

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Katedra: Speciální produkce rostlinné

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Enzymová hydrolýza bramborových proteinů a možnosti
frakcionace získaných peptidových fragmentů

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

Konzultant diplomové práce: Ing. Adéla Brabcová, Ph.D.

Autor diplomové práce: Bc. Klára Miková

České Budějovice, duben 2016

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta zemědělská

Akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Klára MIKOVÁ**
Osobní číslo: **Z14296**
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**
Název tématu: **Enzymová hydrolýza bramborových proteinů a možnosti frakcionace získaných peptidových fragmentů**
Zadávací katedra: **Katedra speciální produkce rostlinné**

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

Studium možností využití hydrolyzátů rostlinných proteinů (resp. jejich koncentrátů) má ve světě stoupající tendence a zahrnuje hlavně oblast potravinářskou (zejména díky zvýšené antioxidační aktivitě hydrolyzátů, zlepšení rozpustnosti a funkčních vlastností původních proteinových koncentrátů) a medicínskou (efekty hydrolyzátů resp. jejich peptidových fragmentů na kardiovaskulární systém, gastrointestinální oblast, nervový či imunitní systém). Většinou se jedná o využití hydrolyzátů jako celých směsí peptidů, v menší míře jde o jednotlivé peptidy. Jako proteinové zdroje jsou používány proteiny ze semen či zrn pšenice, sóji, řepky, slunečnice nebo ječmene (McCarthy et al., 2013).

Diplomová práce (DP) se bude zabývat enzymovou hydrolýzou koncentrátů (izolátů) proteinů získaných z hlíz bramboru. Použity budou zejména koncentráty získané z hlízové vody pomocí kombinace isoelektrické a tepelné koagulace. Enzymová hydrolýza bude provedena pomocí trypsinu a alkalasy za optimalizovaných podmínek. Následně získané peptidové fragmenty budou separovány pomocí elektroforetických nebo chromatografických technik (s využitím HPLC). Získané peptidové frakce budou analyzovány z hlediska jejich antioxidačních vlastností.

Dosažené výsledky budou zpracovány do podoby tabulek a grafů či obrázků a budou také 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. DP 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.

DP bude zpracována podle platného sdělení děkana pro vypracování bakalářských a diplomových prací (Opatření děkana ZF JU č. 4/2014, viz web ZFJU).

Rozsah grafických prací: 10 - 15 stran

Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

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.

Medzianka J., Meksa A., Pokora M., Rytel E., Tajner-Czopek A., Kita A. (2014): Improving the properties of foyer potato protein concentrate by enzymatic hydrolysis. Food Chemistry 159: 512-518.

McCarthy A. L., O'Callaghan Y. C., O'Brien N. M. (2013): Protein hydrolysates from agricultural crops - bioactivity and potential for functional food development. Agriculture 3: 112-130.

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 diplomové práce: **doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.**

Katedra speciální produkce rostlinné

Konzultant diplomové práce: **Ing. Adéla Brabcová**

Katedra speciální produkce rostlinné

Datum zadání diplomové práce: **9. března 2015**

Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2016**

prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studená 19
370 02 České Budějovice

L.S.

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

V Českých Budějovicích dne 9. března 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách. 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.

.....
Bc. Klára Miková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Janu Bártovi Ph.D. za cenné rady a odbornou pomoc. Dále bych chtěla také poděkovat Ing. Františkovi Lorencovi za hodiny práce strávené v laboratoři při experimentální části analýzy. Veliké díky posílám i rodině a přáteli.

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá enzymovou hydrolýzou proteinových koncentrátů a frakcionací získaných peptidových fragmentů. Využity byly proteinové koncentráty z odrůdy brambor Ornella a koncentrát získaný od švédské firmy Lyckeby Starch Avebe. Enzymová hydrolýza probíhala po dobu 24 hodin, využity byly proteolytické enzymy alkalasa a trypsin. U získaných hydrolyzátů se prokázal pozitivní vliv hydrolýzy na jejich rozpustnost a antioxidační aktivitu proteinu. Frakcionace peptidových hydrolyzátů byla založena na systému FPLC. Zachycené frakce obsahovaly peptidové fragmenty kolem 1,35 kDa nebo nižší molekulové hmotnosti. Antioxidační aktivita zachycených subfrakcí se stanovovala metodou DPPH. Nejvyšší hodnoty (2,2 a 2,6 TEAC g/kg) dosahovaly subfrakce získané po separaci hydrolyzátu z odrůdy Ornella štěpené enzymem alkalasa.

Klíčová slova: enzymová hydrolýza, proteinový koncentrát, proteolytické enzymy, FPLC

Abstract

The diploma thesis is focused on enzyme hydrolysis of potato protein concentrates and fractionation of obtained peptide fragments. Were used protein concentrate from tubers variety Ornella and protein concentrate obtained by swedish company Lyckeby Starch Avebe. The enzyme hydrolysis lasted 24 hours and were used the proteolytic enzyme alkalasa and trypsin. In this work were prove possitive effect of enzyme hydrolysis on solubility and antioxidative properties of potato protein isolates. The fractionation of obtained peptide hydrolysed was based on systém FPLC (Fast protein liquid chromatography). The fractions contained of peptide fragments about 1, 350 kDa or fragments of smaller molecular weight. The antioxidative activity of subfractions were determIne by method called DPPH. The highest values (2,2 and 2,6 TEAC g/kg) were accured at the subfractions which were separations from Ornella hydrolyzates digeste by enzyme alkalasa.

Key words: enzyme hydrolysis, potato protein concentrate, proteolytic enzyme, FPLC

Obsah

1. Úvod	9
2. Literární přehled	10
2.1. Proteinové hydrolyzáty	10
2.2. Hydrolýza proteinů	10
2.2.1. Úprava po hydrolýze	13
2.3. Rostlinné hydrolyzáty	14
2.3.1. Uplatnění některých rostlinných hydrolyzáků	15
2.4. Proteiny hlíz brambor	18
2.4.1. Nutriční hodnota proteinu	18
2.4.2. Funkční vlastnosti.....	19
2.4.3. Rozdělení hlízových proteinů.....	21
2.4.3.1. Patatinový komplex	22
2.4.3.1.1. Uplatnění patatinových proteinů	23
2.4.3.2. Inhibitory proteas.....	23
2.4.3.2.1. Možné využití inhibitorů proteas.....	25
2.4.3.3. Ostatní proteiny	26
2.5. Hlízové proteiny získané z hlízové vody	27
2.5.1. Izolace proteinů z hlízové vody.....	27
2.5.2. Uplatnění proteinových přípravků z PFJ	28
2.6. Prospěšné vlastnosti pro lidské zdraví	29
2.6.1. Bioaktivní peptidy	30
2.6.2. Antioxidační aktivita	30
2.7. Frakcionace hlízových proteinů	32
3. Cíl práce	34
4. Materiál a metodika	35
4.1. Příprava hlízové šťávy	35
4.2. Příprava proteinového koncentrátu	35
4.3. Enzymová hydrolýza	36
4.3.1. Příprava vzorků	36
4.3.2. Průběh enzymové hydrolýzy	37
4.4. Frakcionace peptidových fragmentů.....	38
4.4.1. SDS – PAGE (Tris - Tricinová elektroforéza)	38

4.4.2. Systém FPLC	39
4.5. Stanovení antioxidační aktivity.....	40
4.6. Měření koncentrace proteinů metodou BCA	41
4.7. Statistická vyhodnocení dat	42
5. Výsledky	43
5.1. Enzymová hydrolýza	43
5.2. Stanovení antioxidační aktivity hydrolyzátů	46
5.3. Frakcionace peptidových fragmentů metodou SDS – PAGE.....	50
5.4. Frakcionace peptidových fragmentů systémem FPLC	51
5.5. Antioxidační aktivita zachycených peptidových frakcí	54
5.6. Stanovení koncentrace proteinů zachycených subfrakcí	57
6. Diskuze	58
7. Závěr.....	61
Seznam použité literatury.....	62
Přílohová část	72

1. Úvod

Hlízové proteiny brambor zaujímají specifické postavení mezi rostlinnými proteiny pro svou vysokou nutriční hodnotu, složení aminokyselin, specifické biologické aktivity jednotlivých složek a v neposlední řadě pro možnosti využití jejich emulgačních a pěnivých schopností. Hlízový protein představuje heterogenní skupinu bílkovin, přičemž nejdůležitější složky jsou patatin a inhibitory proteas. Patatinový komplex plní funkci zásobní, má vysokou nutriční hodnotu, optimální zastoupení aminokyselin. Dále vykazuje zajímavé enzymatické aktivity a disponuje řadou vlastností, jako jsou emulgační schopnosti a tvorba pěn. Ty se mohou uplatňovat v potravinářství a v biotechnologii. Skupina inhibitorů proteáz tvoří heterogenní skupinu proteinů, která se vyznačuje inhibiční aktivitou vůči řadě proteáz. Jejich uplatnění je především využití v lékařství díky možným dietetickým a protirakovinovým účinkům. Například použití přípravku PI-2 jako doplňků stravy způsobuje nárůst hladiny cholecystokininu (CCK) a tím dochází k redukci příjmu potravy.

Hlízové bílkoviny se převážně izolují z hlízové vody, která vzniká jako vedlejší produkt při výrobě škrobu. Izolace těchto proteinů, aniž by došlo k ovlivnění jejich funkčních vlastností je náročné. Průmyslově se tyto bílkoviny většinou izolují pomocí tepelné koagulace při teplotě vyšší než 80 °C v kombinaci se snížením pH. Při tepelné koagulaci, ale dochází k denaturaci přítomných proteinů. Tím se snižují funkční vlastnosti bílkovin a omezuje se jejich využití v potravinářské sféře. Funkční vlastnosti jsou hlavním kritériem, které určuje využitelnost proteinů. Hlízové bílkoviny jsou řazeny mezi zdroje obsahující bioaktivní peptidy. Ty jsou prospěšné pro zdraví člověka. Dále hlízové bílkoviny vykazují antioxidační aktivitu.

2. Literární přehled

2. 1. Proteinové hydrolyzáty

Proteinové hydrolyzáty Schaafsma (2009), definoval jako směsi polypeptidů, oligopeptidů a aminokyselin. Tyto směsi se získávají částečnou hydrolýzou z bílkovinných zdrojů. Pro přípravu proteinových hydrolyzátů se využívají tradiční zdroje proteinů – mléko, maso, vejce, hrách, sója, rýže, aj (Schaafsma, 2009). Využívají se především hydrolyzáty jako celé směsi peptidů, v menší míře se využívají i jednotlivé peptidy. V posledních dvou desetiletích se o tyto hydrolyzáty zvýšil zájem. S objevením nových biopeptidů se prokázalo, že peptidy s krátkým řetězcem z hydrolyzovaných proteinů mají vysokou nutriční hodnotu (McCarthy *et al.*, 2013). Proteinové hydrolyzáty mají největší využití ve výživě lidí. Tvoří složky energetických nápojů a nutričních výrobků určených pro sportovce. Dále se staly zdrojem živin pro starší osoby a pacienty se sníženou imunitou. Podle způsobu výroby je lze rozdělit na dvě hlavní skupiny (Molín, Pánek, Miyahara, 2016).

- 1) Kyselé hydrolyzáty (součástí HVP - Hydrolysed Vegetable Proteins)
- 2) Enzymové hydrolyzáty

2. 2. Hydrolýza proteinů

Hydrolýza proteinů zahrnuje štěpení peptidových vazeb za vzniku peptidů různých velikostí a různého složení aminokyselin (McCarthy *et al.*, 2013). Proteinové hydrolyzáty mohou být produkovány kyselým, zásaditým, enzymatickým či jiným typem hydrolýzy dle Schaafsma, 2009. Při porovnání enzymatické a chemické hydrolýzy, vykazuje chemická hydrolýza několik nevýhod. Obtížná je její kontrola. Dále při ní dochází ke snižování výživové kvality produktů a k produkci toxických látek. Při enzymatické hydrolýze zůstávají nutriční vlastnosti hydrolyzátů neovlivněny, pokud se vyvarujeme extrémním teplotám a hodnotám pH (McCarthy, 2013).

V potravinářském průmyslu se hydrolyzáty vyrábí enzymatickým typem hydrolýzy. Využívají se proteolytické trávicí enzymy či potravinářské enzymy (Schaafsma,

2009). Příkladem proteolytických enzymů jsou enzymy živočišného původu – chymotrypsin, trypsin a pepsin.

- Chymotrypsin (3.4.21.1) – je produkován v buňkách slinivky břišní ve formě chymotrypsinogenu → aktivován po proteolýze chymotrypsinogenu trypsinem. Optimální pH je 7,8 (Vodrážka *et al.*, 1991).
- Trypsin (3.4.21.4) – Je serinová proteáza, která byla objevena jako první proteolytický enzym. Nachází se v pankreatické šťávě obratlovců. Při hydrolýze proteinů za použití tohoto enzymu vznikají velké peptidové fragmenty (Vodrážka *et al.*, 1991). Štěpí proteiny za bazickými aminokyselinami lysinem a argininem, které zanechává na C - konci vzniklých peptidů. Specifita štěpení je mimořádně vysoká a nedochází k ní pouze v případě, že tyto aminokyseliny sousedí s prolinem (Walmsley *et al.*, 2013). Optimální pH je v rozmezí 7-9 (Vodrážka *et al.*, 1991). Štěpení trypsinem se obvykle provádí přes noc. Během této doby může dojít k tvorbě nežádoucích modifikací peptidů (Walmsley *et al.*, 2013).
- Pepsin (3.4.23.1) – patří mezi karboxylové proteázy. Izoluje se z vepřové nebo hovězí žaludeční mukosy. Optimální pH je kolem 2 (pH 2-4 pro syntetické substráty (Vodrážka *et al.*, 1991).

Skupina potravinářských enzymů zahrnuje například enzymy rostlinného nebo mikrobiálního původu. Vodrážka *et al.*, (1991) uvádí, že praktický význam z rostlinných proteáz mají papain, ficin a bromelain.

Proteázy rostlinného původu

- Bromelain – získává se z ananasové šťávy, nebo ze zbytků (stonků) po výrobě ananasových kompotů.
- Ficin – preparáty ficinu jsou analogicky sušeným latexem z různých rostlin rodu *Ficus*. Používají se především ke stabilizaci piva,

k získávání stříbra z použitých filmů a k hydrolýze různých bílkovin (Vodrážka *et al.*, 1991).

- Papain (3.4.22.2) – Enzym, patřící do skupiny cysteinových proteáz. Katalyzuje štěpení peptidových vazeb základních aminokyselin, jako jsou leucin a glycin. Nejčastěji se využívá papainový preparát ve formě sušeného latexu získaného z nezralých papajovníkových plodů (Vodrážka *et al.*, 1991).

Proteázy mikrobiálního původu

Do této skupiny řadíme bakteriální a plísňové proteázy. Bakteriální proteázy se dále dělí na neutrální a alkalické proteázy, které se získávají z bakterie rodu *Bacillus*. Optimální pH pro neutrální proteázy je 5-8, pro alkalické proteázy je pH optimum v rozmezí 6-12. Nejběžněji využívaným enzymem je subtilisin neboli alkalasa. Plísňové proteázy lze rozdělit na kyselé, neutrální a alkalické. Patří sem plísně z rodu *Penicilium* a *Asperigillus* (Vodrážka *et al.*, 1991).

- Subtilisin neboli alkalasa (3.4.21.62) – enzym patřící do skupiny serinových endoproteáz. Získává se z bakterie *Bacillus licheniformis* fermentací. Tento enzym se vyznačuje vysokou substrátovou specifitou a může hydrolyzovat většinu peptidových vazeb, které se nachází uvnitř molekuly proteinu. Hydrolyzuje nativní i denaturované proteiny. Optimální pH je v rozmezí 6,5 – 8,5. Aktivita enzymu je v alkalickém prostředí. Peptidy štěpí při teplotě 60 °C (Sigma Aldrich, 2016).

Při hydrolýze specifickými proteolytickými enzymy a po jejich následné frakcionaci lze izolovat frakce se specifickými nutričními vlastnostmi. Frakce lze rozdělit do dvou kategorií:

- 1) Proteinové frakce s relativně vysokým obsahem specifických aminokyselin (Schaafsma, 2009). Do této skupiny lze například zařadit peptidy glutaminů a peptidy cystein/glycin a tryptofanu (Garlick, 2001).

Využití těchto frakcí je především v klinické, sportovní výživě (Schaafsma, 2009).

- 2) Bioaktivní peptidy ze specifickými sekvencemi aminokyselin. Tyto bioaktivní peptidy v nedotčené molekule bílkovin jsou neaktivní. Aktivní se stanou v hydrolyzátu po jejich expozici trávicími a/nebo proteolytickými enzymy (McCarthy *et al.*, 2013). Jedná se převážně o hydrofobní peptidy, které obecně obsahují 3 – 20 aminokyselin (Schaafsma, 2009). Zdrojem největšího počtu bioaktivních peptidů jsou mléčné produkty. K ostatním zdrojům řadíme maso, ryby, vejce a rostlinné zdroje (například sója a pšenice).

2. 2. 1. Úprava po hydrolýze

Vzniklý hrubý/surový hydrolyzáat lze dále zpracovávat. Schaafsma (2009) popsal procesy, které se po hydrolýze běžně používají. Jsou to postupy jako je tepelná inaktivace, ultrafiltrace, hydrolýza exoproteázami a úprava specifickými enzymy. Pomocí ultrafiltrace lze odstranit vysokomolekulární proteiny a peptidy. Takto upravené bílkovinné hydrolyzáty mají uplatnění jako složky potravy. Využití exoproteáz je v odstranění hořkosti hydrolyzáatů. Hořkost způsobuje obsah hydrofobních aminokyselin. V tabulce číslo 1 jsou zaznamenány hlavní procesy a jejich funkce, které následují po hydrolýze bílkovin.

Tabulka č. 1: Hlavní procesy používané po hydrolýze bílkovin (dle McCarthy *et al.*, 2013).

Proces	Funkce
Tepelná inaktivace	Inaktivace proteolytických enzymů
Ultrafiltrace	Odstranění proteinů a peptidů s vysokou molekulovou hmotností
Použití specifických enzymů	Snížení obsahu určitých aminokyselin
Hydrolýza exoproteázami	Hydrolýza, redukce (snížení) hořkosti
Absorpční chromatografie	Snížení obsahu aromatických aminokyselin

2. 3. Rostlinné hydrolyzáty

Rostlinné proteiny, získané z různého spektra rostlin, se převážně využívají jako složky lidské potravy (Bacon *et al.*, 1990). A to z důvodu jejich funkčních vlastností, nebo proto, aby zlepšily nutriční a zdravotní vlastnosti potravinářského výrobku. Proteinové přísady jsou k dispozici ve formě izolátů (> 90 % bílkovin), koncentrátů (30 až 80 % proteinu) a hydrolyzátů (Patterson, 2008). Rostlinné proteiny se staly náhražkami mléčných a živočišných proteinů v řadě potravinářských výrobků (Bacon *et al.*, 1990). V potravinářství se hydrolyzáty uplatňují buď to jako produkty hotové nebo jako meziprodukty pro výrobu dalších odvozených aromat (Molín, Pánek a Miyahara, 2016).

V současné době se hydrolyzáty vyrobené v potravinářském průmyslu mohou rozdělit do tří skupin.

- 1) Hydrolyzáty s nízkým stupněm hydrolyzy (nižší než 10 %), které se používají pro zlepšení funkčních vlastností jako je rozpustnost, emulgační síla, pění. Tyto hydrolyzáty se využívají při zpracování těsta pro výrobu chleba, pečiva a přidávají se do majonéz, zmrzlin aj (Pedroche *et al.*, 2003).
- 2) Hydrolyzáty s různým stupněm hydrolyzy. Stupeň hydrolyzy je obvykle vysoký. Přidávají se do polévek, omáček, masných výrobků a do polotovarů. Vylepšují jejich chuť (Pedroche *et al.*, 2003).
- 3) Hydrolyzáty s vysokým stupněm hydrolyzy. Stupeň hydrolyzy je vyšší než 10 %. Využívají se jako složky nutričních doplňků a při zdravotních dietách (Clemente *et al.*, 1999). Patří mezi ně hydrolyzáty, jejichž cílem je zlepšení nutričních vlastností bílkovin. Mezi jejich hlavní vlastností patří vysoká rozpustnost a optimální střevní absorpce těchto hydrolyzátů (Pedroche *et al.*, 2003). Používají se i pro léčbu specifických syndromů jako je fenylketonurie, tyrosinémie a jaterní encefalopatie. Enzymovou hydrolyzou se z těchto proteinů získávají biologicky aktivní peptidy.

2. 3. 1. Uplatnění některých rostlinných hydrolyzátů

Sójová bílkovina

Sója jako potravina rostlinného původu neobsahuje cholesterol na rozdíl od bílkovin živočišného původu. Sójový protein obsahuje vysoký podíl esenciálních bílkovin s příznivým poměrem vhodným pro lidskou výživu (Lahola *et al.*, 1990). Bylo prokázáno, že sójová bílkovina snižuje cholesterol u lidí, kteří mají zvýšenou hladinu cholesterolu (Kunová, 2004).

Rostlinné přísady, které jsou založeny na bázi sóji, mají mnoho různých funkcí a vyznačují se obsahem proteinů srovnatelným s masem, díky čemuž mohou posloužit k vylepšení textury a chuti koncentrovaného výrobku a k rozšíření funkce masných bílkovin. Sójové preparáty se podílejí na absorpci vody, emulgačních vlastnostech, schopnosti tvořit nadýchanou strukturu, tepelné stálosti a zvýšení celkového obsahu proteinů.. Funkční vlastnosti, které se týkají interakce mezi vodou a sójovou bílkovinou, závisí na strukturních a agregačních vlastnostech hlavních složek sójového preparátu, které mohou být modifikovány při výrobě, tepelném a chemickém zpracování nebo při sušení. Hydratační vlastnosti a viskozita roztoku sójového proteinu jsou dány množstvím a vlastnostmi nerozpustné frakce (Boutten *et al.*, 1999; Vaňha *et al.*, 2002).

Největší využití sójových proteinů nalzáme v pekárenském a potravinářském průmyslu v kombinaci s jinými látkami jako je mléčná syrovátka, která má nahradit NFDM (odtučněné sušené mléko). Pekaři využívají tyto směsi především z ekonomického hlediska (Enders *et al.*, 2001).

Nejkvalitnějšími sójovými preparáty jsou izoláty, které obsahují až 90 % proteinu. Dále se vyrábí sójové koncentráty, které obsahují 70 % proteinu a přes 20 % vlákniny. Sójové koncentráty jsou připravovány z loupaných odtučněných bobů. Z nich se odstraní většina ve vodě rozpustných složek, které nejsou bílkovinného původu (Enders *et al.*, 2001).

Vyrábějí se i tzv. texturované sójové koncentráty, které jsou zpracovány na základě tradičního koncentrátu nebo kyselou extrakcí koncentrátu. Zpracování se provádí v jedno - nebo dvoušroubovém extruderu. Účelem extrakčního procesu je, aby struktury, jako jsou vlákna a kusy, mohly být použity jako potravinářská složka.

Texturovaná sójová mouka a koncentráty této složky jsou široce používány v kombinaci s masem. Proteinové texturované výrobky jsou vyráběny v různých tvarech, velikostech a barvách. Tyto produkty mohou mít aroma podobné masu (Enders *et al.*, 2001).

Přidávání sójového koncentrátu do masných výrobků

K dosažení vysokého standardu kvality konečného masného výrobku je do zpracovávané suroviny přidáván koncentrát, který obsahuje sójový protein. Tato vysoce účinná složka zajišťuje stabilitu masných výrobků a udržuje přítomnost vody a tukové emulze, což pomáhá udržovat optimální výsledky hodnocení těchto potravin. Stabilita emulze závisí na poměru sójového koncentrátu, vody a živočišného tuku (Hvízdalová, 2008).

Proteinové preparáty z luštěnin

Proteinové preparáty získané z luštěnin se především využívají jako přísady, které se přidávají do emulzních nápojů, nutričních tyčinek, mastných produktů, aj. Ve srovnání se sójovým proteinem, tyto izoláty mají dobrou emulgační schopnost, mírnější pěnotvornost a mírně nižší schopnost stabilizovat emulze. Avšak tyto vlastnosti lze zlepšit například enzymovou hydrolýzou nebo chemickou modifikací (Pettersen *et al.*, 2010). Hrachová semena obsahují vysoce stravitelné proteiny, které jsou srovnatelné s jinými běžně používanými luštěninami. Kromě vysoké nutriční hodnoty, odvozené proteiny z hrachových semen také slouží jako zdroj peptidů majících široké spektrum biologicky aktivních vlastností. Bylo prokázáno, že tyto peptidy vykazují antioxidační, antihypertenzní a imunomodulační aktivitu (Stanisavljevič *et al.*, 2015). Po rozemletí lusků hrachu lze získat pomocí mokré nebo suché cesty produkty s rozdílným obsahem například škrobu, bílkovin. Lze vyrábět izoláty a koncentráty se speciálními vlastnostmi podle požadavků (například izoláty s různým poměrem nutričních složek). Hrachová mouka, která obsahuje kolem 30 % proteinu, se přidává do pekařských a mastných výrobků a do těstovin (Pettersen *et al.*, 2010).

Řepkové proteinové izoláty

Řepka *spp* je bohatá na obsah proteinu a po extrakci oleje je dobrým zdrojem proteinu pro lidské účely. Vedlejší produkt, který vzniká po extrakci, obsahuje přibližně 30 – 45 % proteinů. Kromě toho, také obsahuje vyvážené složení aminokyselin, které je vhodné pro lidskou výživu. Lze odlišit dvě hlavní proteinové skupiny (rodiny), které vykazují a určují výživné a funkční vlastnosti celkových proteinů zralého řepkového semene. Na 12S globulinu se nachází proteinová skupina, která nese název cruciferin – velikost 300 kDa. Na 2S albuminu je lokalizována rodina pod názvem napin – napinová skupina s velikostí přibližně 14 kDa (Chabanon *et al.*, 2007). Napinová rodina proteinů tvoří asi 20 % z celkového obsahu proteinů zralého semene. Tyto proteiny jsou exprimovány během jeho vývoje semene jako prekurzory, které společně procházejí regulací a posttranslační modifikací. Poté jsou transportovány do membránových organel (Gehrig *et al.*, 1996). Cruciferin a napin mají vysoké pěnicí schopnosti a jsou schopni dobře stabilizovat pěnu, na druhou stranu vykazují špatné nebo mírné emulgační aktivity (Chabanon *et al.*, 2007). Řepkové proteinové izoláty mohou být použity jako složky potravin, ale jejich využití je často omezeno nízkou rozpustností, špatnými funkčními vlastnostmi. Během průmyslové extrakce oleje, proteiny obsažené v semeni denaturují a tím se snižuje jejich rozpustnost (Vioque *et al.*, 2000).

V různých studiích se zjistilo, že z řepkových proteinů hydrolyzou enzymem alkalasa, lze získat peptidové inhibitory HIV-proteázy. Schopnost získaných peptidů je však omezená, protože peptidy mají sníženou aktivitu pronikat do buněčných struktur (Kvasničková, 2004).

HVP (Hydrolysed Vegetable Proteins)

Jde o tzv. hydrolyzáty rostlinných proteinů. Jsou součástí kořenících přípravků, tvoří jejich základ. V potravinářském průmyslu se používají zejména pro zlepšení chuti a aroma polévek, omáček, salátů, masových a zeleninových pokrmů a hotových pokrmů. Pro výrobu kyselých hydrolyzátů se používají tyto suroviny: odtučněný sójový šrot, pšeničný lepek a kukuřičná mouka. Všechny suroviny obsahují 50 %

proteinového podílu, dále balastní látky, menší množství využitelných sacharidů a zbytkový tuk (Molín, Pánek, Miyahara, 2016).

2. 4. Proteiny hlíz brambor

Hlízové proteiny brambor zaujímají specifické postavení mezi rostlinnými proteiny pro svou vysokou nutriční hodnotu, složení aminokyselin, specifické biologické aktivity jednotlivých složek a v neposlední řadě pro možnosti využití jejich emulgačních a pěnivých schopností. Ve srovnání s jinými rostlinnými proteiny jsou bramborové proteiny považovány za kvalitnější, protože obsahují vysoký podíl lysinu (Waglay *et al.*, 2014). Výhodou hlízových proteinů ve srovnání s jinými proteiny je také nižší výskyt alergií. Jiné běžně využívané proteiny v potravinářském průmyslu jako je vaječná bílkovina, sója, ryby a ořechové proteiny jsou spojovány s alergickými reakcemi u přibližně 1 – 2 % lidské populace (Fu *et al.*, 2002). Při alergických testech, které se prováděly u 800 dětí, se ukázalo, že pouze 5 % vykazuje alergickou reakci na brambory. Při konzumaci vajec a kravského mléka hodnota alergické reakce byla 15% a 9% (Kärenlampi and White, 2009). Bramborové přípravky používané jako potravinové doplňky musí splňovat určité požadavky, které se týkají jejich chemického složení, výživové hodnoty a funkčních vlastností. Funkční vlastnosti jsou hlavním kritériem, které určuje využitelnost proteinů pocházejících z různých zdrojů.

2. 4. 1. Nutriční hodnota proteinu

Proteiny hlíz patří k nejkvalitnějším rostlinným zdrojům. Nutriční hodnota je určována podílem esenciálních aminokyselin. Jejich nedostatek limituje průběh proteosyntézy u konzumenta (Bárta a Bártová, 2007). Z nutričního pohledu je kvalita proteinu závislá na jejich stravitelnosti a aminokyselinové skladbě. Jako limitující jsou uváděny sirné aminokyseliny – zejména methionin. Dále se jako limitující uvádí izoleucin. Význam má i vysoký obsah lysinu (Bárta a Čurn, 2004). Bramborový protein má vyšší nutriční hodnotu než hovězí či tuňákové maso z hlediska udržování dusíkaté bilance u dospělých lidí. Její nutriční kvalitu převyšuje pouze vaječná bílkovina (Bárta a Bártová, 2007).

2. 4. 2. Funkční vlastnosti

Funkční vlastnosti, které proteiny vykazují, jsou velice důležité při jejich využití v potravinářské sféře. Hlízové proteiny jsou zajímavé z hlediska jejich pěnicích a emulgačních vlastností. Dále jsou schopny vytvářet gely a mají dobrou rozpustnost a schopnost zadržovat vodu a tuk (Koningsveld *et al.*, 2002,2006). Funkční vlastnosti lze ovlivňovat jak vnitřními tak i vnějšími faktory. Mezi vnitřní faktory řadíme tvar, velikost, složení a sekvence aminokyselin, sekundární, terciární a kvarterní struktura proteinů i schopnost integrovat s jinými komponenty. Vnější faktory, které mají vliv na funkčnost: pH, teplota, vlhkost, chemické zpracování, enzymy a iontová síla (Damodaran a Paraf, 1997).

Rozpustnost

Rozpustnost je parametr, který je snadno měřitelný v jednotlivých roztocích proteinů. Nicméně obtížné je měření ve směsích proteinů, protože různé proteiny vykazují jinou rozpustnost. Bramborové proteiny jsou tvořeny mnoha bílkovinami, proto je obtížné posoudit jejich rozpustnost. Rozpustnost je ovlivněna různými komponentami, které jsou přítomné v roztoku. Včetně tepelných procedur, dialýzy, kovových solí a organických rozpouštědel (Koningsveld *et al.*, 2001). Rozpustnost lze popsat jako existenci rovnováhy mezi hydrofobními a hydrofilními interakcemi.

Emulgační schopnost

Smith a Culbertson (2000) definují emulze jako směsi alespoň dvou nemísitelných kapalin, z nichž jedna je rozptýlena ve druhé ve formě kapiček. Ke stabilizaci emulzí je často prospěšné přidat amfifilní, povrchově aktivní látku jako je protein. Proteiny obsahují jak hydrofobní, tak i hydrofilní složky díky jejich složení aminokyselin. Přidáním proteinů do emulzí dochází k tomu, že se budou orientovat na rozhraní příslušné molekuly na základě jejich polarity. Tato orientace umožní stabilizaci emulze tím, že dojde ke snížení mezifázového napětí mezi dvěma nemísitelnými kapalinami (Smith a Culbertson, 2000). Koningsveld *et al.*, (2006) ve svém pokusu u vzorků hlízových proteinů stanovoval schopnost tvořit emulze a stabilizovat je za

různých podmínek. Vzorky proteinů pocházely z PFJ (potato fruit juice) získané z odrůdy brambor Elkana. Vzorky byly připraveny pomocí různých extrakčních technik, čímž se získaly unikátní vzorky proteinů (hlízový bílkovinný izolát, patatin, patatin vysrážený ethanolem, inhibitor proteas). Emulze byly vytvořeny v neutrálním prostředí. Zjistilo se, že emulze, které obsahují patatin, nevykazují hromadění/seskupení kapiček za podmínek mikroskopování. Zatímco ostatní vzorky proteinů ukázaly hromadění/seskupení kapiček a tím nestabilitu emulze.

Pěnicí vlastnosti

Phillps *et al.*, (1990), definoval pěnu jako dvoufázový systém, v němž je plynná fáze ve formě bublinek obklopena kontinuálně lamelami fáze kapaliné. Proteiny, které se často přidávají do pěny, přispívají k jejich stabilizaci. Při studiu pěnicích vlastností daného proteinu je důležité prozkoumat schopnost jejich pění, ale i schopnost tvořit pěny a změřit stabilitu vytvořené pěny. Tyto parametry se vyhodnotí měřením objemu pěny a změřením množství vypařené kapaliny během času. Koningsveld *et al.*, (2002), zkoumal schopnost hlízových bílkovin tvořit a stabilizovat pěnu. Pěny byly vytvořené metodou probublávání a šlehání. Technika probublávání je více žádoucí pro vysoce strukturované proteiny, protože umožňuje tuhým proteinům strávit více času na rozhraní, což vede k uvolnění bublin v důsledku vztlaku síly. Technika šlehání začíná šleháním, které způsobí rychlost a kolísání tlaku. V důsledku vzájemné interakce bublin mezi sebou dojde ke změně povrchového napětí a mezifázové plochy v průběhu času. Jakmile je rychlost šlehání vysoká vytvoří se pěna díky vysokému povrchovému napětí, to umožní bublinám splývat. Přídavek proteinů umožní delší optimální proces šlehání pěny. To je výhodné, protože delší doba pozitivně koreluje s objemem pěny. Nicméně proteiny mohou během šlehání denaturovat až agregovat, to vede ke snížení objemu pěny. Hlavním problémem při stabilizaci vytvořené pěny je přítomnost hydrofobních molekul. Z důvodu jejich vzájemné interakce dochází k jejich splývání a k roztažení bublin přítomných v pění. Dalším problémem je, že velikost těchto molekul je větší než velikost bublin. To zapříčiňuje zvýšení rozkladu pěny. Nestabilitu vytvořené pěny způsobuje i drenáž, která je výsledkem gravitační síly působící na kapalinu v pění. Avšak v přítomnosti proteinů je tento jev výrazně snížen v důsledku vytvoření stagnující vrstvy. Pěnicí

vlastnosti vykazuje patatinový komplex (viz kapitola uplatnění patatinového komplexu).

2. 4. 3. Rozdělení hlízových proteinů

Rybáček a kolektiv (1989) uvádějí, že bílkovina brambor není chemicky homogenní složkou. V minulosti byla klasifikována podle rozpustnosti – na frakci albuminovou, globulinovou, prolaminovou a glutelinovou (Bárta a Čurn, 2004). Podle Rybáčka a kol. (1989) je protein tvořen ze 70 % globulinem a z 30 % albuminem. Globulinovou frakce byla označována jako tuberin a frakce albuminová jako tuberinin. V roce 1960 Linder *et al.*, (1960) rozdělil hlízový protein na albuminy, globuliny a zbytek. V současné době, nejvíce používaná je klasifikace podle jejich molekulové hmotnosti. Tato klasifikace vznikla s rozvojem elektroforetických a chromatografických technik (Bárta a Čurn, 2004). Na základě molekulové hmotnosti lze hlízové proteiny klasifikovat do tří základních skupin (Pots 1999).

- 1) Patatin – do této skupiny řadíme patatinové komplexy či rodiny patatinových bílkovin. Molekulová hmotnost se udává kolem 43 kDa (Bárta a Bártová, 2007).
- 2) Bramborové inhibitory proteas (Bárta a Čurn, 2004). Představují soubor proteinů s širokou heterogenitou. Molekulová hmotnost je v rozmezí 4 – 25 kDa (Bártová *et al.*, 2009).

→ Tyto skupiny představují přes dvě třetiny obsahu proteinů v hlízách. Většina izoform patatinových bílkovin a inhibitorů proteáz má enzymatickou a inhibiční aktivitu, která může představovat fyziologický význam (Mäkinen, 2014).

- 3) Ostatní proteiny – sem řadíme hlavně proteiny s enzymovou účastí na syntéze škrobu, hlízový lektin (Bárta a Čurn, 2004). Tato skupina zahrnuje proteiny s vysokou molekulovou hmotností (Bárta a Bártová, 2007).

Friedman (1996), uvádí, že obsah bílkovin v hlízách brambor je kolem 3%. Nicméně, jejich nutriční hodnota je vysoká a v sušině je jejich obsah stanoven na hodnotu 10 %, což je na stejné úrovni jako obsah bílkovin u většiny obilovin (Friedman, 1996).

2. 4. 3. 1. Patatin

Představuje skupinu glykoproteinů s molekulovou hmotností monomerů v rozsahu 39 – 43 kDa (Prugar a kolektiv, 2008). Rozdílnou molekulovou hmotnost způsobuje glykosylace s kombinací s mutacemi v primární sekvenci řetězce (Bárta a Bártová, 2008). Patatin (patatinový komplex) se považuje za hlavní zásobní proteiny hlíz, ale vykazuje také aktivitu více enzymů, hlavně nespecifické lipid – acyl – hydrolázy (LAH) pro různé substráty (Prugar a kolektiv, 2008). Poprvé byly izolovány v roce 1980 (Racusen a Foote, 1980) pomocí iontovýměnné a afinitní chromatografie. Patatin neboli patatinový komplex zaujímá 40 % rozpustných proteinů v bramborových hlízách (Racusen a Weller, 1984), uvádí se i vyšší podíl až 60 % (Bárta a Bártová, 2007). Patatin je lokalizován v centrálních vakuolách parenchymatických buněk hlíz. V listech, stoncích a kořenech se vyskytuje pouze ve stopových množstvích (Bárta a Bártová, 2007). Obsah patatinu závisí především na vývoji hlízy, době skladování, kultivaru odrůdy a na agro – ekologických podmínkách (Hannapel, 1991).

Struktura

Nativní forma patatinu je považována za dimer, jehož přibližná molekulární hmotnost je 88 kDa (Racusen a Weller, 1984). Bárta a Čurn (2004), uvádějí, že se skládá z 336 aminokyselin. Jejichž konce (pozitivní i negativní) jsou rozmístěné po celé sekvenci náhodně. Nativní patatin má cylindrický tvar. Sekundární struktura může být α – helikální i β řetězec. Terciální strukturu lze z hlediska nativních vlastností zničit při teplotě 55 – 75 °C a hodnotě pH menší než 5 (Bárta a Bártová 2007, Koningsveld *et al.*, 2001). Existuje až 15 imunologicky identických glykoproteinových isoformů patatinu, ty lze rozdělit do čtyř skupin: A (zaujímá 62 %), B (26 %), C (5 %) a D (7 %) (Bárta a Bártová, 2007). Příčinou existence těchto imunologicky identických isoformů patatinového komplexu je odlišná míra glykosylace a možné bodové mutace v primární struktuře bílkovin (změna v sekvenci aminokyselin) (Bárta a Čurn, 2004).

Z hlediska genové exprese existují dvě třídy genů kódujících patatinové bílkoviny (Bárta a Bártová, 2008). Multigenová rodina třídy I je exprimována výhradně v

hlízách (v 50-100krát vyšších hladinách), zatímco multigenová rodina třídy II je exprimována v nízkých hladinách v celé rostlině (Bárta a Bártová, 2007).

2. 4. 3. 1. 1. Uplatnění patatinových proteinů

Hlízové proteiny brambor, ale především bílkoviny patatinového komplexu disponují řadou vlastností, jež mohou být velmi cenné při využití v krmivářském, potravinářském, farmaceutickém či kosmetickém průmyslu (Bárta a Bártová, 2007). Nabízí se možnost uplatnění patatinového komplexu v potravinářství, zejména při produkci instantních polévek, omáček, sušených výrobků z brambor. Tím by se měly vylepšit výživné hodnoty potravin a došlo by k zvýraznění jejich chuti, aj. Další uplatnění je jako surovina pro tvorbu potravinářsky stabilních pěn a emulzí (Koningsveld *et al.*, 2002). Pěny jsou přítomny v řadě koloidních systémů produkovaných potravinářským a kosmetickým průmyslem. Proteiny jsou často používány jako jejich stabilizační prvek. Pěnové schopnosti nedenaturovaných hlízových proteinů a jejich jednotlivých složek, zejména pak patatinových bílkovin, byly porovnány v práci Ralet a Guéguen (2000) s komerčně dostupným vaječným koncentrátem, který je považován za referenční vzorek s vynikajícími pěnovými vlastnostmi (Bárta a Bártová, 2007, Baniel *et al.*, 1997). Pěnová schopnost patatinové frakce byly vysoké a dosahovaly úrovně vaječného bílku. V několika variantách pokusu byly dokonce pěnové schopnosti vaječného bílku a stabilita produkované pěny překonány (Bárta a Bártová, 2007). Nabízí se také využití enzymové aktivity patatinového komplexu. Například využití LAH aktivity (lipolytické aktivity) patatinu pro tvorbu emulsi a pro syntézu speciálních monoacylglycerolů, které by mohly mít uplatnění v potravinářském či jiném průmyslu. Patatinový komplex také řadíme k proteinům, které vykazují antioxidační aktivitu.

2. 4. 3. 2. Inhibitory proteas (PI's)

Inhibitory proteas tvoří asi 30 % z celkového rozpustného proteinu hlízy. Vytváří více heterogenní skupinu proteinů ve srovnání s patatinem. Mezi sebou se liší molekulovou hmotností, aminokyselinovým složením a inhibiční aktivitou. Úloha proteas je hlavně kontrola proteolýzy, která je klíčový proces všech žijících

organismů (Hanusová a Čurn, 2006). V rostlinném těle se mohou vyskytovat v různých částech, například v hlízách a semenech, ale také v nadzemních orgánech. V zásobních orgánech, zejména hlízách inhibitory proteas působí spíše jako zásobní proteiny, v nadzemních částech, především v listech hrají roli v ochraně před mikrobiálními patogeny a hmyzími škůdci (Bárta a Čurn, 2004).

Klasifikace inhibitorů proteas

Obecně inhibitory proteas lze rozdělit nejčastěji podle aminokyselinového zbytku v aktivním místě (Bártová *et al.*, 2012). Podle tohoto kritéria rozlišujeme 4 hlavní skupiny:

- 1) Serinové inhibitory proteas (serin či histidin v aktivním místě)
- 2) Cysteinové inhibitory proteas (cystein v aktivním místě)
- 3) Aspartátové inhibitory proteas (aspartát v aktivním místě)
- 4) Metalloproteázové inhibitory (kovové ionty v aktivním místě) (Bárta a Bártová, 2007).

Další klasifikace inhibitorů proteas je dělení podle jejich molekulové hmotnosti, stavby molekuly, hodnoty isoelektrického bodu a počtu sulfidických můstků v molekule (Bártová *et al.*, 2012). V tabulce číslo 2, je uvedeno rozdělení inhibitorů proteas do sedmi tříd podle jejich specifických vlastností.

Tabulka č. 2: Rozdělení bramborových inhibitoru proteas podle jejich specifických vlastností (převzato a upraveno dle Bártová *et al.*, 2012,Pouvreau *et al.*, 2001).

Skupina	Molekulová hmotnost (kDa)	pI	Klasifikace	Inhibované enzymy
Bramborový inhibitor proteas I (PI-1)	7,7-7,9	pH 5,5-7,8	Serinový inhibitor	Trypsin, Chymotrypsin
Bramborový inhibitor proteas II (PI-2)	10,2	pH 5,5-6,9	Serinový inhibitor	Trypsin, Chymotrypsin
Bramborový cysteinový inhibitor proteas (PCPI)	20,1-22,8	pH 5,8-9,0	Cysteinový inhibitor	Papain, trypsin, chymotrypsin
Bramborový aspartátový inhibitor proteas	19,9-22,0	pH 6,2-8,7	Aspartátový inhibitor	Cathepsin D, trypsin, chymotrypsin
Bramborový inhibitor Kunitzova typu	20,2	pH 8,0-9,0	Séřinový inhibitor	Trypsin, Chymotrypsin
Ostatní séřinové inhibitory	21,0-21,8	pH 7,5-8,8	Séřinový inhibitor	Trypsin, Chymotrypsin
Bramborový karboxypeptidásový inhibitor proteas	4,3	pH	Metalloproteasový inhibitor	Karboxypeptidáza A

2. 4. 3. 2. 1. Možné využití inhibitorů proteas

Inhibitory proteas vykazují řadu vlastností, které je řadí mezi tzv. multifunkční proteiny. V poslední době se zvětšil zájem o jejich využití v lékařství, díky

vlastnostem, které vykazují. Hanusová a Čurn (2006) uvádějí, využití proteas v léčbě obezity a jejich protirakovinné účinky.

Z pohledu medicínského jsou inhibitory proteas skupina protirakovinových činidel. Byly studovány účinky PI-1, PI-2, které se aplikovaly do epidermálních buněk myši. V pokusu se ukázala schopnost těchto inhibitorů eliminovat aktivátor proteinu AP-1, který působí jako transkripční faktor vzniku rakoviny kůže (Huang, *et al.*, 1997). Dalším důležitým inhibitorem je karboxypeptidáza (PCI), která je jediným přirozeným antagonistou lidského epidermálního růstového faktoru (EGF). EGR (a jeho receptor EGFR) tvoří součást některých aspektů vývoje nádorů, včetně růstu nádorových buněk a tvorby metastáz. Pokud se PCI naváže na receptor EGFR je inhibovaná jeho aktivace – příčinou tohoto jevu je pravděpodobně disulfidická smyčka tzv. T – knot (Hanusová a Čurn, 2007). Další využití inhibitorů proteas je v léčbě obezity. Použití přípravků s obsahem PI-2 jako doplňků stravy způsobuje nárůst hladiny CCK a tím dochází k redukci příjmu potravy. Peptid CCK neboli cholecystokinin hraje klíčovou roli v mechanismu nasycení tím, že stimuluje kontrakce žlučníku a vylučování trypsinogenu ze slinivky. Trypsinogen ovlivňuje uvolňování cholecystokininu. Vysoká hladina CCK způsobuje redukci příjmu potravy. Hlavním efektem podávání cholecystokininu před jídlem je dřívější nástup pocitu nasycení (Hanusová a Čurn, 2007).

2. 4. 3. 3. Ostatní proteiny

Do této skupiny jsou řazeny proteiny, které nelze přiřadit k bílkovinám patatinového komplexu, nebo jde o proteiny, které nemají schopnost inhibovat proteasy (Bárta a Bártová, 2007). Tato skupina tvoří přibližně jednu třetinu všech hlízových proteinů (Bauw *et al.*, 2006). Skupina zahrnuje bílkoviny s vysokou molekulovou hmotností (Bárta a Bártová, 2007). Do této skupiny nejčastěji zařazujeme lektin, polyfenoloxidasu, protein kinasu a enzymy, které se účastní na syntéze škrobu a fosforylové izoenzymy. Molekulová hmotnost ostatních proteinů se pohybuje v rozmezí 49 kDa až 600 kDa (fosforylasa) (Koninsveld *et al.*, 2001). Lektiny jsou proteiny s molekulovou hmotností větší než 40 kDa. Je to důležitá skupina proteinů. Lektiny se například zapojují do obranného mechanismu rostlin tím, že indukují shlukování (aglutinaci) buněk

2. 5. Hlízové proteiny získané z hlízové vody

Nabízí se také uplatnění proteinů z hlíz brambor získaných z hlízové vody, která vzniká jako vedlejší produkt při výrobě škrobu. Zastoupení bílkovin ve vstupní surovině (škrobu) bylo doposud vnímáno spíše negativně, neboť proteiny přecházejí do vedlejších produktů a způsobují problémy při konečné likvidaci tohoto odpadního materiálu (Bárta a Bártová, 2007). Likvidace hlízové vody (neboli PFJ) je nákladné vzhledem k jejím znečišťujícím účinkům. Z fytochemického hlediska je hlízová voda bohatá na obsah proteinů, minerálních látek a volných aminokyselin (Waglay *et al.*, 2014). Obdobně jako bílkoviny hlíz, lze rozdělit bílkovinný komplex, který je obsažen v PFJ na proteiny patatinové, inhibitory proteas a ostatní proteiny (Bárta a Bártová, 2007). Obsah jednotlivých složek v sušině PFJ se může měnit v závislosti na zpracovávaných odrůdách a na pěstitelských podmínkách, aj. Patatinový komplex tvoří přibližně 38 % všech bílkovin, inhibitory proteáz zaujímají 45 % a ostatní proteiny 16% (Bárta *et al.*, 2013). Hlízová voda obsahuje asi 1,5 % ve vodě rozpustných proteinů (Lomolini *et al.*, 2015).

2. 5. 1. Izolace proteinu z hlízové vody

Izolace proteinu z hlízové vody, aniž by došlo k ovlivnění jejich funkčních vlastností je náročné. Průmyslově se většinou z hlízové vody izolují pomocí tepelné koagulace (při teplotě vyšší než 80 °C) v kombinaci se snížením pH. Při tepelné koagulaci dochází k denaturaci přítomných proteinů. Denaturace snižuje jejich rozpustnost a tím se omezuje využití těchto proteinů v potravinářské sféře. Wang a Xiong (2005), ve svých pokusech prokázali, že enzymová hydrolýza zvyšuje rozpustnost proteinu. Nejen, že zvyšuje rozpustnost proteinu, ale je předpokladem pro dosažení mnoha dalších funkčních aktivit v potravinářské sféře. Mnoho firem škrobárenského průmyslu takto získává proteinové přípravky, které jsou charakterizovány vysokým obsahem celkového proteinu, nízkým obsahem popela (Miedzianka *et al.*, 2012). Na druhou stranu se snižuje jejich rozpustnost a schopnost absorpce vody a oleje, což omezuje jejich využití jako složky potravin v lidské výživě. Takto získané proteinové přípravky jsou převážně použity jako složky krmiv, která slouží jako potrava pro zvířata (Peksa a Miedzianka, 2014). Dále se získaná hlízová voda používá jako závlaha (hnojivo). V České republice se hlízová voda využívá jako dusíkato-draselné

organické hnojivo. Toto hnojivo se aplikuje na pole, které se nachází blízko škrobárenského provozu. Tento způsob uplatnění je často problematický, protože dochází k zatěžování stejných pozemků, závislosti na počasí a také k zápachu, který obtěžuje okolní prostředí. Cenný nutriční a biochemický potenciál tak zůstává nevyužit. Avšak pohled českých škrobárenských firem se postupně mění (Bárta *et al.*, 2006).

2. 5. 2. Uplatnění proteinových přípravků z PFJ

Uplatnění jako krmivo pro hospodářské zvířata

Ve vyspělejších státech Evropy se vyzolované proteiny z hlízové vody využívají jako krmiva pro zvířata. Hlízová bílkovina se přímo vyrábí ve škrobárnách nebo ve firmách určených pro její produkci. Například Francouzská firma Tereos Syral vyrábí izolát Protimex, který obsahuje minimálně 83,5 % proteinu v suchém stavu. Tento izolát se používá jako startovací krmivo pro kuřata. Podáván je těsně po jejich vylíhnutí, kdy potřebují vysoce stravitelné proteiny a energii potřebnou ke stimulaci střevního vývoje (Tereos Syral, 2016). Z dalších francouzských firem lze uvést společnost Roquette, která vyrábí izolát nazývaný Tubermine. Tyto izoláty obsahují vysoký podíl proteinu (78 %) a vysoce stravitelné esenciální aminokyseliny (lysin, methionin, threonin, aj.). Využívají se jako složky krmiva pro sající telata a selata (Roquette, 2016).

V České republice existuje také firma, která využívá proteiny jako krmivo pro zvířata. Jedná se o společnost Satur Plus, která koncentrát dováží od Německé firmy. Koncentrát obsahuje vysoký stupeň proteinu, který je využíván jako složka v krmivech pro veškerá hospodářská zvířata. Zejména se vyrábí krmné směsi pro selata, prasata i prasnice ve výkrmu, drůbež a petfood (Saturn Plus, 2016).

Uplatnění v potravinářském průmyslu

Holandská firma Avebe a její dceřiná společnost Solanic produkují řadu proteinových preparátů získaných z hlízové vody. Tyto preparáty se vyznačují dobrými funkčními a chemickými vlastnostmi (Miedzianka *et al.*, 2012). Společnost

vyvinula patentovou techniku pro výrobu proteinu jako alternativy k živočišným bílkovinám. Produkty, které vyrábějí (Suková, 2008):

- **Promish 204P** – přípravek, který je vhodný k použití do výrobků z masa (párků, paštik aj.) a ryb. Přidává se v množství 0,5-0,7 % jako náhražka kaseinátů.
- **Patissionate 401P** – je určen k přípravě pusinek. Přidává se v množství 4 % do výrobků. Měl by nahradit vejce a zdvojnásobit objem pusinek.
- **Beverisch 303L** – přidává se do nápojů pro sportovce a do tzv. energetických nápojů v množství 1 %.
- **Satic-factor** – proteinový preparát lze přidávat do nejrůznějších potravin či nápojů. Určený je pro potlačení pocitu hladu (Suková, 2008).

2. 6. Prospěšné vlastnosti pro lidské zdraví

Lachman *et al.*, (2000) zařazuje brambory k tzv. fytopotravinám, z důvodu toho, že obsahují určité typy antioxidantů. Bramborové hlízy obsahují převážně sekundární metabolity – polyfenolické sloučeniny. K dalším antioxidantům, které jsou přítomné v hlíze lze zařadit kyselinu L – askorbovou, karotenoidy a antykyanová barviva. V dosavadních studiích byla také zjištěna antioxidační aktivita peptidů a proteinů, které se získávají z hlíz brambor. Brambory obsahují také bioaktivní peptidy, které jsou prospěšné pro zdraví člověka. Bramborové peptidy vykazují antihypertenzní aktivitu, která napomáhá snížení krevního tlaku.

2. 6. 1. Bioaktivní peptidy

Bioaktivní peptidy jsou obsaženy jak v rostlinných, tak i v živočišných složkách potravy. K nejvýznamnějším zdrojům patří mléčná bílkovina, maso a rostlinné hydrolyzáty (cizrna, soja, pšenice aj.) (Pihlanto, Akkanen, Korhonen, 2007). Mezi rostlinné zdroje řadíme také proteinové hydrolyzáty získané z hlíz brambor. Jsou to zejména hydrofobní peptidy, které obvykle obsahují 3 – 20 aminokyselin. Pro jejich

činnost jsou rozhodující fragmenty, které se vyskytují na jejich C nebo N – konci (Schaafsma, 2009). Vyskytují se v potravinách jako takové nebo vznikají hydrolýzou bílkovin při výrobě bílkovin. Rovněž mohou vznikat také během hydrolýzy bílkovin trávicími enzymy. Další možnosti vzniku bioaktivních peptidů je řízená hydrolýza proteinu (Kvasničková, 2003). Bioaktivní peptidy, které jsou tvořené pouze několika aminokyselinami, jsou schopné procházet skrz bariéru epitelu v trávicím traktu do krvinek. Takto se tyto peptidy dostávají do různých orgánů, kde se projevují jejich prospěšné účinky na organismus (Kvasničková, 2003).

Existuje široká škála bioaktivních peptidů. Mezi nejdůležitější řadíme peptidy s antihypertenzní aktivitou (Pihlanto, Akkanen, Korhonen, 2008). Tato aktivita spočívá v inhibici enzymu konvertujícího angiotenzin (ACE). ACE inhibitor hydrolyzuje dekaeptid angiotenzin I na oktapeptid angiotenzin II, což je silná vazokonstrikční látka. Dále se hydrolyzuje peptid bradykynin, což je silný vazodilatátor. Výsledkem všech těchto účinků je snížení krevního tlaku (Kvasničková, 2003). ACE inhibitory jsou obecně peptidy s krátkými řetězci, které často nesou zbytky polárních aminokyselin jako je například prolin (Hartmann a Miesel, 2007). Například Pihlanto *et al.*, (2008) ve svém pokusu popisuje možnost zvýšení aktivity ACE inhibitorů v izolovaných proteinech z hlíz brambor pomocí hydrolýzy za použití enzymu alkalasa. Vzorke před hydrolýzou vykazovaly nízkou aktivitu. Hydrolýza po dobu dvou hodin zvýšila aktivitu ACE inhibitorů.

2. 6. 2. Antioxidační aktivita proteinů

Reaktivní formy kyslíku (ROS) a volné radikály hrají důležitou roli v mnoha onemocnění jako je rakovina, ateroskleróza a diabetes (Beckman a Ames, 1998). Tvorba volných radikálů (například superoxidovaného aniontu, hydroxylového radikálu) je důsledkem dýchání aerobního mikroorganismu. Tyto volné radikály jsou nestabilní a rychle reagují s jinými skupinami látek, které jsou přítomné v těle, to vede k poranění tkání či buněk. Tělo má svůj obranný systém proti ROS, nicméně tento mechanismus není dostatečně účinný, aby zabránil zcela poškození. Proto doplňky stravy, které obsahují antioxidanty, by mohly být použity jako pomoc lidskému tělu snížit oxidační poškození. V různých studiích byla popsána antioxidační aktivita proteinů a peptidů, získaných z rostlinných a živočišných

zdrojů, zabraňovat peroxidaci lipidů a mastných kyselin nebo jejich schopnost zabraňovat aktivitě volných radikálů. Mezi zdroje těchto peptidů a proteinů lze zařadit sóju, ječmen, mléko a brambory (Pihlanto *et al.*, 2008).

Wang a Xiong (2005) studovaly antioxidační schopnost hydrolyzovaných bramborových proteinových frakcí ve vařených hovězích karbanátích pomocí antioxidačních testů založených na reaktivních substancích TBARS (thiobarbiturová kyselina) a peroxidu. Došli k závěru, že použité bramborové proteiny vykazují značnou redukční sílu, která může být způsobena peptidovým štěpením. To vede ke vzniku produktů, které mají vyšší dostupnost vodíkových iontů. Tyto vodíkové ionty jsou schopné převádět a stabilizovat volné radikály ve větším rozsahu ve srovnání s delšími proteiny. V literatuře se také uvádí souvislost aminokyselinového složení s antioxidační aktivitou proteinu. Například aminokyseliny methionin, histidin a lysin, které jsou přítomné v bramborových proteinech inhibují oxidaci lipidů. Tyto aminokyseliny mohou zlepšovat oxidační stabilitu, jak se ukázalo v použitých hovězích karbanátích.

Lie *et al.*, (2003) studoval antioxidační aktivitu purifikovaného patatinu. Antiradikálová aktivita byla zkoumána pomocí DPPH (1,1 – difenyl-2-picrylhydrazyl) testu. Jako kontrola byl použit redukovaný glutathion a antioxidant hydroxytoluen (BHT). Ukázalo se, že při zmenšení částic na nanomolární vykazuje purifikovaný patatin podobnou antioxidační odpověď jako antioxidant BHT a lepší antioxidační aktivitu než redukovaný glutathion. Stejná studie také ukazuje schopnost patatinu snižovat peroxidaci lipoproteinu (LDL). To je důležité, protože LDL je spojen s rozvojem aterosklerózy u lidí (Lie *et al.*, 2003).

2. 7. Frakcionace hlízových proteinů

K separaci peptidů se běžně využívají metody elektromigrační a metody chromatografické. Elektroforetické metody jsou založeny na elektroforetickém pohybu ionizujících částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Pohyblivost částic závisí na velikosti náboje, velikosti a tvaru molekuly, koncentraci aj. (Váňková, 1999). Využívá se například kapilární zónová elektroforéza a gelová elektroforéza. Dělení proteinů, při využití kapilární zónové elektroforézy, probíhá ve velmi tenkých kapilárách, které rychle odvádějí teplo, proto mohou být použita elektrická pole s vysokým napětím. Při využití gelové elektroforézy tvoří gely přechod mezi pevným a kapalným stavem. Vytváří se trojrozměrná síť, kdy póry slouží jako molekulové síto. Proteiny se separují póry dle jejich velikosti. Gelovou elektroforézu rozdělujeme na dva hlavní typy: Nativní elektroforéza (nedenaturační) ta probíhá bez přítomnosti denaturačního činidla. Proteiny migrují gelem podle svého celkového náboje, velikosti a tvaru. SDS-gelová elektroforéza – k separaci peptidů dochází na základě jejich rozdílné relativní molekulové hmotnosti. Proteiny jsou nejprve denaturovány dodecylsíránem sodným (SDS) a β – merkaptoethanolem, který zruší disulfidické vazby. Hydrofobní konec molekuly SDS silně interaguje s proteinovým řetězcem. Počet molekul SDS, které se váží na protein je úměrný délce proteinu. Každá molekula SDS přispívá negativním nábojem a překrývá případně náboj proteinu. To dovoluje separovat vzorek pouze podle molekulové hmotnosti (velikosti), nikoli podle náboje, protože konečný náboj proteinu po asociaci s SDS je vždy negativní a úměrný velikosti (Pazourek, 2003)

Chromatografické metody jsou založené na principu dělení a distribuci látek mezi dvěma fázemi. Pohyblivá část se nazývá mobilní a je tvořena kapalinou či plynem. Nepohyblivá část se označuje stacionární (sorbent) a může mít rozdílnou formu (Křížek a Šíma, 2015). Při chromatografii dochází k přesunu látek do fáze stacionární a zpět do fáze mobilní. Každá molekula přejde mnohokrát z mobilní fáze do sorbentu a zpět, přičemž doba, po níž separovaná látka setrvá v koloně, závisí na četnosti a síle interakcí a určuje pořadí, v němž složka opouští kolonu. Čím větší jsou tyto interakce ve stacionární fázi, tím vyšší je hodnota elučního času. Jedním z hlavních dělení chromatografických metod je podle skupenství fází, a to na plynovou a kapalinovou chromatografii (Drbal a Křížek, 1999). Plynová chromatografie pracuje nejčastěji v systému plyn-kapalina, ale i v systému plyn-

pevná látka. Kapalinová chromatografie pracuje v systému kapalina-kapalina nebo pevná látka-kapalina (Káš *et al.*, 2005). Podrobnější rozdělení chrom. metod je založeno na interakci separační látky se stacionární fází. Z tohoto důvodu lze rozlišit chromatografii afinitní, rozdělovací, iontové výměnou, adsorbční. aj. K separaci proteinů a peptidů se nejčastěji využívají tzv. moderní systémy kapalinové chromatografie. Jde například o HPLC a FPLC.

- HPLC neboli vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vyvinula se z plynové chromatografie na počátku 70. let. Pro separaci využívá kapalinovou mobilní fázi. Jedná o sloupcový neboli kolonový typ chromatografie. Stacionární fáze vyskytující se na stěnách kolony obsahuje malé částice nepravidelného tvaru a jednotné velikosti. Systém HPLC využívá vysokých tlaku pro průchod mobilní fáze kolonou, protože stacionární fázi tvoří těsně vázané malé částice, které při působení nízkých tlaku mobilní fáze hůře adsorbují (Štulík a kol., 2005).

- FPLC neboli vysokorychlostní kapalinová chromatografie

Tato metoda vykazuje vysokou rozlišovací schopnost. Oproti HPLC se jedná o střednětlakou metodu, která využívá tlaky maximálně do 5 MPa. Z tohoto hlediska je citlivější než HPLC. Pomocí injekční stříkačky nebo peristaltického pumpovače jsou vzorky vpraveny do nasávací smyčky. Poté je vzorek se smyčky přenesen do kolony, kde dochází k interakci se stacionární fází. U této metody lze využívat různé typy kolon.

3. Cíl diplomové práce

Cílem diplomové práce byla separace peptidových fragmentů, které byly vytvořené enzymovou hydrolýzou proteinových izolátů. Získané peptidové frakce byly analyzovány z hlediska jejich antioxidačních vlastností. Konkrétně práce probíhala podle následujících dílčích kroků:

- Příprava hlízové šťávy z odrůdy brambor Ornella.
- Laboratorně připravit pomocí tepelné koagulace proteinový koncentrát z hlízové šťávy získané z hlíz brambor odrůdy Ornella.
- Enzymová hydrolýza získaných proteinových izolátů enzymem alkalasa a trypsin za optimalizovaných podmínek a ověření zda došlo ke zlepšení rozpustnosti a k nárůstu antioxidační aktivity u peptidových fragmentů.
- Separace peptidových fragmentů pomocí SDS – PAGE a FPLC.
- Stanovení antioxidační aktivity a koncentrace proteinů vyseparovaných peptidových subfrakcí.
- Statistické hodnocení dat.

4. Materiál a metody

Výchozím materiálem pro výzkum byla zvolena odrůda brambor Ornella, která se používá k výrobě škrobu a smažených výrobků a již připravený proteinový koncentrát získaný od švédské firmy Lyckeby Starch AB (dále označován jako Lyckeby).

4. 1. Příprava hlízové šťávy

Získané hlízy z odrůdy Ornella byly omyty a zbaveny všech nečistot. Po jejich omytí a usušení následovalo odšťavnění za pomoci odšťavňovače CATLER JE 4010. Získaná šťáva byla přelita do chlazené kádinky a byl k ní přidán 1 % konzervant siřičitan sodný (3,5 g disiřičitanu sodného + 5 g siřičitanu sodného bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody), aby nedocházelo k ztmavnutí hlízové šťávy.

Odstranění škrobu z hlízové šťávy

Hlízová šťáva byla rozdělena do 4 nádob a centrifugovaná po dobu 30 minut při 4500 otáčkách (Centrifuga Rotina 420 R). Po centrifugaci proběhla filtrace a usazený škrob byl vylit. Následovalo přelití hlízové šťávy do plastové láhve a její uchování v mrazáku do dalšího použití.

4. 2. Příprava proteinu

Před vlastní tepelnou koagulací proběhla úprava pH hlízové šťávy pomocí pH metru. Hodnota byla upravena přidávkou 0,5 M H₂SO₄ na hodnotu pH 5. Získaný objem byl rozdělen do Fisherových tub o známé hmotnosti. Došlo k zahřátí objemu ve Fisherových tubách ve vodní lázni na teplotu 80 °C (reálná teplota hlízové šťávy) po dobu 10 minut. Následně se provedla centrifugace získaného roztoku po dobu 10 minut při 4500 otáčkách. Vzniklé supernatanty se slily do plastových dóz, které se zamrazily na teplotu – 20 °C. K získaným peletům (vzorky) se přidalo 10 ml deionizované vody a opatrně se rozmíchaly pomocí skleněné tyčinky. Takto připravené směsi byly opět zcentrifugované po dobu 10 minut při 4500 otáčkách.

Vzniklý supernatant byl odstraněn. Pelety byly zamrazeny v mrazicím boxu na teplotu $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a poté zlyofilizovány do doby, dokud nebyly zcela vysušeny – získá proteinového koncentráty z odrůdy Ornella.

Homogenizace vzorku

Homogenizace vzorku byla provedena prostřednictvím planetárního typu mlýnku Pulverisette 6 od firmy FRITSCH. Tento mlýnek umožňuje rychlé a velmi jemné mletí materiálu. Mlecí prvky (miska a kuličky) byly vyrobeny z materiálu achát. Homogenizace probíhala při 500 otáčkách po dobu 2 x 2 minut. Byla provedena homogenizace proteinových koncentrátů z odrůdy Ornella i Lyckeby. Následně byly jednotlivé proteinové koncentráty rozděleny do dvou plastových dóz, které se řádně uzavřely a vložily do ledničky pro další použití.

4. 3. Enzymová hydrolýza

Enzymové štěpení probíhalo po dobu 24 hodin, použity a využity byly proteolytické enzymy alkalasa (subtilisin) a trypsinu. Použité enzymy pocházely od firmy Sigma – Aldrich. Enzym trypsin (katalogové číslo bylo T4799), dodaný v práškové formě bylo nutné před hydrolýzou nejprve rozpustit. Pro účely analýzy bylo naváženo 300 mg prášku. Ten byl nejprve rozpuštěn v 10 ml 1 mM HCl a poté v 50 ml TRIS – HCl pufru (o pH 8). Hydrolýza trypsinem probíhala při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Jako pufr byl použit TRIS – HCl pufr o hodnotě pH 8. Katalogové číslo použité alkalasy bylo P4860. Enzym alkalasu nebylo nutné rozpouštět. Podmínky štěpení byly teplota $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, využití TRIS – HCl pufru o hodnotě 7.

4. 3. 1. Příprava vzorku pro hydrolýzu

K analýze byly použity již připravené proteinové koncentráty získané z hlíz brambor odrůdy Ornella a Lyckeby. Od každého výchozího proteinu bylo naváženo 99 – 101 mg do Fisherových tub o známé hmotnosti. Vytvořeny byly následující varianty štěpení. Pro jednotlivé proteiny byly vždy vytvořeny dvě sady štěpení (štěpení

enzymem alkalasa a trypsin) po několika opakování. U enzymu alkalasa bylo ke každému izolátu proteinu přidáno 10 ml příslušného pufru (TRIS - HCl – pH 7) a 50 µl enzymu alkalasy. U varianty štěpení enzymem trypsin se ke každému izolátu proteinů přidalo 9 ml příslušného pufru (TRIS-HCl – pH 8) a 1 ml enzymu trypsin. Jako kontrola pro zjištění účinnosti štěpení určitým enzymem, se ke každému vybranému proteinu přidalo 10 ml příslušného pufru

4. 3. 2. Průběh enzymové hydrolýzy

Před vlastním štěpením byly nejprve připraveny 1 M zásobní roztoky pufru o objemu 100 ml, ze kterých se připravily jednotlivé pufrы o koncentraci 50 mM. Pro enzym alkalasa byl připraven zásobní roztok pufru TRIS – HCl o pH 7. Pro enzym trypsin byl připraven zásobní roztok pufru TRIS – HCl o pH 8. Jednotlivé složení pufrů je uvedeno v přílohové části diplomové práce. Připravené tuby byly umístěny ve vodní lázni, kdy pro varianty s enzymem alkalasa byla teplota vodní lázně nastavena na teplotu 60 °C, pro varianty s enzymem trypsin byla teplota nastavena na 37 °C – proběhlo štěpení. Při těchto teplotách dochází k aktivitě činnosti použitých enzymů. Po skončení doby štěpení činnost jednotlivých enzymů byla zastavena varem, kdy Fisherovy tuby byly ponořeny do vroucí vody po dobu 10 minut. Následně proběhla centrifugace. vychladlých tub po dobu 15 minut při 4500 otáčkách. Vzniklé supernatanty byly převedeny do tub o známé hmotnosti. Z každé tuby bylo napipetováno 200 – 300 µl supernatantu do 1,5 ml zkumavek. Zkumavky i tuby se supernatanty byly uloženy do mrazáku pro další aplikace. K peletům se přidalo 10 ml destilované vody a opatrně se promíchaly pomocí skleněné tyčinky a byly opět zcentrifugovány po dobu 15 minut při 4500 otáčkách. Vzniklé supernatanty byly odstraněny. Pelety byly zamrazeny v mrazicím boxu na teplotu – 80 °C a poté lyofilizovány do jejich úplného vysušení. Po lyofilizaci bylo provedeno vážení s využitím hodnot navážek byla stanovena změna hmotnosti (úbytek) jednotlivých vzorků. Rozpustnost byla stanovena jako procentuální podíl úbytku hmotnosti k původní navážce.

4. 4. Frakcionace proteinových fragmentů

4. 4. 1. SDS-PAGE pro analýzu peptidových fragmentů

Analýza peptidových fragmentů založena na systému SDS-PAGE probíhala na vertikální elektroforéze (model SE 600, Hoeffer). Metoda probíhala podle modifikovaného protokolu dle R. C. Judd. Gel, na kterém byly separovány peptidy, obsahoval tři vrstvy: spodní separační gel, mezigel a horní zaostřovací gel.

Příprava vzorků

Na analýzu byly využity supernatanty, které vznikly po enzymovém štěpení jednotlivými enzymy. Supernatanty před použitím musely být zakoncentrovány. Množství 5 ml od každého z nich se dalo zlyofilizovat a následně vzniklý pelet rozpustil ve 250 μ l destilované vody. Poté se do nových mikrozkuavek napipetovalo 80 μ l vzniklých vzorků. K nim se přidalo 20 μ l nanešecího pufru s β – merkaptetanolem. Takto připravená směs byla vařena po dobu 3 minut a v množství 60 μ l nanesena na gel. Na gel byl kromě vzorků nanesen také marker (Sigma – Aldrich, Color Marker Ultra-low Range).

Příprava gelu

Nejprve se připravila skla, která byla vertikálně upevněna do stojanu. Mezi ně byl nalit separační gel. Povrch gelu byl upraven butanolem, aby se odstranily vytvořené bublinky. Pak se gel nechal zatuhnout. Po jeho zatuhnutí se slil butanol, připravil a nalil na něj spacer gel - mezigel. Povrch gelu byl opět upraven butanolem. Po zatuhnutí mezigelu se slil butanol, a na gel se nalila 3 vrstva zaostřovacího gelu. Do zaostřovacího gelu se zandaly vzorkovací hřebeny a vzniklý gel se nechal zatuhnout. Po zatuhnutí zaostřovacího gelu a vyjmutí hřebenů byl povrch gelu upraven vanovým pufrem. Pod jeho hladinu byly do jamek naneseny barvené vzorky a hmotností marker. (Složení jednotlivých vrstev gelu je uvedeno v tabulce číslo 3).

Tabulka číslo 3: Složení jednotlivých vrstev gelů.

	dH₂O	Separáčn í gelový pufr (3 M Tris, 0,3 % SDS	Separáč. Akrylamí d	Glycerol	TEMED	10 % Persíran amonný	EDTA
Separáčn í gel	13,4 ml	20 ml	20 ml	6,4 μ l	20 μ l	200 μ l	-
Spacer gel	13,8 ml	10 ml	6 ml	-	10 μ l	100 μ l	-
Zaostřova cí gel	20,6 ml	3,8 ml	5 ml	-	15 μ l	300 μ l	300 μ l

TEMED – tetramethylethyldiamin, EDTA - kyselinu ethylendiamintetraoctovou

Průběh SDS - PAGE

Po zaběhnutí vzorků do gelů, byly gely vyjmuty ze stojanu a dány do elektroforetické vany, kde byly zality vanovým pufrém. Sestava byla zapojena do elektrického proudu a vložena do ledničky. Separace probíhala po dobu 6 hodin. Gely byly po proběhnutí elektroforézy odbarveny, fixovány a digitalizovány.

4. 4. 2. Separace peptidových fragmentů systémem FPLC

Z chromatografických metod pro separaci peptidových fragmentů vzniklých po enzymovém štěpení byl vybrán systém FPLC. Použita byla kolona ENrich SE 70 (ENrich High – Resolution Size Exclusion Columns, Bio-rad). Tato kolona separuje biomolekuly v rozmezí 500 Da – 70 kDa při vysokém průtoku (≤ 1 ml/min). K separaci byly vybrány peptidové fragmenty (supernatanty), vzniklé po enzymové hydrolyze příslušnými enzymy. V následujícím protokolu jsou uvedeny jednotlivé kroky analýzy (tabulka číslo 4).

Tabulka číslo 4: Protokol k chromatografické separaci na systému FPLC pomocí kolony ENrich SEC 70.

Fáze	Objem (ml)	Průběh dané fáze	Komponenty	Objem pufru a průtoky
1	0,00			
2	0,00	Vynulování základní čáry	QuadTec	
3	0,00	Isokratická eluce	A: Pufr A1	Objem: 1 ml
			B: Pufr B1	Průtok: 1 ml/min
4	1,00	Vynulování základní čáry	QuadTec	
5	1,00	Vložení vzorků	Vzorek	Objem: 0,50 ml
			Statická smyčka	Průtok: 1 ml/min
6	1,50	Isokratická eluce	A: Pufr A1	Objem: 30 ml
			B: Pufr B1	Průtok: 1 ml/min
	31,50	Konec protokolu		

4. 5. Stanovení antioxidační aktivity

Pro stanovení antioxidační aktivity byla vybrána metoda DPPH. Princip metody spočívá v reakci testované látky se stabilním radikálem DPPH (1,1- difenyl-2-pikrylhydrazylem). Při reakci dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazinu). DPPH v metanolu vytváří intenzivní fialové zbarvení, které se v přítomnosti antioxidantu odbarvuje do žluta. Reakce je nejčastěji sledována spektrofotometricky. Rychlost a rozsah odbarvení je úměrný antioxidační účinnosti analyzované látky. Pokles absorbance je měřen při vlnové délce 515 – 520 nm (Paulová *et al.*, 2004).

Příprava roztoků a analýza

Nejprve musel být připraven zásobní roztok radikálu DPPH ($c = 0,000634 \text{ mol/l}$), ze kterého se těsně před měřením absorbance připravil pracovní roztok DPPH-H. Dále se připravily kalibrační roztoky standartu TROLOXu (o určitých koncentracích, viz přílohová část – tab. číslo 5). Jednotlivé přípravy roztoků jsou uvedeny v přílohové části. Poté se změřila a odečetla absorbance připravených roztoků standartu TROLOXu. Ze zjištěné absorbance a koncentrace se sestrojila kalibrační křivka, která sloužila pro výpočet celkové antioxidační aktivity jednotlivých vzorků. Celková antioxidační aktivita vzorků se stanovovala jako ekvivalent Troloxu v g/kg DM (sušiny).

Příprava vzorků

Antioxidační aktivita peptidových frakcí a proteinových štěpů se měřila pomocí kyvet. Nejprve se musely peptidové frakce zakonzentrovat. Množství 1 ml od každé peptidové subfrakce se zlyofilizovalo a vzniklý pelet rozpustil s 200 μl destilované vody. Se štěpy nebylo nic provedeno. Takto připravené vzorky se podrobily analýze.

Měření

Od každé subfrakce a proteinového štěpu se pipetovalo 0,025 ml do připravených eppendorfků a přidalo se k nim 0,975 ml radikálu. Poté se eppendorfky daly inkubovat na 37 °C po dobu 30 minut. Po uplynutí doby se jednotlivé eppendorfky přelily do kyvet, změřila se a odečetla jejich absorbance (spektrofotometr Thermo BioMate 5) při 515 nm. Jako blank byl použit metanol.

4.6. Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA

K určení koncentrace byl použit komerčně dostupný Pierce BCA Protein assay kit. Měření probíhalo v souladu s jeho návodem. Koncentrace proteinů se stanovovala u jednotlivých peptidových subfrakcí.

Příprava vzorku

Peptidové subfrakce před vlastním měřením musely být zakoncentrovány, kdy se 1 ml od každé z nich zlyofilizoval a vzniklý pelet rozpustil s 200 μ l destilované vody.

Měření koncentrace proteinů

Pro měření absorbance jednotlivých peptidových subfrakcí byly využity mikrotitrační destičky. Do každé jamky se vždy napipetovalo 25 μ l vzorku a 200 μ l pracovní reagentie (součástí kitu). Takto připravená destička se inkubovala po dobu 30 minut při 37 °C. Po uplynutí doby byla změřena a odečtena absorbance vzorků při 562 nm (spektrofotometr Bio-rad Xmark). Koncentrace se stanovovala z rovnice kalibrační křivky závislosti koncentrace bílkovinného standardu BSA (hovězí sérový albumin) na absorbanci. BSA standart je součástí kitu.

4. 7. Statistické vyhodnocení výsledků

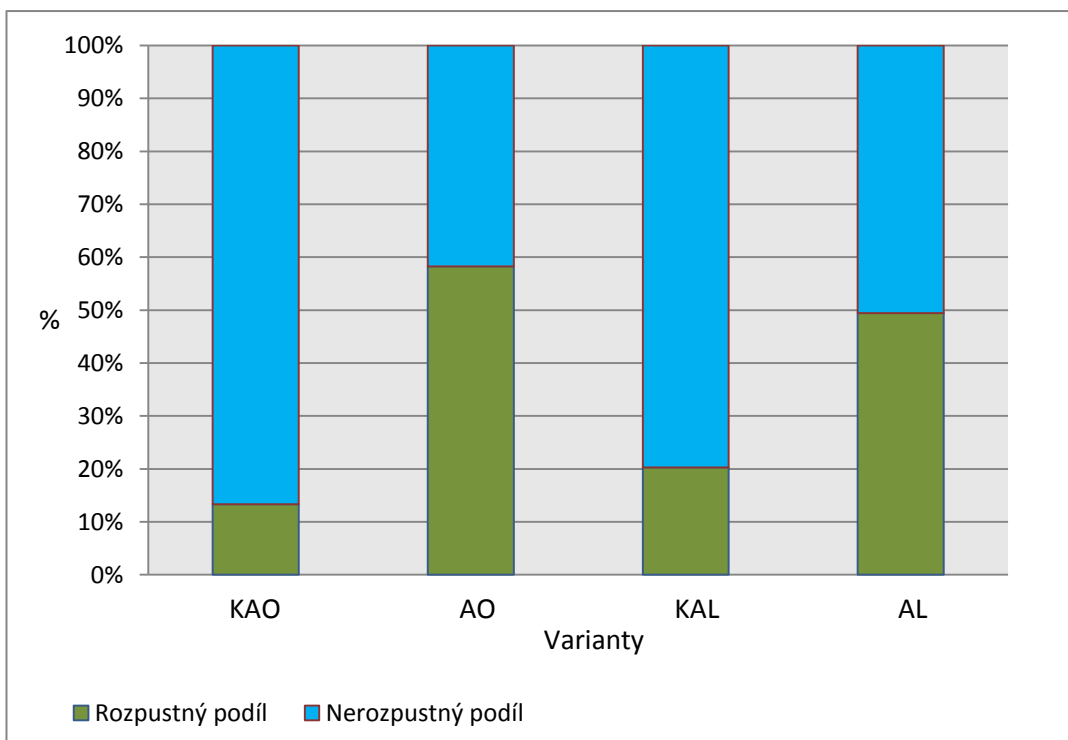
Výsledky byly statisticky vyhodnoceny analýzou rozptylu dat. Veškeré vyhodnocování proběhlo v programu Statistika.

5. Výsledky

5. 1. Enzymová hydrolýza

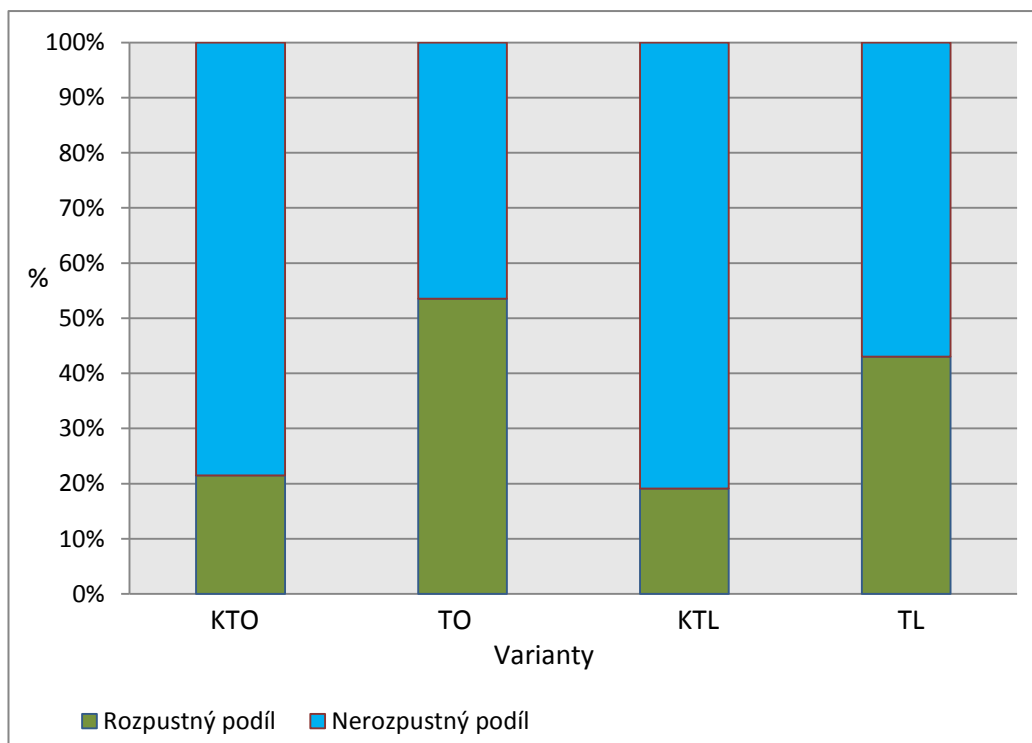
Enzymová hydrolýza proteinových izolátů probíhala po dobu 24 hodin. Za tuto dobu došlo ke zlepšení rozpustnosti. Rozpustný podíl byl stanoven jako procentuální podíl úbytku hmotnosti k původní navážce. K jednotlivým enzymům byla vytvořena kontrola (graf č. 1-2, označeno K), která vždy obsahovala pouze navážku konkrétního proteinu a pufr (pro jednotlivé enzymy). Tato kontrola sloužila pro zjištění, zda při enzymové hydrolýze dochází k nárůstu rozpustnosti proteinových izolátů. Rozpustný podíl proteinových izolátů po jejich štěpení byl v průměru 51013 % (graf č. 1 – 4). Nejvyšší podíl rozpustnosti byl stanoven u izolátů získaných z odrůdy Ornella štěpené enzymem alkalasa. Z grafu číslo 1 je patrné, že maximální hodnota rozpustnosti činila 57,66 %. Ve srovnání s příslušnou kontrolou vzrostl rozpustný podíl o 4 krát více. Dále se prokázalo, že využití odlišných enzymů při štěpení vede k různým hodnotám rozpustnosti (graf č. 1 - 2). Například nejvyšší rozpustný podíl proteinového izolátů po působení alkalasy dosahoval 57,66 %, (graf č. 1) u trypsinu 53, 34 % (graf č. 2). To je o necelé 4 % méně. Dále bylo prokázáno, že i vybraná odrůda a technologie izolace proteinu hraje určitou roli. U proteinových izolátů označovaných jako Lyckeby byly dosaženy nejmenší hodnoty rozpustného podílu. Ty se pohybovaly kolem 49,65 % (graf číslo 1) a 42,66 % (graf číslo2).

Graf číslo 1: Změna rozpustnosti proteinových izolátů působením enzymu alkalasa po dobu 24 hodin.



Varianty: KAO, KAL – kontroly, AO – enzym alkalasa + proteinový izolát z odrůdy Ornella, AL – alkalasa + proteinový izolát Lyckeby

Graf číslo 2: Změna rozpustnosti proteinových izolátů působením enzymu trypsin po dobu 24 hodin.



Varianty: KTO, KTL – kontroly, TO – enzym trypsin + proteinový izolát z odrůdy Ornella, TL – trypsin + proteinový izolát Lyckeby

Statistické vyhodnocení závislosti rozpustného podílu izolátů na jednotlivých proměnných

Na hladině významnosti $p < 0,05$ byla statisticky prokázána závislost rozpustného podílu na dvou faktorech – zvoleném typu proteinového koncentrátu a typu použité proteasy (tabulka číslo 6). V diplomové práci byl zjištěn největší vliv na rozpustnost u proteasy alkalasa a proteinového koncentrátu z odrůdy Ornella.

Tabulka číslo 6: ANOVA test – Vyhodnocení závislosti rozpustného podílu na proměnných.

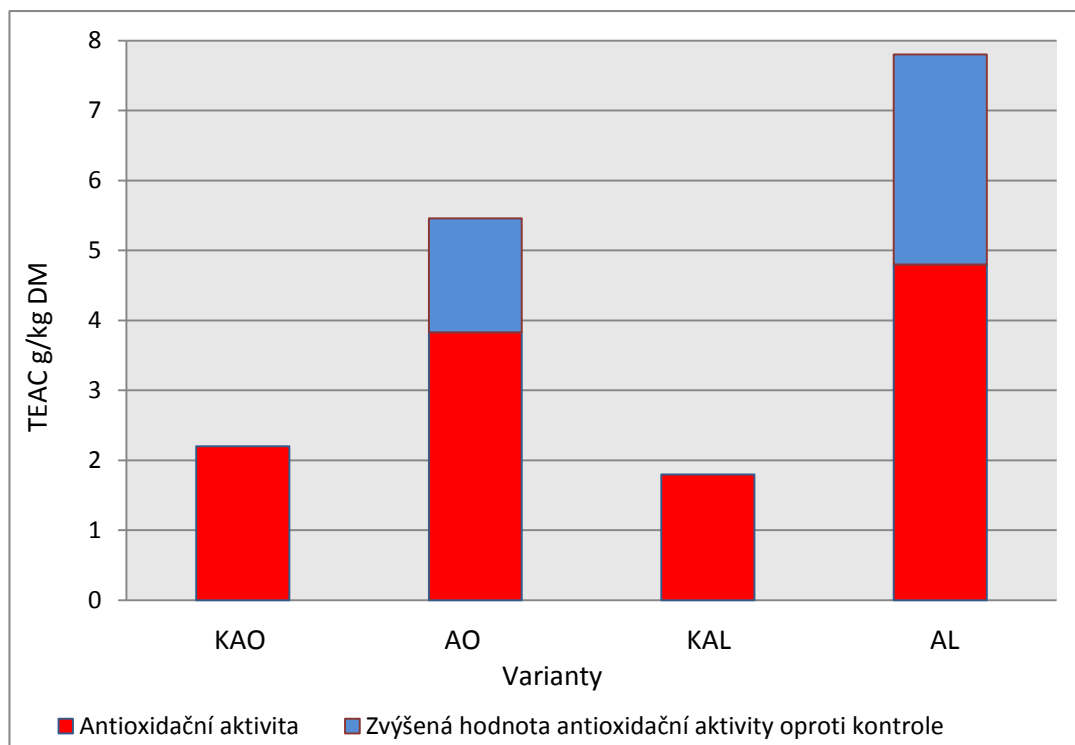
Efekt	Suma čtverců	Stupeň volnosti	Průměr čtverců	F	p*
Absolutní člen	82673,98	1	82673,98	3145,264	0,000000
Typ proteinového koncentráту	698,25	1	698,26	26,565	0,000018
Proteasa	255,49	1	255,49	9,720	0,004190
Typ proteinového koncentráту x proteasa	14,34	1	14,34	0,545	0,466317
Chyba	735,99	28	26,29	-	-

* p-hodnota je hladina pravděpodobnosti, pro kterou platí nulová hypotéza (H₀), že dvě varianty sledování se od sebe statisticky významně neliší. Je-li p-hodnota < 0,05 popř. < 0,01 nebo < 0,001, zamítáme H₀ a mezi variantami sledování (úrovněmi znaku) je statisticky významný popř. velmi významný rozdíl, nebo velmi vysoce významný rozdíl.

5. 2. Stanovení antioxidační aktivity

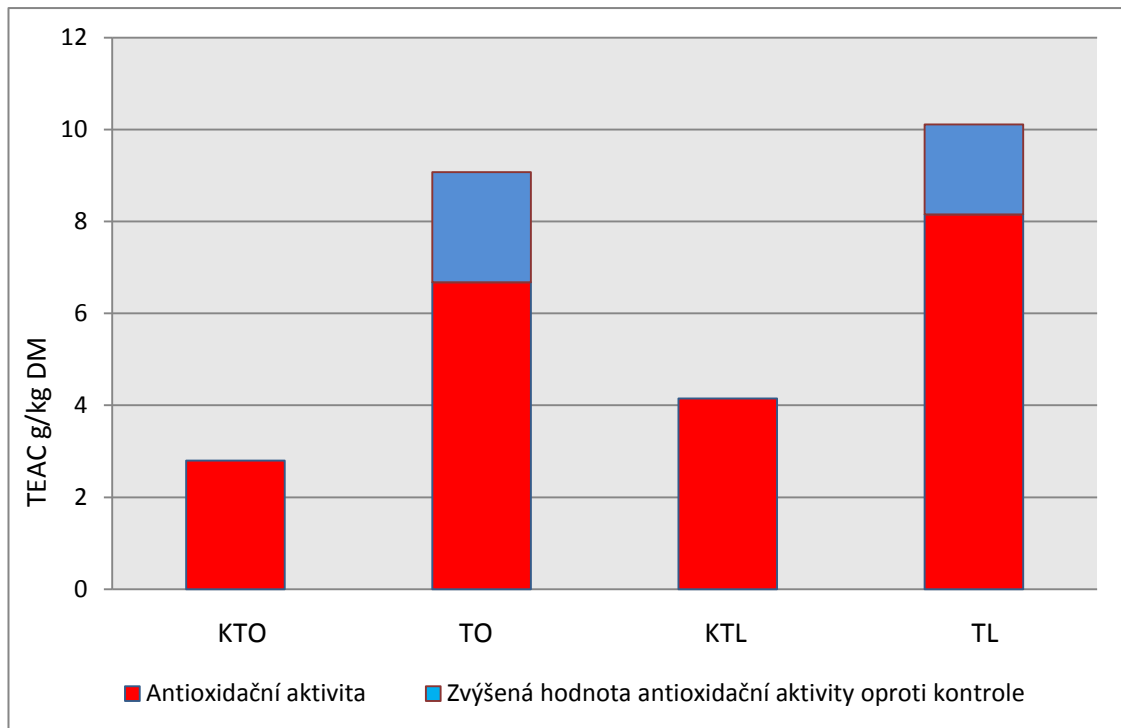
Celková antioxidační aktivita byla zjištěna metodou DPPH. Hodnoty antioxidační aktivity se vyjádřily ekvivalentem standartu Troloxu TEAC v g/kg DM. Antioxidační aktivita byla také stanovena u příslušných kontrol pro jednotlivé štěpy. Tyto kontroly nebyly enzymově štěpeny (graf číslo 3 – 4, označeno K). Hydrolyzáty, získané po enzymovém štěpení trypsinem dosahovaly hodnot v průměru 6,68 TEAC g/kg (u štěpů z odrůdy Ornella, graf číslo 4) a 8,15 TEAC g/kg (u štěpů získaných z proteinové koncentráту Lyckeby, graf číslo 4). Naproti tomu hodnota příslušné kontroly činila 2,8 a 4,5 TEAC g/kg. Při použití alkalasy se antioxidační aktivita pohybovala v průměru 3,83 g/kg (u štěpů z odrůdy Ornella, graf číslo 3) a 4,8 TEAC g/kg (u štěpů získaných z proteinové koncentráту Lyckeby, graf číslo 3). Hodnota příslušné kontroly byla 2,2 a 1,8 TEAC g/kg. U hydrolyzátů došlo k navýšení antioxidační aktivity ve srovnání s kontrolami.

Graf číslo 3: Celková antioxidační aktivita hydrolyzátů vzniklých z proteinového koncentráту působením enzymu alkalasa.



Varianty: KAO, KAL – kontroly, AO – hydrolyzát z odrůdy Ornella štěpený alkalasou, AL – hydrolyzát z proteinového koncentrátu Lyckeby štěpený alkalasou

Graf číslo 4: Celková antioxidační aktivita hydrolyzátů vzniklých z proteinových koncentrátů působením enzymu trypsin.



Varianty: KTO, KTL – kontroly, TO – hydrolyzát z odrůdy Ornella štěpený trypsinem, TL – hydrolyzát z proteinového koncentráту Lyckeby štěpený trypsinem

Statistické vyhodnocení závislosti antioxidační aktivity na jednotlivých proměnných

Na hladině významnosti $p < 0,05$ byla statisticky prokázána závislost antioxidační aktivity hydrolyzátů na typu použité proteasy (tabulka číslo 7). V rámci experimentu byla největší antioxidační aktivita zjištěna u proteinových koncentrátů štěpených enzymem trypsin.

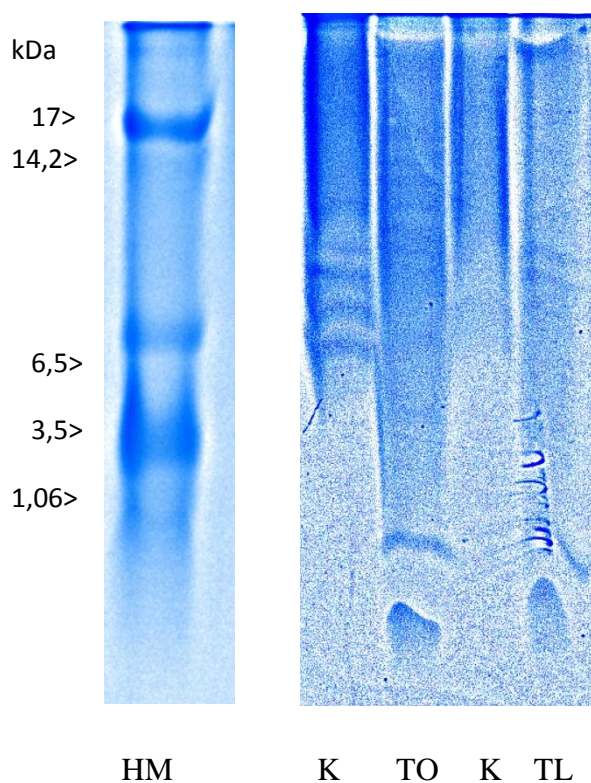
Tabulka číslo 7: ANOVA test – Vyhodnocení závislosti antioxidační aktivity na proměnných.

Efekt	Suma čtverců	Stupeň volnosti	Průměr čtverců	F	p*
Absolutní člen	549,9025	1	549,9025	93,80907	0,00000
Typ proteinového koncentrátu	6,0025	1	6,0025	1,02398	0,331546
Proteasa	38,4400	1	38,4400	6,55756	0,024966
Typ proteinového koncentrátu x proteasa	0,2500	1	0,2500	0,04265	0,839852
Chyba	70,3432	12	5,8619	-	-

5. 3. Separace fragmentů na Tris - Tricinovém gelu

Z peptidového gelu nelze přesně určit molekulovou hmotnost vyseparovaných peptidových fragmentů z hydrolyzátů, které byly štěpeny enzymem trypsin. Jednotlivé pruhy jsou rozmazané. Avšak lze konstatovat, že na rozdíl od kontrol, které nebyly enzymaticky štěpeny se vyseparovaly peptidy o nižší molekulové hmotnosti a tím se ověřila účinnost hydrolýzy.

Obrázek číslo 1: Proteinové spektrum separovaných hydrolyzátů pomocí peptidové SDS – PAGE.

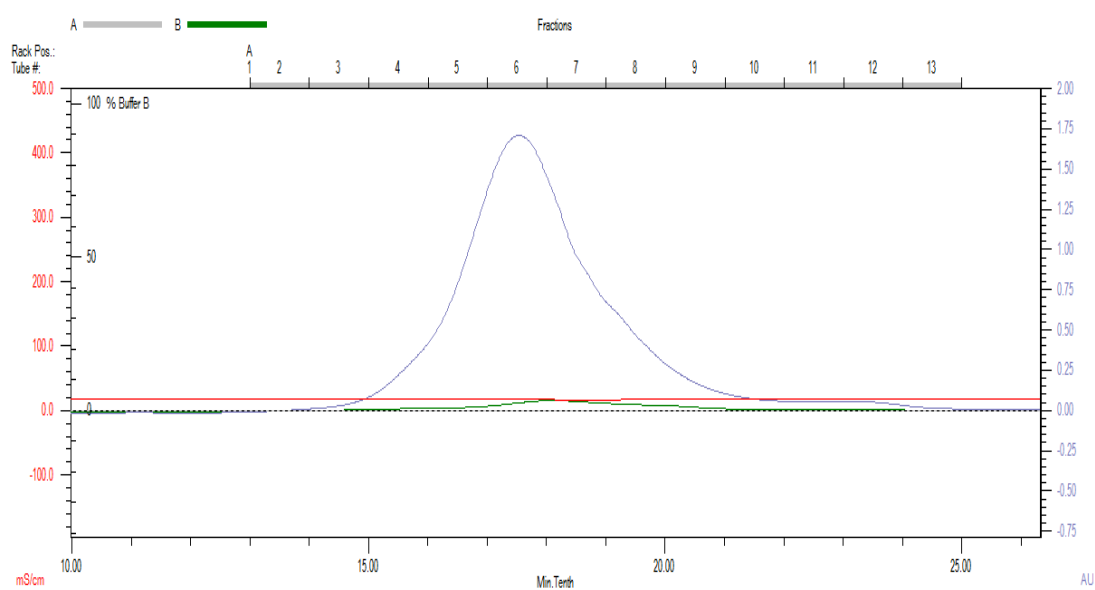


Pořadí nanesených vzorků: HM – hmotností marker, K – kontrola, u které neproběhlo enzymové štěpení, TO – proteinový izolát z odrůdy Ornella štěpený enzymem trypsin, TL – proteinový izolát Lyceby štěpený enzymem trypsin

5.4. Separace peptidových fragmentů systémem FPLC

Separace probíhala na koloně ENrich SEC 70. Tato kolona využívá jako hmotnostní standard například vitamín B12 ($M_r = 1,350$ kDa), který má retenční objem 15 – 16 ml. Použitím této kolony se ověřila účinnost enzymové hydrolýzy. U jednotlivých vzorků se zachytily frakce, složené z 12 peptidových subfrakcí (obrázek číslo 2-5). Většina zachycených chromatografických frakcí obsahovala peptidové fragmenty kolem 1,35 kDa nebo o nižší molekulové hmotnosti. Podle průběhu chromatografické křivky směs peptidů pomocí této kolony nebyla oddělena do jednotlivých píků. I přesto se zachytily jednotlivé subfrakce s rozdílným retenčním objemem.

Obrázek číslo 2: Znázornění chromatografické separace proteinového hydrolyzátu z odrůdy Ornella vzniklého působením enzymu alkalasa na koloně ENrich SEC 70.



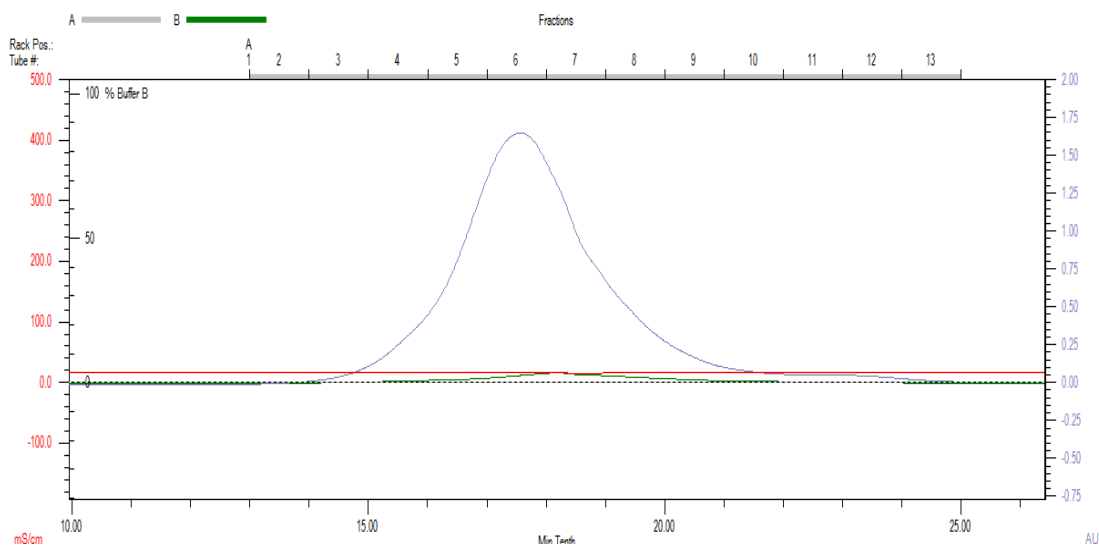
osa x – časová osa (při průtoku 1 ml/min)

osa y1 (červená b.) – konduktivita (mS/cm, miliSiemens/centimetr)

osa y2 (modrá b.) – absorbance zachytávaných frakcí při 214 nm

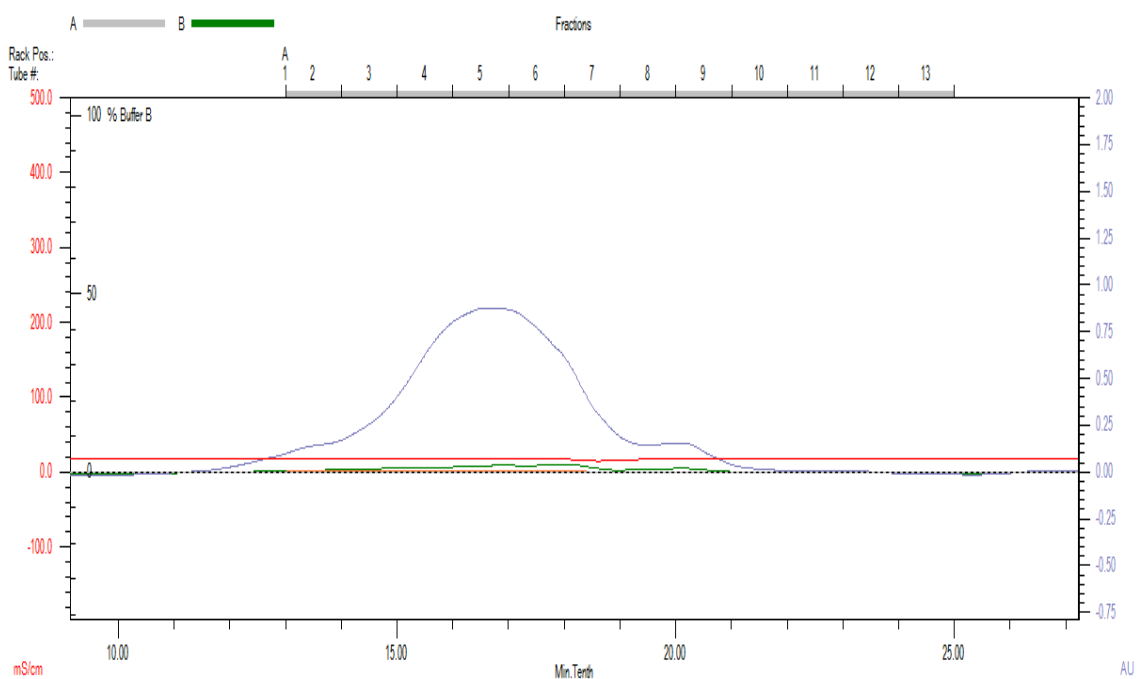
(AU, *Absorbance units* – jednotky absorbance)

Obrázek číslo 3: Znázornění chromatografické separace proteinového hydrolyzátu z proteinu Lyceby vzniklého působením enzymu alkalasa na koloně ENrich SEC 70.



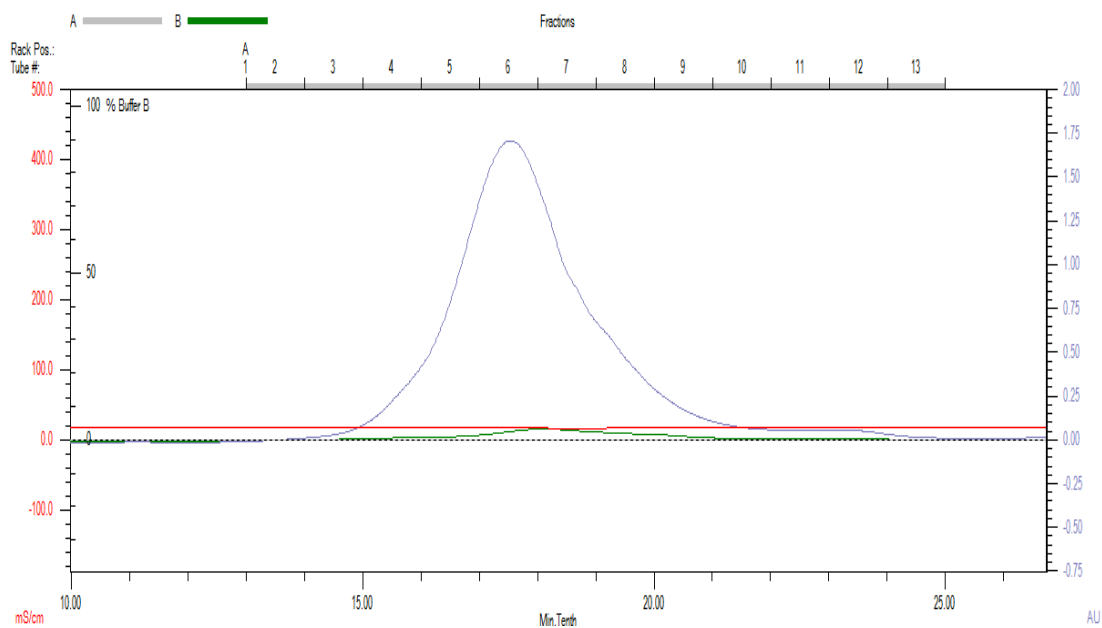
Popisky os jsou uvedeny u obrázku číslo 2.

Obrázek číslo 4: Znázornění chromatografické separace proteinového hydrolyzátu z odrůdy Ornella vzniklého působením enzymu trypsin na koloně ENrich SEC 70.



Popisky os jsou uvedeny u obrázku číslo 2.

Obrázek číslo 5: Znázornění chromatografické separace proteinového hydrolyzátu z proteinu Lyceby vzniklého působením enzymu trypsin na koloně ENrich SEC 70.

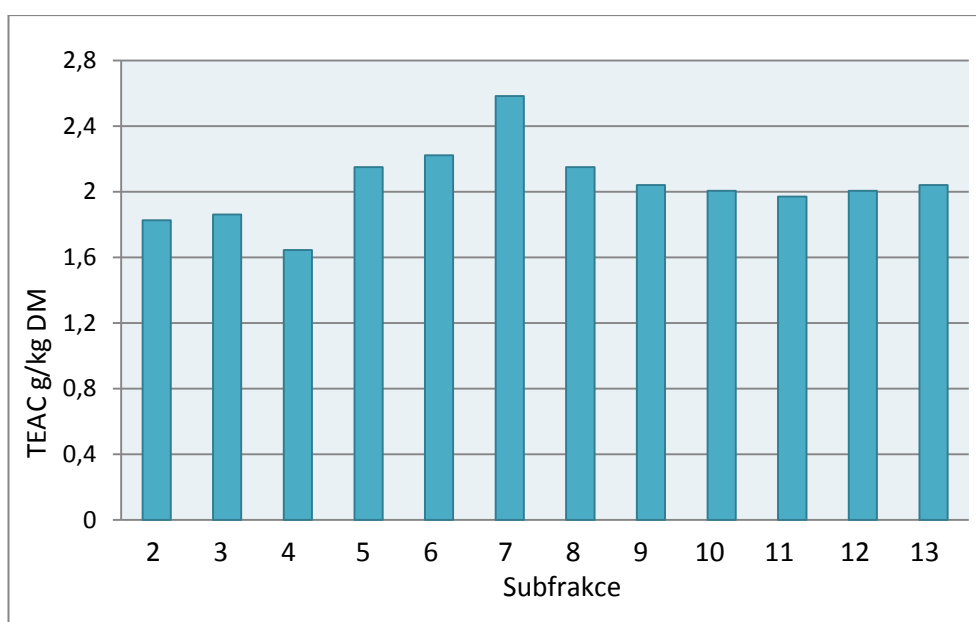


Popisky os jsou uvedeny u obrázku číslo 2.

5. 5. Antioxidační aktivita získaných peptidových frakcí

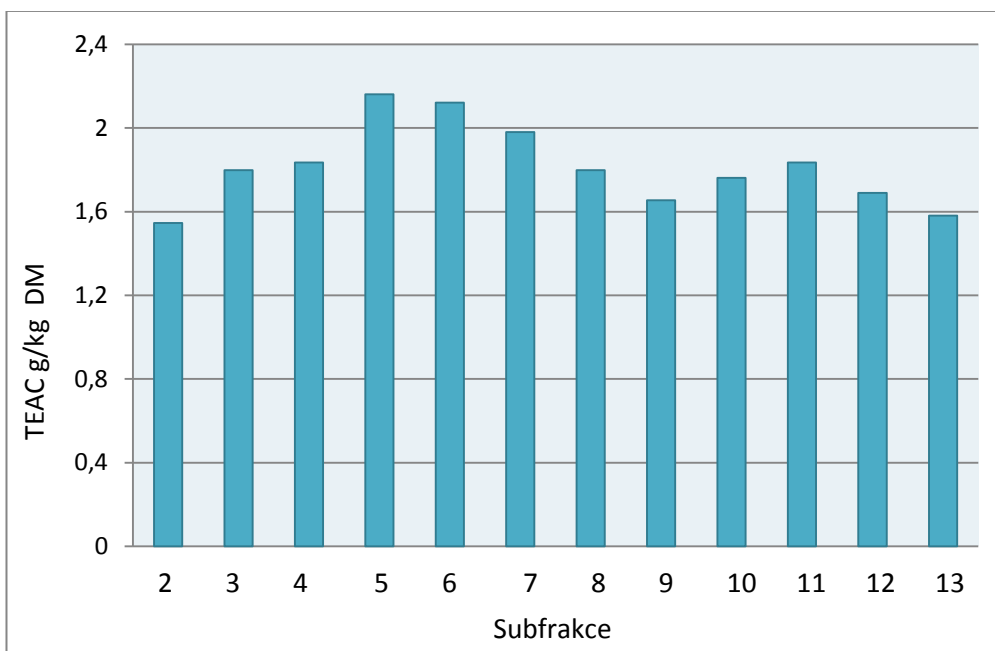
Antioxidační aktivita byla stanovena u frakcí, které se byly zachyceny při separaci peptidových fragmentů na systému FPLC. Celková antioxidační aktivity se vyjádřila jako ekvivalent Troloxu v g/kg DM (sušiny). Z grafů číslo 5, vyplývá, že nejvyšší hodnota aktivity 2,2 a 2,6 TEAC g/kg DM byla určena u subfrakce 6 a 7. Subfrakce, které vznikly po separaci fragmentů působením enzymu trypsin, vykazovaly nižší hodnoty. Nejvyšší hodnoty byly stanoveny u subfrakcí 5 a 6, kdy celková aktivita byla 2,1 a 2,12 TEAC g/kg DM (graf číslo 6). Antioxidační aktivita frakcí separovaných z peptidových fragmentů z proteinu Lyceby vykazovaly nižší hodnoty než u frakcí separovaných z peptidových fragmentů z proteinu odrůdy Ornella. Hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 0,01 – 0,9 TEAC g/kg DM (graf číslo 7-8).

Graf číslo 5: Celková antioxidační aktivita peptidových subfrakcí získaných po separaci na FPLC z hydrolyzátů z proteinového koncentrátů Ornella působením enzymu alkalasa.

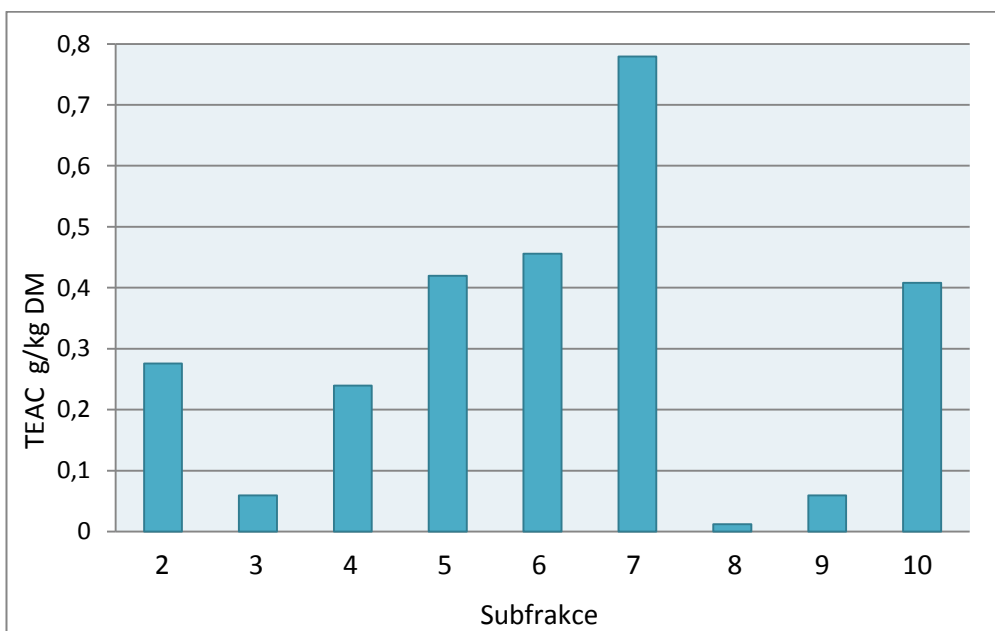


TEAC – Trolox equivalent antioxidant capacity

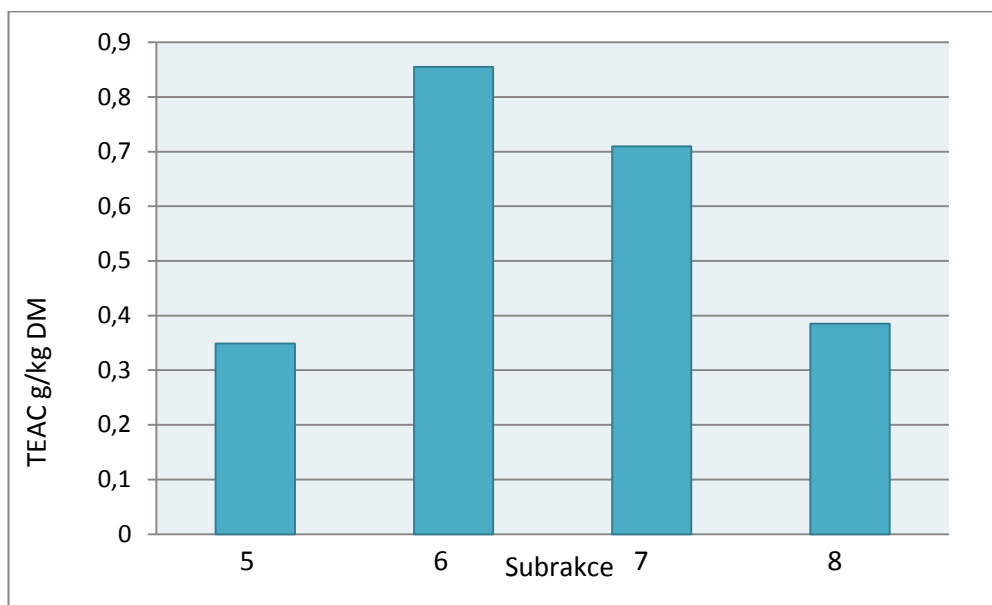
Graf číslo 6: Celková antioxidační aktivita peptidových subfrakcí získaných po separaci na FPLC z hydrolyzátů z proteinového koncentráту Ornella působením enzymu trypsin.



Graf číslo 7: Celková antioxidační aktivita peptidových subfrakcí získaných po separaci na FPLC z hydrolyzátů z proteinového koncentráту Lyckeby působením enzymu trypsin.



Graf číslo 8: Celková antioxidační aktivita peptidových subfrakcí získaných po separaci na FPLC z hydrolyzátů z proteinového koncentrátů Lyckeby působením enzymu alkalasa.



5. 6. Stanovení koncentrace proteinů u zachycených chromatografických subfrakcí

Koncentrace proteinů byla stanovena u frakcí vzniklých separací na systému FPLC. Jednotlivé změřené koncentrace jsou uvedeny v tabulce číslo 8. Koncentrace proteinů byla vztažena na jednotku g/l. Nejvyšší hodnoty koncentrace proteinu dosahovaly subfrakce, které tvořily středy chromatografických píků. U ostatních subfrakcí nebyla koncentrace proteinu pomocí metody BCA stanovena, protože nedosahovaly koncentračního minima proteinů, které se nachází v rozpětí kalibrační křivky standartu BSA (hovězí sérový albumin).

Tabulka číslo 8: Koncentrace proteinů subfrakcí získaných na systému FPLC.

Frakce	3	4	5	6	7	8	Varianta
c proteinů (g/l)	0,08643	0,20964	0,36644	0,32724	0,28468	0,05507	TO
	-	-	0,09575	0,26788	0,36084	0,25188	AO
	0,06067	0,18948	0,35860	0,39556	0,40452	0,09539	TL
	-	0,07075	0,12339	0,63525	0,42804	0,20739	AL

Varianty: T – enzym trypsin, A – enzym alkalasa, O – izolát proteinu z odrůdy Ornella, L – Izolát proteinů z proteinu Lyckeby

6. Diskuze

Při izolaci proteinů tepelnou koagulací dochází k denaturaci bílkovin a ke snížení funkčních vlastností jako je rozpustnost a ke snížení antioxidační aktivity izolovaných proteinových fragmentů. Tím se limituje uplatnění těchto proteinů v potravinářské sféře (Peksa *et al.*, 2009). Podle Wanga a Xionga (2005), by měla enzymová hydrolýza zlepšit tyto zmiňované vlastnosti. Toto tvrzení bylo v rámci diplomové práce prokázáno. U proteinových izolátů získaných z odrůdy Ornella štěpených enzymem alkalasa dosahoval rozpustný podíl v průměru 57,66 %, kdežto kontrola dosahovala pouze 13,2%, což bylo 4 krát méně. Podíl rozpustnosti u izolátů získaných z odrůdy Ornella štěpené enzymem dosahovaly v průměru 53,34 %. U proteinových izolátů získaných z proteinového koncentráту označovaného Lyckeby byly zjištěny nižší hodnoty, a to 49,65 %, kontrola 20,2 % u štěpení enzymem alkalasa a 42,66 %, kontrola 19 % u štěpení enzymem trypsin.

Lze konstatovat, že vlastnosti získaných hydrolyzátů jsou ovlivněny podmínkami enzymové hydrolýzy, typem enzymu i zvoleným proteinovým koncentrátem (Medzianka *et al.*, 2014). V práci se prokázalo, že laboratorně připravený proteinový koncentrát získaný z odrůdy Ornella vykazoval lepší rozpustnost než proteinový koncentrát označovaný jako Lyckeby. Tento izolát byl získán od švédské škrobárenské firmy. Zde by měly být proteiny izolovány s využitím vyšších teplot (více než 80 °C) metodou tepelné koagulace po injektaci páry. To vede k vysoké výtěžnosti proteinů, ale dochází k jejich denaturaci. Tím se limituje použitelnost proteinových koncentrátů v potravinářském průmyslu. V experimentu byly dosaženy optimální podmínky pro aktivaci účinnosti štěpení použitých enzymů. Vodrážka *et al.* (1991) uvádí, že enzym trypsin štěpí jednotlivé proteiny v rozmezí pH 7-9. Štěpení se obvykle provádí přes noc. Peptidy štěpí při teplotě 37 °C. U enzymu alkalasa se pH optimum udává v rozmezí 6,5 - 8,5 a peptidy štěpí při teplotě 60°C. Tyto podmínky byly splněny. V diplomové práci se také ověřoval vliv enzymové hydrolýzy na celkovou antioxidační aktivitu hydrolyzátů (štěpů) získaným po štěpení proteolytickými enzymy. Při použití trypsinu jako štěpícího enzymu antioxidační aktivita byla v průměru 6,68 a 8,15 TEAC g/kg DM, u příslušných kontrol 2,8 a 4,5 TEAC g/kg. Při použití alkalasy se antioxidační aktivita pohybovala v průměru 3,83 a 4,8 TEAC g/kg. Antioxidační aktivita kontrol byla 2,2 a 1,8 TEAC g/kg. Prokázal se nárůst antioxidační aktivity hydrolyzátů ve srovnání s příslušnými kontrolami,

kteře nebyly enzymaticky štěpeny. Rozdíly v hodnotách celkové antioxidační aktivity hydrolyzátů jsou způsobeno tím, že nedošlo k dostatečnému zhášení DPPH radikálu, které se projevuje blednutím roztoku DPPH a poklesu jeho absorbance (Bondet *et al.*, 1997). Je však zřejmé, že enzymatická hydrolýza bílkovin může vést ke zlepšení analyzovaných vlastností bílkovin.

Separace proteinových fragmentů pomocí systému FPLC ověřila funkčnost enzymové hydrolýzy použitými enzymy. Použitá kolona ENrich 70 SEC využívá jako hmotnostní standard například vitamín B12 ($M_r = 1,350$ kDa), který má retenční objem 16 ml. U analyzovaných hydrolyzátů, byly subfrakce sebrány v retenčním objemu 14-20 ml. Tudíž většina zachycených chromatografických frakcí obsahovala peptidové fragmenty kolem 1,35 kDa nebo nižší molekulové hmotnosti.

Rozdíly v molekulové hmotnosti peptidů mohou být způsobeny rozdílnou sekvencí aminokyselin, které tyto enzymy štěpí. Enzym trypsin štěpí proteiny za bazickými aminokyselinami lysinem a argininem, které zanechává na C – konci vzniklých peptidů. Specifita štěpení je vysoká a nedochází k ní pouze v případě, že tyto aminokyseliny sousedí s prolinem (Walmsley *et al.*, 2013). Naproti tomu enzym alkalasa hydrolyzuje většinu peptidových vazeb, které se nachází uvnitř molekuly.

V práci bylo zjištěno, že celková antioxidační aktivita separovaných štěpů a koncentrace proteinů dosahovaly nejvyšších hodnot u subfrakcí, které tvořily střed chromatografického píku. Celková antioxidační aktivita se vyjádřila jako ekvivalent Troloxu (TEAC) v g/kg DM (sušiny) a koncentrace proteinů v g/l. Například subfrakce 6 a 7 (obrázek číslo 1) dosahovaly 2,2 a 2,6 TEAC g/kg DM ve srovnání se subfrakcemi 2 a 3, jejichž antioxidační aktivita činila 1,9 a 1,8 TEAC g/kg DM. Koncentrace proteinů byla u těchto subfrakcí (6 a 7) 0,26788 a 0,36086 g/l. U frakcí vyseparovaných ze štěpů proteinového koncentrátu označovaného Lyckeby dosahovala antioxidační aktivita daleko nižších hodnot nebo nebyla stanovena, ve srovnání s frakcemi získaných z hydrolyzátů z odrůdy Ornella. To mohlo být způsobeno tím, že nedošlo k dostatečnému zhášení DPPH radikálu, které se projevuje blednutím roztoku DPPH a poklesu jeho absorbance (Bondet *et al.*, 1997). Nebo to bylo způsobené složením aminokyselin získaných subfrakcí. Naproti tomu množství peptidů u frakcí tvořící středy píku dosahovaly vyšších hodnot. Například 0,63525 g/l a 0,42804 g/l. Rozdíly v množství peptidů jsou zřejmě způsobeny různou

molekulovou hmotností získaných subfrakcí a rozdílnou intenzitou enzymového štěpení proteinových fragmentů, které se podrobily analýze na systému FPLC.

7. Závěr

Vlivem enzymové hydrolýzy došlo ke zlepšení rozpustnosti a antioxidační aktivity proteinových koncentrátů, které byly štěpeny proteolytickými enzymy. Nejvyššího rozpustného podílu dosahoval hydrolyzát získaný z odrůdy Ornella štěpený alkalasou a to 57,66 %. Nejvyšší celková antioxidační aktivita byla stanovena u varianty štěpení proteinových izolátů enzymem trypsin, která dosahovala hodnoty 8, 15 TEAC g/kg. Účinnost enzymové hydrolýzy se ověřila a potvrdila na systému FPLC a na Tris – Tricinovém gelu. Na systému FPLC byly zachyceny dílčí subfrakce, které většinou obsahovaly peptidy o molekulové hmotnosti kolem 1,35 kDa nebo peptidy o nižší molekulové hmotnosti. Nejvyšší hodnoty antioxidační aktivity byly stanoveny u subfrakcí, které tvořily středy chromatografických píku a to 2,2 a 2,6 TEAC g/kg DM. Tyto frakce obsahovaly i nejvyšší množství proteinů (0,26788 – 0,63525 g/l).

V rámci dalšího experimentu by bylo dobré věnovat se hlubší analýze zachycených subfrakcí. Například by se u jednotlivých subfrakcí mohla zjistit sekvence aminokyselin.

Seznam použité literatury

Bacon J. R., Noel T. R., Lambert N. (1990): Preparation of transparent pea proteins gel: A comparison of isolation procedures, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 25:527–537.

Baniel A., Fainz A., Popineau Y. (1997): Foaming properties of egg albumin with a bubbling apparatus compared with whipping, *Journal Food Science* 62: 377-381.

Bárta J., Bártová V. (2007): Bílkoviny hlíz brambor (*Solanum tuberosum* L.), vědecká monografie, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta. ISBN: 978-80-7394-036-2, str. 115.

Bárta, J., Bártová, V., (2008). Patatin, the major protein of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber, and its occurrence as genotype as genotype effect: processing versus table potatoes. *Czech Journal of Food Sciences* 26 (5): 347-359.

Bárta J., Bártová V., Kamenová A., Brabcová A. (2013): Hlízová voda. Odpad při zpracování brambor na škrob nebo zajímavá surovina?, *Agromanuál*, 8: 42-44.

Bártová V., Bárta J., Diviš J. (2009): Využití bílkovin hlíz analyzovaných na SDS – PAGE pro charakterizaci odrůd bramboru (*Solanum tuberosum* L.), Metodika pro praxi, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta. ISBN: 978-80-7394-158-1.

Bárta J., Čurn V. (2004): Bílkoviny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.) – klasifikace, charakteristika, význam, *Chemické listy* 98:373-378.

Bártová V., Bárta J., Kamenová A., Stanková A., Čurn V. (2012): Charakteristika a potenciál využití antimikrobiálních proteinu a peptidu bramboru (*Solanum tuberosum* L.), *Chemické listy* 106: 365-372.

Bárta J., Heřmanová V., Diviš J., Kotlářová L., Švajner J. (2006): Potato tuber proteins – a waste in starch production or valuable raw material? *Biotechnology 2006 symposium*, Scientific Pedagogical Publishing, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, pp 526-528, ISBN: 808-5645-53-X,

Bauw G., Nielsen H. V., Emmersen J., Nielsen K. L., Jorgensen M., Welinder K. G. (2006): Patatins, Kunitz protease inhibitors and other major proteins in tuber of potato cv. Kuras, *FEBS Journal* 273: 3569 – 3584.

Beckman K. B., Ames B. N. (1998): The free radical theory of aging matures, *Physiological Reviews* 78: 547–581.

Bondet V., Brand-Williams W., Berset C. (1997): Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical, *Metod. Leben. Wissenschaft Tech. Food Sci. Tech.* 30: 609-615.

Boutten B., Humbert C., Chelbi M., Durand P., Peyarud D. (1999): Quantification of soy proteins by association of immunohistochemistry and video image analysis, *Food Agricultur Immunology* 11 (1): 51-59.

Clemente, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Pedroche, J., Millán F. (1999): Production of extensive chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates with reduced antigenic activity. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3776-3781.

Damodaran S., Paraf A. (1997): *Food proteins and their applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, str. 694.

Drbal K., Křížek M. (1999): Analytická chemie, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, ISBN: 80-7040-352-7, str. 186.

Enders J. G. (2001): Soy protein products characteristics, nutritional aspect, and utilization, a publication of AOCS, ISBN: 1-893997-27-8.

Friedman M. (1996): Nutritional value of proteins from different food sources. A Review. *J. Agric. Food Chem.*,44: 6–29.

Fu T. J., Abbott U. R., Hatzos C. (2002): Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid-a comparative study, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24: 7154-7160.

Garlick P. J. (2001): Assessment of the safety of glutamine and other amino acids, *Journal of Nutrition*, 131: 2556-2561.

Gehrig P. M., Krzyzaniak A., Barciszewski J., Biemann K. (1996): Mass spectrometric amino acid sequencing of a mixture of seed storage proteins (napin) from *Brassica napus*, products of a multigene family, *Biochemistry* 93: 3647-3652.

Hannapel D., J. (1991): Distribution of potato tuber proteins during development. *American Potato Journal*, 68: 179 – 190.

Hanusová L., Čurn V. (2007): Inhibitory proteas v hlíze bramboru., *Chemické listy* 101: 536-541.

Hartman R., Miesel H. (2007): Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications, *Current Opinion in Biotechnology* 18: 163-169.

Huang C., Ma W. Y. Ryan C. A., Dong Z. (1997): Proteinase inhibitors I and II from potatoes specifically block UV-induced activator protein -1 activation through a pathway that is independent of extracellular signal-regulated kinases, C-jun N-terminal kinases, and P38 kinase, Proc. Natl. Acad. Sci., 94: 11957.

Hvízďalová, I. (2008): Masné výrobky s přídavkem sóji, Agronavigátor, č. článku 74741.

Chabanon G., Chevalot I., Framboisier X., Chenu S., Marc I. (2007): Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates, Process Biochemistry 42: 1419-1428.

Káš J., Kodíček M., Valentová O. (2005): Laboratorní techniky biochemie, Praha, Vydavatelství VŠCHT, ISBN: 80-7080-586-2, str. 258.

Kärenlampi S. O., White P. J. (2009): Potato proteins, lipids and minerals, In: Singh J., Kaur L. (Eds), Advances in Potato Chemistry AND Technology, Elsevier, Burlington, Maine, pp. 99-108.

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, Journal Sci Food Agric, 82: 134-142.

Koningsveldvan van G. A., Walstra P., Voragen A. G. J, Kuijpers I. J., Boekel van M. A. J. S., Gruppen H., (2002): Effect of proteins composition and enzymatic activity on formation and properties of potato protein stabilized emulsions. J Agric Food Chem 54: 6419-6427.

Koningsveld van G. A., Walstra P., Voragen A. G. J., Kuijpers I. J., Boekel van M. A. J. S., Gruppen H. (2006): Effects of protein composition and enzymatic activity on formation and properties of potato protein stabilized emulsions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (17): 6419-6427.

Křížek M., Šíma J. (2015): Analytická chemie, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, ISBN: 978-80-7394-486-5, str. 214.

Kunová V. (2004): Zdravá výživa, 1. vyd. Praha, Grada, ISBN: 80-247-0736-5, str. 136.

Kvasničková A. (2003): ACE inhibitory biologicky aktivní peptidy z cizrny. *Agro navigátor*, článek 14998.

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.

Lahola J., a kol.(1990): Luskoviny - pěstování a využití, Státní zemědělské nakladatelství, Praha, ISBN: 80-209-0127-2, str. 224.

Lie Y. W., Han CH., Lee M. H., Hsu F. L., Hou W. C. (2003): Patatin, the tuber storage protein of potato (*Solanum tuberosum* L.), exhibits antioxidant activity in vitro, *Journal Agricultural and Food Chemistry* 51(15): 4389-4393.

Linder K., Jashik S., Korpaczy I. (1960): Amino acid composition and biological value of potato protein fractions, *Qual Plant Mater Veg* 7: 289-294.

Lomolino G., Vincenzi S., Gazzola D., Crapisi A., Curioni A. (2015): Foaming properties of potato (*Solanum tuberosum*) proteins: A study by the gas sparging

method, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 475: 75-83.

Mäkinen S. (2014): Productions, isolation and characterization of bioactive peptides with antihypertensive properties from rapessed and potato protein, Doctoral thesis in Food Sciences at the university of Turku, ISBN: 798-951-29-5965-5 (pdf).

McCarthy A. L., O' Callaghan Y. C., O' Brien N. M. (2013): Protein hydrolysates from agricultural crops – bioaktivity and potential for functional food development, *Agriculture* 3: 112-130.

Miedzianka J., Peksa A., Antolowska M. (2012): Properties of acetylated potato protein preparations, *Food Chemistry* 133:1283-1291.

Paulová H., Bochořáková H., Táborská E. (2004): Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*, *Chemické listy* 98: 174-179.

Pedroche J., Yust M. M., Girgo-Calle J., Vioque J., Alaiz M., Millián F. (2003): Plant protein hydrolysates and tailor made foods, *Electronic Journal of Enviromental, Agriculturala and Food Chemistry* 2 (1): 233-235.

Peksa A., Miedzinka J. (2014): Amino acid composition of enzymatically hydrolysed potato protein preparations. *Czech J. Food Sci.*, 32: 265–272.

Petterson C. A., Maskus H., Bassett C. M. C. (2010): Fortifying foods with pulses, *Cereal Foods World*, 55 (2): 56-62.

Phillips L. G., German J. B., O'Neill T. E., Foregeding E. A., et al. (1990): Standardized procedur efor measuring foaming properties of three proteins, a collaborative study, *Journal of Food Science* 55: 1441-1444.

Pihlanto A., Akkanen S., Korhonen H. J. (2008): ACE-inhibitory and antioxidant properties of potato (*Solanum tuberosum*), *Food Chemistry*, 109: 104-112.

Pots A. M., Gruppen H., Hessing M., Boekel M. A. J. S., Voragen A. G. J. (1999): Isolation and characterization of patatin isoforms, *Journal Agricultural and Food Chemistry* 47(11): 4587-5492.

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).

Racusen D., Foote M. (1980): A major soluble glykoprotein of potato, *Journal Food Biochemistry* 4: 43-52.

Racusen D., Weller D. L. (1984): Molecular mass of patatin, a major potato tuber protein, *Journal Food Biochemistry* 8: 103-107.

Rybáček V., a kolektiv (1988): Brambory, Státní zemědělské nakladatelství – Praha, str. 360.

Ralet M. - Ch., Guéguen J. (2000): Fractionation of potato proteins: solubility, thermal coagulation and emulsifying properties, *Lebens Wiss Technology* 33: 380-387.

Schaafsma G. (2009): Safety of protein hydrolysates, fractions thereof and bioactive peptides in human nutrition, *European Journal of Clinical Nutrition*, 63: 1161-1168.

Smith D. M., Cutbertson J. D.(2000): Proteins: Functional properties, In: *Advances in Potato Chemistry and Technology*, second edition, Academic Press is an imprint of Elsevier.

Stanisavljević S. N., Vukotič G. N., Pastor F. T., Sužnjević D., Jovanović Ž. S., Strahinić I. D., Fira D. A., Radović S. S. (2015): Antioxidant activity of pea protein hydrolysates produced by batch fermentation with lactic acid bacteria, *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 67(3): 1033-1042.

Suková I. (2008): Bílkovina z brambor Promish 204 PTM, *Agronavigátor*, článek 81722.

Štulík K., a kolektiv (2005): *Analytické separační metody*, Univerzita Karlova, Praha, Karolinum, ISBN: 80-246-0852-9, str. 264.

Vaňha J., Kvasnička F., Prokorátová V. (2002): Detekce sójových bílkovin v masných výrobcích, *Maso* 11 (5): 36 – 39.

Vaňková H. (1999): Peptidové mapy, *Chemické listy* 93: 120-127.

Vodrážka, Z., Rauch, P., Káš, P. (1991): *Enzymologie*, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, ISBN – 80-7080-124-7, str. 245.

Viuque J., Sanchez-Vioque R., Clemente A., Pedroche J., Millán F. (2000): Partially hydrolyzed Rapeseed protein isolates with improved functional properties, *JAACS* 77: 447-450.

Waglay A., Karboune S., Alli I. (2014): Potato protein isolates: Recovery and characterization of their properties, *Food Chemistry* 142: 373-382.

Walmsley S. J., Rudnick P. A., Liang Y., Dong Q., Stein S. E., Nesvizhskii A. I. (2013): Comprehensive analysis of protein digestion using six trypsins reveals the origin of trypsin as a significant source of variability in proteomics, *Journal Proteome Res.*, 12(12): 5666-5680.

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 1radical scavenging ability, *Journal Agricultural Food Chemistry*, 56 (23): 9186-9192.

Ostatní zdroje

Molín R., Pánek J., Miyahara M.: Vitana Food Ingredients, Bílkovinné hydrolyzáty v potravinách, [online]. [cit. 15. 1. 2016]. Dostupné na: <http://www.bujon.cz/wp-content/uploads/2014/11/VFI_HYDROLYZATY_CZ.pdf>, staženo dne 15. 1. 2016.

Patterson C. A. (2008): Bioactive proteins and peptides: Essential, functional and beneficial, Agriculture and Agri-Food Canada, [online]. [cit. 15. 12. 2015]. Dostupné na: <http://www5.agr.gc.ca/resources/prod/doc/misb/fb-ba/nutra/pdf/proteins_peptides_eng.pdf>, staženo dne 10. 12. 2015.

Pazourek J. (2003): Moderní elektroforetické analytické metody (přednášky pro magisterské studium), skripta [online]. [cit. 10. 4. 2016]. Dostupné na: <https://faf.vfu.cz/pub-files/ustavy/ustav-chemickyh-leciv/vyuka->

predmetu/analyticka-chemie-i-ii/separacni-metody---elektroforeza.pdf, staženo dne 10. 4. 2016.

Roquette [online]. [cit. 25. 3. 2016]. Dostupné na: <<http://www.roquette-animalnutrition.com/tubermine-potato-protein-animal-feed-potato-juice-amino-acids-lysine-745/>>, citováno dne 25. 3. 2016.

Satur-Plus [online]. [cit. 25. 3. 2016]. Dostupné na: <<http://www.satur-plus.cz/page/cz/bramborovy-protein.html>>, citováno dne 25. 3. 2016.

Sigma-aldrich-subtilisin [online]. [cit. 20. 3. 2016]. Dostupné na: <<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/subtilisin.html>>, staženo dne 20. 3. 2015.

Tereos Syral [online]. [cit. 25. 3. 2016]. Dostupné na: <<http://www.tereos-starchsweeteners.com/animal-nutrition/product-finder>>, citováno dne 25. 3. 2016.

Přílohová část

Složení 1 M zásobního roztoku pufru TRIS - HCl (pH 7):

- 12,14 g TRIS (Tris base) bylo naváženo do 150 mg kádinky a rozpuštěno v 80 ml destilované vody. Následně v digestoři bylo upraveno pH na hodnotu 7 pomocí kyseliny HCl. Objem roztoku byl doplněn destilovanou vodou na 100 ml. Zásobní roztok pufru se uchovával v uzavřené skleněné doze v ledničce.

Složení 1 M zásobního roztoku pufru TRIS - HCl (pH 8):

- 12,14 g TRIS (Tris base) bylo naváženo do 150 mg kádinky a rozpuštěno v 80 ml destilované vody. Následně v digestoři bylo upraveno pH na hodnotu 8 pomocí kyseliny HCl. Objem roztoku byl doplněn destilovanou vodou na 100 ml. Zásobní roztok pufru se uchovával v uzavřené skleněné doze v ledničce.

Příprava radikálu DPPH

- 0,025 g radikálu DPPH bylo rozpuštěno v metanolu, kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky a doplněno po rysku, poté uloženo do tmy do ledničky ($c = 0,000634 \text{ mol/l}$).

Příprava kalibračních roztoků standartu TROLOXu

- 0,0501 g Troloxu bylo rozpuštěno v 80 % metanolu, kvantitativně převedeno do 100 ml kádinky a doplněno po rysku. V tabulce číslo 3 jsou uvedeny koncentrace kalibračních roztoků a jejich příprava

Tabulka číslo 5: Kalibrační roztoky standartu TROLOXu.

TROLOX (μl)	Metanol (μl)	Koncentrace roztoku (mmol/l)	Absorbance
0	500	0	
25	475	0,1	0,762
50	450	0,2	0,644
75	425	0,3	0,578
100	400	0,4	0,534
150	350	0,6	0,422
200	300	0,8	0,345
250	250	1,0	0,180
300	200	1,2	0,128
350	150	1,4	0,092
400	100	1,6	0,053
450	50	1,8	0,047
500	0	2,0	0,044

Příprava pracovního roztoku

- Odebralo se 10 ml zásobního roztoku DPPH, doplnilo do odměrné 100 baňky po rysku ($c = 0,0000634 \text{ mol/l}$).