



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

NETRADIČNÍ ZDROJE PROTEINŮ A MOŽNOSTI JEJICH APLIKACE

NON-TRADITIONAL SOURCES OF PROTEINS AND THEIR POTENTIAL APPLICATIONS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Petra Kubisová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1430/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Petra Kubisová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Netradiční zdroje proteinů a možnosti jejich aplikace

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- 1) Výběr netradičních zdrojů proteinů a jejich základní charakterizace
- 2) Srovnání vybraných zdrojů proteinů
- 3) Návrh vhodných forem aplikace vybraných zdrojů proteinů ve sportovních doplňcích stravy

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

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

Petra Kubisová
student(ka)

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cieľom tejto bakalárskej práce bol výber netradičných zdrojov proteínov, ich základná charakterizácia a následný návrh vhodnej aplikácie v športovej výžive.

Teoretická časť je zameraná na popis významu proteínov vo výžive, charakterizáciu rôznych proteínových doplnkov pre športovcov dostupných na trhu a základné predstavenie používaných vzoriek.

V praktickej časti sa práca zameriava na analýzu proteínov, sacharidov a lipidov vo vybraných vzorkách. Nutričné zložky boli analyzované rôznymi metódami a to spektrofotometrickými metódami, elektroforetickou analýzou, plynovou chromatografiou a ďalšími metódami.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Proteíny, športová výživa, doplnok stravy, nutričné zložky

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on choosing the non-traditional sources of proteins, their characterization and subsequently its potential applications in diet of sportsmen.

The theoretical part is focused on specification of importance of proteins in nutrition, description of different available protein supplements for sportsmen and essential characterization of chosen samples.

The practical part of this bachelor thesis is focused on analysis of proteins, sacharides and lipids in samples. Nutritional components were analysed by different methods such as spectrophotometric methods, electrophoresis, gas chromatography etc.

KEYWORDS

Proteins, sport nutrition, dietary supplement, nutrition components

KUBISOVÁ, P. *Netradiční zdroje proteinů a možnosti jejich aplikace*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. 47 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne, a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

podpis študenta

Pod'akovanie

Na tomto mieste by som chcela poďakovať vedúcej tejto bakalárskej práce Ing. Petre Matouškovej, Ph.D. za cenné rady, ochotu pomôcť, ústretovosť a trpezlivosť. Ďalej by som rada poďakovala mojej rodine za podporu a trpezlivosť, ktorú mi poskytovali počas štúdia.

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	TEORETICKÁ ČASŤ	10
2.1	Proteíny	10
2.1.1	Význam	10
2.1.2	Funkcie.....	10
2.2	Výživa a proteíny.....	10
2.2.1	Biologická hodnota proteínov	11
2.2.2	Trávenie	11
2.2.3	Zdroje proteínov v potrave.....	12
2.2.3.1	Živočíšne zdroje.....	12
2.2.3.2	Rastlinné zdroje.....	12
2.2.4	Odporúčané denné dávky proteínov	13
2.3	Proteíny v športovej výžive.....	13
2.3.1	Proteínové výživové doplnky	14
2.3.1.1	Srvátkové proteíny	14
2.3.1.2	Kazeínové proteíny	15
2.3.1.3	Vaječné proteíny	15
2.3.1.4	Sójové proteíny	16
2.3.1.5	Hrachové proteíny	17
2.3.1.6	Konopné proteíny.....	17
2.3.2	Odporúčané dávkovanie proteínov u športovcov	18
2.4	Vybrané netradičné zdroje proteínov	18
2.4.1	Hmyz – cvrček domáci (<i>Acheta domestica</i>)	18
2.4.2	Hrach.....	19
2.4.3	Cícer.....	19
2.4.4	Chia semienka	20
2.4.5	Konopné semienka.....	20
2.4.6	Chlorella.....	21
3	CIELE PRÁCE.....	22
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	23
4.1	Použité chemikálie.....	23
4.2	Použité prístroje a pomôcky.....	23

4.3	Úprava vzoriek	24
4.3.1	Mletie vzoriek.....	24
4.3.2	Hydrolyza	24
4.4	Spektrofotometrické stanovenie proteínov.....	24
4.4.1	Stanovenie proteínov podľa Hartree-Lowryho.....	24
4.5	Spektrofotometrické stanovenie sacharidov.....	25
4.5.1	Stanovenie celkových sacharidov podľa Duboisa	25
4.5.2	Stanovenie redukujúcich cukrov podľa Somogyi-Nelsona.....	25
4.6	Papierová chromatografia aminokyselín.....	26
4.7	Chromatografia sacharidov na tenkej vrstve	27
4.8	Stanovenie celkového dusíku podľa Kjeldahla	27
4.9	SDS-PAGE.....	27
4.9.1	Príprava vzoriek.....	27
4.9.2	Príprava separačného gélu.....	28
4.9.3	Príprava zaostrovacieho gélu.....	28
4.9.4	Príprava elektroforetických pufrov	28
4.9.5	Farbenie gélu	29
4.10	Analýza lipidov.....	30
4.10.1	Extrakcia lipidov	30
4.10.2	Transesterifikácia lipidov	30
4.10.3	Analýza pomocou plynovej chromatografie.....	30
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	31
5.1	Stanovenie obsahu proteínov podľa Hartree – Lowryho	31
5.2	Stanovenie celkového dusíku a hrubej bielkoviny podľa Kjeldahla	31
5.3	Separácia proteínov pomocou SDS-PAGE	32
5.4	Aminokyseliny vo vzorkách.....	33
5.5	Stanovenie obsahu celkových sacharidov podľa Duboisa	34
5.6	Stanovenie obsahu redukujúcich cukrov podľa Somogyi – Nelsona	35
5.7	Chromatografia sacharidov na tenkej vrstve	35
5.8	Gravimetrická analýza lipidov	36
5.9	Analýza lipidov prostredníctvom plynovej chromatografie.....	37
5.9.1	Kvalitatívne a kvantitatívne zastúpenie mastných kyselín.....	38
5.9.1.1	Cvrčia múka.....	38

5.9.1.2	Chlorella	38
5.9.1.3	Hrach	39
5.9.1.4	Cícer	39
5.9.1.5	Konopné semenka	40
5.9.1.6	Chia semenka	40
5.10	Porovnanie nutričného zloženia vzoriek	41
6	ZÁVER	42
7	POUŽITÉ ZDROJE	44
8	POUŽITÉ SKRATKY	47

1 ÚVOD

Zdravá výživa sa najmä v posledných rokoch stáva stále obľúbenejšou témou čoraz väčšieho množstva ľudí. Kvalita a zloženie potravín, ich pôvod či spôsob spracovania no v neposlednom rade aj cena sú základnými faktormi, ktorými sa spotrebiteľ riadi pri výbere zo širokej škály rôznych produktov. Hoci názory a cesty na správny spôsob stravovania sa líšia, predsa sa stretávajú v jednom bode a to v riešení optimálneho pomeru živín obsiahnutých v konzumovaných potravinách.

Vyvážený spôsob stravovania je zvlášť dôležitou časťou života športovcov. Pri svojom pravidelnom tréningu a výdaji energie je zameranie sa na ideálny príjem živín ďalšou časťou dennej rutiny, ktorá ovplyvňuje podanie optimálneho športového výkonu. Základný príjem všetkých živín by mal byť zabezpečený vyváženým každodenným stravovaním. V súčasnosti je však na trhu už dostupných niekoľko desiatok rôznych druhov výživových doplnkov, ktoré profesionálni ale aj rekreační športovci využívajú takmer na dennej báze. Odborníci sa však zhodujú v názore, že tieto suplementy by nemali a ani nemôžu plnohodnotne nahradiť vyvážený spôsob stravovania a živiny z tejto stravy prijaté.

Čoraz väčšie množstvo populácie taktiež trpí rôznymi intoleranciami či alergiami. Ďalej sa stále viac ľudí prikláňa k alternatívnym spôsobom stravovania ako sú vegetariánstvo či vegánstvo. Vzhľadom na tieto fakty neustále narastá aj dopyt po nových a teda aj netradičných výživových zdrojoch. Proteíny, ako jeden zo základných makronutrientov, by nemali v tomto smere zostať zabudnuté.

Táto práca sa zameriava na skúmanie množstva základných nutričných zložiek vybraných rastlinných ale aj živočíšnych produktov. Testovanie jednotlivých vzoriek sa pritom orientuje najmä na možnú budúcu aplikáciu v športovej výžive. Proteíny a proteínové doplnky sú totiž najbežnejšími a najžiadanejšími výživovými doplnkami vo výžive športovcov.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Proteíny

Proteíny (bielkoviny) sú vysokomolekulové látky nachádzajúce sa vo všetkých živých organizmoch. Tieto makromolekuly sa skladajú z jedného alebo viacerých polypeptidových reťazcov. Každý polypeptid pozostáva z reťazca aminokyselín spojených peptidovými väzbami. Aminokyseliny, ktoré sa vyskytujú v proteínoch sa označujú ako kódované aminokyseliny [1],[2].

2.1.1 Význam

Bielkoviny sú najbohatším zdrojom látok obsahujúcich dusík vo výžive a v organizme. Tieto dôležité látky majú aj energetickú hodnotu, avšak táto je telom využívaná len v určitých metabolických situáciách. Ľudský genóm, zložený z približne 30 000 génov, obsahuje stovky tisícov proteínov, ktoré sú zodpovedné za ľudskú jedinečnosť.

Na základe týchto faktov je zrejmé, že príjem proteínov, ale aj jednotlivých konkrétnych aminokyselín môže mať významný vplyv na činnosť tkanív, funkcie orgánov a udržanie celkového zdravia jedinca [3].

2.1.2 Funkcie

Hlavné funkcie bielkovín môžeme zhrnúť do niekoľkých bodov:

- a) štruktúrna – bielkoviny sú súčasťou membránových štruktúr, kože, kĺbov, väzív a ostatných tkanív,
- b) enzýmová – vo forme enzýmov sú súčasťou veľkého množstva biologických a chemických procesov v organizme,
- c) transportná – proteíny ako hemoglobín, transferín a ďalšie majú štruktúru, ktorá im umožňuje prenášať iné látky, najmä kyslík a železo,
- d) pohybová – kontraktilné bielkoviny aktín a myozín sú nevyhnutnou súčasťou mechanickej činnosti svalu,
- e) obranná – vo forme protilátok ochraňujú organizmus pred škodlivými prvkami z vonkajšieho a vnútorného prostredia organizmu,
- f) regulačná – sú súčasťou viacerých regulačných hormónov,
- g) transformačná – bielkoviny sa zúčastňujú na prenose nervového impulzu,
- h) nutričná – sú zdrojom esenciálnych a neesenciálnych aminokyselín, z ktorých sa syntetizujú telu vlastné proteíny

Vymenované funkcie plnia bielkoviny u všetkých živých organizmov a podmieňujú ich druhovú špecifitu [1].

2.2 Výživa a proteíny

Bielkoviny, ktoré prijímame v potrave, nie sú organizmom využívané v nezmenenom stave. Naopak, prechádzajú rôznymi premenami, aby mohli byť telom spracované a využité správnym spôsobom. Proteíny sú zložené z aminokyselín, ktoré pre organizmus predstavujú najdôležitejší zdroj dusíkatých zlúčenín. Hlavnou a základnou funkciou týchto zlúčenín je vytvoriť substrát a základ potrebný pre syntézu proteínov telu vlastných [5].

2.2.1 Biologická hodnota proteínov

Kvalitu proteínov posudzujeme podľa zastúpenia esenciálnych aminokyselín vo vhodnom pomere a tiež podľa stráviteľnosti konkrétneho proteínu. Miera kvality bielkoviny je charakterizovaná biologickou hodnotou proteínov. BH udáva, koľko gramov telu vlastných proteínov môže byť vytvorených zo 100 g proteínov prijatých z potravy. BH možno zvýšiť kombinovaním proteínov z rôznych zdrojov, ktoré sa môžu líšiť v zastúpení jednotlivých aminokyselín [4].

Tabuľka 1 – Biologické hodnoty rôznych zdrojov proteínov [4]

Potravina	BH [%]
Celé vajce	100
Mäso	92 – 96
Ryby	94 – 96
Mlieko	88
Syry	82 – 85
Sója	84
Zelené riasy	81
Raž	76
Fazuľa	72
Ryža	70
Zemiaky	70
Chlieb	70
Šošovica	60
Pšenica	56
Hrach	56
Kukurica	54

2.2.2 Trávenie

Trávenie bielkovín, podobne ako aj trávenie ďalších zložiek potravy, je súbor za sebou nasledujúcich procesov a reakcií.

Pred vlastnou konzumáciou a trávením proteínov dochádza väčšinou k ich tepelnému spracovaniu. Spracovanie vedie k rozloženiu ich priestorovej štruktúry. Čo sa týka výživy, je proces rozkladu priestorovej štruktúry dôležitý pretože sa ním zjednoduší prístup tráviacich enzýmov k funkčným skupinám proteínov a teda sa zlepši ich stráviteľnosť.

Vlastné trávenie bielkovín sa po mechanickom spracovaní v ústach začína v žalúdku. V prítomnosti HCl a za pôsobenia pepsínov dochádza v prostredí s pH 2 až pH 5 k štiepeniu peptidových väzieb proteínov. V tenkom čreve sú vplyvom hydrogénuhličitanu zo slinivky brušnej pepsíny neutralizované. Ďalej v tenkom čreve pôsobia šťavy obsahujúce enzýmy ako trypsín a chymotrypsín, ktoré katalyzujú štiepenie na tripeptidy a dipeptidy. Napokon ich enzým aminopeptidáza rozkladá na jednotlivé aminokyseliny. Tie sa dostávajú do krvného obehu a portálnou žilou do pečene, kde sú ďalej spracovávané a rozvádzané do tela [5].

2.2.3 Zdroje proteínov v potrave

Vo všeobecnosti možno zdroje proteínov rozdeliť do dvoch základných kategórií, a to živočíšne zdroje a rastlinné zdroje.

2.2.3.1 Živočíšne zdroje

Medzi živočíšne zdroje proteínov patria rôzne druhy mäsa, mlieko a mliečne výrobky a vajcia. Výhodou týchto zdrojov je, že obsahujú všetky esenciálne aminokyseliny (histidín, izoleucín, leucín, lyzín, methionín, fenylalanín, threonín, tryptofán, valín). Nemusia byť kombinované s inými potravinami a nazývajú sa tiež kompletne proteíny [6].

Tabuľka 2 – Obsah proteínov v niektorých potravinách živočíšneho pôvodu [7]

Potravina	Obsah (od – do) [%]	Obsah (priemer) [%]
Hovädzie mäso	13,1 – 27,0	20,8
Bravčové mäso	9,1 – 20,0	15,5
Hydina	12,8 – 23,7	21,1
Zverina	20,8 – 24,3	22,8
Ryby	16,0 – 29,0	18,7
Kravske mlieko	3,0 – 3,4	3,2
Slepačie vajce	–	13,0

2.2.3.2 Rastlinné zdroje

K rastlinným zdrojom bielkovín sa radia najmä strukoviny a obilniny, ale tiež orechy a semená. Medzi kompletne proteíny patria z rastlinných zdrojov sójové bôby a quinoa. Na rozdiel od živočíšnych zdrojov, však väčšina z nich neobsahuje všetky esenciálne aminokyseliny a ich nutričná hodnota je v tomto dôsledku nižšia. Vzhľadom na tieto fakty je potrebné rastlinné zdroje vhodne kombinovať, aby bol zabezpečený dostatočný prísun všetkých aminokyselín [8].

Tabuľka 3 – Obsah proteínov v niektorých potravinách rastlinného pôvodu [7]

Potravina	Obsah [%]
Pšenica	11,7
Žito	11,6
Ovos	12,6
Cícer	17,5
Hrach	22,0 – 28,0
Šošovica	25,0 – 30,0
Sójové bôby	38,0

2.2.4 Odporúčané denné dávky proteínov

Denná potreba a aj odporúčané dávky proteínov sú závislé na faktoroch ako je vek, pohlavie, zamestnanie či zdravotný stav jedinca. Všetky odporúčané dávky sú všeobecné a optimálny príjem bielkovín každého organizmu je individuálny.

Pre zdravého dospelého človeka by mal príjem proteínov tvoriť 10 – 15 % denného energetického príjmu. Minimálna potreba bielkovín pre človeka bez výraznej fyzickej aktivity je denne 0,8 g na kilogram hmotnosti.

Bielkoviny sú dôležitou súčasťou výživy, ale ich príliš vysoký príjem môže mať negatívny efekt na organizmus. Pri prekročení istého množstva príjmu proteínov klesá ich ďalšie využitie v tele. Ďalej môžu byť výrazne zaťažené obličky a pečeň a neprímeraný príjem bielkovín tiež môže mať vplyv na metabolizmus vápnika v organizme [9].

Tabuľka 4 – Odporúčané denné dávky proteínov pre mužov [10]

Fyzická záťaž	Vek	
	19 – 34 rokov	35 – 59 rokov
Sedavé zamestnanie	66 g/deň	64 g/deň
Stredne ťažká práca	70 g/deň	68 g/deň
Ťažká fyzická práca	76 g/deň	72 g/deň

Tabuľka 5 – Odporúčané denné dávky proteínov pre ženy [10]

Fyzická záťaž	Vek	
	19 – 34 rokov	35 – 59 rokov
Sedavé zamestnanie	52 g/deň	51 g/deň
Stredne ťažká práca	57 g/deň	55 g/deň
Ťažká fyzická práca	61 g/deň	58 g/deň

2.3 Proteíny v športovej výžive

Rozdiely medzi organizmom trénovaného športovca a bežného človeka sú markantné. Prispôsobenie tela na záťaž trénovanému športovcovi umožní podávať vyššie výkony. Z tohto hľadiska je zrejmé, že aj výživové nároky sa líšia [11].

Hlavnými faktormi, ktoré ovplyvňujú potrebné množstvo bielkovín u športovcov sú ich tréningový režim a pravidelný príjem živín. Väčšina športovcov prijme dostatok proteínov v každodennom bežnom jedle. Proteíny prijímané prostredníctvom výživových doplnkov budú poskytovať už len minimálnu ďalšiu prídavnú hodnotu [12].

Vplyv na metabolickú odpoveď organizmu pri prijímaní proteínu u športovca má aj načasovanie požitia proteínu, obsah aminokyselín, kombinácia s iným výživovým doplnkom ale aj typ cvičenia. Samotnú účinnosť doplnku ovplyvňuje aj dávkovanie, dĺžka podávania, aktuálny zdravotný stav užívateľa, spôsob výživy, kvalita produktu. Žiadny výživový doplnok však nemôže kompletne nahradiť klasickú stravu a nemôže byť nutrične komplexný [13].

2.3.1 Proteínové výživové doplnky

Proteínové suplementy patria medzi základné a najznámejšie výživové doplnky vo výžive športovcov. Na trhu sú dostupné v rôznych formách ako sú prášky, tyčinky, nápoje ale aj kapsule.

Obsah čistého proteínu v suplementoch sa v jednotlivých výrobkoch líši. Vo väčšine prípadov na 100 g hmotnosti proteínového doplnku pripadá 50 g až 95 g samotných proteínov.

Proteínové výživové doplnky sú vyrábané zo spracovaných bielkovín, ktoré sú obsiahnuté v mlieku, mäse, vajciach a strukovinách. Proteínové suplementy je najvhodnejšie rozpúšťať vo vode. Mlieko nie je vhodné, pretože proteínové doplnky rozpustené vo vode sú lepšie stráviteľné [14].

Jedným zo základných kritérií pri výbere proteínu je schopnosť vstrebávať sa a zásobovať tak telo esenciálnymi aminokyselinami. Túto schopnosť charakterizuje tzv. index pomeru účinnosti proteínu (PER – Protein Efficiency Ratio) a index stráviteľnosti (PDCAAS – Protein Digestibility-Corrected Amino Acids Score). PER index sa vypočíta ako pomer prírastku telesnej hmotnosti k hmotnosti prijatej bielkoviny [15].

2.3.1.1 Srvátkové proteíny

Srvátkový proteín je najznámejší proteínový suplement používaný športovcami pre rýchlejšiu regeneráciu a rast svalovej hmoty.

Srvátkový proteín je biely prášok, ktorý sa rozpúšťa vo vode a vytvára tak roztok na konzumáciu. Srvátka je žltozelená tekutina vznikajúca pri zrážaní mlieka a práve táto tekutina sa používa na výrobu srvátkových výživových doplnkov. Bielkovina v srvátke je jednou z dvoch hlavných proteínov v mlieku a to rýchlo vstrebateľnou. Druhým proteínom je kazeín, ktorý je pomaly vstrebateľnou bielkovinou. Pomer srvátkovej a kazeínovej bielkoviny v mlieku je 1:4.

V športovej výžive je srvátkový proteín najrýchlejšie vstrebateľným zdrojom. Používa sa teda najmä v obdobiach, kedy organizmus potrebuje okamžite doplniť stavebné elementy pre rast svalov. Tiež pôsobí ako antioxidant pozitívne ovplyvňujúci imunitný systém [16].

Športovci obľubujú tento druh proteínu aj vďaka jeho vhodnému aminokyselinovému zloženiu. Je bohatý okrem iného najmä na leucín, izoleucín a valín. Taktiež obsahuje všetkých deväť esenciálnych aminokyselín.

Srvátkový proteín je tiež spájaný s pozitívnym vplyvom na kontrolu hladiny cukru v krvi, cholesterolu v organizme a tiež na mentálne zdravie konzumenta. Srvátkové suplementy môžu poskytnúť do výživy vysoko kvalitné proteíny. Väčšina zdravotníckych organizácií však odporúča prijímanie proteínu radšej z prirodzeného zdroja, teda z každodennej potravy [17].

Srvátkové bielkoviny možno podľa stupňa spracovania rozdeliť na tri typy:

- a) Srvátkový koncentrát – vyrába sa zo sladkej mliečnej srvátky, obsahuje 35 – 89 % bielkovín. V porovnaní s izolátom a hydrolyzátom obsahuje viac tuku a sacharidov a je horšie stráviteľný. Má vysoký obsah rozvetvených aminokyselín. Zo spomínaných troch typov sa považuje za najmenej kvalitný.

- b) Srvátkový izolát – podľa druhu výroby sa delí na dve skupiny:
- Mikrofiltrovaný srvátkový izolát – v porovnaní s koncentrátom má vyšší podiel bielkovín (90 – 95 %), nízky obsah tuku a sacharidov, dobre ho znášajú aj ľudia intolerantní na laktózu, obsahuje vysoké množstvo rozvetvených aminokyselín a vápnika.
 - Srvátkový izolát vyrobený iónovou výmenou – je vyrobený z čerstvej sladkej srvátky, obsahuje o približne 5 % viac proteínov ako mikrofiltrovaný izolát, neobsahuje laktózu a ani tuk.
- c) Srvátkový hydrolyzát – radí sa medzi najkvalitnejšie bielkoviny, hydrolyzovaná srvátka je dobre využiteľná organizmom pretože je predtrávená, hydrolyza neznižuje nutričnú hodnotu proteínu [18].

2.3.1.2 Kazeínové proteíny

Kazeín je pomaly sa vstrebávajúci mliečny proteín, ktorý ľudia často využívajú ako suplement. Aminokyseliny sú z tejto bielkoviny uvoľňované pomaly, približne až 7 hodín, preto je často konzumovaný pred spaním, kedy pomáha v budovaní svalovej hmoty a regenerácii počas spánku.

Kazeín tvorí 80 % z mliečnych proteínov. Podobne ako ostatné živočíšne zdroje aj kazeínový proteín obsahuje všetky esenciálne aminokyseliny potrebné na rast a regeneráciu.

Výživový doplnok vyrobený z kazeínu obsahuje približne 73 % proteínov, 9 % cukrov a 3 % tuku. Zvyšok tvoria rôzne mikronutrienty ako napríklad vápnik. Tieto hodnoty sú všeobecné, konkrétny obsah jednotlivých zložiek závisí na výrobcovi a značke. Na ľudský organizmus môže kazeínová bielkovina vplyvať pozitívne vo viacerých smeroch. Medzi benefity patrí redukcia vysokého krvného tlaku, zlepšenie imunitného systému, má tiež antioxidantný efekt. Kazeínový proteín sa vyskytuje v dvoch hlavných formách:

- Micelárny kazeín – najpopulárnejšia forma, pomaly stráviteľný
- Kazeínový hydrolyzát – táto forma je už predtrávená a teda sa organizmom spracúva rýchlejšie [19].

2.3.1.3 Vaječné proteíny

Vaječné proteíny patria medzi najkvalitnejšie proteíny živočíšneho pôvodu. Obsahuje všetky esenciálne aminokyseliny a je výborným zdrojom vysoko kvalitných bielkovín. Telom sú veľmi dobre a rýchlo stráviteľné.

Na rozdiel od ostatných proteínových suplementov, izolovaný vaječný proteín sa využíva okrem športovej výživy aj pri pečení. Proteínový prášok vyrobený z vaječných bielok má nízky obsah sacharidov a tukov.

Najviac zastúpenou aminokyselinou vo vaječných bielkovinách je leucín, proteín ho obsahuje približne 9 %. Práve leucín je hlavnou aminokyselinou zodpovednou za rast svalových vlákien. Obsah leucínu vo vajciach je o 10 – 20 % vyšší než vo väčšine ostatných zdrojov bielkovín. Viac leucínu než vaječný proteín obsahuje srvátka.

Medzi nevýhody vaječných proteínov patrí fakt, že podobne ako iné produkty môže spôsobovať alergie, ktoré sa prejavujú najmä tráviacimi ťažkosťami. Je to z dôvodu vysokého obsahu síry vo vaječnej bielkovine.

Vaječný proteínový výživový doplnok sa vyrába tak, že sa najprv vyizoluje vaječný bielok. Ten je následne sušený a drvený. Vo výrobkoch je niekedy obsiahnutý aj vaječný žltok, no vo väčšine prípadov tieto doplnky pozostávajú len z bielkov [20].

2.3.1.4 Sójové proteíny

Sójové bôby, pochádzajúce z rastliny sója fazuľová (*Glycine max*), sú všestranným a bohatým zdrojom živín rôzneho druhu. Sú taktiež výborným zdrojom vysoko kvalitných proteínov. Sójové bôby predstavujú alternatívny zdroj bielkovín pre ľudí, ktorí sú alergickí na mliečne proteíny.

Sójový proteín je ľahko stráviteľný a obsahuje všetky esenciálne aminokyseliny. Aj keď methionín obsahuje v menšej miere, je veľmi dobrým a bohatým zdrojom lyzínu. Nárast konzumácie sójového proteínu súvisí s jeho nepopierateľnými kvalitami ako výborné nutričné hodnoty, dostupnosť a nízka cena sóje.

Po odstránení tukov zo sójových bôbov je zvyšný proteínový materiál nazývaný tiež odtučnené vločky. Ako výživové doplnky existujú sójové proteíny v troch formách. Sójová múka alebo krupica, sójové proteínové koncentráty a sójové proteínové izoláty obsahujú 50 – 90 % proteínov v závislosti na konkrétnom výrobku.

- a) Sójová múka a krupica – múka a krupica sú pripravené rozomletím sójových bôbov na menšie častice, minimálny obsah proteínov v týchto výrobkoch sa pohybuje v rozmedzí 40 – 50 % pričom toto množstvo je závislé tiež na obsahu tuku.
- b) Sójový proteínový koncentrát – čistejší ako múka a krupica, obsahuje minimálne 70 % proteínov. Proteínový koncentrát je vyrobený z múky odstránením oligosacharidov, časti popola a niektorých minoritných zložiek. Jedným zo spôsobov výroby sójového proteínového koncentrátu je čistenie odtučnenej múky v roztoku alkoholu. Proteíny a polysacharidy sú v alkoholoch nerozpustné zatiaľ čo sú cukry a ostatné komponenty odstránené. Koncentrát je potom zneutralizovaný a vysušený.
- c) Sójový proteínový izolát – najčistejšia forma sójového proteínu, obsahuje minimálne 90 % proteínov. Sú vyrábané odstránením vo vode nerozpustných polysacharidov, oligosacharidov a ostatných vysoko molekulových látok. Odtučnené sójové vločky alebo sójová múka sú povarené v neutrálnom až mierne alkalickom vodnom prostredí pri pH 7 – 8,5 za zvýšenej teploty. Polysacharidy a vo vode nerozpustné proteíny sú následne odseparované. pH odseparovanej zložky je upravené na hodnotu 4,5. Vyzrážané proteíny sú oddelené filtráciou alebo centrifugáciou. Potom sú neutralizované a sušené [21].

2.3.1.5 Hrachové proteíny

Najviac hrachových proteínov sa nachádza v žltom hrachu (*Pisum sativum*). Je výborným zdrojom rastlinných bielkovín. Najmä pre vegetariánov predstavuje alternatívny zdroj príjmu proteínov. Okrem iného má tiež vysoký obsah vlákniny a má nízku energetickú ale vysokú výživovú hodnotu.

Najväčším konkurentom hrachu medzi rastlinnými zdrojmi je už vyššie spomínaná sója. Sója je však na rozdiel od hrachu častejším alergénom. Hrášok neobsahuje lepok a teda je vhodný aj pre ľudí trpiacich celiakiou [22].

Kvalitný hrachový proteín obsahuje minimálne 75 % bielkovín a nízke percento tukov. Z esenciálnych aminokyselín obsahuje vo vysokej miere najmä leucín, izoleucín a valín. Na druhej strane tyrozín a methionín sa v ňom vyskytujú len v malom množstve. Tieto dve aminokyseliny sú zas bohato obsiahnuté v ryžovom proteíne. Hrachový proteín je z tohto dôvodu vhodné kombinovať práve s ryžovým.

Trávenie hrachového proteínu je v porovnaní so srvátkovým pomalšie, čo však umožňuje organizmu kvalitne ho spracovať. Proteíny z hrachu obsahujú veľa arginínu, ktorý pozitívne ovplyvňuje hladinu krvného tlaku. Tento proteín tiež pomáha regulovať hladinu cukru v krvi a množstvo cholesterolu.

Nevýhodou hrachových bielkovín, ako už bolo spomenuté, môže byť, že neobsahujú všetky esenciálne aminokyseliny, čo môže byť vyriešené kombináciou s iným proteínom.

Hrachový proteín sa vyrába tak, že sa najprv mechanicky odstráni vonkajšie obaly struku. Hrach je potom rozomletý na múku. Z múky sa bielkoviny od vlákniny a škrobu odstráni mokrou filtráciou. Po vyzrážaní a odstredení vzniká proteínový izolát.

Negatívny vplyv na kvalitu hrachového proteínového izolátu môže mať kyselina fytová a množstvo oligosacharidov. Využitelnosť hrachových bielkovín je ovplyvnená aj správnym vstrebávaním minerálnych látok. Práve toto vstrebávanie kyselina fytová narušuje. Čo sa týka oligosacharidov, kvôli nedostatku enzýmov potrebných na ich spracovanie, spôsobujú tráviace ťažkosti. Nadbytočné oligosacharidy a kyselina fytová sa z hrachového proteínového izolátu odstraňujú ultrafiltráciou [23].

2.3.1.6 Konopné proteíny

Konopný proteínový doplnok je ďalším druhom proteínového suplementu vhodným nielen pre vegetariánov. Okrem výborne stráviteľných bielkovín obsahuje tiež veľké množstvo vlákniny. Konopný proteín je ľahko stráviteľný a nespôsobuje nadúvanie. Ako jeden z mála rastlinných zdrojov obsahuje všetky esenciálne aminokyseliny a teda sa radí medzi kompletné zdroje. Štruktúrou je podobný vaječnému proteínu. Konopný proteín je zo 65 % tvorený edestínom. Edestín je globulárny proteín a zložením je najviac podobný proteínom nachádzajúcim sa v ľudskom tele. Z tohto dôvodu sú z konopného proteínu živiny ľahšie absorbovateľné.

Konopný proteín sa vyrába z konopných semienok. Po vylisovaní konopného oleja z konopných semienok ako zvyšok po spracovaní zostáva tzv. celozrnná konopná múka, ktorá obsahuje veľké množstvo vitamínov a stopových prvkov. Celozrnná konopná múka je preosiata, čím je oddelená hrubá časť otrúb od jemného konopného prášku. Preosiaty konopný prášok už predstavuje samotný konopný proteín obsahujúci až do 50 % bielkovín [24].

2.3.2 Odporúčané dávkovanie proteínov u športovcov

Bielkoviny sa v tele neskladujú vo veľkých množstvách. Z tohto dôvodu je potrebné ich príjem pred športovým výkonom správne načasovať, aby mohli byť využité čo najefektívnejšie. Ako vhodný čas príjmu sa uvádza 2 – 3 hodiny pred športovým výkonom. Dávky proteínov u športovcov sa odporúčajú vyššie ako pre nešportovcov avšak nie príliš vysoké [25].

Denný príjem bielkovín by nemal presiahnuť vhodnú normu, pretože ich nadmerné množstvo môže spôsobiť napríklad problémy vo fungovaní obličiek. Nadmerné užívanie tiež môže spôsobiť spomalenie rastu svalovej hmoty, bolesť pri cvičení ale môže zvýšiť aj možnosť infekcie.

Strava s veľkým množstvom bielkovín tiež oberá organizmus o horčík, vápnik a zinok. Toto môže mať negatívny vplyv na kondíciu kostí, či hladinu krvného tlaku a celkovo riziko vzniku kardiovaskulárnych ochorení [26].

Tabuľka 6 – Odporúčané denné dávky bielkovín pre športovcov [26]

Prijímateľ	Denná dávka bielkoviny [g/kg hmotnosti]
Dospelý so sedavým zamestnaním	0,8
Kondične cvičiaci dospelý	1,0 – 1,5
Dospelý športovec	1,2 – 1,8
Dospievajúci športovec v raste	1,6 – 1,8
Dospelý budujúci svalovú hmotu	1,4 – 1,8
Športovec obmedzujúci príjem energie	1,6 – 1,8
Maximálna využiteľná dávka pre dospelého	1,8

2.4 Vybrané netradičné zdroje proteínov

Na analýzy bolo vybraných a použitých šesť rôznych zdrojov proteínov. Tieto zdroje boli živočíšneho ale tiež rastlinného pôvodu.

2.4.1 Hmyz – cvrček domáci (*Acheta domestica*)

Hmyz patrí medzi najbohatšie zdroje proteínov živočíšneho pôvodu. Používaný v podobe sypkého jemného prášku – múky. Múka obsahuje kvalitnú bielkovinu a viac železa, vápniku a vitamínu B než normálne mäso.

Hmyz, ako zdroj bielkoviny, je tiež ekologicky menej zaťažujúci pre životné prostredie. V porovnaní s hovädzím mäsom sa na rovnaké množstvo vyrobených bielkovín spotrebuje až dvanásťkrát menej krmiva, nespotrebuje sa takmer žiadna voda a vyprodukuje sa až stokrát menej skleníkových plynov [27].

Konzumácia hmyzu najmä v krajinách na východe Ázie ako sú Čína či Thajsko je bežnou súčasťou potravy. V Českej republike sa na trh dostali proteínové tyčinky obsahujúce múku z cvrčkov. Jedna energetická tyčinka obsahuje približne 32 cvrčkov, proteínová až 132 kusov tohto hmyzu [29].

Tabuľka 7 – Zastúpenie niektorých živín v múke z cvrčkov[28]

Nutričná zložka	Množstvo (na 100 g múky)
Proteíny	70 g
Omega – 3 mastné kyseliny	2,8 g
Železo	5,9 mg
Vápnik	170 mg
Vitamín B12	24 µg



Obrázok 1 – Proteínové tyčinky z cvrčej múky [29]

2.4.2 Hrach

Strukovina, ktorej vysušené semená sú využívané na konzumáciu. Je získavaný z rastliny, ktorá sa nazýva hrach siaty (*Pisum sativum*). Ide o najrozšírenejšiu strukovinu na svete.

Hrach je bohatým zdrojom dôležitých látok vďaka obsahu pomerne vysokému obsahu proteínov, škrobu, vlákniny, minerálov a vitamínov. Z aminokyselín obsiahnutých v proteínoch hrachu je najzastúpenejší glutamín ďalej nasleduje kyselina asparágová, arginín a lyzín. Najmenej tieto proteíny obsahujú methionín, tryptofán a cysteín [30].

Tabuľka 8 – Zastúpenie niektorých živín v hrachu [31]

Nutričná zložka	Obsah [g/100 g výrobku]
Bielkoviny	25,0
Sacharidy	57,0
Cukry (z celkových sacharidov)	5,67
Tuky	1,0
Nasýtené mastné kyseliny (z celkových tukov)	0,04
Soľ	0,01

2.4.3 Cícer

Ide o strukovinu známu tiež ako rímsky hrach. Získava sa z rastliny, ktorá sa nazýva cícer baraní (*Cicer arietinum*). Semená sú nažltlé guľovitého tvaru. Po hrachu a fazuli je treťou najrozšírenejšou strukovinou na svete [32].

Tabuľka 9 – Zastúpenie niektorých živín v cícer [33]

Nutričná zložka	Obsah [g/100 g výrobku]
Bielkoviny	19,0
Sacharidy	44,0
Cukry (z celkových sacharidov)	3,1
Tuky	5,9
Nasýtené mastné kyseliny (z celkových tukov)	0,6
Vláknina	15,0

2.4.4 Chia semenka

Chia semenka pochádzajú z rastliny šalvia hispánska (*Salvia hispanica*). Zrníčka sú oválne, majú hnedastú až čiernu farbu a sú bez výraznej chuti.

Chia semená sú bohatým zdrojom omega-3 mastných kyselín, antioxidantov, vlákniny, bielkovín, minerálov a vitamínov. Sú tiež výborným zdrojom energie. Vo vode zväčšujú svoj objem a vytvárajú gélovitú hmotu. Táto hmota po konzumácii udržuje stabilnú hladinu cukru v krvi. Chia obsahujú dostatok vlákniny, ktorá napomáha tráveniu a podporujú detoxikáciu organizmu [34].

Tabuľka 10 – Zastúpenie niektorých živín v chia semenách [35]

Nutričná zložka	Obsah [g/100 g výrobku]
Bielkoviny	21,0
Sacharidy	4,9
Cukry (z celkových sacharidov)	0,8
Tuky	31,0
Nasýtené mastné kyseliny (z celkových tukov)	3,8
Vláknina	34,0

2.4.5 Konopné semenka

Získavajú sa z rastliny konopa siata (*Cannabis sativa*), ktorá je pestovaná pre potravinárske účely. Tento druh obsahuje minimálne množstvo THC a to len v listoch, v semenkách sa nenachádza vôbec.

Konopné semenka obsahujú ideálny pomer omega-6 a omega-3 mastných kyselín, čo je 3:1. Vďaka gama linolénovej kyseline majú pozitívny vplyv na hormonálnu sústavu. Tieto semenka tiež obsahujú všetky esenciálne aminokyseliny, čo je u rastlín zriedkavé [36].

Tabuľka 11 – Zastúpenie niektorých živín v konopných semenách [37]

Nutričná zložka	Obsah [g/100 g výrobku]
Bielkoviny	29,0
Sacharidy	2,8
Cukry (z celkových sacharidov)	1,9
Tuky	55,0
Nasýtené mastné kyseliny (z celkových tukov)	4,8
Vláknina	4,1

2.4.6 Chlorella

Chlorella je sladkovodná riasa s vysokým obsahom zeleného farbiva chlorofylu. Vďaka tomuto ju zaradíme do kategórie zelených potravín.

Je to komplexný zdroj výživných látok potrebných pre organizmus. Obsahuje vysoký podiel bielkovín, betakaroténu, vitamínov a stopových prvkov. Pozitívne vplýva na imunitu, detoxikuje organizmus, podporuje tvorbu krvi a tiež činnosť a stabilitu nervového systému [38].

Tabuľka 12 – Zastúpenie niektorých živín v chlorelle [39]

Nutričná zložka	Obsah [g/100 g výrobku]
Bielkoviny	60,0
Sacharidy	8,0
Cukry (z celkových sacharidov)	0,3
Tuky	8,0
Nasýtené mastné kyseliny (z celkových tukov)	2,0
Vláknina	13,0



Obrázok 2 – Použité produkty [31],[33],[35],[37],[39]

3 CIELE PRÁCE

Cieľom práce je popis netradičných zdrojov proteínov a návrh ich vhodných aplikácií predovšetkým vo forme športových doplnkov stravy. V rámci práce boli riešené nasledujúce úlohy:

- 1) Výber netradičných zdrojov proteínov a ich základná charakterizácia
- 2) Porovnanie vybraných zdrojov proteínov
- 3) Návrh vhodných foriem aplikácie vybraných zdrojov proteínov v športových doplnkoch stravy

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité chemikálie

- Vínan sodno – draselný tetrahydrát p.a., Lach:Ner (ČR)
- Uhličitan sodný bezvodý p.a., Lach:Ner (ČR)
- Hydroxid sodný p.a., Lach:Ner (ČR)
- Síran meďnatý pentahydrát p.a., Lach:Ner (ČR)
- Folin-Ciocalteauvo činidlo, Serva (Nemecko)
- Kyselina sírová 96 % p.a., Lach:Ner (ČR)
- Kyselina octová ľadová 98 % p.a., Lach:Ner (ČR)
- Kyselina chlorovodíková 35 % p.a., PENTA (ČR)
- Butan-1-ol p.a., PENTA (ČR)
- Propan-2-ol p.a., PENTA (ČR)
- Hexán p.a., PENTA (ČR)
- Chloroform pre HPLC, PENTA (ČR)
- Hydrogenuhličitan sodný p.a., Lach:Ner (ČR)

4.2 Použité prístroje a pomôcky

- Analytické váhy, Boeco (Nemecko)
- Predvážky: Kern 440-33 (Nemecko)
- Predvážky Ohaus ScoutPro (USA)
- Elektrický sekáčik, Hyundai (Čína)
- Termostat INCU-Line, VWR (USA)
- Centrifúga Boeco U-32R, Hettich Zentrifugen, (Nemecko)
- Vortex, TK3S, Kartell spa (USA)
- Nanophotometer UV/VIS Spectrophotometer, IMPLEN (Nemecko)
- VAPODEST, Gerhardt (Nemecko)
- Aparatúra pre elektroforézu - Mini-PROTEAN, BioRad (USA)
- Extraktor SOXTHERM, Gerhardt (Nemecko)
- Vákuová rotačná odparka Werke RV06-ML:IKA (Nemecko)
- Plynový chromatograf, TRACE GC, ThermoQuest Italia S. p. A (Taliansko)
- Chromatografický papier Whatman č. 4
- Silufol

4.3 Úprava vzoriek

4.3.1 Mletie vzoriek

Vzorky hrachu a cíceru boli zakúpené ako bežne dostupné strukoviny. Obidve vzorky boli rozomleté pomocou elektrického sekáčiku na jemné častice. Následne boli uchovávané v uzatvorenej nádobe pri laboratórnej teplote.

Vzorky konopných a chia semienok boli tiež zakúpené ako bežne dostupné potravinárske produkty. Semienka boli na jemno rozdrvené v miske pomocou mažiaru. Po rozdrvení boli uchovávané v uzavretej nádobe pri laboratórnej teplote.

Vzorky cvrčej múky a chlorelly boli dostupné priamo vo forme jemného prášku (múky). Boli uchovávané v uzavretej nádobe pri laboratórnej teplote.

4.3.2 Hydrolýza

Na hydrolýzu proteínov vo vzorkách bola použitá kyselina chlorovodíková. Roztok koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej bol zriedený na koncentráciu $6 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Tento roztok bol následne použitý pri hydrolýze.

Do 6 baniek, pre každú vzorku jedna, bolo navážených 20 g rozomletých vzoriek. K rozomletým vzorkám bolo pridaných 60 ml zriedenej kyseliny chlorovodíkovej. Následne boli banky so suspenziami vložené do autoklávu, kde bol nastavený program s teplotou 124°C . Po skončení hydrolýzy boli suspenzie scentrifugované a kvapalný podiel bol použitý na ďalšie experimenty.

4.4 Spektrofotometrické stanovenie proteínov

Pre kvantitatívnu analýzu proteínov bola vybraná metóda na stanovenie celkového obsahu proteínov podľa Hartree-Lowryho.

Ako porovnávací proteín na zostrojenie kalibračnej závislosti bol použitý komerčný bovinný albumín. Kalibračná závislosť koncentrácie proteínov na absorbancii bola meraná pri vlnovej dĺžke 650 nm. Prípadné potrebné riedenie vzoriek bolo prevádzané destilovanou vodou.

Celkové proteíny podľa Hartree-Lowryho boli premerané vo vzorkách pred hydrolýzou aj po hydrolýze.

4.4.1 Stanovenie proteínov podľa Hartree-Lowryho

Pre stanovenie celkových proteínov vo vzorkách pred hydrolýzou boli pripravené roztoky vzoriek v destilovanej vode o koncentrácii 1 mg/ml. Pre stanovenie po hydrolýze bol použitý odcentrifugovaný kvapalný podiel hydrolyzovaných vzoriek.

Do skúmaviek bol odpipetovaný 1 ml roztoku vzorky. Následne bolo do každej skúmavky pridané 0,9 ml Hartree-Lowryho činidla A a roztoky boli inkubované vo vodnom kúpeli pri 50°C po dobu 10 minút. Po inkubácii boli skúmavky ochladené na laboratórnu teplotu a po pridaní 0,1 ml činidla B boli ponechané 10 minút pri laboratórnej teplote. Nakoniec boli pridané 3 ml činidla C a roztoky boli opäť inkubované pri teplote 50°C po dobu 10 minút. Následne bola na spektrofotometri zmeraná absorbancia pri vlnovej dĺžke 650 nm oproti slepej vzorke [40].

Činidlo A: 500 ml činidla A bolo pripravené zmiešaním a rozpustením nasledujúcich chemikálií a následnom doplnení objemu na 500 ml destilovanou vodou: [40]

- 1 g vlnan sodno – draselný tetrahydrát
- 50 g uhličitan sodný
- 250 ml hydroxid sodný o koncentrácii $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

Činidlo B: 100 ml činidla B bolo pripravené zmiešaním a rozpustením nasledujúcich chemikálií a následnom doplnení objemu na 100 ml destilovanou vodou: [40]

- 2 g vlnan sodno – draselný tetrahydrát
- 1 g síran meďnatý pentahydrát
- 10 ml hydroxid sodný o koncentrácii $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

Činidlo C: činidlo C bolo pripravené zriedením Folin-Ciocalteauvho činidla destilovanou vodou v pomere 1:15 [40].

4.5 Spektrofotometrické stanovenie sacharidov

Pre kvantitatívnu analýzu sacharidov boli vybrané dve spektrofotometrické metódy. Stanovenie celkových sacharidov bolo prevedené metódou podľa Duboisa. Redukujúce cukry boli stanovené metódou podľa Somogyi-Nelsona.

Obidvoma metódami boli premeriavané vzorky pred hydrolyzou a aj po hydrolyze.

4.5.1 Stanovenie celkových sacharidov podľa Duboisa

Na zostrojenie kalibračnej závislosti bol použitý základný vodný roztok glukózy o koncentrácii 1 mg/ml. Kalibračná závislosť koncentrácie sacharidov na absorbancii bola meraná pri vlnovej dĺžke 490 nm. Prípadné potrebné riedenie vzoriek bolo prevádzané destilovanou vodou.

Pre stanovenie celkových sacharidov vo vzorkách pred hydrolyzou boli pripravené roztoky vzoriek v destilovanej vode o koncentrácii 2 mg/ml. Pre stanovenie po hydrolyze bol použitý odcentrifugovaný kvapalný podiel hydrolyzovaných vzoriek.

Do skúmaviek bol odpipetovaný 1 ml roztoku vzorky. Následne bol pridaný 1 ml 5 % roztoku fenolu a 5 ml koncentrovanej kyseliny sírovej. Zmes bola pretrepaná a ponechaná 30 minút pri laboratórnej teplote. Napokon bola na spektrofotometri zmeraná absorbancia pri vlnovej dĺžke 490 nm oproti slepej vzorke [40].

4.5.2 Stanovenie redukujúcich cukrov podľa Somogyi-Nelsona

Na zostrojenie kalibračnej závislosti bol použitý základný vodný roztok glukózy o koncentrácii 1 mg/ml. Kalibračná závislosť koncentrácie sacharidov na absorbancii bola meraná pri vlnovej dĺžke 720 nm. Prípadné potrebné riedenie vzoriek bolo prevádzané destilovanou vodou.

Pre stanovenie redukujúcich cukrov vo vzorkách pred hydrolyzou boli pripravené roztoky vzoriek v destilovanej vode o koncentrácii 2 mg/ml. Pre stanovenie po hydrolyze bol použitý odcentrifugovaný kvapalný podiel hydrolyzovaných vzoriek.

Do skúmaviek bol odpipetovaný 1 ml roztoku vzorky. Následne bol pridaný 1 ml Somogyiho činidla pripraveného tesne pred stanovením zmiešaním činidiel I a II

v pomere 4:1. Potom boli roztoky v skúmavkách zahrievané 15 minút vo vodnom kúpeli. Po ochladení na laboratórnu teplotu boli do každej skúmavky pridané 2 ml Nelsonovho činidla. Objem skúmaviek bol doplnený na 10 ml destilovanou vodou a absorbancia bola zmeraná pri vlnovej dĺžke 720 nm oproti slepej vzorke [41].

Somogyiho roztok I: 800 ml bolo pripravené zmiešaním a rozpustením nasledujúcich chemikálií a následnom doplnení objemu na 800 ml destilovanou vodou: [41]

- 24 g uhličitan sodný bezvodý
- 16 g hydrogenuhličitan sodný
- 12 g Seignettova soľ
- 144 g síran sodný

Somogyiho roztok II: 200 ml bolo pripravené zmiešaním a rozpustením nasledujúcich chemikálií a následnom doplnení objemu na 200 ml destilovanou vodou: [41]

- 4 g síran meďnatý pentahydrát
- 36 g síran sodný

Nelsonovo činidlo: činidlo bolo pripravené zmiešaním a rozpustením nasledujúcich chemikálií: [41]

- 25 g molybdénan amónny v 450 ml destilovanej vody
- 21 ml koncentrovaná kyselina sírová
- 2 g hydrogénarzeničnan sodný heptahydrát v 25 ml destilovanej vody

Činidlo pred použitím stálo 48 h pri 37°C a bolo uchovávané v tmavej fľaši.

4.6 Papierová chromatografia aminokyselín

Ako štandardy pri papierovej chromatografii boli použité 0,5% roztoky aminokyselín v izopropanole.

Na papieri Whatman č. 4 boli 1 cm od kraja nanesené hydrolyzované vzorky. Papier bol vložený do chromatografickej komory, v ktorej bola vyvíjacia zmes. Vyvíjanie bolo ukončené, keď vyvíjacia zmes dosiahla 1 cm od konca papiera. Po vyvinutí bol chromatogram vysušený. Potom bol postriekaný 0,1% roztokom ninhydrínu a opäť usušený. Boli zmerané retenčné faktory jednotlivých škvrn aminokyselín [40].

Vyvíjacia zmes: 100 ml zmesi bolo pripravené zmiešaním nasledujúcich chemikálií: [40]

- 60 ml butanol
- 15 ml ľadová kyselina octová
- 25 ml destilovaná voda

4.7 Chromatografia sacharidov na tenkej vrstve

Ako štandardy pri chromatografii sacharidov na tenkej vrstve boli použité 2% roztoky cukrov v chloroforme.

Na doske Silufol boli 1 cm od kraja nanesené 2% roztoky hydrolyzovaných vzoriek. Silufol bol vložený do chromatografickej komory, v ktorej bola vyvíjacia zmes. Vyvíjanie bolo ukončené, keď vyvíjacia zmes dosiahla 1 cm od konca Silufolu. Po vyvinutí bol chromatogram vysušený. Potom bol postriekaný detekčným činidlom a opäť usušený. Boli zmerané retenčné faktory jednotlivých škvrn cukrov [40].

Vyvíjacia zmes: 120 ml zmesi bolo pripravené zmiešaním nasledujúcich chemikálií: [40]

- 60 ml ethylacetát
- 40 ml izopropanol
- 20 ml destilovaná voda

4.8 Stanovenie celkového dusíku podľa Kjeldahla

Pred stanovením boli vzorky mineralizované. Do mineralizačných trubíc bol navážený 1 g rozomletých vzoriek. Do trubíc bolo ku každej vzorke pridaných 10 ml koncentrovanej kyseliny sírovej a 2 g Weiningerovho katalyzátoru. Vzorky boli v mineralizačnom bloku mineralizované až pokiaľ neboli číre [42].

Mineralizáty vzoriek boli v mineralizačných trubiciach rozpustené v malom množstve vody. Bolo pridaných niekoľko kvapiek fenolftaleínu. Mineralizačná trubica bola vložená do prístroja VAPODEST (Gerhardt), kde bol pridaný hydroxid sodný a prebehla destilácia. V prístroji bola pripravená predloha, ktorá obsahovala pre vzorky chlorelly a cvrčkej múky 75 ml kyseliny sírovej o koncentrácii $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Pre ostatné vzorky predloha obsahovala 25 ml kyseliny. Po skončení destilácie bol do predlohy pridaný Tashiro indikátor a roztok bol titrovaný roztokom hydroxidu sodného o koncentrácii $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ [42].

4.9 SDS-PAGE

Ako proteínový štandard pri SDS-PAGE bol použitý komerčný proteínový štandard PageRuler™ Prestained Protein Ladder.

Na gél bolo nanesených 5 μl štandardu a 30 μl roztoku vzorky. Elektroforéza prebiehala pri napätí 70 V a prúde 120 mA. Po skončení elektroforézy bol gél farbený (viď. 4.9.5 Farbenie gélu).

4.9.1 Príprava vzoriek

K 10 mg pomletej vzorky bol pridaný 1 ml kyseliny chlorovodíkovej o koncentrácii $6 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Roztoky boli inkubované vo vodnom kúpeli po dobu 15 minút a následne boli zneutralizované. K 100 μl pripravenej vzorky bolo pridaných 100 μl vzorkového pufru a roztok bol vo vodnom kúpeli povarený 5 minút [40].

4.9.2 Príprava separačného gélu

Pre analýzu bol použitý 8% separačný gél. 60 ml separačného gélu bolo pripravených zmiešaním nasledujúcich chemikálií:

- 28,2 ml ultračistej deionizovanej vody
- 16,2 ml AA/BIS
- 15 ml $1,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ Tris-HCl pufoer pH 8,8
- 0,6 ml 10% SDS

Zmes bola 5 minút ultrazvukovaná pre elimináciu prítomných vzduchových bublín a následne boli pridané nasledujúce chemikálie:

- 300 μl 10% APS
- 30 μl TEMED

Gél bol ihneď dávkovaný do aparatury [40].

4.9.3 Príprava zaostrovacieho gélu

10 ml zaostrovacieho gélu bolo pripravených zmiešaním nasledujúcich chemikálií:

- 4,7 ml ultračistá deionizovaná voda
- 2,7 ml AA/BIS
- 2,5 ml $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ Tris-HCl pufoer pH 8,8
- 0,1 ml 10% SDS

Zmes bola 5 minút ultrazvukovaná pre elimináciu prítomných vzduchových bublín a následne boli pridané nasledujúce chemikálie:

- 50 μl 10% APS
- 10 μl TEMED

Gél bol ihneď dávkovaný do aparatury nad separačný gél [40].

4.9.4 Príprava elektroforetických pufov

Elektródový pufoer (koncentrovaný)

Pre potreby elektroforézy bol koncentrovaný elektródový pufoer zriedený na 10% roztok. 1000 ml koncentrovaného pufru bolo pripravených pomocou nasledujúcich chemikálií: [40]

- 3 g Tris-HCl
- 14,4 g glycín
- 1 g SDS
- 1000 ml ultračistá deionizovaná voda

Vzorkový pufoer

10 ml vzorkového pufru bolo pripravené pomocou nasledujúcich chemikálií: [40]

- 5 ml glycerol (bezvodý)
- 2,13 ml $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ Tris-HCl o pH 6,8
- 2,56 ml β -merkptoethanol
- 1 mg bromfenolová modrá
- 1 g SDS
- Doplnené na 10 ml ultračistou deionizovanou vodou

4.9.5 Farbenie gélu

Po skončení elektroforézy bol gél vybratý zo sklíčok a 30 minút trepaný vo fixačnom roztoku. Potom bol gél ponorený a trepaný v premývacom roztoku 20 minút. Následne bol gél 2 minúty trepaný v senzibilizačnom roztoku. Gél bol dvakrát premytý ultračistou deionizovanou vodou. Potom bol gél zaliaty čerstvým farbiacim roztokom, v ktorom bol trepaný 20 minút, následne bol opäť premytý ultračistou deionizovanou vodou. Napokon bol gél trepaný v 300 ml vyvíjacieho roztoku a po vyvinutí bola redukcia ukončená pridaním 50 ml ukončovacieho roztoku.

Fixačný roztok: 1000 ml roztoku bolo pripravené zmiešaním a rozpustením nasledujúcich chemikálií a následnom doplnení objemu na 1000 ml ultračistou deionizovanou vodou:

- 120 ml ľadová kyselina octová
- 500 ml metanol
- 500 µl formaldehyd 35%

Premývací roztok: 1000 ml roztoku bolo pripravené pomocou 364 ml 96% ethanolu a doplnení objemu na 1000 ml ultračistou deionizovanou vodou.

Senzibilizačný roztok: 1000 ml roztoku bolo pripravené pomocou 200 mg thiosíranu sodného a doplnení objemu na 1000 ml ultračistou deionizovanou vodou.

Farbiaci roztok: 1000 ml roztoku bolo pripravené zmiešaním a rozpustením nasledujúcich chemikálií a následnom doplnení objemu na 1000 ml ultračistou deionizovanou vodou:

- 2 g dusičnan strieborný
- 760 µl formaldehyd 35%

Vyvíjací roztok: 1000 ml roztoku bolo pripravené zmiešaním a rozpustením nasledujúcich chemikálií a následnom doplnení objemu na 1000 ml ultračistou deionizovanou vodou:

- 60 g uhličitan sodný bezvodý
- 4 mg thiosíran sodný pentahydrát
- 500 µl formaldehyd 35%

Ukončovací roztok: 1000 ml roztoku bolo pripravené zmiešaním a rozpustením nasledujúcich chemikálií a následnom doplnení objemu na 1000 ml ultračistou deionizovanou vodou:

- 120 ml ľadová kyselina octová
- 500 ml metanol

4.10 Analýza lipidov

4.10.1 Extrakcia lipidov

Extrakcia lipidov zo vzoriek bola realizovaná pomocou prístroja SOXTHERM (Gerhardt). Ako rozpúšťadlo bol zvolený hexán. Extrakcia prebiehala pri nasledujúcich nastaveniach prístroja:

- maximálna teplota: 200 °C
- teplota extrakcie 170 °C
- redukčný interval: 3 min 30 s
- redukčný pulz: 3 s
- horúca extrakcia: 1 h 30 min
- evaporácia A: 5-krát interval
- extrakčný čas: 1 h
- evaporácia B: 2-krát interval
- evaporácia C: 10 min
- dĺžka programu: 3 h 4 min

Do extrakčných patrón boli navážené rozomleté vzorky. Patróny boli vložené do extrakčných baniek a k nim bolo pridaných 150 ml hexánu. Banky boli umiestnené do prístroja a bola spustená extrakcia.

Po ukončení extrakcie bol extrakt s rozpúšťadlom kvantitatívne prevedený do vopred zvaženej slzičkovej banky a umiestnený na vákuovú odparku. Po odparení rozpúšťadla bol odparok ochladený a zvážený. Následne bol odparok rozpustený v chloroforme pre HPLC tak, aby koncentrácia roztoku bola 2,5 mg/ml.

4.10.2 Transesterifikácia lipidov

Do krymplovacej skúmavky bol napipetovaný 1 ml extrahovanej vzorky rozpustenej v chloroforme pre HPLC. Ku vzorke bolo napipetovaných 0,8 ml transesterifikačnej zmesi. Transesterifikačná zmes obsahovala 15% obj. koncentrovanej kyseliny sírovej v metanole pre HPLC a 0,5 mg/ml kyseliny heptadekánovej (interný štandard). Skúmavky boli zakrymplované a vložené do termobloku, kde sa inkubovali 120 minút pri teplote 85 °C.

Po skončení transesterifikácie a vychladnutí vzoriek, sa celý obsah skúmaviek preliadol do 4 ml vialiek a k obsahu bolo napipetovaných 0,5 ml 0,05M NaOH. Vialky boli uzatvorené a 5 min trepané na multipozičnom vortexe. Po oddelení fáz sa zo spodnej chloroformovej fázy odpipetovalo 0,1 ml, ktoré boli prevedené do vialiek určených na GC analýzu. Do vialiek bolo následne napipetovaných 0,9 ml chloroformu pre HPLC a vialky boli uzavreté. Vzorky boli analyzované pomocou plynovej chromatografie.

4.10.3 Analýza pomocou plynovej chromatografie

Transesterifikované vzorky boli analyzované s použitím plynového chromatografu TRACE GC s automatickým dávkovačom. Detekcia prebehla plameňovo ionizačným detektorom. Nosným plynom bol vodík. Doba analýzy jednej vzorky bola 28 minút.

Dáta boli vyhodnocované v programoch TRACE a MS Excel. Identifikácia jednotlivých masných kyselín vo vzorkách prebehla na základe známych retenčných časov štandardov jednotlivých masných kyselín a ich kvantitatívne zastúpenie na základe plochy píku.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Stanovenie obsahu proteínov podľa Hartree – Lowryho

Celková koncentrácia proteínov vo vzorkách bola zistená na základe metódy podľa Hartree – Lowryho kolorimetrickej metódy podľa postupu uvedenom v kapitole 4.4. Pre stanovenie koncentrácie bola použitá kalibračná závislosť pre komerčný bovinný albumín Rovnica lineárnej regresie kalibračnej závislosti bola $y = 0,0083x$. Stanovenie bolo prevedené s hydrolyzovanými aj s nehydrolyzovanými vzorkami. Všetky vzorky boli premerané trikrát a zo získaných hodnôt bol vypočítaný priemer. Zastúpenie proteínov vo vzorkách je znázornené v tabuľke 13.

Tabuľka 13 – Výsledky stanovenia obsahu bielkovín

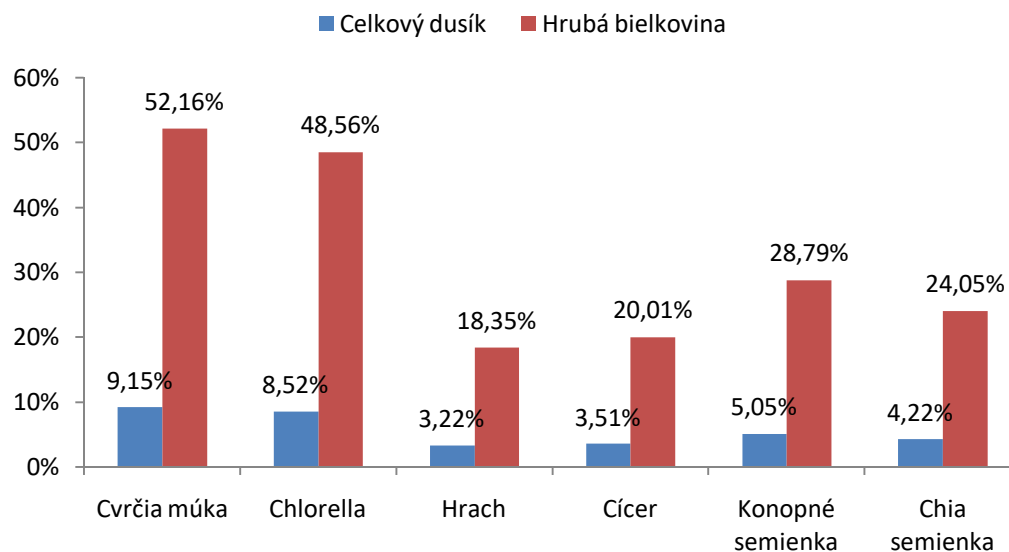
	Obsah proteínov [%]	
	Nehydrolyzované vzorky	Hydrolyzované vzorky
Cvrčia múka	26,81 ± 0,22	53,25 ± 0,99
Chlorella	23,71 ± 0,53	51,39 ± 0,97
Hrach	17,02 ± 0,25	19,18 ± 0,67
Cícer	15,90 ± 0,48	18,37 ± 0,63
Konopné semienka	18,77 ± 0,42	26,94 ± 0,47
Chia semienka	16,11 ± 0,32	20,16 ± 0,93

Pri nehydrolyzovaných vzorkách boli stanovené len proteíny rozpustné vo vode preto sú hodnoty obsahu proteínov nižšie. Pri vzorkách hydrolyzovaných sú vo výsledku už zahrnuté aj proteíny, ktoré vo vode rozpustné nie sú, a teda aj výsledný obsah bielkovín je vyšší.

Z nameraných výsledkov vyplýva, že najviac proteínov sa nachádza vo vzorke cvrčej múky. Naopak najmenej proteínov obsahuje vzorka hrachu.

5.2 Stanovenie celkového dusíku a hrubej bielkoviny podľa Kjeldahla

Stanovenie celkového dusíku podľa Kjeldahla bolo prevedené podľa postupu v experimentálnej časti v kapitole 4.8. Celkový dusík bol stanovený v mineralizáte vzoriek a stanovenie bolo prevedené jedenkrát. Hrubá bielkovina bola následne prepočítaná pomocou prepočítavacieho faktoru 5,70.



Obrázok 3 – Obsah celkového dusíku a hrubej bielkoviny

Z výsledkov stanovenia vyplýva, že najbohatším zdrojom bielkovín z vybraných vzoriek je jediný živočíšny zdroj a to cvrčia múka, ktorá obsahuje 52,16 % hrubej bielkoviny. Chlorella ako druhý najbohatší zdroj obsahuje 48,56 % hrubej bielkoviny. Zo strukovinových zdrojov viac proteínov obsahuje cícer, kde je obsah hrubej bielkoviny 20,01 %. Najmenej hrubej bielkoviny obsahuje vzorka hrachu, kde táto hodnota predstavuje 18,35 %.

5.3 Separácia proteínov pomocou SDS-PAGE

SDS-PAGE vertikálna elektroforéza na polyakrylamidovom gély bola prevedená podľa postupu uvedeného v experimentálnej časti v kapitole 4.9. Ako štandard bol použitý komerčný výrobok PageRuler™ Prestained Protein Ladder.



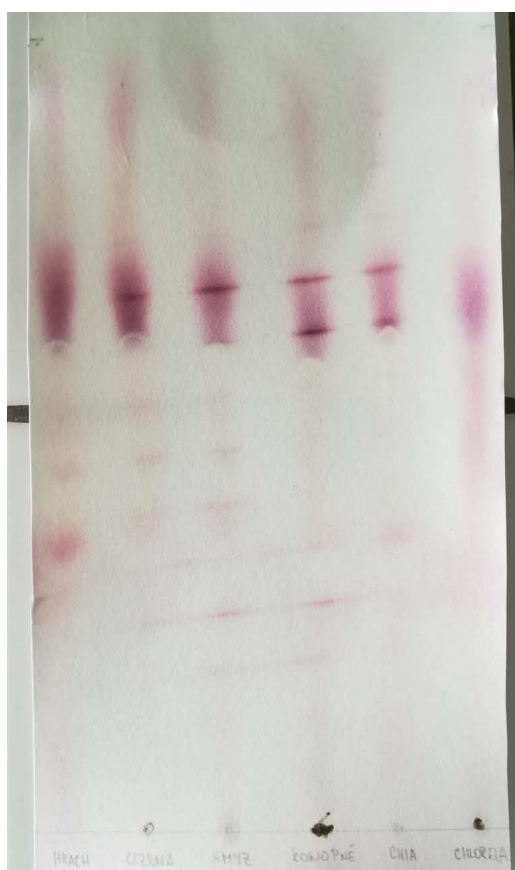
Obrázok 4 – Elektroforegram SDS-PAGE pri použití 8% gélu (farbenie striebrom)

Na výsledkoch delenia proteínov pomocou SDS-PAGE možno pozorovať, že na elektroforegrame sú jednotlivé vzorky rozmazané do súvislých pásov a konkrétne proteíny rozdelené podľa veľkosti nie sú viditeľné. Napriek tomu, možno vidieť, že najväčšie množstvo proteínov je opäť obsiahnuté v cvrčkej múke, ktorá je na elektroforegrame najvýraznejšia. Naopak najmenej výrazné sú vzorky konopných semienok a chia semienok.

Vo vzorkách hrachu a cíceru možno vidieť, že sa v nich nachádzajú najmä proteíny menšie ako 40 kDa. Vzorky konopných semienok, chia semienok a chlorelly obsahujú najmä bielkoviny o veľkosti menej ako 25 kDa.

5.4 Aminokyseliny vo vzorkách

Kvalitatívna analýza aminokyselín prítomných vo vzorkách bola prevedená prostredníctvom papierovej chromatografie. Ako štandardy boli použité 2% roztoky dostupných aminokyselín v izopropanole. Pre túto analýzu boli použité hydrolyzované vzorky.



Obrázok 5 – Vyvinutý chromatogram vzoriek po papierovej chromatografii

Tabuľka 14 – Aminokyseliny prítomné vo vzorkách

	Cvrčia múka	Chlorella	Hrach	Cícer	Konopné semienka	Chia semienka
Alanín	x		x	x	x	x
Arginín						
Asparagín						
Cystín	x	x	x	x	x	x
Glycín	x			x	x	
Kyselina asparágová	x	x	x	x	x	x
Leucín	x	x	x	x	x	x
Methionín						
Prolín	x		x	x	x	x
Tryptofán	x					x
Tyrozín	x					
Valín		x				

Vo všetkých vzorkách je prítomné bohaté spektrum aminokyselín (tabuľka 14). Na chromatograme je vidieť, že sa na nich nachádza niekoľko rozdelených aminokyselín, pričom najvýraznejšie sa prejavuje leucín, ktorý je prítomný vo všetkých vzorkách.

5.5 Stanovenie obsahu celkových sacharidov podľa Duboisa

Celkový obsah sacharidov vo vzorkách bol stanovený metódou podľa Duboisa podľa postupu uvedenom v kapitole 4.5.1. Ako štandard bol pre stanovenie použitý roztok glukózy, rovnica lineárnej regresie kalibračnej závislosti bola $y = 0,7344x$. Stanovenie bolo prevedené s hydrolyzovanými aj nehydrolyzovanými vzorkami. Všetky vzorky boli premerané trikrát a zo získaných hodnôt bol vypočítaný priemer. Zastúpenie sacharidov vo vzorkách je znázornené v tabuľke 15.

Tabuľka 15 – Výsledky stanovenia obsahu celkových sacharidov podľa Duboisa

	Obsah celkových sacharidov [%]	
	Nehydrolyzované vzorky	Hydrolyzované vzorky
Cvrčia múka	18,86 ± 0,61	20,31 ± 0,54
Chlorella	18,01 ± 0,24	19,62 ± 0,52
Hrach	65,57 ± 0,38	67,65 ± 0,55
Cícer	49,44 ± 0,42	51,22 ± 0,47
Konopné semienka	16,01 ± 0,23	18,46 ± 0,44
Chia semienka	13,37 ± 0,24	14,97 ± 0,59

Z uvedených výsledkov vyplýva, že najviac sacharidov obsahujú strukovínové zdroje hrach a cícer. Najmenej sacharidov obsahujú chia semienka. Hydrolyzované aj nehydrolyzované vzorky museli byť pri stanoveniach riedené až stokrát kvôli vysokej koncentrácii sacharidov.

5.6 Stanovenie obsahu redukujúcich cukrov podľa Somogyi – Nelsona

Redukujúce cukry vo vzorkách boli stanovené metódou podľa Somogyi – Nelsona podľa postupu uvedenom v kapitole 4.5.2. Ako štandard bol pre stanovenie použitý roztok glukózy, rovnica lineárnej regresie kalibračnej závislosti bola $y = 0,0071x$. Stanovenie bolo prevedené s hydrolyzovanými aj nehydrolyzovanými vzorkami. Všetky vzorky boli premerané trikrát a zo získaných hodnôt bol vypočítaný priemer. Zastúpenie redukujúcich sacharidov vo vzorkách je znázornené v tabuľke 16.

Tabuľka 16 – Výsledky stanovenia obsahu redukujúcich cukrov podľa Somogyi – Nelsona

	Obsah redukujúcich cukrov [%]	
	Nehydrolyzované vzorky	Hydrolyzované vzorky
Cvrčia múka	3,23 ± 0,38	18,15 ± 0,64
Chlorella	4,18 ± 0,67	17,94 ± 0,83
Hrach	22,16 ± 0,42	62,38 ± 0,52
Cícer	18,34 ± 0,56	48,65 ± 0,57
Konopné semienka	6,12 ± 0,33	15,32 ± 0,63
Chia semienka	8,63 ± 0,38	12,14 ± 0,87

Z uvedených výsledkov vyplýva, že všetky vzorky obsahujú veľa oligosacharidov a polysacharidov, ktoré boli hydrolyzou rozštiepené na redukujúce cukry. Z tohto dôvodu sú hodnoty pri hydrolyzovaných vzorkách vyššie.

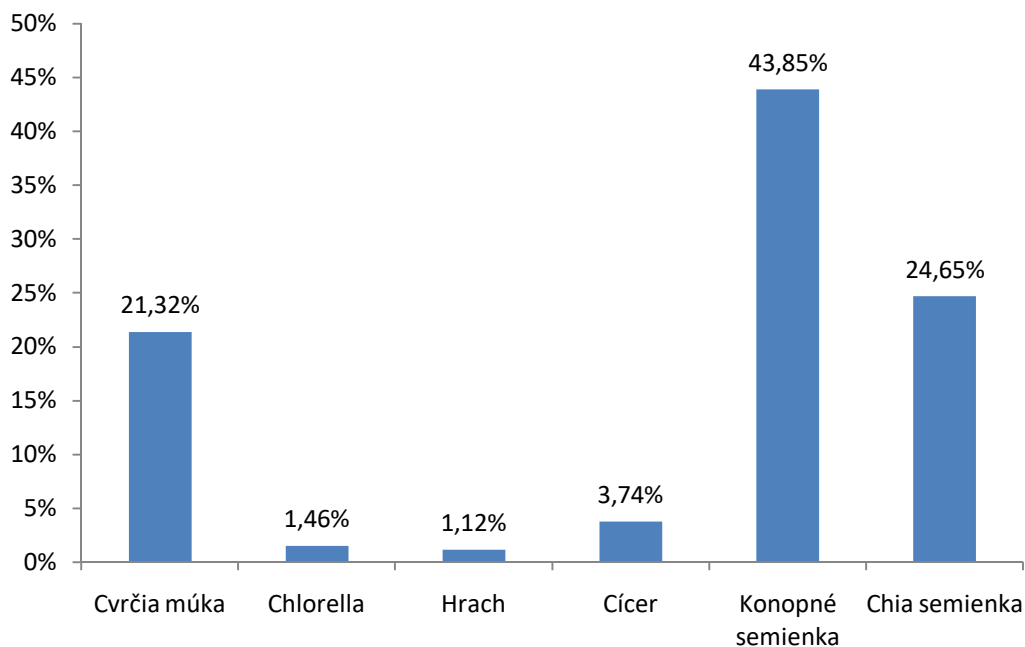
5.7 Chromatografia sacharidov na tenkej vrstve

Kvalitatívna analýza sacharidov bola prevedená TLC metódou. Ako štandardy boli použité roztoky dostupných sacharidov a to roztoky glukózy, fruktózy, maltózy, galaktózy, laktózy, xylulózy, arabinózy, sacharózy a rhamnózy.

Vzhľadom na veľké množstvo sacharidov vo vzorkách, sa na Silufole objavili súvislé stopy sacharidov. Konkrétne bolo možné detekovať len maltózu a galaktózu a to vo vzorkách hrachu a cíceru. Strukovinové vzorky hrachu a cíceru obsahujú najviac sacharidov, čo možno vidieť aj na spektrofotometrických stanoveniach (Tabuľka 15, Tabuľka 16). Vzhľadom na to sú aj ich stopy na chromatograme najvýraznejšie.

5.8 Gravimetrická analýza lipidov

Gravimetrická analýza lipidov bola prevedená v extraktoch lipidov, ktoré boli extrahované pomocou prístroja SOXTHERM (Gerhardt). Po odparení rozpúšťadla na vákuovej odparke, boli vzorky v bankách odparené a následne zvážené.

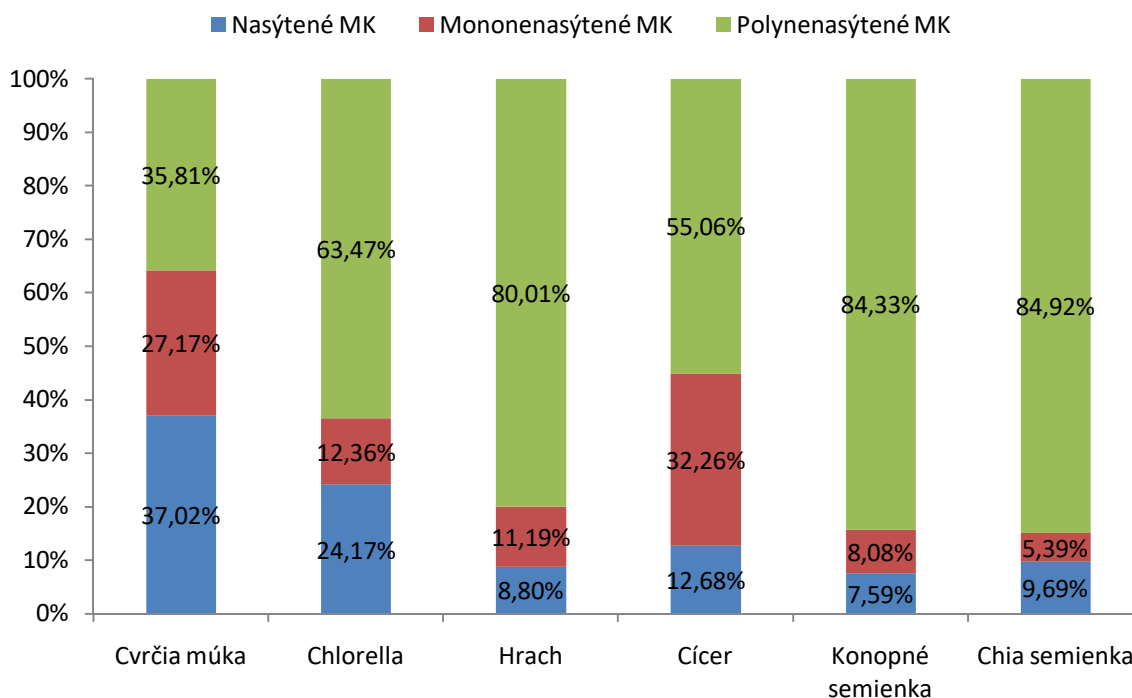


Obrázok 6 – Percentuálne zastúpenie lipidov v jednotlivých vzorkách

Z výsledkov gravimetrickej analýzy lipidov možno konštatovať, že najbohatšie sú lipidy zastúpené vo vzorke konopných semienok. Vysoký podiel lipidov obsahujú taktiež chia semienka a cvrčia múka. Tieto vzorky majú na druhej strane nižší podiel sacharidov. Najnižšie zastúpenie lipidov je vo vzorke hrachu a cíceru, ktoré sú naopak na sacharidy bohaté.

5.9 Analýza lipidov prostredníctvom plynovej chromatografie

Mastné kyseliny boli vo vzorkách analyzované prostredníctvom plynovej chromatografie po transesterifikácii extrahovaných lipidov.



Obrázok 7 – Zastúpenie mastných kyselín vo vzorkách podľa nasýtenosti

Mastné kyseliny prítomné vo vzorkách boli analyzované z hľadiska nasýtenosti. Najviac nasýtených mastných kyselín obsahuje cvrčia múka, ostatné vzorky obsahujú viac nenasýtených mastných kyselín.

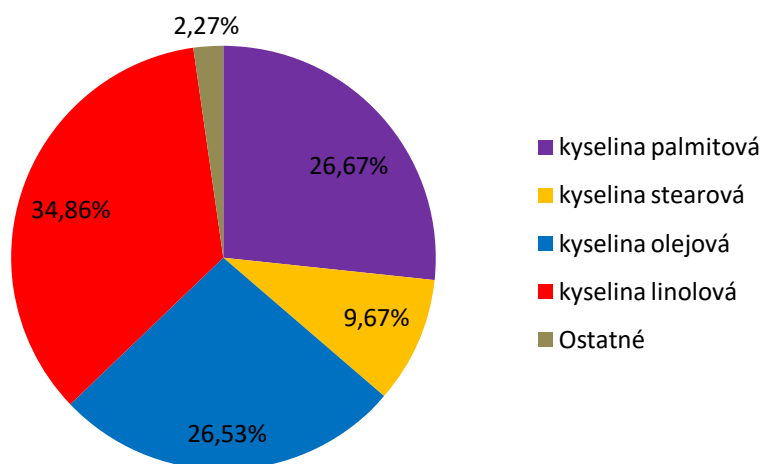
Cvrčia múka ako jediný živočíšny zdroj obsahuje viac tukov preto je v nej prítomných až 37,02 % nasýtených mastných kyselín. Naopak ostatné vzorky sú rastlinného pôvodu, a preto obsahujú najmä nenasýtené mastné kyseliny, ktoré sú väčšinou zložkami olejov.

Polynenasýtené mastné kyseliny sú oproti mononenasýteným mastným kyselinám vo vyššej miere zastúpené vo všetkých vzorkách. Výrazný rozdiel vykazujú najmä všetky rastlinné vzorky.

5.9.1 Kvalitatívne a kvantitatívne zastúpenie mastných kyselín

Vo vzorkách boli kvantitatívne a kvalitatívne analyzované mastné kyseliny. Mastné kyseliny, ktorých zastúpenie bolo nižšie ako 1 %, boli v grafoch zahrnuté do jednej kategórie označenej ako „Ostatné“.

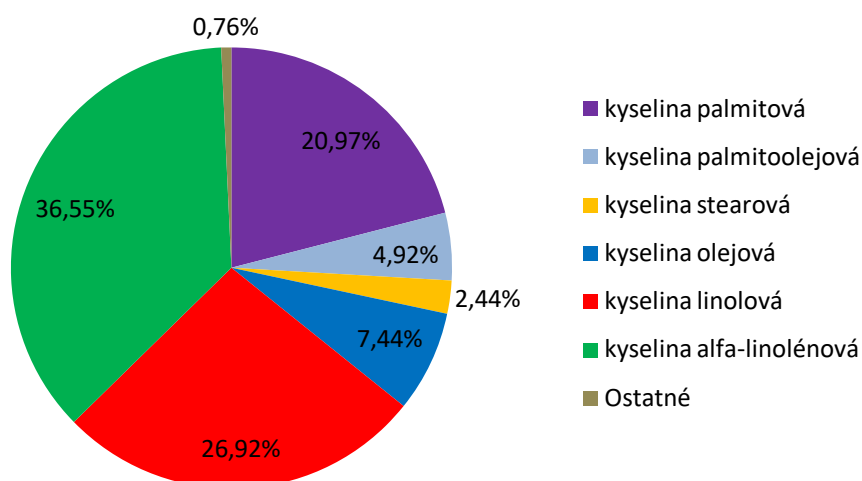
5.9.1.1 Cvrčia múka



Obrázok 8 – Zastúpenie mastných kyselín vo vzorke cvrčej múky

Vzorka cvrčej múky obsahuje celkovo 21,32 % lipidov (Obrázok 6). Z tohto množstva je najviac zastúpená kyselina linolová, čo je polynenasýtená mastná kyselina, ktorá patrí medzi omega – 6 mastné kyseliny. Vysoký podiel v tejto vzorke má aj kyselina palmitová, ktorá je zo všetkých vzoriek najviac zastúpená práve v cvrčej múke. Spoločne s kyselinou stearovou patria medzi nasýtené mastné kyseliny, ktorých sa celkovo najviac nachádza v cvrčej múke.

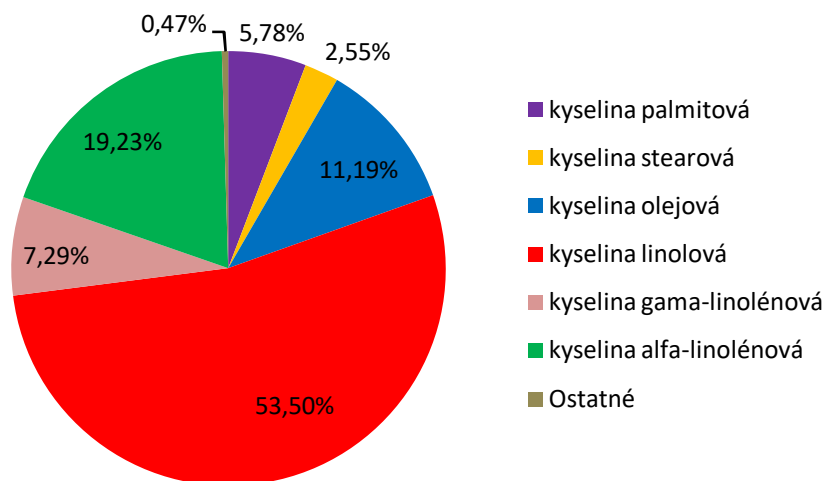
5.9.1.2 Chlorella



Obrázok 9 – Zastúpenie mastných kyselín vo vzorke chlorelly

Vo vzorke chlorelly bolo detekované bohaté spektrum mastných kyselín hoci chlorella celkovo obsahuje len 1,46 % lipidov (Obrázok 6). Najvyšší podiel predstavuje kyselina α – linolénová, ktorá patrí medzi polynenasýtené mastné kyseliny a zároveň medzi omega – 3 mastné kyseliny. Vysoké percentuálne zastúpenie má aj kyselina linolová a kyselina palmitová. Oproti ostatným vzorkám sa chlorella líši prítomnosťou kyseliny palmitolejovej, ktorá sa v žiadnej inej vzorke nenachádza. Je to mononenasýtená mastná kyselina a hydrogenáciou prechádza na kyselinu palmitovú.

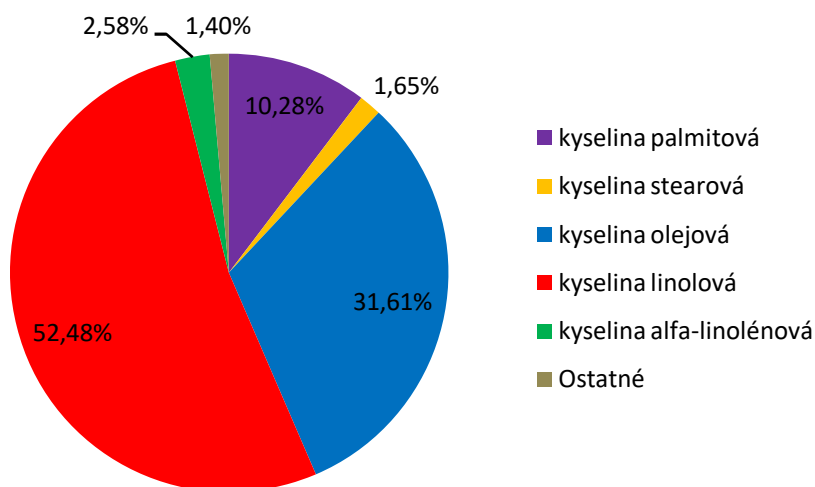
5.9.1.3 Hrach



Obrázok 10 – Zastúpenie mastných kyselín vo vzorke hrachu

Vzorka hrachu obsahuje celkovo 1,12 % lipidov, čo je najmenej zo všetkých vzoriek (Obrázok 6). Najvyšší podiel v tejto vzorke má kyselina linolová. Vzorka hrachu tiež obsahuje kyselinu linolénovú a to vo forme alfa aj gama. Kyselinu γ – linolénovú obsahujú len dve vzorky a to práve hrach a ďalej konopné semienka. Táto kyselina patrí medzi omega – 6 mastné kyseliny a to spolu s kyselinou linolovou. Vo vzorke hrachu majú teda práve omega – 6 mastné kyseliny celkovo najvyšší podiel

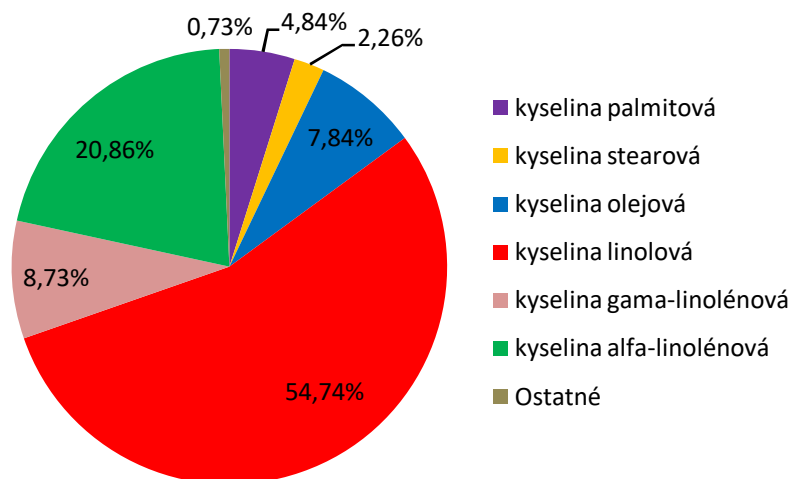
5.9.1.4 Cícer



Obrázok 11 – Zastúpenie mastných kyselín vo vzorke cíceru

Vo vzorke cíceru sa celkovo nachádza 3,74 % lipidov (Obrázok 6). Podobne ako vzorka hrachu aj cícer obsahuje v najvyššej miere kyselinu linolovú. Spomedzi všetkých vzoriek obsahuje najviac kyseliny olejovej, čo je mononenasýtená masťná kyselina. Je to omega – 9 nenasýtená masťná kyselina. Oproti ostatným rastlinným vzorkám má najnižší podiel kyseliny α – linolénovej a to len 2,58 % z celkového množstva masťných kyselín.

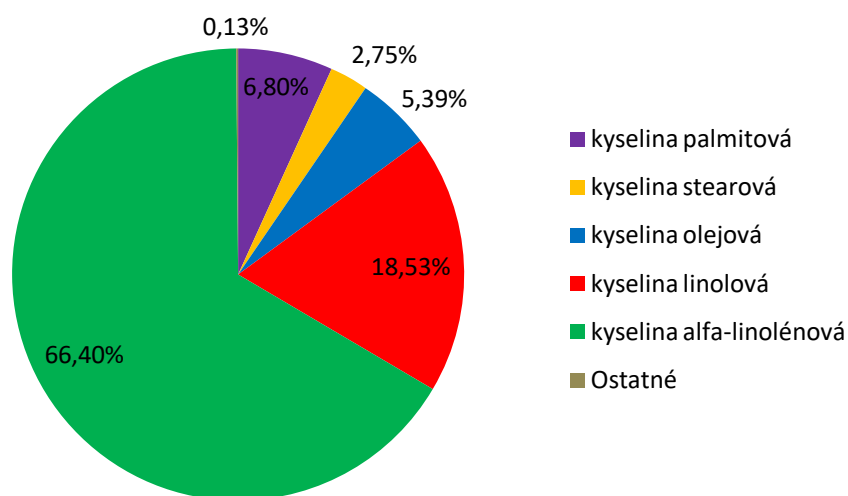
5.9.1.5 Konopné semienka



Obrázok 12 – Zastúpenie masťných kyselín vo vzorke konopných semienok

Konopné semienka obsahujú celkovo najviac tukov zo všetkých vzoriek a to až 43,85 %. V porovnaní s ostatnými vzorkami, má podobné spektrum masťných kyselín ako hrach. V tejto vzorke bol detekovaný najvyšší podiel kyseliny linolovej spomedzi všetkých vzoriek a to až 54,74 % z celkového množstva masťných kyselín. Taktiež spoločne s hrachom ako jediné zo vzoriek obsahujú kyselinu γ – linolénovú.

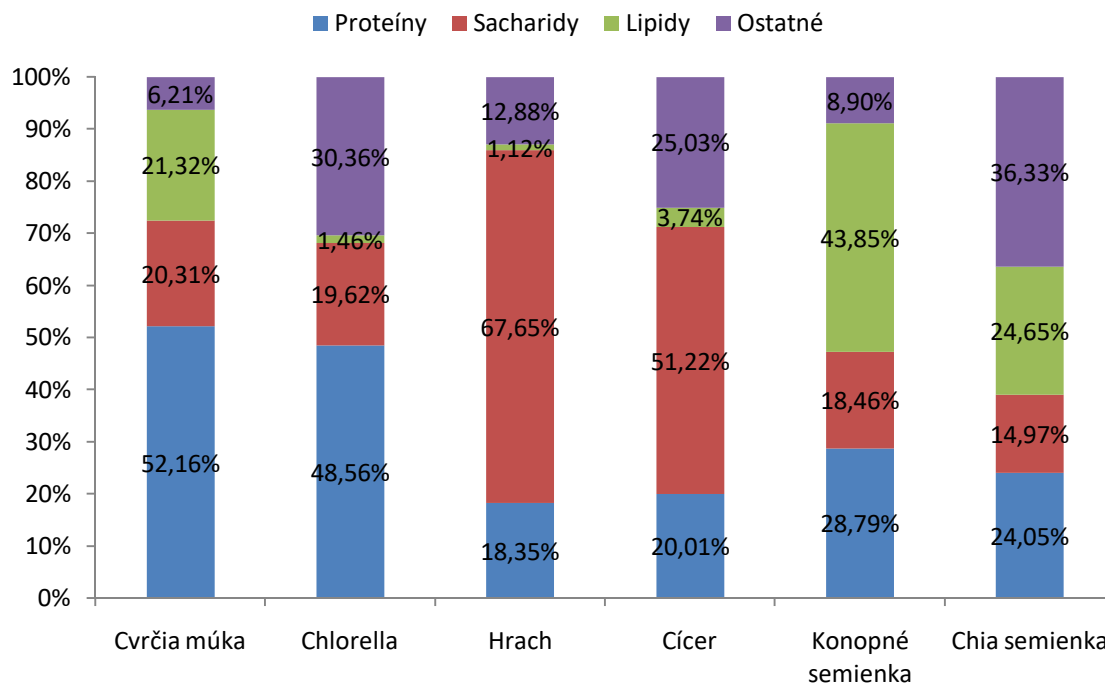
5.9.1.6 Chia semienka



Obrázok 13 – Zastúpenie masťných kyselín vo vzorke chia semienok

Vo vzorke chia semienok sa celkovo nachádza 24,65 % lipidov. Spektrum mastných kyselín v tejto vzorke je zaujímavé najmä z hľadiska podielu kyseliny α – linolénovej, ktorá je v chia semienkach zastúpená v najvyššej miere a to až podielom 66,40 %. Táto mastná kyselina patrí medzi omega – 3 mastné kyseliny, ktoré pozitívnym spôsobom vplyvajú na organizmus. V porovnaní s ostatnými vzorkami obsahuje najnižšie zastúpenie kyseliny linolovej.

5.10 Porovnanie nutričného zloženia vzoriek



Obrázok 14 – Percentuálne zastúpenie proteínov, sacharidov a lipidov vo vzorkách

Z hľadiska aplikácie skúmaných vzoriek proteínov v športovej výžive je nutné zohľadniť aj obsah a pomer ostatných výživových zložiek. Okrem hrachu obsahujú všetky vzorky viac ako 20 % proteínov. Najviac bielkovín je prítomných v jedinej živočíšnej vzorke a to v cvrčej múke 52,16 %. Táto vzorka má aj relatívne vysoký podiel lipidov, ktoré obsahujú veľké množstvo nasýtených mastných kyselín. Vzorka chlorelly sa s obsahom proteínov 48,56 % javí ako druhý najbohatší zdroj. Zároveň obsahuje len 1,46 % lipidov, čo je vo výžive športovcov dôležitým kritériom. Vzorky hrachu a cíceru obsahujú 18,35 % a 20,01 % proteínov. V oboch prípadoch majú tieto vzorky vysoký podiel sacharidov a to viac ako 50 %. Vzorky konopných semienok a chia semienok obsahujú 28,79 % a 24,05 % proteínov. Obidve tieto vzorky sú bohaté aj na lipidy. V tomto prípade sú však lipidy vo vzorkách tvorené najmä nenasýtenými mastnými kyselinami

6 ZÁVER

Predložená bakalárska práca bola zameraná na charakterizáciu netradičných zdrojov proteínov a popis ich jednotlivých nutričných zložiek. V rámci teoretickej časti bola vypracovaná literárna rešerš zameraná na popis významu proteínov vo výžive a charakterizáciu športových proteínových doplnkov rôzneho druhu momentálne dostupných na trhu.

V praktickej časti boli vykonané experimenty prostredníctvom spektrofotometrických stanovení, papierovej chromatografie, plynovej chromatografie, SDS-PAGE vertikálnej elektroforézy a tiež Kjeldahlovo titračné stanovenie dusíku. Pomocou týchto metód bolo vo vybraných vzorkách stanovené zastúpenie proteínov, sacharidov a lipidov a následne ich zloženie.

V športovej výžive je prítomnosť a funkcia proteínov nenahraditeľná. Niektoré z vybraných vzoriek sa už v doplnkoch športovej výživy používajú. Ide o hrachový proteín a konopný proteín, ktoré boli popísané v teoretickej časti. Ďalej sa na trh postupne dostávajú aj proteínové tyčinky obsahujúce proteíny izolované z hmyzu, konkrétne cvrčkov. V týchto prípadoch v produktoch dostupných na trhu na nachádzajú proteíny izolované z rôznych zdrojov a tieto nie sú ovplyvnené ďalšími zložkami potravy ako je to pri priamej konzumácii celej potravy.

V hrachu a cíceri je prítomné väčšie množstvo sacharidov, v oboch prípadoch ide najmä o oligosacharidy a polysacharidy a menej o cukry. Konopné semienka obsahujú vysoký podiel lipidov rovnako tiež chia semienka. Lipidy prítomné v semienkach však obsahujú najmä polynenasýtené mastné kyseliny a veľké množstvo omega – 3 mastných kyselín, a teda patria medzi zdraviu prospešné lipidy. Na základe prevedenej metódy stanovenia celkových proteínov podľa Hartree – Lowryho a stanovenia celkového dusíku a hrubej bielkoviny podľa Kjeldahla je vidieť, že ako vhodné a bohaté zdroje proteínov sa javia cvrčia múka a chlorella. Oproti ostatným vzorkám obsahujú takmer dvojnásobné množstvo proteínov. Navyše obidva zdroje sú vhodnými alternatívami ku klasickým proteínovým doplnkom, pretože zaobstaranie primárnych surovín ako chov hmyzu alebo pestovanie chlorelly je finančne nenáročné.

Do športovej výživy môžu byť aplikované všetky vzorky, prípadne jednotlivé zložky z nich extrahované. Cvrčia múka a chlorella majú na základe svojho zloženia a obsahu proteínov veľký potenciál. Problémom by mohla byť ich priama konzumácia, keďže nie sú zo senzorického hľadiska príliš atraktívne. Tento problém by mohla riešiť ich aplikácia do rôznych foriem pre zákazníka prijateľnejších. Prvým spôsobom je už známa proteínová tyčinka obsahujúca múku z cvrčkov. Podobným spôsobom je možné aplikovať tiež chlorellu, ktorá by tak mohla byť vegánskou alternatívou proteínovej tyčinky. Ďalšou formou aplikácie je možné použitie týchto vzoriek ako surovín v pečive. Zmiešaním s celozrnnou múkou vo vhodnom pomere by mohlo toto pečivo predstavovať zaujímavú možnosť pre športovcov keďže by obsahovalo menej sacharidov. Zároveň je možné do tohto pečiva pridať aj chia semienka prípadne konopné semienka, čím by sa opäť zvýšil obsah proteínov.

Skúmané netradičné zdroje proteínov možno použiť aj pri výrobe cestovín. Pri zvýšenom množstve bielkovín by tieto cestoviny opäť tvorili prijateľnejšiu formu pre športovcov. Ďalšou možnosťou využitia je prídavok proteínov do rôznych sušienok, cukríkov či iných sladkostí, čím by sa vytvorila alternatíva, ktorá by obsahovala menej cukrov a bola tak zdravšia. Zaujímavou formou je tiež aplikácia v jogurtoch, kde by sa po pridaní proteínu opäť

zvýšila atraktivita produktu pre športovca. V súčasnosti sú na trhu dostupné aj rôzne instantné kaše ako napríklad ovsená, pohánková či ryžová kaša. Ako ďalšia možnosť aplikácie sa javí aj pridávanie skúmaných zdrojov proteínov do týchto potravín, čím by sa obohatila ich výživová hodnota.

Proteíny sú v športovej výžive dôležité kvôli regenerácii a pri náraste svalovej hmoty. Preto je pre športovcov dôležité prijímať ich vo zvýšenej miere. Na trhu je dostupné veľké množstvo proteínových suplementov, ktoré sú športovcami často využívané. Avšak ako najprirodzenejší spôsob sa javí prijímanie proteínov vo vyváženej a pestrej strave spolu s ostatnými dôležitými nutričnými zložkami vo vhodnom pomere.

7 POUŽITÉ ZDROJE

- [1] VODRÁŽKA, Zdeněk, 1996. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia. ISBN 80-200-0600-1.
- [2] WALSH, Gary, c2002. *Proteins: biochemistry and biotechnology* [online]. New York: J. Wiley [cit. 2019-04-17]. ISBN 04-718-9907-0.
- [3] GIBNEY, Michael J., 2009. *Introduction to human nutrition* [online]. 2nd ed. London: Nutrition Society [cit. 2019-04-17]. Human nutrition textbook series. ISBN 978-1-4051-6807-6.
- [4] *Biologická hodnota proteínov* [online], [cit. 2019-04-17]. Dostupné z: http://www.protein4you.sk/casopis/proteiny/biologicka_hodnota_proteinov/
- [5] FERENČÍK, Miroslav, 2000. *Biochémiá*. Bratislava: Slovak Academic Press. ISBN 80-889-0857-4.
- [6] ALBERTS, Bruce, 2002. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science. ISBN 978-0815332183.
- [7] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ, 2009. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [8] MELINA, Vesanto, Winston CRAIG a Susan LEVIN, 2016. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Vegetarian Diets. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* [online]. **116**(12), 1970-1980 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1016/j.jand.2016.09.025. ISSN 22122672. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212267216311923>
- [9] KOBULNICKÝ, Matúš, Prečo a koľko prijímať bielkovín. *Best body* [online]. [cit. 2019-04-17]. Dostupné z: <https://bestbody.sk/prijem-bielkovin-mnozstvo/>
- [10] PODMANICKÁ, Zuzana, Bielkoviny ako základ života. *DIABETIK*. Bratislava, 2004(2).
- [11] FOŘT, Petr, 2002. *Sport a správná výživa*. Praha: Ikar. ISBN 80-249-0124-2.
- [12] TIPTON, Kevin D a Robert R WOLFE, 2007. Protein and amino acids for athletes. *Journal of Sports Sciences* [online]. 22(1), 65-79 [cit. 2019-04-17]. ISSN 0264-0414. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0264041031000140554>
- [13] FOŘT, Petr, 2005. *Zdraví a potravní doplňky*. V Praze: Ikar. ISBN 80-249-0612-0.
- [14] EMBLETON, Phil a Gerard THORNE, 1999. *Suplementy ve výživě: ucelený informativní průvodce užíváním ergogenních látek v kulturistice*. Pardubice: Ivan Rudzinskyj. ISBN 80-902-5897-2.
- [15] MACH, Ivan a Jiří BORKOVEC, 2013. *Výživa pro fitness a kulturistiku: ucelený informativní průvodce užíváním ergogenních látek v kulturistice*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4618-0.
- [16] CAHA, Ján, 2012. Doplnky stravy: Nevyhnutnosť vo svete fitness. *Muscle & Fitness*. XXII(261).
- [17] DELANEY, R. A. M., 1976. COMPOSITION, PROPERTIES AND USES OF WHEY PROTEIN CONCENTRATES. *International Journal of Dairy Technology* [online]. **29**(2), 91-101 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1111/j.1471-0307.1976.tb00406.x. ISSN 1364-727X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-0307.1976.tb00406.x>
- [18] DEVRIES, Michaela C., Stuart M. PHILLIPS a Susan LEVIN, 2015. Supplemental Protein in Support of Muscle Mass and Health: Advantage Whey. *Journal of Food*

- Science* [online]. **80**(S1), A8-A15 [cit. 2019-04-18]. DOI: 10.1111/1750-3841.12802. ISSN 00221147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1750-3841.12802>
- [19] LUIKING, Yvette C., Nicolaas E. P. DEUTZ, Martin JÄKEL a Peter B. SOETERS, 2005. Casein and Soy Protein Meals Differentially Affect Whole-Body and Splanchnic Protein Metabolism in Healthy Humans. *The Journal of Nutrition* [online]. **135**(5), 1080-1087 [cit. 2019-05-22]. DOI: 10.1093/jn/135.5.1080. ISSN 0022-3166. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jn/article/135/5/1080/4663880>
- [20] TIPTON, Kevin D a Robert R WOLFE, 2007. Protein and amino acids for athletes. *Journal of Sports Sciences* [online]. **22**(1), 65-79 [cit. 2019-04-18]. DOI: 10.1080/0264041031000140554. ISSN 0264-0414. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0264041031000140554>
- [21] SINGH, Preeti, R. KUMAR, S. N. SABAPATHY a A. S. BAWA, 2008. Functional and Edible Uses of Soy Protein Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. **7**(1), 14-28 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2007.00025.x. ISSN 1541-4337. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2007.00025.x>
- [22] *Hráškový proteín* [online], [cit. 2019-04-19]. Dostupné z: <https://www.kompava.sk/hraskovy-protein>
- [23] LI, Huan, Natalie PRAIRIE, Chibuike C. UDENIGWE, Abayomi P. ADEBIYI, Paramjit S. TAPPIA, Harold M. AUKEMA, Peter J. H. JONES a Rotimi E. ALUKO, 2011. Blood Pressure Lowering Effect of a Pea Protein Hydrolysate in Hypertensive Rats and Humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **59**(18), 9854-9860 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1021/jf201911p. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf201911p>
- [24] *Čo to je konopný proteín* [online], [cit. 2019-04-19]. Dostupné z: <http://www.konopnyprotein.sk/co-je-konopny-protein/>
- [25] KONOPKA, Peter, 2004. *Sportovní výživa*. České Budějovice: Kopp. Průvodce sportem. ISBN 80-723-2228-1.
- [26] CLARK, Nancy, 2009. *Sportovní výživa*. Praha: Grada. Fitness, síla, kondice. ISBN 978-80-247-2783-7.
- [27] HUIS, Arnold van, 2013. *Edible insects: future prospects for food and feed security* [online]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations [cit. 2019-04-19]. FAO forestry paper, 171. ISBN 978-92-5-107596-8.
- [28] *5 dôvodov prečo jest' cvrčiu múku* [online], [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <https://bestbody.sk/5-dovodov-preco-jest-cvrciu-muku/>
- [29] Protein a energy tyčinky s cvrčočou múkou, In: *Sens* [online]. [cit. 2019-04-23]. Dostupné z: <https://www.sensbar.com/cz/>
- [30] DAHL, Wendy J., Lauren M. FOSTER a Robert T. TYLER, Review of the health benefits of peas (*Pisum sativum* L.). *British Journal of Nutrition* [online]. 23. 8. 2012 [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/article/review-of-the-health-benefits-of-peas-pisum-sativum-1/C97E78717EF51A80A80D4E09A233AE8/core-reader>
- [31] Hrách žlutý púlený 500 g BIO COUNTRY LIFE, In: *Country Life* [online]. [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <https://www.countrylife.cz/hrach-zluty-puleny-500-g-bio-country-life>

- [32] WALLACE, Taylor, Robert MURRAY a Kathleen ZELMAN, 2016. The Nutritional Value and Health Benefits of Chickpeas and Hummus. *Nutrients* [online]. 8(12) [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.3390/nu8120766. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6643/8/12/766>
- [33] Cizrna 500 g BIO COUNTRY LIFE, In: *Country Life* [online]. [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <https://www.countrylife.cz/cizrna-500-g-bio-country-life>
- [34] HAMANN, Brigitte, 2016. *Chia semínka: zdraví, energie, omlazení a chuť do života*. Liberec: Dialog. Zdraví (Dialog). ISBN 978-807-4240-959.
- [35] Chia semínka 300 g BIO COUNTRY LIFE, In: *Country Life* [online]. [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <https://www.countrylife.cz/chia-seminka-300-g-bio-country-life>
- [36] *Neskutočne zdravé konopné semenka. Chrumkáte ich tiež?* [online], [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <http://zdravie.cvicte.sk/zdravie-1/neskutočne-zdravé-konopné-semienka-chrumkáte-ic>
- [37] Konopná semínka loupaná 100 g BIO COUNTRY LIFE, In: *Country Life* [online]. [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <https://www.countrylife.cz/konopna-seminka-loupana-100-g-bio-country-life>
- [38] DESATERO KLÍČOVÝCH VLASTNOSTÍ CHLORELLY, *Zelené zdravičko* [online]. [cit. 2019-04-23]. Dostupné z: <https://www.zelene-zdravicko.cz/chlorella-desatero/>
- [39] ČESKÁ CHLORELLA, In: *Neobotanics* [online]. [cit. 2019-04-23]. Dostupné z: <https://neobotanics.cz/produkt/ceska-chlorella/>
- [40] MÁROVÁ, I., VRÁNOVÁ, D.: *Praktikum z biochemie*. Pracovní sešit, FCH VUT Brno, 2008
- [41] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2005, 258 s. ISBN 80-708-0586-2.
- [42] HRSTKA, M., SOMROVÁ, L.: *Praktikum z analytické chemie potravin*, FCH VUT Brno, 2017

8 POUŽITÉ SKRATKY

AA – akrylamid

BH – biologická hodnota

BIS – bisakrylamid

GC – plynová chromatografia

HCl – kyselina chlorovodíková

HPLC – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

PAGE – polyakrylamidový gél

SDS – síran dodecylsodný

TLC – chromatografia na tenkej vrstve