

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4131 Zemědělství

Studijní obor: Zemědělské Biotechnologie

Katedra: Rostlinné výroby a agroekologie

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vliv enzymové hydrolysy na rozpustnost a antioxidační vlastnosti
izolátů bramborových proteinů získaných tepelnou koagulací

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.

Konzultant bakalářské práce: Ing. Adéla Brabcová

Autor bakalářské práce: Klára Miková

České Budějovice, 2014

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Klára MIKOVÁ
Osobní číslo: Z11341
Studijní program: B4131 Zemědělství
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie
Název tématu: Vliv enzymové hydrolysy na rozpustnost a antioxidační vlastnosti izolátů bramborových proteinů získaných tepelnou koagulací
Zadávací katedra: Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Bakalářská práce (BP) se bude zabývat možnostmi vlivu enzymové hydrolysy na změnu rozpustnosti a antioxidační aktivity izolátů bramborových proteinů získaných pomocí tepelné koagulace. Izoláty nebo koncentráty získané pomocí tepelné koagulace jsou obecně špatně rozpustné a proto je jejich využití limitováno (jen krmné účely). Tento stav by mohl být zlepšen pomocí enzymové hydrolysy, navíc by získané štěpy mohly disponovat zlepšenou antioxidační aktivitou. Řešení BP bude zahrnovat dvě části:

První částí bude vypracování literárního přehledu z dostupných literárních a ostatních informačních zdrojů ohledně produkce a vlastností izolátů a koncentrátů bramborových proteinů a možností jejich praktického uplatnění. V literárním přehledu bude rovněž uveden přehled možností, jak lze vlastnosti těchto izolátů či koncentrátů pozitivně měnit.

Druhou částí řešení BP bude experimentální hodnocení efektu enzymové hydrolysy na dvě klíčové vlastnosti proteinových izolátů (koncentrátů) - rozpustnost a antioxidační aktivitu. Laboratorně budou pomocí tepelné koagulace připraveny izoláty proteinů ze dvou typů materiálu - průmyslová hlízová voda (odrůdová směs) a "jednoodrůdová" hlízová voda získaná z hlíz brambor vybraných odrůd (1-2).


Případně bude testován i zahraniční komerční koncentrát. Pro přípravu hydrolyzátů budou vybrány dva enzymové systémy (alkalasa a další vybraná proteinasa). Budou použity nejméně dvě odlišné varianty týkající se času štěpení. Na připravených či získaných tepelných koagulátech budou probíhat laboratorní testy týkající se rozpustnosti, bude spektrofotometricky stanovena antioxidační aktivita a budou hodnoceny změny proteinových profilů v souvislosti s hydrolysou pomocí peptidové SDS-PAGE. U použitých koagulátů bude také stanoven obsah sušiny, obsah N a obsah rozpustných proteinů. Dosažené výsledky budou zpracovány do podoby tabulek a grafů či obrázků a budou taktéž statisticky vyhodnoceny.

Součástí práce bude diskuse dosažených výsledků s dostupnými výsledky z jiných prací a budou navrženy nosné body pro další výzkum v této oblasti. BP bude mít obvyklé formální členění sestávající z následujících částí: úvod, literární přehled, cíl práce, materiál a metody (metodika), výsledky, diskuse, závěr a seznam použitých literárních a informačních pramenů.


Rozsah grafických prací: 5 - 10 stran
Rozsah pracovní zprávy: 30 - 40 stran
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná
Seznam odborné literatury:

Bárta, J., Bártová, V. (2007): Bílkoviny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.). Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, ISBN 978-80-7394-036-2, 116 p.
Cheng Y., Xiong Y. L., Chen J. (2010): Antioxidant and emulsifying properties of potato protein hydrolysate in soybean oil-in-water emulsions. *Food Chemistry* 120: 101-108.
Kärenlampi, S. O.; White P. J. (2009): Potato proteins, lipids, and minerals. In *Advances in potato chemistry and technology*; Singh, J., Kaur, L. eds.; Academic Press imprinted by Elsevier: Amsterdam, Netherlands, 508 p.
Wang L. L., Xiong Y. L. (2005): Inhibition of Lipid Oxidation in Cooked Beef Patties by Hydrolyzed Potato Protein Is Related to Its Reducing and Radical Scavenging Ability. *J. Agric. Food Chem.* 53 (23): 9186-9192.

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.
Katedra rostlinné výroby a agroekologie
Konzultant bakalářské práce: Ing. Adéla Brabcová
Katedra rostlinné výroby a agroekologie
Datum zadání bakalářské práce: 27. března 2013
Termín odevzdání bakalářské práce: 15. dubna 2014


prof. Ing. Miloslav Soch, CSc.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13 ④
370 05 České Budějovice


prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 27. března 2013

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum 10. 4. 2014 v Českých Budějovicích

.....

Klára Miková

Chtěla bych poděkovat doc. Ing. Janu Bártovi Ph.D. za cenné rady a odbornou pomoc při zpracování mé bakalářské práce. Dále bych chtěla také poděkovat Ing. Adéle Brabcové za odbornou pomoc při práci v laboratoři.

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá vlivem enzymové hydrolýzy na změnu rozpustnosti bílkovinných izolátu a změnu jejich antioxidační aktivity. V práci byla použita průmyslová hlízová voda a hlízová voda z odrůd Sibů a Ornella. Izoláty získané pomocí tepelné koagulace jsou obecně špatně rozpustné, a proto je jejich využití limitováno (jen krmné účely). Práce popisuje, pozitivní vliv enzymové hydrolýzy na rozpustnost a antioxidační aktivitu proteinu. Například antioxidační aktivita štěpů dosahovala 99 mg L⁻¹ - askorbové kyseliny na gram štěpů. Nejvyšší podíl rozpustného izolátu bylo zjištěno u štěpení enzymem alkalasa.

Klíčová slova: brambory, hlízová voda, enzymová hydrolýza, hlízový protein, antioxidační aktivity

Abstract

This bachelor thesis is focused on effect of enzyme hydrolysis on solubility and antioxidative properties of potato protein. It was used industrial potato fruit juice and potato fruit juice from tubers two varieties Sibü and Ornella. Isolates derived from heat coagulation are generally poorly soluble so their use is limited (only feeding purposes). This work describes positive effect of enzyme hydrolysis on solubility and antioxidative properties of potato protein isolates. For example, antioxidative activity of soluble isolates was 99 mg of L - ascorbic acid per mg protein. The highest share of soluble isolates was found at cleavage of enzyme alkalase.

Keywords: potatoes, potato fruit juice, enzyme hydrolysis, potato protein, antioxidative properties

Obsah

1. Úvod	10
2. Literární přehled	11
2.1. Brambor hlíznatý (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	11
2.2. Látkové složení hlíz	11
2.3. Dusíkaté látky hlíz brambor	13
2.4. Hlízové bílkoviny brambor	14
2.4.1. Patatin.....	14
2.4.1.1. Základní charakteristika patatinu	14
2.4.2. Inhibitory proteáz	15
2.4.2.1. Klasifikace inhibitoru proteáz	15
2.4.3. Ostatní bílkoviny	17
2.4.4. Nutriční hodnota hlízových bílkovin brambor	17
2.5. Antioxidanty – obecná charakteristika.....	17
2.5.1. Antioxidanty v hlízách bramboru	18
2.5.2. Vliv faktorů na antioxidační aktivitu	19
2.5.3. Význam antioxidantů v hlíze bramboru	20
2.5.4. Polyfenoly	20
2.5.5. L – askorbová kyselina.....	21
2.5.6. Karotenoidy	21
2.5.7. Antokyanová barviva	21
2.5.7.1. Význam antokyanů v hlízách	21
2.5.8. Další antioxidanty	22
2.6. Enzymatická hydrolýza.....	22
2.6.1. Proteázy.....	22
2.6.2. Enzymy digestivní.....	23
2.7. Hlízová voda	25
2.7.1. Izolace bílkovin z hlízové vody brambor	27
2.7.2. Izolace hlízových bílkovin pomocí srážecích činidel	28
2.7.3. Další způsoby izolace hlízových bílkovin.....	28
3. Cíl práce	29
4. Materiál a metody	30

4.1. Materiál	30
4.2. Příprava a zpracování vzorků.....	30
4.3. Enzymatické štěpení	31
4.4. Stanovení obsahu dusíkatých látek ve vysrážených proteinech	32
4.5. Stanovení antioxidační aktivity.....	33
5. Výsledky	34
5.1. Enzymatické štěpení	34
5.2. Statistické vyhodnocení závislosti rozpustného podílu na jednotlivých faktorech	39
5.3. Stanovení dusíkatých látek ve vysrážených proteinech.....	40
5.4. Stanovení antioxidační aktivity.....	41
5.5. Statistické vyhodnocení závislosti antioxidační aktivity na jednotlivých proměnných.....	43
6. Diskuse	45
Závěr.....	47
Seznam zkratk	48
Seznam použité literatury.....	49
Přílohová část	55

1. Úvod

Brambor hlíznatý (*Solanum tuberosum* L.) je významnou plodinou zemědělství. Sklizené produkty jsou konzumovány v tepelném stavu. Hlíza bramboru v různých kuchyňských podobách patří do jídelníčku většiny obyvatel zeměkoule. Jsou především spojovány s vysokým obsahem škrobu. V posledních desetiletích si společnost začíná uvědomovat, že hlíza není pouze zdrojem škrobu, ale i dalších cenných látek. Řadíme mezi ně komplex dusíkatých látek, bílkovin (Bárta a Bártová, 2007). Obsah bílkovin v hlízách je sice nízký, ale důležitá je jejich nutriční hodnota. Brambory obsahují řadu významných složek, a to vitamínů a minerálních látek (například vápník, draslík a fosfor). Antioxidanty jako je např. L - askorbová kyselina a fenolické sloučeniny podporují zdraví. Brambory jsou také slibným zdrojem biologicky aktivních látek jako složek pro výrobu funkčních potravin, které mají příznivý vliv na kardiovaskulární stav.

Hlízová voda, která, vzniká jako odpad při výrobě škrobu, se většinou používá především jako závlaha pro zemědělské plodiny. Avšak vysrážené bílkoviny z hlízové vody lze využít jako bílkovinné krmivo (Bárta *et al.*, 2013). Tepelná procedura při koagulaci bramborový protein denaturuje a snižuje jeho funkčnost. Enzymová hydrolýza by mohla vést ke zlepšení funkčnosti dříve denaturovaných bílkovin (Wang a Xiong, 2005). Bílkoviny se během hydrolýzy štěpí na menší molekuly – peptidy a volné aminokyseliny, proto se zlepšuje jejich stravitelnost. Tepelná koagulace vede ke ztrátě rozpustnosti a zredukovaní funkčních vlastností proteinů (Kudo *et al.*, 2009). Díky enzymové hydrolýze by mohly být tyto vlastnosti zlepšeny.

2. Literární přehled

2.1 Brambor hlíznatý (*Solanum tuberosum* L.)

Brambor hlíznatý (*Solanum tuberosum* L.) řadíme do rodu lilek (*Solanum*) a čeledi lilkovitých (*Solanaceae*). Brambor má mnoho biologických vlastností typických pro tuto čeleď. Ke společným vlastnostem patří tvorba jedovatých látek glykosidů a alkaloidů. Brambor hlíznatý vytváří např. glykosid solanin, chaconin. Do rodu *Solanum* zařazujeme vytrvalé i jednoleté druhy (Rybáček *et al.*, 1988). Brambor hlíznatý je jednoletá bylina. Charakteristickým znakem je křídlení na hranách stonku. Listy jsou lichozpeřené, složené z čepele a řapíku. Květenství je dvojitý. Květy brambor jsou pětičetné, ale setkáváme se i s šestičetnými nebo sedmičetnými květy. Plodem je bobule, která obsahuje semena (Minx a Diviš *et al.*, 1994).

V zemědělské výrobě se u nás a téměř ve všech zemích brambor rozmnožuje vegetativně. Ve šlechtění se uplatňuje generativní množení semen. Ze semen se pěstují tzv. semenáčkové rostliny (semenáče) (Rybáček *et al.*, 1988).

Podle Rybáčka *et al.*, (1988) mateřské hlízy po vyčerpání jejich zásob v průběhu vegetace odumírají a spolu s nimi také všechny podzemní a nadzemní orgány kromě semena a dceřiné hlízy s živými spícími pupeny.

2.2 Látkové složení hlíz

Hlízy bramboru hlíznatého mají význam hlavně v lidské výživě a ve zpracovatelském průmyslu. Význam je spojen s obsahem škrobu a zdrojem vitamínu C v případě přímé lidské výživy. Konzument – laik často opomíjí význam dusíkatých látek včetně bílkovin kvůli jejich nízkému obsahu v čerstvé hmotě (Bárta a Čurn, 2004). Látky, obsažené v hlíze obecně rozdělujeme na látky kalorické a látky nekalorické. Vytvářejí nutriční hodnotu brambor. Jejich sloučeniny se podílejí i na konečné chuti a vůni hotového produktu (Míča *et al.*, 1995).

Nekalorické látky lze rozdělit na:

- a) látky pochutinové - podílejí se na vůni a chuti
- b) látky v hlíze přítomné – nepodílejí se na vůni a chuti

Ke kalorickým látkám patří škrob, dusíkaté látky a tuky. K pochutinovým látkám řadíme cukry, minerální látky, organické kyseliny, aromatické látky, fenoly a glykosidy. Do látek v hlíze přítomných patří polysacharidy (mimo škrob), vitamíny, enzymy a barviva. Lze říci, že hranice mezi jednotlivými látkami je těžko rozlišitelná (Zrůst, 2004).

Z biochemického hlediska hlíza obsahuje mnoho sloučenin nebo komplexů sloučenin. Tyto komplexy nejsou v hlíze rozmístěny rovnoměrně (Hruška *et al.*, 1974). Za hlavní látku obsaženou v hlízách je považována voda. Obsah vody se určuje v rozmezí 70-80 % i více čerstvé hmoty. Voda se vyskytuje ve formě vázané či volné. Forma vody volné tvoří hlavní podíl tzv. hlízové vody. Forma vody vázané je spojována s hydratací buněčných koloidů. Hlízy jsou rostlinný produkt, který obsahuje vysoké procento škrobu (až 30 % v čerstvé hmotě). Je hlavní složka sušiny hlíz. Obsah sušiny se pohybuje v rozmezí 16-32 % čerstvé hmoty (Prugar *et al.*, 2008). Hodnota sušiny je závislá na mnoho faktorech. Faktory jsou například odrůda, podmínky pěstování. V období mezi plným květem a odkvětem je u sušiny nejvyšší intenzita tvorby. Nejnižší intenzita tvorby je mezi jejím odkvětem a zráním rostliny (Hruška *et al.*, 1974).

Škrob je hlavní zásobní látka. V hlízách bramboru je uložen v škrobových zrnech. Škrob patří k méně stravitelným škrobům i přes vysokou energetickou hodnotu. Nejvyšší koncentrace obsahu dosahují oblasti centrálního kruhu cévních svazků. Jeho složky jsou – amylosa a amylopektin. Základní stavební jednotkou obou komponent je D-glukosa (Prugar *et al.*, 2008). Jako hlavní rostlinný zásobní polysacharid se ukládá ve formě zrn v amyloplastech a chloroplastech. Zde probíhá jeho biosyntéza. K nejdůležitějším vlastnostem patří jeho chování ve vodním prostředí. V suchém stavu jsou škrobová zrna hygroskopická (Zrůst, 2004).

Hlíza není jen zdrojem škrobu, ale i zdrojem zajímavých a cenných složek. Jsou obsaženy v menších množstvích ve srovnání se škrobem. Zařazujeme k nim komplex dusíkatých látek a především bílkovin. Bílkoviny hlíz patří k nejkvalitnějším rostlinným bílkovinám (Bárta a Bártová, 2007).

2.3 Dusíkaté látky hlíz brambor

Dusíkaté látky v bramborové hlíze obsahují 50 % bílkovin, 25 % amidů, 15 % volných aminokyselin a 12 % ostatních dusíkatých látek. K těm zařazujeme například glykoalkaloidy, adenin, guanin, narkotin, trigonelin, kadevarin aj. Bárta a Bártová, (2007) uvádí, že volné aminokyseliny jsou v hlíze zastoupeny především dvaceti běžnými aminokyselinami. Převažují glutamové kyseliny a amidy asparagové. V hlíze se mohou vyskytovat i jiné méně obvyklé aminokyseliny a to například β -alanin (Bárta a Bártová, 2007). Volné aminokyseliny mají také vliv na chuť brambor – zesilují účinky jiných sloučenin. Mají též vlastní chuť, od neutrální (fenylalanin, tryptofan, tyrosin) až ke sladké (prolin, alanin). Jejich obsah je závislý především na odrůdě (Zrůst, 2004). Podle Rybáčka *et al.*, (1988) další významnou složkou dusíkatého komplexu tvoří dusičnany. Jejich obsah není vysoký. Uvádí se zhruba 4 % celkového dusíku. Je významný v potravinářské sféře. Obsah dusičnanů závisí na velikosti hlízy, ale i na částech hlízy. Brambory nepatří totiž mezi plodiny se schopností nadměrně akumulovat dusičnany (Míča, Vokál a Penk, 1991). Přípustné množství pro brambory rané je 500 mg a pro brambory ostatní je stanoveno na 300 mg.kg⁻¹ (Jůzl, Zrůst a Hlušek, 2008). Nejdůležitějším komplexem dusíkatých látek je tzv. čistá bílkovina, jejíž obsah se pohybuje kolem 58%. Hrají významnou roli v interakci s ostatními složkami v rostlině, jako jsou cukry, fenoly, hormony, apod. Význam je i v jejich vysoké biologické hodnotě, která se blíží vaječné bílkovinně (Zrůst, 2004).

2.4 Hlízové bílkoviny brambor

Bílkoviny, obsažené v hlízách bramboru nejsou homogenní složkou. Názory na způsob klasifikace jednotlivých složek se liší (Bárta a Bártová, 2007). Například Rybáček *et al.*, (1988) uvedl, že bílkovina je tvořena zhruba ze 70 % globulinem a z 30 % albuminem. Albuminová frakce se též nazývá tuberinin a globulinová frakce tuberin. Novější klasifikace frakcí hlízových bílkovin je z analýz elektroforetickými technikami (Bárta a Bártová, 2007). Například Pots (1999) separoval hlízové bílkoviny pomocí techniky SDS-PAGE neboli elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti anionického detergentu dodecylsulfátu sodného. Na základě získaných spekter klasifikoval hlízové bílkoviny dle jejich molekulové hmotnosti na:

- a) Patatinové bílkoviny nebo jen patatiny s molekulovou hmotností 39-44 kDa
- b) Inhibitory proteáz s hmotností 4-25 kDa (Bárta *et al.*, 2009).
- c) Ostatní bílkoviny, které nepatří ani k jedné z uvedených skupin molekulová hmotnost vyšší než 45 kDa (Bárta a Bártová, 2007).

2.4.1 Patatin

Patatinové bílkoviny představují 20-40 % všech extrahovaných bílkovin. Patatinový komplex je homogenní skupina isoform. Isoformy se skládají z glykoproteinů o velikosti 43 kDa. Patatin byl poprvé izolován Racusen a Foote pomocí iontovýměnné a afinitní chromatografie. (Bárta a Bártová, 2007). Přítomnost patatinu je ve všech odrůdách brambor i v příbuzných divokých diploidech ze skupiny Andigena a Phujera (Bárta a Čurn, 2004).

2.4.1.1 Základní charakteristika patatinu

Isoelektrický bod bílkovin patatinu je v rozpětí pH 4,6-5,2, protože isoformy patatinu mají rozdílnou nábojovou heterogenitu. Patatinové komplexy jsou v hlíze lokalizované v parenchymatických buňkách, které se nacházejí v centrální vakuole. Z tohoto důvodu spolu s vysokým obsahem v hlíze jsou bílkoviny patatinu

považovány za hlízové bílkoviny, které mají zásobní funkci (Bárta a Bártová, 2007). Obsah patatinu je snižován v průběhu skladování hlíz a při jejich klíčení (Bárta a Čurn, 2004).

Patatinový komplex se za normálních podmínek vyskytuje ve významných množstvích jen v hlízách. V malém množství se také vyskytuje v listech, kořenech a stoncích. Existují dvě třídy genů, které kódují patatinové bílkoviny. Multigenová rodina třídy I kóduje patatinové komplexy v hlízách. Zatímco multigenová rodina třídy II kóduje patatin v celé rostlině. Obě třídy se mezi sebou liší přítomností či nepřítomností sekvence o délce 22 bází v 5' netranskribované oblasti. Tato sekvence je přítomna v multigenové rodině třídy I a nepřítomna v multigenové rodině třídy II (Bárta a Čurn, 2004).

2.4.2 Inhibitory proteáz

Inhibitory proteáz tvoří 30 % z celkového rozpustného proteinu hlízy. Jsou více heterogenní skupina proteinů než patatin. Mezi sebou se liší molekulovou hmotností, aminokyselinovým složením a inhibiční aktivitou. Úloha proteáz je hlavně kontrola proteolýzy, která je klíčový proces všech žijících organismů (Hanusová a Čurn, 2006).

2.4.2.1 Klasifikace inhibitoru proteáz

Na základě typu, popř. typů enzymů (proteáz), které inhibují lze přirozeně se vyskytující inhibitory proteáz rozdělit do 4 tříd:

1. Třída – serinové proteázy (serin či histidin v aktivním místě proteáz)
2. Třída – cysteinové proteázy (cystein v aktivním místě proteáz)
3. Třída – aspartátové proteázy (aspartátová skupina v aktivním místě)
4. Třída – mettaloproteázy (s kovovým iontem v aktivním místě) (Jongsma 1995, Hanusová a Čurn, 2006)

Podle práce Pouvreau et al., (2001) je možné inhibitory proteáz klasifikovat dle jejich molekulové hmotnosti na:

1. Bramborový inhibitor I (PI-1) – jedná se o sérinový inhibitor proteáz, který je složen z 5 podjednotek.
2. Bramborový inhibitor II (PI-2) – jedná se o sérinový inhibitor, který je složen z 2 podjednotek.
3. Bramborový cysteinový inhibitor (PCPI)
4. Bramborový aspartátový inhibitor proteáz (PAPI)
5. Bramborový inhibitor proteáz Kunitzova typu (PKP)
6. Ostatní serinové inhibitory proteáz (OSP)
7. Bramborový karboxypeptidový inhibitor proteáz (PCI)

Tabulka č. 1: Vlastnosti inhibitorů proteáz přítomné v hlíze bramboru (převzato a upraveno dle Pouvreau et al., 2001).

Skupina	Počet podjednotek	MW [kDa]	pI	Inhibovaný enzym hlavní
PI-1	5	35-40	5,1-7,8	Chymotrypsin
PI-2	2	20,5	5,5-5,9	Trypsin
PCPI	1	20,1-22,8	5,8-9,0	Papain
PAPI	1	19,9	8,2	CathepsinD
PKPI	1	20,2	8,0-9,0	Trypsin
PCI	1	4,3	-	karboypeptidasa A
OSP	1-2	21-24	7,5-8,8	trypsin, chymotrypsin, elastasa

Inhibitory proteáz zaujímají v rostlinách řadu rolí. Působí jako zásobní proteiny. Dále působí jako regulátory endogenní proteolytické aktivity. Jsou součástí programované buněčné smrti. Tvoří složku obranného mechanismu rostlin. Vykazují rezistenci rostlin vůči hmyzu a patogenům (Hanusová a Čurn, 2006).

2.4.3 Ostatní bílkoviny

Ostatní bílkoviny představují 20-30 % z extrahovaných bílkovin. Skupina zahrnuje bílkoviny s vysokou molekulovou hmotností (Bárta a Bártová, 2007). Patří sem nejčastěji hlízový lektin, polyfenoloxidas, protein kinasa a enzymy, které se účastní na syntéze škrobu a fosforylové isoenzymy. Molekulová hmotnost ostatních bílkovin se pohybuje v rozmezí 49 kDa až do velikosti 600 kDa (fosforylasa) (Koningsveld *et al.*, 2001).

Velmi zajímavý z pohledu využití v genovém inženýrství a biotechnologií je bramborový lektin. Označuje se také jako *Solanum tuberosum* agglutinin (STA). Hmotnost v nativním stavu je 100 kDa (Bárta a Bártová, 2007). Vodrážka (2002) uvádí, že lektin je významný z hlediska účasti ochrany rostlin. Zpomaluje růst infekce u hub, které obsahují chitin ve vnější stěně.

2.4.4 Nutriční hodnota hlízových bílkovin brambor

Hlízová bílkovina patří mezi nutričně nejhodnotnější bílkoviny. Nutriční hodnota je dána především podílem esenciálních aminokyselin. Nedostatek esenciálních aminokyselin limituje průběh proteosyntézy u konzumenta (Bárta a Bártová, 2007). Bramborová bílkovina kromě esenciálních aminokyselin je tvořena i jinými aminokyselinami (Zrůst, 2004). Z nutričního pohledu je kvalita bílkovin závislá na jejich stravitelnosti a aminokyselinové skladbě. Sírné aminokyseliny, které jsou obsažené v bílkovinách bramboru lze považovat za limitující. Zejména je uváděn methionin. Význam má i vysoký obsah lysinu (Bárta a Čurn, 2004).

2.5 Antioxidanty – obecná charakteristika

Antioxidanty, jsou látky, které jsou schopny převádět volné radikály na nereaktivní nebo méně reaktivní formy. V potravinách se dají členit na přirozené a syntetické. Syntetické antioxidanty se přidávají pouze do potravin, které by byly

bez jejich přídavku oxidací poškozovány. Antioxidanty, obsaženy v lidské výživě snižují aterosklerotické procesy, inhibují akumulaci cholesterolu v krevním séru a zvyšují rezistenci cévních stěn (Zrůst, 2004).

Proteiny také představují antioxidanty přídatných látek v potravinách, protože inhibují oxidaci lipidů prostřednictvím různých cest, včetně inaktivace reaktivních forem kyslíku, volných radikálů změny fyzikálních vlastností potravin. Nejslibnější metoda výroby peptidů se jeví pomocí hydrolytických reakcí. Jejichž antioxidační aktivita je podstatně vyšší než u intaktních bílkovin. I když jsou proteiny a peptidy považovány za vynikající potravinové antioxidanty, jejich problémem je schopnost vyvolat alergie, hořké příchutě a změnit texturu a barvu potravin (Elias *et al.*, 2008).

2.5.1 Antioxidanty v hlízách bramboru

Brambory jsou řazeny k tzv. fytopotravinám. Z hlediska toho, že obsahují určité typy antioxidantů (Lachman *et al.*, 2000). Antioxidanty obsažené v hlízách bramboru patří k nejbohatším zdrojům antioxidantů v lidské výživě. Zajišťují denní příjem asi 64 mg polyfenolů na osobu spolu s ovocem a zeleninou.

Bramborové hlízy jsou nejbohatší na polyfenoly a L – askorbové kyseliny. Dále jsou zastoupeny karotenoidy, α – tokoferol, selen a L – lipová kyselina. Z fenolických hydroxyskupin brambor obsahuje aminokyselinu L – tyrosin, kávová kyselina, skopolin, chlorogenová kyselina, ferulová kyselina a kryptochlorogenová kyselina (Lachman *et al.*, 2005). Antioxidační schopnost je také prokázána u patatinové bílkoviny a inhibitorů proteáz. Ty mají anti – karcinogenní a anti mikrobiální vlastnosti a schopnost potlačit hlad (Waglay *et al.*, 2014).

Tabulka číslo 2: Jednotlivé zastoupení některých antioxidantů v hlíze bramboru. (převzato dle Lachman *et al.*,2005).

Antioxidanty	Množství v hlíze bramboru [mg.kg ⁻¹]
Polyfenoly	1226-4405
L – askorbová kyselina	170-990
Karotenoidy	4
α – tokoferol	0,5-2,8
Selen	0,01

Heinonen *et al.*, (1997) uvádí, že účinnost antioxidantů je větší, pokud jsou použity ve vzájemné kombinaci. Mají synergický účinek.

2.5.2 Vliv faktorů na antioxidační aktivitu

V současné době jsou prováděny šlechtitelské pokusy s cílem zvýšit antioxidační aktivitu brambor. Podstatnou roli v antioxidační kapacitě bramboru hraje obsah polyfenolů a antokyanů. Flavonoidy a u barevných odrůd antokyany jsou zastoupeny v buněčných vakuolách peridermu. Celkový obsah polyfenolových látek a antokyanů je rozdílný v různých stádiích zralosti hlíz. Podle pokusu Lachmana má největší vliv ze sledovaných faktorů odrůda. Kdy vyšší obsah celkových polyfenolů je u odrůd s fialovou barvou dužniny než u odrůd s bílou nebo žlutou dužninou. To je způsobeno přítomností antokyanu u odrůd s fialovou barvou (Lachman *et al.*, 2006). Bylo také zjištěno, že výše položené chladnější stanoviště s vyšším úhrnem srážek poskytují hlízy s vyšším obsahem celkových polyfenolů. K dalším faktorům, které ovlivňují antioxidační aktivitu, je vliv hnojení. Obsah celkových polyfenolů ovlivňuje použití draselných hnojiv. Kdy draselná hnojiva snižují celkový obsah polyfenolů (Lachman *et al.*, 2006).

2.5.3 Význam antioxidantů v hlíze bramboru

Brambory jsou řazeny k tzv. fytopotravinám. Z hlediska toho, že obsahují určité typy antioxidantů (Lachman *et al.*, 2000).

Bramborové hlízy obsahují sekundární metabolity – polyfenolické sloučeniny, které reprezentují substrát pro enzymové šednutí brambor. To se objevuje během loupání nebo krájení syrových hlíz. Například skořicové polyfenolické kyseliny mohou zastavit i růst některých rakovinných buněk. Askorbová kyselina patří k hlavním přírodním inhibitorům enzymového šednutí dužniny brambor. Dále může také inhibovat bramborovou polyfenoloxidázu přímo blokováním atomu mědi v aktivním centru enzymu. Flavanoidy jsou schopné vázat kovové ionty a bránit jim působit jako katalyzátory v těle. Antioxidanty přítomné v hlíze bramboru se také podílejí na zbarvení – především šednutí dužniny a černání syrových hlíz (Zrůst, 2004).

Důležité antioxidanty v hlíze bramboru dle Lachmana *et al.*, (2005).

2.5.4 Polyfenoly

Řadíme je mezi sekundární metabolity. Jejich funkce je chránit rostlinu před napadením bakteriemi, houbami a viry. Jsou to silné antioxidanty. Do skupin polyfenolů patří fenolické skupiny, aminokyselina tyrosin a flavanoidy. Jejich zastoupení z 90 % tvoří skořicové polyfenolické kyseliny. (Lachmann *et al.*, 2000).

Jsou to látky, které jsou rozpustné převážně ve vodě. Jejich význam je chránit vitamín C a β – karoten. Deriváty skořicové kyseliny mohou zastavit růst některých rakovinných buněk. Flavanoidy mají schopnost zachytit a zneutralizovat přebytečné volné radikály v tkáních nebo jsou schopné vázat kovové ionty (Zrůst, 2004).

Jejich obsah v bramborové hlíze je ovlivněn řadou faktorů. K nejvýznamnějším patří odrůda, lokalita způsob pěstování a řada dalších vnějších faktorů. Naproti tomu celkový obsah polyfenolů lze mírně zvýšit ekologickým způsobem pěstování brambor. (Zrůst, 2004)

2.5.5 L – askorbová kyselina

Je důležitým zdrojem vitamínu C. Její zastoupení v bramborách se udává kolem 170-990 mg . kg⁻¹ . Bylo prokázáno, že i ve vařených bramborách se výskyt L-askorbové kyseliny pohybuje průměrně okolo 130 mg v kilogramu. Představuje hlavní inhibitor enzymového hnědnutí brambor, redukuje primární produkty oxidace. Inhibuje také bramborovou polyfenoloxidasu, kdy přímo blokuje atom mědi v aktivním centru enzymu (Lachmann *et al.*, 2005).

Obsah v bramborové hlíze je ovlivněn vnějšími i vnitřními podmínkami. Například z pokusu Dipierra a de Leonardese vyplývá, že obsah kyseliny závisí na podmínkách skladování hlíz. Vysokých hodnot kyseliny askorbové lze dosáhnout cíleným hnojením hnojivy, které obsahují draslík (Zrůst, 2004).

2.5.6 Karotenoidy

V bramborové hlíze je jejich obsah kolem 4 mg.kg⁻¹. Podle Dukeho (1992), nejvíce jsou zastoupeny β – karoteny a jeho 5,6 monoepoxydy. Ong a Tee (1992), ale uvádějí, že nejvíce je zastoupen lutein, zeaxanthin, poté až následuje β – karoten. Patří k lipofilním antioxidantům. Jsou schopné ochrany určité tkáně, kdy ochranné účinky jsou vyšší, jsou – li všechny karotenoidy obsaženy v kompletní směsi. Chrání také buňky pokožky před UV – zářením (Zrůst, 2004).

2.5.7 Antokyanová barviva

Patří k významným skupinám antioxidantů. Jsou to přirozená barviva, která jsou obsažena v červeně a modře zbarvených odrůdách brambor. Antokyanová barviva se vyskytují hlavně ve slupkách a dužnině bramborových hlíz (Lachman *et al.*, 2005). Brown *et al.*, (2003) uvádí, že celkový obsah antokyanů u brambor s červenou dužninou je 69-350 mg v kg čerstvé hmoty. U brambor s modrou dužninou je celkový obsah antokyanů v rozmezí 55-171 mg. Antioxidační kapacita červeně nebo modře zbarvených brambor je 2-3 x vyšší ve srovnání s bramborami se žlutou, resp. bílou dužninou hlíz (Zrůst, 2004).

2.5.7.1 Význam antokyanů v hlízách

Antokyany zlepšují celkový vzhled a přispívají ke zdraví konzumentů. Při dietě představují účinné antioxidanty, jejichž příjem je odhadován na 180 mg na osobu. Antokyany obsažené v červených a modrých bramborách mají také schopnost blokovat bramborovou plíseň. Díky jejím fungicidním vlastnostem. Mají trvalou rezistenci, ta zabraňuje pronikání plísně do podzemních částí brambor (Lachman *et al.*, 2005).

2.5.8 Další antioxidanty

Za růstový faktor lze považovat α – lipoovou kyselinu, která je uvnitř buněk snadno redukována na dihydrolipoovou kyselinu. Ta likviduje škodlivé radikály (Packer *et al.*, 1995). K dalším antioxidantům také přiřazujeme α – tokoferol a selen. Význam selenu spočívá v tom, že společně s vitamínem E zastavuje reakce volných radikálů, které mohou poškozovat živé buněčné struktury (Zrůst, 2004).

2.6 Enzymatická hydrolýza

Enzymatická hydrolýza je štěpení chemických vazeb za účasti vody. Štěpení se účastní enzym – hydroláza. Hydrolázy jsou jednoduché proteiny, které se podílí na hydrolytickém rozkladu živin. Katalyzují štěpení chemických vazeb (zejména C-C, C - O, C - N) za účasti vody. Mechanismus reakční je založen na přenosu radikálu z hydrolyzovaného substrátu na vodu (Vodrážka *et al.*, 1991.).

2.6.1 Proteázy

Velmi rozsáhlá skupina enzymů, která katalyzuje hydrolýzu peptidových vazeb peptidů a proteinů. Rozdělujeme je na dvě hlavní skupiny:

- peptidázy (exopeptidázy) – štěpí aminokyseliny nebo dipeptidy postupně. Radíme sem α -aminopeptidhydrolázy, dipeptidhydrolázy, dipeptidylhydrolázy a peptidylpeptidhydrolázy.

- proteinázy (endopeptidázy) – hydrolyzují vazby uvnitř peptidového řetězce. Patří sem serinové proteinázy, thiolové proteinázy, kyselé proteinázy, metaloproteinázy a proteinázy (Belitz a Grosch, 1986).

2.6.2 Enzymy digestivní

Patří k enzymům, které jsou nepostradatelné pro štěpení, trávení a autolýzu proteinů. Jejich úlohou je trávení proteinů, nazýváme je proto enzymy digestivní. Řada těchto enzymů je produkováno v inaktivní formě proenzymů, proto musejí být v místě působení aktivovány. Jejich uplatnění je především v potravinářském průmyslu (Belitz a Grosch, 1986).

- **Proteázy živočišného původu** – rozdělujeme je na serinové proteázy a aspartátové proteázy. Největší význam mají trypsin, chymotrypsin, pepsin a chymozin. Komerčně se ještě například vyrábějí elastasa, karboxypeptidáza A (Vodrážka *et al.*, 1991).

Pepsin (3.4.23.1)

Enzym, který patří mezi karboxylové proteázy, Izoluje se z vepřové nebo hovězí žaludeční mukosy. Má širokou specifitu. Přednostně štěpí peptidové vazby, na nichž se podílejí aromatické aminokyseliny. Štěpí také syntetické substráty a vykazuje esterázovou aktivitu. Optimální pH je kolem 2. Pro syntetické substráty je pH optimum 2-4. Preparáty pepsinu se používají jako digestiva, k přípravě bílkovinných hydrolyzátů atd. (Vodrážka *et al.*, 1991).

Trypsin (3.4.21.4)

Enzym, který se nachází v pankreatické šťávě. Patří do skupiny serinových proteínáz. Trypsin štěpí specificky peptidové vazby, na nichž se podílejí karbolovou skupinou bazické aminokyseliny (lysin a arginin). Při hydrolýze bílkovin trypsinem vznikají velké peptidové fragmenty, jejichž terminální aminokyselina na C-konci je lysin nebo arginin. Optimální pH je v rozmezí 7-9 (Vodrážka *et al.*, 1991).

Chymotrypsin (3.4.21.1)

Enzym, který je produkován v buňkách slinivky břišní ve formě chymotrypsinogenu. K jeho aktivaci dochází po proteolýze chymotrypsinogenu trypsinem. Patří do skupiny serinových proteáz. Preferenčně štěpí peptidové vazby, na nichž se podílejí aromatické aminokyseliny (tyrosin, fenylalanin a tryptofan) (Vodrážka *et al.*, 1991).

Po chemické stránce se chymotrypsin skládá z 241 aminokyselinových zbytků. Jeho molekula má tři peptidové řetězce: A řetězec se 13 zbytky, B řetězec ze 131 zbytky a C řetězec s 37 zbytky. Optimální pH je 7,8. Teplotní optimum se pohybuje kolem 50 °C (Anonym₁).

- **Proteázy rostlinného původu** – Z rostlinných proteáz mají praktický význam pouze papain, ficin a bromelain. Bromelain se získává buď z ananasové šťávy, nebo ze zbytků (stonků) po výrobě ananasových kompotů. Ficínové preparáty jsou analogicky sušeným latexem z různých rostlin rodu *Ficus*. Používá se především ke stabilizaci piva, k získávání stříbra z použitých filmů a k hydrolyze různých bílkovin (Vodrážka *et al.*, 1991).

Papain (3.4.22.2)

Jako papainový preparát je nejčastěji užíván sušený latex z nezralých papajovníkových plodů (*Carica papaya*). Mimo jiné obsahuje i jiné enzymy např. chymopapain a lysozym (Vodrážka *et al.*, 1991).

Enzym, patřící do skupiny cysteinových proteas. Z chemické stránky se skládá z jednoho polypeptidového řetězce se třemi disulfidickými můstky a skupiny – SH, která je nezbytná pro jeho aktivitu. Papain katalyzuje štěpení peptidových vazeb základních aminokyselin, leucinu, nebo glycinu. Hydrolyzuje také estery a amidy (Anonym₂).

- **Proteázy mikrobiálního původu** – rozdělujeme je na bakteriální a plísňové proteázy. Do **bakteriálních proteáz** patří neutrální proteázy a alkalické proteázy. Jsou to proteázy získané z bakterie rodu *Bacillus*. **Neutrální proteázy** rozdělujeme na metalproteázy a serinové proteázy. Optimální pH je

5-8. **Alkalické proteázy** – jejich pH optimum je v rozmezí kolem 6-12. **Plísňové proteázy** rozdělujeme na kyselé, neutrální a alkalické. Mají široké rozmezí pH 4-11. Jsou to proteázové plísně z rodu *Penicilium* a *Asperigillus* (Vodrážka *et al.*, 1991).

Subtilisin (3.4.21.62)

Často označován jako bakteriální alkalická proteináza, Subtilopeptidasa A nebo Subtilisin Carisberg. Je produkován z bakterie *Bacillus licheniformis* fermentací. Patří do skupiny serinových endoproteináz. Má širokou specifitu. Hydrolyzuje nativní a denaturované bílkoviny. Aktivní je v alkalickém prostředí (Anonym₃).

2.7 Hlízová voda

Bramborové hlízy kromě kvalitního škrobu obsahují i množství vody (70-80 %). Do této vody ve škrobárně přechází rozpustný podíl sušiny a tím vzniká tzv. hlízová voda neboli PFJ – potato fruit juice. Je to odpad, který vzniká při výrobě škrobu. V největších škrobárnách ve světě se z hlízové vody separuje bílkovina, která má vynikající kvalitu a užitečné vlastnosti. Zbývající tekutina se po separaci bílkoviny zahušťuje, v mnoha případech až do suchého stavu. To je investičně i provozně extrémně náročné. V menších škrobárnách se hlízová voda používá jako závlaha pro zemědělské plodiny (Potravinářská komora, 2009). Bílkoviny vysrážené z hlízové vody lze používat jako bílkovinné krmivo (Bárta *et al.*, 2013).

Tabulka číslo 3: Průměrné složení potato fruit juice (převzato dle Koningsveld *et al.*, 2001).

Komponenta	Koncentrace v PHJ (g/l) (min.-max.)	% sušiny
Bílkoviny (N x 6,25)	13,4 (8,5-22,2)	26,8
Peptidy	2,2 (1,5-3,1)	4,4
Aminokyseliny + amidy (N x 5,13)	4,8 (3,3-7,8)	9,6
Ostatní dusíkaté látky	0,9	1,8
Cukry	7,9 (3,0-24,9)	15,8
Lipidy	1,1	2,2
Citronová kyselina	5,0 (2,0-12,0)	10,0
L - askorbová kyselina	0,3 (0,1-0,6)	0,6
Ostatní organické kyseliny	1,3 (0,7-5,4)	2,6
Chlorogenová kyselina	0,2 (0,1-0,5)	0,4
Kávová kyselina	0,07 (0,03-0,3)	0,1
Draslík	5,6 (3,9-7,3)	11,2
Fosfor	0,5 (0,2-0,9)	1,0
Ostatní látky	5,0	10,1

Obsah jednotlivých složek v sušině PFJ se může měnit v závislosti na zpracovávaných odrůdách a na pěstitelských podmínkách (Bárta *et al.*, 2013).

PFJ obsahuje tři základní skupiny bílkovinných komponent. Jedná se o bílkoviny patatinového komplexu (43-39 kDa), které tvoří přibližně 38 % všech bílkovin. Dále to jsou inhibitory proteáz (25-4,3 kDa), ty tvoří 45 % bílkovin a tzv. ostatní bílkoviny (90-100 kDa), které v průmyslové hlízové vodě zaujímají 16 %. Nejvýznamnější z PHJ bílkoviny jsou patatinové komponenty a inhibitory proteáz (Bárta a Bártová, 2007). Bramborový protein má relativně vysokou nutriční hodnotu, proto má dobrý potenciál pro využití v potravinách (Koningsveld *et al.*, 2006).

2.7.1 Izolace bílkovin z hlízové vody brambor

Jako nejefektivnější se jeví tepelná koagulace injekcí páry. Tento způsob izolace se využívá ve velkých škrobárnách v Německu a v Nizozemí (Zwijnenberg *et al.*, 2002). Postup spočívá v zakoncentrování průmyslové hlízové vody pomocí reverzní osmosy, úpravou PFJ na hodnotu pH 5. Následně jsou bílkoviny vysráženy pomocí tepelné koagulace. Výsledný koncentrát se používá jako bílkovinné krmivo (Bárta *et al.*, 2013). Tento postup izolace bílkovin z hlízové vody zaručuje vysokou výtěžnost (Bárta a Bártová, 2007).

Podle Koningsvelda *et al.*, (2001), srážení bílkovin z PFJ bez úpravy pH je možné pozorovat při překročení 40 °C. Z průmyslové hlízové vody je při zahřátí nad 60 °C vysráženo 50 % přítomných bílkovin. Zahřátí nad 70 °C způsobuje vysrážení kompletních bílkovin. Tyto bílkoviny jsou z 90 % nerozpustné. Teplota 70 °C je z hlediska stability hlízových bílkovin příliš vysoká a způsobuje jejich denaturaci a nerozpustnost (Koningsveld *et al.*, 2001). Technologie založená na principech tepelné koagulace vede k zisku koncentráту, ve kterém hlízové bílkoviny mají špatnou rozpustnost a poškozenou biologickou aktivitu. Výhodné pro bílkovinná krmiva. Z tohoto důvodu je snaha zpracovat hlízovou vodu i jinými technologiemi. (Bárta *et al.*, 2013).

2.7.2 Izolace hlízových bílkovin pomocí srážecích činidel

Izolace bílkovin z hlízové vody brambor pomocí jejich vysrážení je z hlediska průmyslového využití perspektivní způsob. Pro tento typ izolace hlízových bílkovin byly testovány organické i anorganické kyseliny (Knorr *et al.* 1977; Koningsveld *et al.*, 2001), jejichž účinnost z hlediska výtěžnosti izolovaných bílkovin byla nejvyšší při dosažení pH 3. Během srážení pomocí organických rozpouštědel dochází k uvolnění tepla, to vede k nízké výtěžnosti a zpětné rozpustnosti vysrážených bílkovin. Vysoká výtěžnost izolovaných bílkovin se zachováním zpětné rozpustnosti byla zaznamenána také při použití solí kovů (FeCl_3 , ZnCl_2 , FeSO_4). Při použití těchto srážecích činidel nebyla pozorována tak vysoká citlivost vůči teplotě. (Koningsveld *et al.*, 2001; Bárta *et al.*, 2008).

2.7.3 Další způsoby izolace hlízových bílkovin

Pro izolaci bílkovin z PFJ byly testovány i chromatografické metody. Příkladem může být iontovýměnná chromatografie na carboxymethylcelulose. Avšak získané bílkoviny byly z velké části denaturovány. Uplatňují se i membránové techniky ultrafiltrace. Docházelo, ale ke koncentrování antinutričních látek v bílkovinném izolátu. Využívá se i reversní osmóza. Ta se používá ke zkoncentrování hlízové vody před injektací páry a vysrážením bílkovin. To snižuje pracovní objem hlízové vody a energetickou náročnost procesu (Bárta a Bártová, 2007).

3. Cíl práce

Cílem práce bylo ověřit možnost využití enzymové hydrolýzy pro zlepšení rozpustnosti izolátů proteinů vzniklých z hlízové vody pomocí tepelné koagulace a u vzniklých štěpů ověřit zda došlo ke zvýšení jejich antioxidační aktivity a v jaké míře. Konkrétně práce probíhala podle následující osnovy dílčích cílů:

- Laboratorně připravit pomocí tepelné koagulace izoláty proteinů ze dvou typů materiálu – průmyslové hlízové vody ze škrobárny a hlízové vody získané z hlíz brambor odrůd Sibů a Ornella, které jsou používány pro zpracování na škrob.
- Enzymové štěpení vzorků ve dvou časech štěpení – pro přípravu hydrolyzátů byly vybrány enzymy alkalasa, trypsin a papain.
- Stanovení obsahu dusíkatých látek ve vysrážených proteinech pomocí Dumasovy metody a následný přepočet celkového obsahu dusíku koeficientem $N \times 6,25$.
- Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS – na získaných tepelných koagulátech spektrofotometricky stanovit antioxidační aktivita.
- Statistické vyhodnocení dat.

4. Materiál a metody

4.1 Materiál

Byly použity vzorky ze dvou typů materiálu – průmyslová hlízová voda (odrůdová směs) a hlízová voda získaná z hlíz brambor odrůd Sibů a Ornella

- Odrůda Sibů - odrůda, která se používá k výrobě škrobu. Skupina ranosti je polopozdní až pozdní.
- Odrůda Ornella – odrůda, která se používá k výrobě škrobu a smažených výrobků. Skupina ranosti je polopozdní až pozdní.
- PFJ – průmyslová hlízová voda – vzniká jako vedlejší produkt při výrobě škrobu, většinou jde o směs odrůd. PFJ byla získána z provozu podniku Lyckeby Amylex a.s. (Horažďovice).

4.2 Příprava a zpracování vzorků

Vzorky hlízové šťávy pocházely z průmyslové hlízové vody ze škrobárny a z hlízové vody z odrůd Ornella a Sibů. Pomocí pH metru bylo upraveno jejich pH na hodnotu 5 přidáním 0,5 H₂SO₄. Stejný objem hlízové šťávy z hlíz odrůd Ornella a Sibů (30 ml) byl převeden do 10 tub o známé hmotnosti. U průmyslové hlízové vody byl použit objem 20 ml do 20 tub o známé hmotnosti. Takto připravené tuby se zahřály na vodní lázni při 80 °C, po dobu 10 minut. Proběhla tepelná koagulace. Tuby po ochlazení ve studené vodě, byly zcentrifugovány při 4500 otáčkách po dobu 15 minut (centrifuga Rotina 420 R). K peletům (vzorkům) bylo přidáno 10 ml deionizované vody a byly opatrně rozmíchány pomocí skleněné tyčinky. Takto připravené směsi byly opět zcentrifugovány. Vzniklý supernatant byl odstraněn a pelety byly zamrazeny v mrazicím boxu na - 80 °C a poté zlyofilizovány do doby, dokud vzorky nebyly zcela vysušeny. Homogenizace vzorku byla provedena pomocí třecí misky. Homogenizované vzorky byly uchovány v řádně uzavřených tubách.

4.3 Enzymové štěpení

Štěpení probíhalo ve dvou časech po 2 a 24 hodinách. U každého času štěpení byly prováděny dvě opakování. Celkem bylo vyzkoušeno 7 variant štěpení. Od vzorků odrůd brambor Sibů a Ornella bylo naváženo 99 – 101 mg navážky pro každou variantu a čas štěpení. Izoláty vzniklé z průmyslové hlízové vody byly navažovány v množství kolem 79 – 80 mg pro každý čas a variantu štěpení.

Varianty štěpení:

- voda (V) – ke vzorkům bylo přidáno 10 ml vody.
- enzym papain (EP) – ke vzorkům bylo přidáno 9 ml 50 mM Na acetátového pufru o pH 7 + 1 ml enzymu papain.
- enzym trypsin (ET) – ke vzorkům bylo přidáno 9 ml 50 mM Tris – HCl pufru o pH 8 + 1 ml enzymu trypsin.
- enzym alkalasa (EA) – ke vzorkům bylo přidáno 10 ml 50 mM Tris – HCl pufru o pH 7 + 0,050 ml enzymu alkalasa.
- 50 mM Tris – HCl pufr, pH 8, pufr pro trypsin (KT) – ke vzorkům bylo přidáno 10 ml tohoto pufru, jako kontrola k ET.
- 50 mM Tris – HCl pufr, pH 7, pufr pro alkalasa (KA) – ke vzorkům bylo přidáno 10 ml tohoto pufru, jako kontrola k EA.
- 50 mM Na acetátový pufr, pH 6,5, pufr pro papain (KP) – ke vzorkům bylo přidáno 10 ml tohoto vzorku, jako kontrola k EP.
- Použité enzymy pocházely z firmy Sigma Aldrich
 - ✓ Papain – výrobní číslo P3250-25 G, specifita 0,5 – 2,10
 - ✓ Alkalasa – proteináza z bakterie *Bacillus licheniformis*, výrobní číslo P4860-50 ML, specifita $\geq 2,40$
 - ✓ Trypsin – výrobní číslo T4799-25 G

Nejprve bylo naváženo 150 mg enzymu papain a enzymu trypsin. Navážené množství papainu bylo rozpuštěno ve 30 ml Na – acetátového pufru a následně byl zahřát na teplotu 37 °C po dobu 15 minut v termostatu. Stejné množství enzymu trypsin, bylo rozpouštěno v 5ml 1mM HCl a 25 ml Tris – HCl pufru (pH 8).

Štěpení probíhalo v termostatech, kdy pro varianty s enzymem alkalasa byla teplota štěpení nastavena kolem 60 °C. Pro varianty s oběma zbylými enzymy byla teplota nastavena na 37 °C. Po skončení štěpení byla činnost enzymu zastavena varem, kdy tuby byly ponořeny do vroucí vody po dobu 10 minut. Poté byly zcentrifugovány při 4500 otáčkách po dobu 15 minut (centrifuga Rotina 420 R). Vzniklé supernatanty byly slity a 1 ml supernatantu od každého vzorku byl napipetován do mikrozkušavek o objemu 2 ml. Supernatanty byly uloženy do mrazáku a posloužily jako vzorky pro stanovení antioxidační aktivity. K peletům bylo přidáno 10 ml dH₂O poté byly promíchány a opět zcentrifugovány při 4500 otáčkách po dobu 15 minut. Vzniklé supernatanty byly odstraněny. Pelety byly zamrazeny v mrazicím boxu na – 80 °C a poté zlyofilizovány do úplného vysušení. Po lyofilizaci bylo provedeno vážení s využitím hodnot navážek byla stanovena změna hmotnosti (úbytek) jednotlivých vzorků. Rozpustnost byla stanovena jako procentický podíl úbytku hmotnosti k původní navážce.

4.4 Stanovení obsahu dusíkatých látek ve vysrážených proteinech brambor

Od každé odrůdy brambor a průmyslové hlízové vody bylo naváženo 50 mg izolátů získaného tepelnou koagulací vždy ve dvou opakováních pro odrůdu Sib, Ornella a PFJ. Na automatickém analyzátoru N-látek Flash EA 1112 (ThermoQuest, USA/Itálie) byla provedena analýza celkového dusíku modifikovanou Dumasovou metodou. Jako standart pro analyzátor byla použita aspartová kyselina.

4.5 Stanovení antioxidační aktivity

Vzorky (supernatanty) byly získány po enzymatickém štěpení bílkovin. Antioxidační aktivita byla stanovena ABTS testem dle metodiky publikované v příspěvku Šulc *et al.*, (2007). Nejprve byl připraven radikál, který obarvil daný vzorek světle zelenou barvou.

Příprava radikálu:

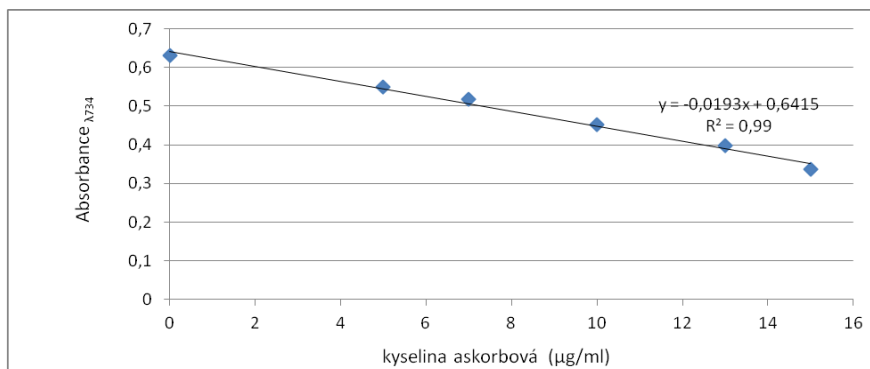
- Bylo naváženo 54,8 mg ABTS a 1 g MnO₂. Navážky byly rozpuštěny s 20 ml destilované vody. Vzniklý roztok byl míchán po dobu 20 minut na magnetickém míchadlu. Poté byl zfiltrován a postupným přidávkem fosfátového pufru (5 mM, pH 7,4) byla jeho absorbance snížena na absorbanci $A_{734} = 0,7$.

Příprava vzorků:

- Do kyvety bylo vždy přidáno po 1 ml vzniklého radikálu a 100 μ l vzorku (naředěného) a promícháno.

Na spektrofotometrickém přístroji byla změřena a odečtena absorbance daných vzorků při vlnové délce 734 nm, po 1 minutě od promíchání vzorků s radikálem. Antioxidační aktivita byla vypočtena z koncentrace daných vzorků a následně vyjádřena v miligramech askorbové kyseliny na gram štěpů.

Graf č. 1: Kalibrační křivka L – askorbové kyseliny.

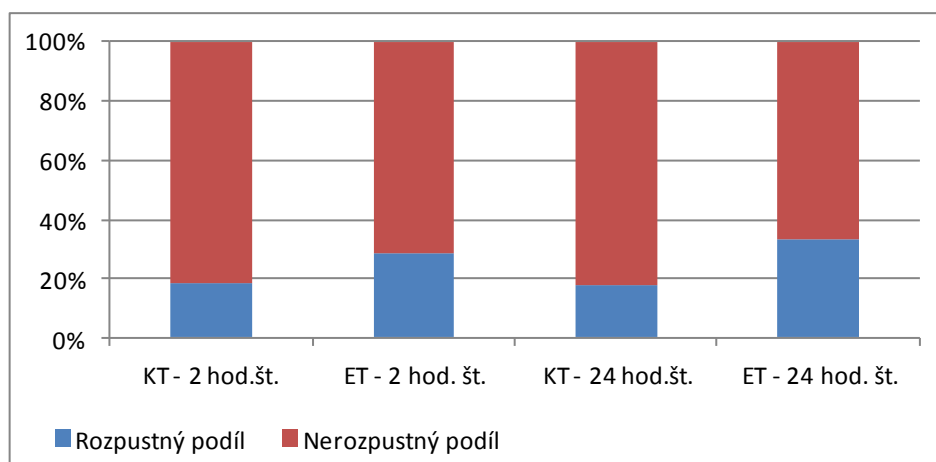


5. Výsledky

5.1 Enzymatické štěpení

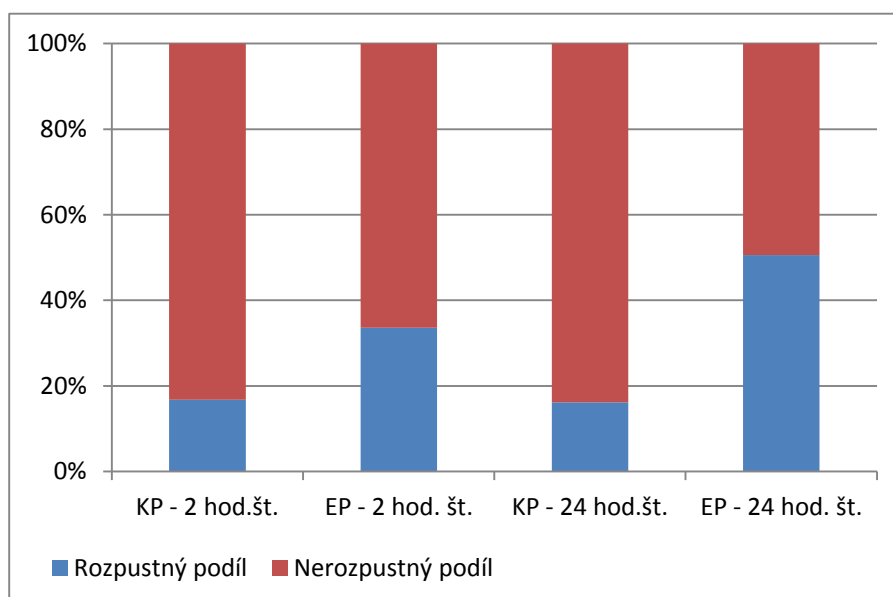
Z grafů (2-10) vyplývá, že štěpením po dobu 24 hodin je mnohem účinnější než štěpení trvající 2 hodiny. Avšak z ekonomického a praktického hlediska by bylo výhodnější používat čas štěpení 2 hodiny. Rozpustnost izolátů se pohybovala v rozmezí 28,5 % - 74,8 %. Z použitých enzymů, bylo nejúčinnější štěpení enzymem alkalasa, kdy rozpustný podíl izolátů činil 74,8 %. U papainu a trypsinu rozpustnost izolátu dosahovala 50,6 % a 44,4 %. Kontroly pro dané enzymy, ukázaly to, že i při použití pufru lze dosáhnout určitého podílu rozpustnosti. I když úbytek hmotnosti byl nižší než u použitých variant enzymů. Například při kontrole pro alkalasu dosahoval podíl rozpustnosti pouze 24,8 %, což je 3x méně než u zmiňovaného enzymu. U proteinových izolátů získaných z hlízové vody z odrůdy Siby byla rozpustnost izolátů u enzymů stanovena v rozmezí 28,5 % - 65,2 %. Naproti tomu u štěpů z odrůdy Ornella bylo dosaženo nejvyššího % rozpustného podílu a to 74,8 %. Nejúčinnější štěpení po dobu 24 hodin bylo také prokázáno u proteinového izolátu získaného z PFJ. Zjištěné podíly rozpustnosti byly ale nižší než u štěpů odrůdy Ornella.

Graf č. 2: Změna rozpustnosti izolátu z odrůdy Siby působením enzymu trypsin.



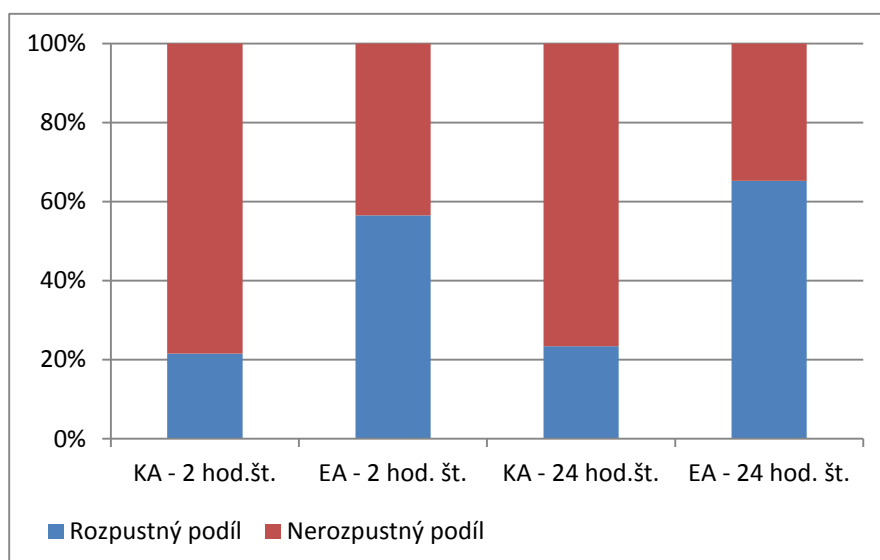
Pozn.: KT – kontrola k trypsinu, ET – enzym trypsin

Graf č. 3: Změna rozpustnosti izolátu z odrůdy Sibů působením enzymu papain.



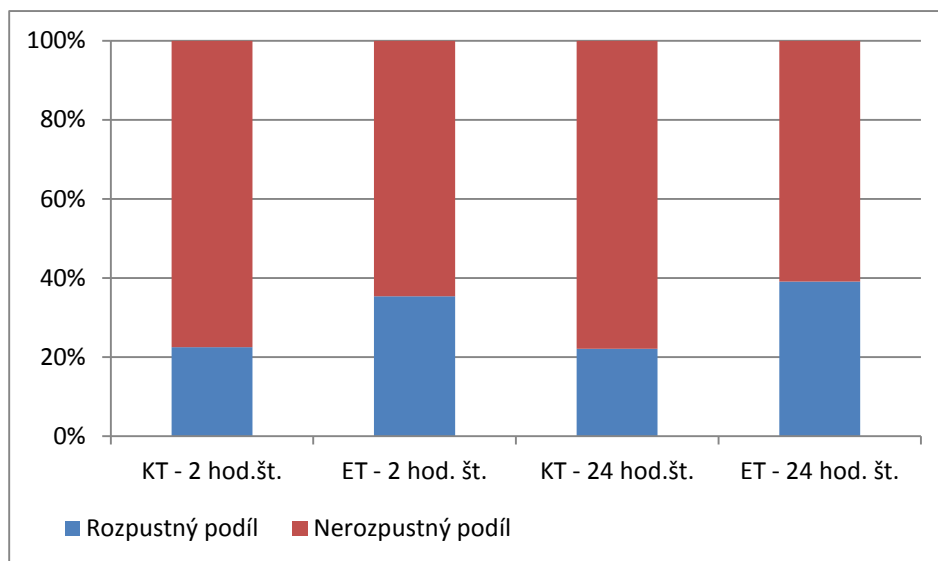
Pozn.: KP – kontrola k papainu, EP – enzym papain

Graf č. 4: Změna rozpustnosti izolátu odrůdy Sibů působením enzymu alkalasa.

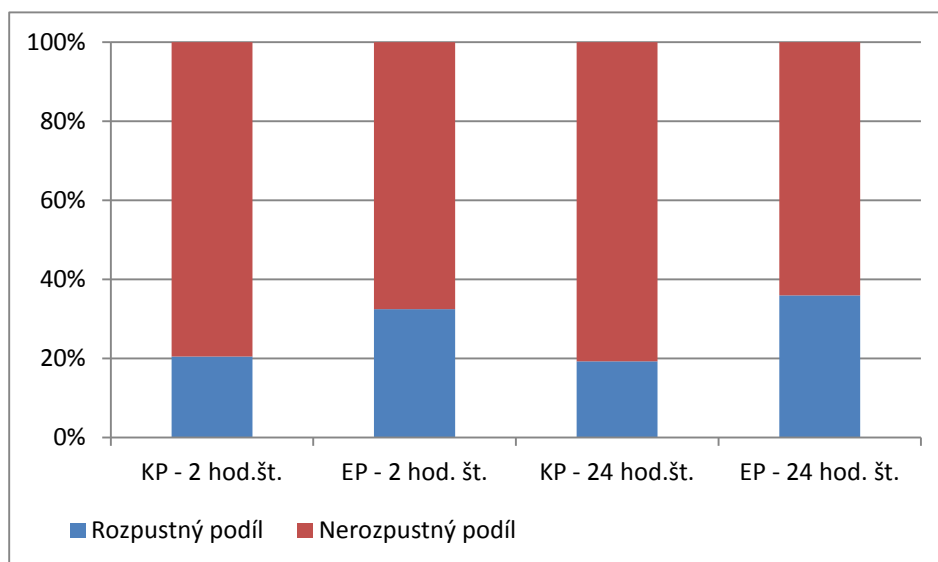


Pozn.: KA – kontrola k alkalasa, EA – enzym alkalasa

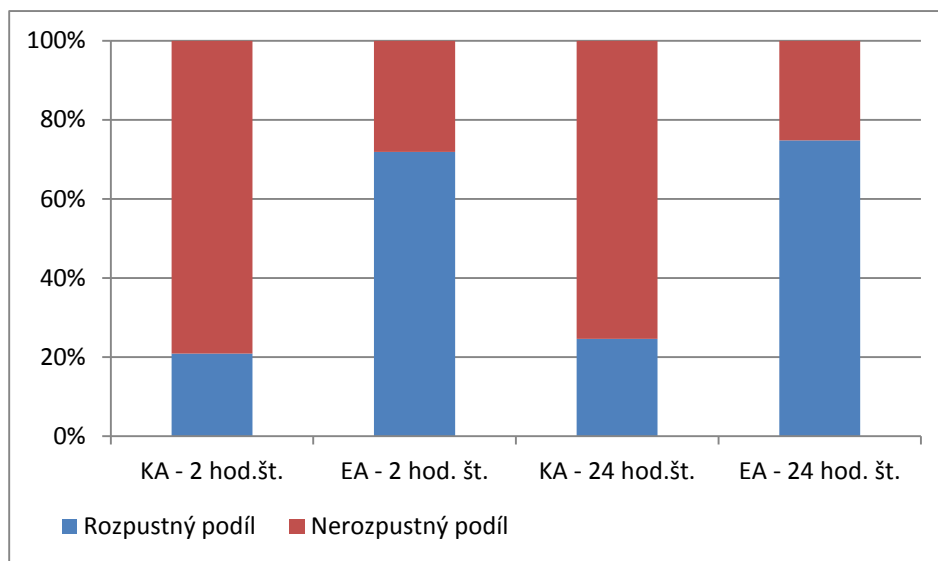
Graf č. 5: Změna rozpustnosti izolátu z odrůdy Ornella působením enzymu trypsin.



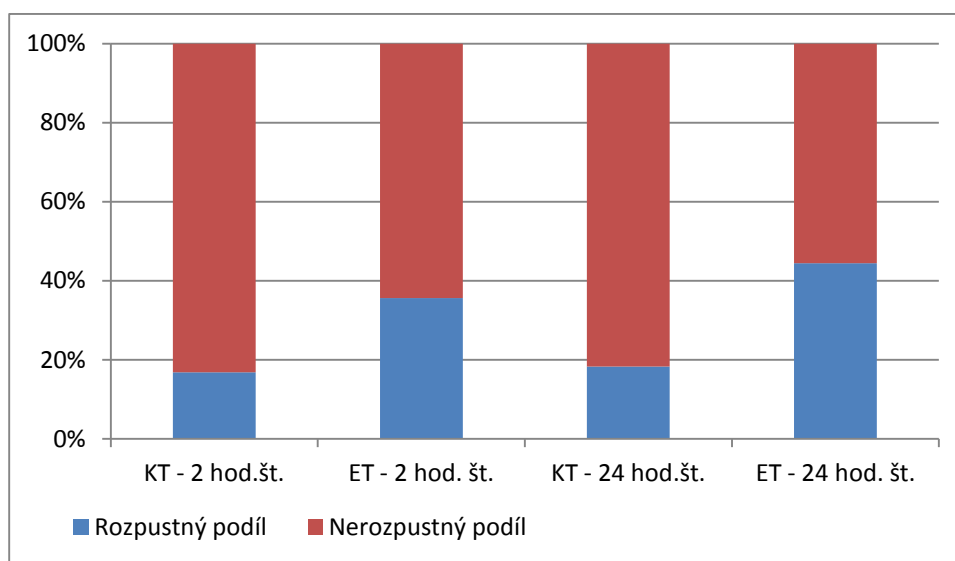
Graf č. 6: Změna rozpustnosti izolátu z odrůdy Ornella působením enzymu papain.



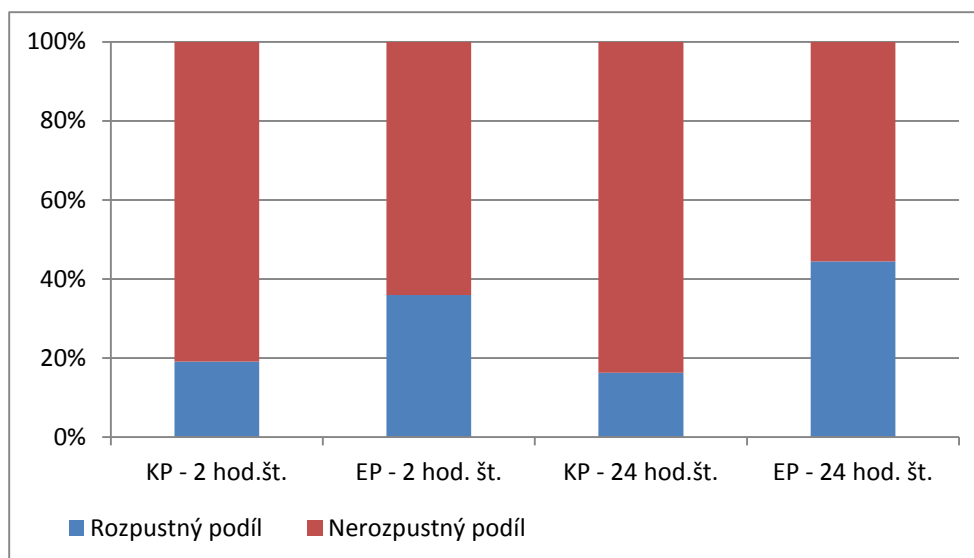
Graf č. 7: Změna rozpustnosti izolátu z odrůdy Ornella působením enzymu alkalasa.



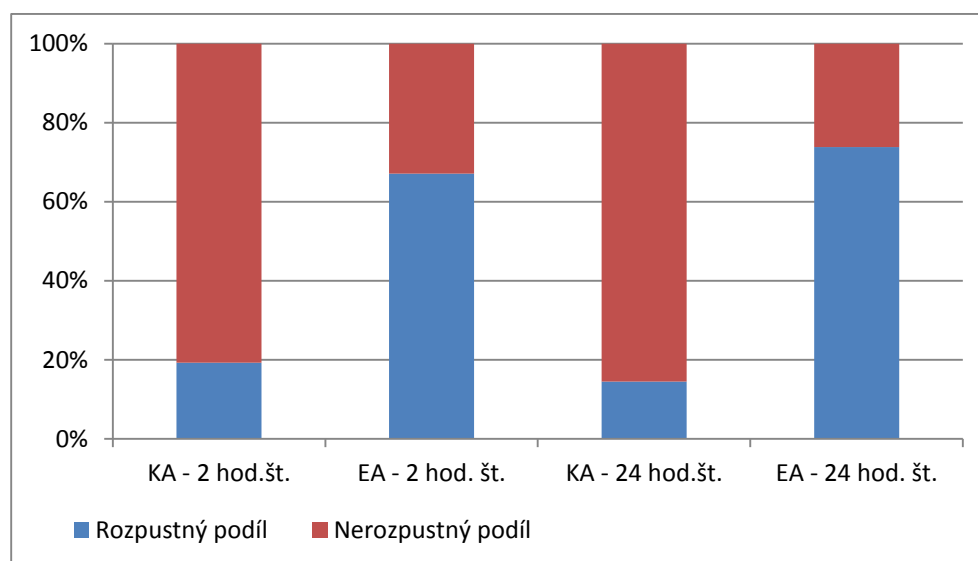
Graf č. 8: Změna rozpustnosti izolátu z PFJ působením enzymu trypsin.



Graf č. 9: Změna rozpustnosti izolátu z PFJ působením enzymu papain.



Graf č. 10: Změna rozpustnosti izolátu z PFJ působením enzymu alkalasa.



5.2 Statistické vyhodnocení závislosti rozpustného podílu izolátů na jednotlivých faktorech

Na hladině významnosti $p < 0,05$ byla statisticky prokázána závislost rozpustného podílu na těchto faktorech – odrůdový izolát, varianta (efekt enzymu, vliv pufrů), čas, odrůdový izolát x varianta a varianta x čas. Nejvyšší závislost rozpustného podílu byla prokázána u proměnné varianta (efekt enzymu, vliv pufrů), kdy variabilita dosahovala 89,4 % (viz tab. č. 4).

Tabulka č. 4: Hodnocení závislosti rozpustného podílu izolátů na jednotlivých proměnných.

ANOVA						
Efekt	Suma čtverců	Stupeň volnosti	Průměr čtverců	Hodnota F	Hodnota P	% Variability
Absolutní člen	80635,9	1	80635,9	4662,54	0	-
Odrůdový izolát	133,66	2	66,83	3,864	0,03018	0
Varianta (enzymy, vliv pufrů)	22089,9	5	4417,97	255,457	0	89,4
Čas	196,42	1	196,42	11,357	0,0018	1
Odrůdový izolát x varianta (enzymy, vliv pufrů)	729,35	10	72,93	4,217	0,00065	3,6
Odrůda x čas	23,37	2	11,69	0,676	0,51511	0
Varianta (enzymy, vliv pufrů) x čas	289,23	5	56,05	3,241	0,01619	1,7
Odrůda x varianta (enzymy, vliv pufrů) x čas	153	10	15,35	0,887	0,55356	0
Chyba	622,6	36	17,29	-	-	4,3

5.3 Stanovení dusíkatých látek ve vysrážených proteinech.

Obsah celkových dusíkatých látek (Nx6,25) v proteinových izolátech se pohyboval kolem 82 % (viz. tabulka č. 5). Obsah N se u vysrážených proteinů výrazně nelišil.

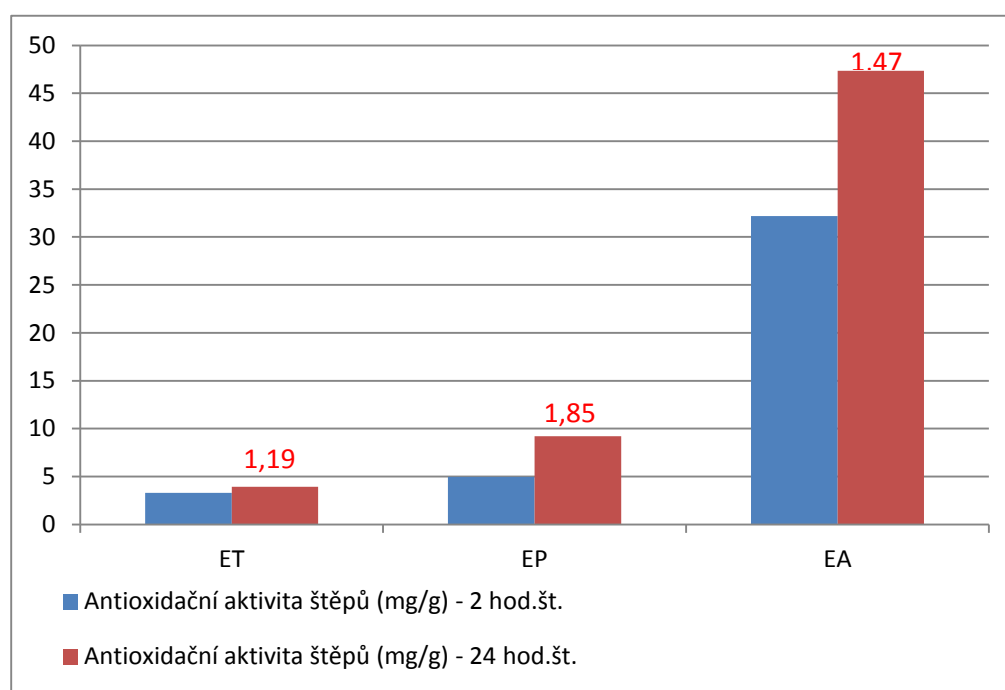
Tabulka č. 5: Obsah dusíkatých látek.

Odrůda	% N	% NL (x 6,25)
Sibu	12,79	79,92
Ornella	13,20	82,49
PFJ	13,01	81,31

5.4 Stanovení antioxidační aktivity

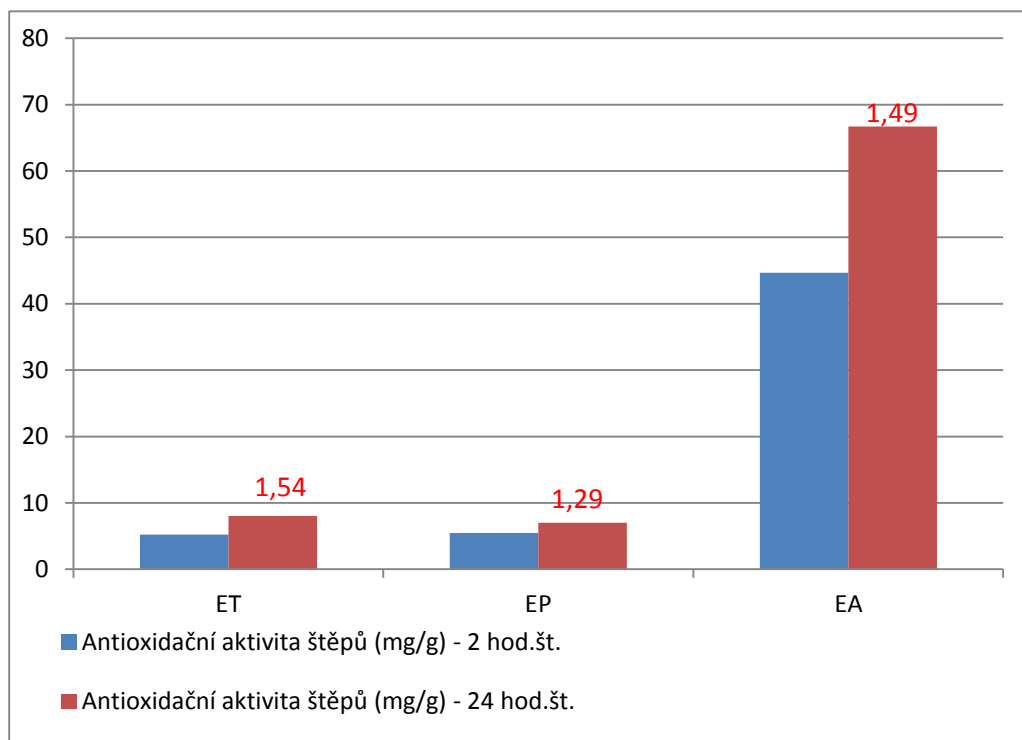
Z kalibrační řady askorbové kyseliny byla vypočtena koncentrace vzorků. Antioxidační aktivita byla vypočtena z koncentrace daných vzorků a následně vyjádřen v miligramech kyseliny askorbové na gram štěpů. Ze získaných výsledků byl vždy u každé varianty a opakování udělán průměr.

Graf č. 11: Celková antioxidační aktivita u štěpů proteinového izolátu vzniklého z hlízové vody odrůdy Sibü.

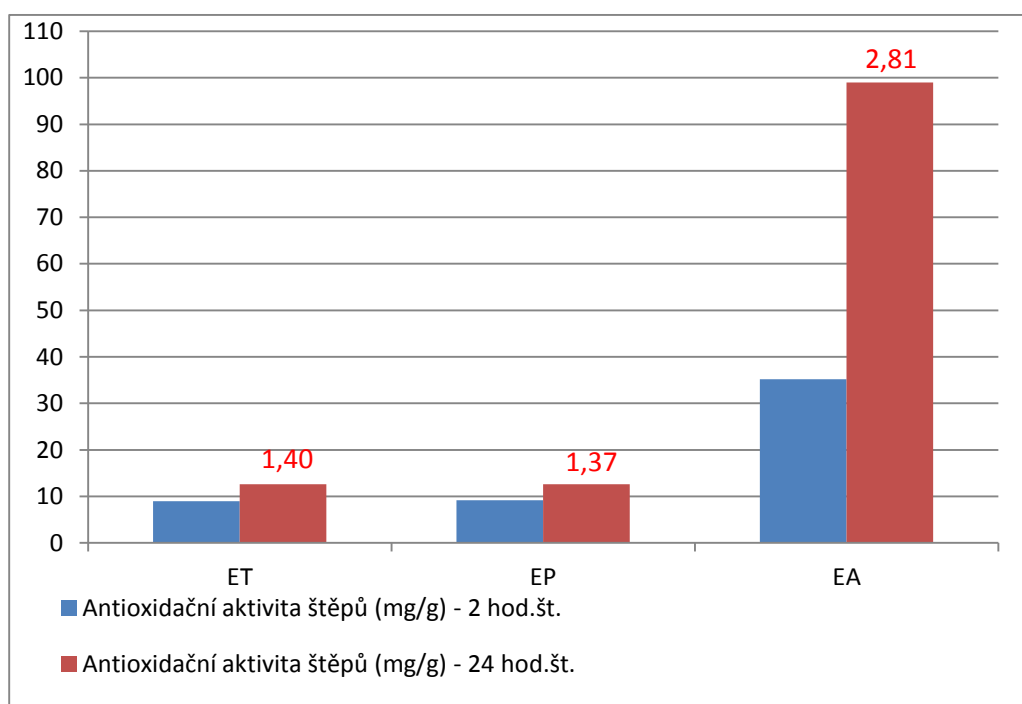


Pozn.: Červená čísla vyjadřují relativní nárůst antioxidační aktivity.

Graf č. 12: Celková antioxidační aktivita u štěpů proteinového izolátu vzniklého z hlízové vody odrůdy Ornella.



Graf č. 13: Celková antioxidační aktivita u štěpů proteinového izolátu vzniklého z průmyslové hlízové vody.



Byla stanovena antioxidační aktivita u štěpů získaných po enzymatické hydrolýze. Z grafů (11-13) vyplývá, že nejvyšší antioxidační aktivita byla dosažena u štěpů získaných štěpením pomocí enzymu alkalasa. Přičemž relativní nárůst vzrostl 2,81 krát více než u štěpů získaných časem štěpení 2 hodin. Obecně byla antioxidační aktivita vyšší u štěpů získaných časem štěpení 24 hodin. Antioxidační aktivita štěpů se v čase štěpení 24 hodin pohybovala v rozmezí 3,935 – 99 mg L- askorbové kyseliny na g štěpů. V čase štěpení 2 hodiny se antioxidační aktivita pohybovala v rozmezí 3,313 – 44,65 mg L - askorbové kyseliny na g štěpů. Štěpy kontrol pro dané enzymy dosahovaly také určitého potenciálu antioxidační aktivity. Avšak celkově byla nižší než u štěpů příslušných enzymů. Nejvyšší aktivita byla stanovena u štěpů získaných z izolátů z průmyslové hlízové vody a to 0,112 mg L- askorbové kyseliny na g štěpů.

5.5 Statistický vyhodnocení závislosti antioxidační aktivity na jednotlivých proměnných

Na hladině významnosti $p < 0,05$ byla statisticky prokázána závislost antioxidační aktivity štěpů na těchto proměnných – varianta (efekt enzymu, vliv pufrů), čas, varianta (efekt enzymů, vliv pufrů) x čas. Nejvyšší podíl na celkové variabilitě antioxidační aktivity vzniklé v rámci experimentu měl faktor varianta (efekt enzymu, vliv pufrů) a to 67,22%.

Tabulka č. 6: Hodnocení závislosti antioxidační aktivity štěpů na jednotlivých proměnných.

ANOVA						
Efekt	Suma čtverců	Stupeň volnosti	Průměr čtverců	Hodnota F	Hodnota p	% Variability
Absolutní člen	9657,23	1	9657,234	84,69831	0,000000	-
Odrůdový izolát	494,17	2	247,085	2,16705	0,129224	0,81
Varianta (efekt enzymu, vliv pufrů)	26941,32	5	5388,264	47,25751	0,000000	67,22
Čas	767,57	1	767,569	6,73193	0,013614	1,00
Odrůdový izolát x varianta (efekt enzymu, vliv pufrů)	1167,32	10	116,732	1,02380	0,443541	0,18
Odrůda x čas	254,81	2	127,407	1,11742	0,338203	0,19
Varianta (efekt enzymu, vliv pufrů) x čas	2678,34	5	535,668	4,69805	0,002101	11,70
Odrůda x varianta (efekt enzymu, vliv pufrů) x čas	1139,16	10	113,916	0,99910	0,462468	0,0
Chyba	4104,69	36	114,019	-	-	18,96

6. Diskuse

Nejúčinnější štěpení bylo prokázáno v čase štěpení 24 hodin, kdy podíl rozpustného izolátu se pohyboval v rozmezí 31,3 % - 74,8 %. Nejvyšší rozpustný podíl izolátu byl zjištěn u varianty štěpení enzymem alkalasa, a to 74,8 %. Množství rozpustného podílu izolátu u papainu a trypsinu bylo nižší než u alkalasy. Mohlo to být způsobeno například použitým množstvím proteinázy nebo nebyly vytvořeny optimální podmínky pro dané enzymy. Avšak z ekonomického a praktického hlediska by bylo výhodnější používat čas štěpení 2 hodiny.

Podle pokusu Wanga a Xionga (2005), enzymová hydrolýza představuje jeden z možných prostředků ke zvýšení rozpustnosti proteinu. Ve srovnání s inaktivní bramborovou bílkovinou, se u bramborového proteinového hydrolyzátu zvýšila jeho rozpustnost. Hydrolýza nejen, že zvyšuje rozpustnost bramborové bílkoviny, ale je předpokladem pro dosažení mnoha dalších funkčních aktivit v potravinářské sféře. Bylo prokázáno, že nedenaturovaný bramborový protein má potenciál působit jako emulgátor. Tepelné procedury bramborový protein denaturují a snižují jeho funkčnost. Enzymová hydrolýza vede ke zlepšení funkčnosti dříve denaturovaných bílkovin (Wang a Xiong, 2005). Podle Kudo *et al.*, (2009), se bílkoviny během enzymové hydrolýzy štěpí na menší molekuly, a to peptidy a volné aminokyseliny. Z tohoto důvodu se zlepšuje jejich stravitelnost.

Dle Pihlanto *et al.*, (2008), bramborové izoláty a vedlejší produkty z bramborového průmyslu jsou zdrojem bioaktivních sloučenin s inhibitory enzymu angiotensin - konvertázy (ACE - inhibitory) a zdrojem antioxidační aktivity. ACE – inhibitory hrají důležitou roli v regulaci krevního tlaku. Bioktivita bílkovinných hydrolyzátů pravděpodobně souvisí s peptidy anebo s volnými aminokyselinami, které se uvolňují během trávení.

Bylo prokázáno, že při enzymové hydrolýze dochází ke zvyšování antioxidační aktivity. To prokazují například pokusy Pihlanto *et al.*, (2008) nebo pokusy Wanga a Xionga (2005). S rostoucí koncentrací roste i antioxidační aktivita vzorku. Celkově antioxidační aktivita štěpů je tím vyšší, čím se zvyšuje rozpustný podíl izolátů.

Stanovená antioxidační aktivita u štěpů získaných po enzymatické hydrolýze byla v rozmezí 2,28 – 99 mg askorbové kyseliny na gram štěpů. Nejvyšší antioxidační aktivita byla u štěpů získaných štěpením pomocí enzymu alkalasa. Při použití enzymu alkalasa došlo k nejvyššímu nárůstu rozpustného podílu, což souvisí s nárůstem antioxidační aktivity. Antioxidační aktivita se u této varianty štěpení pohybovala v rozmezí 32,2 – 99 mg kyseliny askorbové na gram štěpů.

Obsah dusíkatých látek ($N \times 6,25$) ve vysrážených proteinech se pohyboval okolo 82 %. Podle údajů zjištěných v dostupné literatuře se obsah celkových dusíkatých látek v bramborové bílkovině pohybuje mezi 71 % - 75 %. Dolní uvedenou hranici 71 % uvádí Doležal (2004) a horní uvedenou hranici 75 % uvádí ve své publikaci např. Jeroch *et al.*, (2006). Získané výsledky byly tedy vyšší, to mohlo být způsobeno důkladným promýváním izolátu získaných po teplené koagulaci.

Závěr

Na základě výsledků, které byly získané v této bakalářské práci lze vyvodit tyto závěry:

- V čase štěpení 24 hodin bylo prokázáno nejúčinnější štěpení v rámci experimentu. Z pohledu praktického a ekonomického je však výhodnější použít čas štěpení 2 hodiny. Z použitých enzymů nejvyššího podílu rozpustnosti dosahovala alkalasa a to 74,8 %. U papainu rozpustný podíl činil 50,6 %, u enzymu trypsin 44,4 %.
- Statisticky vyhodnocená data prokázala závislost rozpustného podílu na proměnných typu – odrůdový izolát, čas, varianta (efekt enzymu, vliv pufrů), kdy variabilita tohoto faktoru dosahovala 89,4 %.
- Antioxidační aktivita u štěpů získaných po enzymatické hydrolýze se pohybovala v rozmezí 2,28 – 99 mg kyseliny askorbové na g štěpů. Nejvyšší antioxidační aktivita byla stanovena u varianty štěpení enzymem alkalasa. Dosahovala 99 mg kyseliny askorbové na g štěpů.
- Antioxidační aktivita štěpů byla tím vyšší, čím se zvyšoval rozpustný podíl izolátů.
- Statisticky vyhodnocená data prokázala závislost antioxidační aktivity na proměnných typu – varianta (efekt enzymu, vliv pufrů), čas a varianty (efekt enzymu, vliv pufrů) x čas. Nejvyšší podíl na celkové variabilitě antioxidační aktivity vzniklé v rámci experimentu měl faktor varianta (efekt enzymu, vliv pufrů) a to 67,22%.
- Nejvyšší obsah dusíkatých látek ve vysrážených proteinech byl zjištěn u odrůdy Ornella. Celkově se obsah dusíkatých látek pohyboval v rozmezí kolem 82 %.

Seznam zkratk:

SDS – PAGE – SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza

STA – *Solanum tuberosum* agglutinin

PFJ – potato fruit juice – průmyslová hlízová voda

ABTS - 2,2'-azinobis(3ethyl-2,3dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)

ACE – inhibitor – inhibitor enzymu angiotensin - konvertázy

Seznam použité literatury:

- 1) Bárta, J., Bártová, V. (2007): Bílkoviny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.), vědecká monografie, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, s. 116, ISBN- 978-80-7394-036-2.
- 2) Bárta, J., a kol. (2009): Využití analýzy bílkovin hlíz na automatické čipové elektroforese experion pro charakterizaci genotypů brambor, metodika pro praxi, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, s. 37, ISBN- 978-80-7394-159-8.
- 3) Bárta, J., Bártová, V., Kamenová, A., Brabcová, A. (2013): Hlízová voda. Odpad při zpracování brambor na škrob nebo zajímavá surovina?, Agromanuál, 8: 42-44.
- 4) Bárta, J., Čurn, V. (2004): Bílkoviny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.) – klasifikace, charakteristika, význam, Chemické listy, 98: 373-378.
- 5) Bárta, J., Heřmanová, V., Diviš, J. (2008): Effect of low- molecular additives on precipitation of potato fruit juice proteins under different temperature regres, Journal of Food Process Engineering, 31(4): 533-547.
- 6) Belitz, H. D., Grosch, W. (1986): Food Chemistry, Translation from the second German Edition by D. Hadziyev, Springer-Verlag-Berlin, s. 774 (120-121), ISBN – 3-540-15043-9
- 7) Brown, C. R., Wrolstadt, R., Durst, R., Yang, C. P., Clevidence, B. (2003): Am. J. Potato Res., 80: 241.
- 8) Doležal., P (2004): Výživa a nauka o krmivech (cvičení), MZLU v Brně, s. 292.

- 9) Duke, J. A. (1992): Handbook of Biologically Active Phytochemicals and Their Activities, FL. CRC Press, Boca Raton.
- 10) Elias, R. J., Kellerby, S. S., Decker, E. A. (2008): Antioxidant activity of proteins and peptides, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 48(5): 430-441.
- 11) Hanusová, L., Čurn, V. (2006): Inhibitory proteas v hlíze bramboru, Chemické listy, 101: 536-541 (2007).
- 12) Heinonen, M. I., Haila, K., Lampi, A. M., Piironen, V. (1997): Inhibition of oxidation in 10% oil-in water emulsions by beta – karotene with alpha- and gamma – tocopherols, J. Amer. Oil Chem. Soc., 74: 1047-1052.
- 13) Hruška, L., a kol. (1974): Brambory, Státní zemědělské nakladatelství, Praha, s. 416.
- 14) Jeroch H., Čermák B., Kroupová V. (2006): Základy výživy a krmení hospodářských zvířat: vědecká monografie, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, s. 212, ISBN – 80 – 7040-873-1..
- 15) Jůzl, M., Zrůst, J., Hlušek, J. (2008): Rizikové látky v bramboru (*Solanum tuberosum* L.) a ve výrobcích z hlíz, monografie, Brno: Mendelova Zemědělská a Lesnická univerzita v Brně, s. 139, ISBN – 97-807375-167-8.
- 16) Kalač, P. (2003): Funkční potraviny kroky ke zdraví, nakladatelství Dona, České Budějovice, s. 130, ISBN – 80-7322-029-6.
- 17) Koningsveld van, G. A., Gruppen, H., Jongh de, H. H. J., Boekel van, M. A. J. S., Walstra, P., Voragen, A. G. J. (2001): The solubility of potato proteins from industrial potato fruit juice as influenced by pH and various additives, J. Sci Food Agric, 82: 134-142.

- 18) Koningsveld van, G. A., Walstra, P., Voragen, A. G. J., Kuljpers, I. J., Boekel van, M. A. J. S., Gruppen, H. (2006): Effect of protein composition and enzymatic activity on formation and properties of potato protein stabilized emulsions, *J. Agric. Food Chemistry*, 54: 6419-6427.
- 19) Knorr, D., Kohler, G. O., Betschart, A. A. (1977): Potato protein concentrates. The influence of various methods of recovery upon yield, composition and functional characteristic, *Journal of Food Processing and Preservation*, 1(3): 235-247.
- 20) Kudo, K., Onodera, S., Takeda, Y., Benkeblia, N., Shiomi, N. (2009): Antioxidative activities of some peptides isolated from hydrolysed potato protein extract, *Journal of Functional Foods*, 1: 170-176.
- 21) Lachman, J., Hamouz, K., Orsák, M., Pivec, V. (2000): Potato tubers as a significant source of antioxidants in human nutrition, *Rostlinná Výroba*, 46 (5): 231-236.
- 22) Lachman, J., Hamouz, K., Orsák, M. (2005): Červeně a modře zbarvené brambory – významný zdroj antioxidantů v lidské výživě, *Chemické listy*, 99: 474 – 482.
- 23) Lachman, J., Hamouz, K., Čepl, J., Pivec, V., Šulc, M., Dvořák, P. (2006): Vliv vybraných faktorů na obsah polyfenolů a antioxidační aktivitu hlíz brambor, *Chem. Listy*, 100: 522-527.
- 24) Míča B. (1995): Neenergetické a senzory aktivní látky v hlízách brambor, *Výživa a Potraviny*, 50 (5): 130-131.
- 25) Míča, B., Vokál, B., Penk, J. (1991): Dusičnany v bramborách a možnosti snížení jejich obsahu, Praha, MZE ČR, s. 75, ISBN- 80-7084-039-0.

- 26) Minx, L., Diviš, J., a kol. (1994): Rostlinná výroba III (okopaniny), Praha, Agronomická fakulta VŠZ v Praze, s. 153, ISBN- 80-213-0154-6.
- 27) Packer, L., Witt, E. H., Tritschler, H. J. (1995): Alpha-lipoic acid a biological antioxidant, *Free Radic. Biol. Med.*, 19: 227-250.
- 28) Pihlanto, A., Akkanen, S., Korhonen, H. J. (2008): ACE – inhibitory and antioxidant properties, *Food Chemistry*, 109: 104-112.
- 29) Pots, A. M. (1999): Physico-chemical properties and thermal aggregation of patatin, the major potato tuber protein, PhD. Thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen, the Netherlands, s. 123.
- 30) Pouvreau, L., Gruppen, H., Piersma, S. R., Broek van den, L. A., Koningsveld van G. A., Voragen, A. G. J. (2001): Relative abundance and inhibitory distribution of protease inhibitors in potato juice from cv. Elkana, *J Agric Food Chem*, 49 (6): 2864-2874.
- 31) Prugar, J., a kol. (2008): Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s. ve spolupráci s Komisí jakosti rostlinných produktů ČAZV, Praha, s. 328 (241-257).
- 32) Rybáček, V., a kol. (1988): Brambory, Státní nakladatelství Praha, s. 358.
- 33) Šulc M., Lachman J., Hamouz K., Orsák M., Dvořák P., Horáčková V. (2007): Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidační aktivity fialových a modrých odrůd brambor, *Chemické listy* 101 (7): 584-591.
- 34) Vodrážka, Z. (2002): *Biochemie*, Praha: Academia, s. 191, ISBN – 80-200-0600-1.

- 35) Vodrážka, Z., Rauch, P., Káš, P. (1991): Enzymologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, s. 245, ISBN – 80-7080-124-7.
- 36) Wang, L. L., Xiong, Y. L. (2005): Inhibition of Lipid Oxidation in Cooked Beef Patties by Hydrolyzed Potato Protein is related to its reducing and radical scavenging ability, J. Agric. Food Chem., 56 (23): 9186-9192.
- 37) Waglay, A., Karboune, S., Alli, I. (2014): Potato protein isolates: Recovery and characterization of their properties, Food Chemistry, 143: 373-382.
- 38) Zrůst, J. (2004): Faktory ovlivňující obsah nutričně významných a škodlivých látek v hlízách a výrobcích z brambor, Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha, s. 84.
- 39) Zwijnenberg, H., Kemperman, A. J. B., Boerrigter, M. E., Lotz, M., Dijksterhuis, J. F., Poulsen, P. E., Koops, G-H. (2002): Native protein recovery from potato fruit juice by ultrafiltration, Desalination, 144: 331-334.

Internetové zdroje:

Anonym₁: Sigma – aldrich – chymotrypsin [online]. [cit. 15. 03. 2014]. Dostupné na: <<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/trypsin.html>>, staženo dne 15. 03. 2014.

Anonym₂: Sigma – aldrich – papain [online]. [cit. 15. 03. 2014]. Dostupné na: <<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/papain.html>>, staženo dne 15. 03. 2014.

Anonym₃: Sigma – aldrich – subtilisin [online]. [cit. 15. 03. 2014]. Dostupné na: <<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/subtilisin.html>>, staženo dne 15. 03. 2014.

Potravinářská komora (2009): Oborová příručka, Živnost: Výroba škrobárenských výrobků pro nepotravinářské účely [online]. [cit. 5. 04. 2014]. Dostupné na: <<http://www.foodnet.cz/soubor.php?id=15108&kontrola=d120487d7985d13c9983c49e2381e449>>, staženo dne 5. 04. 2014.

Přílohy

Příprava pufru pro štěpení:

Na – acetátový pufr (pH 7, 50 mM):

- Z 1 M Na- acetátového pufru byl připraven 50 mM Na – acetátový pufr.
- objem 15 ml 1 M Na – acetátového pufru byl napipetován do skleněného válce a dolit destilovanou vodou na objem 300 ml roztoku pufru.

Tris – HCl pufr (pH 7, 50 mM):

- Z 1 M Tris – HCl pufru o pH 7 byl připraven 50 mM Tris – HCl pufr.
- Objem 15 ml 1 M Tris – HCl pufru byl napipetován do skleněného válce a dolit destilovanou vodou na objem 300 ml roztoku pufru.

Tris – HCl pufr (pH 8, 50 mM):

- Z 1 M Tris – HCl pufru o pH 8 byl připraven 50 mM Tris – HCl pufr.

Objem 15 ml 1 M Tris- HCl pufru byl napipetován do skleněného válce a dolit destilovanou vodou na objem 300 ml roztoku pufru