



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

IZOLACE ČISTÝCH AMINOKYSELIN Z PŠENIČNÝCH OTRUB

ISOLATION OF PURE AMINOACIDS FROM WHEAT BRAN

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Klára Sloupová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1571/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Klára Sloupová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Izolace čistých aminokyselin z pšeničných otrub

Zadání diplomové práce:

Produkce volných aminokyselin z proteinového izolátu pšeničných otrub

1. Izolace a charakterizace proteinů z pšeničných otrub
2. Testování různých způsobů hydrolyzy proteinů
3. Charakterizace hydrolyzátu z hlediska obsahu aminokyselin
4. Selekce nejvhodnějšího postupu
5. Izolace majoritních aminokyselin z hydrolyzátu pomocí separačních technik
6. Definování závěru práce

Termín odevzdání diplomové práce: 30.7.2021:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Klára Sloupová
student(ka)

Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Pšeničné otruby jsou perspektivní materiál obsahující širokou škálu využitelných komponent, včetně bílkovin. Navíc je produkován ve značných objemech. V současné době se pšeničné otruby využívají na produkci energie spalováním a pro krmné účely. Postupně se hledají nové postupy valorizace tohoto materiálu. Jednou z možností využití pšeničných otrub je izolace bílkovin, hydrolýza a separace vybraných aminokyselin. Touto problematikou se zabývá tato diplomová práce, která se zaměřila na získání argininu a leucinu z proteinového izolátu. Proteiny byly vyextrahovány z pšeničných otrub pomocí změny hodnoty pH. Následnou lyofilizací byl získán proteinový izolát. Před provedením hydrolýzy vzniklého izolátu byl nejprve proveden stabilitní test standardů aminokyselin argininu a leucinu, na které byly aplikovány různé metody hydrolýzy. Jako nejefektivnější se ukázala kyselá hydrolýza pomocí mineralizačního přístroje, která byla aplikována na proteinový izolát. Následovala derivatizace hydrolyzátů činidlem OPA a analýza vzniklých hydrolyzátů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s UV-VIS detekcí. Poté byla provedena optimalizace vhodných podmínek adsorpce a desorpce. Bylo zjištěno, že časová závislost nemá vliv na množství adsorbovaného materiálu na sorbent. Proto byla zvolena doba aplikace 15 minut. Při optimalizaci množství použitého adsorbentu Amberchrom 50WX8 bylo zjištěno, že optimální použitou navážkou je 0,25 g. Zvolené podmínky byly aplikovány na proteinový hydrolyzát. Separací vybraných aminokyselin pomocí změny pH citrátového pufru byly získány dvě frakce. Po aplikaci tohoto postupu bylo z jednoho kilogramu pšeničných otrub po odpaření získáno z frakce jedna 0,26 g argininu a 0,82 g leucinu. Z frakce dva bylo po odpaření získáno 1,01 g argininu a 0,25 g leucinu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Pšeničné otruby, proteiny, proteinový izolát, aminokyseliny, extrakce, hydrolýza, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, iontově-výměnná chromatografie, UV-VIS detektor.

ABSTRACT

Wheat bran is a promising material containing a wide range of useful components, including proteins. In addition, it is produced in significant volumes. Currently, wheat bran is used for the production of energy by combustion and for feed purposes. Gradually, new methods of valorization of this material are being sought. One of the possibilities of using wheat bran is the isolation of proteins, hydrolysis, and separation of selected amino acids. This diploma thesis deals with this issue, it is focused on the recovery of arginine and leucine from a protein isolate. Proteins were extracted from wheat bran by changing the pH. Thanks to the subsequent lyophilization a protein isolate was gained. Prior to hydrolysis of the resulting isolate, a stability test of arginine and leucine amino acid standards was first performed, to which various hydrolysis methods were applied. Acid hydrolysis using a mineralizer, which was applied to the protein isolate, was proved to be the most effective. This was followed by the derivatization of the hydrolysates with OPA and analysis of the resulting hydrolysates by high-performance liquid chromatography with UV-VIS detection. Then, suitable adsorption and desorption conditions were optimized. It was found that the time dependence does not affect the amount of adsorbed material on the sorbent. Therefore, an application time of 15 minutes was chosen. While optimizing the amount of used standard, it was found that the optimal weight was 0.25 g of sorbent. The selected conditions were applied to the protein hydrolyzate. Two fractions were obtained by the separation of selected amino acids due to the change in the pH of the citrate buffer. After the application of this procedure, 0.26 g of arginine and 0.82 g of leucine were obtained from one kilogram after evaporation. From evaporation two, 1.01 g of arginine and 0.25 g of leucine were obtained after evaporation.

KEYWORDS

Wheat bran, proteins, protein isolate, amino acids, extraction, hydrolysis, high performance liquid chromatography, ion exchange chromatography, UV-VIS detector.

CITACE

SLOUPOVÁ, Klára. *Izolace čistých aminokyselin z pšeničných otrub*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131562>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Jaromír Pořízka.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

Podpis studentky

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé práce Ing. Jaromíru Pořízkovi, Ph.D. za odborné vedení, poskytnutí užitečných rad a připomínek. Velké dík patří také Ing. Zuzaně Slavíkové za pomoc, kterou mi věnovala hlavně v laboratoři, za cenné odborné rady, připomínky a ochotu. Především bych chtěla poděkovat své rodině za trpělivost, toleranci, podporu a pomoc při psaní této diplomové práce. Hlavně za podporu v průběhu celého mého studia.

1 ÚVOD.....	8
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1 Valorizace odpadů z potravinářského průmyslu.....	9
2.2 Obiloviny-jejich nutričně a technologicky významné složky	11
2.2.1 Pšenice	11
2.2.2 Žito	12
2.3 Složky zrna	12
2.3.1 Klíček.....	13
2.3.2 Endosperm	13
2.3.3 Aleuronová vrstva	14
2.3.4 Otruby	14
2.4 Chemické složení pšeničných otrub	14
2.4.1 Sacharidy pšeničných otrub	16
2.4.2 Proteiny pšeničných otrub.....	20
2.4.3 Esenciální aminokyseliny pšeničných otrub	21
2.4.4 Poloesenciální aminokyseliny.....	24
2.4.5 Neesenciální aminokyseliny	25
2.5 Biorafinace pšeničných otrub	29
2.6 Izolace proteinů z pšeničných otrub	30
2.6.1 Izolace proteinů degradací škrobu	30
2.6.2 Izolace proteinů fermentací a alkalickou extrakcí	31
2.6.3 Izolace proteinů dle Osborna	31
2.6.4 Extrakce metodou posunu pH	31
2.6.5 Lyofilizace	31
2.7 Hydrolýza proteinů	32
2.7.1 Kyselá hydrolýza.....	32
2.7.2 Kyselý mikrovlnný rozklad.....	32
2.7.3 Enzymatická hydrolýza.....	32
2.8 Derivatizace aminokyselin	32
2.9 Analýza proteinů a aminokyselin.....	33
2.9.1 Metody stanovení proteinů.....	33
2.9.2 Stanovení aminokyselinového profilu pomocí HPLC	34
2.9.3 Iontově-výměnná chromatografie	35
2.9.4 Detekce aminokyselin	36
2.9.5 Přehled vybraných metod stanovení aminokyselin pomocí HPLC	36
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	38
3.1 Materiály a zařízení.....	38
3.1.1 Pomůcky.....	38
3.1.2 Chemikálie	38
3.1.3 Použité přístroje	38

3.1.4	Základní charakterizace pšeničných otrub	38
3.2	Izolace a charakterizace proteinů z pšeničných otrub	40
3.2.1	Předúprava pšeničných otrub	40
3.2.2	Extrakce proteinu	40
3.2.3	Lyofilizace proteinového extraktu	40
3.3	Ověření stability aminokyselin během hydrolyzy	40
3.3.1	Ověření stability aminokyselin během mikrovlnného rozkladu	40
3.3.2	Ověření stability aminokyselin během kyselé hydrolyzy	41
3.4	Hydrolyza proteinového izolátu	41
3.4.1	Kyselá hydrolyza proteinu	41
3.4.2	Enzymatická hydrolyza proteinu	41
3.5	Izolace a separace volných aminokyselin z hydrolyzátu	42
3.5.1	Optimalizace navážky adsorbentu	42
3.5.2	Optimalizace času adsorpce	42
3.5.3	Izolace a frakcionace aminokyselin na základě změny pH citrátového pufru	43
3.6	Analýza aminokyselin pomocí HPLC	44
3.6.1	Kalibrační křivka a směsi standardů aminokyselin.....	45
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	46
4.1	Izolace a charakterizace proteinového izolátu z pšeničných otrub.....	46
4.2	Ověření stability aminokyselin v průběhu hydrolyzy	47
4.3	Hydrolyza proteinového izolátu z pšeničných otrub	49
4.4	Izolace volných aminokyselin z hydrolyzátu pšeničných otrub	50
4.4.1	Optimalizace navážky adsorbentu a času adsorpce	51
4.4.2	Desorpce aminokyselin z adsorbentu v modelovém systému.....	52
4.4.3	Aplikace postupu izolace na hydrolyzát z pšeničných otrub	52
4.4.4	Hmotnostní bilance navržené technologie pro izolaci volných aminokyselin z pšeničných otrub	53
5	ZÁVĚR	54
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	55
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	65
8	SEZNAM PŘÍLOH	66
9	PŘÍLOHY	68

1 ÚVOD

V dnešní době se v potravinářském průmyslu zvyšuje množství vedlejších produktů s nízkou přidanou hodnotou. V mlynářství za tento produkt označujeme pšeničné otruby, jejichž množství může činit denně až několik desítek tun málo využívaného produktu. Otruby se používají jako palivo nebo jako složka krmných směsí. Jsou bohatým zdrojem nutričně významných látek, jako jsou například proteiny. Ty je možné z pšeničných otrub extrahovat hned několika způsoby jako jsou například: izolace alkalickou extrakcí, izolace degradací škrobu, izolace dle Osborna a jiné. Proteiny je možné z pšeničných otrub vyextrahovat také díky změnám hodnot pH. V alkalickém prostředí se proteiny rozpouštějí, při okyselování roztoku do izoelektrického bodu dochází k jejich vysrážení. Následnou lyofilizací je možné získat proteinový izolát, jehož čistota musí být minimálně 90 % nebo proteinový koncentrát, jehož čistota musí být minimálně 65 %. Tyto proteiny jsou často v prášku a nacházejí uplatnění například ve sportovní výživě jako doplňky stravy.

Výhodou proteinových doplňků stravy je, že jsou vhodné i pro lidi s intolerancí na laktózu, alergií na mléčnou bílkovinu, vegany i vegetariány. Nevýhoda je vysoký obsah lepku, který není vhodný pro lidi trpící celiakií, tedy alergií na lepek.

Tato diplomová práce se zabývá využitím pšeničných otrub jakožto zdroje proteinů, jejich extrakcí, hydrolýzou, charakterizací hydrolyzátu z hlediska obsahu vybraných aminokyselin a následnou optimalizací podmínek pro izolaci daných aminokyselin z hydrolyzátu pomocí separačních technik.

2 TEORETICKÁ ČÁST

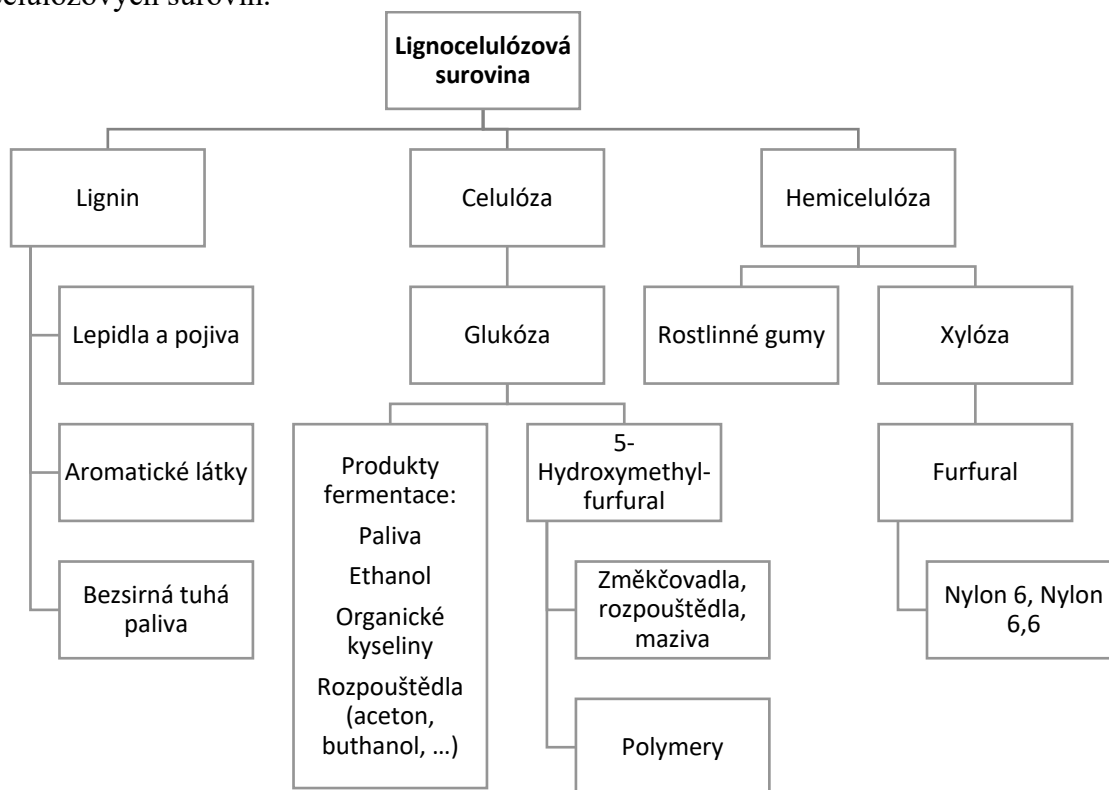
2.1 Valorizace odpadů z potravinářského průmyslu

Životní prostředí v dnešní době významně ovlivňuje velké množství lignocelulózových zbytků rostlin a odpadů pocházejících ze zemědělského a potravinářského průmyslu. Za rok se světová produkce těchto odpadů pohybuje kolem 170 miliard metrických tun. Proto se uvažuje například nad využitím lignocelulózových odpadů jakožto obnovitelných zdrojů energie [1,2].

Mezi lignocelulózové zbytky rostlin lze zařadit materiály získané z dřevařského průmyslu (dřevní štěpka, kůra a piliny) a ze zbytků zemědělských plodin (slámy, otruby, stonky a další). Mezi odpady ze zemědělského a potravinářského průmyslu se řadí odpady ovocné, odpady z výroby cukru a škrobu, z mletí obilí a luštěnin a odpady z mléčného průmyslu, pivovarnictví a vinařství. Tyto odpady je možné považovat za obnovitelné a levné zdroje uhlíku, dusíku a jejich organických sloučenin [2].

Obecně se lignocelulózový materiál skládá z celulózy (30-35 %), hemicelulózy (20-40 %), ligninu (15-25 %), malého množství vody, popela a cyklických uhlovodíků. Procentuální složení jednotlivých materiálů se liší podle druhu a použité části rostliny [3].

Biorafinérie zpracovávající lignocelulózovou biomasu lze rozdělit podle použitého procesu na dva základní typy: termochemická, která probíhá při působení různých teplot za použití různých činidel a biochemická, která se používá častěji. Biochemické zpracování lignocelulózové biomasy je znázorněno na Obrázku 1 a jednotlivé kroky jsou popsány v Tabulce 1 [4]. V současné době se staví biorafinérie specializující se na danou frakci lignocelulózových surovin.



Obrázek 1: Schéma produktů, které lze získat z různých frakcí lignocelulózové biomasy [4].

Tabulka 1: Souhrn postupů lignocelulózové biorafinérie [4].

Suroviny	Lignocelulózové plodiny: dřevo, topol s krátkou rotací, vrba, ... Zbytky lignocelulózy: zemědělské zbytky (sláma, obilí, otruby, kukuřičné klasy, ...), zbytky z pil, komunální odpad, ...
Primární rafinace	Může zahrnovat fyzikální, biochemické nebo termochemické procesy, které slouží k narušení materiálu biomasy. Existuje několik technologií: -frakcionace za působení enzymů -horká voda nebo kyselá chemická hydrolyza -působení páry nebo amoniaku -alkalické působení -působení organosolů.
Dva směry po primární rafinaci	-Výsledkem enzymatické přeměny je frakce fermentovatelných cukrů z celulózy a hemicelulózy a jedna frakce ligninu. -Frakcionace lignocelulózové suroviny vytvoří tři frakce: celulózu, hemicelulózu a lignin.
Produkty fermentovatelných cukrů	Fermentace: fermentovatelné cukry (C5/C6) lze přímo použít na výrobu ethanolu, organických kyselin, aminokyselin, ...
Produkty celulózy	Enzymatická hydrolyza a fermentace: celulóza je hydrolyzovaná za vzniku cukrů, které se použijí jako substrát a zpracovávají se za vzniku stejných produktů jako u fermentovatelných cukrů nebo lze celulózu využít k chemické výrobě buničiny a papíru.
Produkty hemicelulózy	Enzymatická hydrolyza, fermentace a další chemické metody. Hemicelulózová frakce obsahuje více či méně natrávené uhlohydráty a tím pádem má proměnlivé složení a je nutné upravovat kombinaci enzymových aktivit. Monomerní sacharidy jsou odděleny a fermentovány. Jiné sloučeniny mohou být extrahovány (kyselina octová, furfural, ...).
Produkty ligninu	Termochemické cesty (spalování). Výroba pojiv a lepidel. Selektivní degradace na monomerní aromatické sloučeniny.

2.2 Obiloviny-jejich nutričně a technologicky významné složky

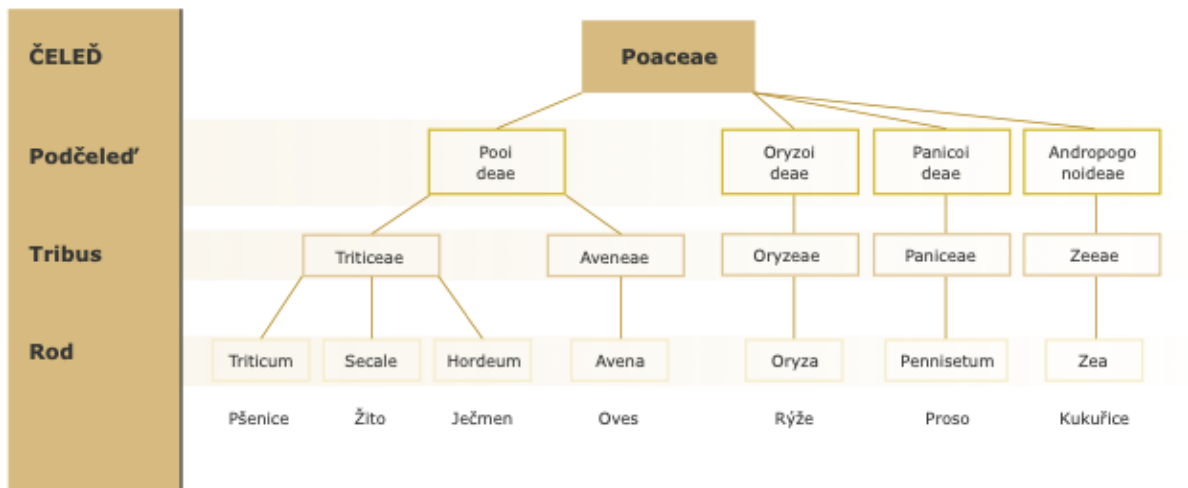
Obiloviny se staly neodmyslitelnou součástí lidské potravy nejen díky jejich pestrému složení, ale také pro jejich přizpůsobení se klimatickým podmínkám, vyšší výnosu konzumních částí a možností dlouhodobého skladování. Obiloviny tvoří 20-60 % z celkového denního příjmu bílkovin člověka.

Obsah bílkovin je rozdílný v jednotlivých částech obilného zrna a jejich množství v mouce závisí na stupni jejího vymletí, na plodině a její odrůdě a na klimatických faktorech. Více vymleté mouky (celozrnné a tmavé) mají až o 4 % vyšší obsah bílkovin než světlé mouky. Tradiční obiloviny bývají díky méně kvalitnímu aminokyselinovému složení v potravě nahrazovány pseudoobilovinami s kvalitou podobnou bílkovinám živočišného původu (pohanka, amarant, quinoa a další). Ty mají vysokou biologickou hodnotu bílkovin hlavně z důvodu vyššího zastoupení esenciální aminokyseliny lysinu. Hlavními bílkovinami zastoupenými ve všech obilovinách jsou albuminy, globuliny, prolaminy a gluteliny. Obiloviny jsou také bohatým zdrojem sacharidů (glukózy, fruktózy, sacharózy, maltózy, laktózy, škrobu, vlákniny a dalších), které se vyskytují ve všech částech obilného zrna.

Obiloviny obsahují zejména vitaminy skupiny B a E. Jejich zastoupení v mouce závisí na poměru klíčků, otrub a endospermu obilného zrna. V mlýnských produktech jsou obsahy vitaminů skupiny B určeny stupněm vymletí, který je zásadní i pro obsah minerálních látek. Přítomnost lipidů, hlavně v obilném klíčku, není z výživového hlediska zásadní, ale je důležitá v technologii při tvorbě těsta. Oblíbenou obilovinou vhodnou pro potravinářství se stala pšenice, kterou jako základní obilovinu konzumuje zhruba 30 % lidské populace. Dalším důležitým zdrojem pro výrobu mouky je žito [5,6,7,8].

2.2.1 Pšenice

Jak je vidět na Obrázku 2, pšenice se řadí do rodu *Triticum*, který náleží do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). Pro Českou republiku je nejčastější pěstování pšenice seté *Triticum aestivum* L. Jedná se o jednoletou travu (ozim i jař) s nelámovým klasem, která je velice populární po celém světě, kde zaujímá 80-90 % osevní plochy pšenice. Pšenice setá se vyskytuje ve čtyřech variantách, pro pěstování v České republice se nejvíce hodí odrůdy zařazené do varianty *lutescens*. Zralé a suché obilky jsou složeny z více než 70 % škrobu a z 10-12 % z bílkovin, proto je pšeničná mouka bohatá na lepek a hodí se na pečení chleba a jemného pečiva [6,9,12].



Obrázek 2: Taxonomie obilovin-zařazení pšenice a žita [6].

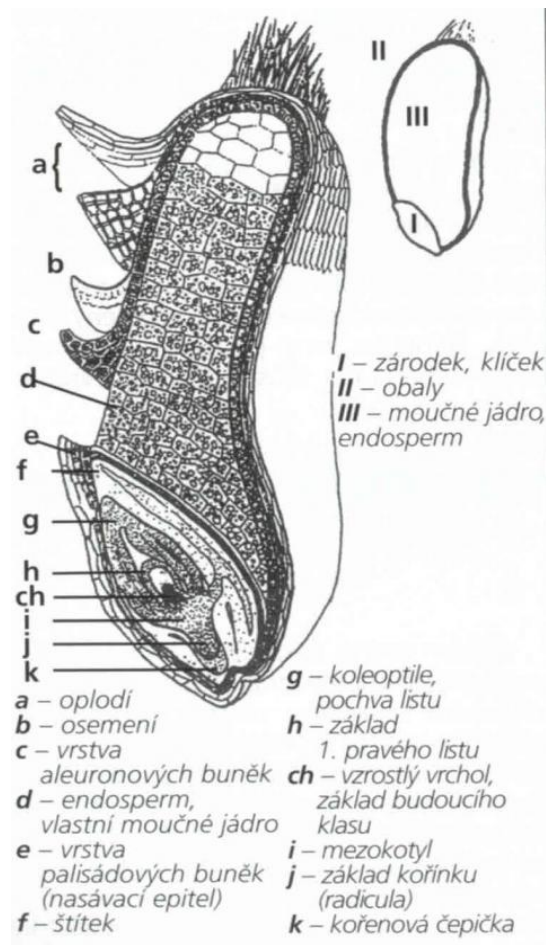
2.2.2 Žito

V České republice je nejčastěji seto žito rodu *Secale cereale*, náležející do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*), které je odolnější nízkým teplotám a kyselým půdám oproti pšenici a může se tak pěstovat ve vyšších polohách. Jedná se o jednoletou travu (ozim i jař), která vznikla z druhu *Secale segetale* při seti pšenice, ve které bylo plevem. Žito je vyséváno na podzim, během dubna vyrůstají silná nosná stébla a v průběhu května se tvoří květy. Žitná mouka se v pekárnictví často používá ve směsi s pšeničnou moukou k výrobě žitného, žitnopšeničného, pšeničnožitného, pšeničného, celozrnného, vícezrnného nebo speciálního těsta. Dříve se obilky žita používaly k výrobě sladové kávy a lihovin, hlavně žitné kořalky [7,10,11,12].

2.3 Složky zrna

Semena obilovin neboli obilky uchovávají životaschopnost zárodku nové rostliny. K tomu jim pomáhají složky uložené v anatomických částech semene, které se liší chemickým složením [9]. Obilky jsou složeny ze tří hlavních částí: obalových vrstev (13-17 %), které chrání obilku před vnějšími vlivy a nazývají se také otruby, klíčku (2-3 %) a „vnitřního bílku“ neboli endospermu (80-85 %) [6,7,13].

Na boční straně obilky je uložený zárodek, který je chráněn oplodím a o semením. S endospermem je spojený pletivem neboli štítkem. Pod o semením se nachází aleuronové buňky, které mají zrnkovitý tvar a tvoří mazlavou a lepkavou vrstvu. Na vrcholové straně se nachází vegetační vrchol s listy. Na protilehlé straně mezi kořínkem a dělohami se nachází první článek tzv. osní hypokotyl. Mezi hypokotylem a koleoptilí, což je pochva obklopující základ stonku s listy, se tvoří první článek nazývaný mezokotyl. V zárodku se nachází hned několik kořínků. Základem primárního kořínku je prostřední koříněk, nazývaný radícula, který je krytý čepičkou tzv. koleorhizou. Na Obrázku 3 je detailněji popsána anatomická stavba obilky [9,14,15,16].



Obr\u00e1zek 3: Pr\u00f9r\u00e9z obilkou p\u0161enice [9].

2.3.1 Kl\u00ed\u010dek

Kl\u00ed\u010dek neboli embryo, je z\u00e1kladem nov\u00e9 rostliny a nositelem genetick\u00e9 informace. Je ulo\u017een\u00fd v zrn\u016f a skl\u00e1d\u00e1 se z v\u00edce \u010d\u00e1st\u00ed: 1. koleoptile neboli pochvy listu, 2. z\u00e1kladu prvn\u00edho prav\u00e9ho listu, 3. vzrostl\u00e9ho vrcholu, kter\u00fd je z\u00e1kladem budouc\u00edho klasu, 4. mezokotylu, 5. radicy a 6. ko\u0159enov\u00e9 \u010d\u00e9pi\u010dky. Je bohat\u00fdm zdrojem l\u00e1tek v\u00fdznamn\u00fdch pro lidskou v\u00fd\u017eivu, ale na vzduchu je nest\u00e1l\u00fd kv\u016fl\u00ed vysok\u00e9mu množství tuku. V mlyn\u00e1renstv\u00ed je kl\u00ed\u010dek snadno odd\u011bl\u00f3v\u00e1n od zrna [6,7,13].

2.3.2 Endosperm

Endosperm tvo\u0159\u00ed p\u0159ev\u00e1\u017enou \u010d\u00e1st hmotnosti zrna. Pro rostlinu spo\u010d\u00edv\u00e1 d\u016bl\u00e9zitost v obsahu z\u00e1sobn\u00ed l\u00e1tky nezbytn\u00e9 pro kl\u00ed\u010den\u00ed rostlin. Z p\u0161eni\u010dn\u00fdch zrn se d\u00e1 snadno z\u00edskat \u010di\u0161t\u00fd endosperm odstran\u011bn\u00edm kl\u00ed\u010dka a obalov\u00e9 vrstvy. Je t\u00e9\u017e d\u016bl\u00e9\u017eit\u00fd pro lidskou v\u00fd\u017eivu. Endosperm je bohat\u00fdm zdrojem \u0161krobu (asi 80 %) s obsahem protein\u016f (15 %), kter\u00e9 jsou schopny tvo\u0159it pru\u017en\u00fd a ta\u017en\u00fd lepek. Ten se st\u00e1v\u00e1 p\u0159i hn\u011bt\u00e9n\u00ed mouky s vodou z\u00e1kladem pro vypracov\u00e1n\u00ed t\u011bsta [6,7].

2.3.3 Aleuronová vrstva

Aleuronová vrstva tvoří vrchní vrstvu endospermu. Struktura aleuronové vrstvy zrna je téměř homogenní, má zrnkový tvar a je převážně bezbarvá. U žita i pšenice se nachází aleuronové buňky v jedné vrstvě, která je mazlavá a lepkavá. Obsahuje více bílkovin, než jich je obsaženo v endospermu, ale ty svými nízkými lepkotvornými vlastnostmi nevyhovují pekařské výrobě [7,15].

2.3.4 Otruby

Otruby jsou obalové vrstvy, které chrání obilku před působením vnějších vlivů. Jsou tvořeny z velké části houževnatými, neškrobovými a nerozpustnými polysacharidy, zejména celulózu. Vnitřní obalové vrstvy, jako jsou aleuronové buňky, se skládají z polysacharidů, které se vyznačují velkou vazností pro vodu. Při styku s vodou se buď rozpouštějí nebo bobtnají, odvádějí vodu z lepku a tím zhoršují optimální viskozitu a elasticitu těsta. Mohou snižovat schopnost těsta zadržovat plyny, a tím snižovat objem pečiva. Vnější obalové vrstvy oplodí a osemení tvoří převážně nestravitelná vlákna. Otruby se používají v pekárenském průmyslu pouze omezeně, protože zhoršují kvalitu a zpracovatelnost těsta. Mají též vliv i na vzhled výrobku. Vymíláním obilek při výrobě mouky zůstávají otruby jako vedlejší produkt. Nejčastěji se používají jako složky krmných směsí [6,7,15,17].

2.4 Chemické složení pšeničných otrub

Bez ohledu na postup zpracování zrna obiloviny obsahují přibližně 12 % vody, až 18 % bílkovin, 4, 2 % tuku, více jak 50 % sacharidů a v malém zastoupení také fenolické látky a popel. Tabulka 2 uvádí obecné složení pšeničných otrub v sušině [18].

Tabulka 2: Složení pšeničných otrub v sušině [18].

Složka	Množství v sušině [%]
Celkové sacharidy	64,5
Proteiny	17,9
Tuky	4,2
Arabinoxylany	21,0
Fenolické kyseliny	1,2
Popel	5,7

Složka	Množství v sušině [%]
Škrob	22,0
Celulóza	12,5

Semena rostlin jsou hlavním zdrojem rostlinných proteinů v potravě. Na rozdíl od potravin živočišného původu jsou bohaté na kyselinu asparagovou, glutamovou a také na glycin, arginin a leucin. Jejich nutriční hodnotu snižuje nedostatek esenciální aminokyseliny lysinu. Proteiny rostlin bývají rozpustné ve vodě, solích, zředěných kyselinách, zásadách a jejich rozpouštědlech. Proteiny jsou v zrně nejvíce zastoupeny v obalových vrstvách, tedy v otrubách. Jejich množství v mouce závisí na stupni vymletí, proto mají celozrnné mouky větší obsah proteinů [6]. Detailní aminokyselinové složení je blíže popsáno v Tabulce 3.

Tabulka 3: Aminokyselinové složení pšeničných otrub [18].

Aminokyselina	g/100 g sušiny	Aminokyselina	g/100 g sušiny
Kyselina asparagová	1,84	Arginin	1,52
Threonin	0,64	Isoleucin	0,52
Serin	0,78	Leucin	1,10
Kyselina glutamová	3,62	Tyrosin	0,52
Prolin	1,05	Fenylalanin	0,67
Glycin	1,08	Histidin	0,51
Alanin	0,96	Lysin	0,78
Valin	0,80	-	-

V pšeničných otrubách jsou hojně zastoupeny i minerální látky. Nalezneme zde hořčík, fosfor, draslík, vápník, mangan, železo, měď a zinek. Detailní složení minerálních látek v pšeničných otrubách je znázorněno v Tabulce 4.

Tabulka 4: Složení minerálních látek v pšeničných otrubách [21].

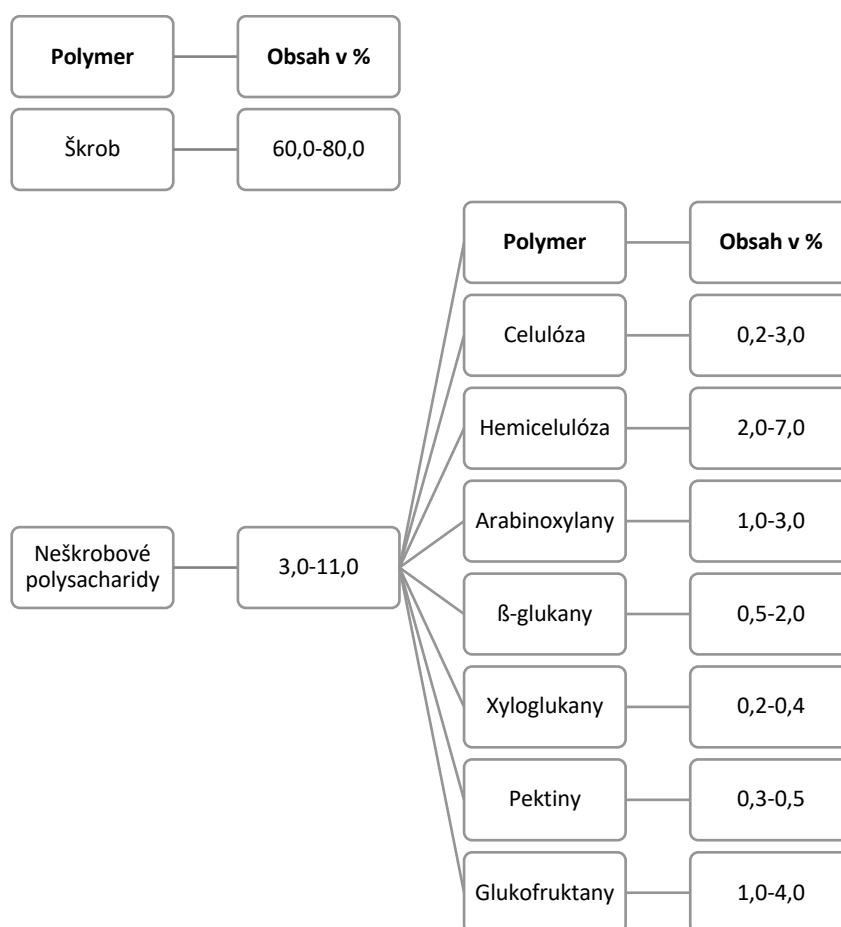
	Množství v ppm		Množství v ppm
Mg	6,59	Mn	128,00
P	15,30	Fe	49,10
K	16,07	Cu	11,70
Ca	814,00	Zn	97,20

2.4.1 Sacharidy pšeničných otrub

Monosacharidy jsou v obilovinách zastoupeny pouze ve stopovém množství. Jejich hlavní výskyt je v klíčku, který je složen z pentóz (arabinóza, xylóza, ribóza) a hexóz (glukóza, fruktóza, galaktóza, mannosy). Stejně tak jsou v malém množství ve zralém, neporušeném a suchém zrně obsaženy oligosacharidy. Převážně se zde nachází sacharóza a maltóza, jejíž obsah roste při naklíčení zrna [7].

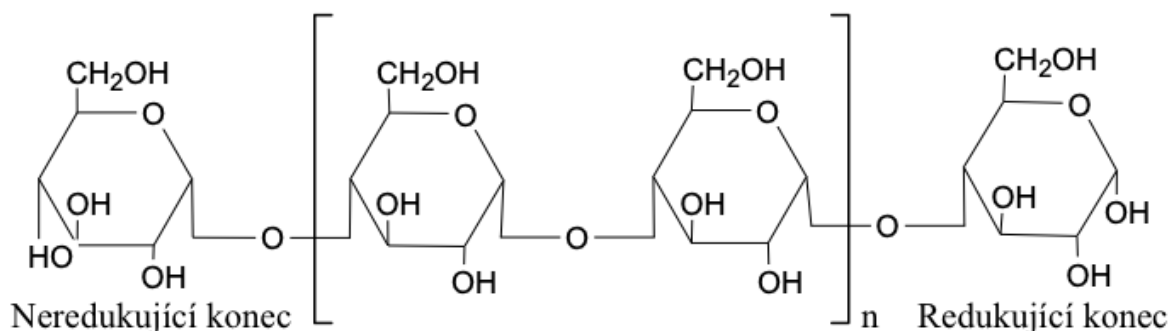
Nejhojněji zastoupenou skupinou sacharidů jsou polysacharidy. Jejich základem jsou obvykle až tisíce monosacharidových jednotek, spojených glykosidovými vazbami. Řetězce mohou být větvené i nevětvené a prostorové uspořádání řetězců může být fibrilární, helikální nebo globulární. Škrob je v zrně zdrojem a zásobou energie. Celulóza, hemicelulóza a lignin jsou základem buněčných stěn rostlin. Jedná se o látky převážně nerozpustné ve vodě. Další významnou skupinou jsou β -glukany, které tvoří podstatnou část vlákniny v lidské potravě. Jsou to látky rozpustné a bobtnající ve vodě, které jsou schopny tvořit vysokoviskózní a vysokovazné koloidní systémy. Dále se v obilovinách mohou objevovat arabinoxylany, xyloglukany, pektiny nebo glukofruktany. Množství jednotlivých polysacharidů v mouce závisí na stupni vymletí mouky. Čím vyšší je stupeň vymletí mouky, tím větší je obsah neškrobových polysacharidů. Polysacharidové složení pšeničné mouky shrnuje Tabulka 5. Obsah škrobu v otrubách bývá asi 15 %, celulózy asi 35 % a obsah hemicelulózy 40-50 % [7,19,20].

Tabulka 5: Obsah hlavních polysacharidů v pšeničné mouce [19].

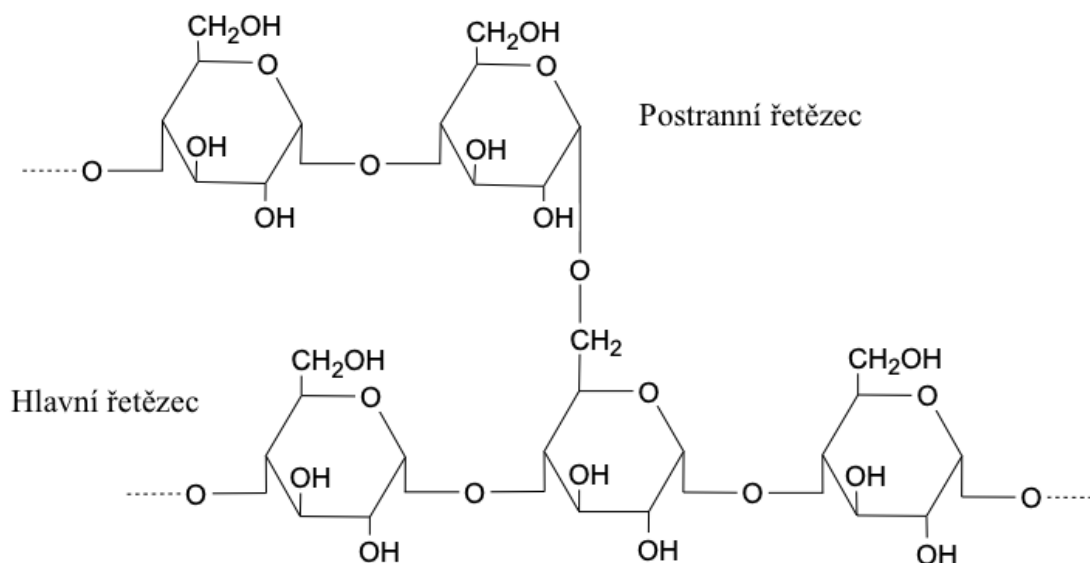


Škrob

Škrob je obsažen převážně v endospermu obilovin, kde tvoří přibližně 60-75 % sušiny. Je hlavním metabolickým produktem v chloroplastech listů zelených rostlin. Bývá degradován na rozpustné sacharidy. V jiných částech rostlin je následně syntetizován zásobní škrob, který je ukládán v podobě škrobového zrna v organelách zvaných amyloplasty. Jedná se o vysokomolekulární zásobní polymer D-glukózy. Slouží jako pohotová zásoba energie. Jeho monomerní jednotky jsou spojeny glykosidovými vazbami α (1 \rightarrow 4) v lineární řetězec. K větvení dochází pomocí vazeb α (1 \rightarrow 6). Je složen ze dvou hlavních polysacharidových frakcí, jejichž základní stavební jednotkou je glukóza, z lineární amyλόzy na Obrázku 4 (cca 25 %), která je rozpustná ve vodě a větveného amylopektinu na Obrázku 5 (cca 75 %), který při styku s vodou bobtná a není schopen vytvořit roztok. Škrob tedy tvoří při styku s vodou za tepla gelovitý maz. Je hydrolyzován pomocí α -amylázy a β -amylázy. Enzym α -amyláza štěpí molekuly amyλόzy a amylopektinu v libovolném místě řetězce. U amylopektinu může docházet k odštěpování jak z volných koncových řetězců, tak i ve větvené struktuře za vazbami α -1,6. Aktivita α -amylázy výrazně roste s naklíčením zrna. Enzym β -amyláza působí z vnější strany amyλόzy a amylopektinu. Postupně odštěpuje molekuly maltózy od konce polymerních řetězců. U amylopektinu není β -amyláza schopna provést celkovou hydrolyzu, protože nepřekročí vazby α -1,6. Zbyde nezhydrolyzovaný dextrin. Při větším obsahu amylopektinu v obilném škrobu zůstává nezhydrolyzovaný velký podíl škrobu, což může při dalším zpracování dělat problémy [5,7,19,20].



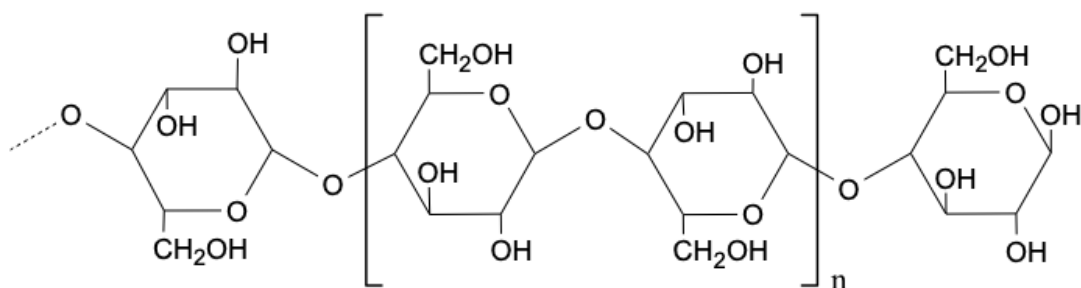
Obrázek 4: Vzorec amyλόzy [21].



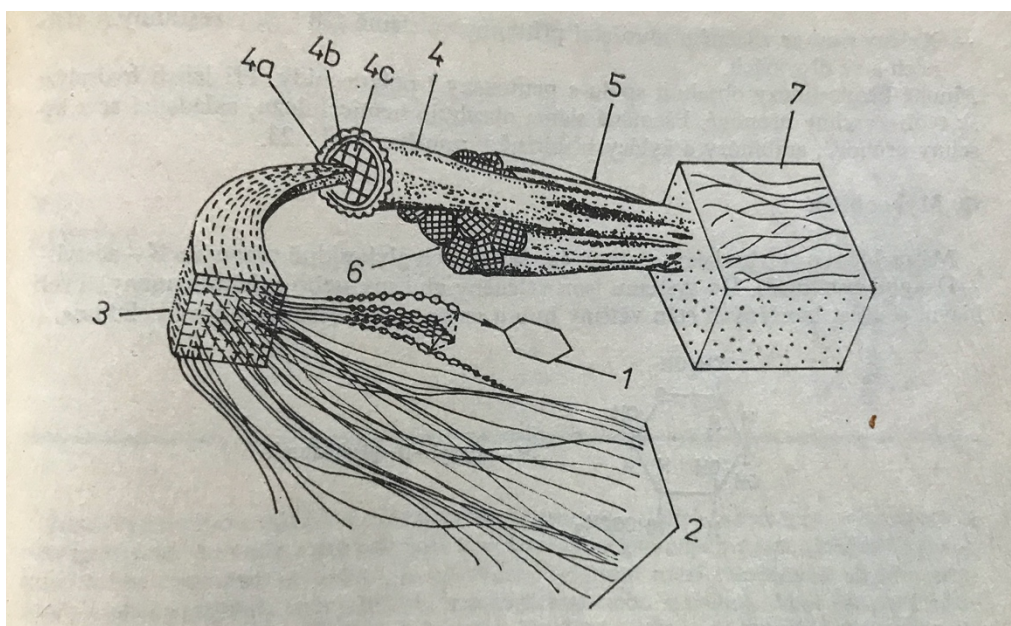
Obrázek 5: Vzorec amylopektinu [21].

Celulóza

Celulóza se řadí mezi nestravitelné neškrobové polysacharidy. Je hlavním stavebním polysacharidem tvořící značnou část buněčných stěn vyšších rostlin. Nalezneme ji také v zelených rostlinách, houbách, dokonce i v živočišné říši ve stěnách buněk jednoduchých mořských bezobratlých živočichů. Je spolu s β-glukany a hemicelulózami obsažena v obalových vrstvách zrna a oplodí. Celulóza je tvořena glukózovými jednotkami spojenými glykosidovými vazbami, její primární struktura je znázorněna na Obrázku 6. Tím je dáno její lineární uspořádání. Jednotlivé makromolekuly interagují pomocí vodíkových vazeb a mohou tvořit uspořádané trojrozměrné struktury ve stěnách rostlinných buněk. Tyto struktury se nazývají celulózová vlákna nebo také mikrofibřily. V mikrofibřilách se pravidelně střídají dvě oblasti: krystalická – uspořádaná oblast s vysokým počtem intermolekulárních vazeb a amorfní – málo uspořádaná oblast s nízkým počtem intermolekulárních vazeb. Strukturální uspořádání buněčné stěny je znázorněno na Obrázku 7. Celulóza je nerozpustná ve vodě, ve zředěných kyselinách, v zásadách a většinou rozpouštědel, za normálních teplot ani výrazně nebobtná. K intenzivnějšímu bobtnání dochází až při působení hydroxidů nebo po proniknutí rozpouštědla do amorfních oblastí. V koncentrovaných kyselinách je celulóza rozpustná, protože dochází k hydrolyze na rozpustné fragmenty s kratší délkou řetězce, disacharid celobiózu, popřípadě až na D-glukózu. V kyselých roztocích při působení vyšší teploty dochází k hydrolyze nebo oxidaci. Pro člověka je nestravitelná, protože ten nedisponuje celulytickými enzymy, stává se tak pro něj nevyužitelným polysacharidem. Pokud se v mleté formě přidává do těsta, snižuje vaznost vody a pružnost těsta. K takovým výrobkům je nutné přidávat zlepšovací prostředky, jako je sušený lepek a kyselina askorbová k posílení lepkové struktury. Ke zlepšení vlastností je také možné použít deriváty a modifikátory celulózy, které mají lepší vaznost vody při zpracování těst za různých teplot než celulóza. V otrubách tvoří až 35% podíl neškrobových polysacharidů, takzvané nerozpustné vlákniny [5,7,15,19,20].



Obrázek 6: Primární struktura celulózy [21].



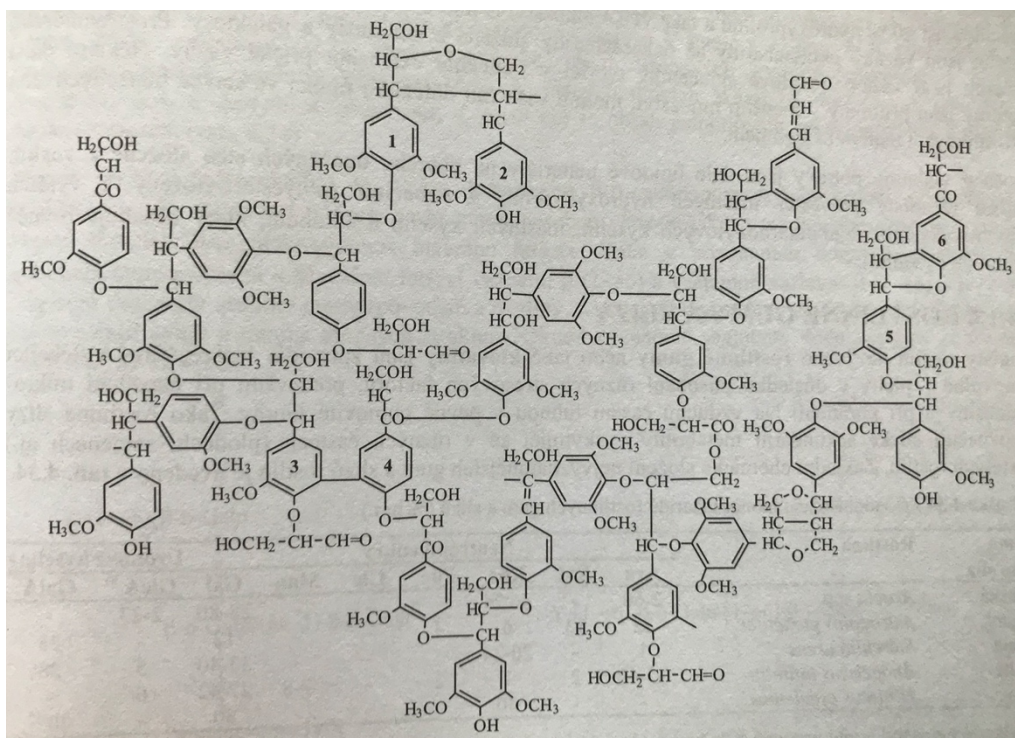
Obrázek 7: Strukturální uspořádání buněčné stěny. 1. glukóza, 2. celulózní řetězce, 3. micela, 4. mikrofibrily, 4a necelulózní látky, 4b parakrystalická část, 4c krystalická část, 5. fibrila, 6. skulina, 7. buněčná stěna [15].

Hemicelulóza

Hemicelulózy se řadí mezi nestravitelné neškrobové polysacharidy. V rostlinném pletivu spolu s pektinovými látkami vyplňují prostory mezi celulóзовými vlákny. Jsou to ve vodě nerozpustné polysacharidy s rozvětvenými řetězci. Hydrolyzují se snadněji kyselinami než celulóza až na nižší rozpustné cukry. Struktura hemicelulózy je amorfni, dle povahy hlavního řetězce se dělí na manany, xylany a glukany. Ten může být dále substituován hexózami (glukóza, manóza, galaktóza, aj.), pentózami (arabinóza, xylóza, aj.) a uronovou kyselinou. V buněčných stěnách slámy jsou převážně obsaženy galaktany a xylany, které jsou přítomny až z 28 %. Složení hemicelulózy v pšeničné slámě je tvořeno kyselinou uronovou, arabinózou a xylózou v poměru: 1: 1: 23 [15,20].

Lignin

Lignin se řadí mezi doprovodné látky polysacharidů. Je druhým nejhojněji zastoupeným biopolymerem lignocelulózy biomasy po celulóze. Jedná se o amorfni tmavohnědou látku fixující a zpevňující stěny buněk, umožňuje transport vody a rozpuštěných látek přes cévní systém rostliny. Také poskytuje fyzické bariéry proti invazím fytopatogenů a dalším environmentálním stresům. Může zabránit degradaci strukturálních polysacharidů díky svým hydrolytickým vlastnostem. Je součástí vlákniny v potravě. V zažívacím traktu se lignin nerozkládá, pouze se štěpí vazby mezi ostatními polymery a ligninem. V otrubách je obsaženo až 8 % ligninu. Skládá se ze tří hlavních fenylpropanolových jednotek p-kumarylalkoholu, koniferylalkoholu a sinapylalkoholu uspořádaných do trojrozměrné sítě. Poměr těchto tří složek se může lišit podle stáří a druhu rostliny. Základní struktura ligninu je znázorněna na Obrázku 8. Krytosemenné rostliny jako je pšenice mají koniferylalkohol a sinapylalkohol zastoupeny přibližně ve stejném množství, zatímco p-kumarylalkohol pouze stopově. Výhodou ligninu jsou jeho antioxidační, antifungální a antimikrobiální vlastnosti. Ve srovnání s celulózou a hemicelulózou je odolnější vůči působení chemických a biologických vlivů. Je schopen absorbovat UV záření [15,19,23].



Obrázek 8: Struktura ligninu [19].

2.4.2 Proteiny pšeničných otrub

Bílkoviny tvoří až 13 % sušiny ve zralém zrně obilovin. Základními bílkovinami obsaženými v pšeničném zrně jsou albuminy 15 %, globuliny 7 %, prolaminy 33 % a gluteliny 45 %. Jednotlivé frakce se liší nejen molekulovou hmotností, ale také strukturou, fyzikálními vlastnostmi, obsahem aminokyselin, výživovými a zdravotními účinky. Albuminy jsou neutrální bílkoviny, globuliny jsou slabě kyselé bílkoviny. Albuminy jsou dobře rozpustné

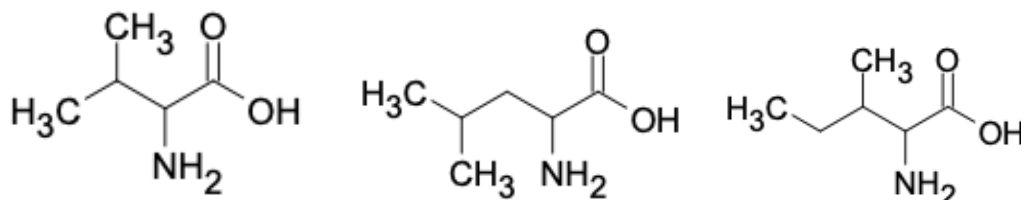
ve vodě, globuliny jsou nerozpustné ve vodě, ale rozpustné ve zředěných roztocích solí, kyselin a zásad, teplem mohou koagulovat. Prolaminy jsou také nerozpustné ve vodě. Jsou rozpustné ve zředěných roztocích solí, kyselin a zásad, ale také ve zředěném ethanolu. Gluteliny jsou nerozpustné ve vodě, ale rozpustné ve zředěných roztocích solí, kyselin a zásad [5,7,19].

Obsah a složení jednotlivých bílkovin v pšeničných otrubách se liší podle podmínek růstu rostliny, použité metody zpracování nebo analyzovaným kultivarům. Hlavně obsah glutelinů závisí na použité metodě k odstranění endospermu. Podle článku jsou otruby složeny z albuminů 23,5 %, globulinů 15,5 %, prolaminů 18,5 %, glutelinů 25,5 %. Bílkoviny z pšeničných otrub mají vysokou nutriční hodnotu. Oproti bílkovinám, nacházejících se v endospermu, mají otruby zastoupený celý profil bílkovin a na rozdíl od endospermu jsou bohaté na esenciální aminokyseliny [24,25].

2.4.3 Esenciální aminokyseliny pšeničných otrub

Esenciální aminokyseliny jsou nepostradatelné aminokyseliny, které si organismus není schopen sám syntetizovat. Je tedy nutné, aby je získával z potravy. Patří sem osm aminokyselin: valin, leucin, isoleucin, threonin, methionin, lysin, fenylalanin a tryptofan. Esenciální aminokyseliny je možné získávat z živočišných i rostlinných zdrojů. Syntéza esenciálních aminokyselin je složitý proces, který je tvořen až 11 kroky. Valin a leucin vznikají z pyruvátu, aromatické kyseliny a histidin z ribózo-5-fosfátu. Prekurzorem lysinu, methioninu, threoninu a isoleucinu je aspartát [19,26,27].

Valin, leucin, isoleucin



Obrázek 9: Strukturální vzorce valinu, leucinu a isoleucinu [21].

Směs tří esenciálních aminokyselin valinu, leucinu a isoleucinu (Obrázek 9) je známá hlavně ve sportovní výživě jako BCAA (the branched chain amino acids). Jsou to neutrální a větvené aminokyseliny, které se podávají nejčastěji ve formě kapslí nebo roztoku. Řadí se spolu s glycinem a alaninem mezi alifatické aminokyseliny. To znamená, že jejich postranní řetězec neobsahuje žádné heteroatomy ani žádný aromatický kruh. Slouží jako zdroj energie pro organismus hlavně v zátěžových situacích, kdy může dojít k vyčerpání rychle použitelných energetických zdrojů: sacharidů. Napomáhají k regeneraci po náročném sportu a urychlují tvorbu nových bílkovin. Sportovci je využívají převážně k potlačení únavy, posílení imunitní funkce, k ochraně svalové hmoty před devastací, ale také ke vzniku svalové hmoty [15,19,26,27,28].

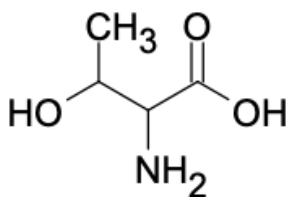
Valin je značně rozšířen v živočišných i rostlinných bílkovinách, i když jeho zastoupení v nich je pouze v malém množství. V bílkovinách vajec a mléka se jeho množství pohybuje

kolem 7-8 %. Získává se také ze sýrů, ryb, masa a zeleniny. Napomáhá k regeneraci po výkonu, kdy pomáhá k obnově jaterního glykogenu. Mimo jiné je i prospěšný k udržení duševní síly, svalové koordinaci a k emočnímu klidu. Doplnky stravy s obsahem valinu se používají k růstu svalů, opravě tkání a doplnění energie. Je vhodné valin kombinovat s leucinem a isoleucinem, a to v poměru 2: 1: 2 [15,19,27,28,30].

Leucin je obsažen ve všech běžných bílkovinách, ve velkém množství hlavně v klíčících obilkách. Napomáhá ke snížení krevního cukru, ke zlepšení stavu kostí, svalů a kůže. Také urychluje regeneraci po chirurgických zákrocích a může tak pomoci zabránit rozpadu svalových bílkovin, ke kterému někdy dochází po traumatu nebo silném stresu [15,19,27,28,31].

Isoleucin je nejvíce zastoupený v mléčných a vaječných bílkovinách. Napomáhá ke stabilizaci hladiny krevního cukru, podporuje tvorbu hemoglobinu, chrání játra, pomáhá při hojení ran a detoxikaci dusíkatých látek. Nachází se také v mase, rybách, sýrech, vejcích, semenech a ořechách [15,19,27,28,32].

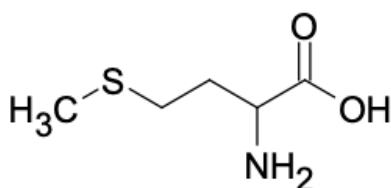
Threonin



Obrázek 10: Strukturální vzorec threoninu [21].

Threonin (Obrázek 10) je neutrální aminokyselina obsahující v postranním řetězci hydroxylovou skupinu. Je hojně zastoupen v mase, mléku, vejcích a pivovarských kvasnicích. Z cereálií má největší zastoupení threoninu pšeničná bílkovina. Je důležitý pro nervový systém, hraje důležitou roli pro metabolismus tuků a zabraňuje hromadění tuků v játrech. Mimo jiné je prospěšný při střevních poruchách a zažívacích potížích. Používá se i pro zmírnění úzkosti a depresí. Prospěšná je i jeho opticky aktivní forma L-threonin, která je důležitá pro tvorbu kolagenu, elastinu a zubní skloviny [19,27,33].

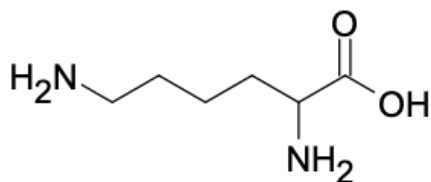
Methionin



Obrázek 11: Strukturální vzorec methioninu [21].

Methionin (Obrázek 11) je sirná nepolární aminokyselina obsahující v postranním řetězci síru (thioéter). Ta pomáhá chránit buňky před znečišťujícími látkami a zpomaluje stárnutí buněk, mimo jiné je nezbytná pro absorpci selenu a zinku. Methionin je zastoupený v malém množství v rostlinných i živočišných bílkovinách. Zlepšuje pružnost pokožky, vlasů, posiluje nehty, je nezbytný pro růst a regeneraci tkání. V játrech působí jako lipotropní látka zabráňující přebytečnému ukládání tuku. Methionin v těle chelatuje těžké kovy, což napomáhá jejich vylučování [15,19,27,34].

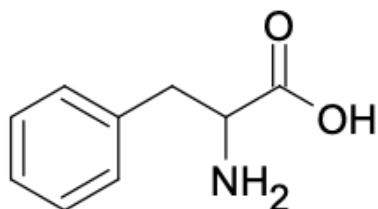
Lysin



Obrázek 12: Strukturální vzorec lysinu [21].

Lysin (Obrázek 12) je zásaditá aminokyselina napomáhající vstřebávání vápníku. Je důležitý pro kvalitu kostí a pro tvorbu kolagenu. V kombinaci s argininem podporuje tvorbu růstového hormonu, což je využíváno hlavně k regeneraci po fyzických výkonech a chirurgických zákrocích. Napomáhá produkci protilátek, hormonů a enzymů. Při jeho nedostatku se může dostavit únava, neschopnost soustředit se, podrážděnost, vypadávání vlasů nebo zpomalený růst. Je obsažen poměrně hojně v živočišných bílkovinách, jako jsou ryby, korýši, vejce, maso a mléko. V rostlinných bílkovinách je jeho množství limitní [15,19,27,28,35].

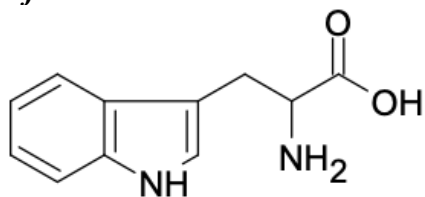
Fenylalanin



Obrázek 13: Strukturální vzorec fenylalaninu [21].

Fenylalanin (Obrázek 13) je silně nepolární aromatická aminokyselina obsahující v postranním řetězci mezomerně stabilizované jádro (benzenový kruh). Je obsažen prakticky ve všech bílkovinách. Jeho přítomnost může vyvolat ojediněle fenylketonurii. Je důležitý pro strukturu a funkci některých proteinů a enzymů. L-forma fenylalaninu se začleňuje do proteinů, zatímco D-forma působí jako lék proti bolesti. Směs optické D- a L-formy fenylalaninu působí jako stimulant, takže je vhodný k podpoře dlouhodobých náročných fyzických výkonů. Využívá se také k omezení pocitu hladu [19,27,28,36].

Tryptofan



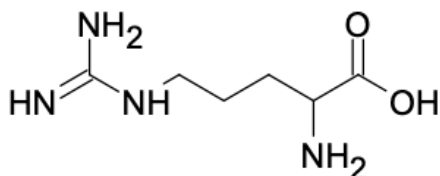
Obrázek 14: Strukturální vzorec tryptofanu [21].

Tryptofan (Obrázek 14) je středně polární aromatická aminokyselina obsahující v postranním řetězci mezomerně stabilizované jádro (indolový kruh). Je obsažen v mléčných výrobcích, masu, rybách a sóje. Tryptofan je v organismu využíván například pro biosyntézu nikotinové kyseliny nebo jako prekurzor fytohormonů auxinu, melatoninu a serotoninu. Prekurzor neurotransmiteru nezbytného při regulaci chuti k jídlu, spánku, nálady a bolesti. Je potřebný pro produkci tělních bílkovin, enzymů a k tvorbě svalové tkáně. Prodává se jako lék na předpis, který pomáhá snížit deprese [15,19,31,32,37].

2.4.4 Poloesenciální aminokyseliny

Arginin a histidin se stávají esenciálními aminokyselinami převážně u rychle rostoucích malých dětí, jelikož je jejich organismus nedokáže dostatečně rychle syntetizovat. U dospělého člověka se považují za neesenciální aminokyseliny. Lze je také nazývat jako semiesenciální aminokyseliny [19].

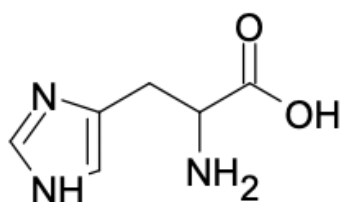
Arginin



Obrázek 15: Strukturální vzorec argininu [21].

Arginin (Obrázek 15) je extrémně zásaditá a silně polární aminokyselina. Je hojně zastoupena v klíčících rostlinách jehličnanů, v bílkovinách semen, arašidech a jiných olejninách. Arginin je důležitý pro působení růstového hormonu, jelikož stimuluje jeho vyplavení do krevního oběhu. Mimo jiné je zdrojem oxidu dusíku, který slouží jako přenašeč vzruchů neboli neurotransmiter. Napomáhá při erektilní dysfunkci, zlepšuje imunitu, kladně působí i při senilní demenci nebo oběhovém onemocnění [15,19,27,28].

Histidin



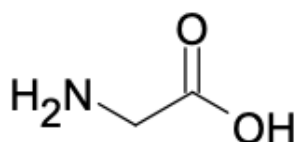
Obrázek 16: Strukturální vzorec histidinu [21].

Histidin (Obrázek 16) je zásaditá aminokyselina obsahující v postranním řetězci imidazolový kruh. Je nezbytný pro tvorbu krevních buněk, chrání tkáň před poškozením způsobeným radiací a těžkými kovy. Používá se při léčbě revmatoidní artritidy, alergických onemocněních, vředů a anémie. Jedním z příznaků nedostatku histidinu v těle může být například zhoršený sluch [27,38].

2.4.5 Neesenciální aminokyseliny

Neesenciální aminokyseliny si je schopen organismus člověka syntetizovat sám, není nutné je dodávat do těla ve formě potravy. Patří sem jedenáct aminokyselin: glycin, alanin, serin, cystein, kyselina asparagová, asparagin, kyselina glutamová, glutamin, selenocystein, tyrosin a prolin. Syntéza asparaginu vzniká od oxalacetátu přes kyselinu asparagovou. Prekurzorem alaninu je pyruvát, tyrosinu fosfoenol pyruvát s erythrosou-4-P. Glutamin a prolin vznikají z oxoglutarátu přes kyselinu glutamovou. Pro glycin a cystein je přes serin prekurzorem 3- fosfoglycerát.

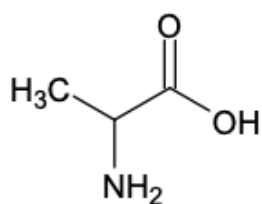
Glycin



Obrázek 2: Strukturální vzorec glycinu [21].

Glycin (Obrázek 17) je alifatická aminokyselina, která ve svém postranním řetězci neobsahuje žádný heteroatom a je bez chirálního centra. Nejvíce je zastoupen ve strukturálních proteinech, jakými jsou kolagen a želatina, kdežto ve většině albuminů se nevyskytuje vůbec. Je stálou složkou globulinů, důležitou složkou a prekurzorem mnoha makromolekul v buňkách. Působí jako inhibiční neurotransmitter v CNS, nutraceutikum. Je důležitý při tvorbě hormonů odpovědných za silný imunitní systém [15,19,27,39].

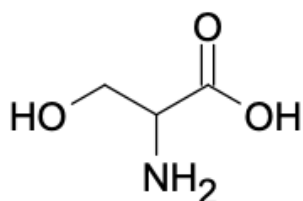
Alanin



Obrázek 18: Strukturální vzorec alaninu [21].

Alanin (Obrázek 18) je alifatická aminokyselina, která ve svém postranním řetězci neobsahuje žádný heteroatom. Je hojně zastoupen v kukuřičném zeinu a želatině. Je nezbytným zdrojem energie pro svaly a centrální nervový systém. Posiluje imunitní systém, pomáhá při metabolismu cukrů a organických kyselin, může napomáhat ke snížení cholesterolu. Využívá se v metabolických procesech a je součástí kyseliny panthotenové [15,19,27,40].

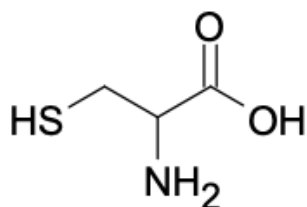
Serin



Obrázek 19: Strukturální vzorec serinu [21].

Serin (Obrázek 19) je neutrální aminokyselina, která ve svém řetězci obsahuje hydroxylovou skupinu. Je přítomen v mnoha bílkovinách, účastní se biosyntetických drah pyrimidinu, purinu, kreatinu a porfyrinu. Je důležitý pro produkci tělních proteinů, enzymů a svalové tkáně, pro metabolismus tuků a mastných kyselin a pomáhá při tvorbě protilátek. Může se použít jako přírodní zvlhčovač v kosmetických přípravcích [19,27,41].

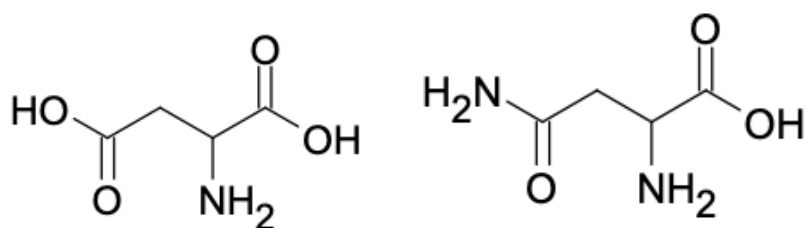
Cystein



Obrázek 20: Strukturální vzorec cysteinu [21].

Cystein (Obrázek 20) je sirárná nepolární aminokyselina, která ve svém postranním řetězci obsahuje thiolovou skupinu. Je součástí metabolických procesů, hlavně syntézy bílkovin, metabolismu koenzymu A, heparinu a biotinu. Nachází se hojně v beta-keratinu, hlavním proteinu nehtů, pokožky a vlasů, je důležitý při tvorbě kolagenu [15,19,27,42].

Asparagová kyselina a asparagin

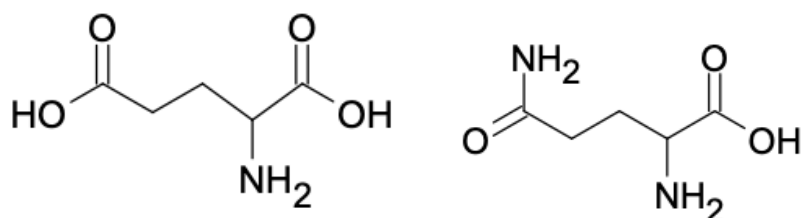


Obrázek 21: Strukturální vzorec kyseliny asparagové a asparaginu [21].

Kyselina asparagová (Obrázek 21) je kyselá aminokyselina, jejíž karboxylové skupiny postranních řetězců bývají při fyziologickém pH plně protonovány. Kyselina asparagová byla prvně získána hydrolyzou jejího amidu asparaginu. Ten lze nalézt v chřestu, v bobovitých rostlinách a v bílkovinách pšenice a kukuřice. Kyselina asparagová je zastoupena v globulinech a albuminech. Zúčastňuje se syntézy dalších aminokyselin, jako je asparagin, arginin, lysin, methionin, isoleucin a některých nukleotidů. Je přítomna v cyklu močoviny a kyseliny citrónové. Slouží jako neurotransmitter [15,19,27,43].

Asparagin (Obrázek 21) je neutrální aminokyselina, která ve svém postranním řetězci obsahuje amidovou skupinu. Je součástí biosyntézy glykoproteinů, působí jako diuretikum, podílí se na metabolické kontrole buněčných funkcí v nervové a mozkové tkáni [19,26,43].

Glutamová kyselina a glutamin

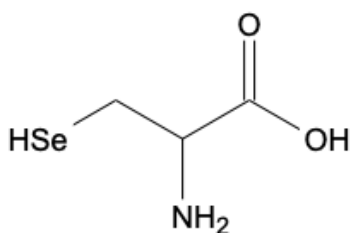


Obrázek 22: Strukturální vzorec kyseliny glutamové a glutaminu [21].

Kyselina glutamová (Obrázek 22) je kyselá aminokyselina, jejíž karboxylové skupiny postranních řetězců bývají při fyziologickém pH plně protonovány. Nachází se v bílkovinách rostlin, převážně pak v kvasinkách. Je nejvíce zastoupenou aminokyselinou v nervové tkáni. Je nejrozšířenějším neurotransmiterem v CNS a jedním ze stavebních kamenů při syntéze bílkovin. Přirozeně se vyskytuje v opticky aktivní L-formě, jako kyselina L-glutamová. Ta slouží jako nutraceutikum, mikroživina nebo metabolit *Escherichia coli* [15,19,27,45].

Glutamin (Obrázek 22) je neutrální aminokyselina, která ve svém postranním řetězci obsahuje amidovou skupinu. Je obsažen v embryích rostlin nebo bulvě řepy cukrové. Glutamin je důležitý pro metabolismus dusíku. Při přeměně kyseliny glutamové na glutamin se ke kyselině glutamové asimiluje skupina amoniaku, díky enzymu glutamin syntetáza. Tato reakce má vliv na regulaci toxických hladin amoniaku v těle. Glutamin je poté možno použít jako donor dusíku při biosyntéze sloučenin, jako jsou například aminokyseliny, puriny a pyrimidiny [15,19,27,46].

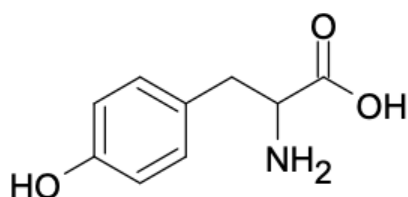
Selenocystein



Obrázek 23: Strukturální vzorec selenocysteinu [21].

Selenocystein (Obrázek 23) je považován za proteogenní aminokyselinu, která je analogem cysteinu. Síra v postranním řetězci cysteinu je nahrazena u selenocysteinu reaktivnějším stopovým prvkem selenem. Nachází se v aktivních centrech proteinů archaeí, bakterií a eukaryotů. Často bývá pouze jedna molekula selenocysteinu v peptidovém řetězci. Je součástí katalytického mechanismu selenoenzymů, jako je savčí glutathionperoxidáza [19,27,47].

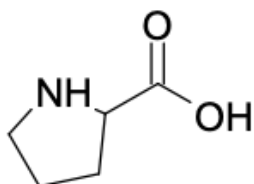
Tyrosin



Obrázek 24: Strukturální vzorec tyrosinu [21].

Tyrosin (Obrázek 24) je středně polární aromatická aminokyselina, která ve svém postranním řetězci obsahuje fenolový kruh. Ve většině bílkovin je obsažen spolu s fenylalaninem. Tyrosin je prekurzorem DOPA, noradrenalinu a adrenalinu. Slouží jako prekurzor k syntéze tyroxinu, melaninu a katecholaminů, je důležitý pro produkci tělních bílkovin, enzymů a svalové tkáně. Pozitivně působí na zlepšení paměti a depresí. Nedostatek se může projevit nízkým krevním tlakem nebo nízkou tělesnou teplotou [19,26,28,48].

Prolin



Obrázek 25: Strukturální vzorec prolinu [21].

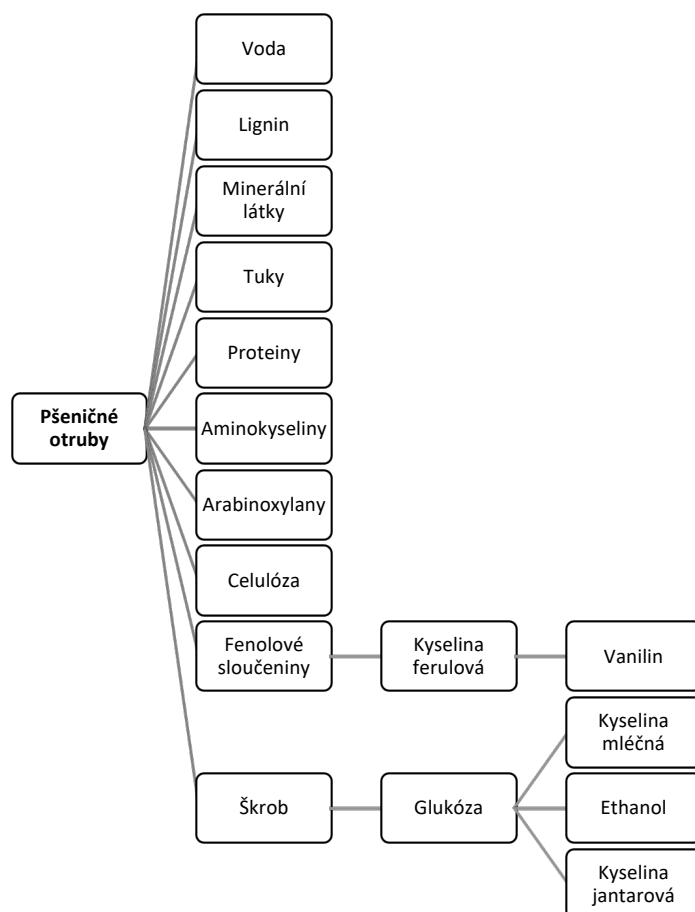
Prolin (Obrázek 25) je cyklická aminokyselina, která ve svém postranním řetězci obsahuje pyrrolidinový kruh. Jedná se o pětičlenný řetězec, který obsahuje α -uhlík i α -aminoskupinu. Často je také nazýván jako iminokyselina. Syntetizuje se z kyseliny glutamové, ve vyšších

koncentracích je obsažen v bílkovinách semen. V gliadinech pšeničného lepku se jej vyskytuje až 10 %. Tvoří jednu z hlavních složek kolagenu, je důležitý pro správnou funkci kloubů a šlach [19,27,49].

2.5 Biorafinace pšeničných otrub

Oproti jiným lignocelulózovým odpadům se pšeničné otruby vyznačují relativně vysokým obsahem bílkovin a nízkým obsahem ligninu. Na celém světě se ročně vyprodukuje až 120 milionů tun otrub [50]. Jsou vedlejším produktem při mletí pšeničného zrna na mouku. V současné době se převážně využívají jako složka krmných směsí.

V biorafinerii by bylo možné otruby rozdělit na frakce o vysoké čistotě, které jsou znázorněny na Obrázku 26. Tak by se mohly získat nové chemikálie sloužící jako prekurzory pro více polymerizované sloučeniny nebo by po případné separaci byly získány cenné látky o vysoké čistotě. V biorafinerii pšeničných otrub by bylo možné získat například frakce vody, ligninu, minerálních látek, tuků, proteinů, aminokyselin, arabinoxylanů, celulózy, fenolových sloučenin nebo škrobu. Například ekonomicky výhodná by byla produkce glukózy a její fermentace na kyselinu mléčnou, jantarovou nebo ethanol, extrakce proteinů a produkce esenciálních aminokyselin. Například extrakce kyseliny ferulové, která má potenciální komerční využití ve zdravotnictví, kosmetice a v potravinách jako antioxidační, antimikrobiální a protizánětlivé činidlo. Důležitá je také extrakce vanilinu z kyseliny ferulové, která se používá jako aromatizační přísada v potravinách a nápojích, vůně v parfémeh nebo k aromatizaci farmaceutik [51,52]. Otruby také obsahují proteiny (až 17,9 % obsahu v sušině), které je možné extrahovat a po následné hydrolyze jsou zdrojem aminokyselin.



Obrázek 26: Jednotlivé frakce získané v biorařiněním zpracováním pšeničných otrub[51].

2.6 Izolace proteinů z pšeničných otrub

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.4 Chemické složení pšeničných otrub, obsah proteinu v pšeničných otrubách činí 17,9 % obsahu sušiny. Jelikož jsou proteiny ve stravě často nedostatečně zastoupené, jejich vyhledáváním zdrojem se nejen pro sportovce stávají doplňky stravy. Pozitivně ovlivňují růst svalové hmoty, zvyšují výkon a úbytek hmotnosti při dietách s vysokým obsahem bílkovin a nízkým obsahem sacharidů. Stále častěji se tak uvažuje o extrakci proteinů právě z pšeničných otrub. Při extrakci proteinů rozlišujeme dva termíny, proteinový izolát (s minimálním obsahem proteinů v sušině 90 %) a proteinový koncentrát (s minimálním obsahem proteinů v sušině 65 %). Úprava pšeničných otrub na proteinové doplňky stravy nabízí výhodné zpracování jinak málo využívaného vedlejšího produktu po výrobě mouky [53,54].

Bílkoviny lze z otrub extrahovat různými způsoby, které jsou popsány dále v této kapitole.

2.6.1 Izolace proteinů degradací škrobu

Izolace proteinů degradací škrobu probíhá dle Tufail et al. [55]. Směs obilných otrub je suspendována ve fosfátovém pufru s laurylsulfátem sodným, merkaptoethanolem a azidem sodným. Ke směsi je přidána alkalická proteáza. Směs je míchána po dobu 2 hodin při 40 °C. Následuje centrifugace a promývání destilovanou vodou. Přidá se alfa-amyláza a směs je míchána hodinu při 95 °C a vysoušena pomocí ethanolu. Je ponechána přes noc v peci

při 40 °C a následně zlyofilizována. Touto metodou je možné získat koncentrát o čistotě okolo 78 % [55,56].

2.6.2 Izolace proteinů fermentací a alkalickou extrakcí

Je možné neodtučněné pšeničné otruby zpracovat dle Arte et al. [57] metodou, která kombinuje fermentaci a alkalickou extrakcí. Pšeničné otruby jsou ve směsi s vodou a startovací kulturou Florapan 4K (složenou ze dvou bakterií mléčného kvašení v kombinaci s aromatickým droždím) fermentovány po dobu 8 hodin při 35 °C. Vzniklý kal je dále extrahován pomocí NaOH při 4 °C přes noc. Poté následuje centrifugace extraktu a vysrážení supernatantu pomocí HCl. Protein je centrifugací oddělen, podroben dialýze a zlyofilizován. Touto metodou je možné získat koncentrát o čistotě okolo 81 % [57,58].

2.6.3 Izolace proteinů dle Osborna

Izolace proteinů dle Osborna probíhá dle Ju et al. [59], kde je aplikována na rýžové otruby. Odtučněné rýžové otruby jsou extrahovány třepáním s destilovanou vodou po dobu 4 hodin při 20 °C a následně centrifugovány při 3000 G po dobu 30 minut. Poté probíhá extrakce 5% NaCl 4 hodiny při 20 °C. Poté probíhá srážení pomocí NaOH na pH 11 po dobu 30 minut při 20 °C a 70 % ethanolem 4 hodiny při 20 °C. Obě extrakce se opakují dvakrát, aby došlo k úplnému odstranění proteinu, který je poté zlyofilizován. Touto metodou je možné získat koncentrát o čistotě okolo 78 % [59].

2.6.4 Extrakce metodou posunu pH

Extrakce metodou posunu pH probíhá dle Piotrowicz et al. [60]. Metoda byla určena k získání proteinových koncentrátů z odtučněných rýžových otrub. Jedná se o proteinovou solubilizaci (rozpuštění nerozpustné látky v kapalině pomocí vhodných detergentů) při alkalickém pH (pH 11, 1 M NaOH), následném srážení na izoelektrickém bodu proteinu (pH 4,5 -1 M HCl). Po solubilizaci byla suspenze centrifugována při 8670 G po dobu 20 minut při 20 °C. Byl odebrán vzniklý supernatant, který se vysrážel po úpravě pH na 4,5 a byl podroben centrifugaci při 8670 G po dobu 20 minut při 20 °C. Sraženina byla neutralizována vodou a 1 M NaOH a následně lyofilizována [60].

2.6.5 Lyofilizace

Jedná se o metodu určenou k vysušení (odvodnění) preparátu, získaného extrakcí, za vakua v zamrznutém stavu. Probíhá ve třech krocích: zmrazení, primární sušení a sekundární sušení. Po zmrazení vzorku použitím nízkých teplot v mrazáku (alespoň - 60 °C) se led obsažený uvnitř kapilár a pórů sublimuje do parní fáze pouze při teplotě a tlaku nižším, než odpovídají podmínkám trojnému bodu vody (teplota 0,01 °C a tlak 62,28 Pa), tomuto procesu se říká primární sušení. Při sekundárním sušení by mělo docházet k desorpci vázané vody nebo rozpouštědla, které bylo zmrazeno. Teplota se pohybuje nad bodem tuhnutí vody nebo rozpouštědla, ale zároveň pod teplotou skelného přechodu matrice. Jedná se o metodu finančně náročnou s pomalou rychlostí sušení a nízkou energetickou účinností ve srovnání s jinými sušicími metodami, jako je například sprejové sušení. Z tohoto důvodu se využívá výjimečně

k dehydrataci například farmaceutických produktů a bioproduktů. U potravinářských výrobků se proces lyofilizace používá jako měřítko pro srovnání kvality [61,62].

2.7 Hydrolýza proteinů

2.7.1 Kyselá hydrolýza

Kyselá hydrolýza je nejvíce používanou metodou pro hydrolýzu vzorku proteinu. Nejčastěji se pro kyselou hydrolýzu používá 6 M HCl. Ta je vhodná pro měření malých objemů vzorků, může být použita jak v kapalně, tak plynné fázi a následně může být odpařena. To jsou výhody hlavně pro získání hydrolyzátu v malém objemu pufru. Hydrolýza probíhá při teplotě 110 °C po dobu 24 hodin. Problémem u této metody je, že některé aminokyseliny se hydrolyzují na své kyselé formy, a tak se z glutaminu a asparaginu přeměňují na kyselinu glutamovou a kyselinu asparagovou. Tryptofan je během kyselé hydrolýzy úplně degradován, methionin a cystein jsou částečně degradovány. Pro přesnou kvantifikaci těchto aminokyselin je třeba vzorek před kyselou hydrolýzou oxidovat nebo použít ochranné činidlo NaOH se škrobem. Díky použité HCl mohou mít aminokyseliny tyrosin, serin a threonin nižší výtěžnost [66,67,68].

2.7.2 Kyselý mikrovlnný rozklad

Kyselý mikrovlnný rozklad je jednou z metod hydrolýzy proteinů na základní aminokyseliny. Aplikace mikrovlnného záření na vzorek může oproti jiným metodám zvýšit rychlost hydrolýzy proteinů. Je možné zkrátit dobu hydrolýzy z 24 hodin až na pár minut. Tato metoda se využívá zejména v potravinářském průmyslu nebo chemii bílkovin. Mikrovlny jsou elektromagnetické vlny o vlnové délce od 1 mm do 1 m a nachází se v oblasti mezi rádiovými a infračervenými oblastmi elektromagnetického spektra. Ve vodném médiu mohou vyvolat polarizaci nebo rotaci citlivé molekuly. Při hydrolýze proteinů pomocí mikrovln mohou citlivé aminokyseliny jako je serin, threonin nebo tyrosin degradovat, což může být způsobeno působením teploty nad 172 °C. Dalším problémem může být degradace aminokyselin nestabilních v kyselinách. Například tryptofan je degradován úplně, postranní řetězce asparaginu a glutaminu jsou hydrolyzovány, cystein a methionin jsou částečně degradovány a oxidovány [63,64,65].

2.7.3 Enzymatická hydrolýza

Enzymatická hydrolýza se používá jen zřídka. Její velkou výhodou je, že na rozdíl od kyselé hydrolýzy a kyselého mikrovlnného rozkladu umožňuje kvantifikaci asparaginu, glutaminu a dalších citlivých aminokyselin, které jinak podléhají částečné nebo úplné degradaci. Pro úplné simulované trávení je nutná inkubace s několika enzymy a reakce tak probíhá dlouhou dobu. Proto tato metoda není vhodná pro sériové analýzy. Pro enzymatickou hydrolýzu se nejčastěji používají enzymy pepsin a pankreatin [68,69].

2.8 Derivatizace aminokyselin

Derivatizace je metoda, která mění fyzikální a chemické vlastnosti analytů. To může sloužit například ke zvýšení citlivosti detekce, snížení meze detekce dané látky, transformaci hydrofilní látky na hydrofobní, zjišťování počtu funkčních skupin s aktivními vodíkovými

atomy, zlepšení detegovatelnosti, zlepšení stability analytů, umožnění chirální separace nebo změny matrice pro lepší separaci. Derivatizaci vzorku je možné použít před chromatografickou separací (předkolonová), na výstupu z chromatografické kolony (pokolonová), nebo přímo při separaci v chromatografické koloně. Předkolonová derivatizace se používá, když je pro analýzu důležitá volba reakčního prostředí a reakčního času. Její nevýhodou však je, že produkt derivatizace musí být jednoznačně definovaný a zbytek derivatizačního činidla nesmí interferovat při stanovení. Pokolonová derivatizace neumožňuje volbu reakčního času ani reakčního prostředí. Derivatizační činidlo v tomhle případě musí mít jiné vlastnosti než produkt derivatizace. Při derivatizaci přímo v chromatografické koloně dochází k okamžité tvorbě produktů derivatizace po styku s derivatizačním činidlem nacházejícím se v mobilní fázi v nízkých koncentracích. Nevýhodou je tvorba vedlejších reakcí, jako je eliminace přebytečného činidla po reakci, tvorba dimerů, nebo snaha o udržení stability produktů po rozkladu. Jako derivatizační činidlo pro UV detekci se nejčastěji používá chromofor. Je také možné použít fenylisothiokyanát (PITC), kyselinu anthranilovou, 9-fluorenylmethoxykarbonylové soli (FMOC), o-ftalaldehyd (OPA) a mnoho jiných. Za laboratorní teploty může docházet po použití PITC ke snížení stability derivátů a je nutné po reakci odpařit přebytečný PITC za použití sníženého tlaku. FMOC na rozdíl od PITC vykazují velmi dobrou stabilitu a reaktivitu, což prodlužuje reakční dobu a může docházet k tvorbě dimerů. Vhodné pro detekci pomocí UV jsou deriváty OPA, které reagují pouze s primární aminoskupinou [70,71,72].

2.9 Analýza proteinů a aminokyselin

2.9.1 Metody stanovení proteinů

Kjeldahlova metoda

Kjeldahlova metoda stanovuje celkový obsah dusíku ve vzorcích. Většina proteinů obsahuje 16 % dusíku, proto se procento přítomného proteinu vypočítá z obsahu dusíku pomocí faktoru 6,25 pro mléčné výrobky za předpokladu, že veškerý dusík v produktu je přítomen jako protein. Vzorek se za vysokých teplot po digesci v koncentrované kyselině sírové za přítomnosti síranu draselného a katalyzátoru převede na síran amonný. Po ochlazení a zředění roztoku se síran amonný přeměňuje na těkavý plynný amoniak zahříváním s hydroxidem sodným. Amoniak se destiluje párou do přebytku roztoku kyseliny borité. Tvoří se boritan amonný, jehož množství se stanoví titrací kyselinou chlorovodíkovou. Díky tomu se dá vypočítat obsah dusíku představujícího množství čistého proteinu ve vzorku [73,74].

Biuretová metoda

Peptidové vazby reagují za alkalických podmínek s měďnatými ionty za vzniku červeného komplexu, pojmenovaného podle sloučeniny biuretu ($\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$), který je modelem dvou peptidových vazeb a je schopen vázat měďnaté ionty tímto způsobem, jehož intenzita při 540 nm koreluje s obsahem bílkovin ve vzorku [20,74].

Lowryho metoda

Metoda odvozená od biuretové metody. Proteiny reagují s fenolovým činidlem za vzniku modrého komplexu při 750 nm. Intenzita barvy je úměrná obsahu bílkovin ve vzorku [74].

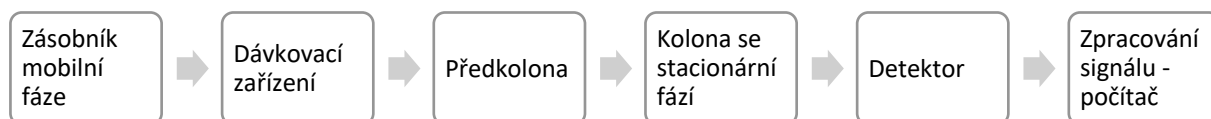
Metoda podle Bradforda

Při této metodě je využíváno nekovalentní vazby barviva Comassie Brilliant blue G250 na proteinové molekuly v kyselém prostředí. Barevná změna této reakce je úměrná množství proteinu ve vzorku [74].

Kromě výše uvedených metod je možné použít například ultrafialovou absorpční metodu při 280 nm, Dumas metodu, IR spektroskopii nebo imunologické metody. Volba vhodné metody závisí na vlastnostech proteinů obsažených ve vzorcích nebo na vlastnostech analytických metod [74].

2.9.2 Stanovení aminokyselinového profilu pomocí HPLC

HPLC neboli vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography) je separační metoda, která je vhodná pro analýzu složek vzorku unášených chromatografickou kolonou kapalnou mobilní fází. Kapalinový chromatograf je složen ze zásobníku mobilní fáze, dávkovacího zařízení, předkolony, kolony se stacionární fází, detektoru a počítače, který zpracovává signál. Blokové schéma chromatografu je znázorněno na Obrázku 27 [71,72,75].



Obrázek 27: Blokové schéma kapalinového chromatografu [71].

Zásobník mobilní fáze

Mobilní fáze tvořena čistým rozpouštědlem, nebo směsí nemísitelných rozpouštědel. Často jde o směsi různě polárních rozpouštědel. Její nejdůležitější vlastností je polarita neboli schopnost rozpouštědla podílet se na polárních interakcích, ovlivňovat rovnováhu mezi analytem a stacionární fází a tím i retenční vlastnosti analytu. Mobilní fáze není inertní, její složení je ovlivnitelné změnou složení rozpouštědel, pH nebo například iontovou silou. Při měření se používá gradient složení mobilní fáze, kdy se změní poměr směsi dávkované mobilní fáze. Dávkování mobilní fáze umožňují vysokotlaká čerpadla, která zajišťují konstantní, reprodukovatelný a bezpečný průtok [71,75].

Dávkovací zařízení

Dávkovat se musí vzorek, který je rozpustný v mobilní fázi a zároveň nesmí nijak reagovat s fází stacionární. Pro nástřik vzorku se používá dávkovací ventil se smyčkou, který nepřerušuje tok mobilní fáze mezi pumpou a kolonou. Dávkovače jsou dvoupolohové. V první poloze

se naplní vnitřní objem smyčky dávkovače vzorkem, po rychlém otočení smyčky do polohy dva se začne z pumpy vytlačovat vzorek uvnitř smyčky do kolony díky mobilní fázi [71,72,75,77].

Předkolona a kolona se stacionární fází

Při kapalinové chromatografii se využívají náplňové kolony tvořené ze skla nebo oceli. Jsou plněné adsorbentem nebo nosičem inertního materiálu, nejčastěji křemelinou. Délka kolon se pohybuje mezi 5 až 25 cm, průměr 4 až 8 mm a jsou vyplněny částicemi o průměru 3 až 10 μm . K ochraně kolon se využívají krátké kolony plněné stejnou stacionární fází, předkolony, které se nacházejí mezi dávkovacím zařízením a chromatografickou kolonou. Jsou dlouhé 1 až 3 cm. Používají se převážně při separaci složitých směsí látek, které se mohou sorbovat ireverzibilně a tím poničit kolonu [71,72,75].

Sběrač frakcí

Při měření vzorků na kapalinovém chromatografu je možné přidat sběrač frakcí. Zachytává eluát z chromatografické kolony do sběrných nádobek. Je možné sbírat frakce v pravidelných časových intervalech nebo odebírat frakce látek podle polohy jejich píků na chromatografu. Tímto procesem se získají větší objemy konkrétních čistých látek [72].

2.9.3 Iontově-výměnná chromatografie

Iontově-výměnná chromatografie je metoda určená k separaci látek, založená na principu vratné výměny iontů mezi roztokem a tuhou fází (ionexem). Afinita iontů k ionexu se zvyšuje s rostoucí velikostí náboje, závisí na objemu iontů a je ovlivnitelná složením mobilní fáze. Metoda je vhodná pro látky iontové povahy, silné elektrolyty (silné kyseliny, báze, soli), slabé elektrolyty (slabé kyseliny, báze, soli), které je třeba upravit disociací či protonizací. Dá se také využít pro separaci léčiv, k analýze aminokyselin, nukleových kyselin, iontů přechodných kovových prvků, lanthanoidů a aktinoidů [71,72,80].

Stacionární fáze

Stacionární fázi tvoří částice o průměru 10 μm , které mají na povrchu ionizované funkční skupiny (SO_3^- , COO^- , NH_3^+). Tyto skupiny elektrostaticky interagují s ionty v mobilní fázi i s ionty separovaného vzorku. Nejčastěji se používají organické polymery, které mají velkou kapacitu pro dávkované vzorky nebo materiály na bázi silikagelu, které jsou účinnější. Jsou vhodné i pro gradientovou eluci. Stacionární fázi je možné dělit na katexy a anexy [71,75].

Katex

Stacionární fáze používaná pro analýzu kationtů. Jejich funkční skupiny jsou kyselé, obsahují SO_3H^+ nebo COOH^+ skupiny. Katex se nazývá iontoměnič, pokud nese aktivní skupina záporný náboj a mohou být vyměňovány kationty z mobilní fáze. Při separaci na katexu eluční síla mobilní fáze roste, pokud pH mobilní fáze klesá [71,72,75,78,79].

Anex

Stacionární fáze používaná pro analýzu aniontů. Jejich funkční skupiny jsou zásadité, obsahují NH_3^+ skupinu. Anex se nazývá iontoměnič, pokud nese kladně nabitě funkční skupiny a mohou být vyměňovány anionty z mobilní fáze. Při separaci na anexu eluční síla mobilní fáze roste, pokud pH mobilní fáze také roste [71,72,75,78,79].

Mobilní fáze

Používají se tlumivé roztoky, jejichž ionty jsou v rovnováze s ionty měniče. To způsobuje, že s rostoucí koncentrací těchto iontů, jsou více zadržovány ionty měniče a tím rychleji probíhá eluce analytů z kolony. Jedná se o zředěné roztoky kyselin, zásad nebo pufrů. Eluční sílu mobilní fáze ovlivňuje hodnota pH a hodnota iontové síly [71].

2.9.4 Detekce aminokyselin

Fluorescenční detektor

Měří intenzitu fluorescenčního záření v průtokové kyvetě, emitovaného molekulami složek po jejich excitaci primárním zářením. Detekce je velice citlivá, není ovlivněna teplotními změnami a je vhodná pro gradientovou eluci. Používají se dva druhy záření s různou vlnovou délkou, excitační a emisní, což napomáhá k snížení detekce nežádoucích interferujících látek. Analyt je ozařován zářením o dané vlnové délce (excitující záření) a produkuje záření o vlnové délce větší než původní (emisní záření). Je vhodný převážně pro detekci látek obsahujících aromatická jádra, při sledování metabolitů léčiv, při analýze aminokyselin nebo složek nukleových kyselin [71,72,75].

UV-VIS detektor

UV-VIS detektor měří absorpenci v oblasti 190 až 780 nm. Vlnovou délku je možné měnit pomocí monochromátoru, který se nachází mezi zdrojem polychromatického záření a průtokovou kyvetou. Průtočná cela měří 10 mm a její objem je 5 až 10 μl . Detekuje látky absorbující UV-VIS záření, proto musí být použita vhodná mobilní fáze, která v této oblasti nebude absorbovat záření. Je vhodný pro měření s gradientovou elucí a pro měření, kde je nutné měnit teploty. Používají se dvoupaprskové spektrofotometry s průtokovou detekční celou, která musí mít dostatečně dlouhou optickou dráhu k získání potřebné citlivosti detekce [71,72,75].

2.9.5 Přehled vybraných metod stanovení aminokyselin pomocí HPLC

V minulosti bylo vyzkoušeno velké množství metod ke stanovení aminokyselin z proteinů. Průběh jednotlivých metod se často liší v použitém materiálu, vybraném způsobu hydrolyzy nebo možnostech stanovení. Zde je příklad několika z nich.

Dle článku Jajic et al. [76] s názvem Validace metody vysoce účinné kapalinové chromatografie pro analýzu aminokyselin v krmivu, byly obsahy aminokyselin stanovovány v kukuřici, sóji, sójové mouce a v jejich směsích obohacených o methionin, threonin a lysin. Nejprve byla aplikována kyselá hydrolyza vzorku, poté následovala derivatizace aminokyselin pomocí o-ftalldialdehydu a 9-fluorenylmethylchlorformiátu, separace na koloně ZORBAX Eclipse-AAA a detekce pomocí detektoru s diodovým polem. Metoda se prokázala

vysokou specifitou, vysokou přesností a opakovatelností. Postup se osvědčil pro stanovení složení primárních aminokyselin obsažených v proteinech krmných směsí [76].

Podle článku dle Liyanaarachchi et al. [81] s názvem Analýza celkových aminokyselin v rýži pomocí ověřené vysoce účinné kapalinové chromatografie s reverzní fází s detekcí diodového pole (RP-HPLC-DAD), se získaly vysoké výtěžky, až 17 aminokyselin z rýže. Nejprve byla aplikována kyselá hydrolyza vzorku, poté následovala derivatizace aminokyselin pomocí OPA, separace na koloně ZORBAX Eclipse-AAA za použití gradientové eluce a detekce pomocí detektoru s diodovým polem [81].

Další možností stanovení proteinů je podle článku Vanvi et al. [82] s názvem Proteiny z ovesných otrub trávené pepsinem: separace, antioxidační aktivita a identifikace nových peptidů enzymatická hydrolyza. Izolované proteiny byly štěpeny různými koncentracemi pepsinu různou inkubační dobou. Pro analýzu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a hmotnostním detektorem byla použita kolona Waters Prep XBridge BEH C18, k separaci byl použit lineární gradient. Obsah proteinu v hydrolyzátu byl stanoven pomocí modifikované Lowryho metody. Ve vzorcích byly identifikovány aminokyseliny tyrosin, cystein, methionin a arginin [82].

Podle článku Hsia et al. [83] B 17 Analýzy aminokyselin-HPLC (předkolonová derivatizace pomocí OPA) se stanovovaly primární aminokyseliny z proteinu izolovaného z rybího masa. Pro analýzu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s fluorescenčním detektorem byla použita kolona Zorbax ODS Eclipse-AAA, separace probíhala s gradientovou elucí po derivatizaci činidlem OPA. Stanoveny byly aminokyseliny: kyselina aspartamová, glutamová, serin, histidin, glycin, threonin, arginin, alanin, tyrosin, cystein, valin, methionin, fenylalanin, isoleucin, leucin a lysin [83].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiály a zařízení

3.1.1 Pomůcky

Běžné laboratorní sklo (Simax), automatické pipety (Thermo Scientific), plastové špičky, Büchnerova nálevka, filtrační papír (150 mm, Whatmann Schlackech a Schnele), plastové zkumavky se závitovým uzávěrem 50 ml, plastové centrifugační zkumavky 250 ml, skleněná tyčinka, lžička, injekční stříkačky Braun 10 ml, mikrostríkačka (Hamilton 100 μ l), stříkačkové filtry (Fisherbrand 0, 2 μ m, 25 mm), Erlenmeyerovy baňky, vialky, universální indikátorové papírky pro pH 0-12 (Lachema Brno).

3.1.2 Chemikálie

Demineralizovaná voda, destilovaná voda, hexan pro HPLC HiPerSolv CHROMANORM (Avantor Performance Materials Poland S. A.), NaOH perly p.a. (Lach-Ner, s. r. o., ČR), H₂SO₄ 96% (Analytika, spol. s r.o., ČR), HCl 36% Analpure (Analytika, spol. s r.o., ČR), L-Arginin Bio Ultra \geq 99,5% (SIGMA-ALDRICH, Co.), L-Glutamin Bio Ultra \geq 99,5% (SIGMA-ALDRICH, Co.), L-Leucin Bio Ultra \geq 99,5% (SIGMA-ALDRICH, Co.), Phthaldialdehyde ReagentSolution Complete (OPA) (SIGMA-ALDRICH, Co.), Amino Acid Standard (SIGMA-ALDRICH, Co.), Pancreatin from porcine pankreas (SIGMA-ALDRICH, Co.), Pepsin from porcine gastric mucosa (SIGMA-ALDRICH, Co.), dihydrát citranu sodného (Spolek pro chemickou a hutní výrobu), kyselina citronová (SIGMA-ALDRICH, Co.), acetonitril \geq 99,9 (CHROMASOLV, gradient grade pro HPLC- SIGMA-ALDRICH, Co.), Amberchrom 50WX8 (SIGMA-ALDRICH, Co.), acetát sodný (SIGMA-ALDRICH, Co.), methanol \geq 99,5 (CHROMASOLV, gradient grade pro HPLC- SIGMA-ALDRICH, Co.).

3.1.3 Použité přístroje

Třepačky (GFL 3006), automatické vyhřívané třepačky IKA KS 4000 i control, analytické váhy (KERN ABJ), předvážky (KERN 440-47 N), centrifuga vysokorychlostní chlazená (HERMLE), HPLC SCHIMADZU LC10A, mikrovlnný rozkladný systém MILESTONE 1200 mega EM-45/A, pH metr 3210 SET 2, vyhřívaná míchačka PHOENIX instrument RSM-05H, KJELDATHERM Gerhardt KT-L, lyofilizátor (LABNOCO, Freeze Dry systém/Freezone 4.5) s vakuovou pumpou (BIOTECH, RZ 6), termoblok, kolona ZORBAX Eclipse AAA Rapid Resolution 4, 6 x 150 mm-3, 5 Micron (Agilent BioHPLC column), automatický mlýnek.

3.1.4 Základní charakterizace pšeničných otrub

Byly použity pšeničné otruby od společnosti Mlýny J. Voženílek, spol. s r. o. z Předměřic nad Labem, Česká republika. Byly prodávány jako krmná surovina s deklarovaným jakostním znakem: hrubá vláknina 10 %. Otruby jsou určeny k přímému zkrmování, nebo pro výrobu krmných směsí. [77].

Tabulka 6: Základní charakterizace použitých pšeničných otrub [87].

Parametr	Jednotky	Výsledek
Sušina	% ve vzorku	86,00
Spalitelné látky	% v sušině	94,10
Škrob	% ve vzorku	11,90
Redukující sacharidy	% ve vzorku	4,73
Tuk celkový	% ve vzorku	4,94
Polynenasycené mastné kyseliny	% zastoupení v tuku	60,40
Mononenasycené mastné kyseliny	% zastoupení v tuku	22,60
Nasycené mastné kyseliny	% zastoupení v tuku	17,10
Proteiny	% ve vzorku	16,00
Dusík celkový	% ve vzorku	2,63
Na	% ve vzorku	0,009
Ca	% ve vzorku	0,075
K	% ve vzorku	1,27
Mg	% ve vzorku	0,45
P	% ve vzorku	1,37

Základní složení pšeničných otrub z Mlýnu Voženílek, jakožto vstupního materiálu, je uvedeno v Tabulce 6. Jedná se o data z průběžné výzkumné zprávy Q1/2021 TAČR TREND, která je shrnutím podstatných výsledků výzkumu a vývoje technologií pro chemické a biotechnologické zpracování pšeničných otrub. Na vzorku bylo provedeno stanovení sušiny metodou sušení v sušárně při 105 °C, stanovení spalitelných látek v muflové peci při 450 °C, stanovení celkového tuku pomocí metody dle Soxhleta, stanovení profilu mastných kyselin, stanovení celkového dusíku metodou dle Kjeldahla a následnou destilací za sníženého tlaku. Dále bylo provedeno stanovení hrubé vlákniny, stanovení škrobu, stanovení přímo redukujících

sacharidů a komplexní prvková analýza. Výsledky ukazují, že pšeničné otruby obsahují velké procento škrobu, dalších polysacharidů a redukujících sacharidů. To potvrzuje, že jsou vhodným materiálem k dalšímu zpracování. Obsahují také vysoké procento proteinů, což bylo podstatné pro tuto diplomovou práci [87].

3.2 Izolace a charakterizace proteinů z pšeničných otrub

Při izolaci a charakterizaci proteinů z pšeničných otrub se vycházelo z odborných článků zabývajících se podobnou problematikou. Metody a podmínky stanovení byly upraveny tak, aby vyhovovaly podmínkám laboratoře, způsobům stanovení a cílům měření.

3.2.1 Předúprava pšeničných otrub

Odtučnění otrub bylo realizováno dle postupu publikovaného Piotrowicz et al. [60]. Do varné baňky byly naváženy pšeničné otruby a byl přidán hexan v poměru 211 g pšeničných otrub: 900 ml hexanu. Celá směs byla po dobu 30 minut zahřívána na 45 °C za současného míchání na automatické míchače. Filtrací za sníženého tlaku pomocí Büchnerovy nálevky byly otruby zfiltrvány. Na Petriho misce byly sušeny dva dny za laboratorní teploty. Poté byly odtučněné otruby namlety na automatickém mlýnku na jemný prášek.

3.2.2 Extrakce proteinu

Do plastových centrifugačních zkumavek (12 kusů) byly naváženy odtučněné a namleté otruby, byla přidána demineralizovaná voda v poměru 10 g otrub: 150 ml demineralizované vody. Hodnota pH směsi byla upravena na pH 11 pomocí 1 M NaOH. Směs byla třepána 10 minut na třepáčkách. Poté byla znovu upravena hodnota pH na pH 11. Zkumavky byly dány na vyhřívání třepačky po dobu 2 hodin (100 rpm; 60 °C). Po uplynulé době se suspenze centrifugovala (20 minut, 8670 G, laboratorní teplota). Byl odebrán supernatant, jehož pH bylo upraveno na pH 5 pomocí 1 M H₂SO₄. Vzorek byl třepán 30 minut a umístěn přes noc do lednice. Supernatant byl rozlít do centrifugačních zkumavek a centrifugován (20 minut, 8670 G, laboratorní teplota). Následně byl supernatant slit a sediment odebrán do zkumavky se závitovým uzávěrem.

3.2.3 Lyofilizace proteinového extraktu

Vzniklý sediment po extrakci proteinu byl zmrazen přes noc na - 80 °C v mrazícím boxu. Následná lyofilizace probíhala po dobu 72 hodin při teplotě - 50 °C a tlaku $133 \cdot 10^{-3}$ mbar.

3.3 Ověření stability aminokyselin během hydrolýzy

V rámci stabilitních testů byly testovány tři postupy: kyselý mikrovlnný rozklad, kyselá hydrolýza za použití termobloku a kyselá hydrolýza pomocí mineralizačního přístroje.

3.3.1 Ověření stability aminokyselin během mikrovlnného rozkladu

Postup kyselého mikrovlnného rozkladu byl inspirován dle článku Kabaha et al. [64], kde byly nastaveny podmínky hydrolýzy 1200 W; 2,45 GHz, 150 °C, 30 minut. Do rozkladných nádob byly naváženy vzorky argininu a leucinu, vždy po 0,1 g. Ke vzorkům bylo přidáno 5 ml 6 M HCl. Kvůli možnostem rozkladného mikrovlnného systému MILESTONE

1200 mega EM-45/A byly nastaveny podmínky rozkladu ve třech krocích po 10 minutách: 1. 250 W, 2. 400 W, 3. 500 W. Jako poslední byl nastaven krok chlazení na 5 minut.

3.3.2 Ověření stability aminokyselin během kyselé hydrolýzy

Kyselá hydrolýza byla paralelně provedena pomocí dvou přístrojů – termobloku a mineralizačního přístroje KJELDATHERM Gerhardt KT-L. Vycházelo se z článku Pascaud et al. [67], kde byla podobná metoda aplikována na stanovení aminokyselin, převážně tryptofanu v proteinech. Vzorek byl zakoncentrován p-merkaptethanolem, který chránil protein před degradací. V článku autoři získali aminokyselinový profil z proteinu a porovnali ho se standardy aminokyselin.

Do zkumavek se závitovým uzávěrem byly naváženy vzorky argininu a leucinu, vždy po 0,0012 g. Ke vzorkům byly přidány 4 ml 6 M HCl. Na termobloku byly nastaveny podmínky hydrolýzy (110 °C, 24 hodin). Byla provedena analýza podle podmínek nastavených v kapitole 3.6.

Kyselá hydrolýza pomocí mineralizačního přístroje byla prováděna ve skleněných trubicích, do kterých byly naváženy vzorky leucinu a argininu, vždy po 0,2 g. Ke vzorkům bylo přidáno 10 ml 6 M HCl. Na mineralizačním přístroji byly nastaveny podmínky hydrolýzy (110 °C, 24 hodin, 30 minut chlazení). Po hydrolýze byly vzorky neutralizovány (6M NaOH), zředěny na vstupní koncentraci 200 mg/l a byla provedena analýza podle podmínek nastavených v kapitole 3.6.

3.4 Hydrolýza proteinového izolátu

3.4.1 Kyselá hydrolýza proteinu

Kyselá hydrolýza pomocí mineralizačního přístroje byla prováděna ve skleněných trubicích, do kterých byly naváženy tři vzorky proteinového izolátu, vždy po 0,2 g. Ke vzorkům bylo přidáno 10 ml 6 M HCl. Na mineralizačním přístroji byly nastaveny podmínky hydrolýzy (110 °C, 24 hodin, 30 minut chlazení). Po hydrolýze byly vzorky neutralizovány (6M NaOH), zředěny na vstupní koncentraci 200 mg/l a byla provedena analýza podle podmínek nastavených v kapitole 3.6.

3.4.2 Enzymatická hydrolýza proteinu

Enzymatická hydrolýza proteinu byla provedena dle článku Kong et al. [69], přičemž byly použity enzymy pepsin a pankreatin.

0,5 g proteinového izolátu bylo suspendováno v 10 ml destilované vody, pH bylo upraveno na hodnotu vhodnou pro působení daného enzymu (pepsin pH 2, 6M HCl; pankreatin pH 8, 1M NaOH). Takto připravená suspenze byla pomocí vyhřívané magnetické míchačky promíchávána (30 minut; 35 °C). Poté byl k suspenzi přidán 1 ml roztoku pepsinu (0,005 g pepsinu v 10 ml demineralizované vody) nebo pankreatinu (0,005 g pankreatinu v 10 ml demineralizované vody). Roztoky byly míchány při 35 °C (pepsin 24 hodin, pankreatin 6 hodin).

Enzymatická hydrolyza daného proteinu byla provedena také působením kombinace pepsinu a pankreatinu. Po 30 minutách hydrolyzy bylo pomocí roztoku pepsinu pH suspenze upraveno na 8,5 1M NaOH a byl přidán roztok pankreatinu. Roztok byl míchán 6 hodin při 35 °C.

Po skončení reakcí bylo upraveno pH ve všech kádinkách na hodnotu 7 (1M NaOH, 6M HCl). Roztoky byly převedeny do centrifugačních zkumavek se závitovým uzávěrem a byly umístěny do vodní lázně (95 °C, 10 minut). Následně proběhla centrifugace (20 minut, 8670 G, pokojová teplota). Vzorky byly zředěny na vhodnou koncentraci a byla provedena analýza podle podmínek nastavených v kapitole 3.6.

3.5 Izolace a separace volných aminokyselin z hydrolyzátu

Cílem práce bylo izolovat z roztoku aminokyseliny arginin a leucin. V rámci vývoje postupu byla optimalizovaná hmotnost použitého adsorbentu a doba působení na adsorbent. Dále bylo třeba separovat aminokyseliny pomocí změny pH citrátového pufru. Hodnoty použitého pH byly nejprve ověřeny na roztoku směsi standardů daných aminokyselin.

3.5.1 Optimalizace navážky adsorbentu

Bylo připraveno 250 ml citrátové pufru (dihydrát citranu sodného 276 mg, kyselina citronová 1,741 g) o pH 2,8 (1M kyselina citronová). Do 100 ml baňky bylo naváženo 0,3 g argininu a objem byl doplněn po rysku připraveným citrátovým pufrem.

Do Erlenmeyerovo baněk bylo naváženo různé množství adsorbentu (0,1 g; 0,15 g; 0,25 g; 0,5 g a 0,8 g), ke kterému bylo přidáno 25 ml směsi citrátového pufru s argininem. Vše bylo mícháno na míchače (2 hodiny, laboratorní teplota). Vzorky byly zředěny na výchozí koncentraci 0,075 mg/l a byla provedena analýza podle podmínek nastavených v kapitole 3.6.

3.5.2 Optimalizace času adsorpce

Bylo připraveno 250 ml citrátové pufru (dihydrát citranu sodného 276 mg, kyselina citronová 1,741 g) o pH 2,8 (1M kyselina citronová). Do 100 ml baňky bylo naváženo 0,3 g argininu a objem byl doplněn po rysku připraveným citrátovým pufrem.

Do Erlenmeyerovo baněk bylo naváženo 0,1 g adsorbentu, ke kterému bylo přidáno 25 ml směsi citrátového pufru s argininem. Vše bylo mícháno různě dlouhou dobu na vyhřívané míchače (15 minut, 30 minut, 60 minut, laboratorní teplota). Vzorky byly zředěny na výchozí koncentraci 0,075 mg/l a byla provedena analýza podle podmínek nastavených v kapitole 3.6.

3.5.2.1 Optimalizovaný postup adsorpce aminokyselin

Bylo připraveno 250 ml citrátového pufru (dihydrát citranu sodného 276 mg, kyselina citronová 1,741 g) o pH 2,8 (1M kyselina citronová). Do 100 ml baňky byla navážena směs argininu a leucinu (vždy po 0,02 g). Objem byl doplněn po rysku připraveným citrátovým pufrem.

Do Erlenmeyerovo baněk bylo naváženo 0,1 g adsorbentu, ke kterému bylo přidáno 25 ml směsi citrátového pufru s aminokyselinami. Vše bylo mícháno různě dlouhou dobu na vyhřívané míchače (15 minut, 30 minut, 60 minut, laboratorní teplota). Byla provedena analýza podle podmínek nastavených v kapitole 3.6.

3.5.3 Izolace a frakcionace aminokyselin na základě změny pH citrátového pufru

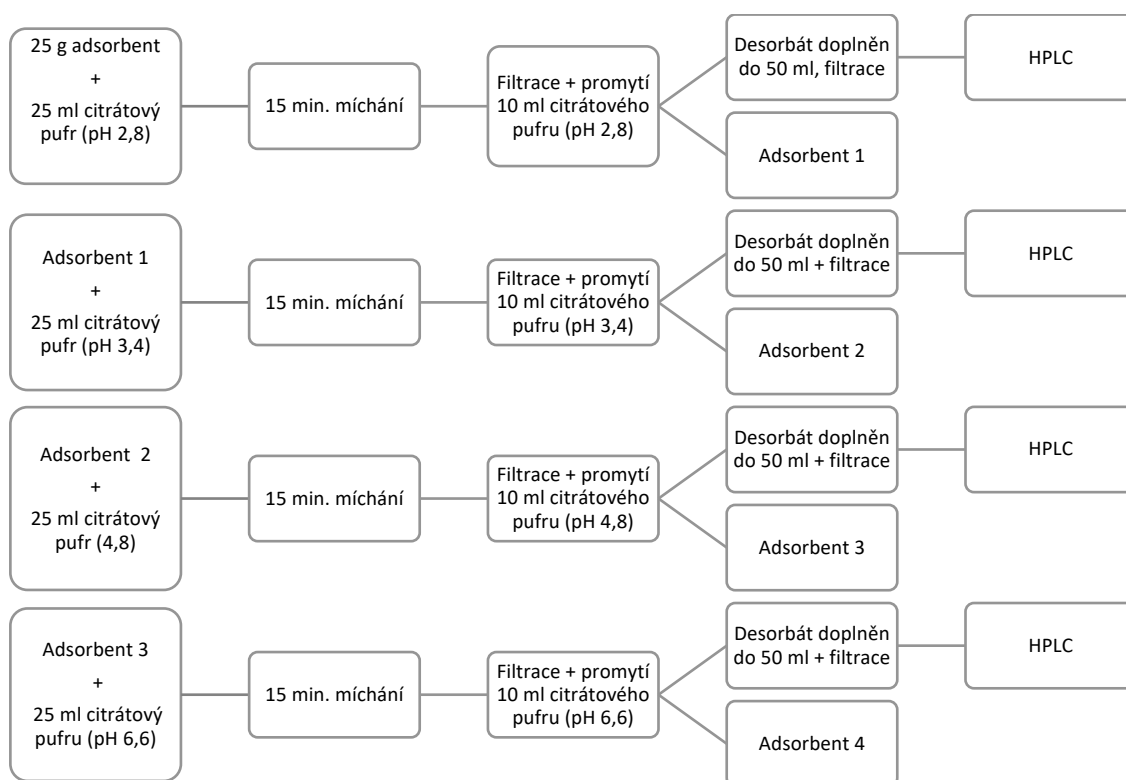
Izolace a frakcionace aminokyselin z modelové směsi na základě změny pH citrátového pufru

Bylo připraveno 250 ml citrátového pufru o pH 2,8 (dihydrát citranu sodného 276 mg, kyselina citronová 1,741 g; 1M kyselina citronová), o pH 3,4 (dihydrát citranu sodného 0,94 g, kyselina citronová 2,69 g; 1M kyselina citronová), o pH 4,8 (dihydrát citranu sodného 3,18 g, kyselina citronová 1,93 g; 1M kyselina citronová) a o pH 6,6 (dihydrát citranu sodného 21,88 g, kyselina citronová 1,18 g; 1M kyselina citronová). Do 50 ml baňky byly naváženy standardy argininu a leucinu (vždy po 0,01 g) a objem byl doplněn po rysku připraveným citrátovým pufrům o pH 2,8.

Do Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 0,25 g adsorbentu, ke kterému bylo přidáno 25 ml směsi citrátového pufru o pH 2,8 se standardy aminokyselin. Desorpce probíhala 15 minut. Po ukončení byl adsorbent oddělen (po promytí 10 ml daného pufru) z roztoku filtrací. Desorbát byl poté převeden do odměrné baňky o objemu 50 ml a doplněn po rysku demineralizovanou vodou. Následně byl filtrován přes stříkačkový filtr a byla provedena analýza podle podmínek nastavených v kapitole 3.6.

K adsorbentu bylo přidáno 25 ml citrátového pufru o pH 3,4. Desorpce probíhala 15 minut. Po ukončení byl adsorbent oddělen (po promytí 10 ml daného pufru) z roztoku filtrací. Desorbát byl převeden do odměrné baňky o objemu 50 ml a doplněn po rysku demineralizovanou vodou. Následně byl filtrován přes stříkačkový filtr a byla provedena analýza podle podmínek nastavených v kapitole 3.6.

Následně byl stejný postup, který byl proveden s roztokem citrátového pufru o pH 2,8 a 3,4 opakován i s pufrům o pH 4,8 a 6,6. Podrobný popis postupu je znázorněn na Obrázku 28.



Obrázek 28: Detailní postup izolace a frakcionace aminokyselin na základě změny pH citrátového pufru

Izolace a frakcionace aminokyselin ze vzorku na základě změny pH citrátového pufru

Bylo připraveno 250 ml citrátového pufru o pH 2,8 (dihydrát citranu sodného 276 mg, kyselina citronová 1,741 g; 1M kyselina citronová), o pH 3,4 (dihydrát citranu sodného 0,94 g, kyselina citronová 2,69 g; 1M kyselina citronová) a o pH 4,8 (dihydrát citranu sodného 3,18 g, kyselina citronová 1,93 g; 1M kyselina citronová).

Vzorek proteinového izolátu hydrolyzovaný pomocí mineralizačního přístroje, byl neutralizován (6M NaOH), doplněn po rysku v 25 ml baňce. Byly odebrány 2 ml do 25 ml baňky a obsah byl doplněn po rysku citrátovým pufrem pH 2,8.

Do Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 0,25 g adsorbentu, ke kterému bylo přidáno 25 ml směsi citrátového pufru o pH 2,8 se vzorkem. Desorpce probíhala 15 minut. Po ukončení byl adsorbent oddělen (po promytí 10 ml daného pufru) z roztoku filtrací. Desorbát byl poté převeden do odměrné baňky o objemu 50 ml a doplněn po rysku demineralizovanou vodou. Následně byl filtrován přes stříkačkový filtr a byla provedena analýza podle podmínek nastavených v kapitole 3.6.

K adsorbentu bylo přidáno 25 ml citrátového pufru o pH 3,4. Desorpce probíhala 15 minut. Po ukončení byl adsorbent oddělen (po promytí 10 ml daného pufru) z roztoku filtrací. Desorbát byl převeden do odměrné baňky o objemu 50 ml a doplněn po rysku demineralizovanou vodou. Následně byl filtrován přes stříkačkový filtr a byla provedena analýza podle podmínek nastavených v kapitole 3.6.

Následně byl stejný postup, který byl proveden s roztokem citrátového pufru o pH 2,8 a 3,4 opakován i s pufrem o pH 4,8.

3.6 Analýza aminokyselin pomocí HPLC

Vhodné složení mobilní fáze a nastavený gradient vycházel z článku dle Hsia et al. [83]. Mobilní fáze ze zásobní lahve A byla složena z 40 mM CH₃COONa. Mobilní fáze B byla složena z látek ACN: MetOH: H₂O (45: 45: 10). Separace probíhala pomocí gradientové eluce mobilní fáze dle Tabulky 7. Vzorky byly derivatizovány OPA (1:1). Měření probíhalo za laboratorní teploty s průtokem mobilní fáze 1 ml/min. Detekce probíhala na UV detektoru při vlnové délce 338 nm, 60 minut.

Tabulka 7: Složení mobilní fáze při měření s gradientovou elucí.

Čas [min.]	Průtok [ml/min.]	A%	B%
0.00	1.0	80	20
10	1.0	80	20
20	1.0	50	50
30	1.0	40	60
35	1.0	20	80
40	1.0	0	100
45	1.0	80	20
60	1.0	80	20

3.6.1 Kalibrační křivka a směsi standardů aminokyselin

Pro měření kalibrační křivky byly připraveny tři roztoky směsi aminokyselin o různých koncentracích (60 mg/l, 80 mg/l a 160 mg/l). Do 25 ml baňky byla navážena směs argininu a leucinu (vždy po 0,02 g) a doplněna po rysku 0,1 M HCl. Vzorky byly derivatizovány pomocí OPA (1: 1) po dobu 1 minuty, byla provedena analýza pomocí HPLC. Výsledky byly vyhodnoceny v programu Excel.

Následně byly proměřeny standardy jednotlivých aminokyselin. Do 25 ml baňky bylo naváženo 0,02 g vybrané aminokyseliny (arginin nebo leucin), doplněno po rysku 0,1 M HCl. Vstupní koncentrace aminokyselin byla 25 mg/l. Byla provedena analýza podle podmínek nastavených v kapitole 3.6. Stejným způsobem byl připraven a změřen směsný aminokyselinový standard.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Izolace a charakterizace proteinového izolátu z pšeničných otrub

Na základě postupu popsaného v kapitole 3.2. Izolace a charakterizace proteinů z pšeničných otrub se podařilo izolovat protein s výtěžností 7,6 g proteinového izolátu ze 120 g odtučněných otrub, což činí 6,3 %. V Tabulce 8 je uveden obsah bílkovin a profil aminokyselin v získaném lyofilizátu pšeničných otrub. Celkové množství proteinů bylo 84,65 g ve 100 g lyofilizátu.

Tabulka 8: Obsah proteinů a profil aminokyselin izolovaného materiálu [85].

Údaje na 100 g	Proteinový lyofilizát z otrub [g]	Údaje na 100 g	Proteinový lyofilizát z otrub [g]
Bílkoviny	84,65	Ala	4,78
Asp	5,62	Cys	0,11
Thr	0,62	Val	4,67
Ser	0,11	Met	0,56
Glu	17,20	Ile	2,33
Pro	4,31	Leu	6,91
Gly	5,02	Tyr	1,22
Phe	2,90	Arg	22,57
His	1,91	Trp	-
Lys	3,82	-	-

Výsledky byly porovnány se složením syrovátkového (živočišného původu) [98] a sójového proteinu (rostlinného původu) [97]. Jedná se o hlavní dietární proteiny volně dostupné na trhu. Celkový obsah bílkovin v lyofilizátu pšeničných otrub byl 84,65 g ve 100 g lyofilizátu, což je srovnatelné s obsahem bílkovin v sójovém (90,00 g na 100 g lyofilizátu) a syrovátkovém (78,00 g na 100 g lyofilizátu) proteinu. Dále bylo popsáno pět aminokyselin, jejichž obsah přesahoval 5,00 g na 100 g lyofilizátu a byly porovnány s jejich obsahy v syrovátkovém a sójovém proteinu.

Nejvíce zastoupenou semiesenciální aminokyselinou proteinového izolátu otrub byl arginin, jehož obsah byl 22,57 g na 100 g lyofilizátu. Množství bylo významně vyšší, než u syrovátkového (2 g na 100 g lyofilizátu) a sójového (7,80 g na 100 g lyofilizátu) proteinu.

Arginin stimuluje vyplavení růstového hormonu do krevního oběhu. Je zdrojem oxidu dusíku, který slouží jako přenašeč vzruchů neboli neurotransmitter. Arginin napomáhá také při erektilní dysfunkci, zlepšuje imunitu a kladně působí i při oběhovém onemocnění a senilní demenci. Mimo jiné snižuje hladinu krevního cukru, zlepšuje zásobování mozku a srdce kyslíkem, napomáhá k detoxikaci organismu a odvádění amoniaku pryč z těla. Kvůli lepšímu prokrvení a okysličení svalů, a tím i zvýšenému přísunu živin, je často užíván sportovci [15,19,27,28,92,97,98].

Na druhém místě byla v proteinovém izolátu zastoupená neesenciální kyselina glutamová, jejíž obsah činil 17,20 g na 100 g lyofilizátu. Její obsah byl srovnatelný s obsahem v syrovátkovém (15,90 g na 100 g lyofilizátu) a sójovém (19,90 g na 100 g lyofilizátu) proteinu. Je nejrozšířenějším neurotransmitterem v CNS a jedním ze stavebních kamenů při syntéze bílkovin. Přirozeně se vyskytuje v opticky aktivní L-formě, jako kyselina L-glutamová. Ta slouží jako nutraceutikum, mikroživina nebo metabolit *Escherichia coli* [15,19,27,45,97,98].

Třetí nejzastoupenější tentokrát esenciální aminokyselinou je leucin, jehož obsah byl 6,91 g na 100 g lyofilizátu. Jeho obsah se příliš nelišil od obsahu v syrovátkovém (8,18 g na 100 g lyofilizátu) nebo sójovém (7,60 g na 100 g lyofilizátu) proteinu. Leucin napomáhá ke snížení krevního cukru, ke zlepšení stavu kostí, svalů a kůže. Také urychluje regeneraci po chirurgických zákrocích a může tak pomoci zabránit rozpadu svalových bílkovin, ke kterému někdy dochází po traumatu nebo silném stresu. Spolu s valinem a isoleucinem tvoří tzv. BCAA. Zmíněné aminokyseliny nejsou zachyceny v játrech, ale postupují až ke svalům či mozku, tím zvyšují svalovou hmotu, napomáhají regulovat množství tuku a glukózy v krvi. V potravinářství se využívá jako přídatná látka E641 k zvýraznění chuti a vůně [15,19,27,28,31,93,97,98].

Obsah kyseliny asparagové v proteinovém izolátu činil 5,62 g na 100 g lyofilizátu. Jeho obsah byl znatelně nižší než u sójového (11,80 g na 100 g lyofilizátu) i syrovátkového (7,60 g na 100 g lyofilizátu) proteinu. Jedná se o neesenciální aminokyselinu. Zúčastňuje se syntézy dalších aminokyselin, jako je asparagin, arginin, lysin, methionin, isoleucin a některých nukleotidů [15,19,27,43,97,98].

Glycin je v porovnání s ostatními proteiny nejvíce zastoupen právě v proteinovém izolátu pšeničných otrub a to 5,02 g na 100 g lyofilizátu. V sójovém proteinu je jeho obsah 4,10 g na 100 g lyofilizátu, kdežto v syrovátkovém proteinu jeho obsah činí pouze 1,59 g na 100 g lyofilizátu. Je stálou složkou globulinů, důležitou složkou a prekurzorem mnoha makromolekul v buňkách. Působí jako inhibiční neurotransmitter v CNS, nutraceutikum. Je důležitý při tvorbě hormonů odpovědných za silný imunitní systém [15,19,27,39,97,98].

Z hlediska složení proteinového izolátu byly další experimenty, v této diplomové práci, zaměřeny na separaci dvou aminokyselin, argininu a leucinu.

4.2 Ověření stability aminokyselin v průběhu hydrolýzy

Hydrolýza proteinů představuje nezbytný krok pro izolaci čistých aminokyselin. Neenzymatické postupy štěpení proteinů jsou ve většině případů založeny na proteolýze při zvýšené teplotě a tlaku v prostředí silných minerálních kyselin. Weiss a kol [86] ve svém výzkumu poukázali na teplotní nestabilitu některých aminokyselin. Bylo tedy třeba laboratorně

ověřit, v jaké míře dochází k rozkladu aminokyselin během testovaných způsobů hydrolyzy. Stabilitní experimenty byly prováděny pomocí čistého standardu aminokyselin dle postupu popsaného v kapitole 3.3. Míra dekompozice byla posuzována srovnáním s referenčním standardem.

Tabulka 9: Výsledky stabilitních experimentů na standardy aminokyselin.

Hydrolyza	Aminokyselina	Výchozí koncentrace [mg/l]	Koncentrace po hydrolyze [mg/l]
Mikrovlnný rozklad	arginin	11,00	<DL
	leucin	15,00	<DL
Kyselá hydrolyza za použití termobloku	arginin	0,17	0,0078
	leucin	0,23	<DL
Kyselá hydrolyza pomocí mineralizačního přístroje	arginin	0,40	0,31
	leucin	0,40	0,34

Jak je znázorněno v Tabulce 9, po hydrolyze mikrovlnným rozkladem, jehož postup je popsán v kapitole 3.3.1, nebylo možné získat vzorek a dále ho analyzovat. Došlo k úplné karbonizaci materiálu, proto tato metoda hydrolyzy nebyla dále používána pro další experimenty.

Druhou testovanou variantou byla kyselá hydrolyza na termobloku. Stabilitní test byl proveden podle postupu uvedeného v experimentální části v kapitole 3.3.2. Během hydrolyzy došlo k poklesu výchozí koncentrace argininu z 0,17 µg/l na koncentraci 0,0078 µg/l. Během hydrolyzy tak bylo rozloženo více jak 95 % analytu. Míra degradace leucinu byla ještě vyšší, kdy v hydrolyzátu nebylo možné aminokyselinu detekovat. Podobně jako v případě mikrovlnného rozkladu byla tato metodika vyřazena z dalšího vývoje technologie pro izolaci volných aminokyselin z proteinového izolátu otrub. Z hlediska vysoké míry degradace argininu a leucinu nebyl tento postup dále rozvíjen.

Stanovení stability argininu a leucinu během kyselé hydrolyzy pomocí mineralizačního přístroje, bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.2. Tato technika umožnila hydrolyzovat vzorky ve větších objemech a ověřila vliv teploty a prostředí na stabilitu aminokyselin. Metoda se ukázala z hlediska degradace aminokyselin jako nejšetrnější. Standardy aminokyselin nepodléhaly výrazné degradaci. U argininu došlo k poklesu oproti původní koncentraci o 22,5 %. Leucin byl za použití této metody ještě stabilnější, došlo k poklesu pouze o 15 % oproti původní koncentraci. Podobných výsledků dosáhli také v práci Weiss a kol [86], která se zabývala tepelným rozkladem vybraných aminokyselin. V této studii začínal arginin degradovat až při 220 °C. Tento postup hydrolyzy byl také aplikován v článku

Tsugita et al. [88], kde zkoumali stabilitu aminokyselin za použití směsi koncentrované kyseliny chlorovodíkové a kyseliny trifluoroctové při teplotě 166 °C po dobu 25 minut, aby tak byl urychlen proces hydrolyzy. Tyto podmínky byly považovány za ekvivalentní k běžným podmínkám kyselé hydrolyzy (6 M HCl při 110 °C po dobu 24 hodin). V článku bylo zjištěno, že aminokyseliny zůstávají po použití kyselé hydrolyzy stabilní.

Z výsledků této diplomové práce vyplývá, že teplota hydrolyzy může negativně ovlivnit výtěžnost volných aminokyselin.

4.3 Hydrolyza proteinového izolátu z pšeničných otrub

Proteinový izolát z pšeničných otrub byl hydrolyzovaný pomocí kyselé hydrolyzy v mineralizačním zařízení a třech různých enzymatických postupů. Experiment probíhal podle postupů popsanych v kapitolách 3.4.1 a 3.4.2. Základním ukazatelem účinnosti hydrolyzních postupů je výtěžnost aminokyselin vztažena na 1 g proteinového izolátu. V hydrolyzáttech byly kvantifikovány dvě majoritní aminokyseliny: arginin a leucin. Výtěžnosti hydrolyzních postupů jsou prezentované v Tabulce 10.

Tabulka 10: Výtěžnost aminokyselin z hydrolyzátu proteinového izolátu.

Hydrolyza	Enzym	Aminokyselina	Teoretická výtěžnost hydrolyzy [mg/g]	Výtěžnost hydrolyzy [mg/g]	Procentuální výtěžnost hydrolyzy [%]
Enzymatická hydrolyza	Pepsin	arginin	225,7	0,98 ± 0,049	0,43
		leucin	69,1	0,01 ± 0,0005	0,014
	Pankreatin	arginin	225,7	1,04 ± 0,052	0,46
		leucin	69,1	0,01 ± 0,0005	0,014
	Pepsin a pankreatin	arginin	225,7	0,32 ± 0,016	0,14
		leucin	69,1	0,44 ± 0,022	0,64
Kyselé hydrolyza pomocí mineralizačního přístroje		arginin	225,7	26,80 ± 1,340	11,90
		leucin	69,1	61,70 ± 3,085	89,30

Z výsledků vyplývá, že enzymatickou hydrolyzou nedocházelo k efektivní proteolýze. Z 1 g proteinového izolátu bylo získáno po působení pankreatinu nejvyšší množství argininu 1,04 ± 0,052 mg. Testované enzymatické hydrolyzy vykazovaly velice nízkou efektivitu uvolnění volných aminokyselin do roztoku. Nejedná se tedy o perspektivní řešení pro další měření.

Výrazně vyšší výtěžnost aminokyselin byla dosažena při kyselé hydrolyze pomocí mineralizačního přístroje. Z 1 g proteinového izolátu bylo získáno až 26,8 ± 1,34 mg argininu

a $61,7 \pm 3,085$ mg leucinu. Při porovnání s teoreticky dosažitelným množstvím byla efektivita na úrovni 11,9 % pro arginin a 89,3 % pro leucin.

Mustatea et al. [91] vypracoval literární přehled zabývající se kyselými hydrolyzami proteinů. Zaměřil se převážně na dlouhodobé působení hydrolyzy, nízké výtěžky a nestabilitu aminokyselin v průběhu hydrolyzy. Bylo zjištěno, že zatím neexistuje žádný konkrétní postup, při kterém by byl protein zhydrolyzovaný na 100 %. Studie uvádí, že například aminokyseliny leucin a arginin, mohou být kvantitativně stanoveny během kyselé hydrolyzy, bez jejich zásadní přeměny nebo degradace. Naopak glutamin může během reakce částečně přecházet na kyselinu glutamovou a tím se snižuje jeho výtěžnost.

Wong et al. [94] se ve své práci zabýval stanovením tryptofanu jako redukováného derivátu kyselou hydrolyzou a následným stanovením kapalinovou chromatografií. Vzorky byly nejprve podrobeny redukcí v ledem chlazené koncentrované HCl se dvěma přídávky pyridinboranu. Po deseti minutách byl roztok zředěn vodou a hydrolyzován při teplotě 110 °C po dobu 22 hodin. Vzorky byly separovány na adsorbentu Dionex D-500, derivatizovány činidlem OPA a analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Výsledky byly porovnány s literaturou a bylo zjištěno, že výtěžky této metody jsou srovnatelné. Autor uvádí jako možný důvod odlišností tvorbu derivátů a pravděpodobnou dehydrataci aminokyseliny při nízkém pH. Z jednoho gramu proteinu podrobenému redukcí autor získal 60 mg tryptofanu, což se dá považovat za nepatrnou ztrátu, oproti 65 mg tryptofanu uváděného v literatuře.

Marino et al. [95] testoval rychlou metodu hydrolyzy proteinů v mléce s cílem analyzovat aminokyselinový profil. Hydrolyza byla provedena dvěma postupy: použitím 6 M HCl při 160 °C po dobu 60 minut nebo použitím 4 M kyseliny methansulfonové při 160 °C po dobu 45 minut. Následovala derivatizace pomocí OPA, separace aminokyselin pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenčním detektorem a kolonou Zorbax Eclipse AAA. Podle statistických údajů tato metoda nevedla ke zvýšení výtěžnosti jednotlivých aminokyselin ve srovnání s referenční metodou. Z 1 g proteinu bylo získáno za použití kyseliny chlorovodíkové 36,29 mg argininu a 98,20 mg leucinu. Z 1 g proteinu bylo získáno za použití kyseliny methansulfonové 38,48 mg argininu a 95,02 mg leucinu.

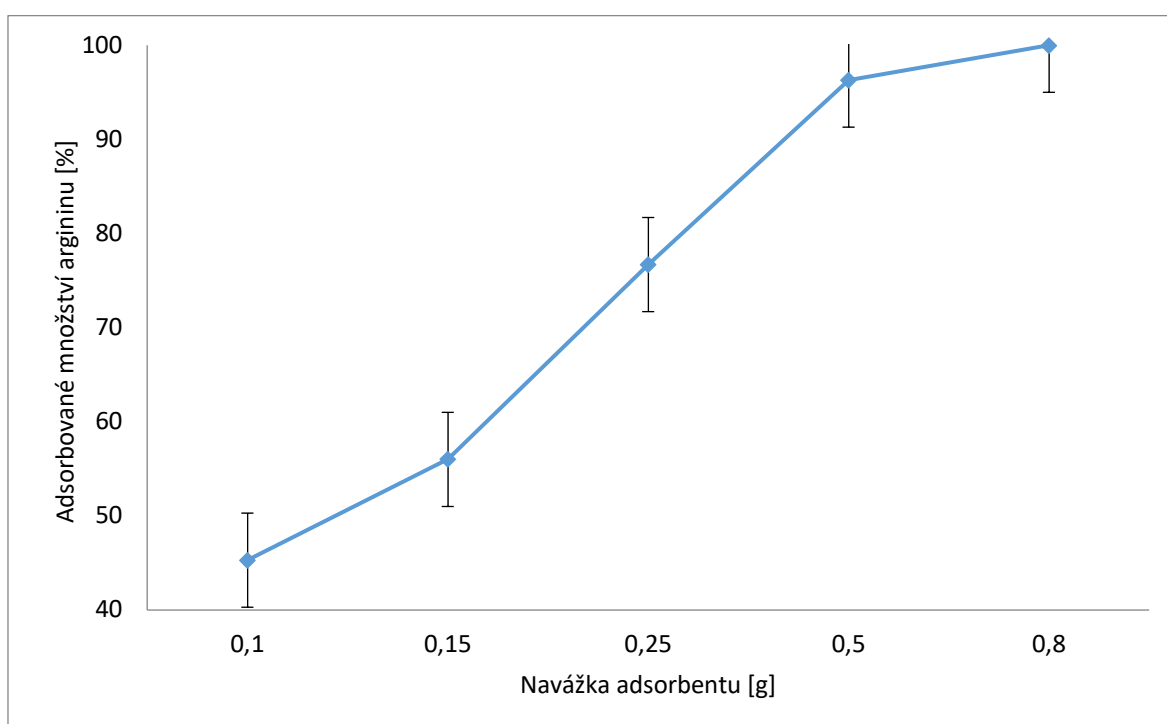
4.4 Izolace volných aminokyselin z hydrolyzátu pšeničných otrub

Hydrolyzát proteinového izolátu představuje komplexní směs různých typů látek. Majoritní část tvoří volné aminokyseliny. Přítomné jsou však i další složky, jako jsou oligopeptidy, polypeptidy, sacharidy, polysacharidy a minerální látky. Jednou z možností, jak izolovat volné aminokyseliny je jejich adsorpce z roztoku na vhodném typu adsorbentu. Pro účely této diplomové práce byl zvolen polymerní iontoměnič Amberchrom 50WX8, jehož matrice je složena ze styren-divinylbenzenu a polymeru o velikosti částic 50-100 μm . Objem pórů je 0,7 ml/g. Jedná se o silně kyselou katexovou pryskyřici pro jemné chemické a farmaceutické separace. Výměna iontů probíhá mezi pevným adsorbentem a sorpčním roztokem pomocí sulfonové skupiny, která je ukotvena na pevném adsorbentu. Stopové prvky z roztoku jsou adsorbovány na povrch pevného adsorbentu pomocí Van der Waalsových sil. Analyt se zachycuje na záporně nabitých funkčních skupinách pevného adsorbentu. Negativně nabitý analyt se zachycuje na kladně nabitých funkčních skupinách adsorbentu. Celý proces je založen na vysokoenergetické coulombické interakci adsorbentu s analytem [96].

Před aplikací metody na reálný vzorek (hydrolyzát) byla nejprve provedena optimalizace podmínek adsorpce na standardech aminokyselin. Byla optimalizovaná navážka adsorbentu a kontaktní čas adsorbentu a adsorbátu. Optimalizační experimenty probíhaly dle postupu popsaném v kapitolách 3.5.1 a 3.5.2.

4.4.1 Optimalizace navážky adsorbentu a času adsorpce

V rámci stanovení adsorpční kapacity byly porovnány různé navážky adsorbentu dle postupu uvedeného v kapitole 3.5.1. Optimalizace byla provedena na standardu argininu o definované koncentraci. Z Obrázku 29 vyplývá, že úplná eliminace argininu z modelového roztoku o koncentraci 3 g/l bylo dosaženo při navážce 0,8 g a čase 120 minut. Efektivní adsorpce v modelovém roztoku argininu byla dosažena i při navážce 0,5 g adsorbentu na 25 ml roztoku o koncentraci 3 g/l argininu ($96,3 \pm 4,815 \%$).



Obrázek 29: Závislost navážky adsorbentu [g] na adsorbovaném množství argininu [%].

Hydrolyzát proteinového izolátu z otrub obsahoval významně nižší koncentrace volných aminokyselin než modelový roztok. Z hlediska úspory adsorbentu byla pro další experimenty zvolena nižší navážka a to 0,25 g.

V rámci optimalizačních experimentů byly také testovány různé časy kontaktu adsorbentu s adsorbátem a to 15 min., 30 min. a 60 min. Nejkratší testovaný čas 15 minut se z hlediska adsorpce argininu zásadně neodlišoval od časů delších. Adsorpce po dobu 15 minut byla aplikována i na modelovou směs standardů argininu a leucinu. Arginin byl adsorbován z 92 % a leucin z 93,8 %. Optimalizace byla provedena i na směsi aminokyselin argininu a leucinu, kde se potvrdila analýza předchozího měření. Arginin byl adsorbován z 92 % a leucin z 93,8 %. Proto byla zvolena jako optimální doba analýzy 15 minut.

4.4.2 Desorpce aminokyselin z adsorbentu v modelovém systému

Po adsorpci aminokyselin dle optimalizovaného postupu v kapitole 3.5.2.1 byla testována metodika desorpce. Uvolnění volných aminokyselin navázaných na adsorbentu z modelového roztoku argininu a leucinu o výchozí koncentraci 200 mg/l (v 50 ml odpovídá 5 mg argininu a leucinu), byla realizována dle postupu uvedeného v kapitole 3.5.3. Experiment byl inspirován článkem Blanch et al. [90]. K uvolnění aminokyselin argininu a leucinu z polymerního iontoměniče Amberchrom 50WX8 byly použity tři desorpční citrátové pufrů o pH 3,4; 4,8 a 6,6. Byly získány tři frakce viz Tabulka 11.

Tabulka 11: Množství desorbovaných aminokyselin z původní koncentrace obsažené ve vzorku.

Frakce	Aminokyselina	Výchozí hmotnost aminokyselin [mg]	Desorbované množství aminokyselin [mg]	Efektivita desorpce [%]
1 - pH 3,4	arginin	5	0,0365	0,7
	leucin	5	0,9280	18,6
2 - pH 4,8	arginin	5	0,3340	6,7
	leucin	5	0,2450	4,9
3 - pH 6,6	arginin	5	0,1690	3,4
	leucin	5	0,0250	0,5

První frakce byla eluát z adsorbentu při pH 3,4, obsahující 18 % leucinu a pouze 0,7 % argininu. Při druhé desorpci aminokyseliny z adsorbentu při pH 4,8 obsahoval eluát 4,9 % leucinu a 6,7 % argininu. Nedocházelo k dostatečnému oddělení aminokyselin, proto se dá tato frakce považovat za směsnou. Ve třetí frakci při pH 6,6 byl zastoupen arginin 3,4 %, leucin byl v této frakci pouze v minoritním množství 0,5 %.

4.4.3 Aplikace postupu izolace na hydrolyzát z pšeničných otrub

Stejný postup desorpce jako v kapitole 4.4.2. byl aplikován podle postupu uvedeném v kapitole 3.5.3 na hydrolyzát proteinového izolátu, který obsahoval 0,43 mg argininu a 0,99 mg leucinu. Pomocí adsorpce a následné desorpce byly získány dvě frakce.

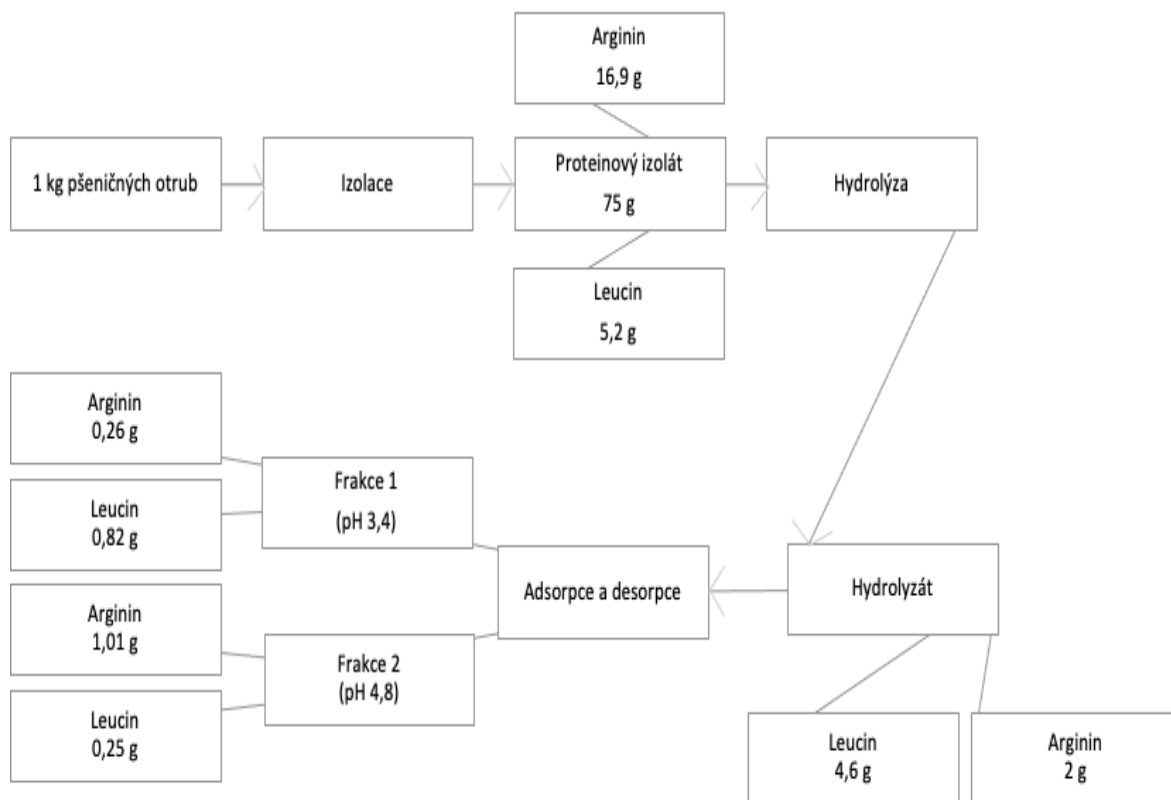
Tabulka 12: Množství získaných aminokyselin ze vzorku pšeničných otrub

Frakce	Aminokyselina	Výchozí hmotnost aminokyselin [mg]	Desorbované množství aminokyselin [mg]	Efektivita desorpce [%]	Výtěžnost aminokyselin na 1 g izolátu [mg]
1 - pH 3,4	arginin	0,43	0,055	12,80	3,43
	leucin	0,99	0,176	17,83	11,00
2 - pH 4,8	arginin	0,43	0,216	50,47	13,50
	leucin	0,99	0,057	5,83	3,44

Analýza probíhala při pH 3,4 a 4,8. Byly získány hmotnosti uvedené v Tabulce 12. V první frakci při pH 3,4 bylo z 1 g proteinového hydrolyzátu získáno 3,43 mg argininu a 11 mg leucinu. Ve druhé frakci při pH 4,8 bylo z proteinového hydrolyzátu získáno 15,5 mg argininu a 4,05 mg leucinu. Celkově bylo získáno separací 1 gramu pšeničných otrub 16,93 mg argininu a 14,44 mg leucinu.

4.4.4 Hmotnostní bilance navržené technologie pro izolaci volných aminokyselin z pšeničných otrub

Na základě všech provedených analýz byla provedena hmotnostní bilance znázorněna na Obrázku 30. Z 1 kilogramu pšeničných otrub byl izolací získán proteinový izolát o hmotnosti 75 g. V proteinovém izolátu bylo obsaženo 16,9 g argininu a 5,2 g leucinu. Byla provedena kyselá hydrolyza pomocí mineralizačního přístroje, kterým byl získán hydrolyzát s obsahem 2 g argininu a 4,6 g leucinu. Po adsorpci a desorpci hydrolyzátu byly získány dvě frakce. Z jednoho kilogramu pšeničných otrub bylo v první frakci při pH 3,4 získáno 0,26 g argininu a 0,82 g leucinu. Ve druhé frakci při pH 4,8 bylo získáno 1,01 g argininu a 0,25 g leucinu.



Obrázek 30: Schéma hmotnostní bilance navržené technologie.

5 ZÁVĚR

Cílem práce bylo navrhnout a otestovat postup pro izolaci volných aminokyselin z proteinového izolátu z pšeničných otrub. V rámci vývoje byl vyizolován proteinový extrakt z otrub, který sloužil jako výchozí materiál. Bílkoviny tohoto extraktu mají specifický aminokyselinový profil. Dominantní aminokyselinou je arginin a ve vysoké koncentraci je přítomen i leucin. Právě na izolaci těchto dvou látek byl celý proces optimalizován.

Za účelem uvolnění volných aminokyselin z izolátu byly testovány různé způsoby hydrolýzy. Jako dostatečně efektivní a relativně jednoduchý postup byl pro sérii experimentů zvolen postup kyselé hydrolýzy pomocí mineralizačního přístroje za daných podmínek: 6 M HCl, 110 °C, 24 hodin, 30 minut chlazení, neutralizací (6 M NaOH). Následovala derivatizace činidlem OPA a analýza pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Zvoleným postupem bylo z 1 g proteinového izolátu získáno až $26,8 \pm 1,34$ mg argininu a $61,7 \pm 3,085$ mg leucinu. Při porovnání s teoreticky dosažitelným množstvím byla efektivita na úrovni 11,9 % pro arginin a 89,3 % pro leucin. Takto získaný hydrolyzát byl velmi složitý roztok, ze kterého bylo potřeba vyizolovat dané aminokyseliny. Jako vhodnou metodou se ukázala adsorpce aminokyselin na adsorbent Amberchrom 50WX8.

Nejprve byla potřeba provést optimalizaci procesu adsorpce a desorpce, který byl poté aplikován na reálný vzorek. Optimalizací podmínek měření bylo zjištěno, že nejvhodnější navážkou adsorbentu je 0,25 g a doba působení analytu na vzorek 15 minut.

Byl získány jednotlivé frakce aminokyselin. V první frakci při pH 3,4 bylo z 1 g proteinového hydrolyzátu získáno 3,43 mg argininu a 11 mg leucinu. Ve druhé frakci při pH 4,8 bylo z proteinového hydrolyzátu získáno 15,5 mg argininu a 4,05 mg leucinu. Celkově bylo získáno separací 1 gramu pšeničných otrub 16,93 mg argininu a 14,44 mg leucinu.

Z jednoho kilogramu pšeničných otrub bylo v první frakci při pH 3,4 získáno 0,26 g argininu a 0,82 g leucinu. Ve druhé frakci při pH 4,8 bylo získáno 1,01 g argininu a 0,25 g leucinu.

V diplomové práci nebylo dosaženo 100% frakcionace, kdy by jedna frakce obsahovala pouze arginin a druhá frakce pouze leucin. Řešením tohoto problému by mohla být optimalizace hodnoty použitého pH citrátového pufru, modifikování iontové síly nebo optimalizace doby desorpce.

Do budoucna by bylo potřeba se zaměřit na čistotu získaných aminokyselin a na podrobnou charakterizaci jednotlivých frakcí, nejen získaných aminokyselin. Mohl by být vyvíjen i postup dehydratace vzniklého roztoku.

Takto vyrobené volné aminokyseliny v práškové formě, by mohly najít uplatnění jako čisté standardy pro analytickou praxi, při přípravě doplňků stravy vhodných i pro lidi s intolerancí na laktózu, alergií na mléčnou bílkovinu, vegany i vegetariány.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] GUAN, Weixiang, Chi-Wing TSANG, Carol LIN, Christophe LEN, Haoquan HU a Changhai LIANG. *A review on high catalytic efficiency of solid acid catalysts for lignin valorization* [online]. *Bioresource Technology*. 2020, 298. [cit. 2021-03-24] DOI: 10.1016/j.biortech.2019.122432. ISSN 09608524. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852419316621>
- [2] ABDESHAHIAN, P., Ascencio, J.J., Philippini, R.R. et al. *Valorization of Lignocellulosic Biomass and Agri-food Processing Wastes for Production of Glucan Polymer. Waste Biomass Valor*, [online], 2020. [cit. 2021-03-24] DOI: 10.1007/s12649-020-01267-z. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01267-z>
- [3] CARLOS Escudero-Oñate, Núria Fiol, Jordi Poch and Isabel Villaescusa. *Valorisation of Lignocellulosic Biomass Wastes for the Removal of Metal Ions from Aqueous Streams: A Review*, [online], 2017. [cit. 2021-03-24] DOI: 10.5772/65958. Dostupné také z: <https://www.intechopen.com/books/biomass-volume-estimation-and-valorization-for-energy/valorisation-of-lignocellulosic-biomass-wastes-for-the-removal-of-metal-ions-from-aqueous-streams-a->
- [4] MORÁN, Dani. *Biorefinery models-Lignocellulosic biorefinery* [online], 2016. [cit. 2021-7-17]. Dostupné také z: <https://biorrefineria.blogspot.com/2016/04/biorefinery-models-lignocellulosic.html>
- [5] SLUKOVÁ, Marcela. *Výroba potravin a nutriční hodnota*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-947-1.
- [6] GABROVSKÁ, Dana, Ilona HÁLOVÁ, Diana CHRPOVÁ, et al. *Obiloviny v lidské výživě*. Praha: Potravinářská komora České republiky, Česká technologická platforma pro potraviny, 2015. Publikace České technologické platformy pro potraviny. ISBN-978-80-87250-28-0.
- [7] KADLEC, Pavel, Karel MELZUCH a Michal VOLDŘICH. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2012. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-145-0.
- [8] BENDA, Vladimír, Ivan BABŮREK a Josef ŽDÁRSKÝ. *Biologie II: Nauka o potravinářských surovinách*. Vyd. 3., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2000. ISBN 80-708-0402-5.
- [9] ZIMOLKA, Josef. *Pšenice: pěstování, hodnocení a užití zrna*. Praha: Profi Press, c2005. ISBN 80-867-2609-6.
- [10] HENDRYCH, Radovan. *Systém a evoluce vyšších rostlin*. 2. vydání. Praha: Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1986. ISBN 14-144-86.
- [11] BAYER, Aug. *Velký ilustrovaný přírodopis všech tří říší: III. Botanika speciální*. Praha: Ústřední nakladatelství a knihkupectví učitelstva československého, 1916. ISBN Publikace 204.

- [12] GRAU, Jürke. *Trávy: lipnicovité, šachorovité, sítinovité a rostliny podobné travám Evropy*. Praha: Knižní klub, 1998. Průvodce přírodou (Knižní klub). ISBN 80-720-2260-1.
- [13] ALONSO, E. *The role of supercritical fluids in the fractionation pretreatments of a wheat bran-based biorefinery*, [online]. The Journal of Supercritical Fluids. 2018, 133, 603-614. [cit. 2021-03-25]. DOI: 10.1016/j.supflu.2017.09.010. ISSN 08968446. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.09.010>
- [14] DOSTÁL, Josef. *Květena ČSR: a ilustrovaný klíč k určení všech cévnatých rostlin na území Československa planě rostoucích nebo běžně pěstovaných*. Praha: Československá botanická společnost, Přírodovědecké nakladatelství, 1950.
- [15] NOVÁČEK, František. *Fytochemické základy botaniky*. Olomouc: Univerzita Palackého, 1986. ISBN 978-80-7336-457-1.
- [16] Slovník anatomie rostlin. *Anatomie rostlin*, [online]. [cit. 2021-04-10]. Dostupné také z: <http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/anatomie/slovník/slovník.htm#pryt>
- [17] DE BONDT, Yamina, Wisse HERMANS, Paula MOLDENAERS a Christophe M. COURTIN. *Selective modification of wheat bran affects its impact on gluten-starch dough rheology, microstructure and bread volume*, [online]. Food Hydrocolloids. 2021, 113. [cit. 2021-04-10] DOI: 10.1016/j.foodhyd.2020.106348. ISSN 0268005X. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106348>
- [18] ALONSO, E. *The role of supercritical fluids in the fractionation pretreatments of a wheat bran-based biorefinery*, [online]. The Journal of Supercritical Fluids. 2018, 133, 603-614. [cit. 2021-04-10] DOI: 10.1016/j.supflu.2017.09.010. ISSN 08968446. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.09.010>
- [19] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [20] KODÍČEK, Milan, Olga VALENTOVÁ a Radovan HYNEK. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015. ISBN 978-80-7080-927-3.
- [21] ACD/Labs, *ACD/ChemSketch for Academic and Personal Use*, [online]. [cit. 2021-05-02]. Dostupné také z: <https://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/>
- [22] ROYE, C.; Bulckaen, K.; De Bondt, Y.; Liberloo, I.; Van De Walle, D.; Dewettinck, K.; Courtin, C. *Side-by-side comparison of composition and structural properties of wheat, rye, oat, and maize bran and their impact on in vitro fermentability*, [online]. Cereal Chem. J. 2020. [cit. 2021-05-02]. DOI: 10.1002/cche.10213. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1002/cche.10213>
- [23] FIGUEIREDO, Patrícia, Kalle LINTINEN, Jouni HIRVONEN, Mauri KOSTIAINEN a Hélder SANTOS. *Properties and chemical modifications of lignin: Towards lignin-based nanomaterials for biomedical applications*, [online]. Progress in Materials

- Science. 2018, **93**, 233-269. [cit. 2021-05-02]. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2017.12.001. ISSN 00796425. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079642517301421>
- [24] BREESE JONES, D. a C.E.F. GERSDORFF. *Proteins of wheat bran. II. Distribution of nitrogen, percentages of amino acids and of free amino nitrogen: A comparison of the bran proteins with the corresponding proteins of wheat endosperm and embryo*, [online]. Journal of the Franklin Institute. 1925, **200**(3). [cit. 2021-05-02]. DOI: 10.1016/S0016-0032(25)90810-1. ISSN 00160032. Dostupné také z: [https://doi.org/10.1016/S0016-0032\(25\)90810-1](https://doi.org/10.1016/S0016-0032(25)90810-1)
- [25] BALANDRÁN-QUINTANA, René Renato, Jorge Nemesio MERCADO-RUIZ a Ana María MENDOZA-WILSON. *Wheat Bran Proteins: A Review of Their Uses and Potential*, [online]. Food Reviews International. 2015, **31**(3), 279-293. [cit. 2021-05-02]. DOI: 10.1080/87559129.2015.1015137. ISSN 8755-9129. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1080/87559129.2015.1015137>
- [26] LOPEZ MJ, Mohiuddin SS. *Biochemistry, Essential Amino Acids*, [online]. 2021 Mar 26. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021. [cit. 2021-05-02]. PMID: 32496725. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557845/>
- [27] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [28] FOŘT, Petr. *Zdraví a potravní doplňky: encyklopedie potravních doplňků pro racionální výživu a péči o zdraví: podrobný popis, při jakých potížích je používat, hodnocení účinnosti, doporučené denní dávky: vitaminy, minerální látky, beta-glukany, aminokyseliny, mozkové nutrienty, byliny, speciality jako řasy, chrupavky, propolis, ovosan*. V Praze: Ikar, 2005. ISBN 80-249-0612-0.
- [29] QIU, Jun, Jinhao WANG, Zhongqi XU, Huiqing LIU, Jie REN a Maxim ANTOPOLSKY. *Quantitation of underivatized branched-chain amino acids in sport nutritional supplements by capillary electrophoresis with direct or indirect UV absorbance detection*, [online]. PLOS ONE. 2017, **12**(6). [cit. 2021-05-02]. DOI: 10.1371/journal.pone.0179892 ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179892>
- [30] PubChem, National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Summary for CID 6287, Valine*, [online]. 2024. [cit. 2021-05-26]. Dostupné také z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Valine>.
- [31] PubChem, National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Summary for CID 6106, Leucine*, [online]. 2024. [cit. 2021-05-26]. Dostupné také z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Leucine>.
- [32] PubChem, National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Summary for CID 6306, l-Isoleucine*, [online]. 2024. [cit. 2021-05-26]. Dostupné také z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/l-Isoleucine>.

- [33] PubChem, National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Summary for CID 6288, L-Threonine*, [online]. 2024. [cit. 2021-05-26]. Dostupné také z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-Threonine>.
- [34] PubChem, National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Summary for CID 6137, Methionine*, [online]. 2024. [cit. 2021-05-26]. Dostupné také z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methionine>.
- [35] PubChem, National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Summary for CID 5962, Lysine*, [online]. 2024. [cit. 2021-05-26]. Dostupné také z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lysine>.
- [36] PubChem, National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Summary for CID 6140, Phenylalanine*, [online]. 2024. [cit. 2021-05-26]. Dostupné také z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenylalanine>.
- [37] PubChem, National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Summary for CID 6305, Tryptophan*, [online]. 2024. [cit. 2021-05-27]. Dostupné také z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tryptophan>.
- [38] PubChem, National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Summary for CID 6274, Histidine*, [online]. 2024. [cit. 2021-05-27]. Dostupné také z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Histidine>.
- [39] PubChem, National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Summary for CID 750, Glycine*, [online]. 2024. [cit. 2021-05-27]. Dostupné také z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glycine>.
- [40] PubChem, National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Summary for CID 602, DL-Alanine*, [online]. 2024. [cit. 2021-05-27]. Dostupné také z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/DL-Alanine>.
- [41] PubChem, National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Summary for CID 5951, Serine*, [online]. 2024. [cit. 2021-05-27]. Dostupné také z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Serine>.
- [42] PubChem, National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Summary for CID 5862, L-Cysteine* [online]. 2024. [cit. 2021-05-27]. Dostupné také z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-Cysteine>.
- [43] PubChem, National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Summary for CID 5960, Aspartic acid*, [online]. 2024. [cit. 2021-05-27]. Dostupné také z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aspartic-acid>.
- [44] PubChem, National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Summary for CID 6267, Asparagine*, [online]. 2024. [cit. 2021-05-27]. Dostupné také z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Asparagine>.
- [45] PubChem, National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Summary for CID 33032, Glutamic acid*, [online]. 2024. [cit. 2021-05-28]. Dostupné také z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glutamic-acid>.

- [46] PubChem, National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Summary for CID 5961, Glutamine*, [online]. 2024. [cit. 2021-05-28]. Dostupné také z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glutamine>.
- [47] PubChem, National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Summary for CID 6326983, Selenocysteine*, [online]. 2024. [cit. 2021-05-28]. Dostupné také z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Selenocysteine>.
- [48] PubChem, National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Summary for CID 6057, Tyrosine*, [online]. 2024. [cit. 2021-05-28]. Dostupné také z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tyrosine>.
- [49] PubChem, National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Summary for CID 145742, Proline*, [online]. 2024. [cit. 2021-05-29]. Dostupné také z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Proline>.
- [50] AMIS, Agricultural Market Information System. *FAO data source in agricultural market information system*, [online]. Consultation on 18 Nov 2018. [cit. 2021-03-24] Dostupné také z: <https://statistics.amis-outlook.org/data/index.html>.
- [51] APPRICH, Silvia, Özge TIRPANALAN, Johannes HELL, Michael REISINGER, Stefan BÖHMDORFER, Susanne SIEBENHANDL-EHN, Senad NOVALIN a Wolfgang KNEIFEL. *Wheat bran-based biorefinery 2: Valorization of products*, [online]. LWT-Food Science and Technology. 2014, 56(2), 222-231. [cit. 2021-03-24] DOI: 10.1016/j.lwt.2013.12.003. ISSN 00236438. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002364381300474X>
- [52] PAZO-Cepeda, V., Benito-Román, Ó., Navarrete, A. et al. *Valorization of Wheat Bran: Ferulic Acid Recovery Using Pressurized Aqueous Ethanol Solutions*, [online]. Waste Biomass Valor 11, 4701–4710 (2020). [cit. 2021-03-25] DOI: 10.1007/s12649-019-00787-7 Dostupné také z: <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00787-7>
- [53] MIDDELBOSS, Ingomar S. a George C. FAHEY. *Soybean Carbohydrates. Soybeans*, [online]. Elsevier, 2008, 269-296. [cit. 2021-05-29]. DOI: 10.1016/B978-1-893997-64-6.50012-3. ISBN 9781893997646. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781893997646500123>
- [54] KÅRLUND, Anna, Carlos GÓMEZ-GALLEGO, Anu M. TURPEINEN, Outi-Maaria PALO-OJA, Hani EL-NEZAMI a Marjukka KOLEHMAINEN. *Protein Supplements and Their Relation with Nutrition, Microbiota Composition and Health: Is More Protein Always Better for Sportspeople?* [online]. Nutrients. 2019, 11(4). [cit. 2021-05-29]. DOI: 10.3390/nu11040829. ISSN 2072-6643. Dostupné také z: <https://doi.org/10.3390/nu11040829>
- [55] TUFAIL, Tabussam, Farhan SAEED, Imran PASHA, et al. *Extraction, quantification, and biochemical characterization of cereal industry by-product cell wall*, [online]. Journal of Food Processing and Preservation. 2021, 45(3). [cit. 2021-05-29]. DOI: 10.1111/jfpp.15023. ISSN 0145-8892. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1111/jfpp.15023>

- [56] KUMAGAI, Takehisa, Hiroyuki KAWAMURA, Takao FUSE, Toshiyuki WATANABE, Yuhi SAITO, Takehiro MASUMURA, Reiko WATANABE a Motoni KADOWAKI. *Production of Rice Protein by Alkaline Extraction Improves Its Digestibility*, [online]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology. 2006, 52(6), 467-472. [cit. 2021-05-29]. DOI: 10.3177/jnsv.52.467. ISSN 0301-4800. Dostupné také z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jnsv/52.467?from=CrossRef>
- [57] ARTE, Elisa, Xin HUANG, Emilia NORDLUND a Kati KATINA. *Biochemical characterization and technofunctional properties of bioprocessed wheat bran protein isolates*, [online]. Food Chemistry. 2019, 289, 103-111. [cit. 2021-05-29]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.03.020. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881461930473X>
- [58] YILMAZ-TURAN, Secil, Amparo JIMÉNEZ-QUERO, Rosana MORIANA, Elisa ARTE, Kati KATINA a Francisco VILAPLANA. *Cascade extraction of proteins and feruloylated arabinoxylans from wheat bran*, [online]. Food Chemistry. 2020, 333. [cit. 2021-05-29]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127491. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814620313534>
- [59] JU, Z.Y., N.S. HETTIARACHCHY a N. RATH. *Extraction, denaturation and hydrophobic Properties of Rice Flour Proteins*, [online]. Journal of Food Science. 2001, 66(2), 229-232. [cit. 2021-05-29]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2001.tb11322.x. ISSN 0022-1147. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2001.tb11322.x>
- [60] PIOTROWICZ, Inajara Beatriz Brose a Myriam Mercedes SALAS-MELLADO. *Protein concentrates from defatted rice bran: preparation and characterization*, [online]. Food Science and Technology. 2017, 37(suppl 1), 165-172. [cit. 2021-05-30]. DOI: 10.1590/1678-457x.34816. ISSN 1678-457X. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1590/1678-457x.34816>
- [61] CHEN, Guohua a Wei WANG. *Role of Freeze Drying in Nanotechnology. Drying Technology*, [online]. 2007, 25(1), 29-35. [cit. 2021-05-30]. DOI: 10.1080/07373930601161179 ISSN 0737-3937. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1080/07373930601161179>
- [62] HANIKA, Jiří. *Speciální separační procesy*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995. ISBN 80-708-0242-1.
- [63] QUITAIN, Armando T., Hiroyuki DAIMON, Koichi FUJIE, Shunsaku KATOH a Takashi MORIYOSHI. *Microwave-Assisted Hydrothermal Degradation of Silk Protein to Amino Acids*, [online]. 2006, 45(13), 4471-4474. [cit. 2021-05-30]. DOI: 10.1021/ie0580699 ISSN 0888-5885. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1021/ie0580699>
- [64] KABAHA, Khaled, Alpay TARALP, Ismail CAKMAK a Levent OZTURK. *Accelerated Hydrolysis Method To Estimate the Amino Acid Content of Wheat (Triticum durum Desf.) Flour Using Microwave Irradiation*, [online]. Journal of Agricultural and Food

- Chemistry. 2011, 59(7), 2958-2965. [cit. 2021-05-30]. DOI: 10.1021/jf103678c ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1021/jf103678c>
- [65] MARGOLIS, Sam A., Lois JASSIE a H. M. KINGSTON. *The hydrolysis of proteins by microwave energy*, [online]. Journal of Automatic Chemistry. 1991, 13(3), 93-95. [cit. 2021-05-30]. DOI: 10.1155/S1463924691000172. ISSN 0142-0453. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1155/S1463924691000172>
- [66] Waters, The Science of What's Possible. *Comprehensive Guide to Hydrolysis and Analysis of Amino Acids. Introduction to Hydrolysis*, [online]. [cit. 2021-06-02]. Dostupné také z: https://www.waters.com/waters/en_US/Types-and-Modes-of-Hydrolysis/nav.htm?cid=135042951&locale=en_US
- [67] NG, L.T., A. PASCAUD a M. PASCAUD. *Hydrochloric acid hydrolysis of proteins and determination of tryptophan by reversed-phase high-performance liquid chromatography*, [online]. Analytical Biochemistry. 1987, **167**(1), 47-52. [cit. 2021-06-02]. DOI: 10.1016/0003-2697(87)90132-1 ISSN 00032697. Dostupné také z: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90132-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90132-1)
- [68] FOUNTOULAKIS, Michael a Hans-Werner LAHM. *Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins*, [online]. Journal of Chromatography A. 1998, **826**(2), 109-134. [cit. 2021-06-02]. DOI: 10.1016/S0021-9673(98)00721-3. ISSN 00219673. Dostupné také z: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00721-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00721-3)
- [69] KONG, X, H ZHOU a H QIAN. *Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates*, [online]. Food Chemistry. 2007, **102**(3), 759-763. [cit. 2021-06-02]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.06.062 ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.062>
- [70] BEŇO, Erik, Róbert GÓRA a Milan HUTTA. *Development of a precolumn derivatization HPLC method with diode-array detection for the determination of amino sugars in peat and soil humic acids*, [online]. Journal of Separation Science. 2018, **41**(4), 814-821. [cit. 2021-06-02]. DOI: 10.1002/jssc.201700776 ISSN 16159306. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1002/jssc.201700776>
- [71] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [72] LEHOTAY, Jozef. *Separace metody v analytické chemii*. Bratislava: Nakladateľstvo STU, 2009. Edícia vysokoškolských učebníc. ISBN 978-80-227-3036-5.
- [73] ROGINSKI, Hubert, Patrick F. FOX a John W. FUQUAY. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, [online]. Amsterdam: Academic Press, 2002. [cit. 2021-07-17]. ISBN 01-222-7235-6. DOI:10.1016/B0-12-227235-8/00015-8. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/B0-12-227235-8/00015-8>
- [74] MAEHRE HK, Dalheim L, Edvinsen GK, Elvevoll EO, Jensen IJ. *Protein Determination-Method Matters. Foods*, [online]. 2018 Jan 1. [cit. 2021-07-17]. DOI: 10.3390/foods7010005. Dostupné také z: <https://doi.org/10.3390/foods7010005>

- [75] ZÁRUBA, Kamil. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-950-1.
- [76] JAJIC, Igor, Sasa KRSTOVIC, Dragan GLAMOCIC, Sandra JAKSIC a Biljana ABRAMOVIC. *Validation of an HPLC method for the determination of amino acids in feed*, [online]. Journal of the Serbian Chemical Society. 2013, **78**(6), 839-850. [cit. 2021-07-17]. DOI: 10.2298/JSC120712144J ISSN 0352-5139. Dostupné také z: <https://doi.org/10.2298/JSC120712144J>
- [77] Mlýny J. Voženílek spol. s r.o., [online]. [cit. 2021-03-25] Dostupné také z: <https://www.mlynyvozenilek.cz>
- [78] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-030-0569-8.
- [79] POPL, Milan a Jaroslav KUBÁT. *Separace látek*. 3. Vydání. Praha: SNTL, 1986. 440-33723.
- [80] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. Vydání. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [81] GVV, Liyanaarachchi, Mahanama KRR, Somasiri HPPS, Punyasiri PAN a Kottawa-Arachchi JD. *Analysis of Total Amino Acids in Rice Using a Validated Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatographic Method with Diode Array Detection (RP-HPLC-DAD)*, [online]. International Journal of Analytical and Bioanalytical Methods. 2020, 2(1). [cit. 2021-07-14] ISSN 26338912. DOI: 10.35840/ijabm/2408 Dostupné také z: <https://doi.org/10.35840/ijabm/2408>
- [82] VANVI, Ariane, Apollinaire TSOPMO, Dragan GLAMOCIC, Sandra JAKSIC a Biljana ABRAMOVIC. *Pepsin Digested Oat Bran Proteins: Separation, Antioxidant Activity, and Identification of New Peptides*, [online]. Journal of Chemistry. 2016, **2016**(6), 1-8. [cit. 2021-07-14] ISSN 2090-9063. DOI: 10.1155/2016/8216378 Dostupné také z: <https://doi.org/10.1155/2016/8216378>
- [83] HSIA, Tan Lu. *B-17 Amino Acid Analysis – HPLC (Pre Column Derivatization – Opa Method)*, [online]. 2006. [cit. 2021-06-29]. Dostupné také z: <https://1url.cz/bKqI8>
- [84] ALIA, Khush Bakhat, Habibullah NADEEM, Ijaz RASUL, et al. *Separation and Purification of Amino Acids. Applications of Ion Exchange Materials in Biomedical Industries*, [online]. Cham: Springer International Publishing, 2019, 2019-01-31, 1-11. [cit. 2021-07-19] ISBN 978-3-030-06081-7. DOI: 10.1007/978-3-030-06082-4_1. Dostupné také z: https://doi.org/10.1007/978-3-030-06082-4_1
- [85] HUBAČOVÁ, Klára. *Výroba a charakterizace proteinových koncentrátů z pšeničných otrub* [online]. Brno, 2020 [cit. 2021-07-20]. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123863>.
- [86] WEISS, Ingrid M., Christina MUTH, Robert DRUMM a Helmut O. K. KIRCHNER. *Thermal decomposition of the amino acids glycine, cysteine, aspartic acid, asparagine*,

- glutamic acid, glutamine, arginine and histidine.* [online]. BMC Biophysics. 2018, **11**(1). [cit. 2021-07-21]. ISSN 2046-1682. DOI: 10.1186/s13628-018-0042-4 Dostupné také z: <https://doi.org/10.1186/s13628-018-0042-4>
- [87] *Průběžná výzkumná zpráva Q1/2021 TAČR TREND.* Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Centrum materiálového výzkumu. 2021. Kontaktní osoba Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D.
- [88] TSUGITA, Akira a Jean-Jacques SCHEFFLER. *European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg.* 1982. Dostupné také z: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1432-1033.1982.tb06634.x>
- [89] KHAN, K. a M. ELIA. *Factors affecting the stability of L-glutamine in solution.* *Clinical Nutrition* [online]. 1991, 10(4), 186-192. [cit. 2021-07-20]. DOI: 10.1016/0261-5614(91)90037-D ISSN 02615614. Dostupné také z: [https://doi.org/10.1016/0261-5614\(91\)90037-D](https://doi.org/10.1016/0261-5614(91)90037-D)
- [90] BLANCH, H.W., and Clark, D.S. (1988) *Biochemical Engineering*, pp. 6-38 to 6-66. *Exercise 11. Separation of Amino Acids by Ion Exchange Chromatography* [online]. [cit. 2021-07-20].
- [91] MUSTATEA G, G., Ungureanu, E.L., Iorga, E. *Protein Acidic Hydrolysis for Amino Acids Analysis in Food-Progress over Time: A Short Review.* [online]. *J. Hyg. Eng. Des.* 2019, 26, 81-87. [cit. 2021-07-20]. DOI: 10.3390/toxics9030063 Dostupné také z: <https://doi.org/10.3390/toxics9030063>
- [92] Doplnvitamin.cz: *L-Argininu v organismu, proč je tak důležitý?* [online]. [cit. 2021-7-27]. Dostupné také z: <https://www.doplnvitamin.cz/clanky/l-argininu-v-organismu-proc-je-tak-dulezity/>
- [93] Zelenyobchod.cz: *Naše svaly rostou díky leucinu, který je v zelených potravinách.* [online]. [cit. 2021-7-27]. Dostupné také z: <https://www.zelenyobchod.cz/nase-svaly-rostou-diky-leucinu-ktery-je-v-zelenych-potravinach>
- [94] WONG, W.S.Dominic, David T. OSUGA, Timothy S. BURCHAM a Robert E. FEENEY. *Determi proteinu nation of tryptophan as the reduced derivative by acid hydrolysis and chromatography* [online]. *Analytical Biochemistry.* 1984, 143(1), 62-70. [cit. 2021-7-27]. ISSN 00032697. DOI: 10.1016/0003-2697(84)90558-X Dostupné také z: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90558-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90558-X)
- [95] MARINO, R., M. IAMMARINO, A. SANTILLO, M. MUSCARELLA, M. CAROPRESE a M. ALBENZIO. *Technical note: Rapid method for determination of amino acids in milk* [online]. *Journal of Dairy Science.* 2010, 93(6), 2367-2370. [cit. 2021-7-27]. ISSN 00220302. DOI: 10.3168/jds.2009-3017. Dostupné také z: <https://doi.org/10.3168/jds.2009-3017>
- [96] MOOS, Martin. *Prekoncentrační techniky pro stanovení uranu s využitím modifikovaných sorbentů* [online]. Brno, 2011. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně. [cit. 2021-7-27]. Dostupné také z: <https://dspace.vutbr.cz/handle/11012/1500>

- [97] Sójový protein: *Soy protein 92*. In: 4FITNESS: Profesionální výživa [online]. Brno: 4FITNESS s.r.o. [cit. 2021-07-28]. Dostupné také z: <https://4fitness.cz/sojovy-protein-1-kg-soy-isolate/>
- [98] Aktin *Syrovátkový protein*. In: Aktin [online]. Brno: Selltime s.r.o. [cit. 2021-07-28]. Dostupné také z: <https://aktin.cz/aktin-syrovatkovy-protein/bez-prichute-2000-g-28100>

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

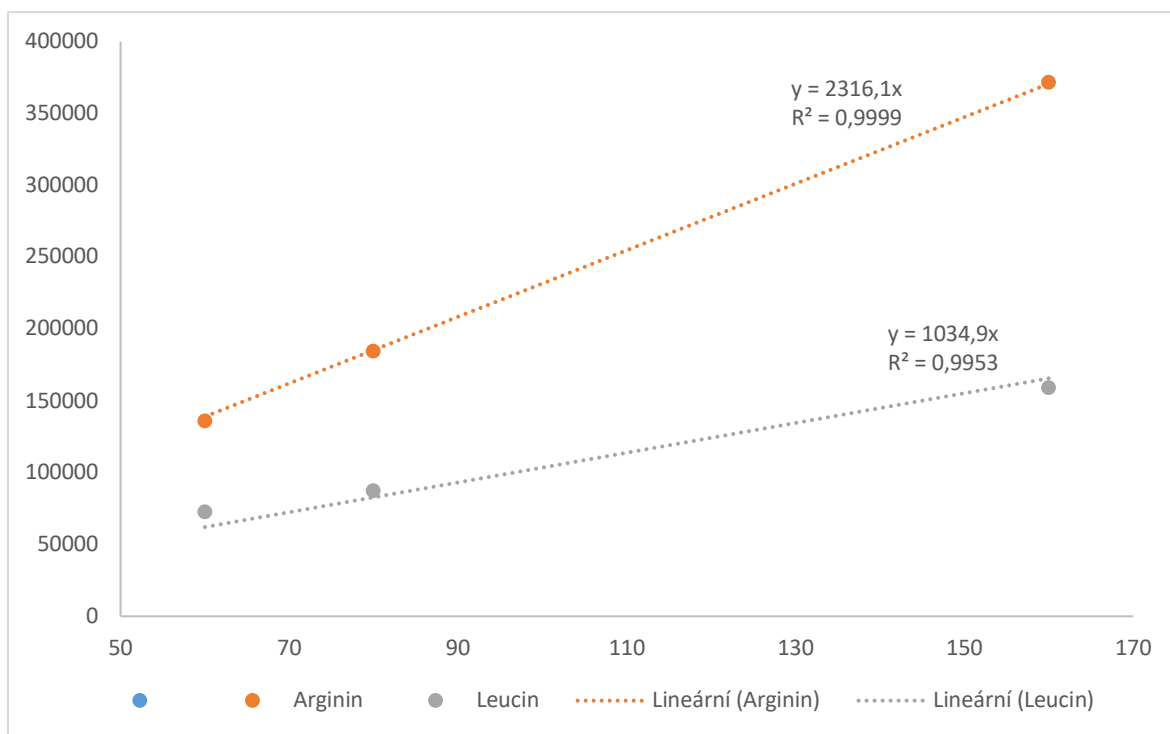
BCAA	Branched Chain Amino Acids (větvené aminokyseliny)
CNS	Centrální nervová soustava
DOPA	Dihydroxyfenylalanin
DL	Detekční limit
Fmoc	9-fluorenylmethoxykarbonylové soli
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
OPA	o-ftalaldehyd
PITC	Fenylisothiokyanát
UV	Ultraviolet (ultrafialové)
UV-VIS	Ultraviolet-visible (ultrafialovo-viditelné)

8 SEZNAM PŘÍLOH

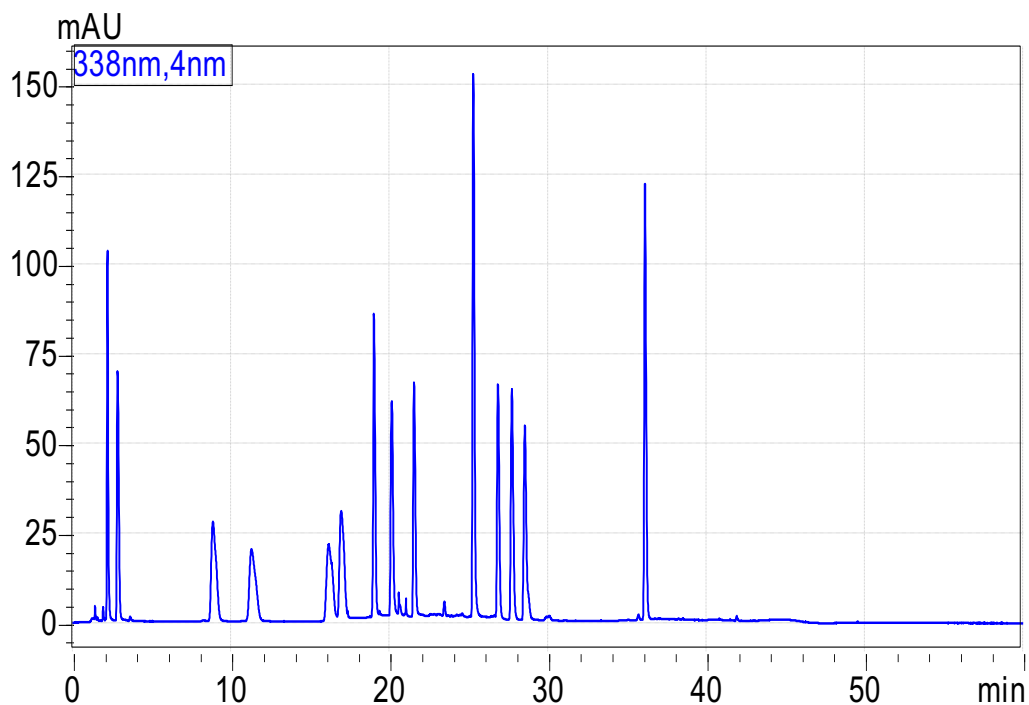
Příloha 1: Kalibrační křivka závislosti koncentrace jednotlivých aminokyselin na odezvě detektoru.....	68
Příloha 2: Chromatogram směsného aminokyselinového standardu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].	68
Příloha 3: Chromatogram aminokyselinového standardu leucinu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].	69
Příloha 4: Chromatogram aminokyselinového standardu argininu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].	69
Příloha 5: Chromatogram kyselé hydrolyzy pomocí termobloku standardu argininu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].	70
Příloha 6: Chromatogram kyselé hydrolyzy pomocí termobloku standardu leucinu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].	70
Příloha 7: Chromatogram kyselé hydrolyzy standardu argininu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].	71
Příloha 8: Chromatogram kyselé hydrolyzy standardu leucinu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].	71
Příloha 9: Chromatogram enzymatické hydrolyzy proteinového izolátu působením pepsinu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].	72
Příloha 10: Chromatogram enzymatické hydrolyzy proteinového izolátu působením pankreatinu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].	72
Příloha 11: Chromatogram enzymatické hydrolyzy proteinového izolátu působením pepsinu a pankreatinu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].....	73
Příloha 12: Chromatogram kyselé hydrolyzy proteinového izolátu pomocí mineralizačního přístroje závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].	73
Příloha 13: Chromatogram adsorpční kapacity 0, 1 g navážky adsorbentu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].	74
Příloha 14: Chromatogram adsorpční kapacity 0, 15 g navážky adsorbentu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].	74
Příloha 15: Chromatogram adsorpční kapacity 0, 25 g navážky adsorbentu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].	75
Příloha 16: Chromatogram adsorpční kapacity 0, 5 g navážky adsorbentu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].	75
Příloha 17: Chromatogram adsorpční kapacity 0, 8 g navážky adsorbentu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].	76
Příloha 18: Chromatogram časové závislosti 15 minut působení směsi aminokyselin na adsorbent závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].....	76
Příloha 19: Chromatogram časové závislosti 30 minut působení směsi aminokyselin na adsorbent závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].....	77
Příloha 20: Chromatogram časové závislosti 60 minut působení směsi aminokyselin na adsorbent závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].....	77
Příloha 21: Chromatogram časové závislosti 15 minut působení roztoku argininu na adsorbent závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].....	78

Příloha 22: Chromatogram časové závislosti 30 minut působení roztoku argininu na adsorbent závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].....	78
Příloha 23: Chromatogram časové závislosti 60 minut působení roztoku argininu na adsorbent závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].....	79
Příloha 24: Chromatogram vlivu pH 3, 4 působící na směs aminokyselin se adsorbentem závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].	79
Příloha 25: Chromatogram vlivu pH 4, 8 působící na směs aminokyselin se adsorbentem závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].	80
Příloha 26: Chromatogram vlivu pH 6, 6 působící na směs aminokyselin se adsorbentem závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].	80
Příloha 27: Chromatogram izolace volných aminokyselin z hydrolyzátu pšeničných otrub při použití pH citrátového pufru 3, 4 závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].	81
Příloha 28: Chromatogram izolace volných aminokyselin z hydrolyzátu pšeničných otrub při použití pH citrátového pufru 4, 8 závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].	81

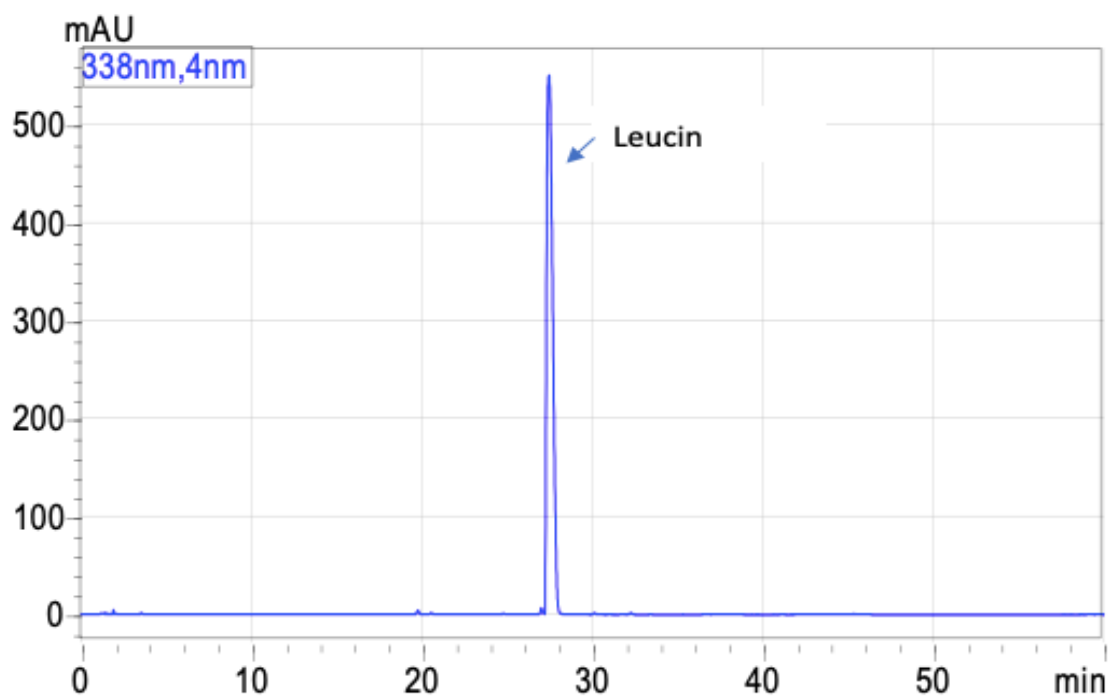
9 PŘÍLOHY



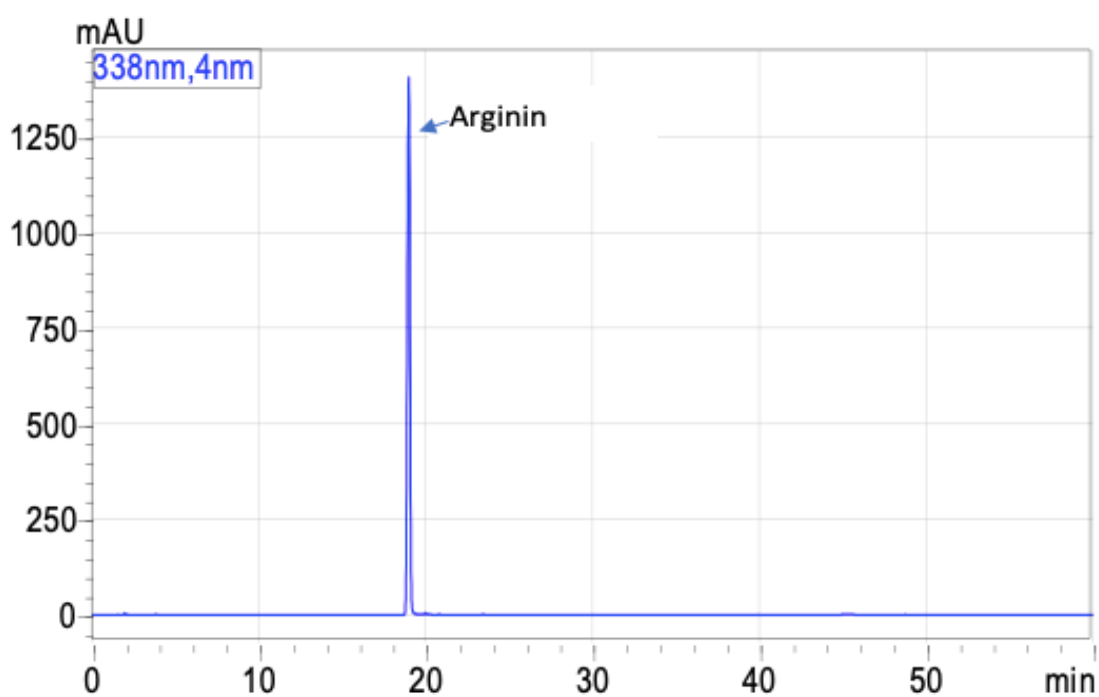
Příloha 1: Kalibrační křivka závislosti koncentrace jednotlivých aminokyselin na odezvě detektoru.



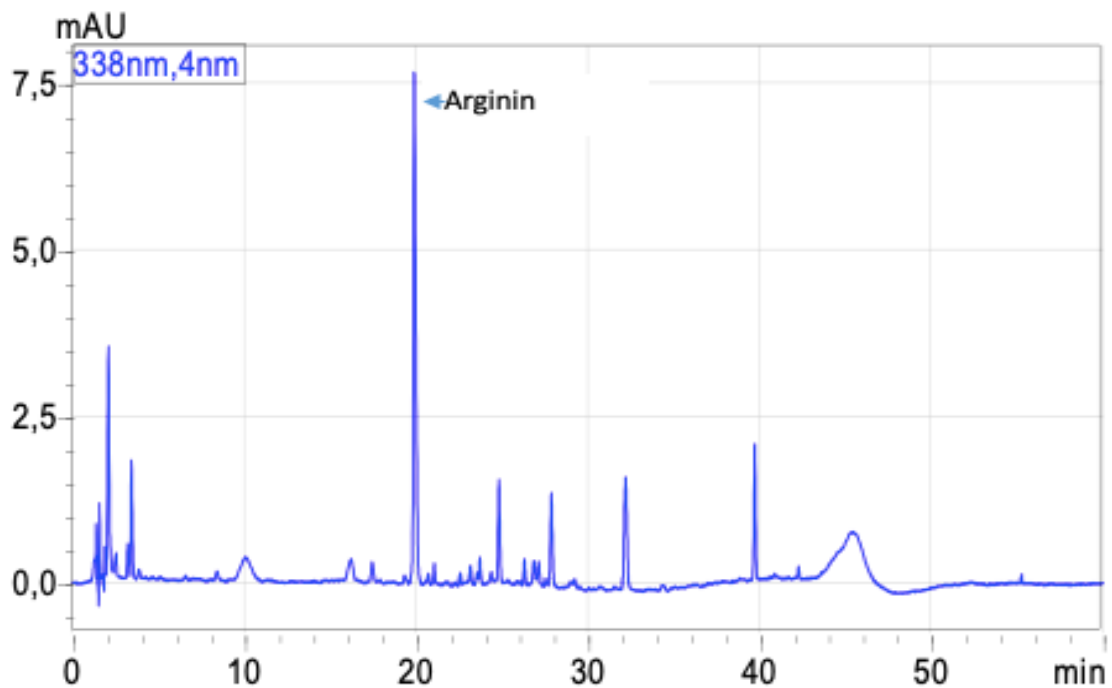
Příloha 2: Chromatogram smíšeného aminokyselinového standardu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].



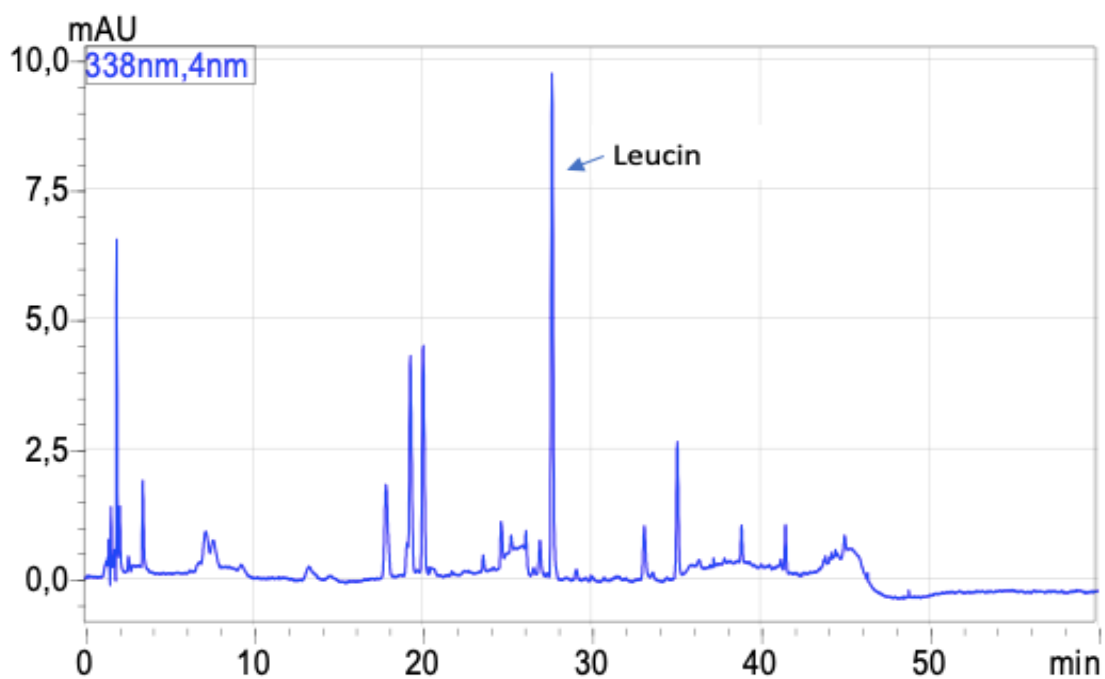
Příloha 3: Chromatogram aminokyselinového standardu leucinu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].



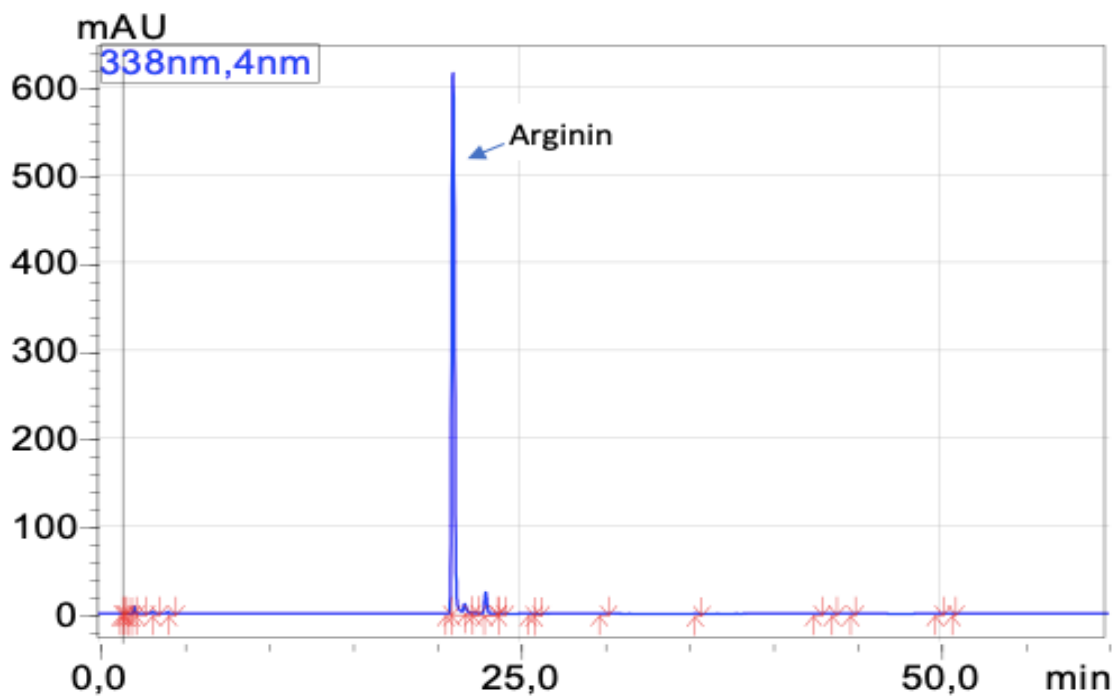
Příloha 4: Chromatogram aminokyselinového standardu argininu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].



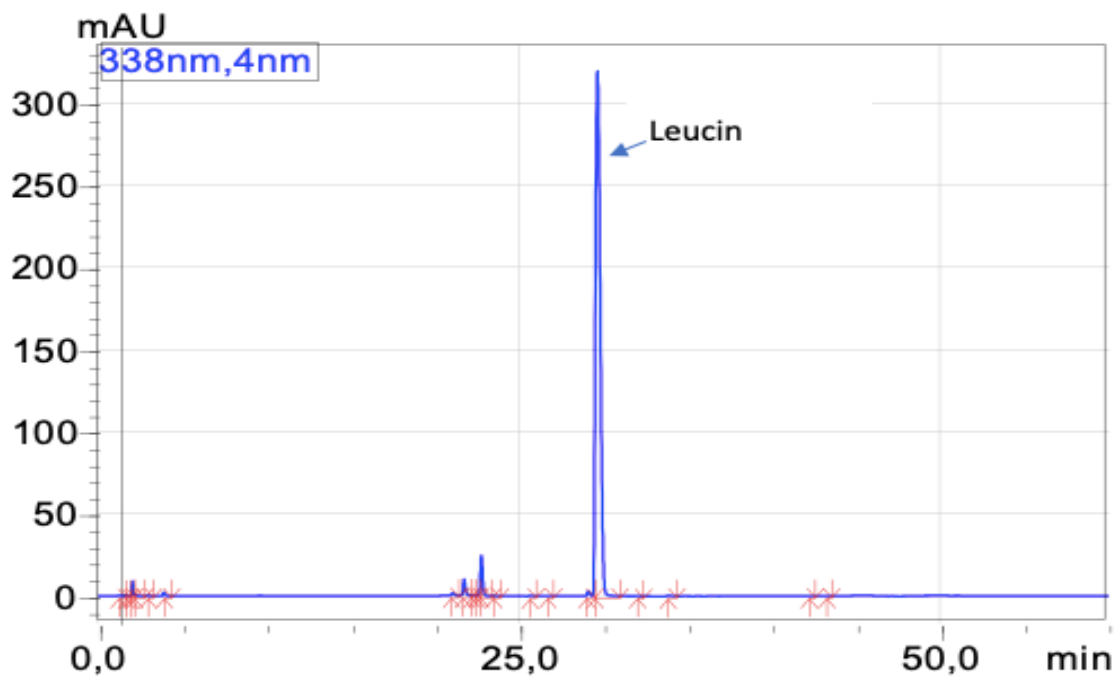
Příloha 5: Chromatogram kyselého hydrolyzy pomocí termobloku standardu argininu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].



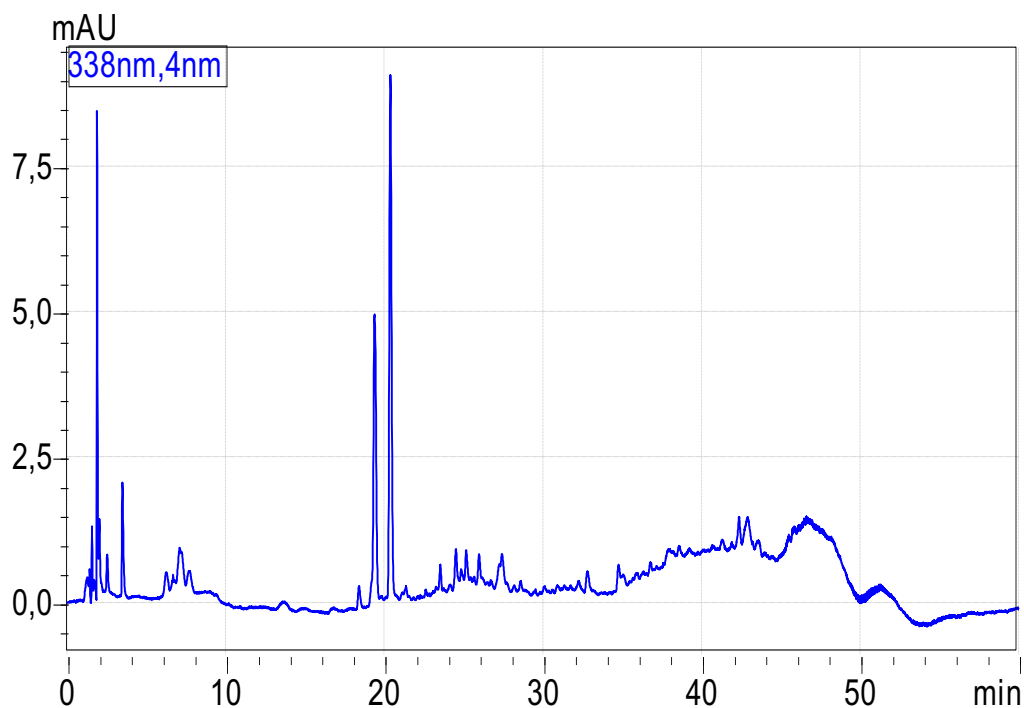
Příloha 6: Chromatogram kyselého hydrolyzy pomocí termobloku standardu leucinu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].



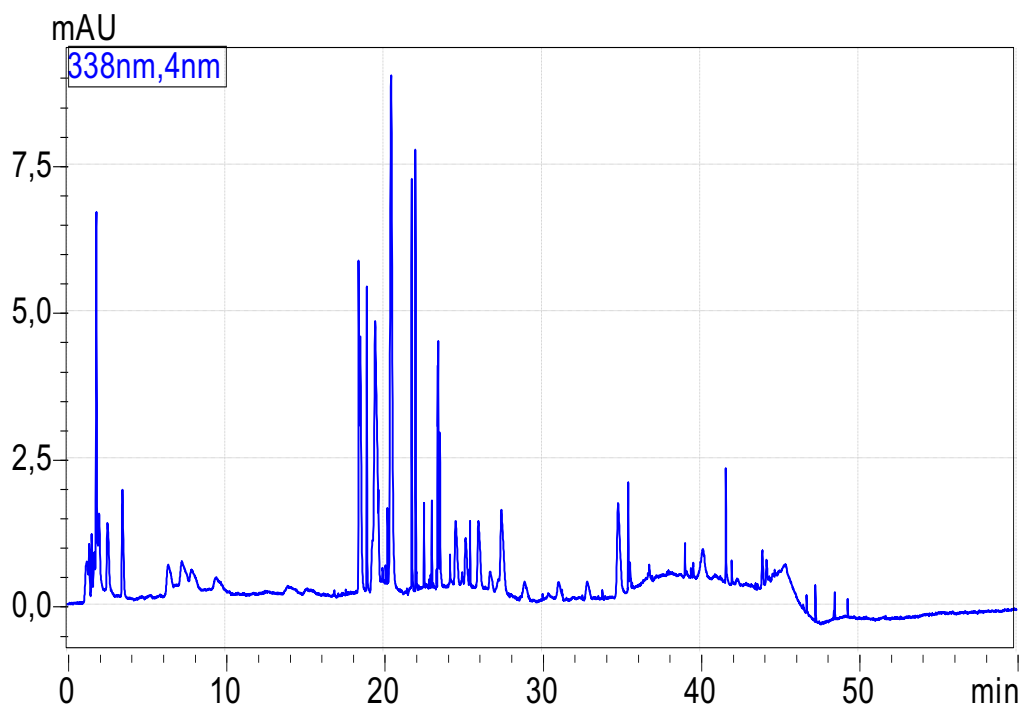
Příloha 7: Chromatogram kyselého hydrolyzy standardu argininu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].



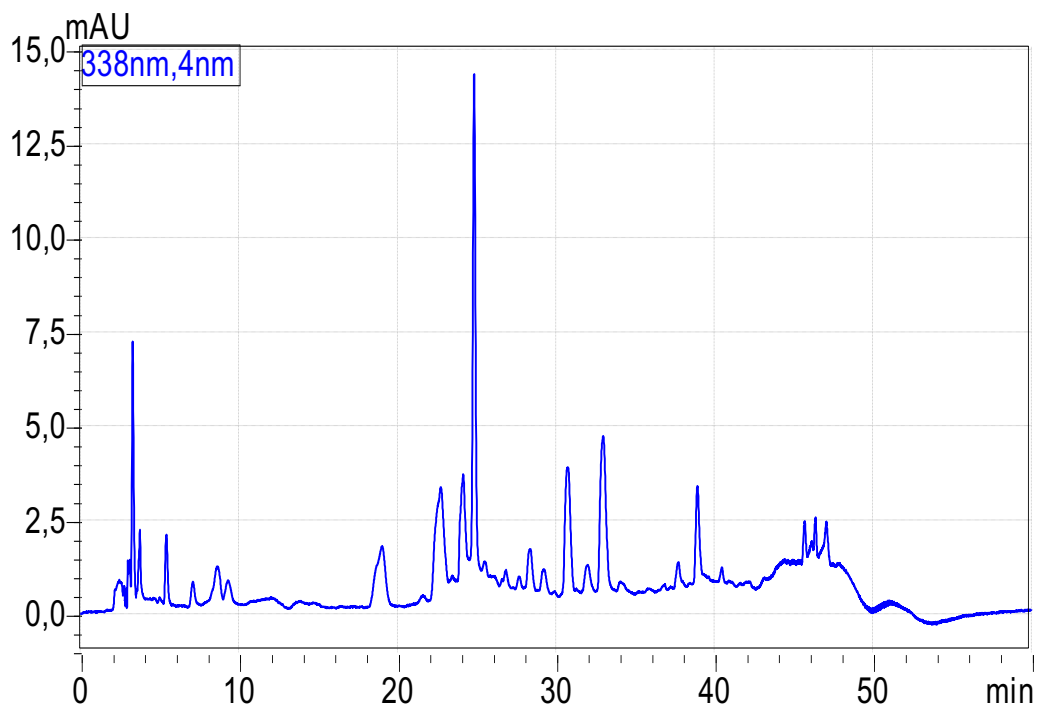
Příloha 8: Chromatogram kyselého hydrolyzy standardu leucinu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].



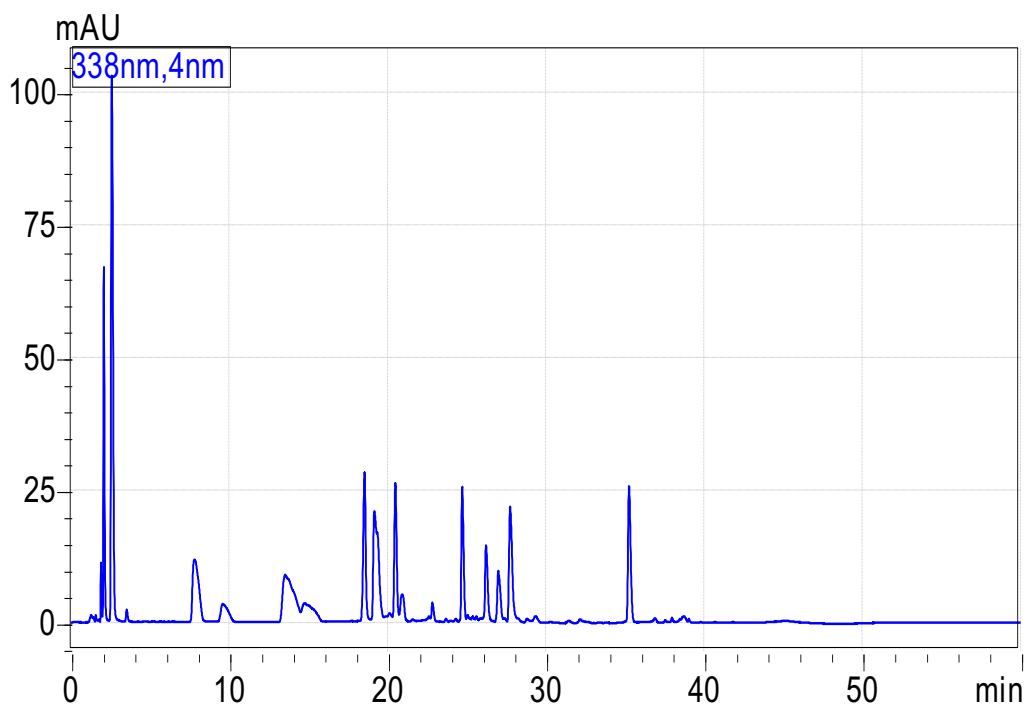
Příloha 9: Chromatogram enzymatické hydrolyzy proteinového izolátu působením pepsinu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].



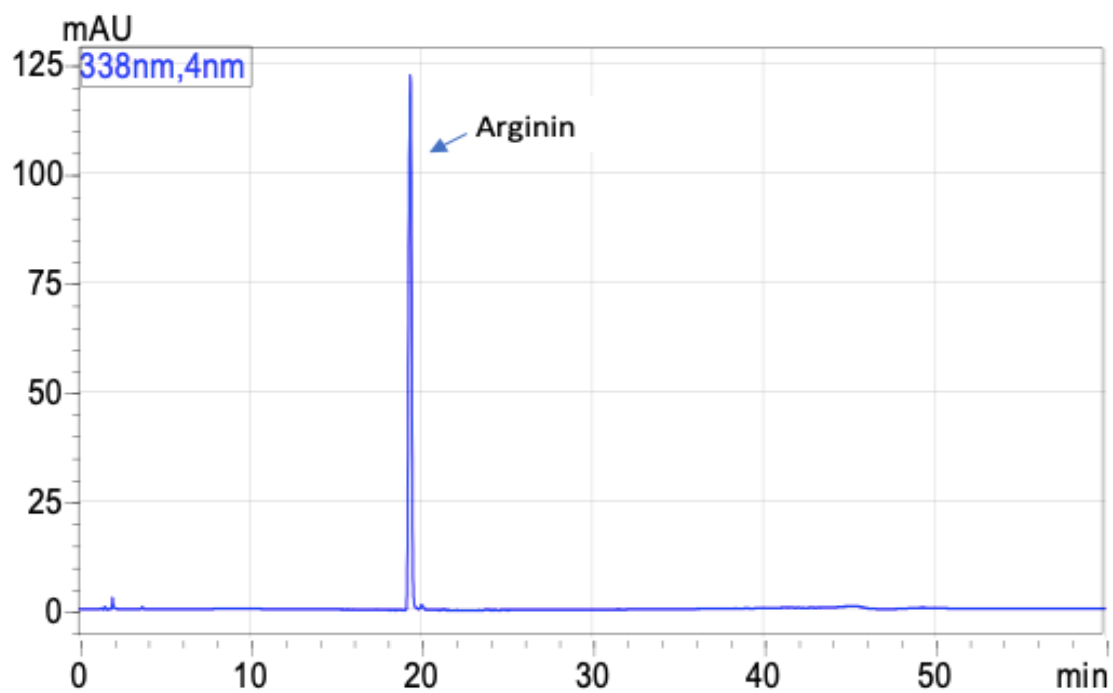
Příloha 10: Chromatogram enzymatické hydrolyzy proteinového izolátu působením pankreatinu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].



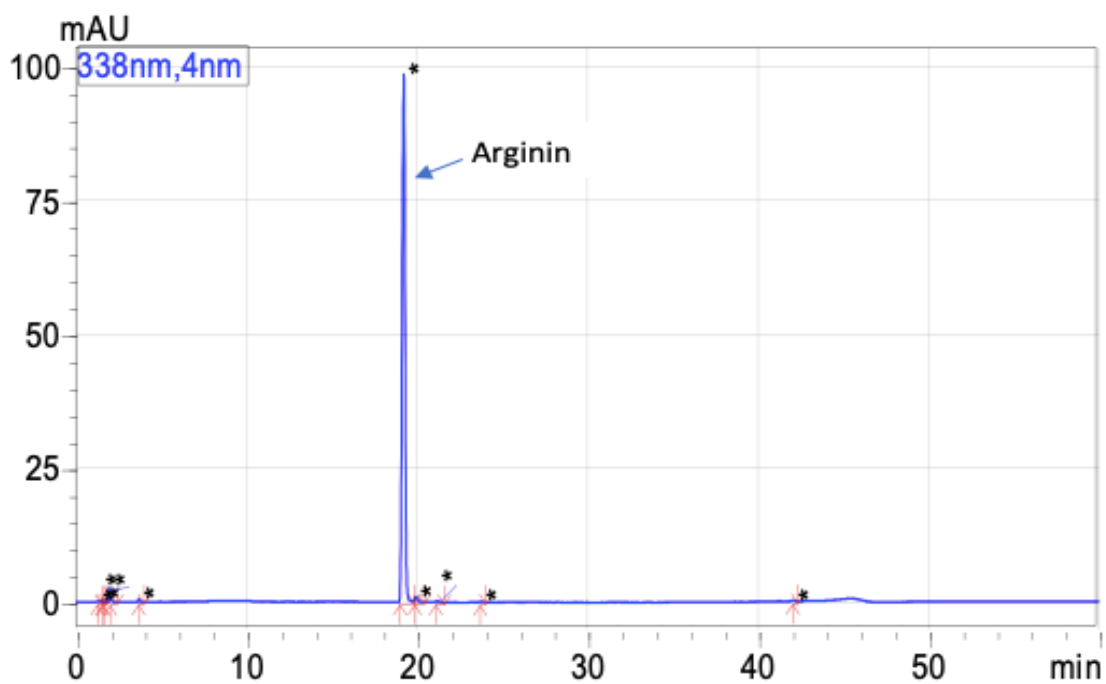
Příloha 11: Chromatogram enzymatické hydrolyzy proteinového izolátu působením pepsinu a pankreatinu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].



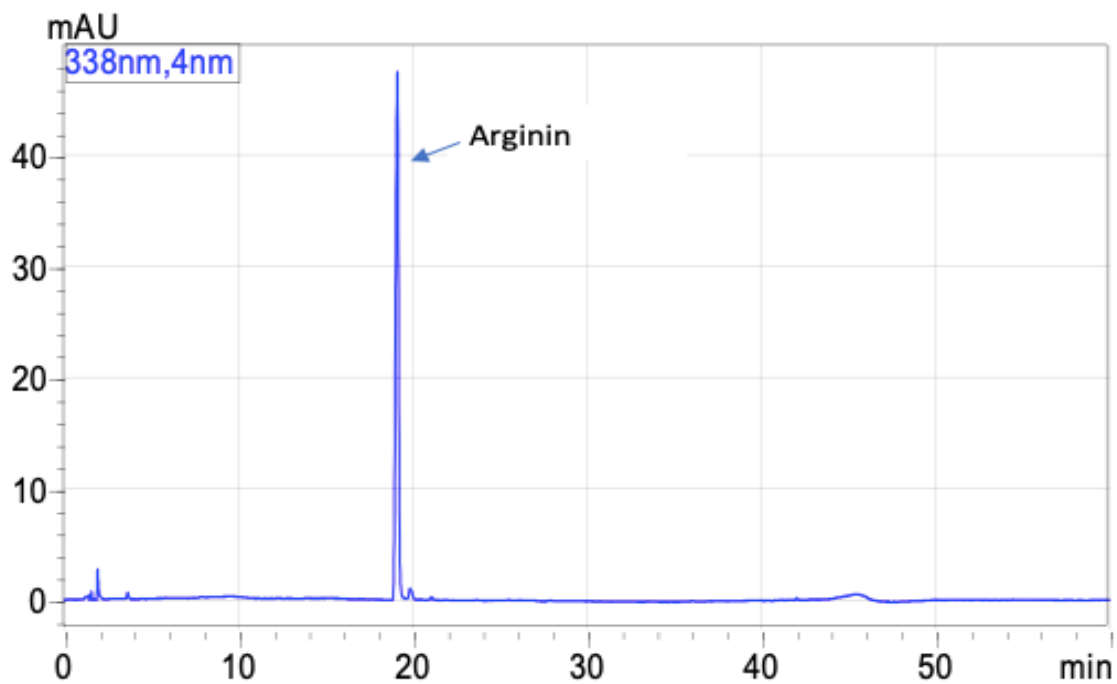
Příloha 12: Chromatogram kyselá hydrolyzy proteinového izolátu pomocí mineralizačního přístroje závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].



Příloha 13: Chromatogram adsorpční kapacity 0, 1 g navážky adsorbentu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].



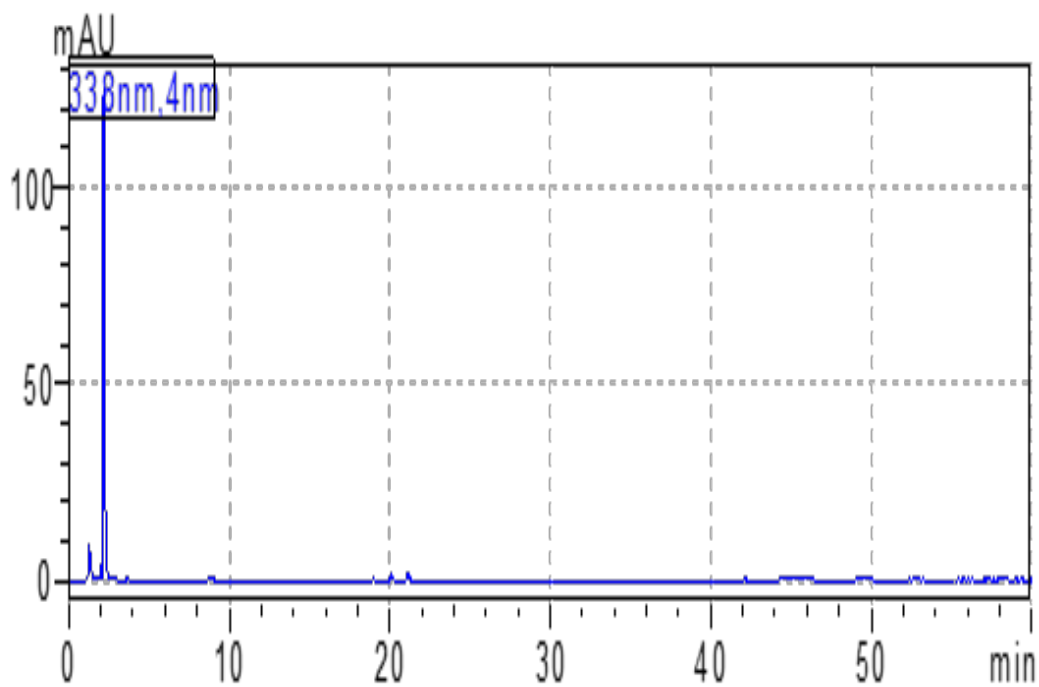
Příloha 14: Chromatogram adsorpční kapacity 0, 15 g navážky adsorbentu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].



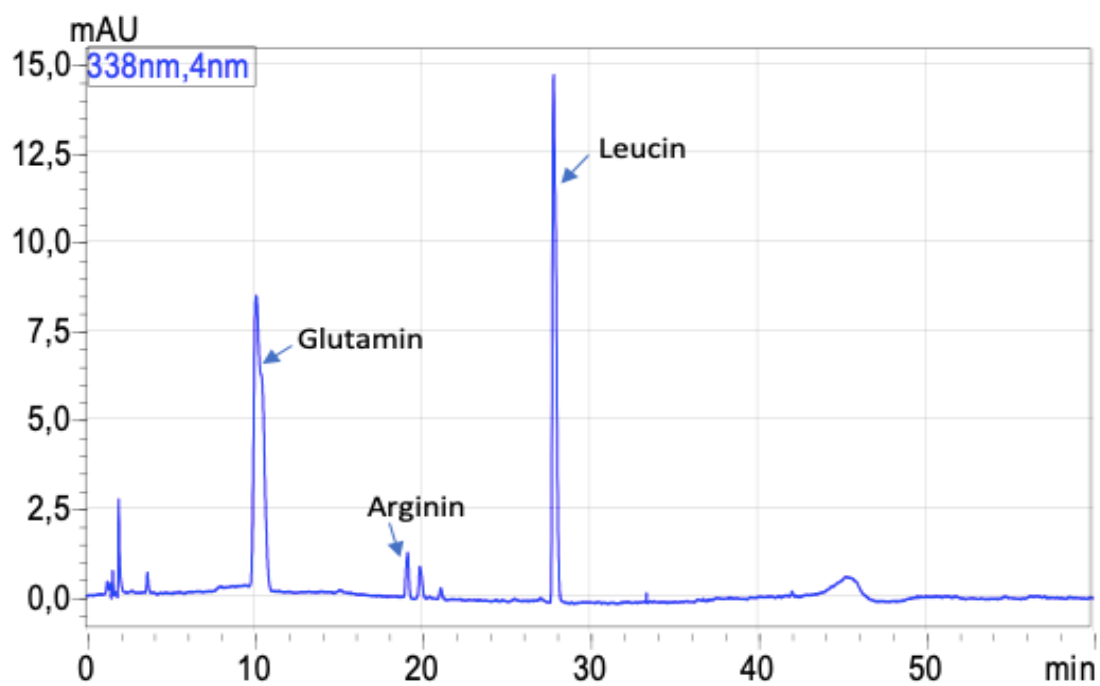
Příloha 15: Chromatogram adsorpční kapacity 0, 25 g navážky adsorbentu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].



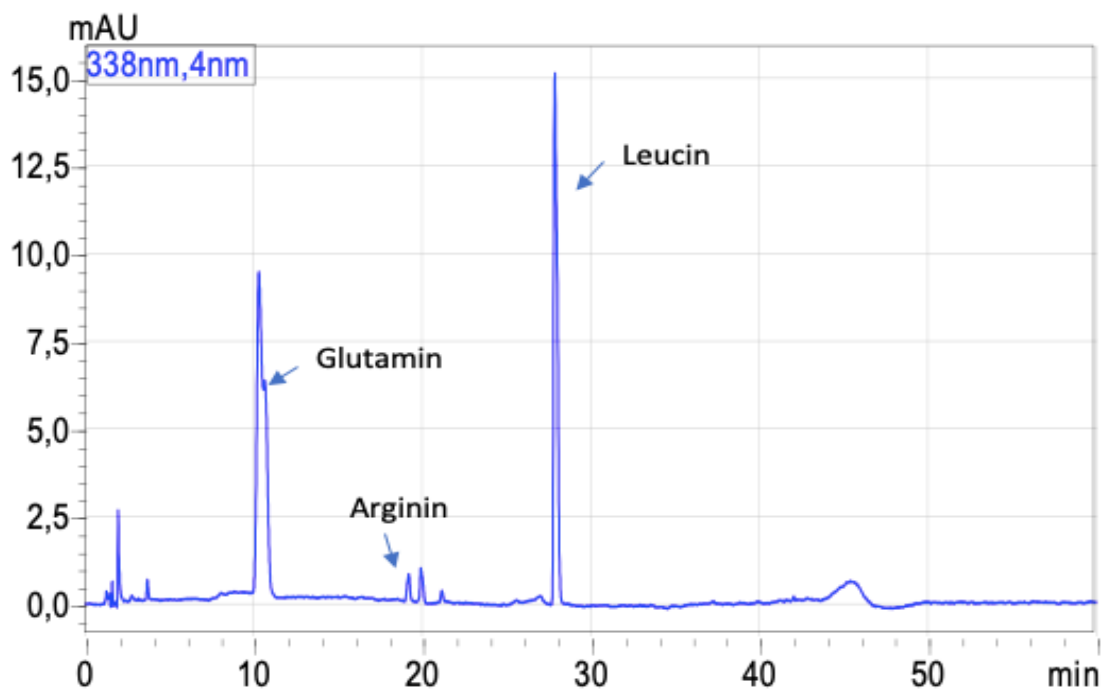
Příloha 16: Chromatogram adsorpční kapacity 0, 5 g navážky adsorbentu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].



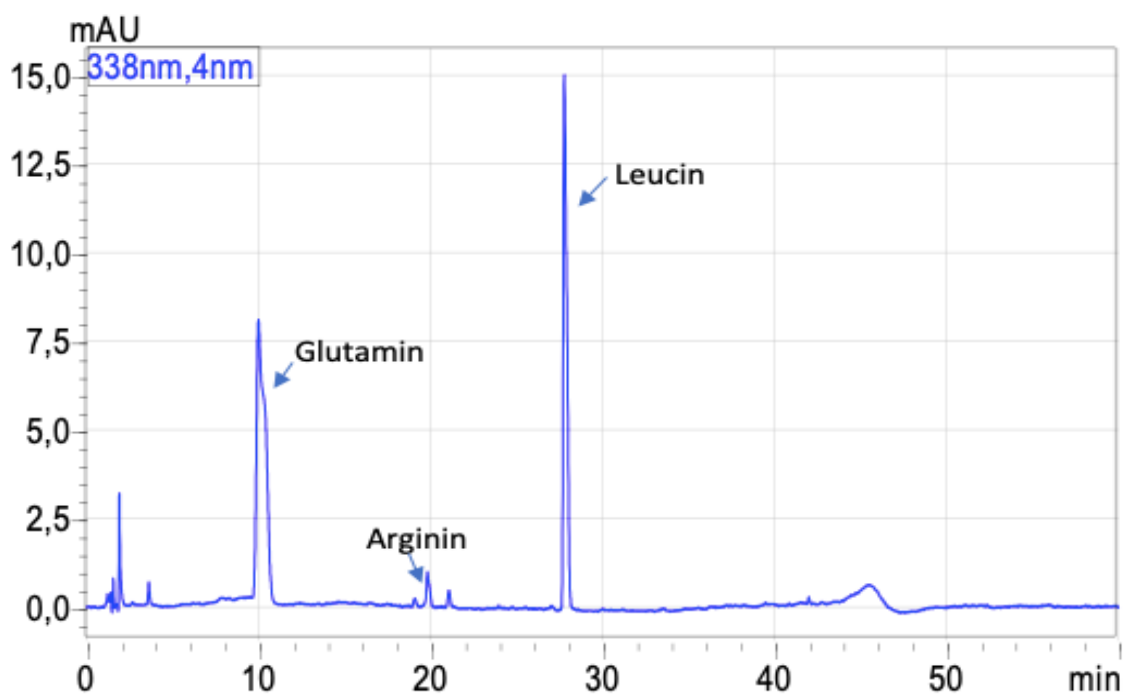
Příloha 17: Chromatogram adsorpční kapacity 0, 8 g navážky adsorbentu závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].



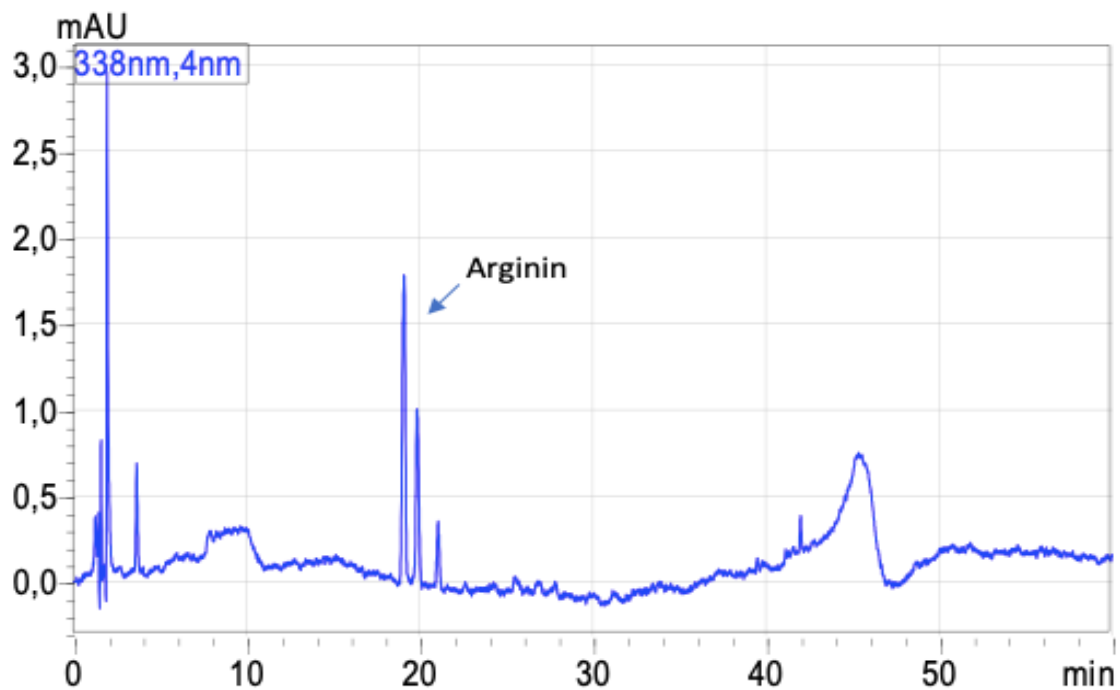
Příloha 18: Chromatogram časové závislosti 15 minut působení směsi aminokyselin na adsorbent závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].



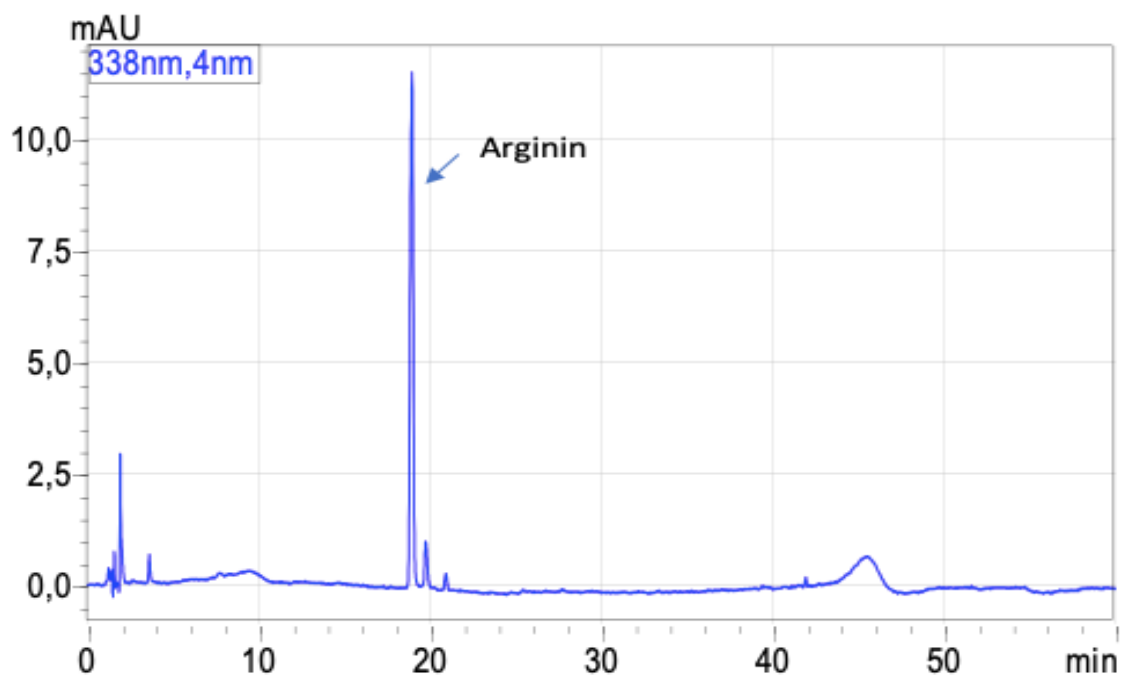
Příloha 19: Chromatogram časové závislosti 30 minut působení směsi aminokyselin na adsorbent závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].



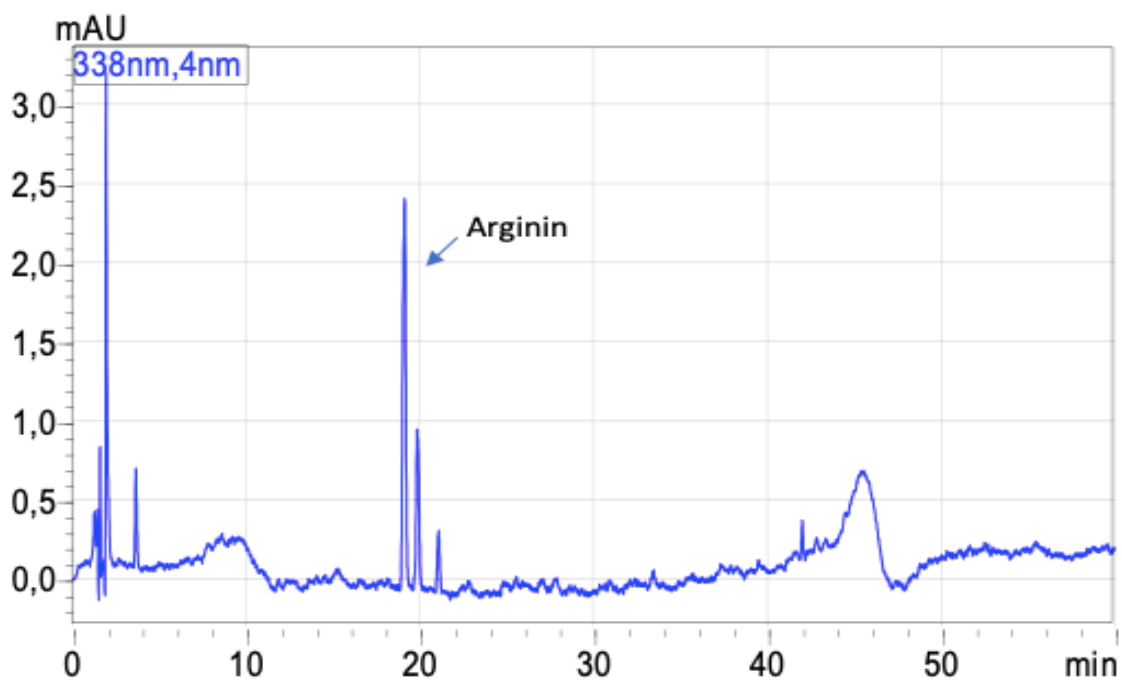
Příloha 20: Chromatogram časové závislosti 60 minut působení směsi aminokyselin na adsorbent závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].



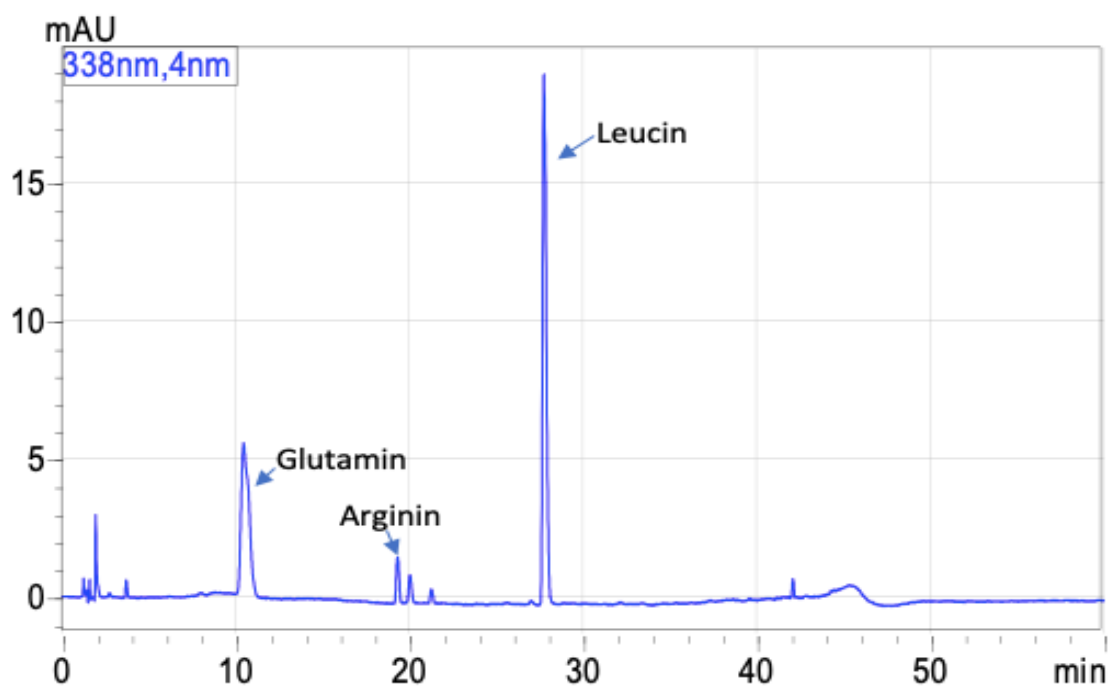
Příloha 21: Chromatogram časové závislosti 15 minut působení roztoku argininu na adsorbent závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].



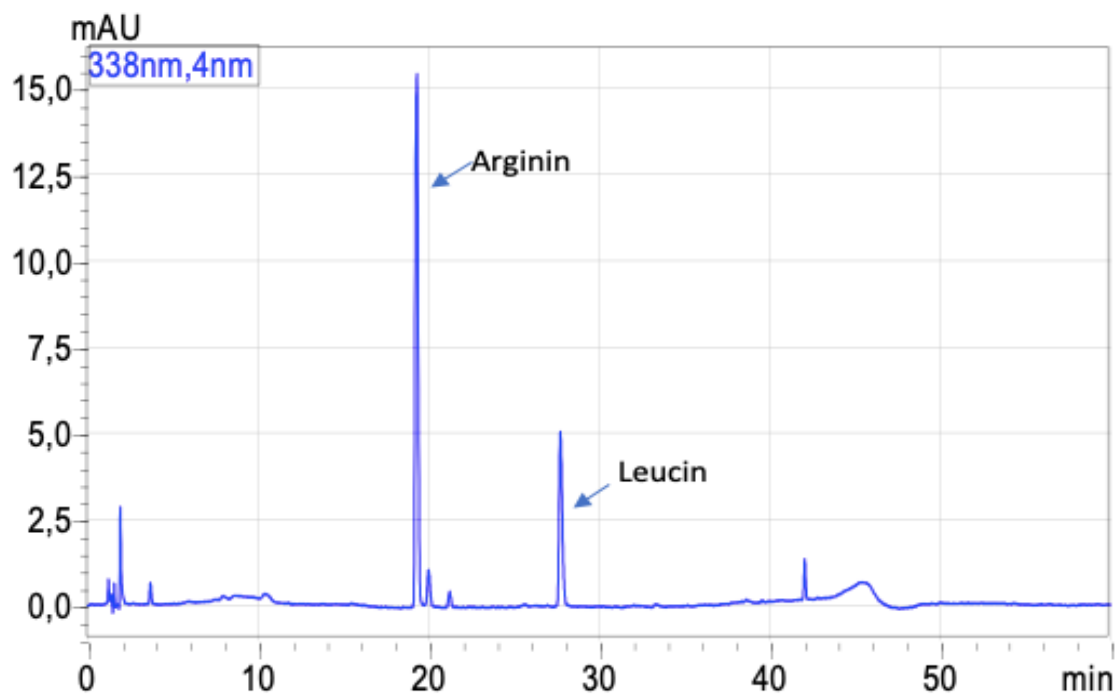
Příloha 22: Chromatogram časové závislosti 30 minut působení roztoku argininu na adsorbent závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].



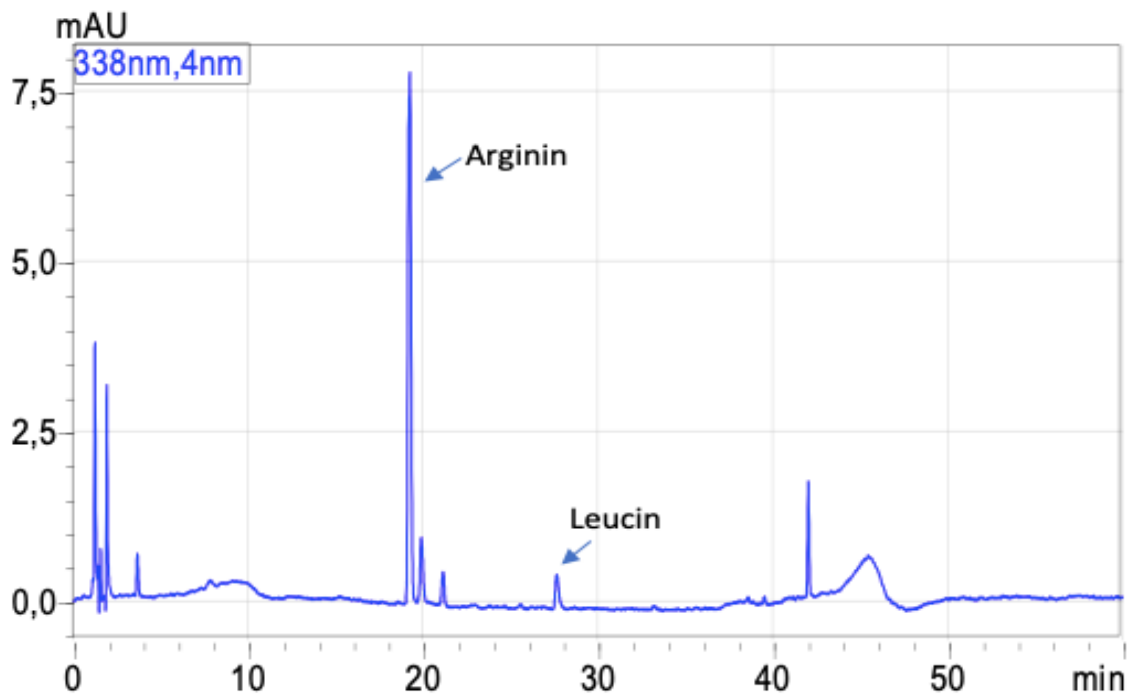
Příloha 23: Chromatogram časové závislosti 60 minut působení roztoku argininu na adsorbent závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].



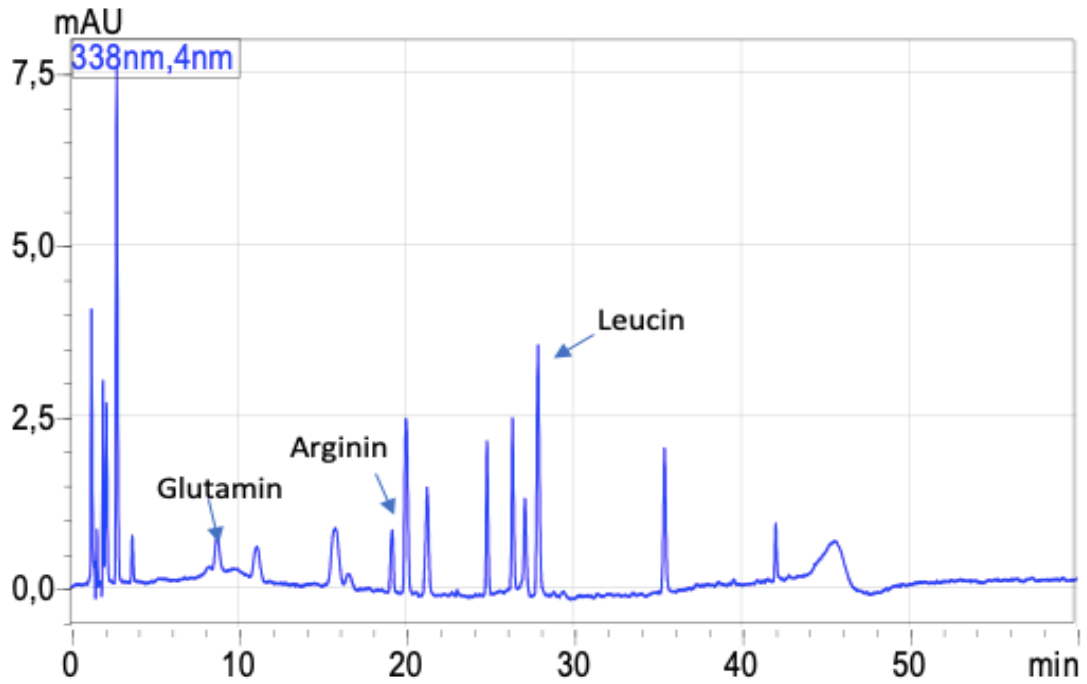
Příloha 24: Chromatogram vlivu pH 3, 4 působící na směs aminokyselin se adsorbentem závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].



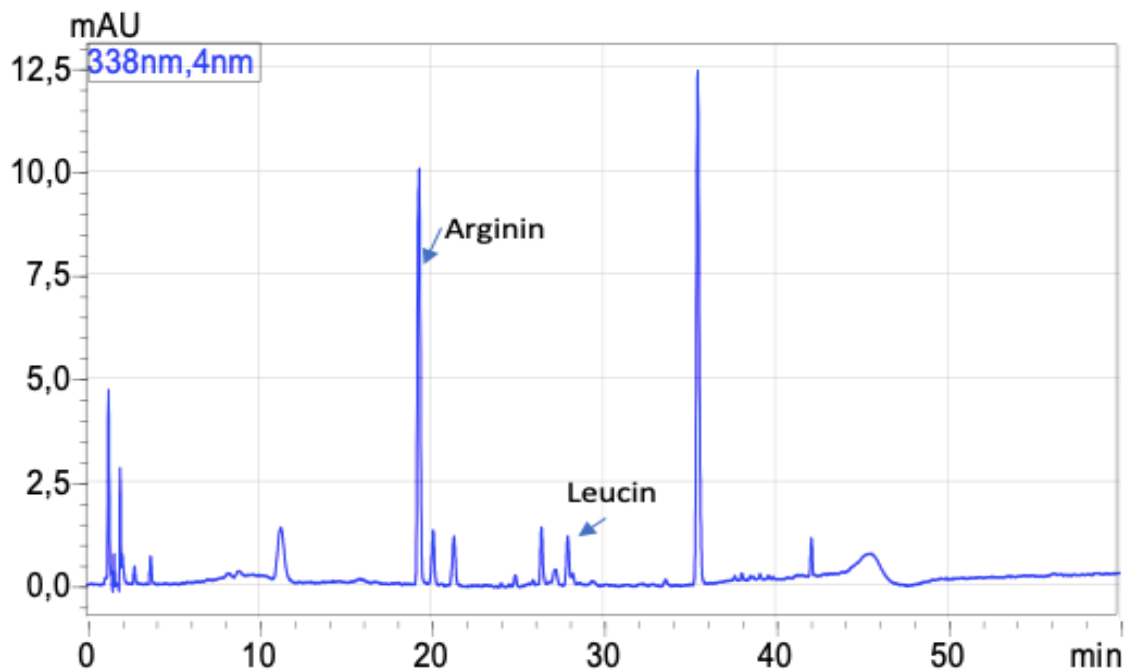
Priloha 25: Chromatogram vlivu pH 4, 8 působící na směs aminokyselin se adsorbentem závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].



Priloha 26: Chromatogram vlivu pH 6, 6 působící na směs aminokyselin se adsorbentem závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].



Příloha 27: Chromatogram izolace volných aminokyselin z hydrolyzátu pšeničných otrub při použití pH citrátového pufru 3, 4 závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].



Příloha 28: Chromatogram izolace volných aminokyselin z hydrolyzátu pšeničných otrub při použití pH citrátového pufru 4, 8 závislosti retenčního času [min] na odezvě [mAU].