

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4131 Zemědělství
Studijní obor: Zemědělství
Katedra: Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné
Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Zpracování výlisků semen tykve olejné (*Cucurbita pepo L.*) na mouku a bílkovinný koncentrát

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

České Budějovice, 2020

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zemědělská fakulta

Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Ema PEŠKOVÁ
Osobní číslo: Z17358
Studijní program: B4131 Zemědělství
Studijní obor: Zemědělství – Zpracování produktů
Téma práce: Zpracování výlisků semen tykve olejné (*Cucurbita pepo* L.) na mouku a bílkovinný koncentrát
Zadávající katedra: Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Zásady pro vypracování

Tykve olejná je minoritní olejina, která je pěstována pro semeno obsahující kvalitní kulinářsky ceněný olej. Převažující mastnou kyselinou v oleji je linolová kyselina, patřící do omega-6 řady. Olej se většinou získává lisováním za studena. Zbytek semen po lisování oleje (semenné výlisky, koláč) obsahuje řadu cenných látek – bílkoviny, vlákninu, minerální látky a další bioaktivní látky. Semeno je považováno za zdroj zinku a jeho konzumace je doporučována jako prevence onemocnění prostaty. Cílem práce bude zpracování semen tykve olejné na mouku a bílkovinný koncentrát a hodnocení jejich vybraných vlastností.

Semena tykve olejné (1-2 odrůd) budou pomleta, upravena před vlastním lisováním a následně podrobena vylišování oleje. Vzniklé výlisky budou následně opětovně pomlety a mechanicky prosévány pomocí sít s různou velikostí ok. Získané frakce mouk budou hodnoceny z pohledu obsahu N látek a vybrané frakce budou následně použity pro přípravu bílkovinného koncentráту pomocí solubilizčních nebo precipitačních technik. Získané bílkovinné koncentráty budou usušeny. Následně budou u získaných mouk a koncentrátů hodnoceny jejich chemické a funkční vlastnosti jako jsou: obsah sušiny, obsah N látek a bílkovin, obsah zbytkového tuku, rozpustnost, vazba vody a tuku, pěnivost, emulgační schopnost a případně další charakteristiky.

Získaná data budou statisticky vyhodnocena a budou zpracována do podoby tabulek či grafů.

BP bude členěna způsobem, který je obvyklý pro práci experimentálního charakteru. Jednotlivé části BP budou následující: úvod, literární přehled, cíl práce, materiál a metody, výsledky, diskuzi, závěr a seznam literárních a ostatních pramenů.

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

Rozsah pracovní zprávy: 30 – 35 stran
Rozsah grafických prací: 5 stran
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

Strašil Z. (2011): Tykev olejná (Cucurbita pepo, var. oleifera). In Moudrý J. (ed.): Alternativní plodiny. Profi Press, Praha, 142 s. (ISBN 978-80-86726-40-3)
Rezig L. et al. (2016): Functional properties of protein fractions obtained from pumpkin (Cucurbita maxima) seed. International Journal of Food Properties 19: 1972-1986.

Pham T. T. et al. (2017): Effects of PH and salt concentration on functional properties of pumpkin seed protein fractions. Journal of Food Processing and Preservation 41: e13073.

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.
Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Datum zadání bakalářské práce: 25. února 2019
Termín odevzdání bakalářské práce: 15. dubna 2020

V Českých Budějovicích dne 25. února 2019



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

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentůvská 1998, 370 05 České Budějovice

L.S.



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

Prohlášení

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

V Českých Budějovicích dne:

.....
Podpis studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala mému vedoucímu práce doc. Ing. Janu Bártovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, rady, ochotu, ale i připomínky, které mi pomohly se zpracováním této bakalářské práce. Dále bych ráda velice poděkovala Ing. Markétě Jarošové, která mi i přes velké množství mých dotazů pokaždé vycházela vstříc a pomáhala mi. Také velmi děkuji své rodině za důvěru a podporu.

Abstrakt

Cílem této bakalářské práce bylo zhodnocení chemických a funkčních vlastností tykvané mouky a z mouky vytvořených frakcí dle jemnosti částic nad 250; 250-180; pod 180 mikronů a výroba tykvanového proteinového koncentráту. Mouka byla vytvořena z výlisků tykve olejné (*Cucurbita pepo L.*). Z chemických vlastností byl zjišťován obsah dusíkatých látek. Nejvyšší obsah byl zjištěn u proteinového koncentráту a to 80,3 %. Mouka a její frakce dosahovaly podobného obsahu, a to v rozmezí od 52 do 54 %. Obsah sušiny byl u mouky a jejích frakcí také velice podobný a to kolem 93 %. Obsah sušiny u koncentráту nebyl zjišťován. Zbytkový tuk se nejvíce nacházel v nejjemnější frakci s obsahem 14,8 %. Naopak nejméně zbytkového tuku obsahovala nejhrubší frakce a to 8,9 %. Obsah bílkovin, které byly zjišťovány metodou BCA dosahoval proteinový koncentrát a to 97,6 %. Druhý nejvyšší obsah bílkovin obsahovala nejjemnější frakce 180 μm , a to 50,7 %. Naopak nejnižší obsah vykazovala nejhrubší frakce 250 μm s obsahem bílkovin 9,61 %. Díky metodě SDS PAGE bylo zjištěno, že nejvíce zastoupenou proteinovou frakcí tykvanového proteinu je globulin 11S, který se nazývá cucurbitin. Ten je tvořen šesti kyselými a zásaditými podjednotkami. Z funkčních vlastností byla zjišťována rozpustnost ve vodě, která byla nejvyšší u proteinového koncentráту 39,4 %. Rozpustnost frakcí a mouky byla kolem 18,5 %. Vaznost vody byla znovu nejvyšší u proteinového koncentráту 3,1 g vody/ g sušiny. Vaznost vody mouk a frakcí se pohybovala od 1,2 – 1,5 g vody/ g sušiny. Proteinový koncentrát vykazoval i nejvyšší vaznost tuku s výsledky 3,1 g tuku/ g sušiny. Výsledky vaznosti tuku mouky a frakcí byly 0,6 g tuku/ g sušiny. Také byla zkoumána emulgační aktivita. V této vlastnosti dosáhl nejlepších výsledků také proteinový koncentrát (22,6 m^2/g). Frakce 250 μm (7,96 m^2/g) dosáhla nejnižších výsledků.

Klíčová slova: tykvanový proteinový koncentrát, funkční vlastnosti tykvané mouky, odtučněná tykvanová mouka, dusíkaté látky, tykvanové výlisky

Abstract

The aim of this bachelor thesis was to evaluate the chemical and functional properties of defatted pumpkin seed flour. This flour was divided into fractions based on the particle sizes: more than 250; 250-180; below 180 μm . The pumpkin protein concentrate was also made. The flour was made from fluted pumpkin (*Cucurbita pepo L.*). The content of nitrogenous substances was determined as a part of chemical properties. The highest content was found in protein concentrate 80.3 %. The flour and its fractions reached a similar content, ranging from 52 to 54 %. The dry matter content of the flour and its fractions was also very similar, around 93 %. The dry matter content of the concentrate was not determined. The residual fat was mostly found in the finest fraction with a content of 14.8 %. The 250 μm fraction contained the least residual fat 8.9 %. The content of proteins, which were determined by the BCA method, reached 97.6 % in the protein concentrate. The second highest protein content was found in the finest fraction 180 μm , namely 50.7 %. The lowest content was found in the fraction 250 μm with a protein content of 9.61 %. Thanks to the SDS PAGE method, it was found that the most represented protein fraction of pumpkin protein is globulin 11S, which is called cucurbitin. It consists of six acidic and basic subunits. As the functional property, the solubility was determined. The highest content was found in the protein concentrate 39.4 %. The solubility of fractions and flour was about 18.5 %. Water binding was again highest in the protein concentrate 3.1 g of water / g of dry matter. The water binding of flour and fractions ranged from 1.2 - 1.5 g of water / g of dry matter. The protein concentrate also showed the highest fat binding with results of 3.1 g of fat / g of dry matter. The fat binding results of the flour and fractions were 0.6 g of fat / g of dry matter. Emulsification ability was also examined. The protein concentrate also achieved the best results (22.6 m^2 / g). The 250 μm fraction achieved the lowest results (7.96 m^2 / g).

Key words: pumpkin protein concentrate, functional properties of pumpkin flour, defatted pumpkin flour, nitrogenous substances, fluted pumpkin

OBSAH

1 ÚVOD	10
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
2.1 Botanická charakteristika	11
2.2 Hospodářská charakteristika.....	12
2.2.1 Pěstování	12
2.2.2 Sklizeň.....	12
2.2.3 Posklizňová úprava	12
2.2.4 Lisování oleje	12
2.3 Chemické vlastnosti tykvového semene	13
2.3.1 Tykvový olej	13
2.3.2 Sacharidy	14
2.3.3 Proteiny	15
2.3.4 Přínos tykvového semene na lidské zdraví	15
2.4 Funkční vlastnosti	18
2.4.1 Emulgační aktivita.....	18
2.4.2 Rozpustnost	20
2.4.3 Pěnovost	21
2.4.4 Vaznost.....	21
2.5 Tykvový proteinový izolát	21
3 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	23
4 MATERIÁL A METODY	24
4.1 Příprava materiálu	24
4.2 Laboratorní metody	25
4.2.1 Stanovení obsahu sušiny	25
4.2.2 Extrakce proteinu	25
4.2.3 Stanovení obsahu dusíkatých látek	25
4.2.4 Stanovení proteinu bicinchoninovou metodou.....	26
4.2.5 SDS PAGE	27
4.2.6 Stanovení zbytkového tuku	29
4.2.7 Stanovení funkčních vlastností.....	29
4.2.8 Vyhodnocení výsledků.....	30
5 VÝSLEDKY.....	32
5.1 Obsah sušiny	32
5.2 Vaznost vody.....	32
5.3 Vaznost tuku.....	33

5.4 Rozpustnost	34
5.5 Emulgační aktivita.....	35
5.6 Obsah zbytkového tuku	36
5.7 Obsah dusíkatých látek.....	37
5.8 Obsah bílkovin	38
5.9 Elektroforetická analýza bílkovinných profilů dle velikostních frakcí a proteinového koncentrátu	40
6. DISKUZE	40
6.1 Obsah dusíkatých látek a bílkovin	41
6.2 Spektra extrahovaných proteinů	42
6.3 Funkční vlastnosti	42
6.4 Obsah zbytkového tuku	44
7. ZÁVĚR	46
8. POUŽITÁ LITERATURA	48
9. PŘÍLOHY	51

1 ÚVOD

Tykev olejná je minoritní plodina, která se těší velké oblibě ve Štýrsku. Olej tmavozeleného zbarvení s oříškovou chutí se získává z bezslupkatých semen a má největší využití ve studené kuchyni. Je bohatý na omega 3 mastné kyseliny, tokoferol a jeho konzumace má pozitivní účinky na lidské zdraví. Při jeho lisování nám jako odpadní produkt vznikají výlisky – pokrutiny. Ty většinou slouží jako krmivo hospodářských zvířat, nebo jako biopalivo. Namleté výlisky by se však také daly využívat jako mouky do bezlepkových potravin, nebo pro zlepšení nutričních vlastností běžného pečiva. Tykvová mouka z výlisků semen je totiž bohatá na bílkoviny, vlákninu, vitamíny a minerály jako je železo, mangan, hořčík nebo zinek. Velké množství kvalitních bílkovin a skladba aminokyselin ji ovšem předurčuje i k výrobě bílkovinných koncentrátů.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Botanická charakteristika

Tykev olejná – *Cucurbita pepo*, var. *oleifera*

Tykev olejná vznikla spontánní mutací tykve obecné v Americe, avšak dnes je hojná po celém světě. Je cizosprašná, keříčkovitého charakteru jednoletá, jednodomá a řadíme ji do čeledi tykvovitých – *Cucurbitaceae*. Její kořenový systém je velice bohatý, vzrůst je bujný. Na její hranaté lodyze se nacházejí drsné chloupky. Listy jsou tvaru srdčité vejčitého až dlanitě pětiklaného, jsou velké a řapíkaté. Její květ je žlutý, na jedné rostlině se nachází více květů, avšak vzniknou pouze 2-4 plody = bobule (Strašil, 2011). Plochá eliptická nahá, snadno rozdrtitelná zrna různých barev (bílá, žlutá, šedozelená i černá) obsahují v průměru 54% oleje (Strašil, 2011, Bavec et al., 2007).

Tykev olejná je plodina s krátkou vegetační dobou (+-120 dní) a je náročná na teplotu i živiny. Dokáže ji zničit i slabý mraz. Cílem jejího pěstování je vysoký výnos semen, se značnou výživovou hodnotou (bohatost na olej a bílkoviny). Semena jsou vhodná jak pro přímý konzum, výrobu oleje i průmyslové zpracování. Obsah dusíkatých látek se pohybuje okolo 32-38 %, 3-5 % tvoří sacharidy, 2-4 % vláknina a 4-6 % minerální látky jako je fosfor, hořčík a draslík (Strašil 2011, Bavec et al., 2007).

Obrázek 1: Plod tykve olejné



Zdroj: <https://www.bobby-seeds.com/olkurbis>

2.2 Hospodářská charakteristika

2.2.1 Pěstování

Tykev je vynikající předplodinou pro pšenici a kukuřici, ale můžeme ji zařazovat i po vojtěšce. Tykev olejná nemá velké nároky na předplodinu, avšak neměla by se zařazovat minimálně 4 roky po okurkách (z důvodu nemocí, které s nimi dokáže sdílet). Naopak je vhodné ji sázet po luštěninách nebo jeteli. Půdu má ráda záhřevnou humózní hlinitou až písčité hlinitou. Co se týče předset'ové přípravy, tak ta je obdobná jako u okopanin. To znamená podmítka, aplikace stájových hnojiv a orba. Semínka tykve se sejí do půdy s minimálním sklonem, nebo se sklonem k jihu či jihovýchodu. Vysévá se do hloubky zhruba 2-3 cm, se vzdáleností řádků 140-150 cm a vzdálenost v řádku 40 cm. Teplota půdy by měla být 12 °C v 10cm. Je tedy vhodné ji sít až po 10. květnu (Stražil 2011, Bavec et al., 2007).

2.2.2 Sklizeň

Je-li plně zralá poznáme po rozkrojení plodu. Lehce se oddělují semena a mají tmavozelenou barvu. Šípovým shrnovačem se oddělí plod od lodyhy, to přispěje k rychlejšímu fyziologickému dozrání. Po šesti dnech následuje vlastní sklizeň, která se provádí sklízecím strojem, který sbírá plody ležící v řádku, drtí je a odděluje jádra, která putují do zásobníku. Dužina se po sklizni vrací zpátky na pozemek. Průměrný výnos semene v ČR je 0,5t/ha (Stražil, 2011, Bavec et al., 2007).

2.2.3 Posklizňová úprava

Po sklizni je nutné semena do šesti hodin vyprat ve speciální pračce, osušit na vlhkost do 8 - 10 % a nakonec zchladit. Semena se suší při 40 – 60 °C. Takto neošetřená semena se nedají skladovat, došlo by ke snížení jejich kvality. Je nutné se vyvarovat poškození semen, z důvodu následného žluknutí oleje (Stražil, 2011, Bavec et al., 2007).

2.2.4 Lisování oleje

Lisování je proces, při kterém se odděluje kapalná fáze (z rostlinných pletiv) od pevné fáze (buněk) za působení tlaku. Při tomto procesu nám vzniká rostlinný olej a v ced'áku lisu zůstávají výlisky-pokrutiny. Předcházejícím procesem samotného lisování je čištění semen, třídění, poté bývá odslupkováno, avšak u tykve olejné, která je bezslupkatá to není potřeba. Dále dezintegrace – rozmělnění semene, tento krok

ovlivňuje výtěžnost oleje při lisování, stejně tak jako nadcházející klimatizace – kondicionace semene za působení tepla a páry, které poruší buněčnou stěnu. (Filip et al., 2013)

Pro výrobu oleje z tykvových semen se používají dva lisovací postupy. Tradiční „horký“ a nový lisování za studena. Tradiční lisovací metoda zahrnuje mletí tykvových semen v kamenném mlýně, homogenizaci mletých semen vodou a solí (asi 50 kg semen, 6 l vody, 250 g soli), pražení mletých semen (na pánvi při teplotě 100 až 130 ° C). Tento postup vede k tmavě zlato zelenému až okrově červenému zbarvenému oleji s kořenitou vůní. Nová metoda lisování za studena, je založena pouze na mechanickém lisování suchých semen bez pražení nebo chemického zpracování ošetření. Výtěžek oleje je asi o 10% nižší, ale je vyšší kvality a bohatý na antioxidantní látky. Změny v chemickém složení tykvového semene během pražení ovlivňují aroma oleje, a to díky pyrazinům (Bavec et al., 2007)

Průměrné náklady na pěstování, sklizeň a zpracování tykve jsou v ČR 36 203 Kč/ha. (Stražil, 2011)

2.3 Chemické vlastnosti tykvového semene

2.3.1 Tykvový olej

Obliba tohoto oleje v poslední době narůstá. Ve Štýrsku, které se pěstováním tykve olejné a jejím následným zpracováním na olej zabývá, je jeden z nejoblíbenějších. Získává se pražením a následným lisováním semen, získaný olej má tmavou zelenou barvu (díky obsahu chlorofylu a karotenoidů) a chutná po oříšcích (Brát, 2018). Má vysoký obsah volných mastných kyselin. Složení mastných kyselin je závislé na mnoha faktorech. Například na oblastech, kde je tykev pěstována, klimatu - pro evropské odrůdy je obsah oleje kolem 54,9 %, egyptské odrůdy mají průměrně 51,0 % a ostatní odrůdy z Afriky 21,9 - 35,0 % obsah oleje (Ardabilil et al., 2011). Dále záleží na zralosti při sklizni a odrůdě dané tykve. Například olej z odrůdy Berettina obsahuje větší množství kyseliny olejové (41 %) než linolové (37 %). Naopak odrůda Procida je bohatá na kyselinu linolovou (58,6 %) a má menší zastoupení kyseliny olejové (44,3 %) (Montesano et al., 2018). Obecně vzato, tykvová semínka obsahují nejvíce nenasycených mastných kyselin 73,1 % - 80,7 % a to

zejména kyselinu linolovou (39,8 - 64 %) a olejovou (20-38 %). Co se týče nasycených mastných kyselin, tak semeno tykve jich obsahuje kolem 19 % a jsou tvořeny především kyselinou palmitovou (13 %) a stearovou (6 %) (Tyszkeiwcz et al., 2012). Tento olej je bohatý na omega 6 mastné kyseliny, ovšem omega 3 mastné kyseliny v něm nenajdeme. Převládá u něj kyselina linolová a na druhém místě kyselina olejová. Tento olej je bohatý na karotenoidy, tokoferol = vitamín E. Olej není vhodný na vaření kvůli své barvě a tvorbě pěny, spíše se tedy hodí do studené kuchyně (Tyszkeiwcz et al., 2012). Jak je zřejmé, vzhledem ke svému profilu mastných kyselin leží v linoleové - olejové skupině, jako jsou oleje z bavlny, kukuřičné, sezamové, slunečnicové a sójové oleje (Ardabilil et al., 2011).

Stabilita tykvového oleje je poměrně vysoká. Studie zabývající se stabilitou olejů ze 12 kultivarů ukázala na jeho vysoký potenciál. Nižší oxidační stabilitu vykazuje tykvový olej lisován za studena než ten, jehož semena byla před lisováním upražená (Naziril et al., 2016, Stevenson et al., 2007). Peroxidové číslo tykvového oleje je kolem 10,85 meq O₂ / kg oleje. Žluklý olej má peroxidové číslo nad 20 meq / kg (Ardabilil et al., 2011). Doba použitelnosti olejů je závislá na podmínkách skladování. Ideální je skladování v suchu, temnu a chladu. (Naziril et al., 2016).

Obrázek 2: Tykvový olej



Zdroj:<https://styl.instory.cz/zdravi/1086-dynovy-olej-je-lahodny-a-zdravy.html>

2.3.2 Sacharidy

Obsah sacharidů je v semenech tykve spíše zanedbatelný. Pohybuje se od tří procent do deseti procent. Semeno tykve neobsahuje fruktózu. Byla v nich nalezena především sacharóza (17,9 g / kg); rafinóza (4,1 g / kg); stachyóza (8,1 g / kg); (Tyszkeiwcz et al., 2012, Moudrý 2011). Avšak mnohem vyšší obsah sacharidů byl

nalezen v tykvi obecné pěstované v Íránu a to $25,2 \pm 3,3$ % . Což je srovnatelný obsah sacharidů s kešu ořechy – 26 % (Ardabilil et al., 2011).

2.3.3 Proteiny

Tykvové proteiny se získávají během extrakce oleje, kdy vzniká olejový koláč (výlisky) jako vedlejší produkt a dochází ke zvýšení obsahu proteinu, což z výlisků činí bohatý zdroj proteinů. Obsah proteinů v semenech se pohybuje od 31-51 % a je dán odrůdou. Jejich obsah je tedy vyšší, než u ostatních olejnatých semen, jako jsou například ořechy kešu (22,8 %), bavlněné semeno (21,9 %), sezam (18,7 %) (Ardabilil et al., 2011, Tyszkiewicz et al., 2012). 59 % bílkovin u tykvového semene je složeno ze dvou hlavních proteinových frakcí, a to globulinů a albuminů (Bučko et al., 2018). Semeno tykve jsou také bohatým zdrojem aminokyselin. Složení aminokyselin se nachází v následující tabulce. Poslední sloupec je věnován proteinovému sójovému izolátu pro srovnání s aminokyselinami tykve. (Apostol et al., 2018).

Tabulka 1: Porovnání obsahu aminokyselin v odtučněné tykvové mouce vs v sójovém proteinovém izolátu

Aminokyselina	Obsah AMK/100g odtučněné tykvové mouky	FAO/WHO/UNO	Chemické skóre (%) AMK tykve	Sójový proteinový izolát, obsah AMK/ 100g
Valin	5,69	3,5	162,6	5
Histidin	2,84	1,9	149,5	2,6
Izoleucin	3,93	2,8	140,4	4,8
Leucin	7,32	6,6	110,9	8,1
Threonin	3,76	3,4	110,6	3,8
Methionin	2,26	2,2	102,7	1,3
Fenylalanin	5,1	6,3	81*	5,2
Lysin	3,95	5,8	68,1*	6,2

* limitující aminokyseliny

Zdroj: Apostol et al., 2018, World health organization 2007

2.3.4 Přínos tykvového semene na lidské zdraví

Semena tykve (*Cucurbita sp.*), které se nevyužijí na výrobu oleje se obecně považují za zemědělsko-průmyslový odpad. V některých částech světa jsou semena spotřebována syrová, pečená nebo vařená, ale pouze v domácím měřítku. Avšak díky vysokému obsahu proteinu, vlákniny, minerálů, polynenasycených mastných kyselin a fytoosterolu jsou považována za cenné pro potravinářský průmysl. Potravinářské společnosti experimentují s jejich začleněním do komerčního potravinářského sektoru a spotřebitelé o ně projevují zájem. Dále je to díky jejich prospěšným účinkům na játra,

prostatu, močový měchýř, hladinu glukózy v krvi, imunitu, cholesterol, deprese, poruchy učení a inhibici parazitů v těle (Patel, 2013).

Tykvové proteiny

Výlisky z tykve obsahují průměrně 43 % proteinu. Tyto výlisky obsahují značné množství esenciálních aminokyselin. Tyto aminokyseliny jsou pro zdraví člověka velmi důležité, jelikož si je tělo nedokáže samo syntetizovat, zároveň tvoří proteiny, které zajišťují funkce lidského těla. Leucin má příznivé účinky na kůži, kosti, hojení ran a podporuje syntézu růstového hormonu. Valin je nezbytný pro svalové bílkoviny. Izoleucin je nepostradatelný pro syntézu hemoglobinu v červených krvinkách. (Apostol et al., 2018).

Aminokyselina arginin, která je také obsažená v semenech dýně, má vliv na vylučovací soustavu. Bylo tak zjištěno při pokusu s potkany, kteří dostávali ve vodě rozpustný extrakt z tykvových semen a sójových klíčků. Došlo k relaxaci a zvýšení objemu močového měchýře, poklesu tlaku v močovém měchýři a snížené frekvenci močení (Tyszkiewicz et al., 2012). Některé frakce proteinů vykazují dokonce antimykotickou, antibakteriální, antioxidační, protizánětlivou, antifungální a antiparazitní aktivitu (Montesano et al., 2018, Apostol et al., 2018).

Hlavním zásobním proteinem v tykvovém semeni je protein zvaný cucurbitin, který patří do skupiny globulinů (11 S). Cucurbitin je hexametrický globulární protein o molekulové hmotnosti 54 kDa. Je složen z kyselých (33 kDa) a bazických (22 kDa) podjednotek, které jsou spojeny disulfidickou vazbou (Ozuna a León-Galván, 2017; Rezig et al., 2013).

Tykvový olej

Co se týče působení tykvového oleje na lidský organismus, bylo zjištěno, že monoenoové mastné kyseliny (především kyselina olejová) mají pozitivní vliv na snižování LDL cholesterolu, avšak zároveň dokáží zvyšovat HDL cholesterol (Montesano et al., 2018). Tykvový olej je také velmi účinný v hojení povrchových ran a to díky obsahu tokoferolu, mastných kyselin a fytosterolů. Zjistila to studie, při které byli potkani rozděleni do tří skupin a léčeni těmito způsoby: 1. skupina - neléčená, 2. skupina léčena přípravkem Cicafolia cream, 3. skupina - léčena extrahovaným olejem z tykve. Poslední skupina, léčena extrahovaným tykvovým olejem měla nejlépe a

nejrychleji zhojené rány (Bardaa et al., 2016). V dalších experimentech se zvířaty bylo zjištěno, že tykvový olej a tykvová semínka významně snížily hmotnost prostaty, avšak použité dávky však byly vyšší, než jsou používána u lidí k terapeutickým účelům (Tyszkiewicz et al., 2012).

Výhodné je i užívání tykvového oleje u žen v menopauze, které mají vyšší pravděpodobnost hypertenze (vyšší tlak), než muži v odpovídajícím věku. Výsledky ze studií prokázaly antihypertenzivní účinky oleje z tykvových semen. Došlo ke snížení krevního tlaku aorty, který je klinicky důležitější než brachiální krevní tlak. Konzumace oleje ze semen tykve tedy může zpozdit nástup a progresi hypertenze (Wonga et al., 2019).

Vitamíny

Samotné tykvové semeno je bohaté na antioxidant tokoferol, tedy vitamín E (15,9mg/100g), ten chrání buňky před oxidačním stresem a volnými radikály. Tykvové semeno je také dobrým zdrojem vitamínu K. Je bohaté na významný karotenoid lutein (50 %) a betakaroten (10-12 %), který snižuje riziko poškození kůže při vystavení slunci a funguje i jako protizánětlivé činidlo. Z jedné molekuly betakarotenu vznikají dvě molekuly vitamínu A. Obsahuje i alfakaroten, který zpomaluje proces stárnutí, snižuje riziko šedého zákalu a slouží jako prevence nádorů. Dále jsou přítomny vitaminy skupiny B: thiamin 6,89; riboflavin 2,47; niacin 61,43; pyridoxin 4,92; kyselina pantothenová 4,95 (mg / kg) (Apostol et al., 2018, Tyszkiewicz et al., 2012).

Minerály

Odtučněná mouka obsahuje vysoké množství minerálních látek. Celkový obsah popelovin se pohybuje okolo 5,3 %. Sto gramů odtučněné tykvové mouky obsahuje více než je denní doporučená dávka železa, hořčíku, manganu, mědi, zinku a čtvrtinu doporučené denní dávky draslíku. Má vysoký obsah selenu 0,08-0,4 µg/g. Některé zdroje uvádí až 1,29 µg/g (Apostol et al., 2018, Tyszkiewicz et al., 2012, Ardabilil et al., 2011).

Tabulka 2: Obsah minerálních prvků v mouce

minerální prvky	obsah v odtučněné mouce mg/100g
draslík	1 290
hořčík	697
vápník	127
železo	87,80
sodík	19,50
zinek	11,5
mangan	8,20
měď	2,30

Zdroj: Apostol et al., 2018

2.4 Funkční vlastnosti

Proteiny jsou základní funkční složky v řadě potravinářských výrobků. Funkční vlastnosti proteinů jsou fyzikálně-chemické vlastnosti proteinů, které ovlivňují chování v potravinách během přípravy, zpracování, skladování a přispívají ke kvalitativním a sensorickým vlastnostem potravinových produktů. Mezi nejdůležitější funkční vlastnosti proteinů patří: rozpustnost, schopnost vázat vodu a tuk, emulgační a pěnové vlastnosti (Zayas, 1997). Pěnicí a emulgační schopnost pomáhá zlepšit strukturu a vzhled potravin (Rezig et.al., 2016).

2.4.1 Emulgační aktivita

Emulze je definována jako disperze dvou nebo více nemísitelných kapalin. Jedna z kapalin je rozptýlena ve druhé ve formě malých kapiček o velikosti 0,1 – 100 μm . Pro potravinářský průmysl je typická emulze oleje ve vodě (např.: mléko, majonéza) nebo emulze vody v oleji v případě margarínu a másla. Emulze jsou vytvářeny pomocí emulgátoru, který je obsahuje molekuly hydrofobní tak hydrofilní (Lam a Nickerson, 2013). Emulgátory vytvářejí kolem dispergovaných kapiček viskoelastické filmy, jenž udrží emulze časově stabilní (Goldstein a Seetharaman, 2011). Emulgátory mohou být ve formě syntetických nízkomolekulárních látek (monoglyceridů), esterů sacharózy, polyglycerolových esterů, nebo přírodní (sojové a vaječné lecitiny). Můžou se také skládat z makromolekul, jako jsou proteiny. Mezi běžně používané proteiny v potravinářském průmyslu patří: syrovátkový proteinový izolát, ovoalbumin a hovězí sérový albumin. Začínají se používat i proteinové složky z luštěnin (fazole, čočka, hrách a cizrna) a olejnatých semen (Lam a Nickerson, 2013).

Většina potravinářských výrobků vzniká na bázi emulze nebo pěny. Jejich stabilita závisí na typu použitého emulgátoru. Proteiny se obecně používají jako potravinové přísady pro jejich funkční vlastnosti a pro propůjčení určitých specifických vlastností konečnému výrobku. Tyto vlastnosti jsou fyzikálně-chemické vlastnosti, které ovlivňují chování proteinů v potravinách během zpracování, výroby a skladování. Proteiny se používají v různých potravinářských výrobcích a formulacích jako nutriční, želatinační, emulgační nebo pěnotvorná činidla.

Proteinové emulgátory zlepšují nutriční profil potravin a jejich biologické a organoleptické vlastnosti (jako je barva, textura, chuť atd.). V neposlední řadě mohou být proteiny izolovány z různých druhů levných, obnovitelných a rozšířených surovin, jako jsou luštěniny, obiloviny a olejniny. Využití rostlinných bílkovin pocházejících z olejnatých semen získává na popularitě nad jinými rostlinnými proteiny, jako jsou obilné proteiny, kvůli vysokému obsahu bílkovin, který je u nich dvakrát až čtyřikrát vyšší než u obilných zrn a také díky vyšší výživné hodnotě.

Tykvové proteiny se získávají během extrakce oleje, kdy vznikají vylisky jako vedlejší produkt a dochází ke zvýšení obsahu proteinu z 24 - 36,5 % u tykvového semene, až na 60–65 % ve vyliscích, což z nich činí bohatý zdroj bílkovin. 59 % proteinů je složeno ze dvou hlavních proteinových frakcí, a to 11S globuliny a 2S albuminy

Tykvový protein je zkoumán pro své funkční vlastnosti: rozpustnost, emulgační vlastnosti a povrchové napětí. Funkčnost potravinářských bílkovin je silně ovlivněna několika vnějšími faktory, jako je pH, teplota a iontová síla. V této studii se nepodařilo stabilizovat kapičky emulze na pH 3, i když byla iontová síla zvýšena přidáním NaCl, při pH 5 bez ohledu na iontovou sílu, což naznačuje, že tykvové proteiny v této studii nevykazují žádoucí funkční vlastnosti potravinářského průmyslu. Pro dosažení lepších funkčních vlastností a nutriční hodnoty se musí modifikovat. K tomuto účelu může být použita enzymatická hydrolýza. Provádí se při mírném pH (6–8) a teplotě (40–60 ° C). Vedlejší reakce enzymatický proces je minimalizován, To vede k přijatelným výsledkům ve využití v potravinářském průmyslu. Proteinové hydrolyzáty mají zlepšenou stravitelnost ve srovnání s nativními proteiny (Adrabilil et al., 2011, Rezig et.al. 2016).

Bucko et.al. (2015) uvádí, že isoelektrickou precipitací při zásaditém pH (pH 8), lze získat 94% proteinový izolát. Takto získaný izolát vykazoval nejstabilnější emulze, ale naopak nebyla stabilita při tvorbě krému či pěny.

V další studii, kde byly získány koncentráty albuminu, globulinu a glutelinu z odtučněného semene, se zjistilo, že hlavní proteinovou frakcí v tykvoém semeni byl glutelin následovaný globulinem a albuminem, zatímco obsah prolaminové frakce byl nejnižší. Získaná aminokyselina glutelin měla nejlepší emulgační účinek, a to při nízkém pH (2–3). Úpravou pH nebo přidáním soli se může zlepšit funkční vlastnost těchto třech proteinových koncentrátů. Z této studie vyplývá, že tykvové proteinové koncentráty by mohly být použity jako složky při formulaci nových potravinářských výrobků (Phan et al., 2016).

2.4.2 Rozpustnost

Rozpustnost je důležitým předpokladem pro to, aby protein mohl sloužit jako funkční složka potravin. Poskytuje výhody snadného přidávání a rovnoměrné distribuce proteinů v potravinářských výrobcích. Rozpustnost je fyzikálně-chemická vlastnost proteinu, která velmi ovlivňuje strukturu, barvu a smyslové vlastnosti produktů, včetně emulgace, pěny a tvorby gelů. Rozpustnost je závislá na pH a na iontové síle. Podle studie, která zkoumala funkční vlastnosti proteinových frakcí se proteinové frakce ze semen tykve (*Cucurbita maxima*) ukázaly jako středně rozpustné a jejich rozpustnost je nejlepší za alkalických podmínek (Rezig et.al. 2016).

Ke zlepšení rozpustnosti může pomoci enzymatická hydrolýza, která zvýší rozpustnost proteinů v širším rozmezí hodnot pH (Ozuna et al., 2017).

Tabulka 3: Příklad rozpustnosti koncentráty ve vodě při určitém pH (%)

Koncentrát	pH 10	pH 2
albumin	92,4	26,9
globulin	15	76
glutelin	35	34,1

Zdroj: Phan et al., 2016

2.4.3 Pěnivost

Pěnicí vlastnost proteinu, nám u potravinářských výrobků pomáhá zlepšit strukturu a vzhled potravin. Závisí a je ovlivněná vnějšími faktory, jako je pH, teplota a iontová síla. Ve studii, kde byly použity proteinové frakce extrahované z tykvových semen (*Cucurbita maxima*) deionizovanou vodou, solným roztokem a alkalickým roztokem v zásaditém pH 8, vykazovaly všechny proteinové extrakty špatné pěnicí vlastnosti bez ohledu na iontovou sílu (Rezig et al., 2016).

Jiný autor uvádí, že při přípravě koncentrátů z albuminu, globulinu a glutaminu, bylo prokázáno u albuminu nejlepších pěnicích vlastností (Phan et al., 2016).

2.4.4 Vaznost

Vaznost je schopnost určité složky (například mouky, nebo proteinového izolátu) vázat vodu nebo olej. Bylo zjištěno, že glutelin získaný z odtučněného tykvového semene váže více vody než globulin. Albumin vykazoval nejnižší kapacitu absorpce vody, ale naopak vykazoval nejvyšší absorpční kapacitu oleje. (Phan et al., 2016).

Tabulka 4: Vaznost vody a oleje

koncentrát	OAC* - ml/g	WAC** - ml/g
albumin	6,9	1,36
globulin	3	3,32
glutelin	2,3	3,63

* oil absorption capacity = vaznost oleje

** water absorption capacity = vaznost vody

Zdroj: Phan et al., 2016

2.5 Tykvový proteinový izolát

Nejčastěji se pro izolaci proteinu používá alkalická solubilizace. Která je následována kyselým srážením, dokud nenastane takové pH, v němž se bílkovina - amfion (iont, který ve své molekule obsahuje jak kladný, tak záporný náboj, tudíž je celkový náboj negativní) nepohybuje v elektrickém poli a jeho volný náboj je nulový.

V alkalickém prostředí se protein převádí do roztoku za laboratorní teploty. V prostředí, které se shoduje s hodnotou izoelektrického bodu (pI) a které je kyselé se protein vysráží. Sraženina se od roztoku izoluje odstředěním. Získaná sraženina se znovu rozptýlí v destilované vodě. Nakonec se upravuje pH pomocí NaOH a roztok se suší (Malomo, 2015).

3 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem mé práce bylo:

- zpracování tykve olejně na mouku, její jednotlivé frakce a bílkovinný koncentrát
- u získaných frakcí mouk a bílkovinného koncentrátu zhodnotit chemické vlastnosti, jako například: obsah dusíkatých látek a bílkovin, obsah sušiny, obsah zbytkového tuku
- dále u získaných frakcí mouk a koncentrátu zhodnotit i jejich funkční vlastnosti: vaznost tuku a vody, rozpustnost, emulgační aktivita

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Příprava materiálu

Jako základní materiál byly použity pomleté výlisky (pokrutiny) tykve olejné po lisování oleje. Pomleté výlisky (mouka) byly dodány od moravské společnosti AGRO-EL sídlící ve Znojmě.

Další před úpravou pomletých výlisků bylo síťování na velikostní frakce ve třech opakováních. Síťovány byly vzorky po 100 g přes dvě síta. První síto mělo velikost ok 250 mikronů a druhé mělo velikost ok 180 mikronů. Po prosévání první sítím vznikla velikostní frakce mouky nad 250 mikronů. Po prosévání druhým sítím vznikla velikostní frakce mouky pod 180 mikronů. Mouka, která propadla prvním sítím, ale zároveň nepropadla druhým, měla velikostní frakci od 250 do 180 mikronů. Velikostní frakce byly zváženy a uskladněny v uzavíratelných dózách v lednici.

Příprava proteinového koncentrátu

Do kádinky bylo naváženo 20 g původního vzorku mouky ve třech opakováních. Ke vzorkům bylo přidáno 120 ml deionizované vody, suspenze byla za stálého míchání po dobu 30 minut míchána na magnetické míchačce. Poté bylo upraveno pH suspenze z původních 5,95 na pH 10,00, přidáním 7,5 ml hydroxidu sodného. Suspenze byla rozdělena do čtyř 50 ml tub k odstředění na centrifuze ROTINA 420 R (Hettich, Německo) po dobu 10 minut, při 20 °C a 4500 rpm. Supernatant byl přelit do popsáných kádinek. Pelet byl promyt 5 ml deionizované vody (5 ml d. vody/ 50 ml tubu) a odstředěn, supernatant byl slit k předchozímu. Promytí bylo ještě jednou opakováno. Veškerý supernatant byl filtrován přes filtrační papír Filpap KA 2 - M (VERKON, ČR), aby se zachytil zbylý olej.

Poté bylo upraveno pH zfiltrovaného supernatantu k hodnotě isoelektrického bodu na pH 4 přidáním 2,2 ml 2M HCL. Hodnota pH pro isoelektrickou precipitaci srážení byla zvolena podle autorů Ozuna a Galván, 2017 ve své práci uvádějí hodnotu isoelektrického bodu cucurbitinu při pH 4 - 5). Po vysrážení následovalo odstředění na centrifuze. Pelet neboli vysrážený protein byl rozpuštěn v 10 ml deionizované vody,

zamražen a lyofilizován na lyofilizátoru Alpha 1-4 LSC (Martin Christ, Německo), za následujících podmínek: teplota: -50 °C, tlak: 0,520 mbar, doba: cca 72 h.

4.2 Laboratorní metody

4.2.1 Stanovení obsahu sušiny

Obsah sušiny se stanovoval gravimetricky ve třech opakováních. Vzorky byly navažovány do předem zvážených filtračních sáčků XT4 (Ankom, USA) po 1 g. Následovně byly sušeny v sušárně UN 75 (Memmert, Německo) při 105 °C 3 hodiny a po vychladnutí v exsikátoru zváženy.

4.2.2 Extrakce proteinu

Extrakce vzorků pro stanovení koncentrace bílkovin bicinchoninovou metodou probíhala následně. Vzorky mouk s různými velikostními frakcemi a bílkovinným koncentrátem o navážce 30 mg byly extrahovány v 1 ml extrakčním pufru po dobu 3 hodin na ledu. Extrakční pufr byl připravený smícháním 0,0625M Tris-HCl s 2 % SDS. V průběhu extrakce s extrakčním pufrům byly vzorky každou hodinu promíchány. Poté byla provedena centrifugace při 4°C po dobu 10 minut při 12 000 rpm. Do připravených centrifugačních mikrozkušavek byl odpipetován supernatant. Extrakty byly uchovány před dalšími analýzami v mrazáku při -18°C.

Extrakce vzorků pro elektroforézu SDS-PAGE byla provedena stejným způsobem jako pro stanovení bílkovin, pouze bylo k danému objemu extrakčního pufru přidáno 5 % beta-merkaptoethanolu.

4.2.3 Stanovení obsahu dusíkatých látek

Stanovení obsahu dusíku bylo provedeno pomocí modifikované Dumasovy metody. Ve srovnání s metodou podle Kjeldahla je výrazně rychlejší (proces trvá 3 – 4 minuty), (Jung et al., 2003).

Fungování této metody spočívá ve spalování vzorku v komoře při teplotě 960 °C za přítomnosti kyslíku. Dochází tak k uvolnění oxidu uhličitého, oxidu dusíku a

vody. Speciálními sorpčními kolonami, které pohlcují oxid uhličitý a vodu, jsou hnány plyny. Dusík, který vzniká katalyticky redukcí plynného oxidu dusíku, je detekován tepelně-vodivostním detektorem. Plynné oxidy dusíku jsou katalyticky redukovány na dusík, který je detekován tepelně-vodivostním detektorem. Přepočet koncentrace dusíku ve vzorku na obsah dusíkatých látek se provádí přepočtovým faktorem 6,25 (Elementar, 2019).

Příprava vzorků

Pro analýzu bylo použito 25 mg vzorků zabalených v cínových kapslích. Vzorky byly navažovány ve třech opakováních. Před vlastní analýzou na analyzátoru rapid N cube (Elementar, Německo) se stanovil denní faktor, jako standard se používá kyselina asparagová. Standard byl navážen do kapslí po 25 mg v pěti opakováních. Po stanovení denního faktoru byly vzorky vloženy do autosampleru k vlastnímu stanovení obsahu dusíku.

4.2.4 Stanovení proteinu bicinchoninovou metodou

Tato metoda funguje na základě alkalické redukce měďnatého iontu na měďný pomocí proteinu a následné chelataci měďného iontu kyselinou bicinchoninovou za vzniku purpurového zbarvení. Jak již bylo zmíněno, využívá kyseliny bicinchoninové – BCA, a to ke stanovení celkových proteinů spektrofotometricky (Peč et al., 2008)

Příprava vzorků a stanovení metodou BCA

Bylo připraveno čerstvé pracovní činidlo smícháním 50 dílů *reagentu A* s 1 dílem *reagentu B*. *Reagent A* obsahuje uhličitán sodný, hydrogenuhličitán sodný, kyselinu bicinchoninovou a vinan sodný v 0,1M roztoku hydroxidu sodného. *Reagentem B* je 4 % síran měďnatý. Standardem je bovinní sérový albumin (BSA). Pro analýzu byl použit kit Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA).

Z důvodu vyšší koncentrace proteinu, bylo provedeno ředění vzorků destilovanou vodou, 20 ml u mouk a frakcí a 40 ml u proteinového koncentrátu. Každá varianta extrahovaných proteinů byla provedena ve třech opakováních. Naředěné vzorky byly odebírány o objemu 100 µl do kyvet. Následně bylo přidáno pracovní činidlo o objemu 2000 µl. Po přidání pracovního činidla ke vzorkům se vzorky promíchaly a následovala inkubace při teplotě 37°C po dobu 30 minut. Poté byla

měřena absorbance na přístroji BioMate 5(Thermo Scientific Electron, Anglie) při vlnové délce 562 nm.

4.2.5 SDS PAGE

SDS PAGE je elektroforéza na polyakrylamidovém gelu, která probíhá v prostředí dodecyl síranu sodného = sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE. Tato metoda, která je často využívána v biochemii, ale i v dalších podobných oborech jako je genetika nebo mikrobiologie, je jednou ze základních pro analýzu proteinů. Slouží například pro analýzu čistoty proteinu, stanovení molekulové hmotnosti, k odhadu relativní a absolutní koncentrace sledovaných proteinů v proteinové směsi, sledování purifikačního procesu cílového proteinu, pro detekci proteinových modifikací, či při studiu kvarterní struktury proteinů. Základ fungování SDS – PAGE spočívá v přítomnosti a působení molekul anionického detergentu SDS na proteinový vzorek při jeho přípravě a v gelovém systému při vlastní separaci. Účinkem detergentu SDS = sodiumdodecylsulfátu dochází k rozpadu kvarterní struktury proteinů na jednotlivé proteinové podjednotky. Tyto podjednotky na sebe vážou molekuly SDS v konstantním poměru, kdy je 1,4 g SDS navázáno 1 g polypeptidu. Komplexy SDS-proteinu mají stejnou zápornou hodnotu povrchového náboje a migrují v polyakrylamidovém gelu. Dostávají se ke kladné anodě podle své velikosti.

Jednou z nevýhod této metody je její časová náročnost. Celý průběh od přípravy polyakrylamidových gelů, přes průběh elektroforézy, následné fixace, detekce podoby proteinových pruhů na gelu a odbarvování gelů až po jejich sušení a vyhodnocování výsledků a dat obrazovou analýzou a speciálním softwarem, může zabrat i dny. Další nevýhodou je používání karcinogenního monomeru akrylamidu (Bárta et al., 2010).

Příprava vzorků na SDS PAGE

Mouka, velikostní frakce a lyofilizovaný koncentrát byly zhomogenizovány. Od každé varianty bylo naváženo 25 mg do centrifugačních mikrozkušavek o objemu

2 ml. Precipitát byl extrahován 3 hodiny na ledu v extrakčním pufru (0,0625M Tris-HCl + 2 % SDS). Vzorke byly v průběhu extrakce 2x promíchány. Následná centrifugace probíhala při 4 °C po dobu 10 minut při 12 000 otáčkách.

Po extrakci bylo do nových 1,5 ml centrifugačních mikrozkušavek odpipetováno 40 µl a přidáno 10 µl nanášecího pufru (2-merkapt ethanol). Směs vzorků byla zahřáta v termobloku na teplotu 99°C po dobu 3 minut. Byla zchlazena a nanášena na gel o objemu 5 µl/slot. Jako hmotnostní marker byl použit Blue Protein ladder 5 – 245 kDa (Central European Biosystems, ČR). Gel s nanesenými vzorky byl vložen do vertikální elektroforetické vany s pufrem o složení: 0,192 M glycin + 0,025 M Tris + 0,1% SDS. Vlastní separace byla provedena za podmínek napětí 150 V prvních 30 minut a následně při napětí 200 V po dobu 5 hodin. Z důvodu účinnějšího chlazení byla sestava v průběhu separace umístěna v chladničce.

Pro analýzu proteinových spekter a identifikaci proteinů byla použita denaturační vertikální elektroforéza na polyakrylamidovém gelu SDS-PAGE dle Laemmliho (1970). Byla použita sestava vertikální elektroforézy Hoefer SE 600. Vzorke byly separované na 12 % v separačním gelu a 3,75 % v zaostřovacím gelu. Zaostřovací gel byl vytvořen a použit až po zatuhnutí separačního gelu. Složení separačního gelu bylo následující: 36,7 ml destilované vody, 31,9 ml akrylamidu, 10 ml pufru A, 800 µl sodiumdodecylsulfátu (SDS), 400 µl persíranu amonného, 40 µl tetramethylethyldiaminu (TEMED). Složení zaostřovacího gelu: 12,15 ml destilované vody, 2,5 ml akrylamidu, 5 ml pufru B, 200 µl sodiumdodecylsulfátu (SDS), 150 µl persíranu amonného a 20 µl tetramethylethyldiaminu (TEMED).

Po separaci byly gely vyjmuty, opláchnuty v destilované vodě a separované proteiny byly přes noc obarveny v roztoku obsahující 1 g barviva Coomassie Brilliant Blue R- 250, 500 ml methanolu, 100 ml kyseliny octové a 400 ml destilované vody. Následné vymytí detekčního roztoku z pórů gelů, tzv. „odbarvení“, bylo provedeno pomocí odbarvovacího roztoku (obsahující 25 % ethanolu, 10 % kyseliny octové a 65 % destilované vody) po dobu 6 h za podmínek aktivního třepání gelů o velmi nízké intenzitě na třepačce. Po odbarvení byly gely digitalizovány pomocí fotodokumentačního zařízení Gel Doc XR+ (Bio-Rad, USA) a získaný elektronický záznam byl vyhodnocen pomocí software Image Lab (Bio-Rad, USA).

4.2.6 Stanovení zbytkového tuku

Obsah zbytkového tuku byl stanoven pomocí extraktoru Ankom XT10 (Ankom, USA) za použití petroletheru jako rozpouštědla. Do předem zváženého speciálního filtračního sáčku (Ankom XT4) byl navážen 1 g vzorku, který byl následně zataven pulsní svářečkou. Takto připravené vzorky byly vysušeny při 105 °C po dobu 3 hodin v sušárně. Po vychladnutí v exsikátoru byly sáčky zváženy a poté vloženy do extraktoru. Po extrakci následovalo vysušení při 105 °C po dobu 30 minut. Po vychladnutí v exsikátoru byly sáčky opět zváženy. Podle vzorce byl spočítán obsah tuku v sušině ($\% \text{ tuku} = ((100 * (\text{hmotnost vysušeného sáčku a vzorku} - \text{hmotnost vysušeného sáčku a vzorku po extrakci})) / \text{hmotnost vzorku})$).

4.2.7 Stanovení funkčních vlastností

Tykvové proteinové koncentráty, mouky a velikostní frakce mouk mohou díky schopnosti proteinů vázat vodu nebo tuk (WHC/FAC) a být tak aplikovány na pekárenské výrobky a pomoci zabránit ztrátě vody/tuku a zlepšit konzistenci při konzervování potravin. Kromě toho může přispívat vysoká vaznost vody proteinů k zahušťování a viskozitě různých potravin, například polévky nebo pudinku (Phal et.al. 2016).

Vaznost vody - WHC

Při zjišťování WHC – water holding capacity, tedy vazby vody, bylo do předem zvážených 15 ml tub o hmotnosti zhruba 6 g odměřeno 300 mg vzorků mouky. Proteinového izolátu bylo naváženo 150 mg. U všech vzorků byly provedeny 3 opakování. Do těchto vzorků byla přidána destilovaná voda. Vše bylo řádně promícháno a roztřepáno v přístroji Vortex-Genie 2 a vzorky se ponechaly stát při laboratorní teplotě 30 minut. Vzorky se poté vložily do centrifugy (Hettich zentrifugen, Rotina 420 R), kde se odstředovaly při 20°C, 4 500 otáčkách 10 minut. Vznikl usazený pelet a supernatant, který se opatrně slil. Tuby byly otočeny dnem vzhůru a nechaly se několik minut vykapat a zvažily se. Rozdíl ve váze v g byl zaznamenán do protokolu. Poté se vzorky nechaly lyofilizovat a zjišťoval se u nich rozpustný podíl.

Vaznost tuku – FAC

Postup při zjišťování FAC, tedy fat absorption capacity - vazby tuku, byl obdobný, jako při zjišťování WHC, avšak místo destilované vody byl použit rafinovaný kuchyňský řepkový olej a nezjišťoval se rozpustný podíl.

Rozpustnost

Rozpustnost je důležitou vlastností v potravinářském průmyslu (Phal et.al. 2016). Díky dobré rozpustnosti docílíme snadného přidávání a rovnoměrné distribuce proteinů v potravinářských výrobcích. Rozpustnost je fyzikálně-chemická vlastnost proteinu, která velmi ovlivňuje jak strukturu, barvu, tak ale i smyslové vlastnosti produktů, včetně emulgace, pěny a tvorby gelů (Rezig et.al. 2016).

Ke stanovení rozpustného podílu byly použity vzorky po stanovení vazby vody. Po odstředění a slití supernatantu byl vlhký pelet zvážen a lyofilizován a znovu zvážen. Rozpustný podíl představoval relativní podíl rozdílu hmotnosti původní navážky a lyofilizovaného vzorku k hmotnosti původní navážky.

Emulgační aktivita

Emulgační aktivita byla stanovena a upravena podle metodiky Djuardi et al.(2020). Do 50 ml centrifugačních tub bylo odváženo 45 mg vzorku, který byl smíchán s 15 ml d. vody. Poté bylo přidáno 5 ml řepkového oleje. Tato směs byla míchána po dobu 2 minut při 18 000 otáček/min homogenizátorem ULTRA TURRAX IKA T 18 basic (USA). Mezitím byly připraveny kyvety s roztokem 0,1% SDS o objemu 2 000 µl. Následně bylo do připravených kyvet s roztokem SDS odebráno 10 µl suspenze která se vytvořila pod vrstvou emulze. Po promíchání byla měřena absorbance při vlnové délce 500 nm na spektrofotometru BioMate 5(Thermo Scientific Electron, Anglie). Index emulgační aktivita (EAI) byl stanoven ve třech opakováních. Změřená absorbance byla dosazena do vzorce pro výpočet EAI.

$$EAI(m^2/g) = \frac{(2 \times 2.303A)DF}{l\Phi C}$$

A = absorbance vzorku při 500 nm; DF = 200 (ředění);
I = 0,01 (délka kyvety);
C = koncentrace proteinu

4.2.8 Vyhodnocení výsledků

Výsledky z jednotlivých laboratorních metod byly zpracovávány v podobě grafů a tabulek v programu Microsoft Excel. Následně byla tato získaná data

statisticky vyhodnocována v programu Statistica 12. Také byl využit Fisherův LSD test mnohonásobného porovnávání. Dále byla použita třífaktorová analýza rozptylu – ANOVA s F-testem.

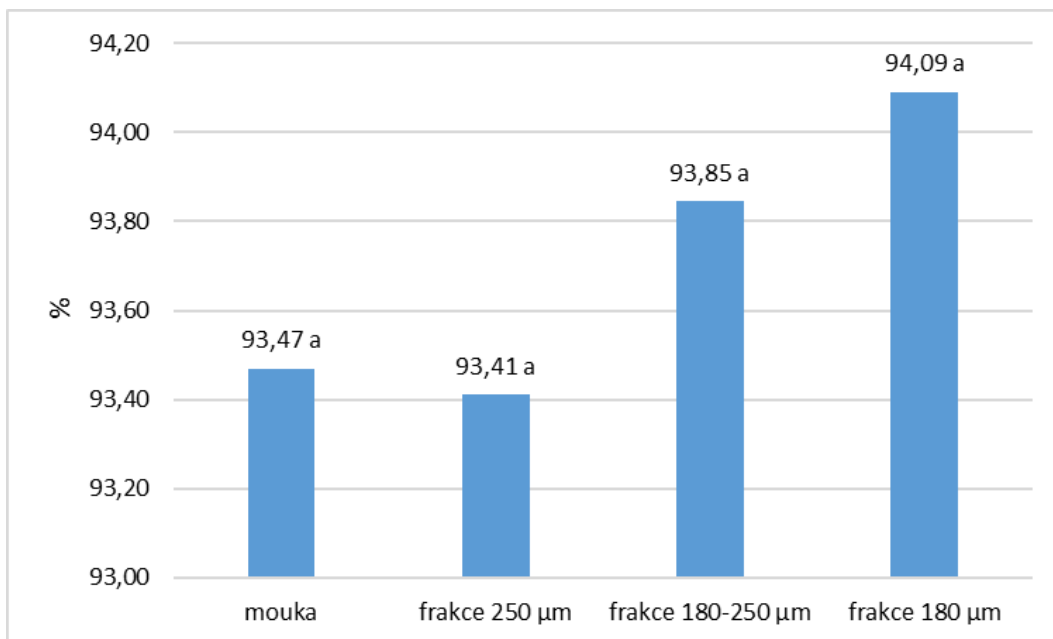
5 VÝSLEDKY

V následujících podkapitolách jsou shrnuty výsledky dosažené v rámci řešení bakalářské práce.

5.1 Obsah sušiny

Gravimetrické měření prokázalo nejvyšší obsah sušiny u velikostní frakce 180 μm s obsahem sušiny 94,09 % a nejnižší u velikostní frakce 250 μm (93,41 %). Avšak jak z výsledků vyplývá (Obr. 3), rozdíly v obsahu sušiny jsou nepatrné. U proteinového koncentrátu byla gravimetricky vypočtena výtěžnost, která byla 5,73 g/100g mouky.

Obrázek 3: Graf obsahu sušiny



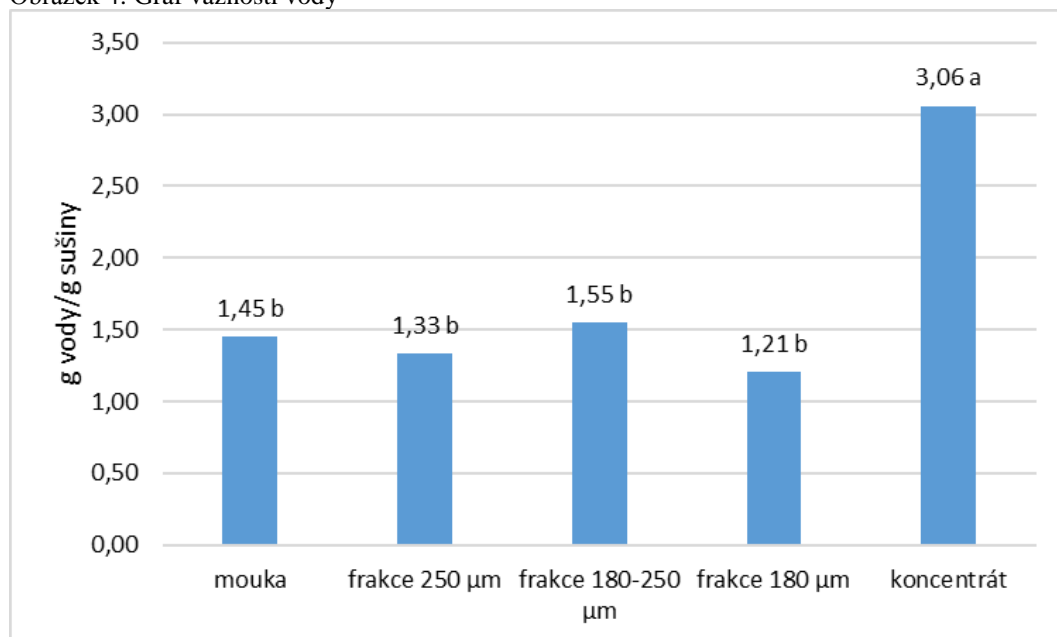
Pozn.: Rozdílná malá písmena za hodnotami znamenají statisticky průkazný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$ (Fisher LSD test)

5.2 Vaznost vody

Vaznost vody, tedy WHC (water holding capacity) byla zjišťována ve třech opakováních. Výsledky jsou graficky zobrazeny v grafu 4. Nejvyšší vaznost vody vykazoval proteinový koncentrát. Jeho vaznost byla 3,06 g vody/g sušiny. Nejnižších výsledků dosáhla nejjemnější frakce 180 μm a to 1,21 vody/g sušiny. Z výsledků tedy vyplývá, že do potravinářství by bylo nejvhodnější používat tykvový proteinový koncentrát. Avšak vaznost samotných mouk také není nejhorší, proto by mohly být

vhodné k nahrazování obyčejné pšeničné mouky, nebo alespoň její části ke zlepšení nutričních vlastností výrobků.

Obrázek 4: Graf vaznosti vody

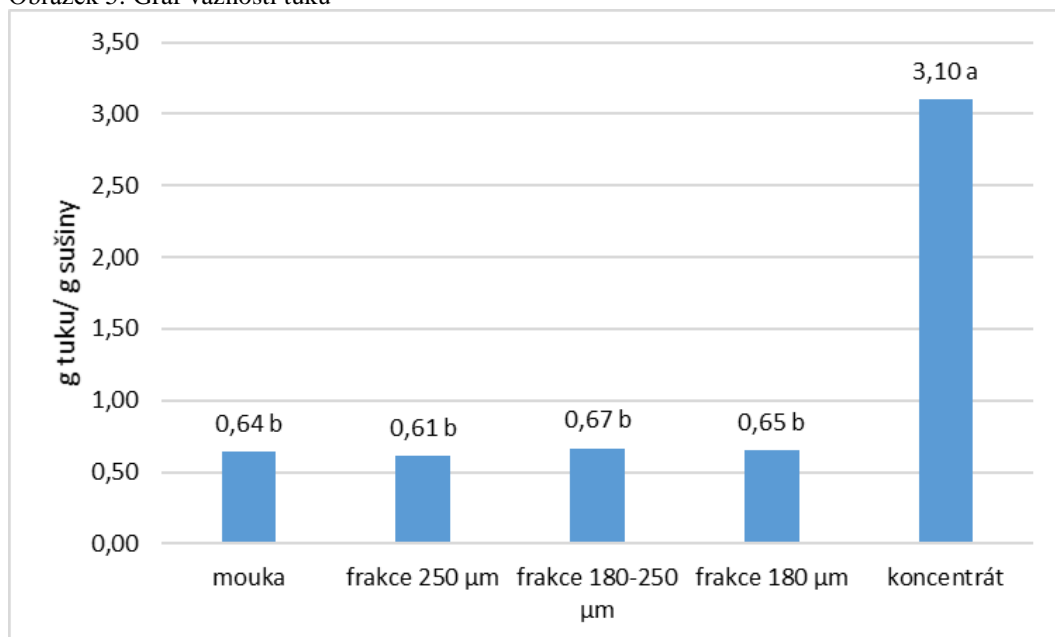


Pozn.: Rozdílná malá písmena za hodnotami znamenají statisticky průkazný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$ (Fisher LSD test)

5.3 Vaznost tuku

Nejvyšší vaznost tuku – FAC (fat absorbing capacity) vykazoval také proteinový koncentrát. Jeho vaznost byla 3,10 g tuku/g sušiny. U ostatních vzorků byla vazba tuku velmi podobná, a to kolem 0,65 g tuku/ g sušiny. Nejnižších výsledků dosáhla naopak nejhrubší frakce 250 µm a to 0,61 g tuku/g sušiny. Celkově nebyla vaznost tuku úplně dobrá. Jako nejfunkčnější se znovu ukázal proteinový koncentrát.

Obrázek 5: Graf vaznosti tuku

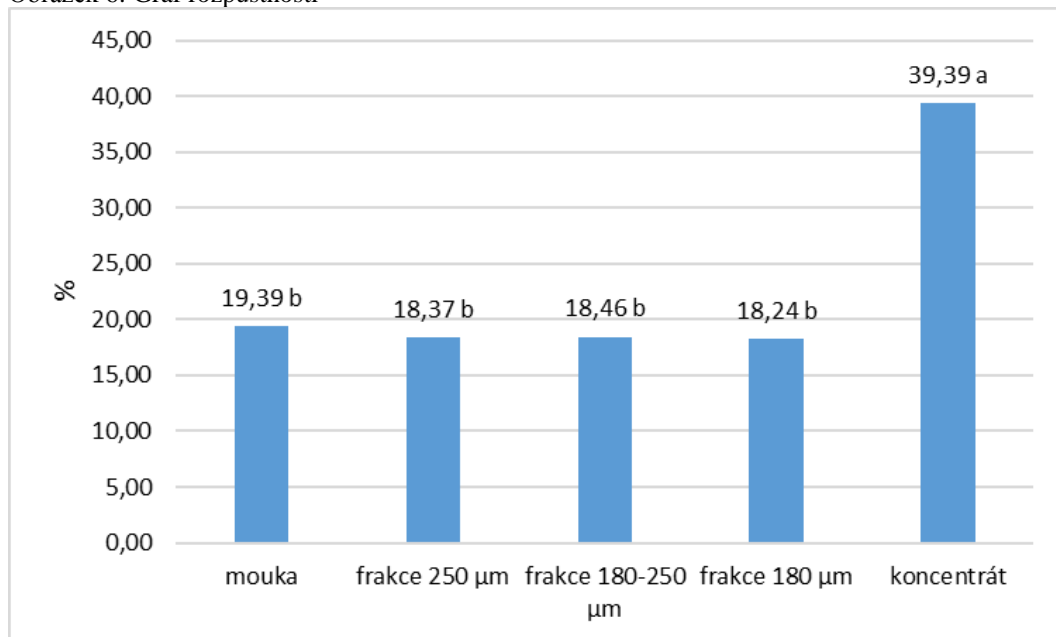


Pozn.: Rozdílná malá písmena za hodnotami znamenají statisticky průkazný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$ (Fisher LSD test)

5.4 Rozpustnost

Nejvyšší rozpustnost ve vodě prokázal proteinový koncentrát. Jeho rozpustnost činila v průměru 39,39 %. Tato rozpustnost je tedy velmi dobrá a díky ní má tento tykvvový proteinový koncentrát vysoký potenciál k využití i jako samostatný proteinový koncentrát/izolát ve sportovní výživě k přípravě proteinových nápojů. Ale samozřejmě by se hodil i do dalších odvětví potravinářství. Dále druhou nejvyšší (avšak poloviční rozpustnost oproti proteinovému koncentrátu) vykazovala samotná mouka a to průměrně 19,39 %. Ostatní frakce vykazovaly rozpustnost kolem 18 % v průměru.

Obrázek 6: Graf rozpustnosti

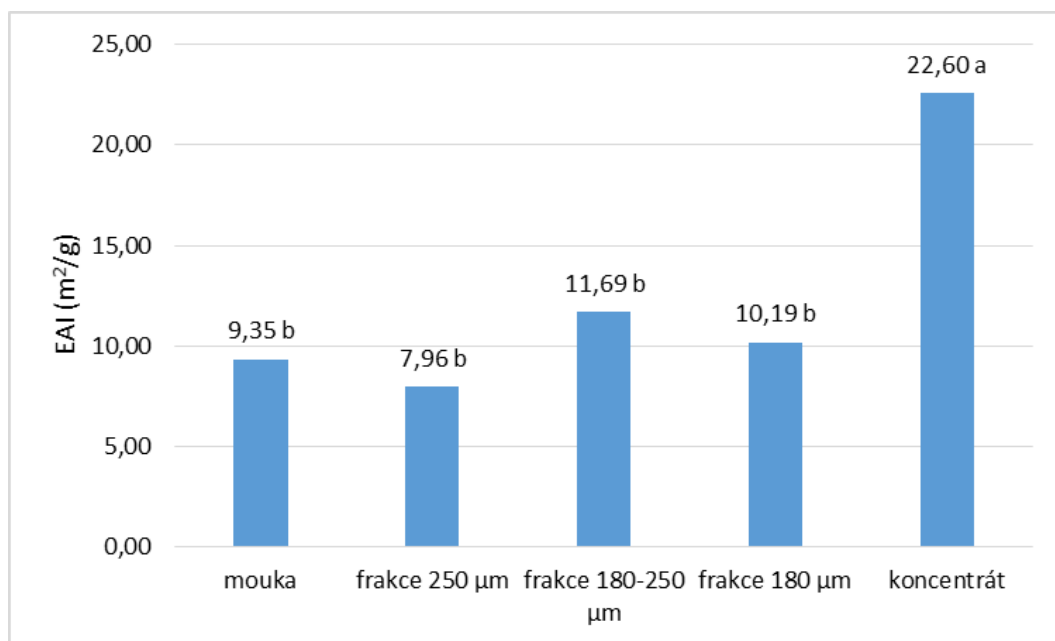


Pozn.: Rozdílná malá písmena za hodnotami znamenají statisticky průkazný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$ (Fisher LSD test)

5.5 Emulgační aktivita

Tato funkční vlastnost byla téměř dvojnásobně vyšší u proteinového koncentrátu $22,6 \text{ m}^2/\text{g}$ oproti síťovaným frakcím. Druhá nejvyšší emulgační aktivita, avšak poloviční byla u střední frakce, a to $11,69 \text{ m}^2/\text{g}$. Dále to byla nejjemnější frakce $10,19 \text{ m}^2/\text{g}$, samotná mouka $9,35 \text{ m}^2/\text{g}$ a nejnižšího výsledku dosáhla nejhrubší frakce, a to $7,96 \text{ m}^2/\text{g}$.

Obrázek 7: Graf emulgační aktivity



Pozn.: Rozdílná malá písmena za hodnotami znamenají statisticky průkazný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$ (Fisher LSD test)

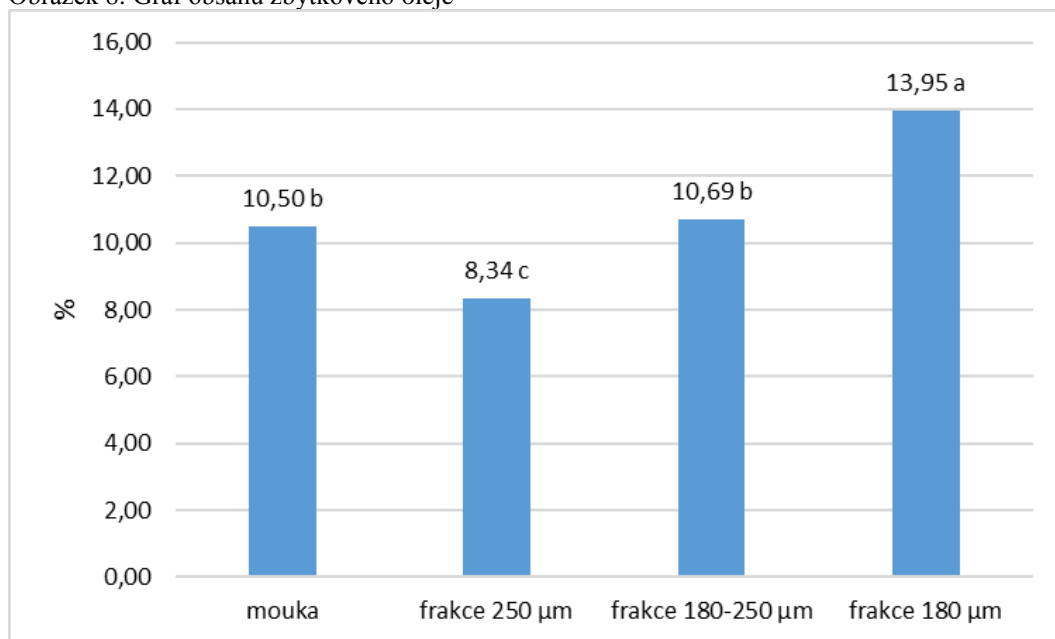
5.6 Obsah zbytkového tuku

Obsah zbytkového oleje je velmi důležitý. Tykвовá mouka je vždy odtučněná (získává se po lisování oleje z pokrutin, následované jejich mletím a tříděním dle velikostních frakcí) a měla by obsahovat co nejméně zbytkového oleje. Čím více olejné složky totiž mouka a frakce z ní vytvořené obsahují, tím je horší skladovatelnost a při nesprávném skladování je zde možnost žluknutí tuku, tedy jeho zkažení. Tudiž z pohledu skladovatelnosti a trvanlivosti tedy není vysoký obsah tuku v mouce příznivý a vhodný.

Tykвовý olej je sice velmi zdravý a bohatý na vitamíny rozpustné v tucích (například tokoferol – vitamín E), avšak vyšší obsah zbytkového tuku má dopad i na horší využití a vlastnosti mouky například v pekařství, nebo celkově v potravinářství.

Jak vyplývá z obrázku 7 nejméně zbytkového tuku obsahuje nejhrubší frakce 250 µm a to 8,34 % a se snižující se hrubostí mouk se obsah tuku zvyšuje (střední frakce 10,69 %, nejjemnější 13,95 %). Samotná nepředěná mouka má obsah tuku 10,5 % tedy podobně jako střední frakce.

Obrázek 8: Graf obsahu zbytkového oleje

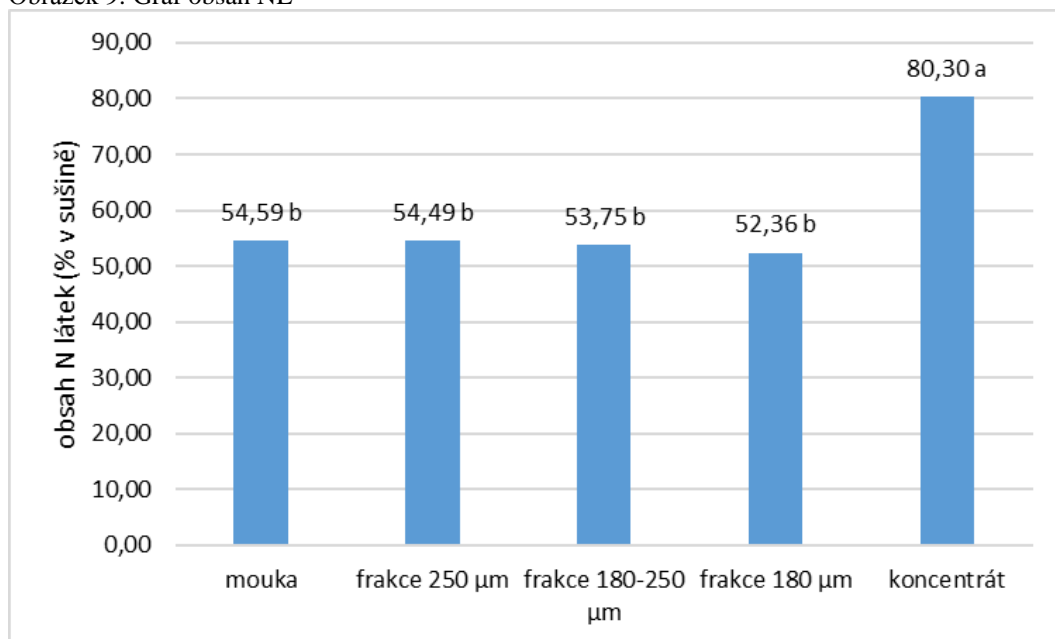


Pozn.: Rozdílná malá písmena za hodnotami znamenají statisticky průkazný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$ (Fisher LSD test)

5.7 Obsah dusíkatých látek

Po stanovení obsahu dusíku na analyzátoru rapid N cube (Elementar, Německo) bylo zjištěno, že nejvyšší obsah dusíkatých látek ($N \times 6,25$) se nachází u proteinového koncentrátu, a to 80,3 % v průměru. Jak vyplývá z grafu níže, obsah dusíkatých látek u dalších vzorků byl velice podobný, pohyboval se okolo 53 %. I tento obsah je na mouku a její frakce velmi vysoký. Na druhém místě by tedy byla mouka s obsahem N – látek 54,59 %, na třetím místě velikostní frakce 250 µm s 54,49 %, dále velikostní frakce 250 µm - 180 µm s obsahem dusíkatých látek 53,75 % a na posledním místě je nejjemnější frakce 180 µm s 52,36 % obsahu N - látek.

Obrázek 9: Graf obsah NL

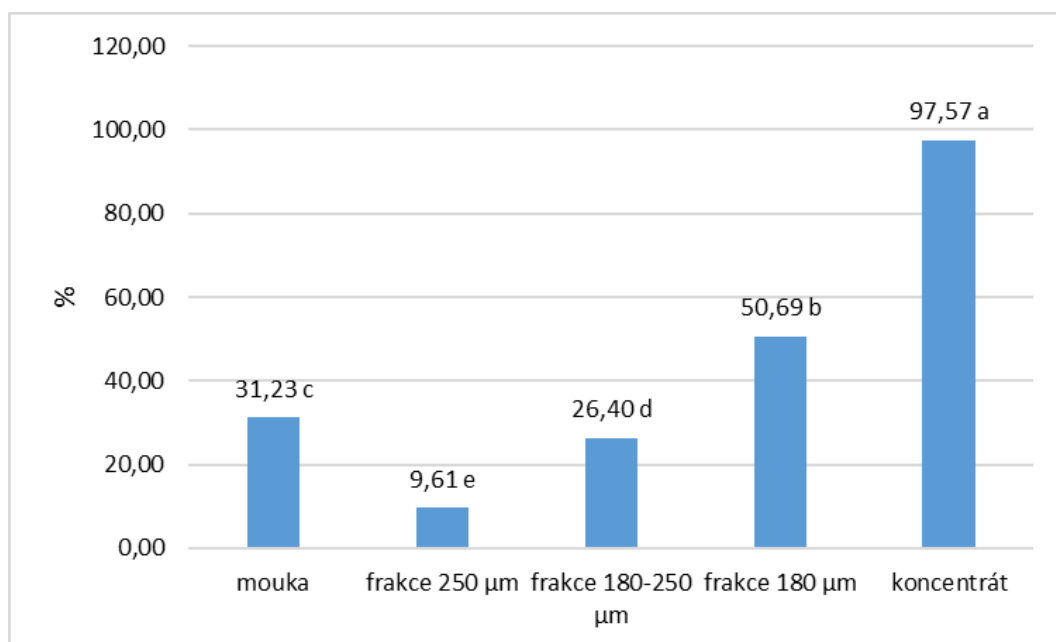


Rozdílná malá písmena za hodnotami znamenají statisticky průkazný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$ (Fisher LSD test)

5.8 Obsah bílkovin

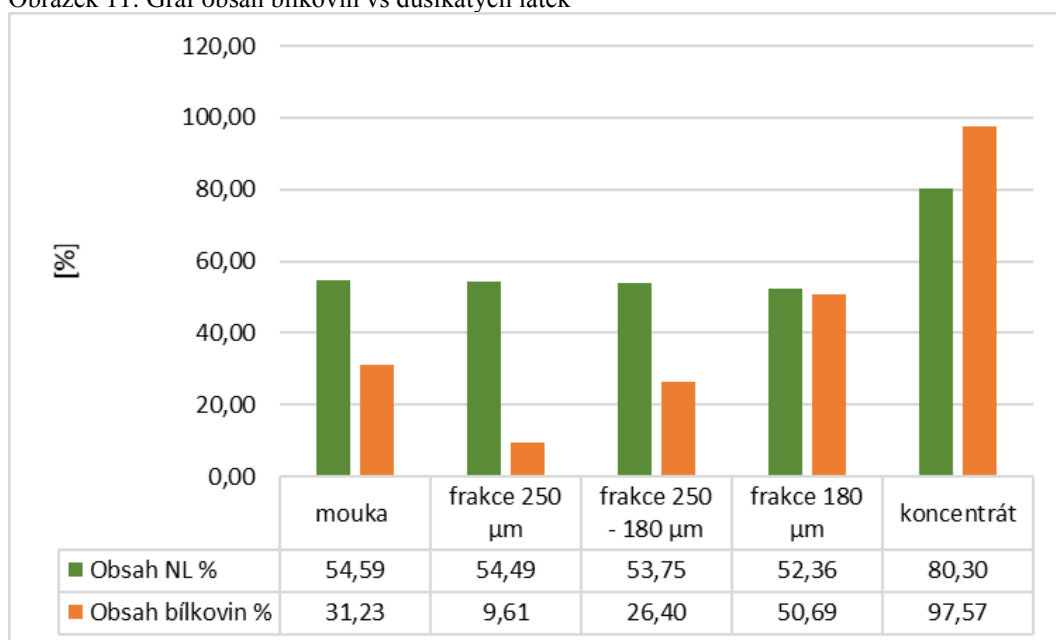
Výsledky bicinchoninové metody ukázaly, že nejvyšší obsah vyextrahovaných bílkovin byl v proteinovém koncentrátu, a to 97,57 %. Avšak velice dobře, co se obsahu bílkovin týče, dopadla i nejjemnější frakce 180 µm s obsahem bílkovin 50,69 %. Už takto vysoký obsah bílkovin v mouce (v tomto případě její frakci) by se dal považovat za samotný bílkovinný koncentrát. Samotná neprosetá mouka také neměla nejhorší obsah bílkovin, a to 31,23 %. Střední frakce 250 µm – 180 µm na tom s 26,40 % byla podobně. Nejhorše dopadla nejhrubší frakce. Ta obsahovala pouze 9,61 % bílkovin. Skutečný obsah bílkovin u této frakce může být i vyšší, avšak kvůli hrubosti této frakce a nerozpustným strukturám, které obsahuje, se nepovedlo ty bílkoviny použitým pufrem vyextrahovat. V druhém grafu se nachází porovnání obsahu dusíkatých látek a obsahu bílkovin, ze kterého vyplývá, že obsah dusíkatých látek je vždy vyšší, než samotný obsah bílkovin. Je to z toho důvodu, že dusíkaté látky v sobě zahrnují i dusíkaté látky, které jsou nebílkovinného charakteru. Výjimku tvoří proteinový koncentrát, kde převyšuje obsah bílkovin nad dusíkatými látkami. Což je způsobené možným štěpením molekul bílkovin na menší úseky při extrakci a následné precipitaci v kyselém pH, které reagují s bicinchoninovou kyselinou.

Obrázek 10: Graf obsah bílkovin



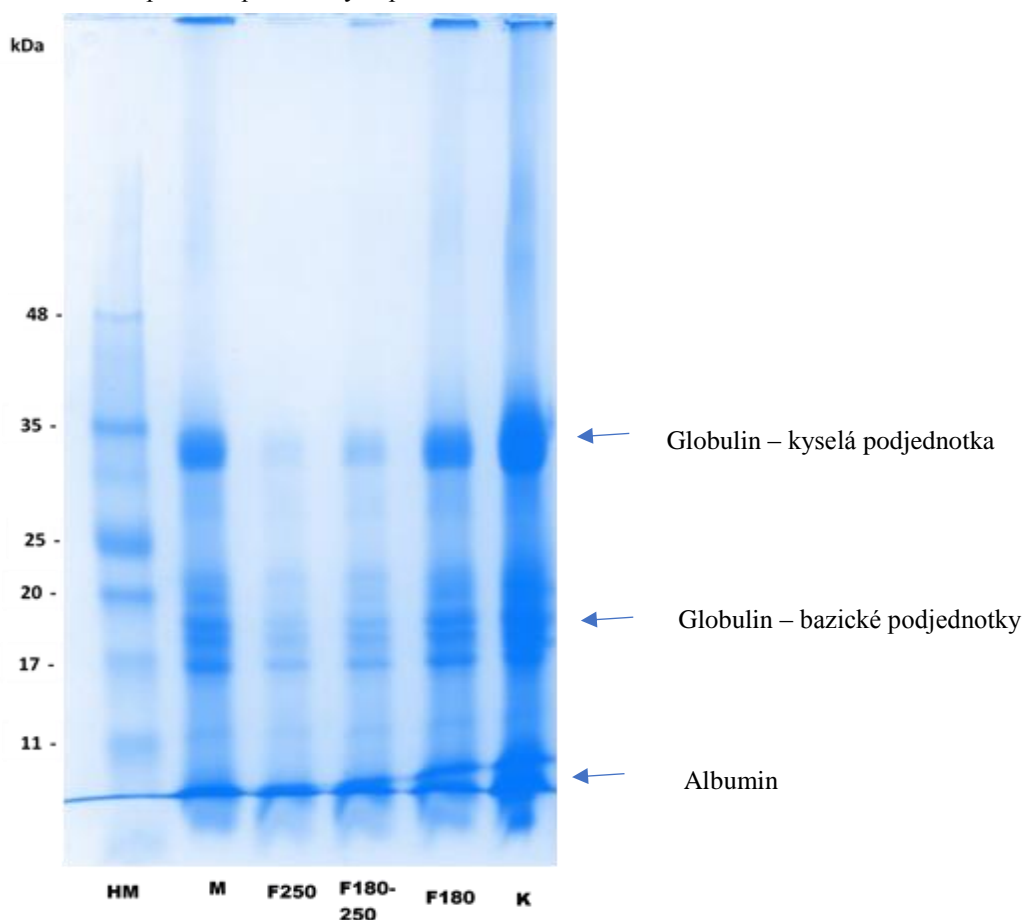
Pozn.: Rozdílná malá písmena za hodnotami znamenají statisticky průkazný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$ (Fisher LSD test)

Obrázek 11: Graf obsah bílkovin vs dusíkatých látek



5.9 Elektroforetická analýza bílkovinných profilů dle velikostních frakcí a proteinového koncentrátu

Obrázek 12: Spektrum proteinových profilů velikostních frakcí a bílkovinného koncentrátu



HM = hmotnostní marker; M = mouka; F250 = velikostní frakce nad 250 μm ; F180-250 = velikostní frakce 180-250 μm ; F180 = velikostní frakce pod 180 μm ; K = proteinový koncentrát

Při elektroforéze a následném odbarvení gelu byly gely digitalizovány pomocí fotodokumentačního zařízení Gel Doc XR+ (Bio-Rad, USA) a získaný elektronický záznam byl vyhodnocen pomocí software Image Lab (Bio-Rad, USA). Díky tomu bylo zjištěno, že velká část tykvového proteinu je tvořena převážně 11S globuliny. Na obrázku č. 12 je nejvíce intenzivní pruh o molekulové hmotnosti okolo 33 kDa, jenž lze přisoudit globulinu, jak uvádí ve své práci Rezig a kolektiv (2013). Dále je viditelná různá intenzita pruhů u jednotlivých velikostních frakcí mouky, což odpovídá stanovení obsahu NL, tedy s menší frakcí se zvyšuje zastoupení bílkovin. V oblasti s molekulovou hmotností mezi 16 až 22 kDa bylo detekováno několik pruhů, které odpovídají bazickým podjednotkám globulinu. Jednotky o hmotnosti kolem 33 kDa patří kyselým podjednotkám globulinu.

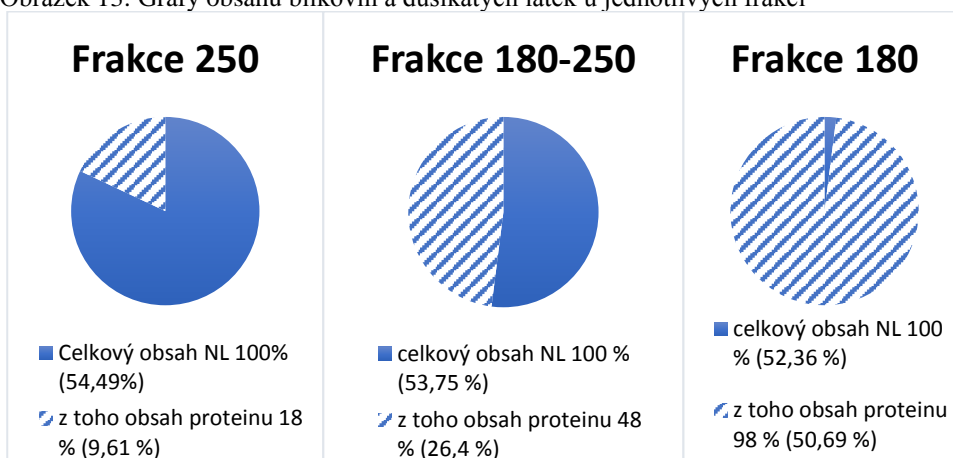
6. DISKUZE

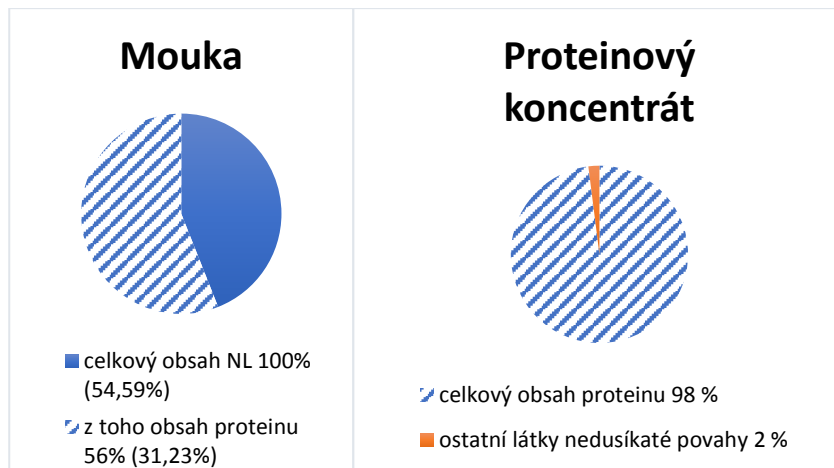
6.1 Obsah dusíkatých látek a bílkovin

Obsah dusíkatých látek v mouce a vyliscích byl nejvyšší u samotné mouky, a dusíkatých látek frakce nad 250 μm s obsahem 54,49 %, dále frakce střední 250-180 μm s 53,75 % a na posledním místě nejjemnější frakce pod 180 μm 52,36 %. Jak je z výsledků zřejmé, rozdíl v obsahu N – látek se v mouce a frakcích moc neliší. Respektive rozdíl není úplně markantní, obsah dusíkatých látek se zde pohybuje v průměru okolo 53 %. Největší rozdíl je v porovnání s proteinovým koncentrátem, který má obsah dusíkatých látek 80 % v průměru.

Ovšem obsah samotných vyextrahovaných bílkovin u frakcí jde opačným směrem. Obsah dusíkatých látek je sice nejnižší u nejjemnější frakce 180 μm , a to 52,36 %, zatímco obsah samotných bílkovin má tato frakce nejvyšší (jak vychází z grafu níže) 50,69 %, z čehož vyplývá, že 98 % všech N – látek je tvořeno bílkovinami. Frakce s nejhrubšími částicemi má sice ze všech tří frakcí největší obsah dusíkatých látek (54,49 %), ovšem zastoupení bílkovin je zde nejmenší (9,61 %). Obsah bílkovin v N – látkách je tedy jen pouhých 18 %. Střední frakce 250 – 180 μm a samotná mouka mají zhruba stejný, a to poloviční obsah bílkovin v poměru s celkovým obsahem dusíkatých látek (střední frakce 53,75 % N – látek, z toho bílkoviny 26,4 % -> 48% tvoří bílkoviny, mouka s obsahem 54,59 % N – látek, 31,23 % bílkovin -> 56 % tvoří bílkoviny). Proteinový koncentrát obsahuje 98 %.

Obrázek 13: Grafy obsahu bílkovin a dusíkatých látek u jednotlivých frakcí





Obsah bílkovin a dusíkatých látek se u tykví pohybuje od 31 -51 % a jejich obsah je především ovlivněn odrůdou. Obsah bílkovin je také vyšší než u jiných olejnatých semen a ořechů jako je sezam, arašidy nebo kešu ořechy (20-25 %) (Ardabilil et al, 2011; Tyszkeiwcz et. al, 2012). Stejně tak jako například obsah oleje závisí obsah bílkovin a N - látek i na dalších několika faktorech kromě samotné odrůdy. Například na podnebí, klimatu a lokalitě, ve které je tykev pěstována (Montesano et al, 2018).

6.2 Spektra extrahovaných proteinů

Elektroforéza ukázala, že nejvíce zastoupeným proteinem v tykvovém semeni je globulin 11S, skládající se ze dvou podjednotek (kyselé a bazické), které jsou spojeny disulfidovou vazbou. Naše výsledky byly porovnány s výsledky Césara Ozuna a Fabiola León-Galván (2017) a byly shodné.

6.3 Funkční vlastnosti

Vaznost vody - WHC

Tato funkční vlastnost se nejlépe projevila u proteinového koncentrátu. Jeho WHC bylo 4,06 g vody/ g sušiny. U ostatních vzorků (mouky a frakce z ní vytvořené) byla vaznost vody nižší a vzorky měly velmi podobnou vaznost. Vaznost vody u samotné nefrakciované mouky byla 2,45 g vody/ g sušiny, frakce nad 250 měla vaznost v průměru 2,33 g vody/ g sušiny, střední frakce 250-180 μm měla vaznost 2,55 g vody/ g sušiny a poslední frakce pod 180 měla nejnižší vaznost 2,21 g vody/ g sušiny.

Důvodem nejvyšší vaznosti vody u proteinového koncentrátu je vyšší obsah bílkovin, než u ostatních vzorků a jejich schopnost vázat větší množství vody. Nižší či vyšší vaznost vody je také ovlivněna vlhkostí vzorků. Čím totiž bude vlhkost vyšší, tím menší bude vaznost vody. Vysokou schopnost vázat vodu má také vláknina. Ovšem jejím výskytem a obsahem ve vzorcích se tato práce nezbyvá.

Vaznost tuku – FAC

Nejlepší výsledky ze všech vzorků, co se týká vaznosti tuku, také přinesl proteinový koncentrát. Jeho FAC byla sice nižší než vaznost vody, avšak stále poměrně vysoká, a to 3,1 g tuku/ g sušiny. Ostatní vzorky měly podobnou, ale o dost nižší vaznost. Vaznost samotné mouky byla 0,64 g tuku/ g sušiny, frakce nad 250 μm měla vaznost 0,61 g tuku/ g sušiny, frakce 180 μm -250 μm měla výsledek 0,67 g tuku/ g sušiny a poslední frakce měla vaznost 0,65 g tuku/ g sušiny.

Důvodem vyšší vaznosti tuku u koncentrátu je znovu vyšší obsah bílkovin spojen s jejich vyšší absorpční schopností.

Dle Phan (2016) různé frakce proteinů, vykazují různé vaznosti, ať už tuku, nebo vody. Například proteinová frakce globulin váže více vody než glutelin. Naproti tomu albumin sice vykazuje nejnižší WHC, avšak vaznost tuku má nejvyšší, ze všech třech jmenovaných. Je velmi zajímavé vidět, že různé proteinové frakce se takto liší a jejich obsah v proteinových koncentrátech ovlivňuje tuto funkční vlastnost.

Rozpustnost

Nejvyšší rozpustnost vykazoval znovu proteinový koncentrát. Jeho průměrná rozpustnost byla 39,4 %. Tato rozpustnost se dá považovat za velmi dobrou. Tykvoový proteinový koncentrát by tedy mohl sloužit i v potravinářství, či jako samotný proteinový koncentrát například ve sportovní výživě pro lidi s alergií na mléko nebo laktózovou intolerancí či vegany. Rozpustnost mouky a frakcí měla podobné hodnoty. Mouka měla rozpustnost 19,4 %, frakce nad 250 μm 18,2 %, frakce střední 250-180 μm 18,4 %, a nejjemnější frakce pod 180 μm 18,5 %. Tyto hodnoty už nejsou tak vysoké, avšak to je z důvodu, že se nejedná o proteinový koncentrát, ale o mouky obsahující i pevné a větší částice, než u koncentrátu proteinového.

Lepší či horší rozpustnost (velmi důležitá chemicko-fyzikální vlastnost v potravinářském průmyslu) je ovlivněna několika faktory. Je to například pH. Pro proteinový koncentrát z tykvových semen je dle Reziga (2016) nejlepší rozpustnost za alkalických podmínek. Ke zlepšení rozpustnosti proteinů v širším rozmezí pH může pomoci i enzymatická hydrolýza (Ozuna et al., 2017). Například Rezig (2016) také hodnotí tykvový proteinový koncentrát jako středně rozpustný. S tímto výsledkem se ztotožňují i naše výsledky proteinového koncentrátu. Jeho rozpustnost by mohla být lepší. Co se týče mouk, zde je důležitější než rozpustnost spíše vaznost vody/tuku.

Emulgační aktivita

Nejvyšší emulgační aktivitu vykazoval proteinový koncentrát. Jeho průměrná emulgační aktivita byla 22,6 m²/g. Naopak nejnižší emulgační aktivitu měla nejhrubší frakce pod 250 μm, a to 7,96 m²/g. Ostatní frakce měly emulgační aktivitu okolo 10 m²/g.

Tyto výsledky ukazují na spíše slabší až střední emulgační aktivitu. Což se shoduje s tvrzením, které uvádí například Rezig (2016) ve své studii, a to, že emulgační aktivita pro potravinářský průmysl je nedostatečná. Tyto vlastnosti lze zlepšit například enzymatickou hydrolýzou, kterou jsme však v našem pokusu neprováděli.

6.4 Obsah zbytkového tuku

Výsledky z extraktoru Ankom XT10 (Ankom, USA) a následné spočítání obsah tuku v sušině podle vzorce ($\% \text{ tuku} = ((100 * (\text{hmotnost vysušeného sáčku a vzorku} - \text{hmotnost vysušeného sáčku a vzorku po extrakci})) / \text{hmotnost vzorku})$) ukázaly na nejvyšší obsah zbytkového tuku u nejjemnější frakce pod 180. Ta má obsah zbytkového tuku 13,95 %. Druhý nejvyšší podíl má střední frakce (10,69 %) a mouka (10,5 %). Nejméně zbytkového tuku má frakce nejhrubší nad 250 μm, a to 8,34 %. Obsah zbytkového tuku (oleje) je závislý na tom, jak moc dobře a v jakém množství byl vylisován ze semen při výrobě oleje.

Tykvový olej má spoustu zdravotních benefitů. Od vitamínů rozpustných v tucích, a to především vitamíny K a E (Apostol et al., 2018), snižuje LDL cholesterol, ale zároveň zvyšuje HDL cholesterol (Montesano et al., 2018) a dle

nových studií dokáže i snižovat krevní tlak (Wonga et al., 2019). Nevýhodou však je, že čím vyšší je obsah zbytkového tuku v moukách a frakcích, tím jsou náchylnější ke žluknutí a mají sníženou trvanlivost. Z pohledu skladovatelnosti a trvanlivosti není vyšší obsah tuku v moukách příhodný.

Dle Apostol L. (2018) a jeho prováděné studii, která zkoumala přínos částečně odtučněných semen tykve jako přínos živin do potravinářských výrobků, obsahují odtučněná semena 12,28 % zbytkového tuku. Toto číslo je vyšší než naše čísla, což může být způsobené pouze částečným odtučněním tykvových semen.

7. ZÁVĚR

Z výsledků, které byly získány v rámci řešení této práce, lze vyvodit tyto závěry:

- Dle provedené statistiky, nejvyšší výtěžnost mouky (pomleté výlisky) dosáhla nejhrubší frakce nad 250 μm a to 42,4 %, druhou nejvyšší výtěžnost měla nejjemnější frakce pod 180 μm s 39,98 %. Nejnižší výtěžnost vykazovala střední frakce 250-180 μm , a to 17,62 %.

- Obsah dusíkatých látek byl nejvyšší u proteinového koncentrátu, a to 80,3 %. Frakce a mouka měly obsah N – látek velmi podobný, kolem 53 % \pm 1 % (f. 250 μm - 54,49 %; f. 250-180 μm – 53,75 %; f. 180 μm – 52,36 %; mouka 54,59 %).

- Proteinový koncentrát měl i nejvyšší obsah bílkovin 97,57 %. Zatímco obsah N – látek byl u frakcí a mouky velmi podobný, obsah bílkovin se zde velmi lišil. Nejvíce bílkovin obsahovala nejjemnější frakce pod 180 μm s obsahem 50,69 % bílkovin. Střední frakce 250-180 μm a mouka měly obsah bílkovin podobný. Mouka 31,23 % a frakce 26,4 %. Nejméně bílkovin obsahovala nejhrubší frakce 250 μm , a to 9,61 %.

- Výsledky SDS PAGE ukázaly, že nejvíce zastoupenou proteinovou frakcí tykvového proteinu je globulin 11 S, který má kyselé a bazické podjednotky. Molekulová hmotnost těchto podjednotek byla vizualizována v oblasti od 11 po 35 kDa. Elektroforézou bylo prokázáno, že s menší velikostní frakcí se zvyšuje intenzita pruhů, tedy roste obsah bílkovin.

- Vaznost vody, tedy WHC byla u proteinového koncentrátu nejvyšší 3,06 g vody/ g sušiny. Mouka a její frakce měly velmi podobnou vaznost, kolem 1,3 g vody/ g sušiny. (f. 250 μm : 1,33 g vody/g sušiny; f. 250-180 μm : 1,55 g vody/g sušiny; f. 180 μm : 1,21 g vody/ g sušiny; mouka 1,45 g vody/ g sušiny)

- Vaznost tuku FAC byla nižší než vaznost vody. Nejvyšší byla znovu u proteinového koncentrátu, a to 3,01 g tuku/ g sušiny. Mouka a její frakce měly velmi podobnou a poměrně nízkou vaznost tuku. Od 0,61 do 0,67 g tuku/ g sušiny.

- Obsah zbytkového tuku se zjišťoval pouze u mouky a frakcí. Mouka měla obsah zbytkového tuku 10,5 %, obsah tuku u frakcí se zvyšoval spolu s jemností částic. Nejméně zbytkového tuku tedy obsahovala nejhrubší frakce (nad 250 μm) 8,34 %. Střední frakce (250-180 μm) měla střední obsah zbytkového tuku 10,69 %. Nejvíce zbytkového tuku obsahovala nejjemnější frakce (pod 180 μm) 13,95 %.

- Ze všech vzorků se jako nejlépe rozpustný ve vodě ukázal proteinový koncentrát. Jeho rozpustnost byla 39,39 %. Všechny tři frakce měly v podstatě stejnou rozpustnost a to 18 %. Mouka měla 19 %. Rozpustnost je velmi důležitá funkční vlastnost. Závisí na ní rovnoměrné rozložení koncentrátu v potravinářském výrobku a jeho konzistence (hrudky, krémová konzistence atd.).

- Obsah sušiny byl ve všech frakcích a mouce poměrně podobný. Mouka měla obsah sušiny 93,47 %. Frakce 250 μm 93,41 %, střední frakce 250-180 μm měla obsah sušiny 93,85 % a frakce 180 μm 94,09 %.

- Emulgační aktivita byla nejvyšší u proteinového koncentrátu, a to 22,6 m^2/g . Nejnižší byla naopak u nejhrubší frakce nad 250 μm 9,35 m^2/g . Ostatní frakce a mouka měly tyto hodnoty: mouka 9,35 m^2/g , frakce střední 11,69 m^2/g , frakce nejjemnější 10,19 m^2/g .

8. POUŽITÁ LITERATURA

Apostol L., Berca L., Mosoiu C., Badea M., Bungau S., Oprea O.B., Cioca G., 2018, *Partially deffated pumpkin (Cucurbita maxima) seeds – a rich source of nutrients for use in food products*, vol. 69, Revist de chimie, 1398-1402

Ardabili A. G., Farhoosh R., Haddad Khodaparast M.H., 2011, *Chemical Composition and Physicochemical Properties of Pumpkin Seeds (Cucurbita pepo Subsp. pepo Var. Styriaka) Grown in Iran*, Journal of Agricultural Science and Technology, vol.13, 1053-1063

Bardaa S., Halima N.B., Aloui F., Mansour R.B., Jabeur H., Bouaziz M. and Sahnoun Z., 2016, *Oil from pumpkin (Cucurbita pepo L.) seeds: evaluation of its functional properties on wound healing in rats*, Biomedcentral, 1-12

Bárta J., Bártová V., Čurn V., 2010, *Laboratorní přístroje a postupy: Analýza proteinů pomocí automatické čipové elektroforézy experion a porovnání s metodou SDS-PAGE*, Chemické listy, vol. 104, 33-40

Bavec F., Grobelnik Mlakar S., Rozman Č., Bavec M., 2007, *Oil Pumpkins: Niche for Organic Producers*, Issues in New Crops and New Uses, 185-189

Brát Jiří, 2018, Praha: Sdružení českých spotřebitelů, *Podle čeho vybírat tuky a oleje*, ISBN 978-80-87719-62-6

Bucko S., Katona J., Popovic L., Vaštag Z., Petrovic L., Milica Vučinić Vasić M., 2015, *Investigation on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (Cucurbita pepo) seed protein isolate*, LWT - Food Science and Technology, 609 - 615

Bucko S., Katona J., Petrović L., Milinković J., Spasojević L., Mucić N., Miller R., 2018, *The Influence of Enzymatic Hydrolysis on Adsorption and Interfacial Dilatational Properties of Pumpkin (Cucurbita pepo) Seed Protein Isolat*, Food Biophysics, vol. 13, 217–225

Djuard, A. U. P., N. D. Yuliana, M. Ogawa, T. Akazawa a M. T. Suhartono. *Emulsifying properties and antioxidant activity of soy protein isolate conjugated with*

tea polyphenol extracts. *Journal of Food Science and Technology*. 2020, 1-10. ISSN 0022-1155.

Filip V., Kadlec P., Melzoch K., Voldřich M., 2013, Ostrava: Key Publishing, *Procesy a zařízení v potravinářství a biotechnologiích*, ISBN 978-80-7418-163-4

Goldstein, A. a K. Seetharaman. Effect of a novel monoglyceride stabilized oil in water emulsion shortening on cookie properties. *Food Research International* 2011, 44(5), 1476-1481. ISSN 09639969.

Jung S., Rickert D.A., Deak N.A., Aldin E.D., Recknor J., Johnson L.A., Murphy P.A., 2003, *Comparison of Kjeldahl and Dumas methods for determining protein contents of soybean products*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1169-1173.

Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227: 680-685

Lam R. S. H., Nickerson M. T. (2013): Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure–function approach, *Food Chemistry*, 141: 975 – 984.

Malomo, S.A., Aluko R.E., *Conversion of a low protein hemp seed meal into a functional protein concentrate through enzymatic digestion of fibre coupled with membrane ultrafiltration*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2015b, 151 – 159.

Montesano D., Blasi F., Simonetti M.S., Santini A., Cossignani L., 2018, *Chemical and Nutritional Characterization of Seed Oil from Cucurbita maxima L. (var. Berrettina) Pumpkin*, *Foods — Open Access Journal*, 1-14

Naziri1 E., Mitić M.N., Tsimidou M.Z., 2016, *Contribution of tocopherols and squalene to the oxidative stability of cold-pressed pumpkin seed oil*, *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 118, 898-905

Ozuna, C. a M. F. León-Galván. *Cucurbitaceae Seed Protein Hydrolysates as a Potential Source of Bioactive Peptides with Functional Properties*. BioMed Research International 2017, 1-16. ISSN 2314-6133.

Patel S., 2013, *Pumpkin (Cucurbita sp.) seeds as nutraceutical: a review on status quo and scopes*, Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism, Springer

Peč P., Šebela M., Luhová L., Frébort I., Zajoncová L., Petřivalský M., 2004, *Laboratorní cvičení z biochemie*. 2. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 99 s. ISBN 80-244-0912-7

Phan T., Tran T.T.T., Nquyet Ton N.M. and Man Le V.V., 2016, *Effects of pH and salt concentration on functional properties of pumpkin seed protein fractions*, Journal of Food Processing and Preservation, vol. 41, 1-11

Pichl I., 1976, *Amino Acid Composition and Nitrogen Content of Seed Albumins and Globulins of Various Species of the Cucurbitaceae Family*, vol. 170, 509-515

Rezig L., Riaublanc A., Chouaibi M., Guéguen J., Hamdi S., 2016, *Functional Properties of Protein Fractions Obtained from Pumpkin (Cucurbita Maxima) Seed*, International Journal of Food Properties 172-186

Rezig, L., F. Chibani, M. Chouaibi, M. Dalgalarrodo, K. Hessini, J. Guéguen a S. Hamdi. Pumpkin (Cucurbita maxima) Seed Proteins: Sequential Extraction Processing and Fraction Characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013, 61(32), 7715-7721. ISSN 0021-8561

Stevenson D.G., Fred J. Eller, Liping Wang, Jay-Lin Jane, Tong Wang, and George E. Inglet, 2007, *Oil and Tocopherol Content and Composition of Pumpkin Seed Oil in 12 Cultivars*, Journal of agricultural and food chemistry, vol. 55, 4005-4013

Stražil Z., Moudrý J., 2011, Praha: Profi press, *Alternativní plodiny*, ISBN 978-80-86726-40-3

Widy-Tyszkiewicz E., Matławska I., Bylka W., 2012, *Assessment report on Cucurbita pepo L. semen*, European medicines agency - Committee on Herbal Medicinal Products, 1-44

Wonga A., Viola D., Bergena D., Caulfield E. Mehrabanib A., Figueroa A., 2019, *The effects of pumpkin seed oil supplementation on arterial hemodynamics, stiffness and cardiac autonomic function in postmenopausal women*, Science direct , vol. 37, 23-36

World health organization, Codex Alimentarius: Cereals, Pulses, Legumes and Vegetable Proteins: codex general standart for soy protein products, Rome, 2007, 86 - 89., ISBN 978-92-5-105842-8.

Zayas F. J. (1997): Introduction. In: *Functionality of Proteins in Food*, Springer, Berlin, 1 – 5.

9. PŘÍLOHY

Použité tabulky:

Tabulka 1: Porovnání obsahu aminokyselin v odtučněné tykvvové mouce vs v sojovém proteinovém izolátu.....	15
Tabulka 2: Obsah minerálních prvků v mouce;	18
Tabulka 3: Příklad rozpustnosti koncentráту ve vodě při určitém pH (%)	20
Tabulka 4: Vaznost vody a oleje	21

Použité obrázky a grafy:

Obrázek 1: Plod tykve olejné	11
Obrázek 2: Tykvvový olej.....	14
Obrázek 3: Graf obsahu sušiny	32
Obrázek 4: Graf vaznosti vody	33
Obrázek 5: Graf vaznosti tuku	34
Obrázek 6: Graf rozpustnosti	35
Obrázek 7: Graf emulgační aktivity	36
Obrázek 8: Graf obsahu zbytkového oleje	37
Obrázek 9: Graf obsah NL	38
Obrázek 10: Graf obsah bílkovin	39
Obrázek 11: Graf obsah bílkovin vs dusíkatých látek	39
Obrázek 12: Spektrum proteinových profilů velikostních frakcí a bílkovinného koncentráту.....	40
Obrázek 13: Graf obsah bílkovin a dusíkatých látek u jednotlivých frakcí.....	41