*. Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc., 2020. s. 1-4. ISBN: 978-1-7281-7426-6.

POŘÍZKA, J.; DIVIŠ, P.; ŠTURSA, V.; PUNČOCHÁŘOVÁ, L.; SLAVÍKOVÁ, Z.; KŘIKALA, J. Impact of organic and integrated pest management on the elemental composition of wine and grapes in a season with high fungal pressure. *JOURNAL OF ELEMENTOLOGY*, 2021, roč. 26, č. 4, s. 871-891. ISSN: 1644-2296.

DIVIŠ, P.; POŘÍZKA, J.; NÁBĚLEK, J.; HRABALOVÁ, V.; SLAVÍKOVÁ, Z. Comparison of saccharification methods for biotechnological utilization of wheat bran. *Agriculture & Food*, 2023, č. 11, s. 96-102. ISSN: 1314-8591.

POŘÍZKA, J.; SLAVÍKOVÁ, Z.; BIDMONOVÁ, K.; VYMĚTALOVÁ, M.; DIVIŠ, P. Physiochemical and Sensory Properties of Bread Fortified with Wheat Bran and Whey Protein Isolates. *Foods*, 2023, roč. 12, č. 13, ISSN: 2304-8158.

SLAVÍKOVÁ, Z.; POŘÍZKA, J.; DIVIŠ, P. Elemental analysis of czech wines including wines from organic production. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2024, roč. 13, č. 5, ISSN: 1338-5178.

SLAVÍKOVÁ Z., DIVIŠ P., BIALAS W., MONTOWSKA M., ADAMCZYKOVÁ M., a POŘÍZKA J. The study of relationship between taste and wheat bran protein isolate fortification during high-protein yogurt manufacturing, *Journal of Agriculture and Food Research*, roč. 16, s. 101185, čer. 2024, doi: 10.1016/j.jafr.2024.101185

SLAVÍKOVÁ Z., SMATANA I., DIVIŠ P., SMILEK J., SLANINOVÁ E., a POŘÍZKA J. „Utilization of wheat bran protein isolate as a fortifier for production of high protein yoghurts“, *Mljekarstvo*, roč. 74, č. 4, 2024.

Konferenční příspěvky v podobě abstraktu

SLAVÍKOVÁ, Z.; POŘÍZKA, J.; DIVIŠ, P. *The influence of addition of spent coffee grounds and their refining products on psychical a chemical properties of a soil and a growth of Lactuca sativa*. Studentská odborná konference Chemie je život 2019. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. s. 64-65. ISBN: 978-80-214-5807-9.

SLAVÍKOVÁ, Z.; POŘÍZKA, J.; DIVIŠ, P. *An isolation of a protein from a wheat bran*. Sborník abstraktů. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, 2020. s. 136-137. ISBN: 978-80-214-5920-0.

SLAVÍKOVÁ, Z.; POŘÍZKA, J.; NÁBĚLEK, J.; DIVIŠ, P. *Nutritional properties of wheat bran protein isolates*. Studentská odborná konference Chemie je život 2021. první. Purkyňova 464/118, 612 00 Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2021. s. 56-57. ISBN: 978-80-214-6002-7.

SLAVÍKOVÁ, Z.; POŘÍZKA, J.; DIVIŠ, P. *Chemical composition of wheat bran protein isolates*. Elsevier, 2022. s. 55-55.

DIVIŠ, P.; POŘÍZKA, J.; JUGLOVÁ, Z.; SLAVÍKOVÁ, Z. *Autenticita čokolád s různým obsahem kakaové sušiny*. Bezpečnost a kvalita potravin. Zborník vedeckých prác [Food safety and food quality. Proceedings of the scientific papers]. Nitra: Garmond Nitra, 2022. s. 257-261. ISBN: 978-80-8266-007-7.

SLAVÍKOVÁ, Z.; POŘÍZKA, J.; DIVIŠ, P. *Wheat bran proteins – raw material for production of nutritional-valued food*. Book of Abstracts, IEES conference, Chania 2023. ZHAW Life Sciences und Facility Management, Grüentalstrasse 14, 8820 Wädenswil, Switzerland: International Ecological Engineering Society, 2023.

POŘÍZKA, J.; SLAVÍKOVÁ, Z.; GAJDUŠEK, M.; DIVIŠ, P. *Production and characterization of biochar produced from different type of bran*. ZHAW Life Sciences und Facility Management, Grüentalstrasse 14, 8820 Wädenswil, Switzerland: International Ecological Engineering Society, 2023.

Aktivní účast na konferencích

CHEMIE JE ŽIVOT 2019, Fakulta chemická Brno, ČR, téma přednášky: The influence of addition of spent coffee grounds and their refinery products on physical and chemical properties of a soil and a growth of *Lactuca sativa*.

CHEMIE JE ŽIVOT 2020, Fakulta chemická Brno, ČR, téma přednášky: An isolation of protein from wheat bran.

CHEMIE JE ŽIVOT 2021, Fakulta chemická Brno, ČR, téma přednášky: Nutrition properties of wheat bran protein isolate.

NIZO PLANT PROTEIN FUNCTIONALITY CONFERENCE 2022, Nizozemsko (online), název posteru: Chemical composition of wheat bran protein isolate

BEZPEČNOST A KONTROLA POTRAVÍN 2023, Piešťany, SR, téma přednášky: Výroba a fortifikace jogurtů pomocí proteinového izolátu z pšeničných otrub

IEES 2023, Closed cycles and the circular society Chania, Řecko, téma přednášky: Wheat bran proteins: raw material for production of nutritional-valued food.

FOODTECH CONGRESS 2024, Novi Sad, Srbsko, téma přednášky: Wheat bran: Alternative protein source

12 Přílohy

Příloha 1 Shrnutí výsledků testování technologií pro izolaci proteinů

Modifikovaná fáze izolace	Označení	Celková výtěžnost [g/100g]	Zastoupení bílkovin [%]
-	Původní postup	9,04 ± 0,69	82,98 ± 1,63
Předúprava	MI	8,53 ± 0,17	82,35 ± 1,75
	celulázy	15 ± 0,24	87,02 ± 2,23
	AMG	3,33 ± 0,9	65,71 ± 2,81
	Odt	7,79 ± 0,66	85,45 ± 1,03
Extrakce	1:20	9,68 ± 0,47	80,96 ± 2,64
	1:30	9,50 ± 0,85	82,38 ± 1,64
	40 °C	7,47 ± 0,14	77,42 ± 6,33
	50 °C	7,46 ± 0,27	80,04 ± 2,20
	0,35	10,83 ± 0,10	24,52 ± 1,80
	2 h	7,94 ± 0,16	80,54 ± 1,06
	3 h	8,18 ± 0,40	77,32 ± 0,49
	2x	10,0 ± 0,10	72,54 ± 1,34
Precipitace	3x	10,9 ± 0,21	72,56 ± 3,11
	pH 3	7,67 ± 0,34	80,73 ± 1,79
	pH 5	7,09 ± 0,32	86,38 ± 1,73
	4 °C	7,20 ± 0,08	82,94 ± 0,82
	-4 °C	6,93 ± 0,50	84,55 ± 1,70

Příloha 2 Publikace The study of relationship between taste and wheat bran protein isolate fortification during high-protein yogurt manufacturing (Journal of Agricultural and Food Research, Elsevier)

Příloha 3 Publikace Publikace Utilization of wheat bran protein isolate as a fortifier for production of high protein yoghurts (Mljekarstvo)

Příloha 4 Physicochemical and Sensory Properties of Bread Fortified with Wheat Bran and Whey Protein Isolates (Foods MDPI)



The study of relationship between taste and wheat bran protein isolate fortification during high-protein yogurt manufacturing

Zuzana Slavíková^a, Pavel Diviš^a, Wojciech Białas^b, Magdalena Montowska^c,
Michaela Adamczyková^a, Jaromír Pořízka^{a,*}

^a Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Food Science and Biotechnology, Purkyňova 118, Brno, Czech Republic

^b Poznań University of Life Sciences, Department of Biotechnology and Food Microbiology, ul. Wojska Polskiego 48, Poznań, Poland

^c Poznań University of Life Sciences, Department of Meat Technology, ul. Wojska Polskiego 48, Poznań, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

High-protein yogurt
wheat bran protein isolate
Sensory analysis
Yogurt syneresis

ABSTRACT

High-protein (HP) food is becoming a popular and nutritionally valuable commodity. The most common protein fortifiers are milk whey or soy protein isolates. However, one of the potentially promising sources of quality protein isolate is wheat bran, the secondary product of wheat milling. Wheat bran protein isolate (WBPI) can be obtained using a sustainable and environmentally friendly pH shift method. Considering its nutritional properties, incorporating WBPI into people's diet is convenient. This work focuses on protein fortification of plain yogurt using WBPI while maintaining sensory acceptability. Direct fortification of yogurts with WBPI to achieve 5 % and 10 % protein content revealed two main sensory defects – bitterness and sandiness. Several approaches, such as grinding WBPI, protein blending, and WBPI encapsulation, were applied to improve the overall impression score of HP yogurts. It was found that eliminating the sandiness of WBPI-fortified yogurt is not possible by reducing WBPI particle size. Blending WBPI with dried milk decreased bitterness, but the products lacked amino acid diversity. The most effective procedure to mask the sensory defects was WBPI encapsulation using alginate, revealing an appropriate way to incorporate natural plant proteins into HP food.

1. Introduction

In recent years, the global food industry has witnessed a remarkable surge in demand for functional foods that offer both enhanced nutritional value and sensory satisfaction. A significant part of the functional foods field focuses on high protein products, aiming to enhance the protein content of standard foodstuffs. One such product at the forefront of this trend is high-protein yogurt, offering consumers a convenient source of essential nutrients. The strong position of high protein yogurts in the market is supported by various market research findings. The global high protein yogurt market valuation in 2022 was 35.19 billion US dollars, with a projected global market growth rate of 7 % from 2023 to 2033 [1].

The production requirements for high-protein yogurt are still not legislated in most of the countries. The closest benchmark for this type of product is concentrated fermented milk with a minimum of 5.6 % protein content [2]. The enhancement of yogurt with proteins can be achieved through different methods of milk base concentration (after and

prior to fermentation) or by direct fortification of the milk base with protein isolates. Direct fortification includes the possibility of enriching the product with various types of protein isolates, both of animal and plant origin, or adding of protein blends. A common and almost exclusive representative from the group of animal proteins is whey protein isolate. However, in the field of plant protein isolates, the choices are significantly more varied. In addition to commonly used soy and wheat proteins, proteins from crops such as pea, fava bean, mung bean, rice, oat, chickpea, potato, and wheat bran can be utilized [3–5].

Another promising candidate with substantial potential for incorporation into dairy products is wheat bran protein isolate (WBPI). This isolate is derived from the external layer of the wheat grain, involving several procedural stages, including defatting, solubilization, and precipitation [6]. A key advantage of WBPI lies in its sourcing from readily available wheat bran, a cost-effective and environmentally sustainable material abundantly generated during the milling process. WBPI is characterized by a well-balanced amino acid composition similar to plant-derived proteins like those from soy and pea. Its Protein

* Corresponding author.

E-mail address: porizka@fch.vut.cz (J. Pořízka).

Digestibility Corrected Amino Acid Score (PDCAAS) closely resembles that of these plant proteins. The isolate is rich in asparagine, glutamic acid, leucine, arginine, and proline. Beyond its protein content, WBPI contains bioactive components such as polyphenols, phytosterols, and lignans. These components have been correlated with advantageous health effects, including the enhancement of cardiovascular well-being, antioxidative efficacy, and potential anticancer properties [7–10].

According to its chemical composition, WBPI has the potential to be integrated into high-protein yogurt formulations. An interesting amino acid profile and the potential physiological benefits make WBPI an attractive option for fortification. However, the integration of WBPI into high-protein yogurt formulations prompts an intriguing consideration: the influence of manipulating WBPI fortification levels on sensory attributes, especially taste and texture. It is common for plant protein isolates to have an astringent and bitter taste and can produce sandiness in specific types of products [11]. The aim of this article was to evaluate the impact of different fortification approaches on the sensory and functional attributes of high protein yogurt. The optimization of the production technology was focused on producing a high-protein product with properties similar to standard yogurt. There is currently no published scientific article on the application of WBPI in yogurts, and it is thus a new contribution to the field of research and development of functional dairy products.

2. Materials and methods

2.1. Isolation and characterization of WBPI

Wheat bran was obtained from flour manufacturer (Mlýny J. Voženílek, Czech Republic). The process of WBPI isolation from wheat bran was described in detail in the work published by Pořízka et al. [6]. The pH-shift method was used for isolation of WBPI. The extraction of proteins from wheat bran was carried out by 0.05 M NaOH (pH 11, 1 h, 20 °C). The de-proteined wheat bran was removed from the protein extract by centrifugation (8000 rcf, 15 min, 20 °C). The precipitation of extracted proteins was provided by pH adjustment to 4 ± 0.05 by H_2SO_4 . The sedimented WBPI was collected after centrifugation and freeze-dried.

Protein content of WBPI and of its encapsulated forms was determined by determination of total nitrogen using elemental analyzer (Eurovector EA 3100, Pavia, Italy) in triplicate. For the conversion of total nitrogen amount to protein content, the factor 6.31 corresponding to wheat bran was used.

The amino acid composition was measured by automatic amino acid analyzer (AAA-400, Ingos, Prague, Czech Republic) with post-column derivatization by ninhydrin and photometric detection. The hydrolysis of peptide bonds was carried out by 6 M HCl for 23 h at temperature 110 °C. The concentration of cysteine and methionine was determined after their oxidation by solution of performic acid, phenol, and hydrogen peroxide. Tryptophane was determined after hydrolysis by saturated solution of barium hydroxide at 110 °C for 20 h.

The SDS-PAGE analysis of WBPI was performed according to Czubinski et al. [12]. The proteins from homogenized WBPI were extracted by shaking of 20 mg of sample with 0.15 mL of buffer consist of 8 M urea, 2 M thiourea, 50 mM trizma base, 0,1 M SDS and 75 mM DTT for 30 min. After centrifugation, the supernatant with extracted proteins was collected and directly analyzed.

The digestibility of the WBPI proteins was verified by simulating the conditions of the digestive tract. Determination of digestibility was always carried out in 2 repetitions. 1 g of WBPI was first mixed with 15 mL of 0.03 M HCl and shaken for 5 min at 37 °C. Then the pH of this suspension was adjusted to 1.9 ± 0.05 (1 M NaOH/1 M HCl) and 1 mL of pepsin solution (4 mg/mL; 2000 U/g) was added and the suspension was

shaken and incubated for another 30 min in an IKA KS 3000 shaking incubator. Subsequently, the pH of the suspension was adjusted to 7.5 using 1 M NaOH, 4.5 mL of phosphate buffer and 1 mL of pancreatic solution (5 mg/mL, 4 USP) were added. The suspension was further incubated and shaken at 37 °C for 24 h. After the given time, the suspension was centrifuged (8000 rcf, 10 min, laboratory temperature). Undigested dried residue was analyzed by elemental analyzer (Eurovector EA 3100, Pavia, Italy). For the conversion of total nitrogen amount to protein content, the factor 6.31.

2.2. Manufacturing and fortification of yogurt

Whole fat, standardized, UHT milk purchased from a retail was used for manufacturing the yogurt samples. The dry matter of the milk was determined by drying a 3 mL milk sample to a constant weight in a laboratory oven (Memmert UFE550, Memmert, Büchenbach, Germany) maintained at 105 °C. The milk characteristics are presented in Table 1.

As a starter culture, freeze-dried YF-L812 (Chr. Hansen, Denmark) containing *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* was used to create a 1 % w/w inoculum. The milk was initially heated to 70 °C for 10 min, and after cooling to laboratory temperature, the inoculum was added to the milk in a 1:100 ratio. The samples were then homogenized and placed in the yogurt maker (43 °C) until the pH reached 5 (approximately 8 h). The samples were stored in a refrigerator at 4 °C until further analysis.

For the production of high-protein yogurts, WBPI, dried milk, or a combination of both were used to enhance the protein content. The dried milk (Bohemilk, Czech Republic) contained 31 % protein.

The appropriate amount of WBPI, dried milk, or encapsulated WBPI was added directly to the milk and homogenized before the fermentation process. Yogurt samples with a total protein content of 5 % and 10 % were prepared, in addition to a reference yogurt sample. The precise amounts of individual protein materials were calculated based on their protein content, and they are detailed in Table 2.

Table 1

Characterization of milk used for yogurt manufacturing.

Energy value	266 kJ
Components [g/100 mL]	
Fat	3.5
Carbohydrates	4.7
Proteins	3.3
Dry matter	12.5

Table 2

Composition of individual yogurt samples per 100 mL of milk.

Sample	WBPI [g]	Dried milk [g]	Encapsulated WBPI [g]	Total protein content [%]
Reference	–	–	–	3.30
5 % WBPI	2.01	–	–	5.00
10 % WBPI	7.91	–	–	10.0
5 % MIX1	1.00	2.74	–	5.00
5 % MIX2	1.33	1.84	–	5.00
10 % MIX1	3.96	10.8	–	10.0
10 % MIX2	5.27	7.19	–	10.0
5 % E-WBPI	–	–	3.15	5.00
10 % E-WBPI	–	–	12.4	10.0

2.3. Grinding and particle distribution of WBPI

The raw WBPI was ground using a ball mill (HK 40, HK Laboratory Equipment, Turnov, Czech Republic) to obtain smaller WBPI particles and prevent sensory defects such as sandiness. The size of the resulting WBPI particles was measured using a Dispersing unit (Rodos, Sympatec, Clausthal, Germany) and Laser diffraction (Helos, Sympatec, Clausthal, Germany).

2.4. Encapsulation of WBPI

The raw whey protein isolate (WBPI) was encapsulated using sodium alginate. A solution of alginate and WBPI in distilled water was prepared. Initially, alginate was dissolved in water at a temperature of 60 °C and mixed for 1 h. Subsequently, WBPI was added, mixed, and homogenized for an additional hour at a temperature of 35 °C. The ratio of alginate to WBPI in the resulting solution was 1:5.

The solution was then pumped through a tube with a diameter of 0.2 mm using a peristaltic pump and dropped into a 10 % solution of CaCl₂ to form encapsulated balls. These formed encapsulates were filtered, washed three times with distilled water, and dried at laboratory temperature for 12 h. They were subsequently stored in a dark, dry place until further use. The encapsulation efficiency was verified by determining the protein content in the dry WBPI encapsulates. The size of the WBPI encapsulates was determined using a vibratory sieve shaker and test sieves (Retsch, Haan, Germany).

2.5. Sensory analysis of yogurt samples

The sensory analysis of all prepared samples was conducted one day after storage at the sensory laboratory of the Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Czech Republic. This laboratory is equipped in accordance with the requirements of the ISO 8589 standard. The sensory panel consisted of 20 participants with relevant experience and knowledge of dairy products, trained in general sensory analysis of various food products. Before the analysis, the problematics, and conditions of sensory analysis of dairy products were explained to all participants. Sensory descriptors were evaluated for all yogurt samples and compared to the reference. Maximum 4 samples were analyzed at the same time. The water and bread were used as an odor neutralizer for aroma and taste descriptors. The yogurt samples had the temperature of about 5 °C, which corresponds to usual temperature for eating yogurt.

Descriptors of homogeneity, firmness, and density described the textural perception of samples and were determined visually or mechanically by stirring with a teaspoon. Aroma of the samples was evaluated by smelling. Creaminess, sweetness, sourness, and bitterness described the taste properties and were evaluated after the perception of the samples in mouth. It was recommended to roll the samples on the tongue for several seconds and then evaluated the descriptor. Overall

Table 3
Sensory analysis descriptors.

Descriptor	1	3	5
Homogeneity	Inhomogeneous, big particles	Inhomogeneous, small particles	Homogenous, no particles
Firmness	Easy to stir, teaspoon is not standing	Firm, teaspoon is not standing	Firm, teaspoon is standing
Density	Thin, fluid	Thin, compact	Solid, compact
Creaminess	Sandy, lumpy	Creamy, small particles	Creamy, no particles
Aroma	Unpleasant, unnatural smell	Imperceptible	Pleasant, yogurt like
Sweetness	Imperceptible	Pleasant	Very intensive
Sourness	Imperceptible	Pleasant	Very intensive
Bitterness	Imperceptible	Middle intensive	Very intensive
Overall impression	I dislike	Acceptable	I like it very much

impression was determined by participants according to their personal preferences and requirements to yogurts.

Descriptor ratings were measured by 5-point scales characteristic for each descriptor. The points 1, 3 and 5 were defined according to Table 3. The median of the rating was used for evaluation using Statistica software (Tibco, Palo Alto, USA, version 14.1). The results of the sensory analysis were presented using radar graphs created in Microsoft Excel software (Microsoft, Redmond, USA, version 2019).

2.6. Syneresis of yogurt samples

Syneresis measurement was conducted to characterize the release of whey in yogurt over time. This measurement was performed after 7 days of storing the yogurt samples. A predetermined amount of each yogurt sample was placed on pre-wetted filter paper in a funnel. The whey released was collected in a graduated cylinder. Syneresis was determined as the volume of released whey after 3 h per 100 g of the yogurt sample in duplicate.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of WBPI

The WBPI was extracted for wheat bran according to the procedure described in 2.1. Protein material was subjected to analysis. The protein content in WBPI was 84.7 ± 0.3 %, comparable to commercially available protein isolates from soy or whey [3]. According to SDS-PAGE analysis (Fig. 1), WBPI contains protein fractions with molecular weights ranging from 6.5 to 145 kDa. The used isolation method did not cause the cleavage of wheat bran proteins into new shorter peptides (under 40 kDa), which could be. This is evident when comparing the WBPI bands with the bands of the raw wheat bran sample. Short peptides could be responsible for the bitter taste of plant-protein foods, making it undesirable to use them in higher amounts for food fortification [13].

Another nutritionally important factor is the amino acid profile (AAP) of WBPI. The high-quality protein isolates contain all essential amino acids (EAA) in high quantities. However, the intake of non-essential amino acids in the diet (NEAA) can also provide several health benefits. The content of semi-essential amino acids (SEAA) is particularly important for children and youth. The amino acid composition of WBPI is presented in Table 4.

The WBPI contains all essential amino acids (EAA), making it a nutritionally significant plant-protein supplement or fortifier, similar to soy protein isolate [14]. The most abundant amino acids in WBPI are glutamic acid, proline, and the semi-essential arginine. According to the amino acid profile (AAP), WBPI could be utilized in sports nutrition due to its relatively high content of amino acids responsible for muscle growth or regeneration. It could also be nutritionally beneficial for elderly individuals, helping to prevent or slow down the loss of muscle mass [15]. In addition to the influence of WBPI amino acids on the development of muscle mass, WBPI can be a good supplement to reduce blood pressure and improve outcomes in diabetes. It is also known, that

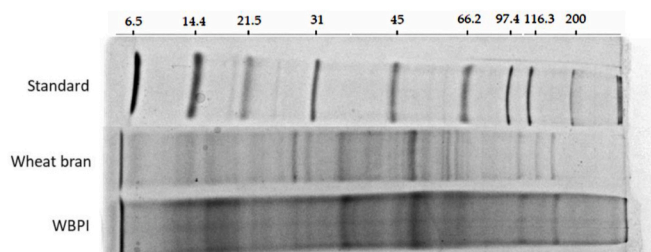


Fig. 1. Comparison of WBPI and wheat bran protein fractions (SDS-PAGE).

Table 4
Amino acid composition of WBPI [mg/100g].

EAA		SEAA		NEAA	
Val	4.6	Arg	7.7	Gly	5.2
Leu	6.8	His	3.3	Ala	4.6
Ile	2.8	–	–	Ser	4.7
Thr	3.3	–	–	Cys	1.6
Met	1.8	–	–	Asp	9.2
Lys	4.0	–	–	Glu	20.1
Phe	4.1	–	–	Tyr	3.7
Trp	0.9	–	–	Pro	9.5

EAA – essential amino acids; SEAA – semi-essential amino acids; NEAA – non-essential amino acids.

increased intake of certain amino acids positively affects the endocrine system include that of glucocorticoids, thyroid function, glucagon-like peptide 1, ghrelin, insulin-like growth factor-1 and leptin [16]. Lysine is the limiting amino acid in WBPI. However, even a single dose of WBPI (typically 30 g) covers, according to WHO, about 57 % of the recommended daily intake of lysine for 70 kg individual.

The composition of encapsulated WBPI (E-WBPI) differs from raw WBPI due to the alginate content covering the protein isolate. According to analysis, the protein content in E-WBPI was 53.9 %. Due to this decrease, the dosage of E-WBPI needed to be higher to maintain the required protein content of fortified yogurt compared to the dosage of raw WBPI (Table 2). Encapsulation substantially increased the particle size. The average size of E-WBPI determined by sieve analysis was 4.4 mm.

Important nutritional aspect of protein isolates is digestibility. Native plant proteins in general have lower digestibility compared to animal proteins due to the presence of antinutritional factors which can be exogenous (tannins, phytates and lectins) or endogenous (cross-linking or hydrophobicity). Determination of WBPI digestibility was proceeded according to the procedure described in 2.1. Total digestibility of WBPI was $93,4 \pm 0,2$ %. It is obvious, that isolation process significantly increased digestibility when compared to standard native plant proteins, which is normally between 75 and 80 % [17].

3.2. Raw WBPI fortification of yogurt

Individual samples of high-protein yogurts were prepared using direct fortification by raw WBPI. Yogurts with a protein content of 5 and 10 % were prepared according to the procedure described in chapter 2.2.

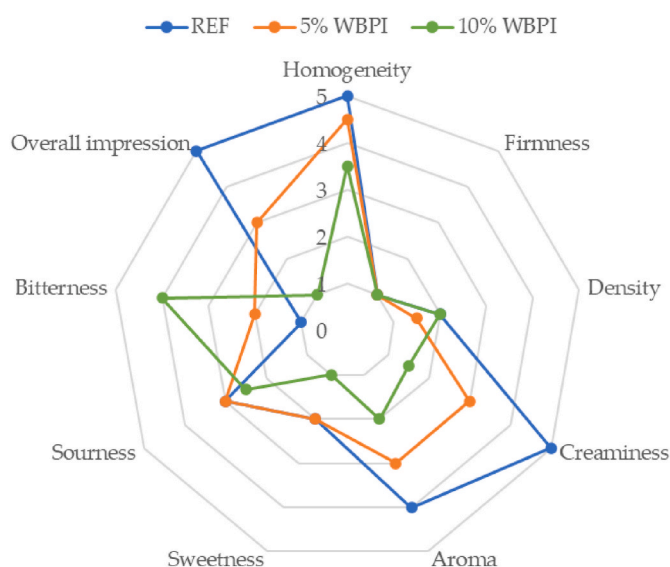


Fig. 2. Sensory descriptor scores of raw WBPI fortified yogurt samples.

According to the proposed technology, it was possible to prepare yogurts with a homogeneous structure and texture close to the reference yogurt. Produced samples were subjected to sensory analysis which revealed several sensory defects of fortified yogurts. The descriptor scores for WBPI-fortified yogurt samples were compared to the reference, which was plain reference yogurt (Fig. 2).

The physical characteristics of yogurt samples, such as firmness and density, were not affected by the WBPI fortification according to the sensory analysis and its statistical evaluation. All samples, including the reference, were evaluated as thin and easy to consume. However, the scores for other sensory descriptors changed with the addition of WBPI. The homogeneity score slightly decreased with increasing WBPI content, indicating uneven distribution or larger WBPI particles, the changes were also confirmed by ANOVA, which showed significant differences between samples ($P = 0.0122$). Most sensory panel participants evaluated the 10 % WBPI yogurt as inhomogeneous, with evidence of small lumps (score 3.5). The homogeneity perception of 5 % WBPI fortified yogurt was slightly better, but still inferior to that of the reference.

The creaminess feeling of the yogurt samples is closely related to homogeneity. The reference yogurt structure was described as mild and creamy in the mouth, with no lumps. On the other hand, WBPI-fortified yogurts were perceived as less creamy, and the 10 % WBPI sample structure was evaluated as sandy and lumpy. According to statistical evaluation the high protein samples and the reference were significantly different with the P value = 0.0001.

The aroma of yogurt samples was also affected by the addition of WBPI. The aroma of the reference sample was mostly evaluated as pleasant. It was revealed that WBPI additions led to the development of an aroma that was rather unpleasant for the sensory panel, which was confirmed by multiple comparison test. At a lower addition of WBPI, this phenomenon was not statistically significant, but the 10 % high-protein yogurt already showed a statistically significant deterioration of the aroma compared to the reference. WBPI has a characteristic grain aroma due to its origin, and this aroma persists in yogurts after WBPI fortification. The fat content in yogurts can even amplify this aroma. However, according to the sensory panel, this type of aroma is not natural for yogurts, and its presence reduced the aroma descriptor score.

Preferences for yogurt taste vary among individuals, but an appropriate perception of sweetness and sourness is generally acceptable. Yogurt should not exhibit any undesired or unpleasant taste, such as bitterness. These yogurt standards were maintained in the reference sample production, with sweetness slightly lower than the sensory participants' preferences and a moderate sourness. With WBPI addition, the taste perception of the fortified samples changed. The most significant difference was observed in the bitterness score ($P = 0.0004$). The 5 % WBPI yogurt was mostly described as moderately bitter (score 3), and the 10 % WBPI sample was perceived as even more bitter (score 4). The sourness of the fortified samples was almost identical to the reference, but the sweetness was likely masked by the bitterness and in the 10 % WBPI sample, it was described as unrecognizable (score 1). Statistically significant differences between sourness and sweetness perception of the samples and the reference were not observed.

It is well known that plant-based protein isolates can cause a bitter and astringent perception. The compounds responsible for bitterness can vary among proteins from different plant species [11]. Bitterness is commonly caused by the presence of small molecular weight peptides [18] or phenolic compounds [19]. Most plant protein isolates have an intense odor of their raw material. Although wheat protein aroma is less intense compared to various plant protein isolates [8], the grain aroma in WBPI yogurt was detected and described as less pleasant. Sandiness is also a natural characteristic of plant proteins and is associated with their low solubility. The solubility of protein isolates can be influenced by the extraction method, protein fraction content [20], or storage conditions [21]. The potential sandy perception of food limits the application of plant protein isolates. For yogurt fortification, it is necessary to treat the plant protein isolates to eliminate or reduce their sandy perception.

Table 5
Correlation coefficients between sensory descriptors and overall impression of WBPI fortified yogurt samples.

	Homogeneity	Firmness	Density	Creaminess	
Overall impression	0.4905	0.0734	0.1054	0.7489	
	Aroma	Sweetness	Sourness	Bitterness	Fortification
Overall impression	0.5789	0.4719	0.2366	-0.7933	-0.8294

According to the correlation coefficients provided by Spearman correlation test (Table 5), the overall impression score of individual samples was mainly affected by bitterness (-0.7933), aroma (0.5789), and creaminess (0.7489) of the yogurts. These descriptors are directly related to WBPI fortification. Consumers rated creamy, non-bitter, and pleasantly smelling yogurt samples with higher overall impression scores. It was also observed significant negative correlation between overall impression and degree of WBPI fortification (0.8294).

To improve the overall impression score of WBPI-fortified yogurt samples, it is necessary to mitigate or reduce the negative effects of adding WBPI on sensory descriptors. Adjusting the particle size of WBPI can enhance the creaminess score. Additionally, efforts should be made to mask the aroma and bitterness of WBPI with components more typical of yogurt. However, these enhancement procedures should not diminish the scores of other sensory descriptors of the yogurt samples or alter the natural characteristics of yogurt.

3.3. Enhancing of sensory properties of high-protein yogurts

The identification of the negative sensory properties of WBPI-fortified yogurt prompted modifications to both the raw WBPI and the yogurt recipe and manufacturing process. The objective was to significantly reduce or eliminate the negative sensory perceptions and enhance the overall impression score.

3.3.1. Grinding of WBPI

The negative evaluation of the creaminess of fortified yogurt was addressed by grinding and reducing the particle size of raw WBPI. Incorporating finely ground WBPI into the yogurt was intended to prevent the perception of sandiness in the product. The raw WBPI had a median particle size (x50) of 94.6 μm, which was reduced to a median particle size (x50) of 38.3 μm through ball mill grinding (referred to as G-WBPI).

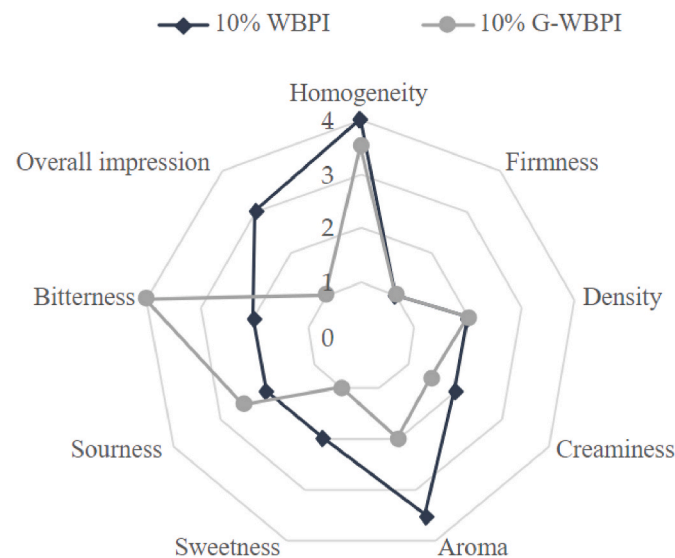


Fig. 3. Sensory descriptor scores of ground WBPI fortified yogurt sample.

The fortification of yogurt with ground WBPI was carried out following a process similar to the original manufacturing, and sensory analysis of these samples was conducted after 1 day of storage. The creaminess perception of yogurts fortified with raw and ground WBPI was compared, and the results are presented in Fig. 3.

Reducing the particle size of WBPI to less than 40 μm did not effectively eliminate the perception of sandiness in the yogurt. The textural sensory characteristics remained almost the same as those of yogurts fortified with raw WBPI. Additionally, the aroma perception of G-WBPI yogurt samples was evaluated to be even worse than that of yogurts fortified with raw WBPI. Furthermore, the sweetness score of the G-WBPI sample decreased. This reduction in sweetness could be attributed to the significant increase in bitterness of G-WBPI, which masked the sweet perception of the sample. The final low overall impression (score 1 – unacceptable) of yogurt samples fortified with ground WBPI revealed the potential adverse effects of fortifying high-protein (HP) foods with ground plant proteins on sensory properties.

Sandiness is considered a common sensory defect in all protein powders. Depending on the target food, achieving a specific minimum protein particle size is necessary to prevent sandiness. While reducing sandiness perception through grinding has been demonstrated in various studies [22,23], grinding WBPI did not effectively reduce sandiness perception. On the contrary, it led to a significant deterioration in other sensory properties. Creaminess is a crucial sensory property of yogurt, and any defects in this aspect are readily perceived by consumers. Addressing the sandiness issue in WBPI-fortified yogurt through particle size reduction alone proves challenging. Using alternative protein forms, such as balls instead of powder, could potentially help mitigate product sandiness while maintaining the creaminess of the original yogurt.

3.3.2. Protein blending

To enhance the taste of WBPI-fortified yogurts, protein blending was employed. A portion of the WBPI was substituted with dried milk while maintaining the 5% and 10% protein content in the yogurts. The blends were created to maintain a protein content ratio of 1:2 (MIX1) and 1:1 (MIX2) between WBPI and dried milk. Besides the protein fraction, the MIX samples were enriched with components from dried milk, such as fat and carbohydrates, which could also influence the sensory perception of the yogurt samples.

Sensory analysis of yogurts with 5% and 10% protein content was conducted individually to determine the acceptability limits of the yogurts. The descriptor scores for yogurt samples fortified with protein

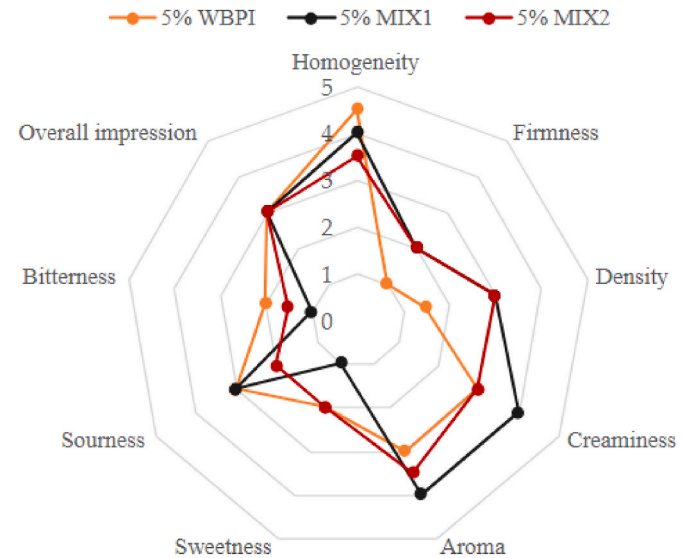


Fig. 4. Sensory descriptor scores of 5% MIX fortified yogurt samples.

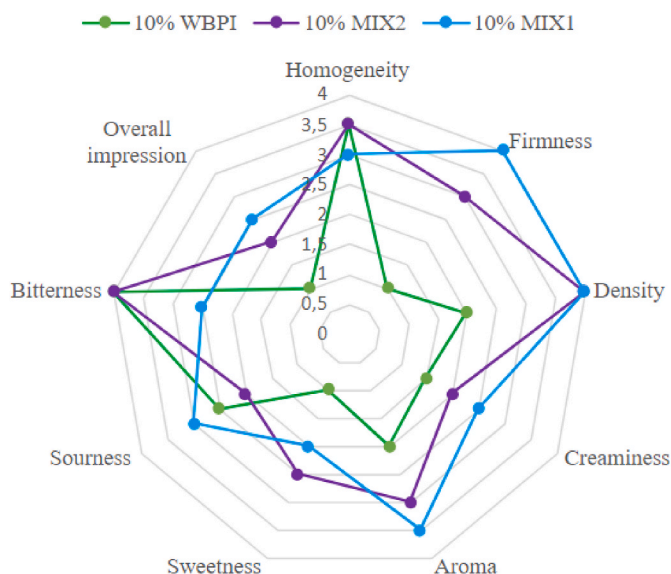


Fig. 5. Sensory descriptor scores of 10 % MIX fortified yogurt samples.

blends (MIX1 and MIX2, prepared according to the recipes listed in Table 2) were compared to those of raw WBPI-fortified yogurt. The results are presented in Figs. 4 and 5.

The scores for individual sensory descriptors differed between yogurts with 5 % and 10 % protein content, but only few descriptors of the samples were evaluated as statistically different according to multiple comparison test. Fortifying with blended protein materials to maintain 5 % protein content did not result in significant differences in taste sensory descriptors among the yogurt samples. However, the samples with dried milk were perceived as denser ($P = 0.0025$) and creamier ($P = 0.0486$). Combination of milk and WBPI led to a stiffer and more compact structure. Better synergy of mixed systems of milk and plant proteins for stabilizing the emulsions was also described in the research of Lima Nascimento et al. [24]. Additionally, milk proteins, specifically caseins, are more compatible with casein micelles due to their unique structural properties, such as open and flexible conformations and the presence of calcium phosphate. Plant proteins, on the other hand, have different properties that make them less compatible with casein micelles, including low solubility and lack of structural compatibility. Blending of plant proteins with milk proteins can improve this problem and increase solubility in aqueous solutions [25].

The aroma of yogurts with dried milk content was also rated as more pleasant. Conversely, the sample with 5 % WBPI was described as more homogeneous compared to the 5 % MIX yogurt samples with P value = 0.0339.

The differences in individual descriptors for 5 % protein yogurts did not result in a variation in the overall impression score. For yogurts with lower protein content, protein blending did not significantly increase scores for any sensory descriptor, which are generally important for yogurt consumers. It was also not proved the influence of WBPI fortification degree on overall impression.

The fortification using a blend of dried milk and WBPI to maintain a 10 % protein content in yogurts (Table 2) resulted in more notable changes in the perception of taste, structure, and aroma of MIX yogurt samples compared to the 10 % WBPI sample.

Homogeneity among the evaluated samples was similar, but the textural characteristics, such as firmness and density, of MIX samples were described as much more solid compared to the 10 % WBPI yogurt and were evaluated as significantly different ($P = 0.0001$ and 0.00001 respectively). The higher density of MIX samples was also observed in yogurts with a total protein content of 5 %. As mentioned earlier, a higher amount of dry matter in yogurts leads to a stiffer yogurt.

Additionally, the presence of milk proteins contributes to stabilizing the yogurt structure. This aligns with the results of the sensory analysis, where the highest density was observed in the sample 10 % MIX 1, which contains 10.8 g of dried milk.

Creaminess was also influenced by the addition of dried milk and statistical differences were evaluated ($P = 0.0294$). There were no significant observations of statistical differences between aroma and taste descriptors of yogurt samples, except of the bitterness perception ($P = 0.0444$).

The perception of bitterness in MIX samples varied. Bitterness reduction was observed only in the 10 % MIX1 sample, which had a higher content of dried milk. In the 10 % MIX2 and 10 % WBPI samples, bitterness was very intense, significantly affecting the overall impression (correlation coefficient -0.6966). The 10 % WBPI sample received the lowest overall impression score. The scores of MIX samples were higher, with the panel mostly describing them as acceptable. In these samples, the fortification by WBPI had great influence on the overall impression (cor. coefficient = -0.5019), but in comparison to samples fortified only by raw WBPI, the correlation between the fortification degree and the overall impression was not so significant.

It was demonstrated that substituting WBPI with dried milk positively influenced the sensory perception of fortified yogurts, although the diversity of amino acids was reduced. The lower amount of added WBPI and the presence of dried milk components increased the overall impression score of the 10 % MIX samples compared to 10 % WBPI-fortified yogurt. Whey and milk proteins are, based on their physical characteristics, the most suitable for incorporation into the yogurt structure. Furthermore, other milk components can effectively mask the aroma and bitter taste of WBPI [26] and improve the textural properties of yogurts. According to Karam, adding 1–2% whey protein concentrate to yogurt leads to a creamier perception, but the firmness and density of yogurt are low. Conversely, adding skimmed milk powder increases viscosity and reduces lumpiness in yogurts [27].

3.3.3. WBPI encapsulation

The encapsulation of WBPI was performed to mitigate the perception of sandiness, bitter taste, and enhance the aroma in WBPI-fortified yogurt. The WBPI was immobilized in alginate according to the procedure described in 2.4. Zhang et al. (2016) proved, that alginate is good delivery system for encapsulation and release of proteins in human nutrition. Release of proteins occurs in the small intestine environment at slightly acidic pH around 6.3 This pH is suitable for almost absolute release of proteins from alginate beads [28,29].

Encapsulation had significant effect on sensory properties of prepared yogurts. The scores for sensory descriptors of E-WBPI fortified yogurt samples are presented in Fig. 6.

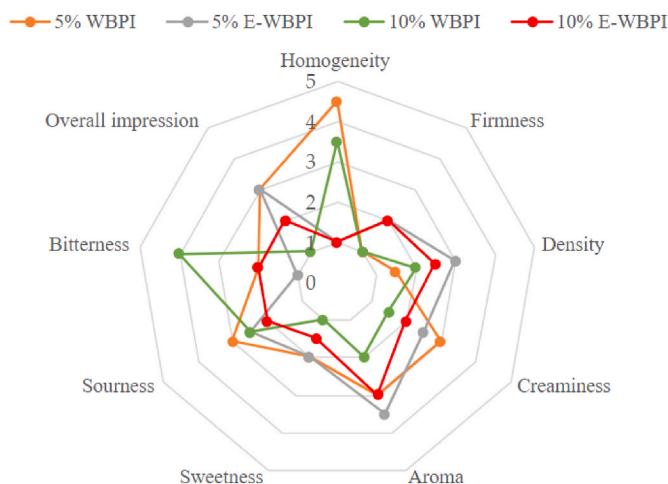


Fig. 6. Sensory descriptor scores of E-WBPI fortified yogurt samples.

The sensory analysis of 5 % and 10 % E-WBPI yogurts was compared to samples of raw WBPI. The encapsulation of WBPI altered the perception of E-WBPI yogurts compared to WBPI yogurt samples. The resulting WBPI encapsulate balls ranged in size from 0.25 to 0.63 cm. The addition of WBPI encapsulate strongly influenced the homogeneity score ($P = 0.0001$), with the yogurt samples described as non-homogeneous with visible particles. The other texture descriptors, as firmness and density, were not evaluated as statistically different. The creaminess of the samples was also not affected by the addition of E-WBPI, differences in this descriptor were not significant.

One advantage of WBPI encapsulation is the prevention of yogurt color alteration and masking of WBPI grain odor. The addition of raw WBPI turns the color of yogurt to brown, while the yogurt with E-WBPI maintains its original white color. The aroma of E-WBPI and 5 % WBPI yogurts was described as acceptable. However, a 10 % addition of raw WBPI to the yogurt caused the development of a less pleasant aroma, which also influenced the overall impression score.

Perceptions of sourness was not significantly different in any of the tested yogurt samples. However, differences in the perception of sweetness ($P = 0.0379$) and bitterness ($P = 0.0122$) between individual yogurt samples were observed. The encapsulation of WBPI reduced the bitterness of E-WBPI yogurt samples compared to 10 % WBPI yogurt and therefore sweet taste was perceived more intensively. In the 5 % E-WBPI sample, the bitterness was almost eliminated. The bitterness perception of 10 % E-WBPI was similar to the bitterness of the 5 % WBPI yogurt sample.

The overall score of the yogurt samples was mainly influenced by bitterness sweetness and creaminess perception (cor. coefficients = -0.6471 , 0.6113 , 0.6253 respectively). The 10 % WBPI yogurt sample was evaluated as unacceptable compared to E-WBPI samples. The overall impression score of the yogurt sample with 10 % E-WBPI was higher, but the yogurt was still not considered good enough to be acceptable for consumers. The presence of larger particles in yogurt is also undesirable [30]. The 5 % WBPI and 5 % E-WBPI received similar and the highest overall impression score among the compared yogurt samples.

3.4. Syneresis of high-protein yogurts

Syneresis of whey is one of the primary sensory defects observed in yogurts. This is mainly caused by the low dry matter content in yogurts. However, factors such as high incubation temperature, storage conditions, or an inappropriate ratio of casein and whey proteins can also contribute to whey separation. Commercially, it is recommended to use milk with a 15 % dry matter content to produce yogurt. Nevertheless, adding non-milk material to the yogurt increases the dry matter content, which can disrupt the yogurt micelle structure and increase product syneresis. The dry matter content and the degree of syneresis for each yogurt sample are presented in Fig. 7.

The syneresis of the reference yogurt was 31.8 ± 1.6 mL/100 g, a volume of whey separated from yogurt that was similar to the one determined by Erkaya et al. [31]. The addition of 5 % WBPI, in any form,

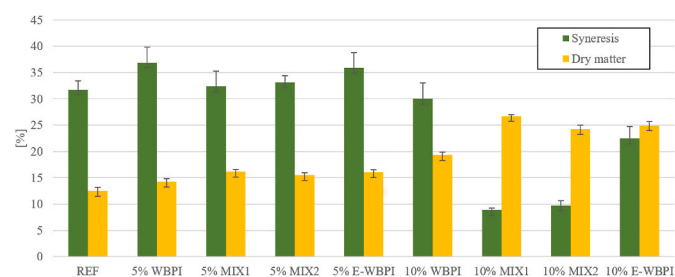


Fig. 7. The syneresis and dry matter content of yogurt samples; syneresis [mL/100 mL], dry matter [g/100 mL].

caused a slight increase in yogurt syneresis. According to Akin et al. [32], the addition of plant protein materials to fermented milk products increases their syneresis due to their low water-holding capacity. This was observed and confirmed by the syneresis of 5 % WBPI yogurt samples.

However, the syneresis of yogurt samples with 10 % WBPI content decreased compared to the reference yogurt. The lowest syneresis was observed in sample 10 % MIX1 with the addition of a blend of dry milk and WBPI. Due to its high content of dry matter and relatively low content of plant-origin WBPI, the syneresis of the 10 % MIX samples reduced by more than 20 mL/100 g. Delikanti et al. [33] also described the reduction of syneresis after the addition of whey protein. This reduction was confirmed in the case of the combination of dry milk and WBPI, but only up to a total 10 % protein content of the yogurt samples. The addition of E-WBPI to the 10 % protein yogurt also caused a reduction in whey syneresis. In addition to proteins, E-WBPI yogurt samples are fortified by carbohydrates, especially alginate. The presence of alginate could significantly influence the syneresis of the yogurt sample due to its water-holding capacity. The same phenomenon was described by Free-Manjarrez et al. [34] after the addition of encapsulated bean protein hydrolysate by arabic gum and whey protein concentrate to the yogurt.

The correlation coefficient between dry matter content and syneresis volume was -0.891 , revealing that an increase in the yogurt's dry matter decreases whey release. The indirect addition of carbohydrates, together with the protein fraction, to the yogurts can improve the strength of the yogurt structure. Therefore, fortifying yogurts with plant proteins of high purity can be inconvenient and may lead to excessive whey release.

4. Conclusions

Analysis of WBPI proved, that WBPI is good source of dietary proteins. WBPI contains complete spectrum of essential amino acids. Another significant positive feature of this isolate is its good digestibility (93.4 ± 0.2 %). However, fortifying yogurts with plant proteins is limited by the occurrence of sensory defects, notably sandiness, aroma, and bitterness, as confirmed by the production of WBPI-fortified yogurts.

It was revealed that the form in which WBPI is added to the yogurt samples has a significant impact on individual sensory descriptors and the final overall impression of the HP yogurts. Raw powder form of WBPI had negative impact on overall impression which was directly connected with textural and flavour descriptors bitterness, aroma and creaminess.

To reduce sandiness, and thus increase the degree of creaminess, WBPI was ground to a finer, analytically defined powder. This modification proved to be inefficient. It did not solved problems with sandiness and the yogurt samples were also perceived as significantly more bitter, which was further reflected in the deterioration of the overall evaluation of the product.

Substituting WBPI with dried milk was demonstrated to positively influence the sensory perception of fortified yogurts, despite a reduction in amino acid diversity. The inclusion of dried milk components, alongside a lower quantity of WBPI, elevated the overall impression score of yogurt samples fortified with a 10 % mixture compared to those fortified solely with 10 % WBPI. Wheat bran protein and milk proteins, due to their physical characteristics, are deemed highly suitable for integration into the yogurt matrix. Moreover, other constituents of milk effectively mask the aroma and bitter taste of WBPI while also improving the textural properties of yogurts.

Encapsulating WBPI in alginate improved yogurt by reducing sandiness and bitterness while masking unpleasant aroma. Sensory analysis showed differences between E-WBPI and raw WBPI yogurts, with E-WBPI maintaining yogurt color and aroma better. Texture-wise, E-WBPI affected homogeneity but not creaminess, firmness, or density.

Bitterness was reduced in E-WBPI, enhancing sweetness perception. Larger particles in proved have negative impact on overall impression.

Syneresis was observed to increase with 5 % added WBPI but decreased with 10 % addition, especially when combined with dry milk. This reduction is attributed to improved yogurt structure. Encapsulated plant proteins also showed a reduction in whey release due to added carbohydrates. A strong negative correlation (-0.891) between dry matter content and syneresis volume suggests that increasing dry matter decreases whey release.

WBPI proved to be a suitable raw material to produce high-protein yogurt. The raw isolate treatment procedures proposed herein are effective enough to minimize the additive's effects on sensory properties.

Funding

This research was supported by project no. FCH-S-23-8330 financed by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

CRediT authorship contribution statement

Zuzana Slavíková: Writing – original draft, Visualization, Validation, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Pavel Diviš:** Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition, Formal analysis. **Wojciech Białas:** Methodology. **Magdalena Montowska:** Methodology. **Michaela Adamczyková:** Investigation. **Jaromír Pořízka:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Software, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Jaromir Porizka reports financial support was provided by Brno University of Technology. If there are other authors, they declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

References

- [1] High protein yogurt market outlook (2023 to 2033), Futuremarketinsights.com, 2023. <https://www.futuremarketinsights.com/reports/high-protein-yogurt-market>. (Accessed 17 January 2024).
- [2] *Codex Alimentarius, Milk and Milk Products*, second ed., FAO and WHO, Rome, 2011. ISBN 978-92-5-105837-4.
- [3] M. Mondor, A.J. Hernández-Álvarez, Processing technologies to produce plant protein concentrates and isolates, in: A. Manickavasagan, L.-T. Lim, A. Ali (Eds.), *Plant Protein Foods*, Springer International Publishing, 2022, pp. 61–108, https://doi.org/10.1007/978-3-030-91206-2_3.
- [4] M.K. Sharif, M. Saleem, H.R. Sharif, R. Saleem, Enrichment and fortification of traditional foods with plant protein isolates, in: A. Manickavasagan, L.-T. Lim, A. Ali (Eds.), *Plant Protein Foods*, Springer International Publishing, 2022, pp. 131–169, https://doi.org/10.1007/978-3-030-91206-2_5.
- [5] A. Krasnoshtanova, L.V. Shul'ts, Preparation and evaluation of the functional properties of protein isolates and hydrolysates from plant raw materials, *Chemistry of plant raw material* (4) (2022) 299–309, <https://doi.org/10.14258/jcpm.20220410952>.
- [6] J. Pořízka, Z. Slavíková, K. Bidmonová, M. Vymětalová, P. Diviš, Physicochemical and sensory properties of bread fortified with wheat bran and whey protein isolates, *Foods* 12 (13) (2023) 2635, <https://doi.org/10.3390/foods12132635>.
- [7] E.D. Teodor, V. Moroeanu, G.L. Radu, Lignans from medicinal plants and their anticancer effect, *Mini-Rev. Med. Chem.* 20 (12) (2020) 1083–1090, <https://doi.org/10.2174/1389557520666200212110513>.
- [8] C. Rodríguez-García, C. Sánchez-Quesada, E. Toledo, M. Delgado-Rodríguez, J. Gaforio, Naturally lignan-rich foods: a dietary tool for health promotion? *Molecules* 24 (5) (2019) <https://doi.org/10.3390/molecules24050917>.
- [9] F. Blanco-Vaca, L. Cedó, J. Julve, Phytosterols in cancer: from molecular mechanisms to preventive and therapeutic potentials, *Curr. Med. Chem.* 26 (37) (2019) 6735–6749, <https://doi.org/10.2174/0929867325666180607093111>.
- [10] M. Rudrapal (Ed.), *Polyphenols*, Wiley, 2023, <https://doi.org/10.1002/9781394188864>.
- [11] K. Jakobson, A. Kaleda, K. Adra, M.L. Tammik, H. Vaikma, T. Kriščiunaite, R. Vilu, Techno-functional and sensory characterization of commercial plant protein powders, *Foods* 12 (14) (2023) 2805, <https://doi.org/10.3390/foods12142805>.
- [12] J. Czubinski, M. Montowska, E. Pospiech, E. Lampart-Szczapa, Proteomic analysis of *Lupinus angustifolius* (var. Zeus and Bojar) and *Lupinus luteus* (var. Lord and Parys) seed proteins and their hydrolysates, *J. Sci. Food Agric.* 97 (15) (2017) 5423–5430, <https://doi.org/10.1002/jsfa.8436>.
- [13] P. Ongkowiwoyo, E. Tello, D.G. Peterson, Identification of a bitter peptide contributing to the off-flavor attributes of pea protein isolates, *J. Agric. Food Chem.* 71 (19) (2023) 7477–7484, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c00435>.
- [14] P. Qin, T. Wang, Y. Luo, A review on plant-based proteins from soybean: health benefits and soy product development, *Journal of Agriculture and Food Research* 7 (2022), <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100265>.
- [15] H. Nicastro, D.F. Seixas Chaves, A.H. Lancha, An overview of branched-chain amino acids in exercise and sports nutrition, in: *Nutrition and Enhanced Sports Performance*, Elsevier, 2013, pp. 367–375, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396454-0.00037-0>.
- [16] N.E. Flynn, M.H. Shaw, J.T. Becker, Amino acids in health and endocrine function, in: G. Wu (Ed.), *Amino Acids in Nutrition and Health*, Springer International Publishing, 2020, pp. 97–109, https://doi.org/10.1007/978-3-030-45328-2_6.
- [17] A.G.A. Sá, Y.M.F. Moreno, B.A.M. Carciofi, Food processing for the improvement of plant proteins digestibility, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 60 (20) (2020) 3367–3386, <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1688249>.
- [18] Y. Fu, J. Chen, K.H. Bak, R. Lametsch, Valorisation of protein hydrolysates from animal by-products: perspectives on bitter taste and debittering methods, *Int. J. Food Sci. Technol.* 54 (4) (2019) 978–986, <https://doi.org/10.1111/ijfs.14037>.
- [19] R.L. Heiniö, M.W.J. Noort, K. Katina, S.A. Alam, N. Sozer, H.L. deKock, M. Hersleth, K. Poutanen, Sensory characteristics of wholegrain and bran-rich cereal foods – a review, *Trends Food Sci. Technol.* 47 (2016) 25–38, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.002>.
- [20] K.K. Ma, M. Greis, J. Lu, A.A. Nolden, D.J. McClements, A.J. Kinchla, Functional performance of plant proteins, *Foods* 11 (4) (2022) 594, <https://doi.org/10.3390/foods11040594>.
- [21] A. Mimouni, H.C. Deeth, A.K. Whittaker, M.J. Gidley, B.R. Bhandari, Rehydration of high-protein-containing dairy powder: slow- and fast-dissolving components and storage effects, *Dairy Sci. Technol.* 90 (2–3) (2010) 335–344, <https://doi.org/10.1051/dst/2010002>.
- [22] I. Lima, H. Guraya, E. Champagne, The functional effectiveness of reprocessed rice bran as an ingredient in bakery products, *Nahrung-Food* 46 (2002) 112–117.
- [23] M. Prückler, C. Lorenz, A. Endo, K. Kraber, K. Dürschmid, K. Hendriks, F. SoaresdaSilva, E. Auterith, W. Kneifel, H. Michlmayr, Comparison of homo- and heterofermentative lactic acid bacteria for implementation of fermented wheat bran in bread, *Food Microbiol.* 49 (2015) 211–219, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.02.014>.
- [24] L.G. Lima Nascimento, D. Odelli, A. Fernandes de Carvalho, E. Martins, G. Delaplace, P. Peres de Sá Peixoto Júnior, N.F. Nogueira Silva, F. Casanova, Combination of milk and plant proteins to develop novel food systems: what are the limits? *Foods* 12 (12) (2023) <https://doi.org/10.3390/foods12122385>.
- [25] A. Krentz, I. García-Cano, J. Ortega-Anaya, R. Jiménez-Flores, Use of casein micelles to improve the solubility of hydrophobic pea proteins in aqueous solutions via low-temperature homogenization, *J. Dairy Sci.* 105 (1) (2022) 22–31, <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20902>.
- [26] L. Fengming, Taste-masking Technology by Taking Milk Powder as Taste-Masking Agent and Application Thereof, Chinese Patent CN101884406A, 2009.
- [27] M.C. Karam, C. Gaiani, C. Horsi, J. Burgain, J. Scher, Effect of dairy powders fortification on yogurt textural and sensorial properties: a review, *J. Dairy Res.* 80 (4) (2013) 400–409, <https://doi.org/10.1017/S0022029913000514>.
- [28] A. Aburub, M. Fischer, M. Camilleri, J.R. Semler, H.M. Fadda, Comparison of pH and motility of the small intestine of healthy subjects and patients with symptomatic constipation using the wireless motility capsule, *Int. J. Pharm.* 544 (1) (2018) 158–164, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.04.031>.
- [29] Z. Zhang, R. Zhang, L. Zou, D.J. McClements, Protein encapsulation in alginate hydrogel beads: effect of pH on microgel stability, protein retention and protein release, *Food Hydrocolloids* 58 (2016) 308–315, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.03.015>.
- [30] S.M. Olarte Mantilla, H.M. Shewan, R. Shingleton, J.R. Stokes, H.E. Smyth, Ability to detect and identify the presence of particles influences consumer acceptance of yoghurt, *Food Qual. Prefer.* 85 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2020.103979>.

- [31] T. Erkaya, M. Sengül, A comparative study on some quality properties and mineral contents of yoghurts produced from different type of milks, *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 18 (2) (2012) 323–329, <https://doi.org/10.9775/kvfd.2011.5498>.
- [32] Z. Akin, T. Ozcan, Functional properties of fermented milk produced with plant proteins, *LWT–Food Sci. Technol.* 86 (2017) 25–30, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.025>.
- [33] B. Delikanli, T. Ozcan, Effects of various whey proteins on the physicochemical and textural properties of set type nonfat yoghurt, *Int. J. Dairy Technol.* 67 (4) (2014) 495–503, <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12142>.
- [34] S. Free-Manjarrez, S.L. Mojica, H. Espinosa-Andrews, N. Morales-Hernández, Sensory and biological potential of encapsulated common bean protein hydrolysates incorporated in a Greek-style yogurt matrix, *Polymers* 14 (5) (2022) 854, <https://doi.org/10.3390/polym14050854>.

Utilization of wheat bran protein isolate as a fortifier for production of high protein yoghurts

DOI: 10.15567/mljekarstvo.2024.0406

*Zuzana Slavíková**, *Igor Smatana*, *Pavel Diviš*, *Jiří Smilek*, *Eva Slaninová*,
Jaromír Pořízka

Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Food Science and Biotechnology,
612 00 Brno, Czech Republic

Received: 24.07.2023. **Accepted:** 15.9.2024.

*Corresponding author: zuzana.slavikova@vut.cz

Abstract

Yoghurts with increased protein content are becoming very popular and beneficial across all age groups. The economic growth of the high-protein yoghurt market contributes to the production and research of various alternatives for these products. In this study, plain yoghurt was fortified with 2 % and 5 % wheat bran protein isolate (WBPI) before fermentation. The influence of the addition of WBPI on nutritional and rheological characteristics, bacteria growth, and sensory properties of yoghurt samples was evaluated. Apart from the nutritional benefits of wheat bran proteins, which have a favourable amino acid profile, fortification also resulted in changes in the rheological properties of the yoghurts. The increase in dry matter led to an increase in water holding capacity and, consequently, the viscosity of the yoghurt samples. The presence of WBPI did not affect bacterial growth or the fermentation process. However, the natural bitter taste of WBPI persisted even after the fermentation process, negatively influencing the sensory acceptability of WBPI-fortified yoghurt samples.

Keywords: wheat bran protein isolate; yoghurt fortification; high protein food; rheology

Introduction

Yoghurt is a widely consumed dairy product that has gained popularity due to its specific taste, nutritional value, and health benefits. However, the moderate protein content of traditional yoghurts limits their ability to provide adequate protein supplementation for individuals who require higher protein intake, such as athletes, elderly people, and those recovering from injuries or illnesses. To address this limitation, researchers have explored various methods for processing high-protein yoghurts. The market for organic and functional foods is rapidly growing, with a projected global size of \$275.77 billion by 2025, driven by increasing consumer awareness of the link between diet and health (Tomić Maksan et al. 2021; Grand View Research, 2019).

Among the common methods of producing high-protein yoghurt is the concentration of yoghurt after fermentation (Ozer et al., 1998; Ozer et al., 1999) or prior to fermentation by methods such as ultrafiltration (Ratray and Jelen, 1996; Gésan-Guiziou et al., 1999) or microfiltration of milk (Chen et al., 2018). Another often-used approach for high-protein production is the direct fortification of yoghurt with various protein concentrates and isolates before the fermentation step. Protein sources can be of both animal and plant origin. While animal protein sources are mainly limited to the use of whey protein powders, the situation in the realm of plant proteins is significantly more diverse. In addition to conventionally employed soy and wheat proteins, proteins derived from various crops, including pea, fava bean, mung bean, rice, oat, chickpea, chia seed and potato, are also utilized (de Paiva Gouvea et al., 2010).

A particularly promising plant protein candidate for integration into dairy products is wheat bran protein isolate (WBPI). Wheat bran is a by-product of wheat milling and is a rich source of protein, dietary fiber, and antioxidants (Elleuch et al., 2011). A notable advantage of WBPI lies in its procurement from the readily available wheat bran, the outer layer of the wheat grain, which is an economically viable and environmentally sustainable by-product abundantly generated during the milling process. The protein isolation process involves sequential procedural stages, including defatting, solubilisation, and precipitation, with derivation from the peripheries of the wheat grain (Pořízka et al., 2023). The resulting protein isolate is characterized by a high protein content (up to 90 %), with essential amino acids in quantities that meet or exceed the recommended daily intake (Uttam et al., 2023). WBPI is notably rich in asparagine, glutamic acid, leucine, arginine, and proline. Its Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score (PDCAAS) closely approximates that of pea and soy protein isolates. In addition to its protein related constituents, WBPI incorporates bioactive elements, including polyphenols, phytosterols, and lignans. These constituents have been empirically associated to health benefits, including the improvement of cardiovascular

health, antioxidative efficacy, and potential anticancer properties (Pořízka et al., 2023; Alzuwaid et al., 2020; Uttam et al., 2023; Nongonierma and Fitzgerald, 2017; Arte et al., 2019; Jørgensen et al., 2019).

The potential application of WBPI in yoghurt extends beyond its nutritional benefits. The use of plant-based proteins, such as WBPI, can contribute to sustainable food production practices by reducing reliance on animal-based protein sources. Additionally, fortifying yoghurt with WBPI can offer a new product for consumers seeking alternative protein sources and expand the yoghurt product market. However, high-protein products, in general, exhibit fundamentally different sensory properties compared to standard yoghurt. Differences are particularly evident in texture, taste, and aroma. For example, the incorporation of whey protein isolate (WPI) in reduced-fat and non-fat yoghurts played a crucial role in replacing fat and improving the texturing properties of these yoghurts. The addition of WPI improved the structure and quality of the yoghurts, particularly in terms of texture and physical characteristics. Set-type yoghurts fortified with WPIs exhibited a softer texture and experienced less syneresis (liquid separation) compared to the control yoghurts (Hashim et al., 2021). Another study demonstrated that fortification with 5 % soy protein led to an increased consistency and stability of the yoghurts. On the other hand, fortification with 5 % whey protein resulted in the formation of aggregates due to excessive coagulation during fermentation. The moisture content and total solid content of the yoghurts were affected by the type as well as by the concentration of proteins used for fortification. The higher the protein fortification level, the lower the moisture content, and the higher the total solid content of the yoghurts. The addition of whey protein led to yoghurts with higher hardness, gumminess, and chewiness compared to the control (without protein fortification) and soy protein-fortified yoghurts. However, whey protein and soy protein did not significantly affect the springiness and cohesiveness of the yoghurts. In terms of rheological properties, soy protein-fortified yoghurts exhibited dynamic viscosity and apparent viscosity values similar to the control yoghurt. The shear stress-shear rate relationship, which determines the apparent viscosity of the yoghurts, could be accurately predicted using the power law model, with an accuracy ranging from 80 % to 99 %, depending on the level of protein fortification and protein type (Mitra et al., 2022).

The novelty of the present study lies in the use of a new type of protein isolate (WBPI) in the production of high-protein yoghurt. This application has not been studied at a scientific level yet. The objectives of this study were to determine the optimal levels of WBPI for yoghurt fortification and to evaluate the impact of its inclusion on sensory and nutritional properties. Additionally, the study investigated the effect on the rheological properties and viability of starter culture bacteria.

Materials and methods

Isolation and characterization of protein isolate from wheat bran

Protein isolate from wheat bran was obtained using the pH-shift method with modifications. Wheat bran was milled (<0.2 mm). The protein fraction was extracted from wheat bran using distilled water with a pH exceeding 10.5 (1 M NaOH) in a ratio of 1:20 (w/v) with continuous mixing for 2 hours. The pH of the suspension was monitored every 30 minutes. After 2 hours, the suspension was centrifuged (8000 rcf, 10 minutes), and the supernatant was collected. The pH of the supernatant was adjusted to 4 (1 M citric acid), mixed thoroughly, and cooled to 4 °C to facilitate protein precipitation from the aqueous phase. After another centrifugation, the sediment was collected and lyophilized. The protein content of the isolated WBPI was determined using the Euroconverter EA 3100 elemental analyser, where the N content was multiplied by the protein conversion factor 6.31 for wheat bran.

Manufacturing of high protein yoghurt

Fresh, whole-fat milk (3.6 %), pasteurized (Moravia Lacto, Czech Republic), was used for manufacturing all yoghurt samples. A freeze-dried starter culture (YF-L812, Chr. Hansen, Denmark) containing *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* was used to create a 1 % w/w inoculum. For the reference sample, the milk was first heated to 70 °C for 10 minutes. After cooling to room temperature, the inoculum was added to the milk in a ratio of 1:100. The mixture was thoroughly mixed and placed in a yoghurt maker (43 °C) for 8 hours. Finally, the reference sample was refrigerated and cooled to 4 °C for further analysis.

To manufacture high-protein yoghurt, WBPI was added to the milk after heating, prior to fermentation. The protein content of the products was increased by adding 2 % and 5 % of WBPI. The suspensions were homogenized before and after inoculation. The conditions for producing high-protein yoghurts were the same as for the reference. All samples were analysed in duplicates. Before every analysis, the samples were mixed and homogenized again.

Dry matter and water holding capacity

To assess the impact of the addition of the protein concentrate on the physical properties of fermented milk products, the dry matter (DM) and water holding capacity (WHC) of individual samples were determined in duplicate. DM was measured by drying the samples in an aluminium dish in a dryer (105 °C) until a constant weight was achieved (approximately 3.5 hours). For WHC determination, approximately 10 mL of each sample was weighed in a 50-mL tube and centrifuged (10,000 rpm, 10

minutes, 25 °C). The supernatants were removed, and the sediment of the individual samples was then weighed. WHC was expressed as grams of sediment per 100 grams of the sample.

Rheological characteristics

The flow properties of the prepared samples were determined using a rotational rheometer (DHR-2, TA Instruments, Inc.). A flat steel plate-plate geometry with a 40 mm diameter was employed as a suitable sensor for these types of samples. Experiments were conducted at least in duplicates under a controlled temperature of 10 °C (maintained throughout the entire experiment using a Peltier plate system).

Before each individual measurement, a conditioning step was included (180 s; 10 °C). During this step, the samples were relaxed and tempered. The axial force during the squeezing of the sample into the geometry gap (1,000 µm) did not exceed 5 N. The steady-state flow step was applied to each individual sample in logarithmic scale mode. The shear rate was increased logarithmically from 0.1 s⁻¹ to 10 s⁻¹ with 6 measuring points per decade. After reaching the final shear rate (10 s⁻¹), the apparent viscosity was measured during the application of shear rates in descending mode (10 - 0.1 s⁻¹; 6 points per decade).

Analysis of cell number and cells viability by flow cytometry

The determination of the cell number and viability of bacteria was performed using flow cytometry with the fluorescent viability probe propidium iodide (Thermo Fisher Scientific). Initially, 1 gram of both reference and fortified yoghurts (8 days old) was resuspended in 10 mL of citrate buffer (100 mM, pH 4.4) and diluted with the buffer to a cell density of approximately 10⁶ cells per mL. Subsequently, 2 µL of propidium iodide (2 mg/mL) was added to the suspensions (resulting in a final concentration of the stain of 4 mg/mL in 1 mL of the sample). The bacterial suspensions were then incubated in the dark at room temperature for 5 minutes. After incubation, the stained samples were immediately measured at the single-cell level using the Cytek Aurora flow cytometer (Cytek Biosciences Inc.) in triplicates, and the signal was observed in collecting channel B6 (617±35 nm).

Sensory analysis of yoghurt

The quality of the final fermented milk products was assessed through sensory analysis after 7 days of storage. Sensory descriptors such as texture, appearance, and flavour were evaluated by a panel consisting of 20 participants from the Faculty of Chemistry, all with

relevant experience and knowledge of dairy products. The panel compared individual samples, including the reference, and assigned scores ranging from 1 to 5. The scores were given based on yoghurt descriptors, including homogeneity, viscosity, flavour, lumpiness, sweetness, sourness, bitterness, and overall impression. The median of each descriptor for individual samples was used for evaluation by Statistica (Tibco, USA).

Results and discussion

Properties of WBPI

The protein isolate used to produce protein yoghurts was obtained from wheat bran using the pH shift method as described in the experimental section. The composition of WBPI is presented in Table 1 and compared to soy and whey protein isolates.

The composition of WBPI is comparable in many parameters to standard whey and soy protein isolates, typically ranging between 70-90 % protein content. WBPI contains 71.2 % proteins, primarily glutelins, albumins, prolamins, and globulins (Idris et al., 2003). The percentage composition of individual protein fractions depends on the degree of wheat bran grinding (Baladrán-Quintana et al., 2015).

Carbohydrates constitute the second most abundant component of WBPI. In plant protein isolates, they mainly consist of nutritionally significant dietary fiber, while in animal protein isolates, mono- and oligosaccharides dominate. The amount of carbohydrates in protein isolates is influenced by the isolation process or the structure of the protein source. Conversely, plant protein isolates typically have a very low fat content compared to animal proteins, making them nutritionally suitable for various types of diets.

A crucial nutritional indicator for protein isolates is their amino acid profile (AAP). The AAP of WBPI is presented in Table 2. WBPI contains nutritionally essential amino acids (EAA) as well as nonessential amino acids (NEAA). While EAA are generally considered more desirable, NEAA also provide several health benefits.

WBPI contains all essential amino acids, with their concentrations comparable to standard soy isolates. The total amount of EAA in WBPI is slightly lower than in whey protein isolate, as EAA are naturally more abundant in animal proteins. Nevertheless, this doesn't imply that WBPI is a poor source of EAA. Methionine is the limiting amino acid in WBPI, but a single dose of WBPI (typically 30 g of protein isolate) covers more than 40 % of the recommended daily intake of methionine.

The most abundant amino acid in WBPI is glutamic acid, and it also contains a relatively high amount of proline and semi-essential amino acids arginine and histidine (SEAA). Considering the AAP, WBPI could be considered for use in sports nutrition. Proline, along with hydroxyproline,

Table 1. Composition of WBPI (Tamaru et al. 2014; Mohsen et al., 2009; Onwulata et al., 2004)

Component (%)	WBPI	Soya PI	WPI
Protein	71.2	90	74.3-77.5
Moisture	6.7	4-5.5	3.4-4.9
Ash	1.2	4-6	2.6-4.8
Fat	0.5	0.3-0.5	1.9-4.2
Carbohydrates	20.4	0.5	11.8-14.7

Table 2. Amino acid profiles of different protein isolates [g/100 g] (Mohsen et al., 2009; Tamaru et al., 2014; Banaszek et al., 2019; Chungchunlam et al., 2016).

		WBPI	Soy PI	Whey PI
EAA	Val	4.6	4.0-4.1	4.4-5.7
	Leu	6.8	6.9-7.8	8.8-10.0
	Ile	2.8	3.8-4.2	4.6-6.4
	Thr	3.3	3.2-4.0	4.5-7.0
	Met	1.8	1.2	1.6-2.5
	Lys	4	5.7-6.1	7.5-8.1
	Phe	4.1	4.6-4.8	2.6-2.7
	Trp	0.9	0.9-1.3	1.3-1.6
SEAA	Arg	7.7	7.1-7.5	2.3
	His	3.3	2.4-2.7	1.4-1.6
NEAA	Gly	5.2	3.7-4.2	1.4
	Ala	4.6	3.7-4.3	3.5-5.5
	Ser	4.7	5.0-5.4	4.5-4.6
	Cys	1.6	1.2-1.3	1.7-2.2
	Asp	9.2	10.7-11.7	8.4-12.2
	Glu	20.1	18.0-20.0	13.0-17.7
	Tyr	3.7	3.6-5.4	2.3-2.8
Pro	9.5	4.7-5.5	5.5-6.6	

is crucial for body protein synthesis, being the second most abundant amino acid in collagen and playing an important role in wound healing (Wu et al., 2011). Arginine supplementation is significant for sport performance, as it is related to NO synthesis, leading to increased blood flow, improved muscle contraction, and enhanced oxygen kinetics (Viri et al., 2020). The intake of histidine, up to about 8 g per day, could also provide several health benefits, including the reduction of inflammation in obese individuals, support for physical concentration, and a decrease in fatigue (Moro et al., 2020).

Influence of yoghurt fortification by WBPI on functional properties

Reference and fortified yoghurts were prepared following the procedures described in the experimental section. The fortification aimed to increase the protein content through direct addition of WBPI into the milk prior to fermentation. The milk used contained 3.2 % proteins,

primarily represented by caseins and serum proteins. The addition of WBPI to the milk altered the nutritional parameters of the products, as shown in Table 3.

WBPI effectively increased the protein content of yoghurt. With the addition of 2 % and 5 % WBPI, the protein content of yoghurts increased to 4.6 % and 6.8 %, respectively. The increase in protein intake is essential not only for athletes but also for elderly people. While the protein Recommended Dietary Allowance (RDA) is 0.8 g/kg/day, experts recommend an intake of up to 2.0 g/kg/day, depending on an individual's physical condition (Wolfe, 2012; Baum et al., 2016; Volpi et al., 2013). This nutritional strategy helps older individuals avoid muscle loss, maintain strength, and can even reduce or prevent obesity (Volpi et al., 2013; Wolfe et al., 2008).

For the elderly, plant proteins may be preferred over animal proteins due to their lack of cholesterol (Qin et al., 2022) and their potential to reduce existing levels (Maki et al., 2010; Tong et al., 2021).

In addition to protein content, WBPI slightly enhanced yoghurts with dietary fiber, offering additional dietary benefits. Meanwhile, the fat content remained almost identical to that of the reference yoghurt.

Water holding capacity and dry matter

Protein-fortified yoghurts are significant not only due to their nutritional benefits but also because their improved consistency makes them more palatable, especially for the elderly. Texture is a crucial factor influencing consumers' perception of food. Texture defects can result from ingredients, the manufacturing process, or even during storage. While sensory analysis provides a basic description of texture quality, several instrumental methods can be employed for texture characterization.

In the case of yoghurts, one undesirable phenomenon is the syneresis of whey. Generally, higher dry matter content in yoghurts decreases the risk of syneresis. According to Tamine and Deeth (1979), it is recommended for commercial yoghurt production to use milk containing about 15 % dry matter. Dry matter content is often increased by adding milk or whey powder, leading to the production of thick and smooth yoghurts. However, the reduction of syneresis was not observed after adding maca powder to yoghurts, mainly composed of carbohydrates (Korkmaz et al., 2021).

Texture defects and changes in yoghurt are commonly evaluated by determining water holding capacity (WHC) or rheological properties of the products. WHC is quantified as the drainage of the sample under specific conditions, describing the structural homogeneity. The percentage of drained yoghurt after dynamic drainage (centrifugation) most often defines WHC, although it does not necessarily correspond to syneresis under normal storage conditions.

Figure 1 illustrates the percentage increase in WHC of yoghurt samples after the addition of WBPI. Enriching yoghurts with 2 % and 5 % WBPI increased dry matter to 14.5 % and 17.5 %, respectively, whereas the reference

Table 3. Nutritional parameters of yoghurt samples

	Reference (%)	2 % WBPI (%)	5 % WBPI (%)
Protein	3.2	4.6	6.8
Fat	3.6	3.6	3.6
Moisture	88.6	88.7	88.9
Carbohydrates	4.6	5.0	5.6

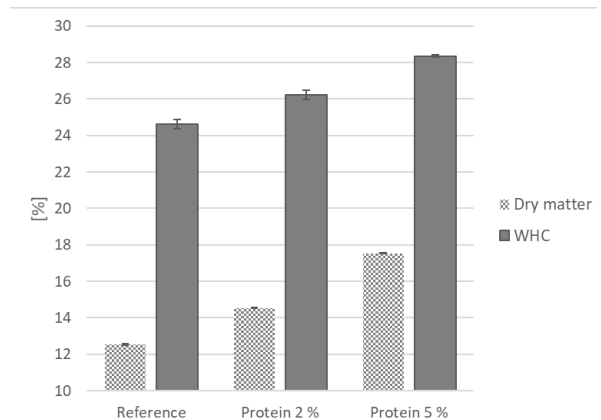


Figure 1. Dry matter (DM) and water holding capacity (WHC) of individual yoghurt samples.

yoghurt contains 12.5 % dry matter. Fortification also caused an increase in WHC of the yoghurts by 1.6 % and 3.7 %, respectively, compared to the reference. The addition of WBPI to the yoghurts clearly shows a similar trend to the addition of milk or whey powder. Under the testing conditions, syneresis in both fortified samples was reduced.

Rheological properties of yoghurt samples

The flow properties of the reference yoghurt and yoghurts with the addition of 2 % and 5 % WBPI were measured as a function of shear rates using the methodology described above. All samples, regardless of the protein concentration, exhibited typical non-Newtonian behaviour, specifically pseudo plastic (shear-thinning) behaviour. In this behaviour, the apparent viscosity decreased with increasing shear rate, reaching a minimum viscosity at the highest shear rate.

Additionally, all samples demonstrated thixotropic behaviour, indicating that the apparent viscosity did not reach the zero-shear viscosity (8.8 Pa.s for the reference sample; see Figure 2) before deformation. After cycling deformation (an increasing and decreasing loop of shear rates), the apparent viscosity significantly decreased to 6.0 Pa.s, suggesting that the sample's recovery was no more than 70 %. This finding is beneficial as it indicates that the flowability of the measured samples can be significantly modulated through shear deformation.

One of the most crucial parameters connected with the sensory analysis related to the swallowability and processability could be found in yield stress (τ_0). The yield stress is the stress at which a material starts to flow. This crucial parameter is related to the structure of yoghurt. The yield stress was calculated through the rheological model Herschel-Bulkley.

$$\tau = \tau_0 + K \cdot \gamma^n$$

Where τ is shear stress measured during the steady-state flow step, τ_0 is determined yield stress, K is consistency parameter and n is flow index. For all samples, the yield stress can be obtained by averaging the stress from the sweep between 0.1 and 1 s⁻¹ giving the result of 0.94±0.07 Pa (the sample without addition of protein). The values of yield stress for the samples with the addition of protein are summarized in Table 4.

One of the primary objectives of the presented rheological data was to establish the relationship between the presence of protein in yoghurt composition and the flow properties of these samples concerning sensory analysis. Therefore, all protein-enriched samples were compared for the following parameters: 1) yield stress (as described above); 2) zero-shear viscosity (the apparent viscosity of the sample before shear application, specifically at the lowest shear rate); 3) infinite-shear viscosity (the apparent viscosity of the sample at the highest applied shear rate – 10 s⁻¹); 4) sample recovery (the ratio of zero-shear viscosities after the application of the lowest shear rate and after the cycling loop deformation). These crucial parameters are summarized in Table 4.

It can be observed that a lower protein content (2 % w/v) in the yoghurt composition influenced the flow properties of the measured samples. The yield stress of yoghurt significantly increased by adding 2 % w/v of WBPI, becoming independent of the protein isolate concentration at higher levels. While the addition of protein can modulate the textural properties of yoghurt, a higher content (5 % w/v) is counterproductive for the flow properties of yoghurts. Higher values of yield stress also contribute to increased kinetic stability in these samples, preventing phase separation of oily and water phases.

Samples with added protein exhibited higher values for both, zero-shear and infinite-shear viscosities, following a similar trend to the yield stress dependence. When a lower content of WBPI (<2 % w/v) was incorporated into the yoghurt composition, both parameters significantly increased compared to the reference sample without protein addition. This could impact the processability,

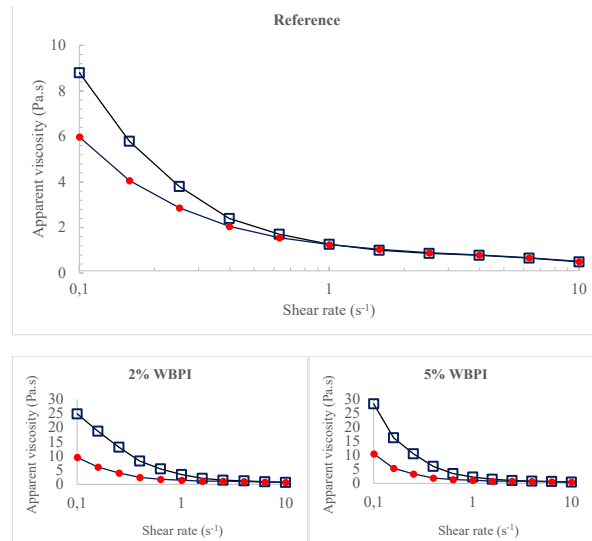


Figure 2. Apparent viscosity as a function of shear rate in forward (●); reverse (□).

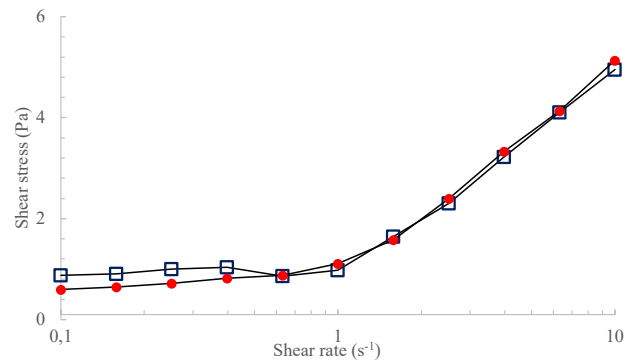


Figure 3. Shear stress as a function of shear rate in forward (●); reverse (□)

kinetic stability, and swallowability of the samples, affecting the sensory analysis of yoghurts.

In summary, the relationship between flow properties and protein addition indicates that both textural and flow properties, especially yield stress and apparent viscosities, are significantly influenced by a relatively low content of WBPI (2 % w/v). These concentrations of protein lead to a substantial increase in yield stress, positively affecting the kinetic stability and textural properties of yoghurts. However, higher protein content in the yoghurt composition is inconsequential, as all

Table 4. Rheological parameters of yoghurt samples

Content of WBPI (% w/v)	τ_0^1 (Pa)	η_0^2 (Pa.s)	η_∞^3 (Pa.s)	Recovery ⁴ (%)
0	0.94±0.07	8.8±0.4	0.50±0.02	67.9
2	2.83±0.39	24.8±1.2	0.82±0.03	38.4
5	2.64±0.59	28.3±1.4	0.53±0.03	37.5

significant parameters (especially yield stress and zero-shear viscosities) remain almost constant, considering the standard deviation, at the same values as the sample with 2 % w/v protein in the composition.

Flow cytometry analysis

One of the beneficial impacts of yoghurt consumption is its positive effect on gut health, attributed to *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. These yoghurt culture bacteria provide numerous positive effects and therapeutic applications, such as enhancing the gastrointestinal mucus layer, stimulating the immune system, reducing lactose intolerance, and preventing lipid peroxidation (Dempsey and Corr, 2022; Fuller R., 1989). The quantity of live bacteria is thus directly related to the quality of the product.

As part of the experiments, the quantity of live yoghurt bacteria was determined using flow cytometry, and the impact of WBPI addition on cell viability was evaluated. The results are presented in Table 5.

The results of the cytometric analysis showed that fortification of yoghurt by WBPI did not influence the viability of cells compared to the reference yoghurt. All samples contained more than 1.109 viable cells. The slight decrease in the number of cells per millilitre in samples containing protein, within one order of magnitude, was likely due to the presence of phenolic compounds (2.3±0.15 mg/g GAE), which are extracted during the isolation process. Phenolic acids are known to inhibit the growth of gram-positive lactobacilli strains (Cueva et al., 2010).

These results can be compared with the commonly used whey protein fortifier. In an earlier study conducted by Ranok et al. (2021), it was revealed that whey protein fortification can positively influence the number of viable cells in yoghurt during long-term storage and also during transit through the gastrointestinal tract. It was concluded that whey protein concentrate slowed down the damage to probiotic cell proteins, enhanced protein repair, and mitigated the effects of acidic environments (Begley et al., 2005; Vargas et al., 2015).

Sensory analysis

The reference yoghurt and WBPI-fortified samples were evaluated through sensory analysis, as described in the experimental section. The medians of the scores assigned to all descriptors are illustrated in the radar graph (Figure 4).

The descriptors were divided into texture, flavour, and overall impression groups. The addition of WBPI influenced all evaluated descriptors. Sensory analysis indicated that

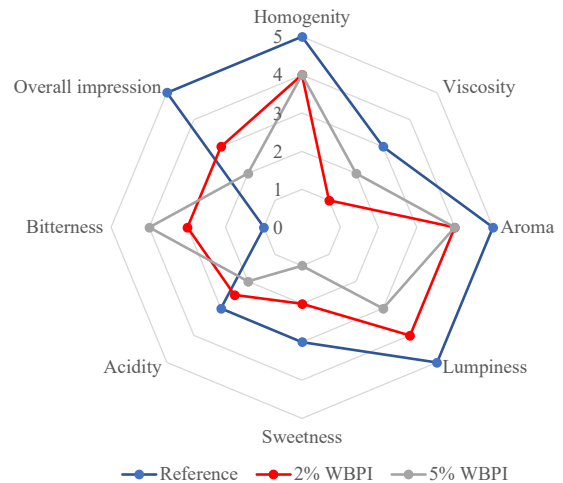


Figure 4. Radar graph of sensory descriptors scores of yoghurt samples

Table 5. Number of bacteria cells in yoghurt samples

	Cell number/mL	Live cells [%]
Reference	$(3.76) \cdot 10^9$	91.5
2 % WBPI	$(2.95) \cdot 10^9$	92.3
5 % WBPI	$(1.53) \cdot 10^9$	90.4

the addition of WBPI to yoghurt had a negative impact on consumer acceptability. Fortified samples exhibited sensory defects, leading to a decrease in the overall score with an increase in WBPI content. The overall consumer impression was correlated with most sensory descriptors (Table 6).

The overall score was mainly influenced by the bitterness descriptor, with a correlation coefficient of -0.8013. Bitterness in protein hydrolysates is often attributed to small molecular weight peptides interacting with taste bud cells (Aluko, 2017). The relatively high concentration of hydrophobic amino acids, such as proline (9.5 mg/g), in WBPI may contribute to the bitterness in fortified yoghurts (Sonklin et al., 2018). Additionally, the proteolytic enzymes in the outer layers of wheat kernel can support the formation of small molecular weight peptides.

Several other potential causes of bitterness in WBPI-fortified yoghurt include the content of free non-volatile phenolic compounds, which can adhere to taste receptors, and the development of bitter taste during lipid oxidation due to wheat bran’s lipoxygenase activity (Galliard, 1986; Heiniö et al., 2016; Cong et al., 2022).

Other taste descriptors (sweetness, acidity, aroma) were less affected by WBPI addition compared to the

Table 6. Correlation coefficients of individual sensory descriptors

	Homogeneity	Viscosity	Aroma	Lumpiness	Sweetness	Acidity	Bitterness
Overall impression	0.2002	0.4894	0.4812	0.5832	0.5934	0.2033	-0.8013

bitterness score. Slight decreases in sweetness and increases in acidity were observed with increasing WBPI concentration. The aroma was evaluated one point worse, likely due to the presence of grain scents from wheat bran.

Regarding textural descriptors (homogeneity, viscosity, lumpiness), WBPI addition increased dry matter and altered texture scores compared to the reference sample. The addition of non-milk protein can disrupt gel structure in yoghurts, leading to changes in texture descriptors. Homogeneity decreased, and lumpiness increased due to the presence of visible WBPI particles. Higher WBPI fortification (5 %) resulted in lumpier yoghurt, negatively perceived by the sensory panel. Resolving components' incompatibility in yoghurt samples could involve substituting milk with plant-based milk (e.g., soymilk). This substitution would eliminate the reliance on casein micelle chains and clusters for yoghurt gel formation (Xu et al., 2022).

Viscosity scores indicated that fortified yoghurts were stiffer compared to the reference yoghurt. The 2 % WBPI addition caused a more significant decrease in viscosity score than the 5 % addition, aligning with measured rheological characteristics, which showed the highest modulation of textural properties up to 2 % w/v protein addition. This observation is most probably related to the formation and stability of the yoghurt structure, which is negatively impacted by higher WBPI concentration.

Conclusions

The fortification of yoghurts with WBPI resulted in significant differences in product characteristics. The

presence of WBPI altered not only the nutritional but also the physicochemical properties of yoghurts, with more pronounced changes observed with increasing WBPI addition. The presence of WBPI had a relatively positive impact on water-holding capacity (WHC) and viscosity, leading to reduced syneresis in fortified yoghurts. Interestingly, even a higher addition of WBPI (5 %) did not affect bacterial growth during fermentation. However, the original bitter taste of the protein isolate was not masked by the fermentation process and was notably detected during sensory analysis. The descriptor of bitterness emerged as the primary reason for the lower overall acceptability score of the fortified samples.

In conclusion, WBPI-fortified yoghurts cannot be considered comparable to regular yoghurts. It is crucial to acknowledge the inherent bitter taste of WBPI as a characteristic of plant protein-fortified yoghurts. Alternatively, efforts should be directed towards finding ways to mitigate the bitterness of WBPI to enhance product appeal for consumers.

Funding

This research was supported by Technology Agency of the Czech Republic, project no. FW02020135 and by project no. FCH-S-23-8330 financed by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

Primjena izolata proteina pšeničnih mekinja kao suplementa u proizvodnji visoko proteinskih jogurta

Sažetak

Jogurti s povećanim udjelom proteina postaju vrlo popularni i korisni za sve dobne skupine. Gospodarski rast tržišta visokoproteinskih jogurta doprinosi proizvodnji i istraživanju različitih alternativa tih proizvoda. U ovom istraživanju je obični jogurt obogaćen dodatkom 2 % i 5 % izolata proteina pšeničnih mekinja (WBPI) prije fermentacije. Proizvedenim uzorcima se određivao utjecaj dodatka WBPI na nutritivna i reološka svojstva, rast bakterija i senzorska svojstva. Osim nutritivnih prednosti proteina pšeničnih mekinja, koji imaju pogodan profil aminokiselina, obogaćivanje je također rezultiralo promjenama u reološkim svojstvima jogurta. Povećanje udjela suhe tvari dovelo je do povećanja kapaciteta zadržavanja vode i, posljedično, do povećanja viskoznosti proizvedenih uzoraka jogurta. Dodatak WBPI nije utjecao na rast bakterija niti na proces fermentacije. Međutim, prirodni gorak okus WBPI-ja zadržao se čak i nakon procesa fermentacije, negativno utječući na senzorsku prihvatljivost obogaćenih uzoraka jogurta.

Ključne riječi: izolat proteina pšeničnih mekinja; obogaćivanje jogurta; visokoproteinska hrana; reologija

References

1. Aluko, R.E. (2017): Structural characteristics of food Protein-derived bitter peptides. Bitterness. New Jersey. <https://doi.org/10.1002/9781118590263.ch6>
2. Alzuwaid, N.T., Sissons, M., Laddomada, B., Fellows, C.M. (2020): Nutritional and functional properties of durum wheat bran protein concentrate. *Cereal Chemistry* 97 (2), 304-315. <https://doi.org/10.1002/cche.10246>
3. Arte, E., Huang, X., Nordlund, E., Katina, K. (2019): Biochemical characterization and technofunctional properties of bioprocessed wheat bran protein isolates. *Food Chemistry* 289, 103-111. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.020>
4. Baladrán-Quintana, R.R., Mercado-Ruiz, J.N., Mendoza-Wilson, A.M. (2015): Wheat Bran Proteins: A Review of their uses and potential. *Food Reviews International* 31 (3), 279-293. <https://doi.org/10.1080/87559129.2015.1015137>
5. Banaszek, A., Townsend, J.R., Bender, D., Vantrease, W. C., Marshall A.C., Johnson, K.D. (2019): The effects of whey vs. pea protein on physical adaptations following 8-weeks of high-intensity functional training (HIFT): A pilot study. *Sports* 7 (1), 12. <https://doi.org/10.3390/sports7010012>
6. Baum, J., Kim, I., Wolfe, R. (2016): Protein consumption and the elderly: what is the optimal level of intake? *Nutrients* 8 (6), 359. <https://doi.org/10.3390/nu8060359>
7. Begley, M., Gahan, C.G.M., Hill, C. (2005): The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews* 29 (4), 625-651. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.09.003>
8. Chen, G.Q., Leong, T.S.H., Kentish, S.E., Ashokkumar, M., Martin, G.J.O. (2019): Membrane Separations in the Dairy Industry. In separation of functional molecules in food by membrane technology (pp. 267-304). London. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815056-6.00008-5>
9. Chungchunlam, S.M.S., Henare, S.J., Ganesh, S., Moughan, P. J. (2016): Effect of whey protein and a free amino acid mixture simulating whey protein on measures of satiety in normal-weight women. *British Journal of Nutrition* 116 (9), 1666-1673. <https://doi.org/10.1017/S0007114516003767>
10. Cong, W., Tello, E., Simons, C.T., Peterson, D.G. (2022): Identification of non-volatile compounds that impact flavor disliking of whole wheat bread made with aged flours. *Molecules* 27 (4), 1331. <https://doi.org/10.3390/molecules27041331>
11. Cueva, C., Moreno-Arribas, M.V., Martín-Álvarez, P.J. (2010): Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in Microbiology* 161 (5), 372-382. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.04.006>
12. de Paiva Gouvêa, L., Caldeira, R., de Lima Azevedo, T., Galdeano, M.C., Felberg, I., Lima, J.R., Grassi Mellinger, C. (2023): Physical and techno-functional properties of a common bean protein concentrate compared to commercial legume ingredients for the plant-based market. *Food Hydrocolloids* 137, 108351. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108351>
13. Dempsey, E., Corr, S.C. (2022): *Lactobacillus* spp. for gastrointestinal health: current and future perspectives. *Frontiers in Immunology* 13, 840245. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.840245>
14. Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C. (2011): Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry* 124 (2), 411-421. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.077>
15. Fuller, R. (1989): Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66 (5), 365-378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x>

16. Galliard, T. (1986): Hydrolytic and oxidative degradation of lipids during storage of wholemeal flour: Effects of bran and germ components. *Journal of Cereal Science* 4 (2), 179-192.
[https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(86\)80020-0](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(86)80020-0)
17. Gésan-Guiziou, G., Boyaval, E., Daufin, G. (1999): Critical stability conditions in crossflow microfiltration of skimmed milk: transition to irreversible deposition. *Journal of Membrane Science* 158 (1-2), 211-222.
[https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(99\)00017-4](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(99)00017-4)
18. Grand View Research. (2019): Functional Foods Market Size, Share & Trends Analysis Report By Ingredient (Probiotics, Proteins & Peptides, Phytochemicals & Plant Extracts, Omega-3 Fatty Acids), By Product, By Application, And Segment Forecasts, 2019 - 2025. <https://www.grandviewresearch.com> (22.7.2023).
19. Hashim, M.A., Nadochii, L.A., Muradova, M.B., Proskura, A.V., Alsaleem, K.A., Hammam, A.R.A. (2021): Non-fat yoghurt fortified with whey protein isolate: physicochemical, rheological, and microstructural properties. *Foods* 10 (8), 1762.
<https://doi.org/10.3390/foods10081762>
20. Heiniö, R.L., Noort, M.W.J., Katina, K., Alam, S.A., Sozer, N., De Kock, H.L., Hersleth, M., Poutanen, K. (2016): Sensory characteristics of wholegrain and bran-rich cereal foods – A review. *Trends in Food Science & Technology* 47 (1), 25-38.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.002>
21. Idris, W.H., Babiker, E.E., El Tinay, A.H. (2003): Fractionation, solubility and functional properties of wheat bran proteins as influenced by pH and/or salt concentration. *Nahrung/Food* 47 (6), 425-429.
<https://doi.org/10.1002/food.200390094>
22. Jørgensen, C.E., Abrahamsen, R.K., Rukke, E.O., Hoffmann, T.K., Johansen, A.G., Skeie, S. B. (2019): Processing of high-protein yoghurt - A review. *International Dairy Journal* 88 (1), 42-59.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.08.002>
23. Korkmaz, I.O., Bilici, C., Korkmaz, S. (2021): Sensory, pH, syneresis, water-holding capacity, and microbiological changes in homemade yoghurt prepared with maca (*Lepidium meyenii*) powder and propolis extract. *International Journal of Gastronomy and Food Science* 23 (1), 100291.
<https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100291>
24. Tomić Maksan, M., Tudor Kalit, M., Pavlina, A., Mesic, Ž. (2021): Consumers' attitudes, motives and behaviour towards organic yoghurt in Croatia. *Mljekarstvo* 72 (1), 43-53.
<https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2022.0105>
25. Maki, K.C., Beiseigel, J.M., Jonnalagadda, S.S., Gugger, C.K., Reeves, M.S., Farmer, M.V., Kaden, V.N., Rains, T. M. (2010): Whole-grain ready-to-eat oat cereal, as part of a dietary program for weight loss, reduces low-density lipoprotein cholesterol in adults with overweight and obesity more than a dietary program including low-fiber control foods. *Journal of the American Dietetic Association*, 110 (2), 205-214.
<https://doi.org/10.1016/j.jada.2009.10.037>
26. Mitra, P., Nepal, K., Tavade, P. (2022): Effect of whey and soy proteins fortification on the textural and rheological properties of value-added yoghurts. *Applied Food Research* 2 (2), 100195.
<https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100195>
27. Mohsen, S.M., Fadel, H.H.M., Bekhit, M.A., Edris, A.E., Ahmed, M.Y.S. (2009): Effect of substitution of soy protein isolate on aroma volatiles, chemical composition and sensory quality of wheat cookies. *International Journal of Food Science+Technology* 44 (9), 1705-1712.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.01978.x>
28. Moro, J., Tomé, D., Schmidely, P., Demersay, T., Azzout-Marniche, D. (2020): Histidine: A systematic review on metabolism and physiological effects in human and different animal species. *Nutrients* 12 (5), 1414.
<https://doi.org/10.3390/nu12051414>
29. Nongonierma, A.B., Fitzgerald, R.J. (2017): Strategies for the discovery and identification of food protein-derived biologically active peptides. *Trends in Food Science & Technology* 69, 289-305.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.003>

30. Onwulata, C.I., Konstance, R.P., Tomasula, P.M. (2004): Minimizing variations in functionality of whey protein concentrates from different sources. *Journal of Dairy Science* 87 (3), 749-756.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73218-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73218-X)
31. Özer, B.H., Bell, A.E., Grandison, A.S., Robinson, R.K. (1998): Rheological properties of concentrated yoghurt (Labneh). *Journal of Texture Studies* 29 (1), 67-79.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1998.tb00154.x>
32. Özer, B.H., Robinson, R.K. (1999): The behaviour of starter cultures in concentrated yoghurt (labneh) produced by different techniques. *LWT - Food Science and Technology* 32 (7), 391-395.
<https://doi.org/10.1006/fstl.1999.0566>
33. Pořízka, J., Slavíková, Z., Bidmonová, K., Vymětalová, M., Diviš, P. (2023): Physicochemical and sensory properties of bread fortified with wheat bran and whey protein isolates. *Foods* 12 (13), 2635.
<https://doi.org/10.3390/foods12132635>
34. Qin, P., Wang, T., Luo, Y. (2022): A review on plant-based proteins from soybean: Health benefits and soy product development. *Journal of Agriculture and Food Research* 7 (1), 100265.
<https://doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100265>
35. Ranok, A., Kupradit C., Khongla C., Musika S., Mangkalan S., Suginta W. (2021): Effect of whey protein concentrate on probiotic viability and antioxidant properties of yoghurt during storage and simulated gastrointestinal transit. *International Food Research Journal*, 28 (1), 110-119.
36. Rattray, W., Jelen, P. (1996): Protein standardization of milk and dairy products. *Trends in Food Science & Technology* 7 (7), 227-234.
[https://doi.org/10.1016/0924-2244\(96\)10024-8](https://doi.org/10.1016/0924-2244(96)10024-8)
37. Sonklin, C., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O., Ratanakhanokchai, K. (2018): Volatile flavour compounds, sensory characteristics and antioxidant activities of mungbean meal protein hydrolysed by bromelain. *Journal of Food Science and Technology* 55 (1), 265-277.
<https://doi.org/10.1007/s13197-017-2935-7>
38. Tamaru, S., Kurayama, T., Sanoko, M., Fukuda, N., Nakamori, T., Furuta, H., Nagata, Y., Tanaka, K. (2014): Dietary soybean peptides containing a low-molecular fraction can lower serum and liver triglyceride levels in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 60 (6), 436-442.
<https://doi.org/10.3177/jnsv.60.436>
39. Tamine, A.Y., Deeth, H.C. (1979): Yoghurt: technology and biochemistry. *Journal of Food Protection* 43 (7), 939-977.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-43.12.939>
40. Tong, L. T., Xiao, T., Wang L. (2021): Plant protein reduces serum cholesterol levels in hypercholesterolemia hamsters by modulating the compositions of gut microbiota and metabolites. *iScience* 24 (12), 103435.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103435>
41. Uttam, A.N., Padte, S., Raj, G.J.V., Govindaraju, K., Kumar, S. (2023): Isolation, characterization, and utilization of wheat bran protein fraction for food application. *Journal of Food Science and Technology* 60 (2), 464-473.
<https://doi.org/10.1007/s13197-022-05617-8>
42. Vargas, L.A., Olson, D.W., Aryana, K.J. (2015): Whey protein isolate improves acid and bile tolerances of *Streptococcus thermophilus* ST-M5 and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. bulgaricus LB-12. *Journal of Dairy Science* 98 (4), 2215-2221.
<https://doi.org/10.3168/jds.2014-8869>
43. Volpi, E., Campbell, W.W., Dwyer, J.T., Johnson, M.A., Jensen, G.L., Morley, J.E. Wolfe, R.R. (2013): Is the optimal level of protein intake for older adults greater than the recommended dietary allowance? *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 68 (6), 677-681.
<https://doi.org/10.1093/gerona/gls229>
44. Wolfe, R.R. (2012): The role of dietary protein in optimizing muscle mass, function and health outcomes in older individuals. *British Journal of Nutrition* 108 (2), 88-93.
<https://doi.org/10.1017/S0007114512002590>

45. Wolfe, R.R., Miller, S.L., Miller, K.B. (2008): Optimal protein intake in the elderly. *Clinical Nutrition* 27 (5), 675-684.
<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2008.06.008>
46. Wu, G., Bazer, F.W., Burghardt, R.C., et al. (2011): Proline and hydroxyproline metabolism: implications for animal and human nutrition. *Amino Acids* 40 (4), 1053-1063.
<https://doi.org/10.1007/s00726-010-0715-z>
47. Xu, X., Cui, H., Xu, J. (2022): Effects of different probiotic fermentations on the quality, soy isoflavone and equol content of soy protein yoghurt made from soy whey and soy embryo powder. *LWT* 157 (1), 113096.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113096>

Article

Physicochemical and Sensory Properties of Bread Fortified with Wheat Bran and Whey Protein Isolates

Jaromír Pořízka ^{1,*}, Zuzana Slavíková ¹, Karolína Bidmonová ¹, Miroslava Vymětalová ² and Pavel Diviš ¹

¹ Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, 612 00 Brno, Czech Republic; zuzana.slavikova@vut.cz (Z.S.); divis@fch.vut.cz (P.D.)

² Mlýny J. Voženílek, Ltd., Průmyslová 107, 503 02 Předměřice nad Labem, Czech Republic; pvj@mlynyvozenilek.cz

* Correspondence: porizka@fch.vut.cz

Abstract: This study investigated the effect of fortifying baked goods with wheat bran (WBPI) and whey protein isolates (WPI) on their physicochemical and sensory properties. The aim was to enhance the nutritional value by incorporating high-protein ingredients. WBPI and WPI, which are rich in essential amino acids, were chosen to create high-protein flour blends. The main advantage of WBPI is that it is derived from readily available and inexpensive wheat bran. High-protein flour blends fortified with substitutions of 5%, 10%, and 15% flour with WBPI and WPI were subjected to chemical and rheological analysis. WBPI substitution slightly increased water binding and softening, but it resulted in a decrease in dough quality. In contrast, WPI substitution prolonged dough development time, improved dough stability, and enhanced farinographic quality. WBPI-substituted dough exhibited comparable extensographic properties to the reference flour, with 5% WBPI substitution leading to improved energy and dough resistance. However, as the level of WBPI flour substitution increased, extensographic parameters gradually declined without further enhancing the dough's mechanical properties. Samples with 5% WPI substitution demonstrated superior mechanical properties compared to the reference sample. Baguette with high WBPI substitution was associated with reduced overall acceptance due to a bitter taste caused by the presence of small peptides, ferulic acid, and tannins, as confirmed by correlation analysis.

Keywords: high protein food; pastry; wheat bran; protein isolates; whey protein; rheology; sensory analysis



Citation: Pořízka, J.; Slavíková, Z.; Bidmonová, K.; Vymětalová, M.; Diviš, P. Physicochemical and Sensory Properties of Bread Fortified with Wheat Bran and Whey Protein Isolates. *Foods* **2023**, *12*, 2635. <https://doi.org/10.3390/foods12132635>

Academic Editor: Lubomir Lapcik

Received: 29 May 2023

Revised: 27 June 2023

Accepted: 1 July 2023

Published: 7 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Pastries are a popular food worldwide and are a regular part of many people's diets. Currently there is growing interest in creating pastries with higher nutritional value and fewer calories. This has led researchers and food manufacturers to explore the potential of fortifying pastries with functional ingredients that can provide additional nutritional benefits. Increasing the protein content by using protein isolates is currently one of the most promising approaches for the production of modified food [1–7].

Protein additives in general can be used as functional ingredients in preparing high-protein foods and can be of both animal and plant origin. Physicochemical properties that can be affected by the addition of protein isolates, include texture, color, and nutrition. For example, the addition of proteins to pastry formulations can lead to changes in rheology and specific volume, which may result in changes in the texture and mouthfeel. Additionally, the polyphenols present in plant isolates can cause the finished product to have a darker color. Plant protein isolates in pastries can also increase the nutritional value by increasing protein and fiber while reducing fat [8–10].

One isolate with a high potential for use in the baking industry is wheat bran protein isolate (WBPI). It is isolated from the outer layer of the wheat grain through a series of

processing steps that include defatting, solubilization, and precipitation. The essential advantage of WBPI is that it is produced from commonly available wheat bran, which is a cheap and sustainable material produced in large quantity during milling [11].

WBPI is a plant-based protein isolate with a well-balanced amino acid profile that is comparable to plant proteins like soy and pea and has a very similar Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score (PDCAAS). The isolate is particularly rich in asparagine, glutamic acid, leucine, arginine, and proline. In addition to its protein content, WBPI also contains bioactive compounds such as polyphenols, phytosterols, and lignans that have been linked with health benefits, such as improved cardiovascular health, antioxidant activity, and anticancer properties [12].

The food application of WBPI has not been extensively studied although a few studies have described its functional properties in model systems. It has been proven that WBPI has the potential for application in food formulation due to its good emulsifying and foaming properties and high water and fat holding capacity [13]. WBPI has also been experimentally used as a protein fortifier in pasta [14] and bread [15]. Spaghetti quality was significantly affected when 5–10% of WBPI was used to enhance the protein content. The deterioration of functional properties was observed with higher WBPI substitutions, but cooking loss and appearance were still comparable to common whole-meal pasta. The evaluation of the influence of WBPI fortification on the functional properties of bread is more complicated. Alzuwaid et al. [14] and Uttam et al. [15] achieved different results when assessing the effect of fortification on loaf volume. From a detailed study of the results, a substantial improvement in volume was achieved when only the albumin fraction of WBPI was used. Non-fractionated WBPI had the opposite effect.

Based on previously published findings, it is evident that the effect of fortifying pastries with WBPI on physiochemical and sensory properties is still not sufficiently understood. The aim of this study is to expand the available knowledge with new findings by using conventionally used analytical techniques from the field of dough analysis such as farinography and extensography. A baking experiment was also part of the study. High-protein baguettes were prepared and subjected to a comprehensive sensory analysis. This study also includes a direct comparison of WBPI and whey protein isolate (WPI) as common representatives of animal proteins to explore the advantages and disadvantages of both functional ingredients.

2. Materials and Methods

2.1. Protein Isolates and Analysis

The WBPI was obtained from wheat bran (Mlýny J. Voženílek, Předměřice nad Labem, Czech Republic) using the pH shift method with modifications (Figure 1). The protein fraction was extracted using a NaOH (Lach-Ner, Neratovice, Czech Republic) solution ($\text{pH } 10.5 \pm 0.1$) in a ratio of 1:20 (wheat bran/NaOH solution) for 2 h with continuous stirring. The liquid protein extract was separated from deproteinized wheat bran by centrifugation (8000 rcf, 15 min, room temperature) and its pH was adjusted to 4.0 ± 0.05 using 1 M citric acid (Lach-Ner, Neratovice, Czech Republic). The precipitated WBPI was collected after centrifugation (8000 rpm, 15 min, room temperature), lyophilized, and used for further experiments.

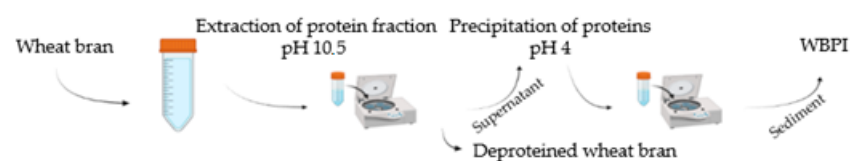


Figure 1. Isolation of WBPI.

The WPI used for the experiments was a commercial whey protein (Vilgain, Brno, Czech Republic).

The protein content and amino acid profile of WBPI were determined. The amount of nitrogen was analyzed using Eurovector EA3100, and the protein was obtained by multiplying the nitrogen content by the conversion factor 6.31, which is specific to wheat-bran proteins. The amino acid profile was determined by HPLC. A 10 mg sample of protein material was hydrolyzed in 3 mL of 6 M HCl for 12 h at 110 °C. The solution was dried and reconstituted in 5 mL of water. HPLC analysis was performed according to the method described by Gorissen et al. [16]. A single quadrupole LC/MSD iQ Agilent 1260 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) was used with AdvanceBio Amino Acid Analysis (AAA), 3.0 × 100 mm column (Agilent, USA).

2.2. Preparation and Characterization of Flour Samples

Plain high-gluten wheat flour T530 (Mlýny J. Voženílek, Czech Republic) was selected for the preparation of high-protein flour blends and for all baking experiments. Fortification of flour was performed by the direct mass substitution of part of the flour with either WBPI or WPI. Composition of flour mixtures with protein isolates is presented in Table 1.

Table 1. Composition of flour mixtures.

	Flour Content (g)	Isolate Content (g)
T530	92.5	0
5% WBPI	87.9	4.6
10% WBPI	83.3	9.3
15% WBPI	78.6	13.9
5% WPI	87.9	4.6
10% WPI	83.3	9.3
15% WPI	78.6	13.9

2.2.1. Determination of Wet Gluten

Exactly 10 g of the flour mixtures were weighed into a porcelain bowl. A 2% sodium chloride solution was added to the protein isolate in a volume of 5–5.5 mL. Using a spatula, a moderately stiff dough was prepared and then kneaded well and shaped into a small ball. The dough covered by a watch glass and left for 30 min. Afterwards, the dough was washed under a gentle stream of water using a sieve. The washing was stopped when water droplets expelled from the wet gluten were transparent. This measurement was performed on samples of flour, flour with WBPI substitution (5, 10, and 15%), and flour with wheat protein substitution (5, 10, and 15%).

The content of wet gluten, expressed as a weight percentage of the product's dry matter, was calculated using the following equation:

$$X = m \cdot 10 \cdot \frac{100}{100 - w_1},$$

where m is the weight of washed dough, and w_1 is the water content (%).

2.2.2. Determination of Sedimentation Value

Exactly 80 mL of lactic acid was transferred into a sedimentation flask, which was then brought to a temperature of 27 °C. From freshly washed gluten, 1 g was weighed and torn into approximately 30 equal pieces. In a porcelain dish, 10 mL of tempered lactic acid was added along with the small pieces of gluten. The content of the porcelain dish was transferred to the swelling flask containing the main portion of the lactic acid solution. The flask was heated in a water bath to 27 °C and left for 120 min. After 10 and 20 min, the contents of the flask were gently mixed to prevent the gluten pieces from sticking together or adhering to the bottom. The flask was stoppered in such a way that the stopper reached the zero mark on the scale. By gradually tilting the flask, the swollen gluten particles slid into the calibrated neck. The volume was immediately read on the scale to the nearest 0.5 division. This measurement was performed on gluten from T530 flour, gluten with

WBPI substitution (5, 10, and 15%) and gluten from flour with whey protein substitution (5, 10, and 15%).

2.2.3. Water and Elemental Analysis of Flour Samples

The water content in all flour samples was analyzed using the Karl Fisher method developed by Laura Corpaş et al. (2013) [17]. Karl Fisher titration was performed on KF Titrande (Metrohm, Herisau, Switzerland). Elemental analysis of C, H, N, S was performed by the elemental analyzer Eurovector EA3100 (Eurovector, Pavia, Italy).

2.2.4. Farinographic Analysis of Flour Samples

The farinographic analysis was carried out at the milling company Mlýny J. Voženílek in Předměřice nad Labem (Czech Republic) on Farinograph-TS instrument (Brabender, Duisburg, Germany). The main component of the farinograph was a mixer with a capacity of 300 g equipped with blades rotating at a speed of 63 revolutions per minute. It also had a thermostat that ensured a constant temperature of 30 °C during the experiment. Exactly 300 g of flour were added to the mixer, and an appropriate water volume was introduced using a burette. The water was added until the torque value reached 500 farinographic units (FUs), which is standard for flour testing in industrial milling. Farinographic analysis was performed on samples of T530 flour, T530 + 5% WBPI, and T530 + 5% WPI. Higher percentage concentrations of WPI and WBPI were not tested because the analytical limit of 500 FUs could not be reached with this type of instrument. Farinographic indicators were calculated:

$$\text{Water absorption} = \frac{m_{\text{water}}}{m_{\text{flour}}} \times 100$$

The dough-development time indicated the duration required for dough to reach 500 FUs. The stability of dough refers to its ability to maintain its structure and resist weakening or breakdown during mixing while the torque remains at 500 FUs. The degree of softening indicated a decrease in dough resistance to mixing represented as an FU after 10 and 12 min. The farinographic quality number (FQN) indicated the time from the beginning of measurement to the 30 FU drop from the maximum curve.

2.2.5. Extensographic Analysis of Flour Samples

The extensographic analysis was performed on a Extensograph-E instrument (Brabender, Germany) heated to 30 °C. The instrument settings are listed in Table 2. The extensographic measurement was conducted on T530 flour, T530 flour with 5, 10, and 15% substitution of flour with WBPI and WPI.

Table 2. Extensograph settings.

Speed of balling unit (min ⁻¹)	83.0 ± 3.0
Speed of dough roll (min ⁻¹)	15.0 ± 1.0
Speed of stretching hook (mm·s ⁻¹)	14.5 ± 0.5
Extensographic force (mN·EJ ⁻¹)	12.3 ± 0.3

Dough was prepared using a mixer, which was part of the farinograph. Additionally, 6 g of sodium chloride were weighed and dissolved in the appropriate amount of water to prepare 0.1 M solution. This solution was used to prepare the dough of 400 FU consistency. The optimized amount of water for each mixture is provided in Table 3.

The dough was formed into a small ball using a shaper and then placed into a sheeter and reshaped into a cylinder. Dough cylinders were placed into a chamber heated to 30 °C and left to rest for 30 min. After the resting period, the dough was stretched by the device's hook until it broke after which it was kneaded again, reshaped in the sheeter, and allowed to rest for another 30 min. Experiment was repeated. The resistance exerted by the hook on the dough during stretching was recorded.

Table 3. Optimized water addition for extensographic measurements.

	Water Volume (mL)
T530	54.6
5% WBPI	52.6
10% WBPI	54.9
15% WBPI	57.7
5% WPI	47.9

2.2.6. Baking Experiments and Sensory Analysis of Pastry

Dough for the baking experiment was prepared by mixing of flour blends, salt, yeasts and water. The ratio of the raw materials is described in Table 4. The pastry was shaped into baguettes and baked at 240 °C for 20 min. Sensory analysis made from reference and fortified flour was assessed by 20 evaluators in a specialized laboratory. Textural and flavor parameters were also evaluated.

Table 4. Raw material for pastry production.

	Water (g)	Flour (g)	Isolate (g)	Yeast (g)	Salt (g)
T530		92.5	0		
5% WBPI		87.9	4.6		
10% WBPI		83.3	9.3		
15% WBPI	64	78.6	13.9	1.2	2.4
5% WPI		87.9	4.6		
10% WPI		83.3	9.3		
15% WPI		78.6	13.9		

2.2.7. Statistical Analysis

Hypothesis testing was used to evaluate the impact of WBPI- and WPI-fortified flour on the physiochemical and sensory properties of dough and pastry. The dataset was processed using the Statistica software (TIBCO, Palo Alto, CA, USA, version 13.0). ANOVA and Kruskal–Wallis ANOVA was used to assess statistically significant differences among the fortified bakery products. Hypothesis testing was conducted at a significance level of $\alpha = 0.05$.

3. Results

3.1. Analysis of WBPI and WPI

An analysis of WBPI and WPI revealed interesting amino acid profiles, which are presented in Table 5 along with the protein content. Both protein isolates are rich in amino acids that are important for sports nutrition. WPI is particularly rich in leucine, lysine, isoleucine, and valine. These branched-chain amino acids (BCAAs) make up approximately 70% of the amino acids in muscles. BCAAs are recognized for their role in promoting muscle growth and facilitating recovery. Previous studies have shown that they can increase the rate of protein synthesis while reducing protein degradation during periods of rest. Consequently, athletes commonly use these amino acids as dietary supplements, which are often incorporated into mixtures referred to as BCAAs. As a result, these products have gained popularity in the range of dietary supplements available for athletes. WPI also contains significant amounts of threonine, and among the non-essential amino acids, glutamine and aspartic acid are the most abundant [18].

Table 5. Protein content and amino acid composition of protein isolates.

Amino Acid Content (%)	WBPI	WPI
Met	1.2	1.6
Met	1.2	1.6
Lys	2.7	6.8
Thr	2.2	5.4
Asp	6.2	8.5
Ser	3.2	4.9
Glu	13.6	13.7
Gly	3.5	1.5
Ala	3.1	3.8
Tyr	2.5	2.2
Val	3.1	4.6
Phe	2.8	2.5
Ile	1.9	4.8
Leu	4.6	8.1
His	2.2	1.3
Arg	5.2	1.9
Cys	1.1	1.6
Pro	6.4	4.9
Trp	0.6	1.3
Protein content (%)	67.6	76.9

WBPI also contains a range of nutritionally important amino acids, and like whey protein it has a significant amount of essential BCAAs. The most abundant non-essential amino acid in WBPI is aspartic acid, followed by glutamine and arginine, which plays a role in regulating urea synthesis in the liver and stimulating the secretion of growth hormone and insulin. Growth hormone is important in the post-physical performance recovery phase [19].

During storage, the lysine in wheat flour degrades. Products made from raw materials stored for a longer period may have a lower concentration of lysine. This deficiency can be solved by substituting a portion of the flour with a protein isolate. Since both WBPI and WPI are rich in lysine, fortifying bakery products could supplement this limiting amino acid [19].

WPI is known for its high PDCAAS score of 1, whereas WBPI, a plant-based protein, has a lower score of 0.54 with phenylalanine being the limiting amino acid [20].

3.2. Analysis of Flour Samples

The protein, water, and wet gluten content and the gluten sedimentation volume of the reference flour and the high-protein blends from WPI and WBPI substitution were determined. All samples were prepared following the procedures described in Section 2.2. The results of the analysis are presented in Table 6.

Table 6. Characteristics of flour and high protein blends.

	Protein Content (%)	Water Content (%)	Wet Gluten Content (%)	Sedimentation Volume (mL)
T530	13.8	10.2	38.6	21.0
5% WBPI	16.5	9.8	33.5	25.0
10% WBPI	19.2	9.4	31.2	28.0
15% WBPI	21.9	9.1	28.3	42.0
5% WPI	16.9	10.0	33.1	23.0
10% WPI	20.1	9.8	30.5	20.0
15% WPI	23.3	9.7	19.6	17.0

3.3. Rheological Properties of Prepared Doughs

3.3.1. Farinographic Analysis of Dough

The purpose of the farinographic measurement was to assess the impact of WBPI and WPI substitution on the rheological properties of the dough following the procedure described in Section 2.2.4. Table 7 displays the values of individual farinographic indicators for all samples: water absorption, development time, stability, softening degree, and farinographic number. Two softening degrees were recorded: 10 min as measured from the start of the measurement and 12 min as measured after reaching maximum torque.

Table 7. Farinographic characteristics of flour mixtures.

	T530	5% WBPI	5% WPI
Water absorption [%]	55.8	56.4	52.6
Development time [min]	1.8	1.7	6.8
Stability [min]	3.8	2.6	9.8
Softening degree (10) [FU]	72.0	73.0	20.0
Softening degree (12) [FU]	94.0	75.0	74.0
Farinographic quality number	35.0	30.0	113.0

A reference sample of T530 flour without any protein substitution was used. One important physical characteristic of wheat flour is its water absorption capacity. Strong flours typically exhibit a water absorption range of 55–60%, meaning that 100 g of wheat flour can absorb 55 to 60 g of water [21]. The analyzed T530 flour fell within this range, indicating its strength and suitability for bread baking due to its high gluten content. Dough development time and dough stability indicate flour strength. The higher values indicate a stronger dough where wheat gluten plays a crucial role in forming a three-dimensional viscoelastic structure. In the Czech Republic the parameter of dough stability typically ranges from 3 to 5 min for wheat flours. The reference T530 flour, based on the measurement, achieved a stability value of 3.8 min.

Data from the farinograph (Table 8) demonstrated that replacing wheat flour with WBPI resulted in a slight increase in water binding compared to the reference sample. This increase could be attributed to the higher protein content and the presence of fiber, which contains numerous hydroxyl groups that interact with hydrogen bonds in water, thereby enhancing absorption. This finding is consistent with the results of a study conducted by Manuel Gómez et al. [22] that investigated the effect of extruded wheat bran on dough rheology and bread quality. Substituting flour with WBPI did not significantly alter the dough development time: only by 0.1 min compared to the reference sample. During dough development, interactions between fiber and gluten can occur, potentially prolonging the process. However, the WBPI, despite its fiber content, did not lead to this phenomenon [22].

On the other hand, dough stability exhibited a noticeable decrease. The substitution of 5% WBPI resulted in a weakening of the gluten network and a decrease in flour strength. Consequently, stability decreased by 1.2 min compared to the reference sample, a significant difference. Additionally, WBPI substitution led to a slowdown in dough softening, which is inversely related to the farinograph quality number (FQN).

Farinographic analysis was also conducted on flour blends with WPI. The data from the farinograph (Table 8) indicated a decrease in water absorption compared to the reference sample. Substituting flour with WPI resulted in the formation of a complex system that hindered hydration, extensibility, and wheat gluten alignment, leading to an increase in dough development time by 5 min with 5% WPI. In addition, dough stability increased by 6 min compared to the reference sample. These findings align with a study conducted by Indrani et al. [23], which demonstrated that the substitution of up to 10% whey protein enhances dough stability. However, a different conclusion was reached in the study published by Tang et al. [24], who found that the substitution of WPI caused a decrease that was believed to be caused by interactions between the sulfhydryl group in WPI and the disulfide bond in wheat gluten. In their study, the substitution of 10% WPI to the dough

resulted in a stability decrease: stability time value, 6.5 min. These contrasting results highlighted the fact that the substitution of WPI to different types of flour had varied effects on rheological properties, suggesting a need for further study.

The softening degree, which is determined by the difference between the consistency value at the maximum and the consistency value at 10 min, decreased due to longer dough development time. This implied that as the development time approached 10 min, the time for the curve to drop became shorter. It can be assumed that the softening time after 12 min will increase with a higher amount of whey protein. According to the FQN, which increased approximately threefold compared to the reference sample, the dough quality improved with a 5% whey protein substitution.

3.3.2. Extensographic Analysis of Dough

The aim of the extensograph measurement was to determine the influence of the WBPI and WPI substitution on the rheological properties of the dough, according to the procedure described in Section 2.2.5. The values of individual extensographic indicators—energy, resistance, extensibility, and ratio number—are listed in Table 8. Two ratio numbers were recorded during the measurement. The ratio number was between resistance and energy, and the ratio number (max) was defined as the ratio between the maximum and energy.

Problems with extensive adhesiveness of the dough caused poor formation of fillet and roller for the 10 and 15% of WPI substitutions. The dough stuck to the cylinder and rolling pin, making it impossible to complete the extensograph determination. The adhesiveness of the dough could potentially have been eliminated by reducing the water content, but for both farinographic and extensographic determination, it was always necessary to create a dough of maximum consistency, reaching approximately 500 FUs. Within the extensograph determination, only the sample with 5% WPI substitution was analyzed.

Table 8. Extensographic parameters of T530 flour and high protein blends.

	T530		5% WBPI		10% WBPI		15% WBPI		5% WPI	
Resting time (min)	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60
Energy (cm ²)	82	82	81	97	56	55	44	42	119	164
Resistance (FU)	216	230	728	960	524	276	144	64	289	196
Ductility (mm)	185	176	85	80	58	54	53	51	196	188
Max (FU)	317	343	741	961	799	865	680	691	443	657
Ratio number	1.2	1.3	8.6	12.0	9.0	4.6	2.7	2.1	1.5	2.2
Ratio number (max)	1.7	2.0	8.8	12.0	13.9	16.1	12.9	13.6	2.3	3.5

The energy of the dough was considered a measure of its bakery workability and dough quality. The lower the energy, the less resistant and stable the dough during processing. Flours with a rigid and short gluten structure typically have low dough energy. The measured energy value for the reference sample was 82 cm², which corresponded to the standard for Czech flours, where this parameter is around 90 cm² [25].

Substituting flour with WBPI within 30 min of dough development did not lead to significant changes in extensographic parameters compared to the reference flour. However, after 60 min from dough development, the energy increased by 16 cm². This indicated that the length of the interval had an impact on the amount of energy when substituting up to 5% WBPI. As the substitution increased, the energy showed a decreasing trend. The dough with 15% WBPI substitution was evaluated as having the lowest energy resistance and stability, which was half that of the reference sample.

Dough resistance indicates the strength of gluten, meaning that higher resistance results in firmer gluten and a stronger and mechanically more resistant dough. The substitution with 5% WBPI showed a resistance approximately four times higher than that of the reference sample. Similar to the energy parameter, resistance also exhibited a decreasing

trend with increasing WBPI substitution. The lowest gluten strength was observed in the case of 15% WBPI. The resulting dough was stiff but less mechanically resistant.

Dough extensibility indicated the elasticity of the dough. The reference sample showed extensibility around 180 mm, which varied depending on the maturation time. The optimal extensibility for unmodified flours used in baking ranges from 140 to 170 mm [2]. The sample with 5% WBPI substitution exhibited approximately half the extensibility compared to the reference sample. Samples with higher WBPI substitution were characterized as more brittle and less elastic. This phenomenon can be connected to the presence of dietary fiber in WBPI because it influences water redistribution in gluten and causes physical damage to the gluten matrix, which can result in reduced gluten visco-elasticity [26].

From the perspective of measuring dough energy, resistance, and extensibility, the dough properties improved with 5% WBPI substitution, where both energy and resistance were higher compared to the reference sample. This suggests that dough substituted with 5% WBPI exhibits greater mechanical resistance than the reference flour. On the other hand, samples with higher substitution levels (10% and 15%) showed deteriorating mechanical resistance.

In addition to resistance, the maximum of the extensographic curve also characterized the strength of gluten. Similar to the resistance parameter, the maximum parameter was the highest in the sample with 5% WBPI. A significant decrease in the maximum parameter occurred in the sample with 15% WBPI substitution. This decrease was twice as great as that for the reference flour (T530).

The ratio number indicated the ratio between resistance and extensibility, unlike the ratio number (max), which indicated the ratio between the maximum and extensibility. The most similar ratio number to the reference sample was found for the sample with 15% WBPI substitution. After 60 min of maturation, the samples showed a decreasing trend, except for the 5% WBPI substitution. The ratio number (max) was the lowest in the 15% WBPI sample, thus putting it the closest to the reference sample. The optimal value for the ratio number should be 2–2.5 although it could be higher for special flours. In the Czech Republic, the average extensographic ratio falls slightly below 2 for flours of medium quality [25]. From the overall assessment of the extensographic parameters of the prepared blends, it is evident that the dough with a 5% WBPI substitution appeared to be the best choice for further processing. As WBPI substitution increased, the extensographic quality decreased significantly.

Mixtures with whey protein had significantly different properties compared to the reference and mixtures with WBPI substitution. Substituting WPI flour led to a significant increase in dough energy compared to the reference sample. The increase in dough energy strengthened with increasing time interval from dough development. The high dough energy value with 5% WPI substitution indicates that the dough is not sensitive to processing conditions and will not soften rapidly during maturation and proofing.

The dough resistance value of the mixture with 5% WPI did not show the same positive trend as the energy mentioned earlier in the case of WBPI substitution. The extensibility of the dough with 5% WPI did not show a significant difference compared to the reference sample.

For energy, resistance, and extensibility measurements, the dough properties improved with 5% WPI, as both energy and extensibility were higher compared to the reference sample. The resistance value was not significantly lower than that of the reference, indicating that the dough fortified with 5% WPI exhibits similar mechanical strength to the reference sample.

The maximum dough value with 5% WPI showed the highest value after a 60 min resting period compared to the reference. However, it was significantly lower than the maximum values for the 5% WBPI sample. The ratio number did not reveal a significant difference between it and the reference.

3.4. Influence of WBPI and WPI Fortification of Sensory Properties of Pastry

The perception of sensory quality is a complex process related to the perception of appearance, taste, aroma, and texture. Sensory analysis was conducted on seven prepared samples of wheat baguettes that contained different amounts and types of protein.

Twenty independent assessors participated in the sensory analysis and evaluated the samples using a sensory questionnaire. The analysis took place in a specialized sensory laboratory following the procedure described in Section 2.2.6. The results of the baking experiments and their sensory analyses are divided into two sections—textural properties and aroma and taste properties. The median values for the textural and the aroma and taste parameters are presented in Table 9.

Table 9. Sensory descriptor scores.

	Structure	Surface	Hardness	Chewiness	Smell	Taste	Bitterness	Saltiness	Overall Score
Reference	5.0	3.0	3.0	3.0	4.5	4.0	1.0	3.0	4.0
WBPI 5	5.0	4.0	3.0	3.0	4.0	4.0	2.5	3.0	4.0
WBPI 10	5.0	4.0	3.0	3.0	2.5	3.0	4.0	2.0	3.0
WBPI 15	5.0	4.0	4.0	4.0	2.0	2.0	4.5	2.0	2.0
WPI 5	5.0	4.0	4.0	3.0	5.0	4.0	1.0	2.0	4.0
WPI 10	4.0	3.0	2.0	3.0	4.0	4.0	1.0	2.0	3.5
WPI 15	4.0	3.0	2.0	3.0	4.0	3.0	1.0	2.0	3.0
ANOVA P	0.0474	0.5985	0.0001	0.0024	0.0030	0.0004	0.0001	0.5763	0.0002

3.4.1. Textural Properties of Fortified Pastry

The fundamental parameter of bakery products is their texture, which includes structure, surface, hardness, and chewiness. Among the most important textural properties of baguettes are high crispiness and firmness. Figure 2 provides an overview of individual textural parameters and the influence of the addition and type of protein isolate.

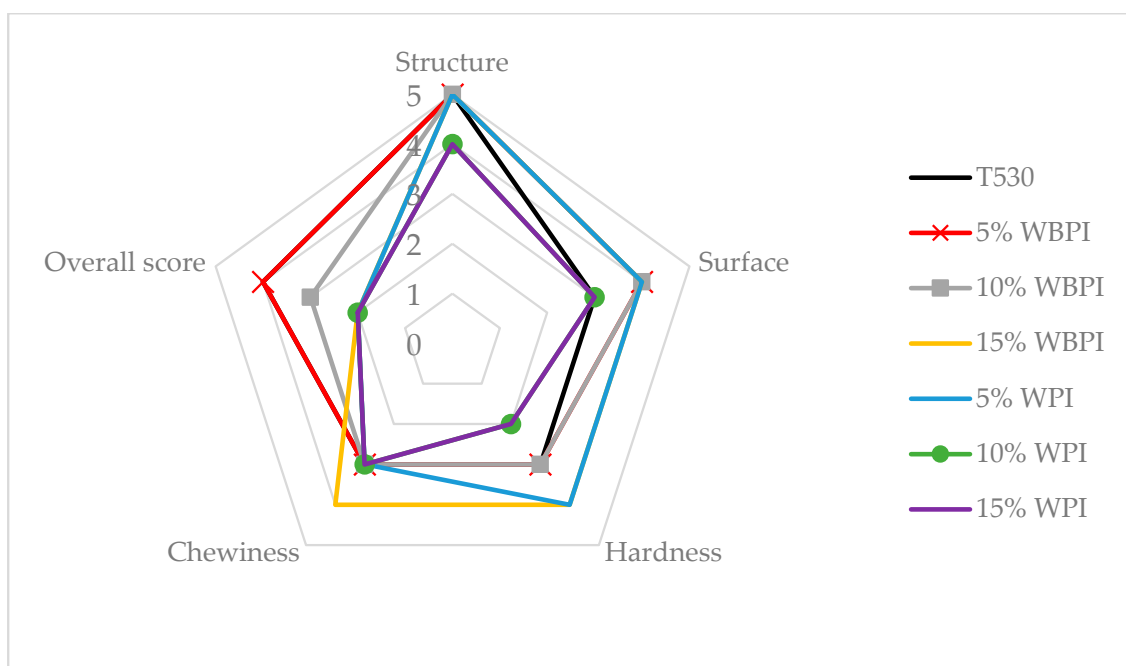


Figure 2. Textural parameters of pastry samples.

Structure analysis entails evaluating the strength, crumbliness, and cohesion of the fortified bakery product. From Figure 2, it is evident that the substitution of a protein isolate influenced the product's structure, the primary parameter for describing textural properties. The substitution of wheat flour with WPI negatively affected the structural parameter, causing assessors to reduce the score by 1 unit compared to the reference sample. The decreased score was most likely caused by the fact that whey protein is highly hygroscopic. The substitution of WPI flour inhibited the structure of the gluten network, resulting in a decreased gluten concentration and competition among gluten, starch, and whey protein for water binding, leading to deterioration in the product's cohesion. This effect was also observed during dough processing. Dough with a higher addition of whey protein was very watery and difficult to process, confirming the hygroscopic effect and weakened gluten network [27].

Sensory analysis did not confirm differences in the structure of the protein-enriched baguettes compared to the reference. However, a more in-depth visual examination of the structure of the baguettes in cross-section revealed that as the concentration of protein isolate from bran increased in the sample, there was a reduction in the expansion of gas cells during the baking phase (Figure 3). This hypothesis was supported by a study conducted by Alzuwaid et al. (2020) [28].

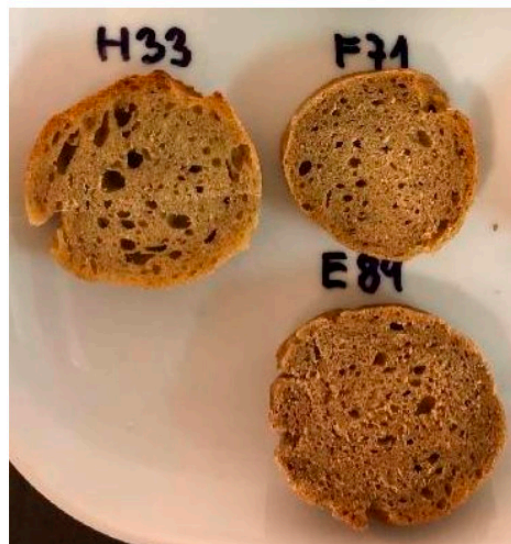


Figure 3. Gas cells of pastry samples: H33—5% WBPI; F71—10% WBPI; E84—15% WBPI.

Surface is the second parameter for describing textural properties. No significant influence of either WPI or WBPI was observed on the surface of the baguettes. However, the substitution of WBPI flour resulted in an improvement in the surface rating by 1 unit compared to the reference sample. The higher score for the surface parameter in the WBPI-fortified baguettes was likely associated with the alteration of its color to lightly browned. This color change could have evoked a healthier consumer perception of whole-grain bread, which was reflected in increasing market demand for such products [27].

In evaluating the hardness parameter, a Kruskal–Wallis ANOVA test revealed that fortified baguettes differed significantly with a probability of $p = 0.0001$. The highest WBPI substitution led to a significant increase in hardness compared to the reference sample. From Figure 2, it can be seen that as the concentration of protein isolate from bran in the dough increased, so did the hardness of the sample. Conversely, in bread with whey protein, no specific correlation was observed between the amount of WPI and the hardness value. The fluctuation of values and the ambiguous trend in dough fortification with whey protein cannot be reliably explained based on the data, meaning that further detailed studies on this phenomenon are necessary.

Chewiness was the last evaluated textural characteristic of the fortified baguettes. A significant difference was observed for the fortified baguette with 15% WBPI (Figure 2). Compared to the reference value, an increase in chewiness (the product was less chewable) and a 1-unit score increase was observed. This result contradicted the conclusion of the study conducted by Alzuwaid et al. (2020), where the substitution of 5% WBPI flour increased chewiness (the product was less chewable). No significant influence of whey protein on the chewiness parameter was observed [28].

Regarding textural properties, the baguette with 15% WBPI flour substitution received the highest rating, while the baguette with 5% whey protein substitution received the lowest. The reference sample fell between the two. A correlation analysis revealed that none of the textural parameters correlated with the overall evaluation of the sample. Therefore, it could be concluded that textural properties do not have a significant impact on the overall evaluation of the product.

3.4.2. Flavor and Aroma Properties of Fortified Pastry

Sensory analysis of taste and aroma is essential for assessing the properties of bakery samples. The taste parameter is considered to be a purely subjective evaluation by specific consumers. The formation of aromatic and flavor compounds depends on the conditions of yeast fermentation and its duration. Longer fermentation leads to products with a richer taste although bread is typically more acidic [29]. The formation of other aroma-active compounds occurred during the Maillard reaction. Figure 4 depicts the evaluation of aroma and taste parameters in bakery samples with different types and amounts of protein isolate.

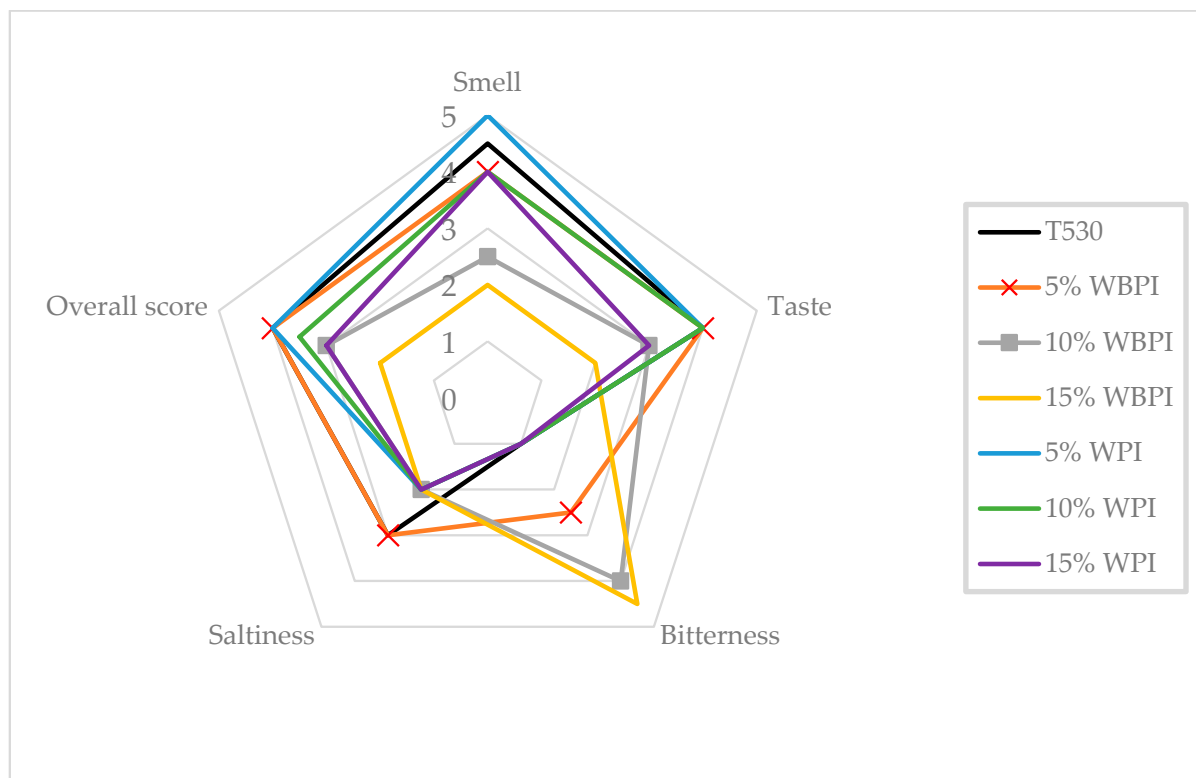


Figure 4. Flavor parameters of pastry samples.

The aroma of fortified baguettes is the first parameter, and to evaluate the differences among the samples, a Kruskal–Wallis ANOVA test was applied. Based on this analysis, fortified baguettes differed significantly at a significance level of $p = 0.0003$. It was found that the substitution of flour with a protein isolate affected the aroma. The highest decrease in score was observed for the baguette enriched with 15% WBPI, which experienced a decrease of 2.5 units compared to the reference sample. From Figure 4, it can be inferred that

the pleasantness of the aroma decreased with higher substitutions of WBPI, intensifying the aroma of cereals, which was less pleasant for the assessors. Conversely, the addition of 5% whey protein resulted in an improvement of 1 unit in aroma compared to the reference sample. With a higher addition of WPI, the median value decreased to 4, which was half a unit lower than for the reference sample but not as significant. In the sample with 5% whey protein, the assessors most commonly described the aroma as pleasantly buttery or nutty.

Taste was another parameter evaluated, and from Figure 4 it is evident that independent assessors detected significant differences among the enriched wheat baguettes. Generally, taste acceptability decreased with higher protein substitutions. The sample with 15% WBPI experienced a decrease of 2 units compared to the reference sample, and the assessors detected a pronounced grainy taste. Similarly, WPI also negatively affected taste. The pastry with 15% WPI received the lowest rating, with the most commonly identified taste being buttery, which was less typical for bakery products.

Bitterness was another evaluated parameter among the samples where a statistically significant difference was identified as $p = 0.00001$. From Figure 4, it is apparent that only WBPI influenced the bitterness. In the 15% WBPI sample, bitterness increased by 2 units compared to the reference bread sample. The degree of bitterness increased proportionally with protein addition. The development of an undesired bitter-to-sour taste in the fortified bread could have been attributed to several probable causes. Wheat bran is rich in ferulic acid and tannins, which can impart a bitter taste, which in practice is masked by the addition of sweeteners (honey) or salt. Increased bitterness could also have been caused by certain amino acids: tryptophan, threonine, valine, phenylalanine, methionine, lysine, histidine, cysteine and arginine can cause bitterness when present in high concentrations. The increased attribute of bitterness with the addition of wheat bran was confirmed by the study conducted by Heiniö et al. [30], where the addition of bran layers to bread increased bitterness. Based on a correlation analysis, it was found that the bitterness parameter negatively correlated with the overall evaluation parameter (correlation -0.488). Based on the correlation coefficients, the lower the bitterness of the fortified bread, the better the overall evaluation [30].

For the saltiness parameter, neither WPI nor WBPI had a significant influence on the baguettes. The highest saltiness was exhibited by the reference baguette and the baguette with a 5% WBPI substitution. The saltiness of the fortified bread had a weakly positive correlation with the overall impression of the bread (correlation = 0.178).

The overall evaluation was the final parameter in the sensory analysis of the bread samples. It was found that the fortified baguettes differed significantly ($p = 0.002$) and that the reference baguette was rated as the most acceptable. Among the samples enriched with protein isolates, the baguettes with 5% WBPI and WPI exhibited the highest ratings with the same score. Generally, the overall impression decreased with higher isolate substitutions. The bitterness parameter had the most significant impact: as it increased, the overall acceptability of the bread significantly decreased. The samples made with dough where 15% of the flour had been replaced with WBPI were rated as almost unfit for consumption.

4. Conclusions

Farinographic measurements revealed that the substitution of flour with protein isolates significantly influenced both physiochemical and sensory properties of the dough and pastry. Enhancing the flour with WBPI resulted in a slight increase in flour water binding and an elevated degree of softening (12 min). However, other farinographic parameters indicated a reduction in dough quality. Conversely, the substitution of flour with WPI led to prolonged dough development time, enhanced dough stability, and improved farinographic quality.

Extensographic measurements demonstrated that WBPI-substituted dough exhibited comparable energy properties to the reference flour. The substitution of 5% WBPI flour resulted in improved energy and dough resistance, suggesting heightened mechanical strength compared to the reference sample. Nevertheless, as the level of WBPI flour

substitution increased, extensographic parameters gradually declined, and there was no further enhancement in the dough's mechanical properties. Samples with 5% WPI substitution exhibited superior mechanical properties compared to the reference sample.

The sensory analysis of the fortified baguettes revealed a significant impact of flour fortification by WPI and WBPI on the sensory properties of the pastry. The aroma was affected by the addition of protein isolates. Higher additions of WBPI resulted in less pleasant cereal-like aromas. Taste acceptability also decreased with higher protein additions. A pronounced grainy taste (both isolates) and buttery taste (WPI) were less typical for bakery products. A fundamental reduction in overall acceptance scores was observed in pastry with a high WBPI substitution level. A correlation analysis proved that this phenomenon was connected with bitterness. The bitter taste was probably caused by the presence of small peptides, ferulic acid and tannins. Future work should focus on the sensory masking of this defect.

The substitution of WBPI and WPI for flour represented a suitable approach for preparing high-protein flour mixes, which can be used in the production of high-protein pastry. WBPI is a promising dietary protein produced from widely available and sustainable material, and could be included among common protein isolates like soy and WPI.

Author Contributions: Conceptualization, J.P.; methodology, J.P. and Z.S.; formal analysis, P.D.; investigation, K.B. and M.V.; writing—original draft preparation, J.P. and Z.S.; writing—review and editing, J.P. and P.D.; visualization, J.P.; supervision, J.P. and P.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by Technology Agency of the Czech Republic, project no. FW02020135 and by project no. FCH-S-23-8330 financed by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Hoehnel, A.; Axel, C.; Bez, J.; Arendt, E.K.; Zannini, E. Comparative Analysis of Plant-Based High-Protein Ingredients and Their Impact on Quality of High-Protein Bread. *J. Cereal Sci.* **2019**, *89*, 102816. [[CrossRef](#)]
2. Arntfield, S.D.; Maskus, H.D. Peas and Other Legume Proteins. In *Handbook of Food Proteins*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2011; pp. 233–266. [[CrossRef](#)]
3. Boye, J.; Zare, F.; Pletch, A. Pulse Proteins: Processing, Characterization, Functional Properties and Applications in Food and Feed. *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 414–431. [[CrossRef](#)]
4. Sanz-Penella, J.M.; Wronkowska, M.; Soral-Smietana, M.; Haros, M. Effect of Whole Amaranth Flour on Bread Properties and Nutritive Value: Processing, Characterization, Functional Properties and Applications in Food and Feed. *LWT-Food Sci. Technol.* **2013**, *50*, 679–685. [[CrossRef](#)]
5. Turfani, V.; Narducci, V.; Durazzo, A.; Galli, V.; Carcea, M. Technological, Nutritional and Functional Properties of Wheat Bread Enriched with Lentil or Carob Flours. *LWT* **2017**, *78*, 361–366. [[CrossRef](#)]
6. Smith, B.M.; Bean, S.R.; Schober, T.J.; Tilley, M.; Herald, T.J.; Aramouni, F. Composition and Molecular Weight Distribution of Carob Germ Protein Fractions. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 7794–7800. [[CrossRef](#)]
7. Marchais, L.-P.D.; Foisy, M.; Mercier, S.; Villeneuve, S.; Mondor, M. Bread-Making Potential of Pea Protein Isolate Produced by a Novel Ultrafiltration/Diafiltration Process. *Procedia Food Sci.* **2011**, *1*, 1425–1430. [[CrossRef](#)]
8. Wouters, A.G.B.; Rombouts, I.; Fierens, E.; Brijs, K.; Delcour, J.A. Relevance of the Functional Properties of Enzymatic Plant Protein Hydrolysates in Food Systems. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2016**, *15*, 786–800. [[CrossRef](#)]
9. Huang, W.; Tian, F.; Wang, H.; Wu, S.; Jin, W.; Shen, W.; Hu, Z.; Cai, Q.; Liu, G. Comparative Assessment of Extraction, Composition, and In Vitro Antioxidative Properties of Wheat Bran Polyphenols. *LWT* **2023**, *180*, 114706. [[CrossRef](#)]
10. Hansmeyer, W.A.; Satterlee, L.D.; Mattern, P.J. Characterization of Products from Wet Fractionation of Wheat Bran. *J. Food Sci.* **1976**, *41*, 505–508. [[CrossRef](#)]
11. Prückler, M.; Siebenhandl-Ehn, S.; Apprich, S.; Höltinger, S.; Haas, C.; Schmid, E.; Kneifel, W. Wheat Bran-Based Biorefinery 1: Composition of Wheat Bran and Strategies of Functionalization. *LWT-Food Sci. Technol.* **2014**, *56*, 211–221. [[CrossRef](#)]

12. Balandrán-Quintana, R.R.; Mercado-Ruiz, J.N.; Mendoza-Wilson, A.M. Wheat Bran Proteins: A Review of Their Uses and Potential. *Food Rev. Int.* **2015**, *31*, 279–293. [[CrossRef](#)]
13. Idris, W.H.; Babiker, E.E.; El Tinay, A.H. Fractionation, Solubility and Functional Properties of Wheat Bran Proteins as Influenced by Ph and/or Salt Concentration. *Nahrung* **2003**, *47*, 425–429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Alzuwaid, N.T.; Pleming, D.; Fellows, C.M.; Sissons, M. Fortification of Durum Wheat Spaghetti and Common Wheat Bread with Wheat Bran Protein Concentrate—Impacts on Nutrition and Technological Properties. *Food Chem.* **2021**, *334*, 127497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Uttam, A.N.; Padte, S.; Raj, G.J.V.; Govindaraju, K.; Kumar, S. Isolation, Characterization, and Utilization of Wheat Bran Protein Fraction for Food Application. *J. Food Sci. Technol.* **2023**, *60*, 464–473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Gorissen, S.H.M.; Crombag, J.J.R.; Senden, J.M.G.; Waterval, W.A.H.; Bierau, J.; Verdijk, L.B.; van Loon, L.J.C. Protein Content and Amino Acid Composition of Commercially Available Plant-Based Protein Isolates. *Amino Acids* **2018**, *50*, 1685–1695. [[CrossRef](#)]
17. Corpaş, L.; Hădărugă, N.G.; David, I.; Pîrşan, P.; Hădărugă, D.I.; Isengard, H.-D. Karl Fischer Water Titration—Principal Component Analysis Approach on Wheat Flour. *Food Anal. Methods* **2014**, *7*, 1353–1358. [[CrossRef](#)]
18. Martinho, D.V.; Nobari, H.; Faria, A.; Field, A.; Duarte, D.; Sarmento, H. Oral Branched-Chain Amino Acids Supplementation in Athletes: A Systematic Review. *Nutrients* **2022**, *14*, 4002. [[CrossRef](#)]
19. Dioguardi, F.S. Clinical Use of Amino Acids as Dietary Supplement: Pros and Cons. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **2011**, *2*, 75–80. [[CrossRef](#)]
20. Schaafsma, G. The Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score (Pdcaas)—A Concept for Describing Protein Quality in Foods and Food Ingredients: A Critical Review. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 988–994. [[CrossRef](#)]
21. Bláha, L.; Plhoň, Z.; Kadlec, F. *Cukrářská Výroba Iii: Pro 3. Ročník Učebního Oboru Cukrář, Cukrářka*; Informatorium: Praha, Czech Republic, 1995; ISBN 80-854-2765-6.
22. Gómez, M.; Jiménez, S.; Ruiz, E.; Oliete, B. Effect of Extruded Wheat Bran on Dough Rheology and Bread Quality. *LWT-Food Sci. Technol.* **2011**, *44*, 2231–2237. [[CrossRef](#)]
23. Indrani, D.; Prabhasankar, P.; Rajiv, J.; Rao, G.V. Influence of Whey Protein Concentrate on The Rheological Characteristics of Dough, Microstructure and Quality of Unleavened Flat Bread (Parotta). *Food Res. Int.* **2007**, *40*, 1254–1260. [[CrossRef](#)]
24. Tang, X.; Liu, J. A Comparative Study of Partial Replacement of Wheat Flour with Whey and Soy Protein on Rheological Properties of Dough and Cookie Quality. *J. Food Qual.* **2017**, *2017*, 2618020. [[CrossRef](#)]
25. Whitford, D. *Proteins: Structure and Function*; Wiley: Chichester, UK, 2005; ISBN 978-0471498940.
26. Liu, N.; Ma, S.; Li, L.; Wang, X. Study on The Effect of Wheat Bran Dietary Fiber on The Rheological Properties of Dough. *Grain Oil Sci. Technol.* **2019**, *2*, 1–5. [[CrossRef](#)]
27. Zhou, J.; Liu, J.; Tang, X. Effects of Whey and Soy Protein Addition on Bread Rheological Property of Wheat Flour. *J. Texture Stud.* **2018**, *49*, 38–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Alzuwaid, N.T.; Sissons, M.; Laddomada, B.; Fellows, C.M. Nutritional and Functional Properties of Durum Wheat Bran Protein Concentrate. *Cereal Chem.* **2020**, *97*, 304–315. [[CrossRef](#)]
29. Příhoda, J.; Sluková, M.; Dřízal, J. Jak Poznáme Kvalitu? In *Chléb a Pečivo*; Sdružení českých Spotřebitelů pro Českou Technologickou Platformu pro Potraviny: Praha, Czech Republic, 2013; ISBN 978-80-905096-7-2.
30. Heiniö, R.-L.; Liukkonen, K.-H.; Katina, K.; Myllymäki, O.; Poutanen, K. Milling Fractionation of Rye Produces Different Sensory Profiles of both Flour and Bread. *LWT-Food Sci. Technol.* **2003**, *36*, 577–583. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Curriculum Vitae

Ing. Zuzana Slavíková



Osobní informace:

Datum narození: 27. 11. 1994
Adresa: Trávník 1980, 560 02, Česká Třebová, Česká republika
Tel.: +420 720 268 168
E-mail: Zuzana.slavikova@vut.cz

Vzdělání:

2019 – současnost: Vysoké učení technické v Brně (doktorské studium)

Fakulta chemická

Téma disertace: Využití lignocelulózového odpadu z potravinářského průmyslu

2017–2019: Vysoké učení technické v Brně (magisterské studium)

Fakulta chemická

Studijní obor: Potravinářská technologie a biotechnologie

2014–2017: Vysoká škola chemicko-technologická Praha (bakalářské studium)

Fakulta potravinářské a biochemické technologie

Studijní obor: Technologie potravin

Pracovní zkušenosti:

1. 2024 – současnost: Ústav chemie potravin a biotechnologií,

Fakulta chemická, VUT Brno

10. 2021–9. 2023: Centrum materiálového výzkumu,

Fakulta chemická, VUT Brno

5. – 7. 2021: Ústav chemie potravin a biotechnologií,

Fakulta chemická, VUT Brno

Projekty:

Program TAČR Trend

Ověření konceptu biorafinerie pro zpracování otrub – FW02020135,
zahájení: 01.09.2020, ukončení: 31.08.2023 – spoluřešitel

Pedagogické zkušenosti: **Fakulta chemická VUT, Ústav chemie potravin a biotechnologií**

Praktikum z technologie potravin – 2019-2020

Praktikum z analýzy potravin a přírodních látek – 2019-2023

Praktikum z biopolymerů – 2022-2023

Praktikum z instrumentální a strukturní analýzy – 2023

Konzultace závěrečných prací:

Výroba a charakterizace proteinových koncentrátů z pšeničných otrub

Izolace čistých aminokyselin z pšeničných otrub

Vývoj a charakterizace proteinového doplňku stravy z pšeničných otrub

Produkce a charakterizace proteinových izolátů z různých druhů otrub

Fortifikace pekařských výrobků proteinovým izolátem z pšeničných otrub

Vývoj a charakterizace nových mléčných výrobků se zvýšeným obsahem vlákniny a proteinů

Optimalizace výroby jogurtu se zvýšeným obsahem bílkovin z pšeničných otrub

Základní umělecká škola Česká Třebová, taneční obor

Taneční teorie a taneční praxe – 5.–6. 2023

Dovednosti:

Laboratorní dovednosti

UV-VIS spektroskopie

Kapalinová chromatografie

SDS-PAGE elektroforéza

Immunoblot analýza

Inženýrské zkušenosti z poloprovozní laboratoře

Vaření piva

Jazyky

Angličtina (pokročilý B2)

Španělština (začátečník)

Němčina (začátečník)

IT dovednosti

Word, Excel, PowerPoint

Analýza dat (Statistica)