



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

**VÝROBA A CHARAKTERIZACE PROTEINOVÝCH
KONCENTRÁTŮ Z PŠENIČNÝCH OTRUB**

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF PROTEIN CONCENTRATES FROM WHEAT BRAN

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Klára Hubáčová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1431/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Klára Hubáčová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Výroba a charakterizace proteinových koncentrátů z pšeničných otrub

Zadání diplomové práce:

Příprava a charakterizace proteinových koncentrátů z pšeničných otrub

1. Vývoj metody pro extrakci a přečištění proteinů z pšeničných otrub
2. Vývoj metody dehydratace materiálu
3. Charakterizace z hlediska základních chemických a fyzikálních vlastností
4. Stanovení molekulové hmotnosti, stravitelnosti a termální stability
5. Definování závěrů práce

Termín odevzdání diplomové práce: 31.7.2020:

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

Bc. Klára Hubáčová
student(ka)

Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá využitím pšeničných otrub jakožto zdroje kvalitních proteinů. Každoročně vyprodukuje mlynářský průmysl značné množství odpadního materiálu, který je tvořen převážně pšeničnými otrubami. V rámci trendu cirkulární ekonomiky je velká snaha o využití takových materiálů. Pšeničné otruby obsahují asi 14–18 % proteinů, tudíž se při valorizaci nabízí právě tato složka. Proteiny lze z otrub vyextrahovat na základě jejich chování v různých hodnotách pH. V alkalickém pH dochází k jejich rozpouštění a postupným okyselování do úrovně isoelektrického bodu k jejich vysrážení. Finální úpravou vysrážených proteinů je lyofilizace. Takto připravený proteinový lyofilizát může být náležitě charakterizován (čistota, profil aminokyselin, prvkové složení, obsah vody atd.). Jelikož v dnešní době roste zájem o proteinové doplňky stravy nejen ze strany profesionálních sportovců, mohl by právě tento produkt být vhodným kandidátem pro toto odvětví.

ABSTRACT

The diploma thesis deals with usage of wheat bran as a source of high-quality proteins. Every year mill industry produces large amounts of by-products. These by-products are constituted by wheat bran. There is a big effort to use these type of materials within a circular economy. Wheat bran contains about 14–18 % proteins which appears to be a good component for valorisation. It is possible to extract proteins from bran according to their behaviour in the range of pH. Proteins are soluble in alkaline pH and can be precipitated around their isoelectric point. The final treatment of precipitated proteins is lyophilisation. The next step is characterisation of the product. There are a few parameters to analyse: purity of the isolate, amino acid profile, composition of minerals, water contain etc. Interest in nutrition is on the rise not only by professional sportsman. This isolated product could serve as a potential protein supplement.

KLÍČOVÁ SLOVA

Pšeničné otruby, proteiny, proteinový izolát, extrakce

KEYWORDS

Wheat bran, proteins, protein isolate, extraction

HUBAČOVÁ, Klára. *Výroba a charakterizace proteinových koncentrátů z pšeničných otrub* [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-07-30]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123863>. 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

Touto cestou bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Jaromíru Pořízkovi, Ph.D. za odborné vedení, věnovaný čas, poskytnutí cenných rad a připomínek. Velký dík patří také Ing. Zuzaně Slavíkové za pomoc, ochotu a odborné vedení. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za obrovskou toleranci, podporu a pomoc v průběhu mého celého studia.

OBSAH

ABSTRAKT	3
ABSTRACT	3
KLÍČOVÁ SLOVA	3
KEYWORDS	3
PROHLÁŠENÍ	4
PODĚKOVÁNÍ	4
1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Valorizace lignocelulózových odpadů	9
2.2 Valorizace pšeničných otrub jakožto vedlejšího produktu mlynářského průmyslu	9
2.3 Obilniny a jejich části	10
2.3.1 Složky zrna a jejich význam	10
2.3.2 Chemické složení pšeničných otrub	12
2.4 Proteinové doplňky stravy	24
2.5 Extrakční metody pro izolaci proteinů	24
2.5.1 Izolace proteinů alkalickou extrakcí	24
2.5.2 Izolace proteinů degradací škrobu	25
2.5.3 Izolace proteinů kombinací fermentace a alkalické extrakce	25
2.5.4 Izolace proteinů metodou dle Osborna	25
2.6 Lyofilizace	25
2.7 Instrumentální metody využívané při analýze proteinových doplňků stravy	26
2.7.1 Infračervená spektroskopie	26
2.7.2 ICP-OES	27
2.8 Metody sloužící k charakterizaci proteinových doplňků stravy	28
2.8.1 Kjeldahlova metoda	28
2.8.2 Hartree-Lowryho metoda stanovení proteinů	29
2.8.3 Analýza profilu aminokyselin	29
2.8.4 Karl-Fischerova titrace pro stanovení obsahu vody	30
2.8.5 ELISA	30
2.8.6 Biologické testování proteinů	31
2.9 Analýza rozptylu (ANOVA)	32

3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
3.1	Materiály a zařízení	33
3.1.1	Pomůcky	33
3.1.2	Chemikálie	33
3.1.3	Pšeničné otruby	33
3.1.4	Přístroje	33
3.2	Optimalizace procesu izolace proteinů	33
3.2.1	Výchozí postup extrakce proteinů	34
3.2.2	Vliv mletí otrub na výtěžnost proteinů	34
3.2.3	Vícestupňová extrakce proteinů	34
3.2.4	Vliv odtučnění na výtěžnost proteinů a čistotu lyofilizátu	35
3.2.5	Optimalizace poměru otrub a extrakčního činidla	35
3.2.6	Optimalizace teploty při srážení proteinů	35
3.2.7	Optimalizace pH při srážení proteinů	35
3.2.8	Lyofilizace	36
3.3	Finální experimentální postup extrakce za optimálních podmínek	36
3.4	Chemická a fyzikální charakterizace vzorků	37
3.4.1	Spektrofotometrické stanovení proteinů Hartree-Lowryho metodou	37
3.4.2	Prvková analýza lyofilizátu	37
3.4.3	Stanovení profilu aminokyselin v lyofilizátu	38
3.4.4	Stanovení obsahu vody v lyofilizátu	39
3.4.5	Stanovení obsahu lepku v lyofilizátu	39
3.4.6	Stravitelnost proteinového lyofilizátu a nativních otrub	39
4	DISKUZE A VÝSLEDKY	40
4.1	Vliv mletí pšeničných otrub na výtěžnost proteinu	40
4.2	Výtěžnost vícestupňové extrakce	41
4.3	Vliv odtučnění pšeničných otrub na výtěžnost proteinu	42
4.4	Vliv poměru otrub a extrakčního činidla na výtěžnost proteinů	43
4.5	Vliv teploty při srážení na výtěžnost produktu a čistotu izolátu	44
4.6	Vliv pH při srážení na výtěžnost produktu a čistotu izolátu	45
4.7	Chemická a fyzikální charakterizace finálního proteinového izolátu	47
4.7.1	Prvková analýza lyofilizátu	47

4.7.2	Obsah proteinů a profil aminokyselin v izolátu	48
4.7.3	Stanovení obsahu vody v lyofilizátu	51
4.7.4	Stanovení obsahu lepku v lyofilizátu	51
4.7.5	Stravitelnost proteinového lyofilizátu a nativních otrub	51
5	ZÁVĚR.....	52
6	BIBLIOGRAFIE	53
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	65

1 ÚVOD

Velmi aktuální se stává trend cirkulární ekonomiky, který klade důraz na opětovné využití všech produktů průmyslové výroby a lepší recyklaci. Jelikož v průmyslu vzniká mnoho odpadů, roste zájem o jejich zužitkování. Například v mlynářství vzniká velké množství vedlejších produktů. Mezi tyto produkty patří otruby. Velké mlýny vyprodukují až desítky tun pšeničných otrub denně. Mlýny se potýkají s kolísavou poptávkou po tomto materiálu. Standardně jsou otruby spalovány, případně využívány jako součást krmných směsí. Pšeničné otruby obsahují mnoho nutričně významných látek, z nichž velkou část (14–18 %) tvoří proteiny. Ty lze z otrub extrahovat různými postupy. Mezi metody izolace proteinů z lignocelulóзовých materiálů patří např. izolace alkalickou extrakcí, izolace degradací škrobu, izolace kombinací fermentace a alkalické extrakce, izolace dle Osborna a další. V alkalickém pH se proteiny vyznačují dobrou rozpustností a s klesajícím pH k jejich isoelektrickému bodu se postupně sráží až denaturují. Takto je možné extrahovat produkt relativně vysoké čistoty. Na základě čistoty získaného materiálu se pak dle terminologie rozlišuje proteinový koncentrát (čistota min. 65 %) a proteinový izolát (čistota min. 90 %). Jedná se zpravidla o proteiny ve formě prášku, které nachází využití např. ve sportovní výživě. Proteinové doplňky stravy a celkově zdravá nutričně vyvážená strava se stává velmi populární nejen mezi profesionálními sportovci.

Existuje řada zdrojů proteinových doplňků stravy. Mohou být jak živočišné, tak rostlinné. Z živočišných se nejčastěji využívá syrovátka, z rostlinných hlavně sója a v menší míře také rýže, hrách, pšenice aj. Každá z těchto surovin poskytuje proteiny s jiným aminokyselinovým profilem. V některých případech tak vznikají i směsi proteinů získaných z různých surovin, aby bylo docíleno co nejkvalitnějšího produktu. Nároky na potraviny a potravinové doplňky v dnešní době narůstají. Zvyšuje se počet lidí s intolerancemi a alergiemi na určité skupiny potravin (laktóza, mléčná bílkovina) či vyhraněným stylem stravování (vegetariáni, vegani). Tato diplomová práce se zabývá využitím pšeničných otrub jakožto zdroje proteinů, optimalizací extrakčního procesu a následnou charakterizací produktu. Proteinový izolát z pšenice je vhodný pro osoby s intolerancí na laktózu, alergií na mléčnou bílkovinu, vegetariány i vegany. Na pozoru by však měli být lidé trpící celiakií, jelikož je pšenice známá svým obsahem lepku.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Valorizace lignocelulózových odpadů

V poslední době se za nejvýznamnější zdroj energie považují fosilní paliva, avšak s jejich postupným vyčerpáváním se k tomuto palivu začínají hledat různé alternativy. Hlavním směrem vývoje je využití obnovitelných zdrojů energie [1].

V dnešní době je v rámci takzvané cirkulární ekonomiky kladen důraz na lepší recyklaci a opakované využití všech produktů průmyslové výroby. Jedním z největších záměrů je zvýšení hodnoty některých téměř bezcenných vedlejších produktů [2]. Obrovským zdrojem obnovitelné energie jsou právě zemědělská a lesnická sféra, které poskytují nepoživatelné a uhlíkově neutrální produkty [1]. Takovéto lignocelulózové biologické materiály se následně používají jako suroviny pro výrobu biopaliv a dalších chemikálií, což je výhodné jak z pohledu technologie, tak i z pohledu ekonomiky a životního prostředí [2]. Světová produkce lignocelulózové biomasy sahá až na 170 miliard metrických tun za rok [3].

Biomasa nám poskytuje významnou zásobu uhlíku a jeho organických sloučenin. Může být původu rostlinného (piliny, kukuřičná sláma, otruby aj.) nebo zvířecího (hnůj, močůvka, kejda aj.). Rostlinná biomasa se skládá hlavně ze tří lignocelulózových komponent, mezi něž patří celulóza (40–60 hm%), hemicelulóza (15–30 hm%) a lignin (10–25 hm%). Konkrétní procentuální složení pak závisí na typu rostliny a pletiva, ze kterého biomasa pochází [4].

Biorafinerie mohou být klasifikovány na základě počtu jejich klíčových charakteristik. Mezi hlavní suroviny patří víceleté rostliny, škrobové plodiny (pšenice, kukuřice), cukerné plodiny (cukrová řepa, třtina), lignocelulózové plodiny (obhospodařovaný les, rozvaděč), lignocelulózové rezidua (sláma), olejniny (palmy, řepka olejka), vodní biomasa (řasy) a organický odpad (průmyslový, komerční odpad). Tyto suroviny mohou být zpracovány na řadu biorafinačních platforem. Tyto platformy zahrnují jedno uhlíkaté molekuly (bioplyn, syntetický plyn); pěti a šesti uhlíkaté uhlovodíky ze škrobu; sacharózu nebo celulózu; směs pěti a šesti uhlíkatých uhlovodíků získaných z hemicelulóz, ligninu; oleje, organické roztoky z trav a pyrolytické kapaliny. Platformy mohou být dále konvertovány na široké spektrum produktů pomocí tepelných, biologických a chemických procesů. Takovými výstupními materiály mohou být například hnojiva, biomateriály, biomethan, bio-H₂, organické kyseliny a extrakty, bioethanol, syntetická biopaliva, glycerin, biodiesel, elektrická a tepelná energie, krmiva pro zvířata, chemikálie, polymery a potraviny (např. proteiny) [5].

2.2 Valorizace pšeničných otrub jakožto vedlejšího produktu mlynářského průmyslu

V celosvětovém měřítku se roční produkce pšenice pohybuje okolo 650 milionů tun (z nichž je 150 milionů tun otrub). Z vypěstované pšenice se v potravinářství využije asi 69 %. Jedním z hlavních mlynářských výstupů, mimo klíček a endosperm, jsou otruby. Tyto obalové vrstvy tvoří asi 25 % hmotnosti pšenice. Otruby bývají z velké části využívány jako krmivo pro hospodářská zvířata. I když byly již mnohokrát prokázány zdraví prospěšné účinky otrub na lidský organismus, jejich zakomponování do potravin je pouze minoritní. Představují totiž problém z hlediska zpracování a vzhledu výrobku [6; 7].

Pšeničné otruby jsou části pšeničného zrna, které jsou tvořeny několika odlišnými vrstvami a buněčnými typy s odlišným chemickým složením. Oproti jiným lignocelulózovým materiálům se vyznačují poměrně vysokým obsahem proteinů a nižším obsahem ligninu. Při klasické biorafinerii mohou být otruby do velké míry dezintegrovány a rozděleny do frakcí o vysoké čistotě. V takovém stavu se z nich pak získávají nové chemikálie, které slouží jako prekurzory pro více polymerizované sloučeniny. Mimo výše zmíněné, otruby obsahují další velmi cenné látky, které však musí být dále separovány a purifikovány [8].

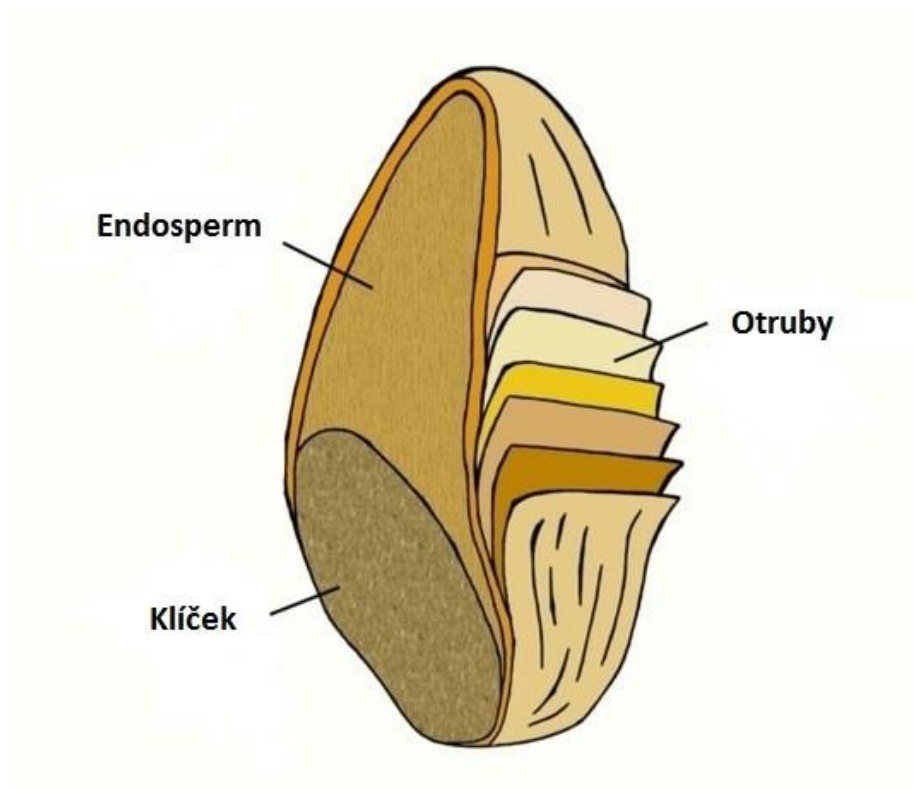
Jsou možné dva základní přístupy valorizace pšeničných otrub a to s ohledem na zisk produktu ze sacharidické nebo nesacharidické složky. Realizovatelná a ekonomicky výhodná může být produkce glukózy a její fermentace na kyselinu mléčnou, jantarovou či ethanol, extrakce proteinů a produkce esenciálních aminokyselin (včetně GABA = α -aminomáselná kyselina), extrakce kyseliny ferulové a její konverze na vanilin, případně extrakce arabinoxylanů [8].

2.3 Obilniny a jejich části

Obilniny jsou v potravinářství považovány za nejvýznamnější plodiny. Tento titul získaly díky svému bohatému složení, vysoké přizpůsobivosti klimatickým podmínkám, malé pracnosti pěstování, vysokým výnosům konzumních částí a dlouhodobému skladování. Jako obilninu označujeme kompletní pěstovanou rostlinu. Cereálií nebo také obilovinou nazýváme vyláčené obilné zrno. Obiloviny patří mezi základní složky lidské stravy, ve vyspělých zemích tvoří 30–40 % celkového příjmu energie v potravě, v rozvojových zemích až 90 %. Obilniny jsou bohaté na bílkoviny, 20–60 % z celkového příjmu bílkovin zkonsumovaných člověkem pochází právě z nich. I když je obsah bílkovin vysoký, nelze spoléhat pouze na obiloviny. V porovnání s živočišnými bílkovinami jsou nutriční hodnoty obilovin nedostačující. Obsah aminokyselin se totiž liší, nejzávažnějším nedostatkem je nižší množství lyzinu. Jedná se totiž o esenciální aminokyselinu (člověk si ji nedokáže sám syntetizovat, musí ji přijímat ve stravě), která se tak v rostlinné stravě stává limitující. Obiloviny nám poskytují také minerální látky a cenné vitaminy, např. vitamin B-1 (thiamin) a B-6 (pyridoxin). Jak z pohledu struktury, tak i z pohledu chemického složení jsou si různá obilná zrna velmi podobná. Přesto jsou pro nás drobné rozdíly v jejich vlastnostech velmi zásadní zejména při zpracovávání a také ve výživě [9; 6].

2.3.1 Složky zrna a jejich význam

Semena obilovin se nazývají obilky, po vyžrání je jejich přirozenou funkcí uchování životaschopnosti zárodku nové rostliny. Tato funkce je umožněna díky složkám, jež jsou obsaženy v anatomických částech obilky s výrazně rozlišným chemickým složením. Povrch obilky je tvořen otrubami skládajícími se z několika vrstev. Největší částí zrna je vnitřní bílek (endosperm). Konkrétně obilku pšenice tvoří: 80–83 % endosperm, 14–16 % otruby a 1,6–3,6 % klíček [9; 6]. Graficky znázorněné složení lze vidět na obrázku 1.



Obrázek 1: Schéma pšeničného zrna [10].

2.3.1.1 Otruby

Otruby neboli obalové vrstvy mají za úkol chránit obilku před vnějšími vlivy. Jsou tvořeny několikavrstevným oplodím (perikarp), pod ním se nachází jednovrstevné osemení (testa) a jedna tenká vrstva vnějšího bílku (perisperm). Co se jejich chemického složení týká, hlavní složku vnější vrstvy, nazývanou též oplodí, tvoří nerozpustné polysacharidy s velkou mechanickou pevností (např. celulóza). Podpovrchové obalové vrstvy, zvané osemení, se skládají z polysacharidů, které velmi pevně vážou vodu a bobtnají v ní nebo se v ní částečně rozpouští. Vnější obalové vrstvy obsahují vyšší množství vlákniny, čehož se využívá pro úpravu výživových hodnot výrobků, avšak za cenu nižší kvality, zpracovatelnosti a často i vzhledu těsta či výrobku [9; 6].

2.3.1.2 Aleuronová vrstva

Aleuronová vrstva se ve struktuře obilky nachází mezi otrubami a endospermem. Tvoří ji velké aleuronové buňky krychlovitého nebo kvádrovitého tvaru v jedné vrstvě (pšenice) nebo ve více vrstvách (ječmen). Nalezneme zde drobné krystaloidy bílkovin, jež plní funkci enzymů. Tyto enzymy štěpí zásobní polysacharidy a tím zajišťují výživu zárodku. Při výrobě bílé mouky bývá aleuronová vrstva zpravidla oddělována společně s otrubami, ve tmavé mouce je však součástí [6].

2.3.1.3 Endosperm

Endospermem nazýváme vnitřní obsah zrna. Tvoří největší podíl zrna a z technologického hlediska je jeho nejvýznamnější složkou, např. drcený pšeničný endosperm představuje bílou pšeničnou mouku. Mezi jeho hlavní složky patří polysacharidy, zejména škrob tvořící 60–75 %

endospermu, a bílkoviny (cca 10 %). Dále zde najdeme lipidy, minerální látky a ve stopových množstvích také vitaminy, barviva a významné zastoupení látek, které mají různé růstové, regulační a genetické funkce [9].

2.3.1.4 Klíček (*embryo*)

Klíček je vlastní zárodek nově vzniklé rostliny, který nese její genetickou informaci. Obsahuje některé významné složky lidské výživy, ale vzhledem k jeho špatné stabilitě na vzduchu se při mlýnském zpracování odděluje. Tato nestabilita je zapříčiněna vysokým množstvím tuků [9].

2.3.2 Chemické složení pšeničných otrub

Obiloviny se nejčastěji využívají v mlynářském průmyslu. Výše zmíněné čtyři hlavní složky zrna se nejprve oddělují a poté se s každou z nich pracuje jinak. Na klasickou bílou mouku se používá pouze endosperm. Na celozrnné mouky však endosperm nestačí, tudíž zde nalezneme výrazný podíl otrub, případně klíčku. Jejich nutriční hodnota je mnohem vyšší, protože obsahují vlákninu, tuky, bílkoviny, škrob, antioxidanty, minerály, vitaminy, lignany a fenolické sloučeniny pozitivně působící na zdraví člověka. Z tohoto důvodu se v poslední době klade důraz na konzumaci celozrnných potravin. V pekárenském průmyslu se vyskytuje problém, protože zakomponování otrub do těsta snižuje viskoelastické vlastnosti a objem výrobku. Chuť je ořechová, zrnitá až hořká. Látky v otrubách narušují síťovitou strukturu lepku, což negativně ovlivňuje tvorbu textury při fermentaci a pečení. Vláknina konkuruje ostatním polymerům při vázání vody, v důsledku toho se snižuje viskoelastická výroba [11].

Pšeničné otruby mají velmi nízké zastoupení nasycených tuků a sodíku. Naopak na proteiny, thiamin (vitamin B1), riboflavin (vitamin B2) a draslík jsou velmi bohaté. Je též výborným zdrojem vlákniny, niacinu (vitamin B3), pyridoxinu (vitamin B6), železa, hořčíku, fosforu, zinku, mědi, manganu a selenu. Poměrně vysoký obsah proteinů není jejich jedinou kvalitou. V porovnání s endospermem se pyšní totiž pestrým profilem aminokyselin [12]. Zastoupení jednotlivých látek lze vyčíst z tabulky 1.

Tabulka 1: Složení pšeničných otrub na 100 g [12]

Sacharidy	64,5 g	Voda	9,9 g
Vláknina	42,8 g		
Cukry	0,4 g	Popeloviny	5,8 g
Tuk	4,3 g	Minerály	
Nasycené tuky	0,6 g	Ca	73 mg
Mononenasycené	0,6 g	Fe	10,6 mg

Polynenasycené	2,2 g	Mg	611 mg
		P	1013 mg
Proteiny	15,5 g	K	1182 mg
		Na	2 mg
Aminokyseliny		Zn	7,3 mg
Tryp	282 mg	Cu	1 mg
Thre	500 mg	Mn	11,5 mg
Ile	486 mg	Se	77,6 mg
Leu	928 mg		
Lys	600 mg	Vitaminy	
Met	234 mg	A	9,0 IU
Cys	371 mg	E	1,5 mg
Phe	595 mg	K	1,9 µg
Tyr	436 mg	Thiamin	0,5 mg
Val	726 mg	Riboflavin	0,6 mg
Arg	1087 mg	Niacin	13,6 mg
His	430 mg	B6	1,3 mg
Ala	765 mg	Folát	79 µg
Asp	1130 mg	Kys. panthotenová	2,2 mg
Glu	2874 mg	Cholin	74,4 mg
Gly	898 mg		
Pro	882 mg		
Ser	684 mg		

V otrubách je přítomná jak rozpustná, tak i nerozpustná vláknina, jež je tvořena zejména arabinoxylany a celulosou. Tyto složené polysacharidy se skládají z cukrů, mezi něž patří xylosa, arabinosa, glukosa, kyselina uronová, dále malý obsah rhamnosy a galaktosy, a stopové množství fukosy a mannosy [12].

2.3.2.1 Polysacharidy a lignin

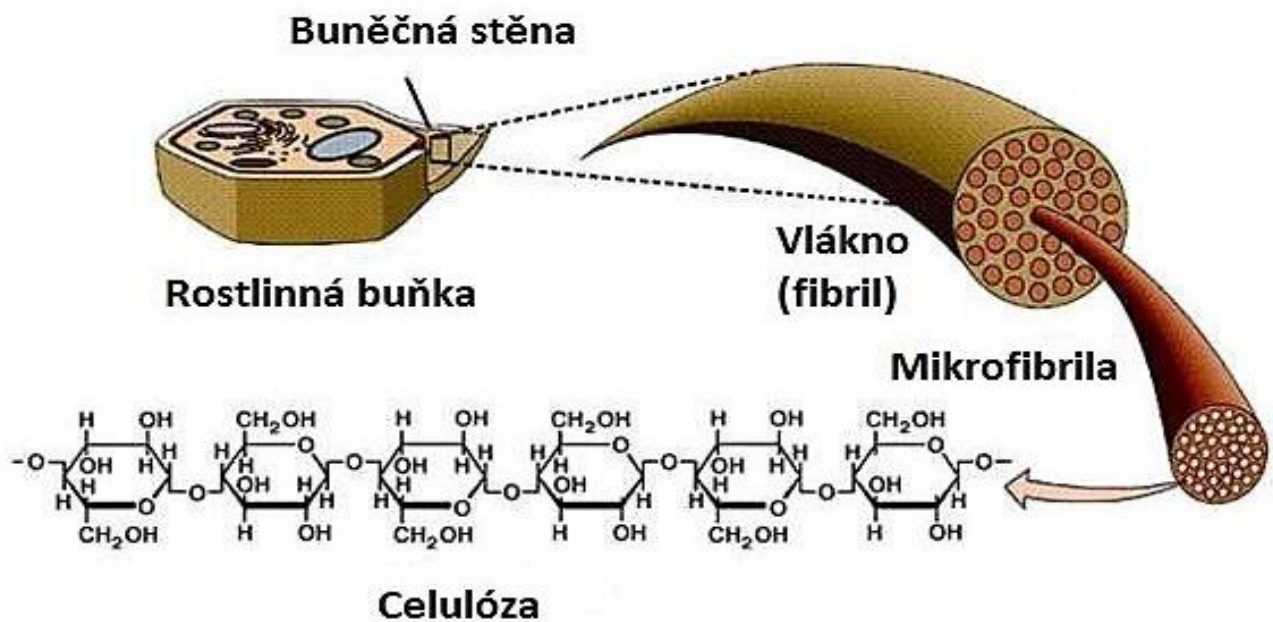
Obilná sláma je složena převážně ze tří skupin organických sloučenin, mezi něž patří celulóza, hemicelulózy a lignin. Tyto látky tvoří v případě pšenice, ovsa a ječmene více než 80 % suché hmoty. Kromě těchto výše vyjmenovaných sloučenin obilná sláma obsahuje i jiné organické látky včetně malého množství proteinů, vosků, cukrů a solí. Složení obilovin je také závislé na stupni zralosti obiloviny, typu půdy a používaných hnojivech [13].

V přírodě se vyskytuje zhruba 100 různých druhů monosacharidů. Pouze 10 z nich kvantitativně dominuje ve skladbě buněčných stěn vyšších rostlin. Z řad pentóz to jsou: arabinóza a xylóza, z hexóz: glukóza, galaktóza a manóza, z 6-deoxyhexóz: rhamnóza a fukóza, z hexuronových kyselin: galakturonová, glukuronová a 4-O-methylglukuronová kyselina. Tyto monosacharidy mohou vytvořit obrovské množství různých polysacharidů, což má za následek dělení polysacharidů do skupin podle jejich fyzikálních, chemických a biologických vlastností [13].

Celulóza

Celulóza jako nejrozšířenější přírodní polysacharid na světě je přítomna ve všech suchozemských rostlinách a také v některých vodních druzích, např. v řasách. Vyskytuje se ve všech rádech rostlin i primitivních organismech, třeba v bakteriích. Dokonce ji můžeme najít i v říši zvířat [13].

Celulóza je lineární homopolymer obsahující D-glukosové jednotky propojené β -1,4 vazbami. Vyskytuje se převážně v krystalické formě organizované do vláken. Tyto celulózové vláknité struktury tvoří kostru buněčných stěn. Počet glukózových jednotek na jednu molekulu se pohybuje od 15 až do 15 000. Tyto molekuly jsou v antiparalelním uspořádání, shlukují se v úzké svazky zvané mikrofibrily. Uvnitř mikrofibril jsou lineární molekuly bočně vázány vodíkovými můstky. Takovéto vodíkové vazby jsou velmi pevné. Lze je přerušit pouze silným aprotickým rozpouštědlem a též silnými kyselinami nebo zásadami. Na molekulární úrovni je jádro krystalické celulózy mikrofibril vysoce resistantní vůči chemické a biologické hydrolýze díky své precizně uspořádané struktuře buněčných dextrinů. Celulózové molekuly se mezi sebou vážou hydrofobními vazbami, což má za následek resistenci ke kyselé hydrolýze. Ta totiž přispívá k tvorbě husté vrstvy vody v blízkosti hydratovaného povrchu celulózy. Aby se zvýšila náchylnost celulózy k hydrolýze, je nutné ji rozemlít, rozmělnit. Tím dojde ke zvětšení jejího povrchu. Následným působením páry nebo alkalického činidla se získá méně krystalická celulóza a přístupnost k ostatním přidruženým látkám, např. k ligninu. Žádnou izolační metodou nelze dostat celulózu v čistém stavu [13]. Na obrázku 2 je znázorněna celulóza v buněčné stěně rostlin.



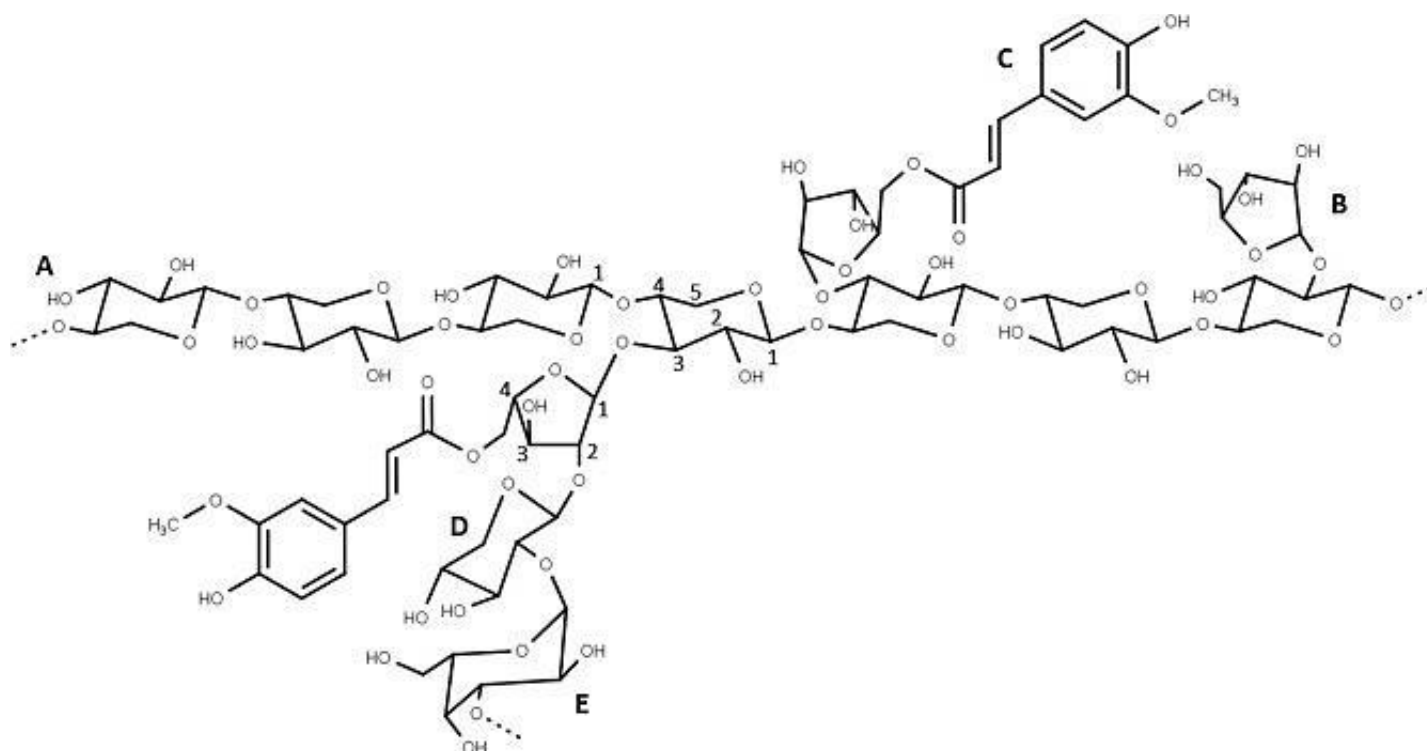
Obrázek 2: Celulóza v buněčné stěně rostlin [14].

Hemicelulózy

Hemicelulózy patří hned po celulóze mezi nejhodněji zastoupené látky v obilninách. Tvoří asi čtvrtinu až třetinu většiny rostlinných materiálů. Toto množství je různé podle druhu rostliny. Na rozdíl od celulózy, což je unikátní molekula lišící se pouze stupněm polymerace a krystalizace, hemicelulózy jsou nekystalické heteropolysacharidy, které jsou charakteristické svou rozpustností v alkalických roztocích po odstranění pektinů. Hemicelulózy jsou nejkompexnějšími látkami buněčné stěny obilnin a trav. Vodíkovými můstky se vážou k celulóze, kovalentními vazbami k ligninu a esterovými vazbami k acetylovým skupinám a hydroxykyselinám [13].

Hemicelulózy se skládají z několika různých jednotek cukrů, které jsou přítomny v rozličném poměru a s odlišnými substituenty. Mezi nejvíce zastoupené cukry patří D-xyulóza, L-arabinoza, D-glukóza, D-galaktóza, D-manóza, D-glukuronová kyselina, 4-O-methyl-D-glukuronová kyselina, D-galakturonová kyselina a v menším množství také L-rhamnóza a L-fukóza [13].

Nejčastějším typem hemicelulóz bývají řetězce založené na (1-4)- β -D-xylopyranosylových jednotkách. Jejich řetězec může být lineární, ale většinou se jedná o rozvětvené struktury zejména díky glykosidicky připojeným jednotkám cukrů. Tyto xylopyranosové jednotky tvoří xylanovou kostru s navázanými bočními řetězci, nejčastěji arabinózou a glukuronovou kyselinou. Takové látky jsou pak nazývány glukuronoarabinoxylany a nebo jen arabinoxylany, pokud obsahují výrazně vyšší množství zbytků arabinózy než kyseliny glukuronové [15]. Jejich strukturu lze vidět na obrázku 3.



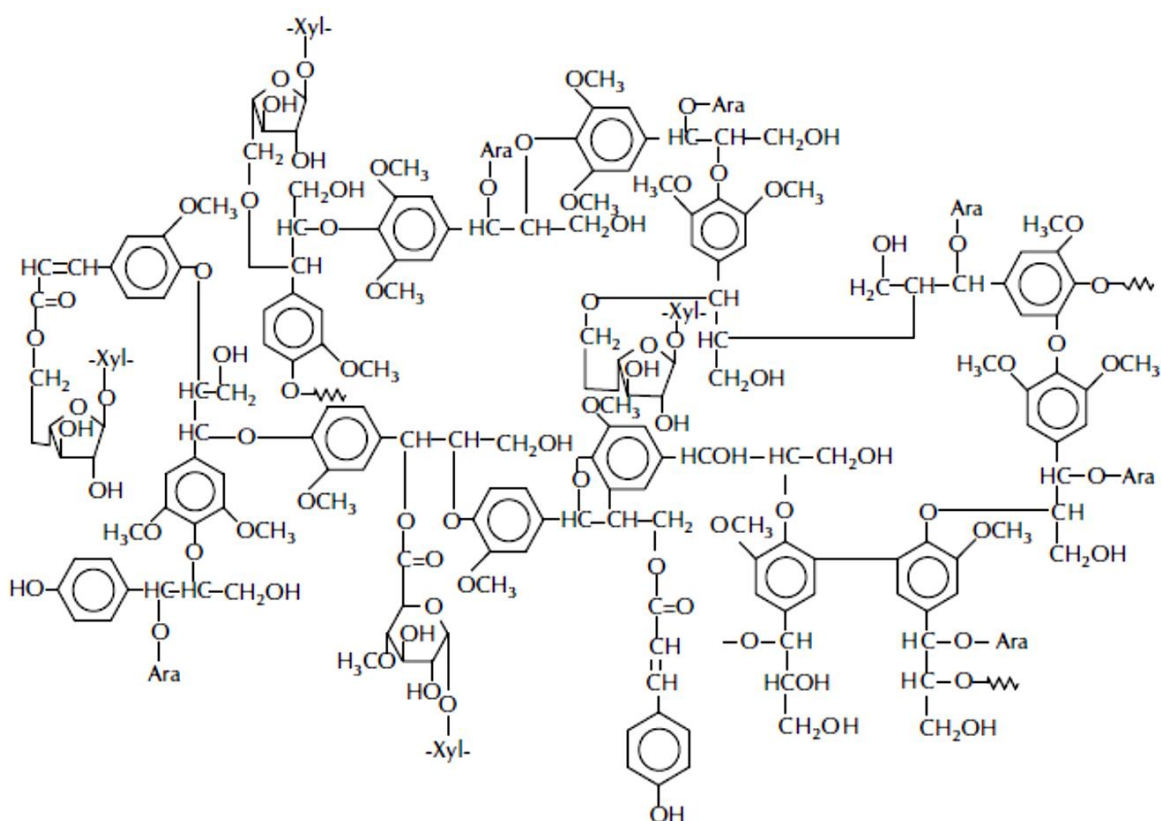
Obrázek 3: Struktura arabinoxylanů: A = xylanová kostra; B = arabinosylová skupina; C = ferulová skupina; D = xylosylová skupina; E = galaktosylová skupina [15].

Lignin

Lignin je velmi větvená amorfní biomakromolekula, jejíž molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí od 1 000 až do 20 000 g/mol. Nejčastěji se vyskytuje společně s hemicelulózou okolo celulóзовých vláken v primární a sekundární buněčné stěně. Kovalentní vazbou se poutá k celulóзовým strukturám. Primárně je důležitá jeho strukturální funkce v buněčné stěně, kde jí dodává pevnost a tuhost. Chrání rostlinu před útokem fytopatogenů a jiných environmentálních faktorů [16].

Lignin se dělí do tří skupin podle chemické struktury jeho monomerních jednotek na: lignin měkkých dřev, lignin tvrdých dřev a lignin travnatých rostlin. Za tyto monomerní jednotky jsou považovány tři fenylypropanové monomery zvané též monolignoly, mezi něž patří koniferylalkohol, p-kumarylalkohol a sinapylalkohol. V případě, že jsou tyto jednotky zapojeny do polymerní struktury ligninu, nazývají se guaiacyl (G), p-hydroxyfenylyl (H) a syringyl (S). Lignin cereálií je složen ze všech tří složek a je označován jako GSH-lignin. V měkkém dřevě je přítomný G-lignin a ve tvrdém dřevě GS-lignin. Lignin je dále spojen s polysacharidy přes hydroxyskořicové kyseliny, konkrétně přes kyselinu p-kumarovou a ferulovou [13; 16; 17]. Struktura pšeničného ligninu je znázorněna na obrázku 4.

Významnými vlastnostmi a pozitivy ligninu jsou antioxidační, antifungální a antimikrobiální aktivity. Je schopen absorbovat UV-záření a zmírňovat oheň. Ve srovnání s celulózou a hemicelulózami je odolnější vůči chemickým i biologickým zásahům. Jedná se převážně o bezbarvou látku, která po aplikaci kyseliny nebo zásady získává hnědé až tmavě hnědé zbarvení [16].



Obrázek 4: Struktura pšeničného ligninu [13].

2.3.2.2 Proteiny

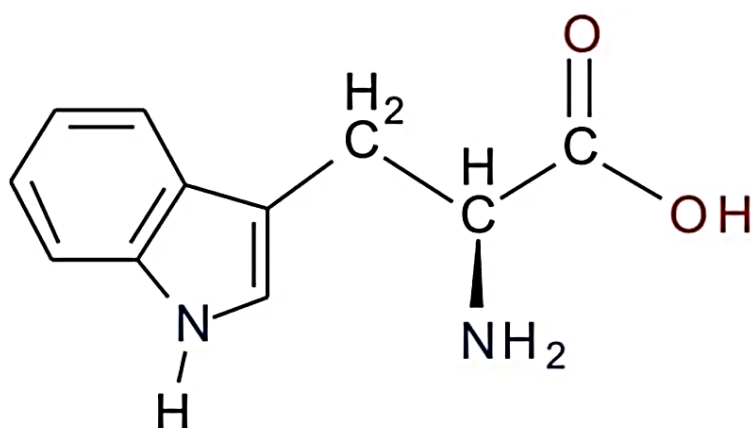
Pšeničné otruby jsou zajímavým zdrojem různých typů proteinů. Proteiny jsou zdrojem organického dusíku a esenciálních aminokyselin, které jsou důležité pro růst a regeneraci tkání [18]. Při posuzování doporučeného příjmu proteinů se nestačí zaměřovat pouze na kvantitativní stránku, ale i na kvalitativní. Kvalitativní stránkou se rozumí skladba esenciálních aminokyselin. Tzv. dietární protein by měl poskytovat všechny esenciální aminokyseliny v odpovídajícím množství [19]. Tvoří v živočišných i rostlinných produktech zpravidla 10–20 % energetického příjmu. Strava zaměřená ať už na živočišné nebo rostlinné produkty dodává proteiny různé kvality i kvantity. Nutriční hodnota proteinu není pouze o složení aminokyselin, ale také o jeho biologické dostupnosti [20].

Dietární proteiny jsou nezbytné v každé fázi života jak pro zvěř, tak pro člověka. Vyznačují se mnoha strukturními a biochemickými funkcemi. Mají zásadní vliv na zdraví a dobrý psychický stav. V posledních dvou desetiletích jejich konzumace ve vyspělých zemích stoupla zejména díky většímu zásobování a dostupnosti. Jeho spotřeba a dostupné množství narůstá také v zemích rozvojových [21]. Dietární proteiny hrají důležitou roli v energetické bilanci a kardiometabolickém zdraví. Bylo dokázáno, že strava bohatá na proteiny ve srovnání se stravou bohatou na sacharidy nebo tuky navozuje pocit sytosti a vyvolává termogenní efekt. Složení dietárního proteinu má vliv na regulaci metabolismu glukózy a lipidů přes fyziologické a buněčné mechanismy [22].

Esenciální aminokyseliny

Esenciální aminokyseliny jsou takové látky, které si organismus nedokáže sám syntetizovat de novo v dostatečném množství ani za běžných životních podmínek. Řadí se sem celkem osm aminokyselin: aminokyseliny s rozvětvenými řetězci (valin, leucin, izoleucin, methionin), aminokyseliny s aromatickým cyklem (tryptofan, fenylalanin), lysin a threonin. Tyto aminokyseliny byly definovány v roce 1951. Rose studoval změny dusíkové bilance při příjmu různých typů diet, jež byly vždy ochuzeny o konkrétní aminokyselinu. Vyjma lysin a threonin je člověk schopen tyto esenciální aminokyseliny syntetizovat v případě, že je k dispozici uhlíkatý skelet. Jedná se o transaminaci dané ketokyseliny za vzniku příslušné aminokyseliny. Mezi významné živočišné zdroje esenciálních aminokyselin patří maso, mořské ryby, vejce, mléko a mezi rostlinné zdroje sója [23; 24; 25; 26].

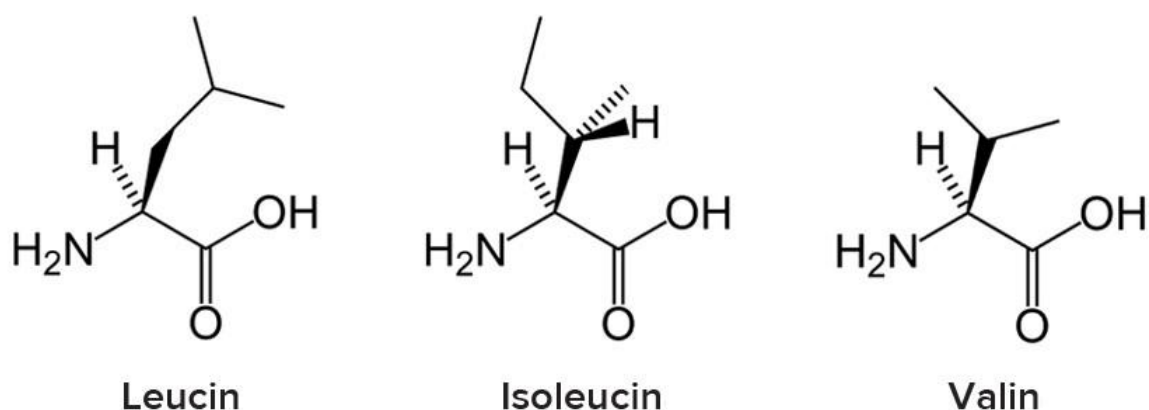
Tryptofan



Obrázek 5: Strukturální vzorec tryptofanu [27]

Tryptofan je esenciální aminokyselinou důležitou nejen pro syntézu proteinů, ale slouží také jako substrát pro tvorbu mnoha bioaktivních sloučenin s významnými fyziologickými funkcemi. Jeho hladina v krvi ovlivňuje psychický stav člověka (deprese nebo naopak vyrovnanost). Snižuje vnímání bolesti a při léčbě alkoholismu pomáhá snižovat příznaky chemických poruch organismu. Tryptofan je prekurzorem neurotransmiteru serotoninu (5-hydroxytryptamin), který je klíčovým při kontrole mnoha odezev centrálního nervového systému (CNS). Dále má vliv na změny nálad, úzkost a kognici. Je známý jako hormon štěstí. Serotonin může být pak konvertován na N-acetylserotonin (NAS) a melatonin mající vliv na cirkadiánní rytmus (jeden z biorytmů s periodou o délce 20–28 hodin). Melatonin působí pozitivně při poruchách spánku tím, že prodlužuje délku REM fáze (hlubokého odpočinku). Je to tzv. hormon dobré noci, podporuje tedy zdravý a kvalitní spánek. Tryptofan u savců degraduje tzv. kynureninovou dráhou za vzniku několika metabolitů působící při zánětech, imunitní odpovědi a excitační neurotransmise [26; 28; 29].

Valin, leucin, isoleucin



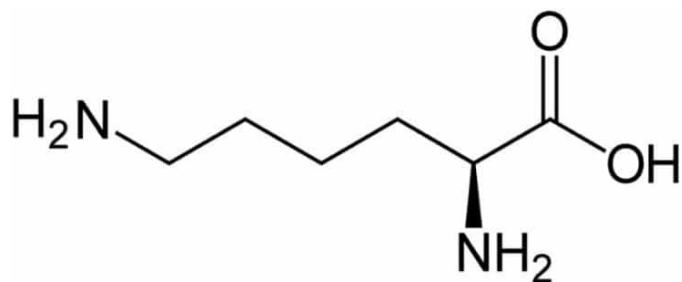
Obrázek 6: Strukturální vzorce BCAA [30]

Valin, leucin a isoleucin patří do skupiny aminokyselin s rozvětveným řetězcem známých také pod zkratkou BCAA (the branched chain amino acids) [31]. Tvoří asi 20 až 25 % dietárního proteinu. Jsou součástí regulace syntézy proteinů, sekrece inzulínu, sytosti a homeostázy glukózy [22]. Tyto aminokyseliny jsou přednostně metabolizovány v kosterním svalstvu, což vede k jejich uvolňování do jater. Příjem BCAA stravou způsobuje rapidní zvýšení hladiny plazmy. Volné suplementární formy BCAA jsou široce používány před a po cvičení, jelikož rychle zvyšují dodávky krve a ovlivňují cirkulaci hladin BCAA. Jsou aktivně metabolizovány ve svalech ve formě energie a hrají důležitou roli při syntéze proteinů [31].

Leucin a jeho metabolit α -kapronová kyselina zastávají důležitou roli při akutní sekreci inzulínu v pankreatických buňkách. Jsou tři možnosti, jakými leucin podporuje sekreci inzulínu. Prvním efektem je alosterická aktivace glutamát dehydrogenázy (GDH) s následným zvýšením glutaminolýzy. Druhým efektem je přímá inhibice buněčných proudů draselného kanálu regulovaných pomocí ATP. Regulace transkripce genů a syntézy proteinů je posledním efektem leucinu. Tyto funkce leucinu při sekreci inzulínu jsou zvyšovány přítomností glukózy [32].

V poslední době se na studium leucinu a jeho metabolitu α -ketoisokaproátu zaměřuje čím dál více. Bylo zjištěno, že tyto látky i jejich vedlejší produkty metabolismu mohou inhibovat proteolýzu, podporovat svalovou hypertrofii u myši vedoucí k redukcii ztrát dusíku močí a ke katabolismu proteinů. In vitro α -ketoisokaproát nebo jiný metabolit leucinu inhibuje degradaci proteinů. K tomuto efektu dochází díky působení inhibitorů transaminace leucinu na α -ketoisokaproát. Stojí při nejmenším za povšimnutí, že ostatní aminokyseliny ze skupiny rozvětvených aminokyselin (BCAA = branched-chain amino acids) jako isoleucin a valin se těmito účinky nevyznačují, což podporuje hypotézu, že některý z metabolitů leucinu je klíčovým elementem při spouštění antikatabolického procesu [33; 34].

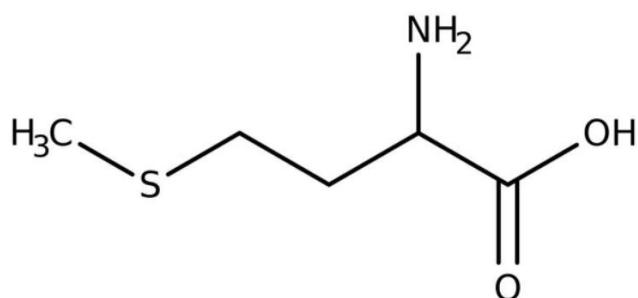
Lysin



Obrázek 7: Strukturální vzorec lysinu [35]

Lysin je první limitující aminokyselinou v potravinách s vysokým obsahem proteinů. Ke ztrátám dochází během skladování a to v důsledku podlehnutí Maillardově reakci nebo tvorbě isopeptidových vazeb. Nahrazením fruktózy sorbitolem lze dosáhnout významného zpomalení procesu degradace lysinu. Závisí to totiž na reaktivitě α -hydroxykarbonylu molekuly cukru [36; 37].

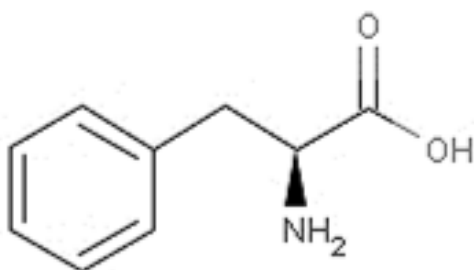
Methionin



Obrázek 8: Strukturální vzorec methioninu [38]

Methionin je jako všechny esenciální aminokyseliny nezbytné přijímat ve stravě. Vyznačuje se několika funkcemi. Je důležitý pro růst jak člověka, ostatních savců, tak i ptáků. Dále slouží jako substrát proteosyntézy. In vivo je významným donorem methylové skupiny získané díky vlastnímu metabolitu adenosylmethioninu. Tuto methylovou skupinu poskytuje při syntéze polyaminů, methylace fosfolipidů a meziproductům DNA a RNA. V jeho remethylační dráze za účasti katalyzátoru homocystein-methyltransferázy (methioninsyntázy) přijímá homocystein methylovou skupinu od 5-methyltetrahydrofolátu nebo za účasti katalyzátoru betain-homocysteinmethyltransferázy přijímá methylovou skupinu od cholinu či betainu. V tomto jediném případě dochází k recyklaci folátu a k in vivo katabolismu cholinu a betainu. Svou funkci zastává také jako prekurzor cysteinu, kde pomocí procesu transulfurace dodává cysteinu atom síry [39].

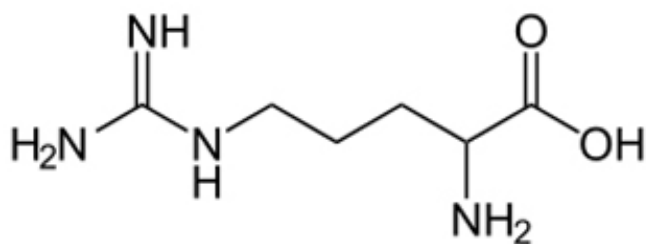
Fenylalanin



Obrázek 9: Strukturální vzorec fenylalaninu [40]

Fenylalanin je esenciální aminokyselinou, jež degraduje drahou přes tyrosin. Pro započetí degradace musí být v prvním kroku konvertován na tyrosin za pomoci enzymu fenylalaninhydroxylázy, jehož kofaktorem je tetrahydrobiopterin. Nedostatek enzymu nebo jeho kofaktoru způsobuje akumulaci fenylalaninu v tělních tekutinách a tkáních. Jedná se o onemocnění hyperfenylalaninemií, kterou lze detekovat z krevní plazmy [41].

Arginin

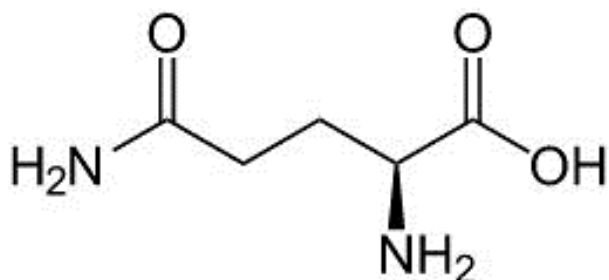


Obrázek 10: Strukturální vzorec argininu [42]

Arginin hraje významnou roli ve výživě a metabolismu. Je hlavní stavební jednotkou proteinů, tvoří asi 14 % celkového obsahu dusíku. Katabolismus argininu pro výrobu ornithinu, polyaminů, prolinu, glutamátu, agmatinu, kreatinu a oxidu dusnatého má několik různých cest. Každá z těchto látek má obrovský biologický význam. Jak lidé, tak i zvířata potřebují značné množství argininu. Arginin je nutný při regulaci syntézy jaterní močoviny v aktivní formě. Dále arginin stimuluje sekreci růstového hormonu a insulinu a také aktivuje savčí buněčnou protein kinázu MTOR (mammalian target of rapamycin), která reguluje syntézu proteinů a buněčný růst na základě proměnlivosti růstových faktorů, živin, energetických hladin a stresu. Další funkcí argininu je zvyšování proliferace a migrace enterocytů tím, že aktivuje MTOR a fokální adhezivní kinázu. Arginin při zvyšování exprese genů souvisejících s mitochondriální biogenezí, vývojem hnědé tukové tkáně, odezvu antioxidantů a oxidací energetických substrátů (mastných kyselin a glukosy) způsobem buněčně specifickým inhibuje expresi prooxidativních a lipogenních genů. Přesvědčivé důkazy ukazují, že zvyšování argininu ve stravě příznivě ovlivňuje kardiovaskulární funkci, imunitu, neurologickou funkci, hojení ran, plodnost jak mužů, tak žen, vstřebání živin, mitochondriální biogenezi, citlivost na inzulín a naopak snižuje hyperglykémii, dyslipidémii, obezitu, vysoký krevní tlak, aterosklerózu, infekce, zárodečnou či plodovou smrt a průjmy. L-arginin je mezi všemi aminokyselinami svými pozitivními účinky

na mnoho častých zdravotních problémů unikátní a tím je velmi slibnou látkou pro zlepšování a dobrý zdravotní stav u lidí i u zvířat [12].

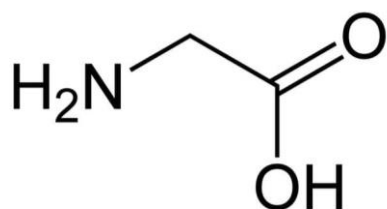
Glutamin



Obrázek 11: Strukturální vzorec glutaminu [43]

Mezi fyziologické funkce glutaminu se řadí modulace sekrecí hormonů (např. zvyšuje uvolňování inzulínu a růstového hormonu, ale snižuje produkci glukokortikoidů), účast při mnoha metabolických drah (jako syntéza nukleotidů a argininu), regulace genové exprese a transdukce signálu v buňkách. Při vlastní oxidaci je glutamin hlavním zdrojem energie pro rychle se dělící buňky včetně enterocytů, imunologicky stimulovaných lymfocytů a dalších buněk (ledviny při nedostatku potravy aj.), poskytuje ATP pro intracelulární obnovu proteinů, transport nutrientů přes plazmatickou membránu, buněčný růst, migraci a také udržování integrity buněk. U zvířat je vznik amoniaku z glutaminu v ledvinách životně důležitý při regulaci balance kyselin a zásad, zvláště za kyselých podmínek [12].

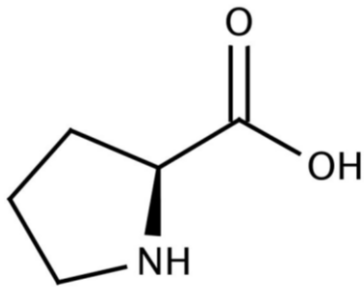
Glycin



Obrázek 12: Strukturální vzorec glycinu [44]

Glycin hraje velmi významnou roli ve výživě a metabolismu. Proteiny lidského těla jsou asi z 11, 5 % tvořeny právě glycinem. Je spousta možností jeho využití jako tvorba glutathionu, kreatinu, purinů (RNA, DNA), hemu (hemoglobinů) a serinu. Všechny výše zmíněné látky mají důležité fyziologické funkce. Například proteiny obsahující hemovou skupinu jsou nezbytné pro transport kyslíku a mitochondriální biogenezi. Glycin, společně s taurinem, je u zvířat hlavní aminokyselinou při konjugaci žlučových kyselin, což je klíčové při trávení a absorpci tuků a vitaminů rozpustných v tucích. Dále pomocí glycinem řízených chloridových kanálků v leukocytech a makrofázích glycin moduluje intracelulární hladiny Ca²⁺, čímž reguluje produkci cytokinů, superoxidu a také fungování imunitního systému. Glycin je neurotransmiterem centrální nervové soustavy. Řídí tak pohyb, příjem potravy i homeostázu celého těla [12].

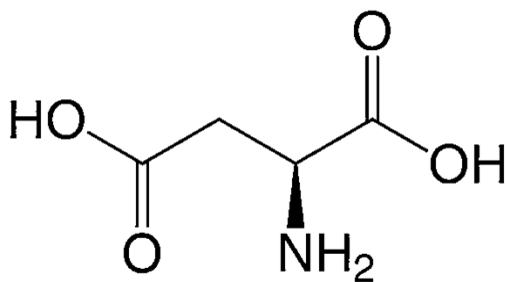
Prolin



Obrázek 13: Strukturní vzorec prolinu [45]

Prolin je z chemické i biochemické stránky unikátní aminokyselinou. Lidské tělo jej při syntéze proteinů vyžaduje v nejvyšším množství ze všech aminokyselin. Prolin je klíčovým regulátorem v mnoha biochemických a fyziologických procesů v buňkách. Je například hlavním zdrojem dusíku při syntéze polyaminů v tenkém střevě novorozenců a placentě savců. Obě tkáně se vyznačují vysokou mírou proteosyntézy a buněčné proliferace. Dráhy proteosyntézy z prolinu vedou přes prolin oxidázu a ornithin dekarboxylázu. Je známo, že prolin a jeho metabolit P5C (pyrrolin-5-karboxylát) regulují genovou expresi a signální dráhy buněk, jež jsou důležité při zdraví a nemoci. Prolin dokáže vyhledat a zničit volné radikály. Tato antioxidační funkce vysvětluje, proč při reakci na oxidativní stres buněk dochází k výraznému nárůstu koncentrace prolinu. Výsledky nedávných výzkumů poukazují i na schopnost prolinu regulovat mTOR aktivační dráhy, což zahrnuje signály nutrientů (jakožto glukózy a aminokyselin), stav buněčné energie, růstové faktory, různé stresové faktory za účelem ovlivňování růstu a funkce buněk. Společně s argininem, glutaminem a leucinem zvyšují proteosyntézu v buňkách a tkáních. Prolin se řadí mezi podmíněně esenciální aminokyseliny. Při zranění či popáleninách podporuje tkáňovou regeneraci a udržuje správnou hladinu dusíku v lidském těle [12].

Asparagová kyselina



Obrázek 14: Strukturní vzorec asparagové kyseliny [46]

Kyselina asparagová se řadí mezi neesenciální aminokyseliny, tudíž kromě příjmu z potravin ji organismus je schopen získat rozpadem endogenních bílkovin či syntézou z oxalacetátu. Aspartát vzniká transaminační reakcí z oxalacetátu, kde glutamát je zdrojem aminoskupiny, za přítomnosti pyridoxalfosfátu jako kofaktoru. Tato transaminační reakce je hlavní katabolickou cestou kyseliny asparagové. Další možností je vstup pomocí argininsukcinátu

do ornithinového cyklu. Jedná se o fyziologicky významnou reakci, při níž dochází ke štěpení na arginin a fumarát. Fumarát pak dále vstupuje do citrátového cyklu [24].

Jedná se o kyselou aminokyselinu, která ve fyziologických hodnotách pH obsahuje disociovaný karboxyl. Díky tomu může vázat kationty a podílet se na tvorbě prostorové strukturu proteinů. Hraje důležitou roli při syntéze purinů a pyrimidinů. Společně s glutamátem je známá jako excitační aminokyselina v mozku [24].

Používá se na výrobu umělého sladidla zvaném aspartam, který se složen právě z aspartátu a fenylalaninu. Avšak vzhledem k častým projevům mnoha nežádoucích účinků, jako jsou bolest hlavy, únava, ztráta sluchu, nespavost a slabost, a také rozkladu při teplotách okolo 40 °C za vzniku jedovatého formaldehydu se od jeho použití upouští [24].

Její nejvyšší množství je obsaženo v zelenině. Najdeme ji i ve výživových doplňcích pro sportovce, jelikož zvyšuje jejich vytrvalost a fyzickou výdrž. Dále chrání centrální nervovou soustavu, zvyšuje odolnost proti únavě a odstraňováním amoniaku detoxikuje organismus [26].

2.4 Proteinové doplňky stravy

Proteinové potravinové doplňky jsou jedním z nejpobulárnějších doplňků stravy vůbec. Užívají je atleti, rekreační sportovci i vojáci usilující o nabrání svalové hmoty, zlepšení zotavení po cvičení a zvýšení výkonnosti. Nejčastěji se vyskytují ve formě prášku. Jejich příprava spočívá ve smíchání daného množství prášku s daným objemem vody, čímž zaručí konzumentovi daný příjem živin. Dostupné jsou také ve formě tyčinek, koktejlů, cereálií aj. Většina těchto produktů je vyrobena ze sójových nebo arašídových bílkovin, případně ze syrovátky (mléčné bílkoviny). Živočišné proteiny jsou zpravidla mnohem kvalitnější než proteiny rostlinného původu. Jedná se o lukrativní sektor s rapidně rostoucí poptávkou po produktech [47; 48; 49].

2.5 Extrakční metody pro izolaci proteinů

V rámci již dříve zmiňované valorizace pšeničných otrub si nelze nepovšimnout značného zastoupení proteinů (14–18 %) v nich. Jelikož se konzumace proteinů, konkrétně proteinových doplňků stravy, stává čím dál více aktuální nejen mezi profesionálními sportovci, nabízí se právě extrakce proteinů z pšeničných otrub. Existuje mnoho přístupů jejich izolace (extrakce). Cílem je zpravidla získat preparát o vysoké čistotě. Z tohoto hlediska se rozlišují dva termíny, proteinový koncentrát a proteinový izolát. Proteinový koncentrát by měl obsahovat minimálně 65 % proteinů v sušině a proteinový izolát 90 % proteinů v sušině [50].

2.5.1 Izolace proteinů alkalickou extrakcí

Metoda je založena na rozpustnosti proteinů otrub v alkalickém prostředí a jejich vysrážení v isoelektrickém bodě. Aplikována byla na rýžové otruby a rýžovou mouku například v publikacích [51; 52], u nichž se nachází rozdíly v dobách extrakce a srážení. Princip však zůstává shodný. Otruby se nejprve smíchají s NaOH za pokojové teploty, aby došlo k rozpuštění proteinů, a zcentrifugují. Supernatant je následně vysrážen použitím HCl. V publikaci od Salas-Mellady byla extrakce jednostupňová, oproti tomu v publikaci od Kumagaie byla dvoustupňová (precipitát otrub po centrifugaci byl znovu použit

pro extrakci). Po izolaci byl protein v obou případech zlyofilizován [51; 52]. V článku od Salas-Mellady byl získán produkt o čistotě (obsahu proteinů) v průměru 59,9 %. V článku od Kumagaie izolovali produkt o čistotě 84,7 %.

2.5.2 Izolace proteinů degradací škrobu

Metoda izolace proteinů pomocí degradace škrobu byla popsána v článku od Kumagaie [52], kde byla aplikována na rýžovou mouku. Směs rýžové mouky a tepelně odolných α -amyláz byla po dobu 30 minut vystavena teplotě 80 °C a pak zahřívána 10 minut při teplotě 90 °C. Po poklesu teploty pod 50 °C byla směs zcentrifugována. Precipitát byl znovu smíchán s tepelně odolnými α -amylázami, promyt a zlyofilizován. Čistota lyofilizátu se pohybovala okolo 78,2 % [52].

2.5.3 Izolace proteinů kombinací fermentace a alkalické extrakce

V publikaci dle Arte [53] byla použita extrakce proteinů na základě fermentace kyseliny mléčné a alkalické extrakce za snížené teploty. Byla studována kombinace bakterií mléčného kvašení, enzymů degradujících buněčnou stěnu a fytázy. Bioprocés s fermentací kyseliny mléčné a enzymy je efektivním nástrojem pro změnu složení vlákniny a proteinů z obilných otrub a tím k celkovému zvýšení nutriční hodnoty otrub. Vybraná metoda byla následně použita i v publikaci od Yilmaz-Turana [54] a spočívá v inokulaci pšeničných otrub ve směsi s vodou startovací kulturou (Florapan 4K). Fermentace probíhá po dobu 8 hodin při 35 °C. Zfermentovaný kal je následně přes noc extrahován pomocí NaOH při 4 °C. Po centrifugaci se supernatant vysráží kyselinou chlorovodíkovou. Výsledný protein se centrifugací oddělí, podrobí dialýze pro odstranění solných příměsí a zlyofilizuje. Lze tak získat proteinový izolát s modifikovanými chemickými vlastnostmi o čistotě okolo 81 % [53; 54].

2.5.4 Izolace proteinů metodou dle Osborna

Další možnou metodou izolace proteinů je extrakce vyvinutá Osbornem popsána v publikacích [55; 56]. Metoda byla studována na rýžové mouce. Rýžová mouka je nejprve odtučněna pomocí hexanu a usušena. Odtučněná mouka byla extrahována vodou při 20 °C po dobu 4 hodin a zcentrifugována. Následně probíhala extrakce pomocí 5% NaCl za stejných podmínek (20 °C, 4 hod). Dalším krokem extrakce bylo srážení hydroxidem sodným na pH 11 (20 °C, 30 min) a 70% ethanolem (20 °C, 4 hod). Každá z extrakcí byla provedena dvakrát, aby byl vyextrahován veškerý přítomný protein. Izolovaný protein byl nakonec zlyofilizován. Čistota izolovaného materiálu se pohybovala kolem 78 % [55; 56].

2.6 Lyofilizace

Lyofilizace nebo též mrazová sublimace je nejšetrnější sušicí metodou biologicky významných látek. Vysouší se tak látky termolabilní, ve vodném roztoku nestálé či obtížně stabilizovatelné. Principem je odstranění vody (nebo jiného rozpouštědla) ze zmrazeného roztoku sublimací, tj. fázovým přechodem tuhé látky přímo ve skupenství plynné. Rozpouštědlo sublimuje za vysokého vakua a nízkých teplot. Proces probíhá ve třech fázích. Prvně dochází k namrazování roztoku na co největší povrch baňky rotací v chladicí směsi při teplotě asi -70 °C. Poté začne evakuování dokud nevytěká hlavní množství rozpouštědla. Poslední fází je dosušování při poněkud vyšší teplotě. Při lyofilizaci nedochází k přesoušení a tím k denaturaci

materiálu, jelikož si produkt ponechává svůj nezbytný obsah vody. Lyofilizáty jsou velmi kypřé a nerozkládají se samovolně, protože nízká teplota zastavuje enzymatické pochody. Mrazová sublimace se v laboratořích používá nejčastěji na roztoky bílkovin, sér, antigenů, bakteriální kultury, histologické preparáty i celé orgány [57; 58].

2.7 Instrumentální metody využívané při analýze proteinových doplňků stravy

Instrumentální metody lze rozdělovat do několika kategorií podle různých hledisek. Jednou z možností je podle toho, zda analyzujeme organický nebo anorganický materiál. V případě, že se jedná o anorganickou sloučeninu, zpravidla tyto látky analyzujeme ve formě iontů. Část z nich se v iontové formě vyskytuje, zbylou část je možné snadno na ionty převést. V daném materiálu mohou být přítomny kterékoliv prvky periodické soustavy. Jestliže pouhá analýza iontů není dostačující, přistupuje se dále k analýze prostorového uspořádání (hlavně u vzorků tuhého charakteru) [59].

V organických materiálech se zpravidla vyskytují hlavně prvky jako uhlík, vodík, kyslík a dusík, méně častěji pak síra, fosfor, křemík a halogeny. Pro charakterizaci takového materiálu nestačí pouhá elementární analýza (zjištění druhu a obsahu přítomných prvků), ale je potřeba se zabývat též strukturní analýzou a případně stanovením fyzikálních konstant. Bude tak zajištěna přesnější charakterizace a identifikace sloučeniny. Organické látky se mohou lišit jen ve své molekulové struktuře, zatímco chemické složení zůstává stejné. Nastává to z důvodu různých vazebných schopností uhlíku a některých jiných prvků [59].

Dále pak dělíme instrumentální techniky dle principů, na kterých jsou jednotlivé metody založeny. Nejedná se tedy o homogenní obor. První skupinou jsou metody elektrochemické, při nichž dochází k přenosu elektrického náboje přes fázové rozhraní a transportu nabitých částic v roztoku. Řadí se sem potenciometrie, konduktometrie, dielektrimetrie, polarografie, coulometrie a elektrogravimetrie. Druhou skupinou jsou optické metody, které jsou založeny na interakci elektromagnetického záření s hmotou. Hmotou je zde zdrojem záření. Patří sem metody emisní, absorpční, refraktometrie, interferometrie, polarimetrie, radiometrie, rentgenová spektrální analýza, nukleární magnetická rezonance a hmotová spektroskopie. Třetí jsou metody termické analýzy, kde se studují pochody při zahřívání nebo ochlazování tuhých a kapalných vzorků. Jsou to například diferenční termická analýza, termogravimetrická analýza, termická dilatometrie a enthalpiometrie. Poslední skupinou jsou separační metody, jež kromě analytické funkce plní i funkci preparace na čisté látky. Jedná se zejména o chromatografii, elektroforézu a hmotnostní spektrometrii [60].

2.7.1 Infračervená spektroskopie

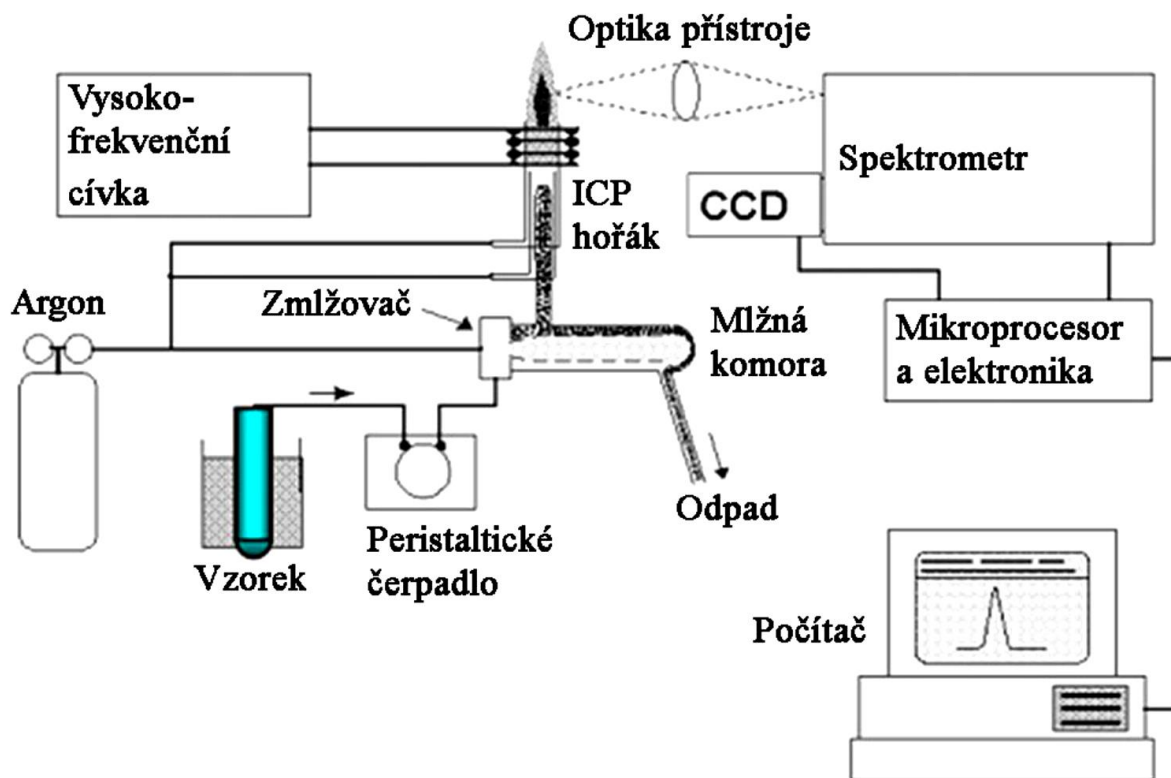
Jedná se o rychlou a citlivou nedestruktivní metodu (analyzovaný materiál zůstává v nepoškozeném stavu), při níž dochází k interakci mezi elektromagnetickým zářením a daným vzorkem. Touto metodou lze získat informace jak o složení vzorku, tak i o jeho molekulové struktuře. Rozsah vlnových délek infračerveného elektromagnetického záření je roven 800 nm až 0,5 mm, čímž zapadá do oblasti mezi záření viditelné (380–780 nm) a záření mikrovlnné (0,4 mm–15 cm). Podle vlnových délek záření se dělí na dalekou (FIR = far infrared), střední (MIR = middle infrared) a blízkou (NIR = near infrared) infračervenou spektroskopii. V praxi se nejvíce využívá oblast střední, kde absorpcí energie pro ni charakteristické způsobí změny

rotačních i vibračních stavů molekul. Tyto rotační a vibrační přechody tvoří podstatu infračervené spektroskopie. Mohou být vibrační, rotační či kombinované vibračně-rotační. Pro praktické využití hrají důležitou roli hlavně čistě vibrační a kombinované přechody, protože čistě rotační jsou typické pro vzdálenou infračervenou a případně mikrovlnnou oblast [61].

Změny vibračních a vibračně-rotačních stavů molekul se projevují ve spektrech jako absorpční pásy. Vlnočtem (převrácená hodnota vlnové délky záření) a intenzitou absorpce (vyjadřovaná absorbcí nebo transmitancí) jsou definovány absorpční pásy. Vibracemi se rozumí změny délek a úhlů vazeb mezi atomy v molekulách. Vazby jsou tedy pružné a jejich viditelnost v infračerveném spektru je podmíněna změnou dipólového momentu. Rozlišujeme dva druhy vibrací podle toho, zda se mění délka vazeb mezi atomy – vibrace valenční nebo valenční úhly – vibrace deformační. Molekuly mohou vibrovat více způsoby. Pro každý způsob mají pak svůj charakteristický absorpční pás. Každá látka má své specifické spektrum, pomocí jehož lze tuto látku určit. Spektrum neznámé látky je možné porovnat se spektry z atlasů či knihoven, avšak zde je nutné analýzu provést stejnou technikou za stejných podmínek jako v případě porovnávaných spekter. Druhou možností je zjištění přítomnosti funkčních skupin, které se ve spektrech různých látek projevují velmi podobně. K tomu postačují tabulky, v nichž je zmíněna poloha a intenzita absorpčních pásů daných funkčních skupin v infračerveném spektru [61].

2.7.2 ICP-OES

Optická emisní spektrometrie se řadí mezi nejcitlivější a nejselektivnější metody pro stanovení elementárního složení vzorků. Je velmi univerzální a jednoduchá, dosahuje velmi nízkých mezí detekce a je schopna spolehlivě identifikovat a kvantifikovat až 45 prvků. Optická spektrometrie s indukčně vázaným plazmovým výbojem (ICP-OES) jakožto budícím zdrojem měří optickou emisí vzorků. Tyto vzorky jsou do plazmatu přiváděny jemně rozptýlené ve formě aerosolu. Teplota plazmatu, jež je tvořeno proudem argonu za atmosférického tlaku, se obvykle pohybuje v rozmezí 5 000 až 10 000 K. Zde dochází k vypaření, účinné atomizaci a excitaci většiny prvků. Potřebná energie je dodávána indukčně radiofrekvenčním elektromagnetickým polem [62]. Schematické znázornění je vyobrazeno na obrázku 15.



Obrázek 15: Schéma ICP-OES [63]

ICP-OES (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry) je komerčně používaná již od roku 1974. Díky své spolehlivosti, možné analýzy mnoha prvků a vysokému výkonu se stala také široce využívanou metodou jak pro rutinní výzkumy, tak i pro vysoce specifické analýzy [64].

2.8 Metody sloužící k charakterizaci proteinových doplňků stravy

2.8.1 Kjeldahlova metoda

Kjeldahlova metoda je rozšířenou technikou pro měření obsahu dusíku v potravinách, nápojích (původně byla vyvinuta na použití v pivovarnictví), masu, zemědělských produktech, krmivech, odpadu, přírodních pramenech, půdě, biologických materiálech, mléčných výrobcích, octu, farmaceutických produktech a mnohých dalších. Skládá se ze tří kroků. Prvním je mineralizace vzorku obsahující dusík, která se provádí digescí kyselinou sírovou za přítomnosti katalyzátoru a způsobuje konverzi dusíku na kation amonný. K urychlení trvání reakce je většinou používána směs síranu sodného, síranu rtuťného, síranu měďnatého, selenu. Síran sodný zvyšuje bod varu kyseliny sírové a ostatní složky působí jako katalyzátor. Mineralizace se provádí v rozmezí teplot 360–410 °C a považuje se za ukončenou, jakmile se roztok vyjasní za uvolnění par. V druhém kroku přidáním hydroxidu sodného (zvýšení pH) dochází k transformaci kationtů amonných na samotný amoniak, destilaci amoniaku vodní parou a jímání amoniaku do kyselé předlohy. Jako předloha se používá kyselina chlorovodíková, kyselina sírová nebo kyselina trihydrogenboritá. Třetím, a zároveň posledním, krokem je titrace získaného destilátu v předloze silnou bází. Výhodou jímání amoniaku do předlohy s kyselinou trihydrogenboritou je potřeba jen jednoho standardizovaného roztoku (HCl nebo H₂SO₄ jako titrační činidlo) a přímé získání výsledků. Pokud předloha obsahuje

silnou kyselinu, jsou nutné dva standardizované roztoky, což je titrační činidlo (NaOH) a silná kyselina do předlohy. V tomto druhém případě výsledky obdržíme nepřímou. Při titraci se využívá vizuálního indikátoru. Ověřeným indikátorem je Tashirův indikátor, což je směs methylové červeně a methylové modře v poměru 2:1. K barevnému přechodu mezi zelenou a fialovou dochází při pH hodnotě 5,2 [65].

2.8.2 Hartree-Lowryho metoda stanovení proteinů

Hartree-Lowryho metoda je jedním ze způsobů stanovení celkového obsahu proteinů ve vzorcích. Jedná se o standardní často volenou metodu, protože se při jejím použití specifická absorbance proteinů významně nemění a Beerův zákon je dodržován v širokém rozsahu. Citlivost metody se pohybuje okolo 0,9 µg/ml [66]. Principem tohoto modifikovaného stanovení je reakce peptidových vazeb proteinů s ionty mědi a reakce mezi Folin-Ciocalteautovým činidlem a aromatickým kruhem přítomných aromatických aminokyselin. Celá reakce vytvoří na konci tmavě modrý stabilní komplex, který lze zanalyzovat při 650–750 nm [67].

2.8.3 Analýza profilu aminokyselin

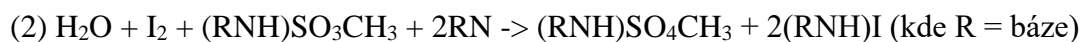
Pro analýzu a separaci aminokyselin bylo vyvinuto již několik chromatografických a elektroforetických metod. Vzorek musí projít nejprve hydrolyzou, poté derivatizací a teprve pak jde k detekci. Nejvíce používané chromatografické metody lze rozdělit do dvou skupin a to z podle toho, zda dochází k derivatizaci volných aminokyselin před kolonou nebo až za kolonou. Z historického hlediska derivatizace za kolonou byla vyvinuta jako první. Zahrnuje separaci reziduí na katexové koloně, po níž následuje reakce eluátu s chromoforem nebo fluoroforem. V před-kolonovém uspořádání dochází prvně k derivatizaci aminokyselin hydrolyzátu a až potom k jejich separaci na HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) koloně s obrácenými fázemi [68].

Po-kolonové uspořádání má výhodu chromatografické separace interferujících látek před uskutečněním reakce. Toho se využívá hlavně při analýze neznámého komplexního materiálu. Iontoměničové kolony obecně vydrží déle a umožňují separaci většího množství homologů aminokyselin. Na druhou stranu toto uspořádání vyžaduje on-line reaktor, který sice dodává systému komplexnost, ale způsobuje rozšiřování píků a šum baseliny. Separace na iontoměničích je vhodnou volbou pro separaci velkého množství aminokyselin najednou (okolo 40 aminokyselin a homologů). Tato metoda je hojně využívána pro separaci aminokyselin a jejich derivátů ve fyziologických tekutinách [68].

Rozlišení kolon s obrácenými fázemi je velmi vysoké a doba separace mnohem kratší ve srovnání s iontoměničovou chromatografií. Výkon kolon s obrácenými fázemi může být však rozlišný, ztrácí rozlišení a vytváří protitlak rychleji než iontoměničové kolony. Tato metoda je vhodná pro separaci menšího množství aminokyselin najednou (okolo 20 aminokyselin) [68].

2.8.4 Karl-Fischerova titrace pro stanovení obsahu vody

Tuto titrační metodu pro stanovení obsahu vody vynalezl v roce 1935 německý vědec Karl Fischer a později byla modifikována Smithem, Bryantem, Mitchellem a Scholzem [69]. Reakce probíhá ve dvou krocích podle následujícího schématu [70]:



Existují dvě techniky stanovení vody podle Karl Fischera: volumetrická a coulometrická titrace. Volumetrická titrace je vhodná zejména pro vzorky obsahující minimálně 1 % vody. Vzorek se rozpouští Karl Fischerově rozpouštědle (obvykle na bázi methanolu). Jod je přidáván jako součást Karl Fischerova reagentu, jež se skládá z oxidu siřičitého a jodu rozpuštěného ve směsi pyridinu a methanolu. Konec titrace je měřen potenciometricky. Coulometrická titrace vyžaduje pouze jeden roztok, jehož součástí je anion jodu. Jod je produkován pomocí anodické oxidace jodidu z roztoku. Konec titrace je měřen elektrochemicky. Je vhodná pro vzorky s obsahem vody do 1 % [69].

Karl Fischerova titrace se používá v širokém rozmezí různých průmyslových odvětví. Jedná se o přímé stanovení obsahu vody se spolehlivými výsledky. V potravinářství se pomocí ní detekuje množství vody v ovocných džusech, medu, mouce, těstovin, brambůrek, kakau, v petrolejovém průmyslu ve všech druzích olejů, benzínu, petroleji, v kosmetickém průmyslu v šamponech, krémech, zubních pastách, ve farmaceutickém průmyslu v surových materiálech, tabletách, lyofilizátech aj [69].

2.8.5 ELISA

ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) je analytickou metodou, pomocí níž lze kvantitativně stanovit různé antigeny, například lepek. Existuje několik variant této metody. Princip však zůstává stejný. Antigen nebo protilátka je zakotvena (adsorpcí nebo kovalentní vazbou) na nerozpustném nosiči, kterým bývá zpravidla povrch reakční nádoby či mikrotritrační destičky. Dochází zde ke specifické interakci antigenu a protilátky, kdy na jednoho z těchto partnerů je kovalentně navázán enzym (nejčastěji peroxidasa nebo alkalická fosfatasa). Do reakční směsi je přidán substrát, který je působením katalyzátoru převeden na barevný produkt. Tento produkt je poté změřen spektrofotometricky. Změřená koncentrace produktu je pak přímo úměrná koncentraci antigenu nebo protilátky ve vzorku [71].

● Analyt/Antigen
 ● Enzym
  Konjugovaná primární protilátka



Obrázek 16: Příklad přímého stanovení – metoda ELISA [72]

2.8.6 Biologické testování proteinů

Metody testování potravinových proteinů se rozdělují do dvou kategorií na in vivo a in vitro zkoušky. Nejlepším způsobem zkoumání kvality proteinů by bylo samozřejmě testování na člověku, avšak cena i čas to zakazují. Velmi rozšířeny jsou metody in vivo využívající krysy. Metody in vitro jsou preciznější a z časového hlediska výhodnější, tedy rychlejší, ve srovnání s metodami in vivo. Vztahu in vitro metod k metodám in vivo musí být podrobně porozuměno a musí být použitelné pro široké spektrum proteinů přítomných potravinách a potravinových produktech [73].

Testování u lidí

Kvalitu proteinů je velmi obtížné definovat přesně, jelikož to závisí jak na aminokyselinovém profilu, stravitelnosti tak na složení a adekvátnosti stravy jako takové a na výživě, fyziologickém a zdravotním stavu konkrétního jedince. Většina testování proteinů u lidí sleduje bilanci dusíku. Tato data se pak dále převádí na standardizaci testů na krysách. Stravitelnost proteinů je ovlivňována strukturou a schopností asociace s jinými složkami potravy (např. s lipidy) [73].

Stanovení stravitelnosti in vitro

Ve srovnání s testováním na krysách jsou metody in vitro méně náročné na čas i množství vzorku. Může být tak testováno více vzorků souběžně. Výhodou metod in vitro je, že není potřeba speciálních povolení či licencí. Veškeré in vitro metody pro stanovení stravitelnosti potravin jsou založeny na použití enzymů, které jsou přirozeně přítomné v gastrointestinálním traktu. Důležitá je simulace fyziologických podmínek [73].

Publikováno bylo několik metod stanovení stravitelnosti proteinů. Jednou z nich bylo testování proteinových koncentrátů přítomných v listech rostlin. Tato in vitro stravitelnost pomocí inkubačních technik enzymů pepsin/trypsin byla srovnatelná se stravitelností s využitím krys. Celková inkubace trvala asi 40 hodin a náročnost metody byla vyšší. Slibnou technikou pak je využití působení komerčně dostupných pankreatických enzymů na směs proteinů ve vodě při pH 8. Byla monitorována změna pH zhruba po každých 10 minutách. Tato metoda dostala rovnocenné výsledky pro 23 z větší části rostlinných proteinů s výsledky testování na krysách

[73]. Citlivost proteinů k proteolýze lze testovat také procedurou, která spočívá ve dvoufázové digesti proteinů enzymy pepsin a pankreatin, jež imitují trávení v žaludku a tenkém střevu. Obsah zbylých nestrávených proteinů lze poté analyzovat např. metodou dle Kjeldahla [74].

2.9 Analýza rozptylu (ANOVA)

Analýza rozptylu, zkráceně ANOVA (Analysis of Variance), se používá k separaci získaných dat do skupin souvisejících s různými faktory dat a jejich vzájemných interakcí. Metoda je založená na zjišťování vlivů různých faktorů (nezávislých proměnných) na sledovanou veličinu (závislou proměnnou), jejíž hodnoty kolísají s variabilitou těchto faktorů. Celkový rozptyl dat je nutno rozdělit na skupiny, které mají známé zdroje variability, a na skupinu neobjasněnou. Je předpokládána hypotéza H_0 , jejíž pravdivost je posuzována oproti alternativní hypotéze H_1 . Základem této statistické metody je počítání testovacího kritéria F , které porovnává průměrné hodnoty jednotlivých skupin a testuje, jestli se liší díky působení přirozené variability nebo vlivem studovaného faktoru. Vypočtená F hodnota se srovnává s tabelovanou kritickou hodnotou F . V případě, že je vypočtená F hodnota větší než kritická hodnota F , nulová hypotéza je zamítnuta. Zda hypotéza H_0 platí je hodnoceno také pomocí tzv. p -hodnoty, kterou lze definovat jako nejmenší hladinu významnosti testu, při níž se hypotéza H_0 ještě zamítá. Tato hodnota bývá zpravidla přirovnávána ke stanovené hladině významnosti α . Pokud je p -hodnota menší než α , hypotéza H_0 se zamítá. Na základě pravdivosti jedné z těchto hypotéz lze zhodnotit významnost jednotlivých zdrojů variability v datech. Podle počtu nezávislých proměnných ovlivňujících závislou proměnnou se jedná buď o metodu jednorozměrnou (ANOVA) mající jednu nezávislou proměnnou a nebo vícerozměrnou (MANOVA) [75; 76; 77; 78].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiály a zařízení

3.1.1 Pomůcky

Běžné laboratorní sklo (Simax), Büchnerova nálevka, filtrační papír (150 mm, Whatmann Schlackech a Schnele), plastové zkumavky se závitovým uzávěrem 50 ml, pH papírky, automatické pipety (Thermo Scientific), plastové špičky, plastové centrifugační zkumavky 50 a 250 ml

3.1.2 Chemikálie

Demineralizovaná voda, hexane pure (Lach-Ner, s. r. o., ČR), hydrogenfosforečnan sodný p. a. (LACHEMA a. s., ČR), dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p. a. (Lach-Ner s.r.o., ČR), ethanol absolutní 99,8% HPLC čistota (Fisher Scientific, UK), pepsin from porcine gastric mucosa (Sigma, SRN), pankreatine from porcine pancreas (Sigma, SRN), 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), substrát, konjugát, stop solution, promývací roztok (RIDASCREEN® Gliadin competitive, R7021), Folin & Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich, SRN), Hydranal™ Solvent (Honeywell), methyl alcohol 99,93% A.C.S. HPLC grade (Sigma-Aldrich, SRN)

3.1.3 Pšeničné otruby

Pšeničné otruby byly poskytnuty společností Mlýny J. Voženílek, spol. s r. o. z Předměřic nad Labem, Česká republika. Byly získány z přetříděných obilných zrn. Materiál se skládal zejména z vnějších vrstev zrna a dalších částí zrna s výjimkou endospermu. Maximální vlhkost otrub je 15 % a obsah surové vlákniny je asi 8 %. Otruby byly skladovány při pokojové teplotě.

3.1.4 Přístroje

Třepačky (GFL 3006), analytické váhy (KERN ABJ), předvážky (KERN 440-47 N), centrifuga vysokorychlostní chlazená (HERMLE), ICP-OES (Horiba Jobin Yvon, typ Ultima 2), pH metr (HANNA instruments, HI 221 Calibration Check Microprocessor pH Meter), lyofilizátor (LABNOCO, Freeze Dry system/Freezone 4.5) s vakuovou pumpou (BIOTECH, RZ 6), magnetická míchačka s vyhříváním (Heidolph, MR Hei-Standard), HPLC (Agilent Infinity s DAD detektorem)

3.2 Optimalizace procesu izolace proteinů

Izolační proces byl inspirován metodou izolace proteinů z rýžových otrub popsanou v publikaci Piotrowitze a Salas-Mellady [51]. Bylo testováno několik faktorů potenciálně ovlivňujících výtěžnost a čistotu extrahovaného proteinu. Mezi tyto faktory patří vícečetná extrakce, množství použitého extrakčního činidla, teplota a hodnota pH při srážení či přečištění vysrážených proteinů. Mimo samotný postup extrakce proteinů byl studován i vliv předúpravy pšeničných otrub (jakožto výchozího materiálu), konkrétně jejich mletí a odtučnění. Výsledný proteinový lyofilizát, izolovaný za optimálních podmínek, byl nakonec charakterizován z fyzikálního i chemického hlediska.

3.2.1 Výchozí postup extrakce proteinů

Navážka 60 g odtučněných otrub v centrifugačních zkumavkách smíchána s 480 ml vody, 18 ml 1M NaOH a promíchána (10 min, 250 rpm). pH bylo upraveno pomocí 1M NaOH na 11 až 11,5. Obsah promíchán (20 min, 250 rpm) a zcentrifugován (6870 rcf, 20 °C, 20 min). Supernatant 1 byl dekantací oddělen od sedimentu 1 a uchován. Sediment 1 byl smíchán s 480 ml vody a 1M NaOH upraven na pH 11 až 11,5. Směs byla promíchána (15 min, 250 rpm) a zcentrifugována (6870 rcf, 20 °C, 20 min). Supernatant 2 byl oddělen dekantací od sedimentu 2 a uchován. Sediment 2 byl smíchán s 480 ml vody a pH upraveno na 11 až 11,5 pomocí 1M NaOH. Směs byla promíchána (15 min, 250 rpm) a zcentrifugována (6870 rcf, 20 °C, 20 min). Supernatant 3 byl dekantací oddělen od sedimentu 4. Supernatanty 1, 2 i 3 byly sráženy při pH 4 použitím 1M H₂SO₄ a zcentrifugovány (6870 rcf, 20 °C, 20 min). Dekantací supernatantu byl získán sediment proteinů. Izolované proteiny byly podrobeny lyofilizaci (viz kapitola 3.2.8). Množství proteinů bylo měřeno Hartree-Lowryho metodou (viz kapitola 3.4.1) a vyjádřeno v mg proteinu/g otrub.

3.2.2 Vliv mletí otrub na výtěžnost proteinů

V rámci experimentů byl studován vliv mletí otrub na výtěžnost proteinů. Nativní pšeničné otruby byly namlety pomocí elektrického mlýnku na zrnkovou kávu. Paralelně s namletými otrubami se při extrakčním procesu pracovalo též s otrubami nativními (bez jakýchkoliv úprav). Navážka 2,5 g pšeničných otrub byla v centrifugačních zkumavkách smíchána s 20 ml vody, 0,4 ml 1M NaOH a promíchána (10 min, 250 rpm). Následně bylo upraveno pH na 11 až 11,5 pomocí 1M NaOH a obsah promíchán (20 min, 250 rpm). Poté byla provedena centrifugace (6870 rcf, 20 °C, 20 minut). Supernatant 1 byl oddělen od sedimentu 1 dekantací. Supernatant 1 byl uchován pro další měření. Sediment 1 byl smíchán s 20 ml vody a pH upraveno na 11 až 11,5 pomocí 1M NaOH. Obsah byl promíchán (15 min, 250 rpm) a zcentrifugován (6870 rcf, 20 °C, 20 min). Supernatant 2 byl od sedimentu 2 oddělen dekantací a uchován pro další měření. Sediment 2 byl smíchán s 20 ml vody a 1M NaOH bylo upraveno pH na 11 až 11,5. Směs byla promíchána (15 min, 250 rpm) a zcentrifugována (6870 rcf, 20 °C, 20 min). Množství proteinů bylo ve všech třech frakcích supernatantů determinováno spektrofotometricky Hartree-Lowryho metodou (viz kapitola 3.4.1) a je vyjádřeno v mg proteinu/g otrub. Veškeré experimenty byly provedeny v duplikátu.

3.2.3 Vícetupňová extrakce proteinů

V rámci experimentů byl studován vliv vícetupňové extrakce na výtěžnost proteinů. Vícetupňová extrakce proteinů byla testována jak na nativních, tak na namletých otrubách. Navážka 2,5 g otrub byla smíchána s 20 ml vody, 0,4 ml 1M NaOH a promíchána (10 min, 250 rpm). Následně bylo upraveno pH na 11 až 11,5. Obsah byl míchán (20 min, 250 rpm) a zcentrifugován (6870 rcf, 20 °C, 20 min). Dekantací byl supernatant 1 oddělen od sedimentu 1 a uchován. Sediment 1 byl smíchán s 20 ml vody a pomocí 1M NaOH pH upraveno na 11 až 11,5. Směs byla promíchána (15 min, 250 rpm) a zcentrifugována (6870 rcf, 20 °C, 20 min). Supernatant 2 byl dekantací oddělen od sedimentu 2 a uchován. Sediment 2 byl smíchán s 20 ml vody a pH upraveno na 11 až 11,5. Směs byla promíchána (15 min, 250 rpm) a zcentrifugována (6870 rcf, 20 °C, 20 min). Supernatant 3 byl dekantací oddělen od sedimentu 3 a uchován. Množství proteinů bylo v supernatantech 1, 2 i 3 změřeno

spektrofotometricky Hartree-Lowryho metodou při 650 nm (viz kapitola 3.4.1). Experimenty byly provedeny v duplikátu.

3.2.4 Vliv odtučnění na výtěžnost proteinů a čistotu lyofilizátu

Dále byl studován vliv odtučnění otrub na výtěžnost proteinů a čistotu lyofilizátu. Postup odtučnění vycházel z publikace Piotrowitze a Salas-Mellady [51]. Testovány byly tři různé teploty odtučňování a to 30, 45 a 60 °C. Navážka 100 g pšeničných otrub byla smíchána s 458 ml hexanu. Směs byla míchána po dobu 30 minut při teplotě 30 °C a poté zfiltrována přes Büchnerovu nálevku za normálního tlaku. Filtrační koláč odtučněných otrub byl usušen volně za laboratorních podmínek. Shodným postupem byly experimenty provedeny pro teploty odtučnění 45 a 60 °C. Takto připravený materiál byl extrahován dle postupu popsaného v kapitole 3.2.1.

3.2.5 Optimalizace poměru otrub a extrakčního činidla

V rámci optimalizace extrakčního procesu byl studován vliv poměru otrub a extrakčního činidla na výtěžnost proteinů. Zvoleny byly 4 poměry a to 1:8, 1:15, 1:20 a 1:25 (otruby:činidlo). Navážka 2,5 g byla smíchána s vodou v daném poměru, s 1M NaOH (0,4 až 1,5 ml) a promíchána (10 min, 250 rpm). Následně bylo upravena hodnota pH na 11 až 11,5 a směs míchána (20 min, 250 rpm). Centrifugací (6870 rcf, 20 °C, 20 min) byly získány supernatant 1 a sediment 1, jež byly od sebe separovány dekantací. Supernatant 1 byl uchován. Sediment 1 byl smíchán s vodou v daném poměru a 1M NaOH na pH 11 až 11,5 a promíchán (15 min, 250 rpm). Směs byla zcentrifugována (6870 rcf, 20 °C, 20 min) a supernatant 2 byl uchován. Sediment 2 byl smíchán s vodou v daném poměru a pH upraveno pomocí 1M NaOH na 11 až 11,5. Směs byla promíchána (15 min, 250 rpm) a centrifugována (6870 rcf, 20 °C, 20 min). Supernatant 3 a sediment 3 byly separovány dekantací. Supernatanty 1, 2 i 3 byly následně změřeny spektrofotometricky metodou dle Hartree-Lowryho (viz kapitola 3.4.1). Experimenty byly provedeny v duplikátu.

3.2.6 Optimalizace teploty při srážení proteinů

Pro studium vlivu teploty při srážení proteinu na výtěžnost produktu byly zvoleny teploty -20 °C, 4 °C a laboratorní teplota. Pro tyto pokusy byl použit supernatant 1 (poměr 1:15) získaný z experimentů popsaných v kapitole 3.2.5. V 10 ml supernatantu bylo upraveno pH pomocí 1M H₂SO₄ na hodnotu 4 (±0,05) a vzorek byl uchován při -20 °C, 4 °C nebo laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny. Vzorky v kapalné formě byly poté zcentrifugovány (6870 rcf, 20 min). Po dekantaci supernatantu byly sedimentované proteiny zlyofilizovány (viz 3.2.8) a změřeny spektrofotometricky Hartree-Lowryho metodou (viz 3.4.1). Experimenty byly provedeny v duplikátu.

3.2.7 Optimalizace pH při srážení proteinů

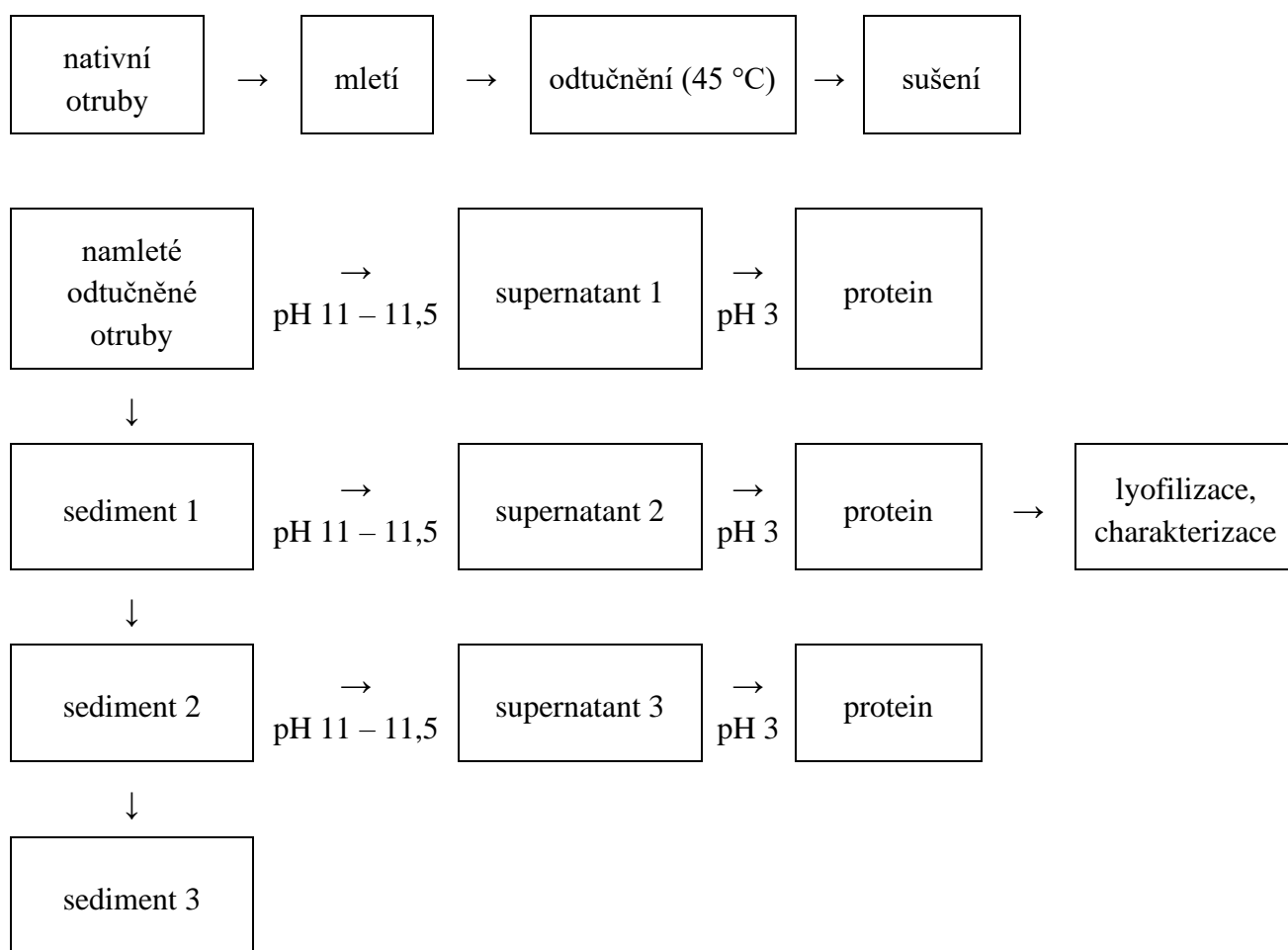
Pro studium vlivu pH při srážení proteinů na výtěžnost byl použit supernatant 1 (poměr 1:20) získaný z předchozích experimentů (viz 3.2.5). Byly testovány hodnoty pH 3, 4 a 5. 10 ml supernatantu bylo okyseleno 1M H₂SO₄ na pH 3, 4 nebo 5 (±0,05). Byla provedena centrifugace (6870 rcf, 20 °C, 20 min), sedimentované proteiny byly zlyofilizovány (viz 3.2.8) a změřeny spektrofotometricky metodou dle Hartree-Lowryho (viz 3.4.1). Experimenty byly provedeny v duplikátu.

3.2.8 Lyofilizace

Finální úpravou vyextrahovaného proteinového izolátu byla lyofilizace. Před samotnou lyofilizací byly vzorky zmrazeny na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Lyofilizace probíhala po dobu 72 hodin při tlaku $133 \cdot 10^{-3}$ mbar a teplotě $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3 Finální experimentální postup extrakce za optimálních podmínek

Na základě experimentů byly definovány optimální podmínky pro izolaci proteinů a jejich čistotu, které jsou popsány níže. Pšeničné otruby (76 g) byly namlety elektrickým mlýnkem na zrnkovou kávu, smíchány s 350 ml hexanu a míchány na magnetické zahřívací míchače (30 min, $45\text{ }^{\circ}\text{C}$). Otruby byly usušeny volně na vzduchu při laboratorní teplotě. Navážka 40 g takto odtučněných otrub byla smíchána s 600 ml vody (v poměru 1:15), 16 ml 1M NaOH a promíchána (10 min, 250 rpm). Pomocí 1M NaOH bylo upraveno pH na 11 až 11,5. Směs byla promíchána (20 min, 250 rpm) a zcentrifugována (6870 rcf, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min). Supernatant 1 byl dekantací oddělen od sedimentu 1 a uchován. Sediment 1 byl smíchán s 600 ml vody a pH upraveno na 11 až 11,5 pomocí 1M NaOH. Obsah byl promíchán (15 min, 250 rpm) a zcentrifugován (6870 rcf, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min). Supernatant 2 byl dekantací oddělen od sedimentu 2 a uchován. Sediment 2 byl smíchán s 600 ml vody a pH upraveno na 11 až 11,5 pomocí 1M NaOH. Obsah byl promíchán (15 min, 250 rpm) a zcentrifugován (6870 rcf, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min). Supernatant 3 a sediment 3 byly od sebe odděleny dekantací. Supernatanty 1, 2 i 3 byly vysráženy při pH 3 a laboratorní teploty pomocí 1M H_2SO_4 . Byla provedena centrifugace (6870 rcf, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min). Izolovaný proteinový sediment byl zlyofilizován (viz 3.2.8) a charakterizován (viz kapitola 3.4).



Obrázek 17: Schéma experimentu

3.4 Chemická a fyzikální charakterizace vzorků

3.4.1 Spektrofotometrické stanovení proteinů Hartree-Lowryho metodou

Proteiny byly analyzovány jak v kapalných extraktech, tak v lyofilizátech. V případě měření zlyofilizovaného vzorku, byla navážka 0,0256 g převedena do odměrné baňky o objemu 25 ml a doplněna vodou po rysku. Bylo upraveno pH na 11 až 11,5 pomocí 1M NaOH. Jednalo-li se o měření přímo supernatantu z extrakčního postupu, byl supernatant zředěn desetkrát. Dále byl postup shodný pro obě skupiny vzorků. Byl odebrán 1 ml roztoku do zkumavky, smíchán s 0,9 ml činidla A a inkubován ve vodní lázni (10 min, 50 °C). Vzorky byly následně ochlazeny na laboratorní teplotu. Poté bylo přidáno 0,1 ml činidla B, promícháno a inkubováno (10 min, laboratorní teplota). Po inkubaci byly do zkumavky přidány 3 ml činidla C, obsah promíchán a inkubován ve vodní lázni (10 min, 50 °C). Nakonec byly vzorky ochlazeny na laboratorní teplotu a jejich absorbance změřena při 650 nm.

3.4.2 Prvková analýza lyofilizátu

Prvkové složení proteinového izolátu vyextrahovaného optimalizovaným postupem bylo analyzováno pomocí ICP-OES (emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem). Byly stanovovány vybrané makroprvky (Ca, K, Mg, Na) a mikroprvky (Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, P, Pb, Zn). Navážka 100 mg lyofilizátu byla smíchána s 0,9 ml 1M NaOH a v odměrné baňce

(25 ml) doplněna vodou. Množství sodíku ve vzorku bylo stanoveno v prostředí deionizované vody. Takto připravené roztoky byly přefiltrovány do vialek a proměřeny na přístroji Horiba Jobin Yvon, typu Ultima 2. Parametry měření jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Parametry měření

	Makroprvky	Mikroprvky	
Výkon	1 200	1 400	W
Otáčky pumpy	15	18	ot/min
Průtok plazmového plynu	14	14	l/min
Průtok stínícího plynu	0,8	0,5	l/min
Tlak zmlžovače	3	3	bar

3.4.3 Stanovení profilu aminokyselin v lyofilizátu

Kvalitativní a kvantitativní stanovení aminokyselin v lyofilizátu bylo provedeno pomocí HPLC s DAD detekcí při 338 nm. Vzorek byl derivatizován pomocí OPA (o-phthalaldehyde). Separace byla provedena pomocí gradientové eluce směsí mobilní fáze A (40 mM Na₂HPO₄ pH 7,8) a mobilní fáze B (ACN:MeOH:voda, 45:45:10, v/v). Nastavení přístroje je uvedeno v tabulce 3, vlastnosti kolony v tabulce 4 a nastavení gradientové eluce v tabulce 5.

Tabulka 3: Nastavení HPLC přístroje pro stanovení aminokyselin

Název přístroje	HPLC Agilent
Objem nástřiku	0,5 µl
Průtok mobilní fáze	2 ml/min
Složení mobilní fáze	A: 40 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 7,8) B: ACN:MeOH:voda (45:45:10, v/v)
Teplota	40 °C
Vlnová délka detekce	338 nm
Detektor	DAD
Doba analýzy	14 min

Tabulka 4: Vlastnosti kolony

Výrobce	Agilent
Velikost	LC Column 75 × 4,6 mm
Popis	ZORBAX Eclipse AAA 3,5 µm

Tabulka 5: Nastavení gradientové eluce

čas [min]	A [%]	B [%]
0	100	0
1	100	0
9,8	43	57
10	0	100
12	0	100
12,5	100	0
14	100	0

3.4.4 Stanovení obsahu vody v lyofilizátu

Obsah vody byl stanovován titrační metodou podle Karl-Fischera. Do odměrné baňky bylo naváženo 0,5 g vzorku proteinu a přidáno 20 ml bezvodého methanolu. Baňky byly umístěny do ultrazvukové lázně vyhřívané na 50 °C po dobu 15 minut. Po vychladnutí bylo odebráno asi 5 ml roztoku vzorku a přefiltrováno přes stříkačkový filtr do vialky. Takto připravený vzorek byl použit pro titraci dle Karl-Fischera. Procentuální zastoupení vody bylo vypočteno z následující rovnice:

$$W_{H_2O} = \frac{(w_{H_2Oex} - w_{H_2Obl}) \cdot (m_{bvzOH} - m_b)}{m_{bvz} - m_b} \quad (1)$$

kde w_{H_2O} obsah vody ve vzorku v hmotnostních procentech, w_{H_2Oex} je obsah vody v extraktu vzorku, w_{H_2Obl} je obsah vody v rozpouštědle (methanolu), m_{bvzOH} hmotnost baňky se zátkou, vzorkem a methanolem, m_b je hmotnost baňky se zátkou, m_{bvz} je hmotnost baňky se zátkou a se vzorkem.

3.4.5 Stanovení obsahu lepku v lyofilizátu

Obsah lepku byl stanoven oficiální metodou uvedenou výrobcem použité sady. Byl navážen 1 g vzorku proteinu, který byl smíchán s 10 ml 60% ethanolu. Takto připravená směs byla 30 sekund vortexována a důkladně promíchávána po dobu 10 minut. Po promíchání byla směs centrifugována při pokojové teplotě, 2500 g po dobu 10 minut. Supernatant byl poté padesátkrát zředěn pufrům. Do jamek bylo pipetováno 50 μ l zředěného supernatantu a 50 μ l zředěného konjugátu. Destička byla promíchána a inkubována 30 minut při pokojové teplotě. Kapalina byla následně vylitá a jamky byly třikrát promyty 250 μ l promývacího pufru. Do jamek bylo pipetováno 100 μ l substrátu. Destička byla inkubována po dobu 10 minut ve tmě při pokojové teplotě. Po skončení inkubace bylo přidáno 100 μ l ukončovacího roztoku a byla změřena absorbance při 450 nm.

3.4.6 Stravitelnost proteinového lyofilizátu a nativních otrub

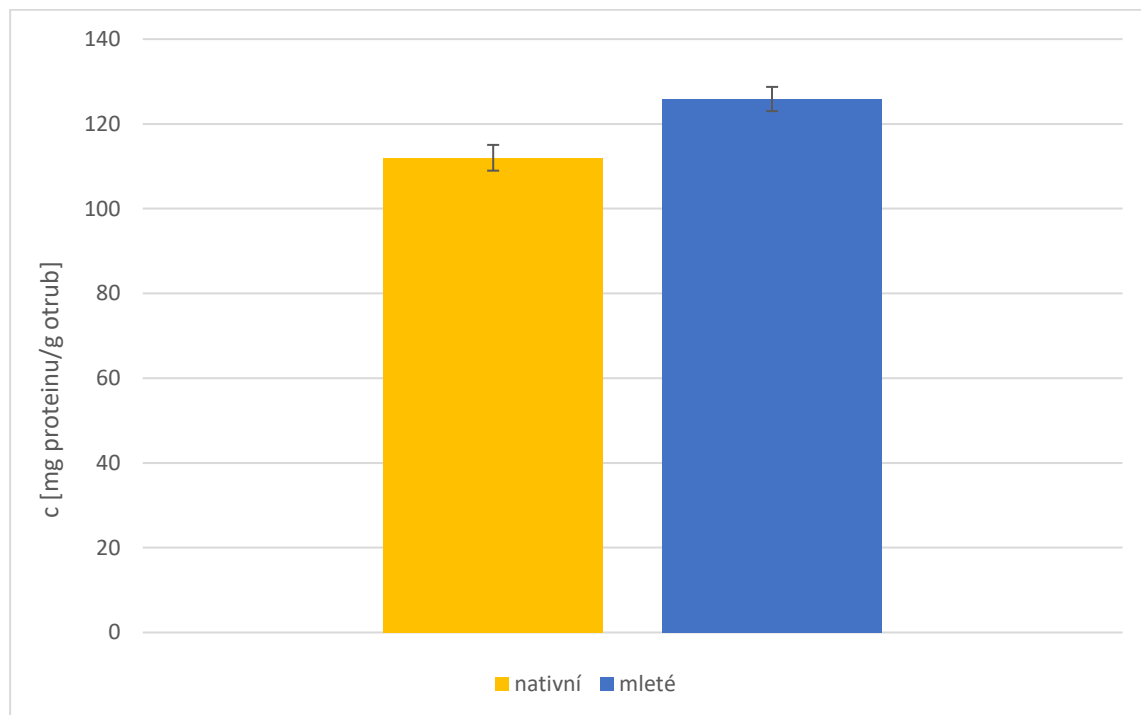
Postup pro stanovení obsahu stravitelných a nestravitelných proteinů byl založen na metodě popsané v publikaci dle Goni, Gudiel-Urbana a Saura-Calixta [79]. Stravitelnost proteinů byla provedena jak na vzorku zlyofilizovaného proteinu, tak na nativních otrubách. Do kádinky bylo naváženo 0,5 g vzorku a přidáno 15 ml 0,03M HCl. Obsah byl promíchán (5 min, 37 °C,

140 rpm). Pomocí 0,5M HCl bylo upraveno pH na 1,9 a přidán 1 ml roztoku pepsinu. Obsah byl promíchán (30 min, 37 °C, 140 rpm). Roztokem 1M NaOH bylo pH upraveno na 7,5. Do kádinky byly napipetovány 3 ml fosfátového pufru a 1 ml roztoku pankreatinu. Za stálého míchání byl vzorek inkubován (24 hod, 37 °C, 140 rpm) a zcentrifugován (6870 rcf, 20 °C, 20 min). Sediment byl kvantitativně převeden do odměrné baňky (25 ml), doplněn vodou a pH upraveno na 11 až 11,5 pomocí 1M NaOH. Vzorek byl spektrofotometricky proměřen (viz 3.4.1).

4 DISKUZE A VÝSLEDKY

4.1 Vliv mletí pšeničných otrub na výtěžnost proteinu

V rámci optimalizace metody extrakce proteinů z pšeničných otrub bylo studováno, zda má na výtěžnost a čistotu proteinu vliv mletí otrub. Navážka 2,5 g namletých otrub byla extrahována v roztoku NaOH o pH 11 až 11,5 a zcentrifugována. V supernatantu byla stanovována koncentrace proteinů Hartree-Lowryho metodou. Paralelně s namletými otrubami se pracovalo s otrubami nativními. Podrobně je celý proces popsán v kapitole 3.2.2. Výsledky extrakce lze vidět v následujícím grafu (Obrázek 18).

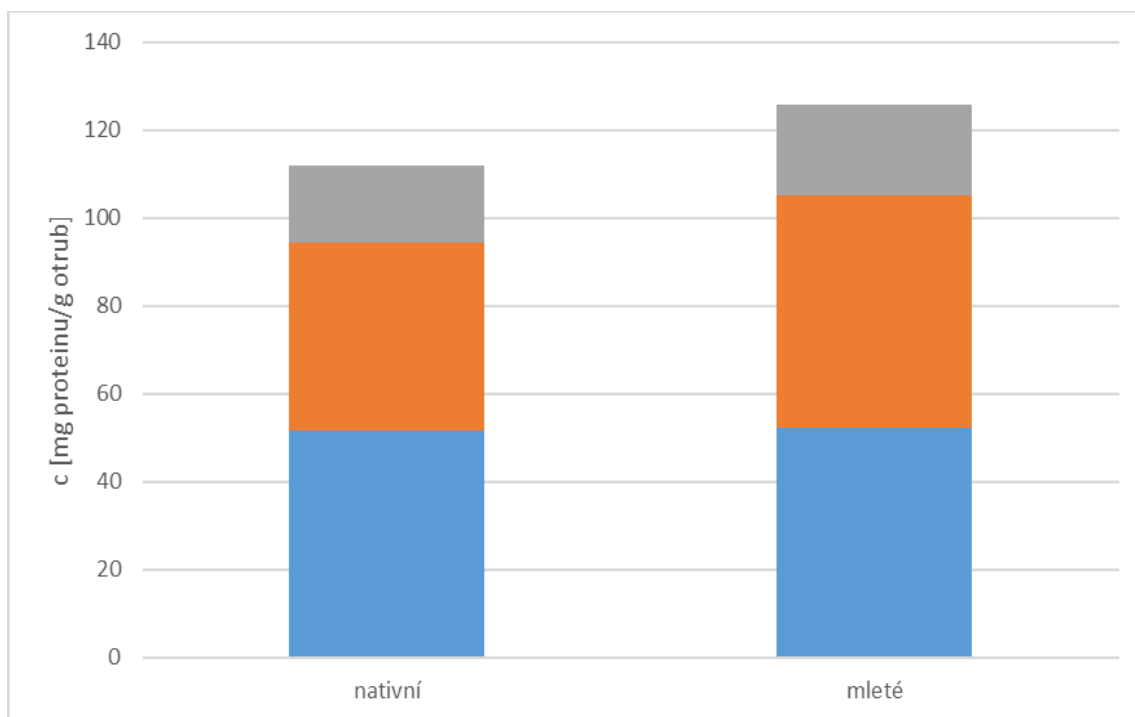


Obrázek 18: Srovnání výtěžnosti nativních a mletých otrub

Z obrázku 18 je patrný rozdíl ve výtěžnosti proteinu extrahovaného z nativních a mletých pšeničných otrub. Vyšších koncentrací bylo dosaženo při použití otrub namletých (126 ± 3 mg proteinu/g otrub) ve srovnání s otrubami nativními (112 ± 3 mg proteinu/g otrub). Namletím se pravděpodobně zlepšila difuze rozpouštědla a více se zpřístupnily obsažené proteiny, které se nachází převážně uvnitř matrixu buněčné stěny uzavřené mezi polysacharidy, což je dělá těžce dostupnými [80]. Extrakce tak byla účinnější. V rámci optimalizace metody byly zvoleny pro extrakci otruby mleté.

4.2 Výtěžnost vícestupňové extrakce

V rámci optimalizace metody izolace proteinů z pšeničných otrub byla studována vícestupňová extrakce, konkrétně třístupňová. Postup tohoto experimentu je podrobně popsán v kapitole 3.2.3. Koncentrace proteinů v každé frakci byla poté zvlášť proměřena spektrofotometricky. Výsledky lze vidět na následujícím obrázku 19 a tabulce 6.



Obrázek 19: Koncentrace proteinů ze třístupňové extrakce

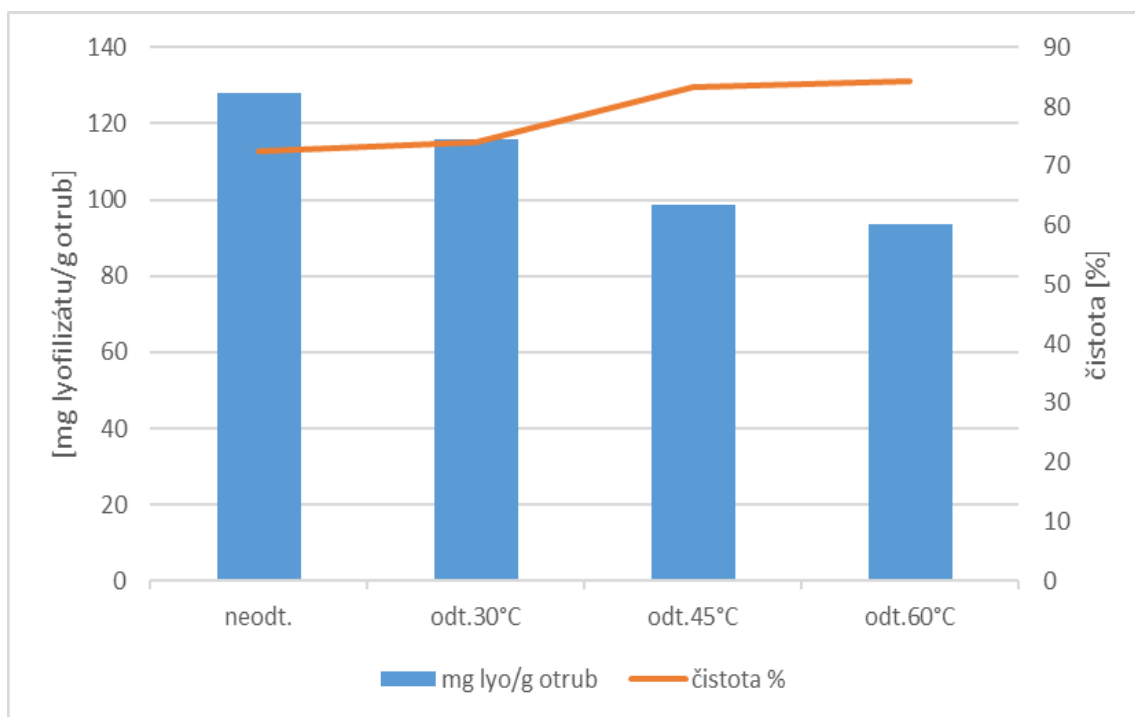
Na obrázku 19 lze vidět koncentrace proteinů v roztoku supernatantu z každé frakce třístupňové extrakce. Experiment byl prováděn jak na nativních, tak i na namletých otrubách. V obou případech lze jasně vidět, že vícestupňová extrakce vliv na výtěžnost má. S rostoucí dobou extrakce se zvyšovala také viskozita směsi. Extrakce přírodních látek rozpouštědlem je charakteristická několika stádii. První dochází k penetraci rozpouštědla do matrixu pevného materiálu. Rozpustné látky se následně rozpouští v daném rozpouštědle, difundují z matrice pryč a shlukují se. Při vícestupňové extrakci, stejně jako u kontinuální perkolace, dochází k výměně již saturovaného rozpouštědla za čisté a tím k vyšším ziskům výtěžků [81]. Pro průmyslové měřítko by bylo vhodné zvážit, zda je třetí extrakce dostatečně výhodná. V rámci optimalizace metody v laboratorních podmínkách byla zvolena třístupňová extrakce.

Tabulka 6: Koncentrace jednotlivých frakcí třístupňové extrakce

	nativní [mg proteinu/g otrub]	mleté [mg proteinu/g otrub]
1. frakce	52 ± 2	52 ± 2
2. frakce	43 ± 0	53 ± 0
3. frakce	18 ± 2	21 ± 0

4.3 Vliv odtučnění pšeničných otrub na výtěžnost proteinu

V rámci experimentů byl testován vliv tří různých teplot odtučnění (30, 45 a 60 °C) na výtěžnost a čistotu proteinů. Otruby odtučněné při těchto teplotách byly srovnány také s otrubami neodtučněnými. Otruby dále prošly extrakčním procesem. Čistota proteinu byla stanovena spektrofotometricky. Podrobný postup experimentů je definován v kapitole 3.2.4. Výsledky lze vidět na obrázku 20 a v tabulce 7.



Obrázek 20: Vliv teploty odtučnění na výtěžnost a čistotu proteinu

Z výše uvedeného obrázku 20 lze vyčíst jak výtěžnost lyofilizátu, tak i obsah bílkovin vyjádřený jako % čistota. Z hlediska výtěžnosti produktu bylo dosaženo nejvyšších výtěžků produktu při použití nativních neodtučněných otrub. S rostoucí teplotou odtučnění klesala výtěžnost. Co se týče čistoty (obsahu proteinů v materiálu) při použití neodtučněných otrub a teploty odtučnění 30 °C byla čistota materiálu relativně nízká. Podíl proteinu v lyofilizátu činil 72, respektive 74 %. Vyšší čistoty bylo naopak dosaženo při teplotách odtučnění 45 a 60 °C. Je evidentní, že otruby obsahovaly nezanedbatelné množství lipofilních látek. Takovými látkami mohou být konkrétně fytosteroly (rostlinné steroly), jejichž obsah se pohybuje okolo 0,16 až 0,17 %, a vitamin E, který tvoří asi 0,15 % celkového složení. [82; 83; 84]. Efektivní extrakcí se zásadně zvýšila čistota produktu z hlediska obsahu proteinů.

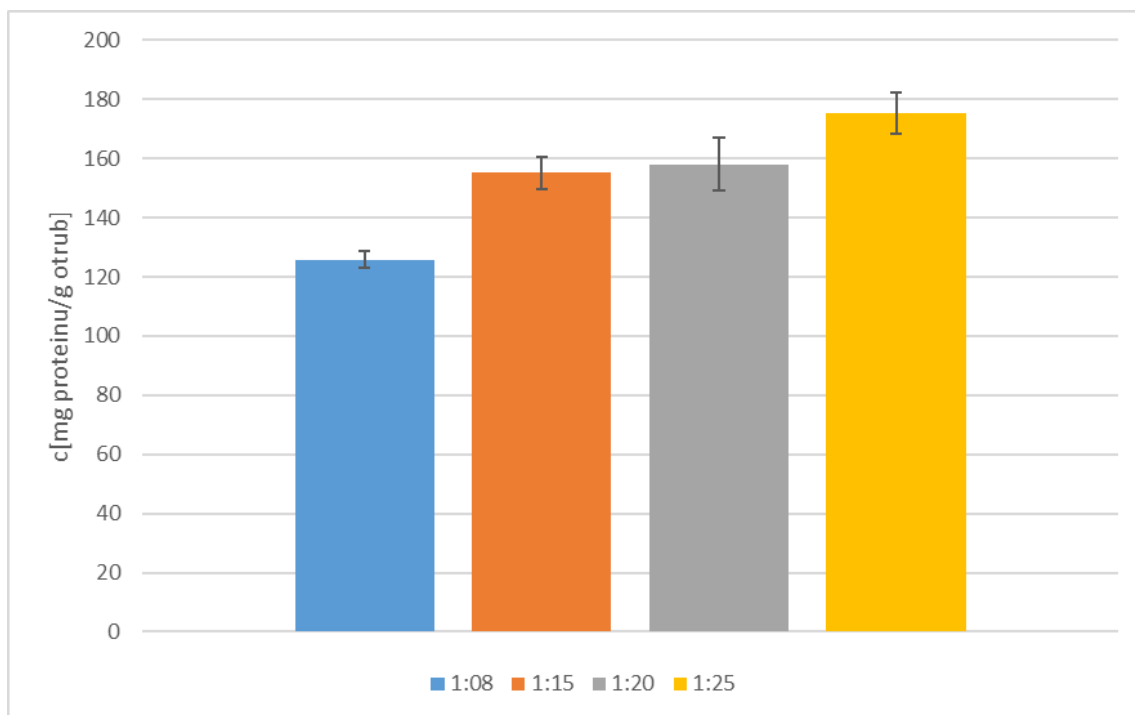
Tabulka 7: Výtěžnost a čistota materiálu

	mg lyofilizátu/g otrub	čistota [%]
Neodtučněné otruby	127,9	72 ± 0
Odtučněné při 30 °C	115,8	74 ± 2
Odtučněné při 45 °C	98,5	83 ± 1
Odtučněné při 60 °C	93,4	84 ± 3

Podle tabulky 7 a obrázku 20 lze výsledky rozdělit do dvou skupin, což bylo potvrzeno i analýzou rozptylu ($p = 0,0118$). První skupinu tvoří neodtučněné otruby a otruby odtučněné při 30 °C. Druhou skupinu tvoří otruby odtučněné při 45 °C a 60 °C. První skupina je charakteristická vyšším výtěžkem, ale výrazně nižší čistotou. Druhá skupina naopak lehce nižším výtěžkem, avšak významně vyšší čistotou. Z technologického hlediska má význam odtučnění při teplotě 45°C. Dalším záhřevem, který představuje zvýšené náklady celé technologie již nedochází k markantnímu nárůstu výtěžnosti ani čistoty.

4.4 Vliv poměru otrub a extrakčního činidla na výtěžnost proteinů

Dalším optimalizačním krokem bylo studium vlivu poměru navážky otrub a objemu extrakčního činidla na výtěžnost produktu. Byly použity čtyři různé poměry otrub a extrakčního činidla (1:8, 1:15, 1:20 a 1:25). Podrobný postup experimentu je popsán v kapitole 3.2.5. Byl posuzován vliv činidla na výtěžnost a čistotu produktu z hlediska obsahu proteinů. Koncentrace proteinů byla stanovena spektrofotometricky. Výsledky lze vidět na následujícím obrázku 21 a tabulce 8.



Obrázek 21: Vliv poměru otrub a extrakčního činidla na koncentraci proteinů

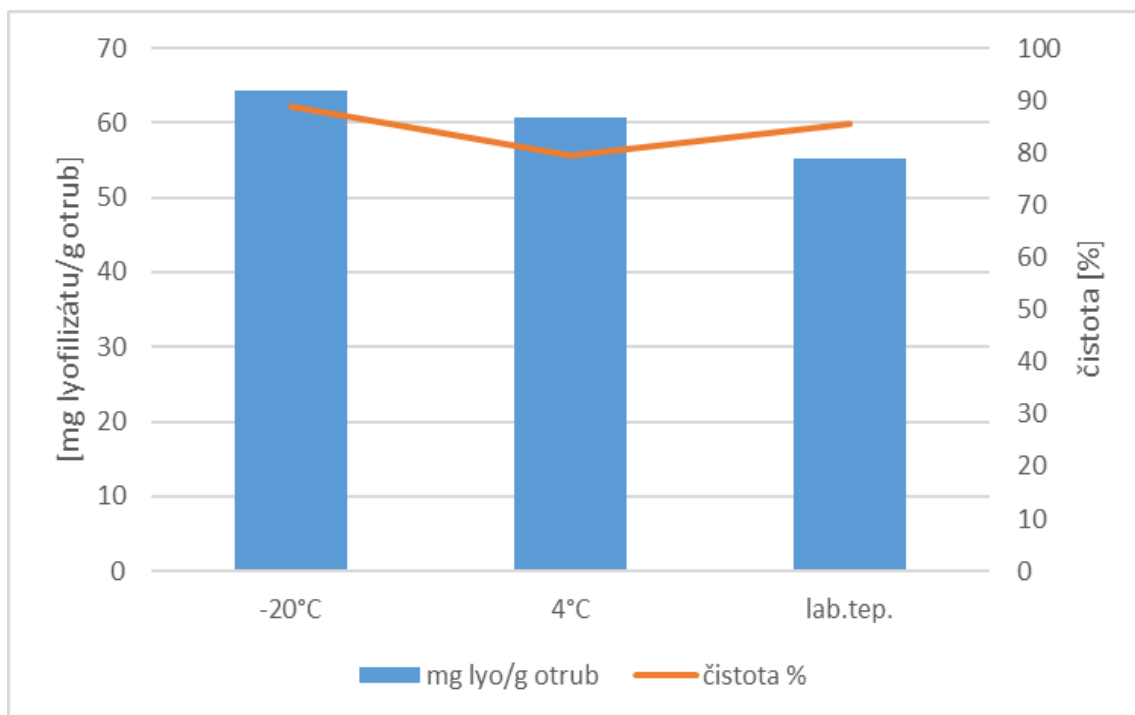
Z obrázku 21 lze zhodnotit vliv poměru otrub a extrakčního činidla. V případě použití poměru 1:8 je výtěžnost nízká v porovnání s ostatními třemi poměry, což bylo potvrzeno i analýzou rozptylu. Na základě analýzy rozptylu ($\alpha = 0,05$) bylo stanoveno, že rozdíly ve výtěžnosti proteinů se statisticky významně neliší mezi poměry 1:15, 1:20 a 1:25 ($p = 0,0068$). Poměr extrakčního činidla a matrice má vliv na difuzivitu a rozpustnost. Při použití většího množství rozpouštědla rostla extrakční účinnost. S použitím většího objemu extrakčního činidla se však navyšují náklady [81]. Z hlediska zacílení technologie na velkoobjemovou výrobu se dá považovat poměr 1:15 za optimální, kdy je při zachování vysokého výtěžku použito menšího objemu technologické vody. Čím méně extrakčního činidla, tím jsou i menší náklady na dehydrataci produktu.

Tabulka 8: Koncentrace proteinů v supernatantech získaných různým množstvím činidla

	1:8	1:15	1:20	1:25
mg proteinu/g otrub	126 ± 3	155 ± 5	158 ± 9	175 ± 7

4.5 Vliv teploty při srážení na výtěžnost produktu a čistotu izolátu

Při optimalizaci metody extrakce proteinu z pšeničných otrub byl sledován vliv teploty srážení na výtěžnost a čistotu proteinu. Pozorováno bylo srážení při teplotách $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a teplotě laboratorní. Výtěžnost a čistota proteinu byla stanovena spektrofotometricky. Výsledky lze vidět na obrázku 22 a tabulce 9.



Obrázek 22: Vliv teploty srážení na výtěžnost a čistotu proteinu

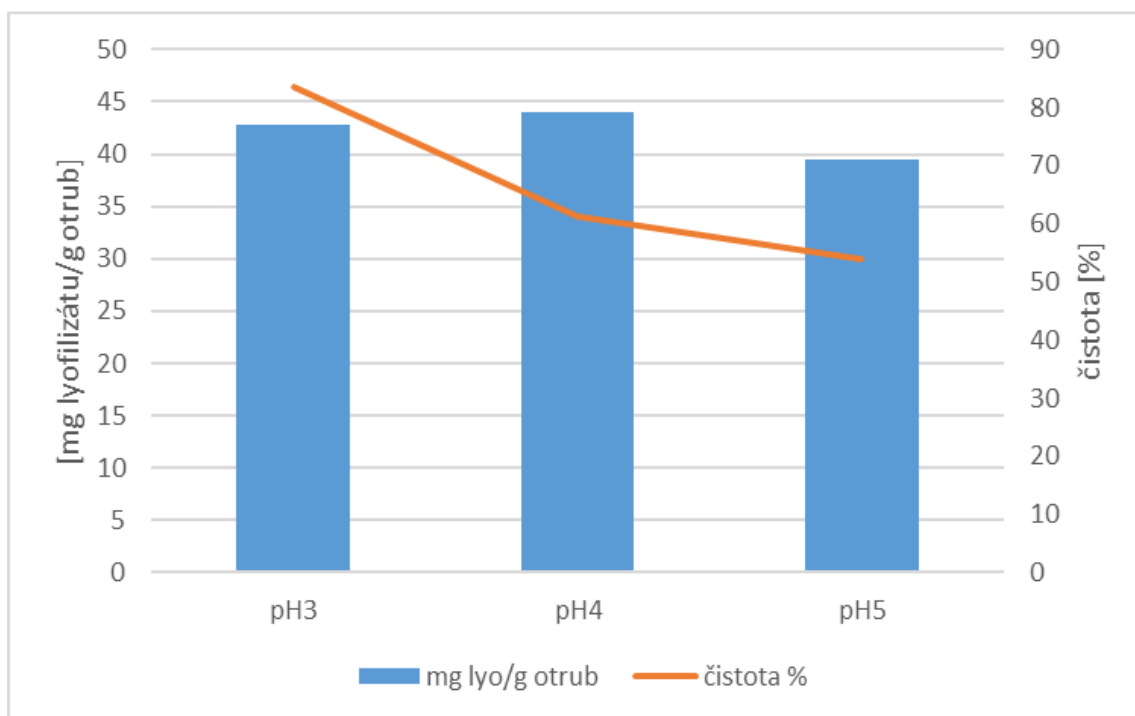
Na obrázku 22 je znázorněna jak výtěžnost, tak i čistota materiálu získaného různými teplotami srážení. Nejvyšších výtěžků bylo dosaženo při teplotě srážení $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a nejnižších při laboratorní teplotě ($p = 0,0019$). Při pohledu na čistotu materiálů bylo dosaženo srovnatelně vysoké čistoty při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a laboratorní teplotě ($p = 0,0066$). I když výtěžnost materiálu získaného srážením při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ byla významně vyšší, čistota byla značně nižší než ve zbylých dvou případech. V laboratorním měřítku bylo nejlepších výsledků dosaženo pomocí srážení při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tento nárůst však pravděpodobně nebude ekonomicky viabilní v měřítku provozním, kdy chladit velký objem extraktu na teplotu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ by bylo velice nákladné. Vzhledem k tomuto zjištění byla zvolena laboratorní teplota jako optimum pro další experimenty.

Tabulka 9: Vliv teploty srážení na výtěžnost a čistotu proteinu

	mg lyofilizátu/g otrub	čistota [%]
$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	64,2	89 ± 0
$4\text{ }^{\circ}\text{C}$	60,8	80 ± 2
laboratorní teplota	55,3	85 ± 0

4.6 Vliv pH při srážení na výtěžnost produktu a čistotu izolátu

Pro studium vlivu pH srážení na výtěžnost a čistotu proteinu byly testovány celkem tři hodnoty pH (3, 4 a 5). Výtěžnost a čistota proteinu byla poté stanovena spektrofotometricky. Výsledky lze vidět na následujícím obrázku 23 a tabulce 10.



Obrázek 23: Vliv pH srážení na výtěžnost a čistotu proteinu

Na obrázku 23 jsou znázorněny výsledky studia vlivu pH srážení na výtěžnost a čistotu materiálu. Při pohledu na výtěžnost bylo získáno nejvíce materiálu při pH 4, avšak čistota materiálu byla nedostačující. Nejspokojivějších výsledků bylo dosaženo při pH srážení 3, kde čistota získaného materiálu byla vysoká. Výsledky byly podrobeny analýze rozptylu, díky níž bylo vyhodnocení rozdílů v čistotě ($p = 0,0010$) i ve výtěžnosti ($p = 0,0007$) potvrzeno. Tato skutečnost souvisí s amfoterní povahou aminokyselin, které tvoří strukturu proteinů. Chování proteinů (i aminokyselin) závisí na pH daného prostředí. V tzv. isoelektrickém bodě se molekula proteinu jeví na venek neutrálně, nachází se ve formě zwitteriontu. V tomto stavu jsou proteiny nejméně rozpustné a dochází k němu např. při fyziologickém pH ($pH = 7-7,4$) [12; 85]. Následným snižováním pH se postupně proteiny sráží a denaturují [86]. V publikaci od Theerakulkaita [87] byla podrobně studována rozpustnost proteinů při pH 4, 7 a 9 extrahovaných z rýžových otrub, kdy pomocí pH 4 bylo srážení nejúčinnější (rozpustnost nejnižší). V rámci optimalizace extrakční metody bylo pro další experimenty zvoleno pH 3. Konkrétní hodnoty jsou zaznamenány v tabulce 10.

Tabulka 10: Vliv pH srážení na výtěžnost a čistotu materiálu

	mg lyofilizátu/g otrub	čistota [%]
pH 3	42,7	84 ± 3
pH 4	44,0	61 ± 0
pH 5	39,5	54 ± 1

4.7 Chemická a fyzikální charakterizace finálního proteinového izolátu

Protein izolovaný za optimalizovaných podmínek byl následně charakterizován. Byla testována jeho stravitelnost a porovnávána se stravitelností nativních otrub. Dalšími studovanými parametry izolátu byly obsah vody, lepku, minerálních látek a profil aminokyselin.

4.7.1 Prvková analýza lyofilizátu

V rámci charakterizace izolovaného proteinu bylo stanovení obsahu makroprvků a mikroprvků. Zastoupení prvků a jejich doporučená denní dávka (DDD [88]) je zaznamenáno v následujících tabulkách (Tabulka 11, Tabulka 12).

Tabulka 11: Zastoupení makroprvků v lyofilizátu a DDD

Makroprvky	mg/100 g lyofilizátu	DDD [mg]
Ca	11,74 ± 1,88	800
K	66,45 ± 4,47	2 000
Mg	4,90 ± 0,43	375
Na	30,89 ± 0,00	-

Tabulka 12: Zastoupení mikroprvků v lyofilizátu a DDD

Mikroprvky	μg/100 g lyofilizátu	DDD [μg]
Al	-	-
Cd	0,60 ± 0,50	-
Co	7,88 ± 0,02	-
Cr	1,09 ± 0,49	40
Cu	37,92 ± 0,63	1 000
Fe	93,21 ± 1,72	14 000
Mn	8,83 ± 1,33	2 000
Ni	-	-
P	13 131,01 ± 29,42	700 000
Pb	-	-
Zn	18,55 ± 9,15	10 000

Z tabulky 11 lze vyčíst zastoupení makroprvků a z tabulky 12 zastoupení mikroprvků v proteinovém izolátu. Množství jednotlivých detekovaných prvků je porovnáno s jejich denní doporučenou dávkou (DDD). V nejvyšším množství z makroprvků je obsažen draslík, který je důležitý pro normální funkci buněk (reguluje objem intracelulárních tekutin a transmembránový elektrochemický gradient) [89]. Z mikroprvků je pak v nejvyšším množství zastoupen fosfor, který je součástí kostí, nukleových kyselin, buněčných membrán (fosfolipidy) a důležitým zdrojem energie (ATP) [90]. Jelikož ani jeden z prvků netvoří výraznou část DDD, nelze izolát považovat za významný zdroj minerálních látek.

4.7.2 Obsah proteinů a profil aminokyselin v izolátu

V rámci charakterizace produktu bylo studováno zastoupení jednotlivých aminokyselin. V tabulce 13 je uveden obsah bílkovin a profil aminokyselin v získaném lyofilizátu a porovnání s dalšími komerčními produkty.

Tabulka 13: Obsah proteinu a profil aminokyselin izolovaného materiálu a srovnání s komerčními produkty

Údaje na 100 g	Proteinový lyofilizát z otrub [g]	Rýžový protein [g]	Sójový protein [g]	Syrovátkový protein [g]
Bílkoviny	84,65	74,00	90,00	78,00
Asp	5,62	6,80	11,80	7,60
Thr	0,62	3,00	3,50	5,19
Ser	0,11	3,90	5,50	3,67
Glu	17,20	13,20	19,90	15,90
Pro	4,31	3,20	5,20	4,50
Gly	5,02	3,60	4,10	1,59
Ala	4,78	4,50	4,20	4,01
Cys	0,11	-	1,30	-
Val	4,67	4,40	4,40	4,44
Met	0,56	2,00	1,30	1,45
Ile	2,33	3,30	4,20	4,30
Leu	6,91	6,60	7,60	8,18

Tyr	1,22	4,50	4,00	2,37
Phe	2,90	4,40	5,30	2,71
His	1,91	1,80	2,70	1,39
Lys	3,82	3,30	6,30	7,01
Arg	22,57	6,40	7,80	2,00
Trp	-	-	1,00	1,45

Z výše uvedené tabulky 10 lze vidět profil aminokyselin a jejich celkovou sumu v izolovaném proteinovém lyofilizátu. Celková suma aminokyselin je 84,65 g ve 100 g lyofilizátu. Jedná se o produkt s významnou čistotou.

Komerční produkty obsahují zpravidla 70 až 90 % proteinů, z nichž ty méně koncentrované tvoří většinu výrobků dostupných na trhu. Nejčastější jsou živočišné (syrovátkové) proteiny, avšak proteiny rostlinného původu (izolované z hrachu, sóji, rýže, bobu, konopí aj.) se vzhledem k aktuálnímu zájmu o veganskou stravu dostávají na trh čím dál více. V následující tabulce je pro srovnání uvedeno složení dvou komerčních rostlinných proteinů (konkrétně čistě rýžového [91] a čistě sójového proteinu [92]) a jednoho komerčního živočišného proteinu (izolovaného ze syrovátky) [93].

Kyselina asparagová je zastoupena v množství 5,62 g na 100 g lyofilizátu, což je srovnatelné se zastoupením kyseliny asparagové v rýžovém i syrovátkovém komerčním proteinu. Jedná se o neesenciální kyselinu, která je používána při léčbě chronické únavy díky své roli při generování buněčné energie. Kyselina asparagová totiž přenáší molekulu NADH do mitochondrií, kde slouží k tvorbě energie (ATP). Dále podporuje tvorbu protilátek v těle a tím posiluje imunitní systém [94].

Kyselina glutamová tvoří vysoký podíl aminokyselinového profilu lyofilizátu. Konkrétně je ve 100 g lyofilizátu 17,20 g kyseliny glutamové, což lze srovnat jak se zastoupením v syrovátkovém, tak v sójovém komerčním proteinu. Tato neesenciální aminokyselina funguje jako neurotransmitter v mozku a míše. Dodává mozku energii, čímž stimuluje pozornost a zlepšuje paměť. Je prekurzorem glutaminu, který je velmi žádoucí ve sportovní výživě. Hraje významnou roli při tvorbě svalové hmoty. Je vyhledávána vytrvalostními a silovými sportovci [95].

Množství prolinu ve 100 g lyofilizátu se pohybuje okolo 4,31 g a je srovnatelné s jeho množstvím v syrovátkovém komerčním proteinu. Je důležitý pro syntézu a strukturu proteinů, metabolismus, výživu. Podílí se na hojení ran, antioxidačních reakcích a imunitní odpovědi. Tvoří asi třetinu kolagenů lidského těla. V období růstu je nejvíce potřebnou aminokyselinou. Podílí se na syntéze proteinů v celém těle. Má zásadní vliv na výživu plodu a novorozenců. Slouží jako hlavní aminokyselina při syntéze polyaminů (regulují syntézu DNA, proteinů a buněčné dělení) v tenkém střevě a placentě [96].

Glycin je v lyofilizátu izolovaném z pšeničných otrub zastoupen v nejvyšším množství (5,02 g/100 g) v porovnání s ostatními komerčními produkty (syrovátkový protein obsahuje pouze 1,59 g ve 100 g produktu). Společně s argininem a methioninem se podílí na vzniku kreatinu a kolagenu v těle [97]. Je jedním z neurotransmiterů míchy [98].

Ve 100 g lyofilizátu je přítomno 4,78 g alaninu, což je srovnatelné s ostatními uvedenými komerčními proteiny. Společně s histidinem (1,91 g/100 g lyofilizátu) tvoří dipeptid zvaný karnosin. Karnosin funguje jako pufr ve svalech (tlumí kyselost) vznikající při vysoce intenzivním cvičení, čímž umožňuje delší vytrvalost a oddaluje svalovou únavu. Suplementací alaninu (a histidinu) lze dosáhnout lepších výkonů v krátkodobých a vysoce intenzivních sportech [99].

Valin je esenciální aminokyselina řadící se do skupiny větvených aminokyselin (BCAA). Ve 100 g izolátu z pšeničných otrub je obsažen v množství 4,67 g, což je srovnatelné s ostatními uvedenými komerčními produkty. Je jednou z nejčastěji suplementovaných aminokyselin. Po vyčerpávajícím výkonu slouží k rychlé regeneraci jaterního glykogenu [100]. Další aminokyselinou patřící do skupiny BCAA je izoleucin. Izoleucin je v porovnání s ostatními komerčními proteiny zastoupen v nejnižším množství (2,33 g/100 g produktu). Je využívána zejména kosterním a srdečním svalstvem jako zdroj energie, stabilizuje hladinu cukru v krvi, chrání játra a podporuje tvorbu hemoglobinu. Poslední aminokyselinou ze skupiny BCAA je leucin (6,91 g/100 g lyofilizátu). Leucin snižuje hladinu cukru v krvi, zlepšuje stav kostí, kůže i svalové hmoty, zlepšuje regeneraci po chirurgických zákrocích a stimuluje tvorbu růstového hormonu. BCAA bývají suplementovány společně, jelikož jejich nejlepší účinek je dosažen při společné konzumaci [100]. Při užití před a po sportovním výkonu snižují poškození svalstva a podněcují syntézu svalových proteinů [99].

Tyrosin je se svým obsahem 1,22 g ve 100 g lyofilizátu méně zastoupenou aminokyselinou. V ostatních uvedených komerčních proteinech je její množství vyšší. Tyrosin pomáhá v boji s depresemi. Jeho nižší obsah v izolátu však není problémem, jelikož nadměrná konzumace tyrosinu způsobuje zažívací potíže, zvyšuje krevní tlak a vyvolává migrénu [100].

Fenylalanin (2,90 g/100 g lyofilizátu) je esenciální aminokyselinou spojovanou s pozorností, optimismem a ambiciózností. Používá se při redukčních dietách, protože snižuje chuť k jídlu [101]. V kombinaci jeho L- a D- formy funguje jako aktivátor tvorby a intenzifikátor funkce endorfinů, což jsou látky navozující pocit pohody a omezující míru bolesti. Pozitivní vliv má na sexuální žádostivost, zvládnání depresí a úzkosti [100].

Lysin (3,82 g/100 g lyofilizátu) je v porovnání se sójovým a syrovátkovým proteinem zastoupen v téměř polovičním množství. Jedná se o důležitou aminokyselinu především pro tvorbu kolagenu a pro kvalitu kostí (podporuje vstřebávání vápníku). Pomocí lysinu lze léčit herpes. S nedostatek této aminokyseliny se mohou potýkat vegani, jelikož je její zastoupení v cereálních produktech velmi nízké [100].

Arginin je nejvíce zastoupenou aminokyselinou (22,57 g/100 g lyofilizátu) proteinového izolátu. V množství této aminokyseliny spočívá rozdíl mezi preparátem získaným z pšeničných otrub a preparátem získaným z ostatních surovin (sója, rýže, syrovátka). Arginin je nutný pro tvorbu růstového hormonu, stimuluje jeho vyplavení do krevního oběhu a podílí se

na tvorbě DNA. Aplikuje se při léčbě oběhového onemocnění, senilní demence, erektilní dysfunkce a mužské neplodnosti. Je totiž zdrojem oxidu dusíku, který slouží jako neurotransmitter s dopadem na regulaci tlaku a průtoku krve řadou orgánů (včetně genitálií mužů i žen). Dále se využívá pro podporu léčby a regenerace po úrazech, operacích a spáleninách [100].

4.7.3 Stanovení obsahu vody v lyofilizátu

V rámci charakterizace produktu bylo stanovováno množství vody metodou dle Karl-Fischera. Protein izolovaný za optimalizovaných podmínek obsahoval $8,04 \pm 0,22$ % vody. Po absolutní dehydrataci produktu by se zvýšilo zastoupení proteinů v izolátu na cca 95 %.

4.7.4 Stanovení obsahu lepku v lyofilizátu

V rámci charakterizace izolovaného proteinového materiálu byl stanovován obsah lepku. Metodou popsanou v kapitole 3.4.5 bylo zjištěno, že lepek je přítomen v množství $2\,349 \pm 26$ mg/kg lyofilizátu. Dle nařízení č. 828/2014 o požadavcích na poskytování informací o nepřítomnosti či sníženém obsahu lepku v potravinách spotřebitelům platného od 20. 7. 2016 lze označovat potravinu s maximálním množstvím lepku 20 mg/kg jako bezlepkovou a s maximálním množstvím lepku 100 mg/kg jako potravinu s velmi nízkým obsahem lepku. Vzhledem k tomuto faktu není možné produkt považovat za bezpečný pro osoby s celiakií.

4.7.5 Stravitelnost proteinového lyofilizátu a nativních otrub

V rámci charakterizace proteinu izolovaného za optimálních podmínek byla studována jeho stravitelnost. Paralelně byla studována též stravitelnost samotných nativních otrub. Výsledky stravitelnosti lze vidět v tabulce 14.

Tabulka 14: Množství nestrávených proteinů na gram otrub

	mg nestráveného proteinu/g otrub
izolovaný protein	3 ± 0
nativní otruby	45 ± 0

V tabulce 14 je uvedeno množství nestrávených proteinů lyofilizátu na gram otrub a pro srovnání také množství nestrávených proteinů v nativních pšeničných otrubách na gram těchto otrub. Z původního obsahu $77,9 \pm 0,9$ % proteinu zůstalo v lyofilizátu získaným optimalizovaným postupem extrakce nestrávených $3,7 \pm 0,1$ % proteinů. Stravitelnost proteinů lze tedy považovat za velmi úspěšnou. V publikaci od Almeidy [102] byla popsána studie stravitelnosti proteinů ze syrovátky, kaseinu a sóji in vitro též pomocí enzymů pepsinu a pankreatinu. Dva různé syrovátkové proteiny se vyznačovaly stravitelností 91,7 % a 88,4 %, kaseinový protein 83,7 % a sójový 55,2 %. V našem lyofilizátu bylo v přepočtu stráveno asi 95,3 % původně přítomných proteinů, což z něj dělá nejlépe stravitelným v porovnání s výše zmíněnými proteinovými preparáty.

5 ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývá optimalizací procesu izolace proteinů z pšeničných otrub a jejich následnou charakterizací. Extrakční metoda byla založena na postupu popsáném v publikaci od Salas-Mellady (2017) [51], kde bylo využíváno otrub rýžových. Výchozí parametry byly voleny na základě tohoto článku a postupně optimalizovány na naše laboratorní podmínky a pšeničné otruby. Byl zjišťován vliv mnoha faktorů na výtěžnost proteinů a čistotu izolátu, mezi které patří mletí otrub před započítáním extrakce, vícestupňová extrakce, odtučnění otrub před samotnou extrakcí, poměr otrub a extrakčního činidla, teplota a pH při srážení. Druhou částí práce byla charakterizace proteinového izolátu. Stanován byl profil aminokyselin, prvkové složení, obsah vody, obsah lepku a stravitelnost proteinů.

Potupnými kroky bylo zjištěno, že na výtěžnost proteinů a čistotu izolátu má pozitivní vliv namletí otrub před započítáním extrakce, vícestupňová extrakce (konkrétně třístupňová), odtučnění otrub při teplotě 45 °C, poměr otrub a extrakčního činidla 1:15, srážení při laboratorní teplotě a pH 3.

Analýzou prvkového složení bylo zjištěno, že izolát nelze prezentovat jako bohatý zdroj minerálních látek. Z makroprvků byl v největším množství zastoupen draslík ($66,45 \pm 4,47$ mg/100 g izolátu) a z mikroprvků fosfor ($13\,131,01 \pm 29,42$ µg/100 g izolátu). Ani v jednom případě netvoří významný podíl denní doporučené dávky (DDD). Izolát byl z hlediska aminokyselinového složení porovnáván s dalšími komerčními proteinovými preparáty rostlinného i živočišného původu. Analýza profilu aminokyselin odhalila výjimečně vysoké zastoupení argininu, který má využití v medicíně jako lék neplodnosti mužů, podpora erektilní dysfunkce či podpora regenerace kožní tkáně po úrazech. Srovnáním zastoupení ostatních aminokyselin přítomných v našem izolátu a ostatních komerčních preparátech nebyl pozorován tak výrazný rozdíl. Dále byl stanovován obsah lepku v izolátu. Pšenice je považována za jeden z hlavních zdrojů lepku, což bylo potvrzeno. Lepek s obsahem $2\,349 \pm 26$ mg/kg izolátu znemožňuje řadit potenciální proteinový preparát mezi bezlepkové nebo s nízkým obsahem lepku. Při charakterizaci izolátu byla zjištěna jeho velmi dobrá stravitelnost. Z původního obsahu proteinů bylo stráveno asi 95,3 %. Posledním stanovovaným parametrem izolátu byl obsah vody, která tvořila okolo 8 % celkového složení. V případě odstranění i zbylého množství vody by bylo možné získat proteinový izolát o ještě vyšší čistotě.

6 BIBLIOGRAFIE

- [1] HUANG, Kefeng, Peyman FASAHATI a Christos MARAVELIAS. System-Level Analysis of Lignin Valorization in Lignocellulosic Biorefineries. *IScience*. 2020, **23**(1). DOI: 10.1016/j.isci.2019.100751. ISSN 25890042. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2589004219304961>
- [2] GONZALEZ-GARCIA, Sara, Beatriz GULLÓN a Maria MOREIRA. Environmental assessment of biorefinery processes for the valorization of lignocellulosic wastes into oligosaccharides. *Journal of Cleaner Production*. 2018, **172**, 4066-4073. DOI: 10.1016/j.jclepro.2017.02.164. ISSN 09596526. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959652617303906>
- [3] 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. *Bioresource Technology*. 2020, **298**. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.122432. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852419316621>
- [4] FOONG, Shin, Rock LIEW, Yafeng YANG et al. Valorization of biomass waste to engineered activated biochar by microwave pyrolysis: Progress, challenges, and future directions. *Chemical Engineering Journal*. 2020, **389**. DOI: 10.1016/j.cej.2020.124401. ISSN 13858947. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1385894720303922>
- [5] Bio-based Chemicals: Value Added Products from Biorefineries. In: *IEA Bioenergy: Technology Collaboration Programme* [online]. IEA Bioenergy [cit. 2020-07-30]. Dostupné z: <https://www.ieabioenergy.com/wp-content/uploads/2013/10/Task-42-Biobased-Chemicals-value-added-products-from-biorefineries.pdf>
- [6] 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.
- [7] PRÜCKLER, Michael, Susanne SIEBENHANDL-EHN, Silvia APPRICH, Stefan HÖLTINGER, Cornelia HAAS, Erwin SCHMID a Wolfgang KNEIFEL. Wheat bran-based biorefinery 1: Composition of wheat bran and strategies of functionalization. *LWT - Food Science and Technology*. 2014, **56**(2), 211-221. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.12.004. ISSN 00236438. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643813004751>

- [8] 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. *LWT - Food Science and Technology*. 2014, **56**(2), 222-231. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.12.003. ISSN 00236438. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002364381300474X>
- [9] KADLEC, Pavel, Karel MELZUCH a Michal VOLDŘICH. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2012. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-807-4181-450.
- [10] Wheat kernel. In: *Tes teach* [online]. Barcelona: Grain, 2016 [cit. 2017-12-28]. Dostupné z: <https://www.tes.com/lessons/sWM5rku2Gb5ybw/grain>
- [11] KHALID, Khairunizah, Jae-Bom OHM a Senay SIMSEK. Whole wheat bread: Effect of bran fractions on dough and end-product quality. *Journal of Cereal Science*. 2017, **78**, 48-56. DOI: 10.1016/j.jcs.2017.03.011. ISSN 07335210. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521016303186>
- [12] WU, Guoyao. *Amino acids: biochemistry and nutrition*. Boca Raton: CRC Press, 2013. ISBN 978-1-4398-6189-9.
- [13] SUN, Run-Cang. *Cereal straw as a resource for sustainable biomaterials and biofuels: Chemistry, Extractives, Lignins, Hemicelluloses and Cellulose*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2010. ISBN 978-044-4532-343.
- [14] *Mindmeister* [online]. San Francisco, USA: © 2018 MeisterLabs, 2018 [cit. 2018-05-17]. Dostupné z: <https://www.mindmeister.com/521885934/main-parts-of-plant-cells-http-www-enchantedlearning-com-subjects-plants-cell>
- [15] BENTO-SILVA, Andreia, Maria VAZ PATTO a Maria DO ROSÁRIO BRONZE. Relevance, structure and analysis of ferulic acid in maize cell walls. *Food Chemistry*. 2018, **246**, 360-378. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.11.012. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814617318071>
- [16] FIGUEIREDO, Patrícia, Kalle LINTINEN, Jouni HIRVONEN, Mauri KOSTIAINEN a Hélder SANTOS. Properties and chemical modifications of lignin: Towards lignin-based nanomaterials for biomedical applications. *Progress in Materials Science*. 2018, **93**, 233-269. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2017.12.001. ISSN 00796425. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079642517301421>
- [17] KUN, Dávid a Béla PUKÁNSZKY. Polymer/lignin blends: Interactions, properties, applications. *European Polymer Journal*. 2017, **93**, 618-641. DOI:

10.1016/j.eurpolymj.2017.04.035. ISSN 00143057. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305716317529>

- [18] CASE, Linda P., Leighann DARISTOTLE, Michael G. HAYEK a Melody Foess RAASCH. Protein and Amino Acids. *Canine and Feline Nutrition*. Elsevier, 2011, , 21-25. DOI: 10.1016/B978-0-323-06619-8.10004-0. ISBN 9780323066198. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323066198100040>
- [19] BHAGAVAN, N.V. a Chung-Eun HA. Protein and Amino Acid Metabolism. *Essentials of Medical Biochemistry*. Elsevier, 2015, , 227-268. DOI: 10.1016/B978-0-12-416687-5.00015-4. ISBN 9780124166875. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124166875000154>
- [20] MALET, A., A. BLAIS a D. TOMÉ. Milk Proteins | Nutritional Quality of Milk Proteins. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, 2011, , 816-820. DOI: 10.1016/B978-0-12-374407-4.00437-4. ISBN 9780123744074. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123744074004374>
- [21] RANAWANA, Viren a Bhupinder KAUR. Role of Proteins in Insulin Secretion and Glycemic Control. *Advances in Food and Nutrition Research*. Elsevier, 2013, (70), 1-47. *Advances in Food and Nutrition Research*. DOI: 10.1016/B978-0-12-416555-7.00001-1. ISBN 9780124165557. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124165557000011>
- [22] CHEVRIER, G., P. MITCHELL, M.-S. BEAUDOIN a A. MARETTE. Impact of Dietary Proteins on Energy Balance, Insulin Sensitivity and Glucose Homeostasis. *The Molecular Nutrition of Amino Acids and Proteins*. Elsevier, 2016, , 241-264. DOI: 10.1016/B978-0-12-802167-5.00018-9. ISBN 9780128021675. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128021675000189>
- [23] STREBLOVÁ, Eva. *Souhrnné texty z chemie: pro přípravu k přijímacím zkouškám (přírodovědné obory, lékařství)*. 3., upr. vyd. Praha: Karolinum, 2012-2013. ISBN 978-802-4622-422.
- [24] HOLEČEK, Milan. *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. 1. vydání. Praha: Grada, 2006. ISBN 978-802-4715-629.
- [25] ODSTRČIL, Jaroslav a Milada ODSTRČILOVÁ. *Chemie potravin*. 1. vydání. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2006. ISBN 80-701-3435-6.
- [26] MANDŽUKOVÁ, Jarmila. *Léčivá síla vitaminů, minerálů a dalších látek: praktický domácí rádce*. 1. vydání. Benešov: Start, 2005. ISBN 80-862-3136-4.

- [27] Tryptofan může ovlivnit náladu, spánek i sportovní výkon. Máte ho ve stravě dostatek?. In: *Aktin* [online]. Brno: Selltime s.r.o., 2012 [cit. 2020-07-21]. Dostupné z: <https://aktin.cz/zazracny-tryptofan>
- [28] TAKADA, A., F. SHIMIZU, J. MASUDA a K. MATSUOKA. Plasma Levels of Tryptophan Metabolites in Patients of Type 2 Diabetes Mellitus. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes*. Elsevier, 2019, , 265-276. DOI: 10.1016/B978-0-12-813822-9.00017-5. ISBN 9780128138229. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128138229000175>
- [29] HOZA, Ignác, Daniela SUMCZYNSKI a Pavel BUDINSKÝ. *Potravinářská biochemie I.: pro studenty kombinované formy studia*. 1. vydání. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2006. ISBN 978-80-7318-495-7.
- [30] The Benefits of BCAA's. In: *Red Leaf* [online]. USA: Red Leaf Nutrition, 2019 [cit. 2020-07-21]. Dostupné z: <https://redleafnutrition.com/blogs/the-benefits-of-bcaas/>
- [31] MARTÍNEZ SANZ, José, Aurora NORTE, Elia GARCÍA a Isabel SOSPEDRA. Branched Chain Amino Acids and Sports Nutrition and Energy Homeostasis. *Sustained Energy for Enhanced Human Functions and Activity*. Elsevier, 2017, , 351-362. DOI: 10.1016/B978-0-12-805413-0.00022-3. ISBN 9780128054130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128054130000223>
- [32] NISOLI, E., R. AQUILANI a G. D'ANTONA. Amino Acid Supplements and Diabetes. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes* [online]. Elsevier, 2013, , 83-95 [cit. 2020-04-21]. DOI: 10.1016/B978-0-12-397153-1.00009-3. ISBN 9780123971531. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123971531000093>
- [33] PINHEIRO, Carlos, Lucas GUIMARÃES-FERREIRA, Frederico GERLINGER-ROMERO a Rui CURI. An Overview on Beta-Hydroxy-Beta-Methylbutyrate Supplementation in Skeletal Muscle Function and Sports Performance. *Nutrition and Enhanced Sports Performance* [online]. Elsevier, 2019, , 665-673 [cit. 2020-04-21]. DOI: 10.1016/B978-0-12-813922-6.00057-6. ISBN 9780128139226. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128139226000576>
- [34] PINHEIRO, Carlos, Lucas GUIMARÃES-FERREIRA, Frederico GERLINGER-ROMERO a Rui CURI. An Overview on Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) Supplementation in Skeletal Muscle Function and Sports Performance. *Nutrition and Enhanced Sports Performance* [online]. Elsevier, 2013, , 455-463 [cit. 2020-04-21]. DOI: 10.1016/B978-0-12-396454-0.00047-3. ISBN 9780123964540. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123964540000473>

- [35] Using Lysine To Heal Cold Sores. In: *The Cold Sore Doctor* [online]. USA, 2020 [cit. 2020-07-21]. Dostupné z: <https://thecoldsoredoctor.com/lysines-benefits-and-dosage-for-a-cold-sore/>
- [36] HIGGS, Kerianne a Mike BOLAND. Changes in Milk Proteins during Storage of Dry Powders. *Milk Proteins* [online]. Elsevier, 2014, , 343-357 [cit. 2020-04-21]. DOI: 10.1016/B978-0-12-405171-3.00011-8. ISBN 9780124051713. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124051713000118>
- [37] LU, Naiyan a Peng ZHOU. Whey Protein-Based Nutrition Bars. *Whey Proteins* [online]. Elsevier, 2019, , 495-517 [cit. 2020-04-21]. DOI: 10.1016/B978-0-12-812124-5.00014-X. ISBN 9780128121245. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012812124500014X>
- [38] L-Methionine, Multi-Compendial, U.S.P., J.T.Baker™. In: *Fisher Scientific: A Thermo Fisher Scientific Brand* [online]. Leicestershire (Spojené království Velké Británie a Severního Irska) [cit. 2020-07-21]. Dostupné z: <https://www.fishersci.co.uk/shop/products/l-methionine-multi-compendial-u-s-p-j-t-baker-2/p-5391643>
- [39] COURTNEY-MARTIN, G. a P.B. PENCHARZ. Sulfur Amino Acids Metabolism From Protein Synthesis to Glutathione. *The Molecular Nutrition of Amino Acids and Proteins* [online]. Elsevier, 2016, , 265-286 [cit. 2020-04-21]. DOI: 10.1016/B978-0-12-802167-5.00019-0. ISBN 9780128021675. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128021675000190>
- [40] Strukturní vzorec fenylalanin. In: *Wikipedie otevřená encyklopedie* [online]. USA: Wikimedia Foundation Inc. [cit. 2020-07-21]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Strukt_vzorec_fenylalanin.PNG
- [41] DE MEER, K. INBORN ERRORS OF METABOLISM | Overview. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* [online]. Elsevier, 2003, , 3262-3270 [cit. 2020-04-21]. DOI: 10.1016/B0-12-227055-X/00628-3. ISBN 9780122270550. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B012227055X006283>
- [42] Arginine: New study exposes additional oral health benefits. In: *DentistryIQ* [online]. USA, 2015 [cit. 2020-07-21]. Dostupné z: <https://www.dentistryiq.com/dental-hygiene/clinical-hygiene/article/16349990/arginine-new-study-exposes-additional-oral-health-benefits>
- [43] L-GLUTAMINE FERMENTOVANÝ. In: *Nejen léky* [online]. Praha [cit. 2020-07-21]. Dostupné z: <https://www.nejenleky.cz/myotec/121-l-glutamine-fermentovany-350g-8594183690445.html>

- [44] Glycin, L-glycin. In: *Passion or halsa* [online]. Švédsko [cit. 2020-07-21]. Dostupné z: <https://passionforhalsa.se/aminosyror/glycin-l-glycin>
- [45] L-Proline BioChemica. In: *Genaxxon bioscience* [online]. Německo [cit. 2020-07-21]. Dostupné z: <https://www.genaxxon.com/shop/en/shop-all-products/cell-biology/amino-acids/1784/l-proline-biochemica>
- [46] L-Aspartic acid. In: *Carl Roth* [online]. Německo [cit. 2020-07-21]. Dostupné z: <https://www.carlroth.com/com/en/protected-amino-acids/l-aspartic-acid/p/1690.1>
- [47] ALI, Ajmol, Sung-Je LEE a Kay J. RUTHERFURD-MARKWICK. Sports and Exercise Supplements. *Whey Proteins*. Elsevier, 2019, , 579-635. DOI: 10.1016/B978-0-12-812124-5.00017-5. ISBN 9780128121245. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128121245000175>
- [48] CROWLEY, S.V. a J.A. O'MAHONY. Drying: Effect on Nutrients, Composition and Health. *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, 2016, , 439-445. DOI: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00242-7. ISBN 9780123849533. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123849472002427>
- [49] SHOCKLEY, Marianne a Aaron T. DOSSEY. Insects for Human Consumption. *Mass Production of Beneficial Organisms*. Elsevier, 2014, , 617-652. DOI: 10.1016/B978-0-12-391453-8.00018-2. ISBN 9780123914538. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123914538000182>
- [50] MIDDELBOSS, Ingomar S. a George C. FAHEY. Soybean Carbohydrates. *Soybeans*. Elsevier, 2008, , 269-296. DOI: 10.1016/B978-1-893997-64-6.50012-3. ISBN 9781893997646. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781893997646500123>
- [51] PIOTROWICZ, Inajara a Myriam SALAS-MELLADO. Protein concentrates from defatted rice bran: preparation and characterization. *Food Science and Technology*. 2017, **37**(1), 165-172. DOI: 10.1590/1678-457x.34816. ISSN 1678-457X.
- [52] 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. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 2006, **52**(6), 467-472. 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>
- [53] ARTE, Elisa, Xin HUANG, Emilia NORDLUND a Kati KATINA. Biochemical characterization and technofunctional properties of bioprocessed wheat bran protein

- isolates. *Food Chemistry*. 2019, **289**, 103-111. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.03.020. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881461930473X>
- [54] 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. *Food Chemistry*. 2020, **333**. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127491. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814620313534>
- [55] AGBOOLA, Samson, Darren NG a Dominic MILLS. Characterisation and functional properties of Australian rice protein isolates. *Journal of Cereal Science*. 2005, **41**(3), 283-290. DOI: 10.1016/j.jcs.2004.10.007. ISSN 07335210. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521005000111>
- [56] JU, Z.Y., N.S. HETTIARACHCHY a N. RATH. Extraction, denaturation and hydrophobic Properties of Rice Flour Proteins. *Journal of Food Science*. 2001, **66**(2), 229-232. 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>
- [57] PROSSER, Václav. *Experimentální metody biofyziky*. 1. vydání. Praha: Academia Praha, 1989. ISBN 80-200-0059-3.
- [58] CHALABALA, Milan a Antonín LIBICKÝ. *Výroba léků*. 1. vydání. Praha: Avicenum, 1985.
- [59] PERTILE, Eva a Vladimír ČABLÍK. *Instrumentální metody analýzy*. Ostrava: VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2006. ISBN 80-248-1049-2.
- [60] HRDLIČKA, Petr a Marie STŘELCOVÁ. *Chemie obecná a anorganická: (laboratorní cvičení)*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2004. ISBN 80-715-7773-1.
- [61] ČÁSLAVSKÝ, Josef a Jiří ŠEVČÍK. *Analýza organických látek: učební text projektu "Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy" : modul K02-2014*. 1. vydání. Český Těšín: 2 THETA, 2014. Analytical standards and equipment. ISBN 978-80-260-7085-6.
- [62] ZÝKA, Jaroslav. *Nové směry v analytické chemii*. 1. vydání. Praha: SNTL, 1983. Knihnice technických aktualit.

- [63] KAŇOVÁ, Veronika. *Problematika analýzy mléka pomocí techniky ICP-OES*. Brno, 2015. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.
- [64] *Radboud University* [online]. Netherlands: Faculty of Science, 2020 [cit. 2020-07-03]. Dostupné z: <https://www.ru.nl/english/>
- [65] MICHAŁOWSKI, Tadeusz, Agustin ASUERO a Sławomir WYBRANIEC. The Titration in the Kjeldahl Method of Nitrogen Determination: Base or Acid as Titrant?. *Journal of Chemical Education*. 2012, **90**(2), 191-197. DOI: 10.1021/ed200863p. ISSN 0021-9584. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ed200863p>
- [66] ZAIA, D.A.M., W.A. VERRI a C.T.B.V. ZAIA. Determination of total proteins in several tissues of rat: a comparative study among spectrophotometric methods. *Microchemical Journal*. 2000, **64**(3), 235-239. DOI: 10.1016/S0026-265X(00)00017-5. ISSN 0026265X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026265X00000175>
- [67] Protein Determination—Method Matters. *Foods*. 2018, **7**(1). DOI: 10.3390/foods7010005. ISSN 2304-8158. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2304-8158/7/1/5>
- [68] FOUNTOULAKIS, Michael a Hans-Werner LAHM. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *Journal of Chromatography A*. 1998, **826**(2), 109-134. DOI: 10.1016/S0021-9673(98)00721-3. ISSN 00219673. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967398007213>
- [69] BOZIC, Dunja. What Is Karl Fischer Titration and What Are Its Applications?. In: *AZO Materials* [online]. United Kingdom: AZoNetwork UK Ltd. [cit. 2020-07-27]. Dostupné z: <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=16017>
- [70] HAMILTON, Bruce. What does the Karl Fischer titration measure?. In: *Stason.org* [online]. [cit. 2020-07-27]. Dostupné z: <https://stason.org/TULARC/science-engineering/chemistry/16-3-What-does-the-Karl-Fischer-titration-measure.html>
- [71] KODÍČEK, Milan. *Biochemické pojmy: výkladový slovník*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2004. ISBN 80-708-0551-X.
- [72] Metoda ELISA aspekty jednotlivých uspořádání. In: *Baria* [online]. Dolní Jirčany: BARIA s.r.o., 2019 [cit. 2020-07-27]. Dostupné z: <https://www.baria.cz/blog/metoda-elisa-aspekty-jednotlivych-usporadani/>

- [73] HUDSON, B.J.F. *Developments in Food Proteins - 2*. London: Applied Science Publishers, 1983. ISBN 08-533-4176-1.
- [74] SHARMA, Bharati a Hardeep GUJRAL. Influence of nutritional and antinutritional components on dough rheology and in vitro protein & starch digestibility of minor millets. *Food Chemistry* [online]. 2019, **299** [cit. 2020-04-21]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125115. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881461931221X>
- [75] ŠKAŘUPA, Přemysl. *Možnosti určení původu vína z prvkového složení*. Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12, 2012. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.
- [76] CRAMER, Angélique O. J., Don VAN RAVENZWAALIJ, Dora MATZKE, Helen STEINGROEVER, Ruud WETZELS, Raoul P. P. P. GRASMAN, Lourens J. WALDORP a Eric-Jan WAGENMAKERS. Hidden multiplicity in exploratory multiway ANOVA: Prevalence and remedies. *Psychonomic Bulletin & Review*. 2016, **23**(2), 640-647. DOI: 10.3758/s13423-015-0913-5. ISSN 1069-9384. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.3758/s13423-015-0913-5>
- [77] P-hodnota a její interpretace. *Matematická biologie* [online]. Brno: Institut biostatistiky a analýz Masarykovy univerzity [cit. 2018-05-17]. Dostupné z: <http://portal.matematickabiologie.cz/index.php?pg=aplikovana-analyza-klinicky-a-biologicky-dat--biostatistika-pro-matematickou-biologii--uvod-do-testovani-hypotez--p-hodnota-a-jeji-interpretace>
- [78] SEBERA, Martin. Statistika - vícerozměrné metody. *Fakulta sportovních studií, Masarykova univerzita* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2012 [cit. 2018-05-17]. Dostupné z: http://www.fsps.muni.cz/~sebera/vicerozmerna_statistika/default.html
- [79] GOÑI, Isabel, Montserrat GUDIÉL-URBANO a Fulgencio SAURA-CALIXTO. In vitro determination of digestible and unavailable protein in edible seaweeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2002, **82**(15), 1850-1854. DOI: 10.1002/jsfa.1270. ISSN 00225142. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.1270>
- [80] BALANDRÁN-QUINTANA, René Renato, Jorge Nemesio MERCADO-RUIZ a Ana María MENDOZA-WILSON. Wheat Bran Proteins: A Review of Their Uses and Potential. *Food Reviews International*. 2015, **31**(3), 279-293. DOI: 10.1080/87559129.2015.1015137. ISSN 8755-9129. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/87559129.2015.1015137>

- [81] ZHANG, Qing-Wen, Li-Gen LIN a Wen-Cai YE. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*. 2018, **13**(1). DOI: 10.1186/s13020-018-0177-x. ISSN 1749-8546. Dostupné také z: <https://cmjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13020-018-0177-x>
- [82] BROUNS, Fred, Youna HEMERY, Ruth PRICE a Nuria Mateo ANSON. Wheat Aleurone: Separation, Composition, Health Aspects, and Potential Food Use. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2012, **52**(6), 553-568. DOI: 10.1080/10408398.2011.589540. ISSN 1040-8398. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2011.589540>
- [83] LIU, Rui Hai. Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*. 2007, **46**(3), 207-219. DOI: 10.1016/j.jcs.2007.06.010. ISSN 07335210. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521007001166>
- [84] Fytosteroly: Rostlinné steroly. In: *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. Praha: VŠCHT, 2018 [cit. 2020-07-23]. Dostupné z: <https://web.vscht.cz/~schulzov/Nutraceutika%20a%20FP/Fytosteroly2018.pdf>
- [85] KOŠTÍŘ, Josef V. *Biochemie známá i neznámá*. 1. vydání. Praha: Avicenum, 1980. Život a zdraví (Avicenum).
- [86] Aminokyseliny, peptidy, bílkoviny. In: *Česká zemědělská univerzita v Praze* [online]. Praha: ČZU, 2017 [cit. 2020-07-23]. Dostupné z: https://home.czu.cz/storage/121996_1.cv_bilkoviny.pdf
- [87] THEERAKULKAIT, Chockchai, Siree CHAISERI a Siriwat MONGKOLKANCHANASIRI. Extraction and Some Functional Properties of Protein Extract from Rice Bran. *Kasetsart Journal: Natural Science*. 2006, **40**(5), 209-214.
- [88] Doporučená denní dávky minerálů. In: *Naturis* [online]. Neratovice, 2017 [cit. 2020-07-25]. Dostupné z: <https://www.naturis.cz/blog/view/doporucene-denni-davky-vitaminu-a-mineralu/>
- [89] Potassium. In: *National Institutes of Health* [online]. USA: Office of Dietary Supplements [cit. 2020-07-29]. Dostupné z: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Potassium-HealthProfessional/>
- [90] Phosphorus. In: *National Institutes of Health* [online]. USA: Office of Dietary Supplements [cit. 2020-07-29]. Dostupné z: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Phosphorus-HealthProfessional/>

- [91] Iswari Rýžový Protein 74% BIO. In: *Aktin* [online]. Brno: Selltime s.r.o. [cit. 2020-07-24]. Dostupné z: <https://aktin.cz/iswari-ryzovy-protein/250-g-17516>
- [92] Sójový protein: Soy protein 92. In: *4FITNESS: Profesionální výživa* [online]. Brno: 4FITNESS s.r.o. [cit. 2020-07-24]. Dostupné z: <https://4fitness.cz/sojovy-protein-1-kg-soy-isolate/>
- [93] Aktin Syrovátkový protein. In: *Aktin* [online]. Brno: Selltime s.r.o. [cit. 2020-07-24]. Dostupné z: <https://aktin.cz/aktin-syrovatkovy-protein/bez-prichute-2000-g-28100>
- [94] L-Aspartic acid. In: *NutriScience* [online]. USA: NutriScience Innovations, LLC [cit. 2020-07-29]. Dostupné z: <https://nutriscienceusa.com/l-aspartic-acid/>
- [95] Glutamic acid. In: *Aminoacidstudies.org* [online]. [cit. 2020-07-29]. Dostupné z: https://aminoacidstudies.org/glutamic-acid/#The_Role_of_Glutamic_Acid_in_the_Body
- [96] WU, Guoyao, Fuller W. BAZER, Robert C. BURGHARDT et al. Proline and hydroxyproline metabolism: implications for animal and human nutrition. *Amino Acids*. 2011, **40**(4), 1053-1063. DOI: 10.1007/s00726-010-0715-z. ISSN 0939-4451. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00726-010-0715-z>
- [97] VAN DE WALLE, Gavin. Benefits and Uses of Glycine. In: *Healthline* [online]. USA [cit. 2020-07-29]. Dostupné z: <https://www.healthline.com/nutrition/glycine>
- [98] KOEPPEN, Bruce M. a Bruce A. STANTON. *Berne & Levy Physiology*. Sixth edition. Canada: Mosby Elsevier, 2010. ISBN 978-0-323-07362-2.
- [99] BEAN, Anita. *Sports Supplements: Which nutritional supplements really work*. 2nd edition. London: Bloomsbury Publishing, 2015. ISBN 9781472911452.
- [100] 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*. Vydání první. V Praze: Ikar, 2005. ISBN 80-249-0612-0.
- [101] *Better Nutrition*. 1999, . ISSN 0405-668X.
- [102] ALMEIDA, Cristine Couto, Maria Lúcia Guerra MONTEIRO, Bruno Reis Carneiro da COSTA-LIMA, Thiago Silveira ALVARES a Carlos Adam CONTE-JUNIOR. In vitro digestibility of commercial whey protein supplements. *LWT - Food Science and*

Technology. 2015, **61**(1), 7-11. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.11.038. ISSN 00236438.
Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643814007634>

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ANOVA	Analysis of Variance (analýza rozptylu)
BCAA	Branched Chain Amino Acids (větvené aminokyseliny)
CNS	Centrální nervová soustava
DAD	Diode-Array Detector (detektor s diodovým polem)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FIR	Far Infrared (daleká infračervená)
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (Optická emisní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou)
MANOVA	Multiway Analysis of Variance
MIR	Middle Infrared (střední infračervená)
MTOR	Mammalian Target Of Rapamycin (savčí cíl rapamycinu)
NIR	Near Infrared (blízká infračervená)
UV	Ultraviolet (ultrafialové)