Zemědělská fakulta
Faculty of Agriculture
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
University of South Bohemia in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra rostlinné výroby

Diplomová práce

Produkce enzymových hydrolyzátů z bílkovin semen lnu a hodnocení jejich vlastností

Autorka práce: Bc. Kateřina Hašková

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

České Budějovice
2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne ....

Podpis

Dedikace

Tato diplomová práce byla vypracována v rámci řešení grantu GAJU 027/2019/Z.

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Janu Bártovi, Ph. D. za pomoc při navržení metodiky a statistickém vyhodnocení výsledků a připomínky k práci. Dále patří mé poděkování Ing. Markétě Jarošové za pomoc při laboratorních stanoveních a nekonečnou trpělivost při zodpovídání mých dotazů.

Děkuji i mých spolužákům Bc. Anetě Bláhové, Bc. Petře Javůrkové, Bc. Markétě Joskové, Bc. Petru Štoidlovi, Bc. Václavu Zahradníkovi a Bc. Haně Žákové, kteří vždy věděli jak mě podpořit, neboť si zrovna procházeli tím samým. A nakonec patří velký dík i mé rodině a přátelům, kteří nikdy nepřestali věřit, že to nějak zvládnu.

Abstrakt

Tato práce se zabývá vlivem hydrolýzy proteinových izolátů (PI) ze tří různých odrůd lnu (Libra, Agriol a Raciol) na antioxidační vlastnosti a vybrané funkční vlastnosti: rozpustnost, vaznost vody a tuku, emulgační aktivitu a stabilitu. Součástí práce je i výroba PI ze semen lnu. Hydrolýza byla provedena trypsinem, alkalázou a papainem štěpení trypsinem proběhlo nejmírněji, zatímco štěpení papainem bylo nejintezivnější. Sledován byl i průběh hydrolýzy během reakce a rozsah naštěpení. U PI i hydrolyzátů byla zjištěna vysoká rozpustnost (téměř 100%). Naopak vaznost vody byla nižší (3,93 g/g a méně) než vaznost tuku (4,34 g/g), která se u většiny hydrolyzátů štěpením zvyšovala, zatímco vaznost vody klesala. Emulgační aktivita vlivem hydrolýzy stoupla (1,47×), avšak stabilita klesla (1,3×). Nejlepší emulgační vlastnosti prokázaly trypsinové hydrolyzáty. Velký dopad měla hydrolýza PI na obsah polyfenolů, který byl u alkalázových hydrolyzátů až 3× vyšší a na antioxidační aktivitu, která narostla u papainových hydrolyzátů až 2,5×.

Klíčová slova: len, proteinový izolát, hydrolýza, trypsin, alkaláza, papain, funkční vlastnosti, rozpustnost, vaznost vody, vaznost tuku, emulgační aktivita, emulgační stabilita, obsah polyfenolů, antioxidační aktivita

Abstract

This thesis focuses on effect on antioxidant properties and chosen functional properties: solubility, water and fat holding capacity, emulsification activity and stability caused by hydrolysis of protein isolates (PI) made from three different flax varieties (Libra, Agriol and Raciol). Part of this work was production of PI from flax seed. For hydrolysis trypsin, alcalase and papain were used – hydrolysis by trypsin was the mildest, while hydrolysis by papain was the most intensive one. Dynamics and degree of hydrolysis were also observed. Solubility of PI and hydrolysates was discovered to be very high (almost 100%). On the contrary water holding capacity was lower (3,93 g/g and less) than fat holding capacity (4,34 g/g), which increased upon hydrolysis for most enzymes, while water holding capacity decreased. Emulsification activity rised (1,47×) under the effect of hydrolysis, however stability dropped (1,3×). The best emulsifiction properties were found out in trypsin hydrolysates. Hydrolysis caused great impact on content of polyphenols which were in alcalase hydrolysates up to 3× higher and on antioxidant activity which grew in papain hydrolysates up to 2,5×.

Key words: flax seed, protein isolate, hydrolysis, trypsin, alcalase, papain, functional properties, solubility, water holding capacity, fat holding capacity, emulgation activity, emulgation stability, polyphenolic content, antioxidant activity

Obsah

1 Lněné semeno....8
1.1 Morfologie a anatomie plodu a semene....8
1.2 Chemické složení lněných semen....8
1.2.1 Lipidy....8
1.2.2 Sacharidy....9
1.2.3 Proteiny....9
1.2.4 Minerály a vitamíny....11
1.2.5 Fenolické látky....11
1.2.6 Antinutriční látky....11
2 Hydrolýza proteinů....12
3 Proteázy....14
3.1 Serinové proteázy....15
3.1.1 Trypsin (EC 3.4.21.4)....15
3.1.2 Alkaláza (EC 3.4.21.62)....16
3.2 Cysteinové proteázy....16
3.2.1 Papain (EC 3.4.22.2)....16
4 Technologické vlastnosti....17
4.1 Rozpustnost....18
4.2 Vaznost vody a tuku....18
4.3 Emulgační vlastnosti....19
5 Cíle....20
6 Materiál a metody....21
6.1 Výchozí materiály....21
6.2 Příprava materiálu....22
6.2.1 Odslizení....22
6.2.2 Lisování oleje a analýza obsahu zbytkového tuku....22
6.2.3 Mletí a prosívání....23
6.2.4 Izolace celkového proteinu....23
6.2.5 Lyofilizace....24
6.2.6 Hydrolýza proteinu....24
6.3 Laboratorní analýzy....25
6.3.1 Analýza obsahu dusíku Dumasovou metodou....25
6.3.2 Stanovení obsahu bílkovin v hydrolyzátech metodou BCA....25
6.3.3 SDS-PAGE....26
6.3.4 Stanovení rozpustnosti, vaznosti vody a tuku....28
6.3.5 Stanovení emulgační aktivity a stability....29
6.3.6 Stanovení polyfenolických látek metodou FCM....29
6.3.7 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS....30
6.4 Zpracování výsledků....31
7 Výsledky....32
7.1 Výtěžnost jednotlivých kroků výroby proteinového izolátu....32
7.2 Vývoj obsahu dusíkatých látek a bílkovin během hydrolýzy....32
7.3 Hodnocení rozsahu hydrolýzy a velikosti vzniklých peptidů....34
7.4 Rozpustnost, vaznost vody a vaznost tuku....35
7.5 Emulgační aktivita a stabilita....37
7.6 Obsah celkových polyfenolů a antioxidační aktivita....38
8 Diskuze....39
8.1 Výtěžnost výroby proteinového izolátu....39

8.2 Vývoj obsahu dusíkatých látek a bílkovin během hydrolýzy.....39
8.3 Bílkovinný profil proteinového izolátu a hydrolyzátů.....40
8.4 Rozpustnost, vaznost vody a vaznost tuku.....40
8.5 Emulgační aktivita a stabilita.....41
8.6 Obsah polyfenolů a antioxidační aktivita.....42

Úvod

Len setý (*Linum usitatissimum* L.) je jednou z nejstarších plodin a v současnosti je stále pěstován ve více jak 50 zemích světa. Přestože se jedná o velmi versatilní rostlinu, jak už naznačuje její latinské jméno znamenající „velmi užitečný“, používala se v minulosti převážně na výrobu textilu a papíru. V ČR byla ukončena produkce přadného lnu v r. 2010 a nadále jsou zde pěstovány pouze olejné odrůdy lnu, jejichž plochy kolísají v závislosti na poptávce a rentabilitě mezi 200-2000 ha s průměrným výnosem 1,16 t/ha (Kraus, 2020).

Po vylisování oleje ze semen vznikají jako odpadní produkt pokrutiny, které lze rozemlet na lněnou mouku. Ta je nejčastěji využívána jako krmivo či hnojivo, což je poměrně nedostatečné využití tohoto materiálu, vzhledem k tomu, že se jedná o dobrý zdroj proteinů. Obzvlášť ve světle aktuálního zvýšeného zájmu o rostlinné (a všeobecně alternativní) proteiny, který je spojen se zdravotními benefity jejich konzumace, vyšší cenou živočišných proteinů a dopadu jejich produkce na životní prostředí, rostoucí vlnou vegetariánství a předpokládaném nedostatku proteinů v budoucnu.

Lněný protein má vybalancovaný obsah AK a všechny prerekvizity nutričně lepších proteinů. Překážkou v širším upotřebení v lidské výživě jsou jeho minimální funkční vlastnosti (především rozpustnosti ve vodním prostředí), které jsou potřebné pro zařazení do receptů potravin. K jejich zlepšení lze však přispět hydrolýzou proteinu, a to až do té míry že, výsledné hydrolyzáty mohou zásadně ovlivňovat strukturu a texturu potravin. Mohou mít změněné i zdravotní účinky, díky vyštěpení peptidů s fyziologickými aktivitami, např. antibakteriální, antidiabetickou, antioxidační či antihypertenzní.

Tato práce se věnuje výrobě proteinového izolátu ze lněných semen a zkoumání vlivu následné hydrolýzy pomocí trypsinu, alkalázy a papainu na obsah polyfenolů, antioxidační aktivitu a vybrané funkční vlastnosti: rozpustnost ve vodě, vaznost vody a tuku, emulgační aktivitu a stabilitu. Sledován byl i průběh hydrolýzy a stupeň naštěpení výsledného hydrolyzátu.

1 Lněné semeno

1.1 Morfologie a anatomie plodu a semene

Lněná semena jsou uložena v tobolkách dělených na pět pouzder, které jsou dále rozděleny ořasenými či hladkými septy. Jedna tobolka tedy může obsahovat maximálně 10 semen, normální je však počet 5-6 semen na tobolku.

Semena jsou zploštělá, na průřezu oboustranně vypouklá, vejčitého tvaru, dlouhá přibližně 4-6 mm, s lesklým, hladkým povrchem, jehož zbarvení se pohybuje od sytě hnědé po okrově žlutou. Jednotlivé odrůdy se, kromě chemického složení semene liší hlavně velikostí, váhou a barvou (Diviš, 2010; Špaldon, 1986). Hmotnost tisíce semen (HTS) se udává okolo 5 ± 1 g, nicméně je možné setkat se i s vyššími hodnotami, obzvlášť jde-li o olejné odrůdy (Daun et al., 2003).

Anatomicky lze semeno rozdělit na pět vrstev osemení (testy), endosperm a embryo, které se skládá ze dvou děloh (coletydon), zárodečného kořínku (radixu) a vzrostného vrcholu (Diviš, 2010).

1.2 Chemické složení lněných semen

Chemickou analýzou byly zjištěno, že lněné semeno obsahuje průměrně 4-8 % vlhkosti, 30-40 % tuku, 20-35 % dietní vlákniny, 20-30 % proteinů a 3-4 % popelovin (Coskuner a Karaba, 2007).

1.2.1 Lipidy

Největší složkou lněných semen jsou lipidy, které představují pro semeno hlavní zdroj energie pro klíčení. Zaujímají až 45 % sušiny, z toho je 75 % uloženo v dělohách, 22 % v obalu semene a 3 % v embryu (Daun et al., 2003). V semeni se vyskytují ve formě drobných tukových kapének o průměru 1,3 μm, jejichž povrch je tvořen obalovým proteinem oleosinem, který představuje až 1,3 % z jejich hmoty. Vnitřní obsah kapénky tvoří neutrální lipidy (98 %), fosfolipidy (0,9 %) a volné MK (0,1 %) (Tzen et al., 1993). Jako hlavní skupiny lze označit (tri)acylglyceroly a MK, méně zastoupené skupiny jsou sterolestery, glykolipidy a fosfolipidy.

U tradičních olejných odrůd je nejzastoupenější MK vícenenasycená kyselina α-linolenová, která může přesáhnout i 50 % veškerých MK. Významněji obsaženy jsou i mononenasycená kyselina olejová (18 %), vícenenasycená kyselina linolová

(14 %) a nasycené kyseliny palmitová (5 %) a stearová (3 %) (Daun et al., 2003). Poměr ω-6 a ω-3 MK je průměrně 0,3:1, což odpovídá poměru typickému pro mořské ryby a plody (Bernacchia et al., 2014). Rozložení obsažených MK není v semeni homogenní, a především olej obsažený v embryu má jedinečnou skladbu MK oproti zbytku semene (Dorrell, 1969). Kromě klasických odrůd byly navíc vyšlechtěny i odrůdy se změněnou skladbou MK na nízký nebo střední obsah kyseliny α-linolenové.

Lipidická fáze také obsahuje, díky svému nepolárnímu charakteru, rozpuštěné vitamíny skupiny E – tokoferoly (α, ß, ale hlavně γ) a tokotrienoly (plastochromanol-8), steroly (stigmasterol, campesterol, δ-5-avenasterol) a různé pigmenty jako např. karotenoid lutein nebo omezeně chlorofyly (Bernacchia et al., 2014; Daun et al., 2003).

1.2.2 Sacharidy

V semeni jsou kromě lipidů hojně obsaženy i proteiny (viz 2.2.3) a sacharidy. Sacharidy jsou soustředěny hlavně v osemení. Stravitelné sacharidy přitom tvoří jen 1-2 % z celkového množství. Zbytek je tzv. dietní vláknina, koncentrovaná především v epidermální vrstvě, kterou můžeme dále dělit na rozpustný sliz a nerozpustný lignin a celulózu (Bekhit et al., 2018).

Velký význam má obzvlášť vláknina ve formě slizu díky svým potenciálně zajímavým vlastnostem, jako např. vysoká rozpustnost, viskozita, bobtnavost, schopnost vázat vodu, emulgační aktivita atd. (Dev a Quensel, 1988; Mazza a Biliaderis, 1989). V semeni zaujímá 7-10 % celkového obsahu a chemicky je tvořena dvěma skupinami polysacharidů – z 83 % neutrálními arabinoxylany a galaktoglukany a ze 17 % kyselými pektinoidními molekulami. Konkrétní složení je proměnlivé v závislosti na odrůdě, obvykle je uváděná směs L/D-galaktózy, D-xylózy, L-arabinózy, L-rhamózy, kyseliny D-galakturonové, L-fukózy a D-glukózy. (Bekhit et al., 2018; Shim et al., 2014; Kajla et al., 2015; Bernacchia et al., 2014).

1.2.3 Proteiny

Proteiny jsou hlavním zdrojem dusíku pro klíčící semeno. Většina (56-70 %) je uložena v dělohách semene, zbytek je obsažen v osemení a endospermu (Shim et al.,

2014). Obsah proteinů se může pohybovat od 10 do 31 % (Shim et al., 2014), přičemž platí, že množství bílkovin je nepřímo úměrné obsahu tuků v semeni (Daun a Przybylski, 2000). Obecně se však uvádí průměrná hodnota 20-30 %, která je však lehce nadhodnocena, jelikož nepočítá s neproteinovým dusíkem vyskytujícím se v semeni ve formě vitamínů, sinapinu, cholinu a kyanogenních glykosidů (Bekhit et al., 2018; Daun et al., 2003).

Lněný protein lze rozdělit na dvě hlavní frakce: vysokomolekulární a nízkomolekulární, známé též jako linin a kolinin (Bekhit et al., 2018). Vysokomolekulární frakce jsou v solných roztocích rozpustné globuliny, které jsou zásobním proteinem semene a tvoří až 80 % veškerého proteinu. (Wu et al., 2019; Bernacchia et al., 2014). Velikost globulinové frakce je odhadovaná na 252-298 kDa, se sedimentačním koeficientem 11-12 S (Wu et al., 2019). Strukturálně se skládá z 5 různých podjednotek o velikostech 14,4 – 24,6 – 30,0 – 35,2 a 50,9 kDa (Marcone et al., 1998). Z toho frakce o velikosti 30,0 a 35,2 kDa jsou acidické a frakce o velikosti 24,6 kDa bazická (Wu et al., 2019). Nízkomolekulární frakci tvoří ve vodě rozpustné albuminy, představující pravděpodobně metabolický protein, které zaujímají zhruba 20 % z celkového proteinu semene. Velikost albuminové frakce je 16-18 kDa, se sedimentačním koeficientem 1,6-2 S. Strukturně se jedná o jediný lineární řetězec (Wu et al., 2019; Bernacchia et al., 2014).

Složením AK se lněný protein podobá sójovým proteinům (Shim et al., 2014), avšak hodnotou aminokyselinového skóre 82 je i předčí (Wu et al., 2019). Protein je bohatý na arginin, kyselinu glutamovou/glutamin a kyselinu asparagovou/asparagin (Wu et al., 2019; Shim et al., 2014; Bekhit et al., 2018). Lněný protein je též dobrým zdrojem sirných AK cysteinu a methioninu a větvených AK, tj. valinu, leucinu a izoleucinu (Bernacchia et al., 2014). Limitující AK je lysin (Kajla et al., 2015). Nicméně je jeho obsah v dobrém poměru vůči ostatním AK (např. poměr lysinu ku argininu je 0,37), což indikuje pozitivní vliv na srdeční činnost. (Wu et al., 2019; Bekhit et al., 2018). Nízký je též obsah threoninu a tyrosinu, (Bernacchia et al., 2014). Největší rozdíly v obsahu mezi odrůdami vykazovali izoleucin a kyselina asparagová. Prostředí zase nejvíce ovlivňovalo obsah argininu, methioninu, serinu, tyrosinu a kyseliny glutamové (Daun a Przybylski, 2000).

Speciální skupinou jsou cyklinopeptidy, nacházející se v oleozomech semene. Lněné cyklinopeptidy (CLs) patří do skupiny hvozdíkovité (typ VI). Jedná se o tzv. orbitidy, což jsou homomonocylinopeptidy. Ty lněné čítají 8-9 AK, a mají velikost cca 1 kDa. Nejvíce zastoupený je CLA, hojněji obsažené jsou i CLs obsahující methionin-S-oxid. Zajímavé jsou především pro své bioaktivní vlastnosti, dané pravděpodobně jejich AK sekvencí, např. imunosupresivitu, antimalarické účinky a různé další inhibiční procesy. Oxidace některých CLs může také stát za hořkostí delší dobu skladovaného vylisovaného oleje. (Shim et al., 2014)

1.2.4 Minerály a vitamíny

Z minerálů je ve lněném semenu nejvíce zastoupen draslík (560-920 mg/100 g) a fosfor (650 mg/100 g), významné je i množství železa, zinku a manganu (Kajla et al., 2015; Bernacchia et al., 2014). Semena jsou i, kromě výše uvedených (viz 2.2.1), v tucích rozpustných, vitamínů, zdrojem vitamínů skupiny B (především niacinu) a vitamínu C (Bernacchia et al., 2014).

1.2.5 Fenolické látky

Z nutričně-terapeutického hlediska je zajímavá i minoritně zastoupená skupina fenolických látek (v množství 0,8-1,3 g/100 g) (Daun et al., 2003). Jedná se o deriváty kyseliny benzoové a skořicové v esterifikované či etherifikované formě, které jsou ve lněných semenech obsažené jako jednoduché fenolické kyseliny a flavonoidy v nelipidické části nebo jako komplexní difenolické lignany v osemení. Z fenolických kyselin byly izolovány kyseliny p-hydroxybenzoová, chlorogenová, ferulová, kumarová, vanilinová, sinapová, gallová, kávová a protokatechová (Hall et al., 2006). Hlavním lignanem je sekoizolariciresinol diglukóza, kromě toho se v semenech vyskytují v menší míře i jiné lignany jako např. izolariciresinol, pinoresinol a matairesinol (Meagher et al., 1999).

1.2.6 Antinutriční látky

Méně žádoucí jsou látky s antinutričním efektem. U lněných semen patří mezi hlavní představitele této skupiny kyselina fytoová, linatin a kyanogenní glykosidy.

Kyselina fytoová je hlavním zdrojem fosforu pro klíčící semeno a tvoří 0,8 -1,5 % semene, což je množství srovnatelné s tím obsaženým např. v arašídech či

sóje, přesto je to méně, než je obvyklé u jiných olejnin (Bekhit et al., 2018). Antinutriční význam má kyselina fytoová především kvůli schopnosti indukovat deficienci zinku díky silnému chelatačnímu účinku na mono- a divalentní kationty, jako je právě zinek, draslík, hořčík a železo nebo dokonce i na proteiny a škroby (Harland a Moris, 1995).

Syndrom deficience může způsobovat i antivitamín linatin, zvaný také jako antipyridoxinový faktor. Jedná se o polární látku, která se nachází v dělohách semene a působí jako inhibitor vitamínu B_6. Běžná lidská strava však obsahuje dostatek vitamínu B_6, aby nedocházelo k jeho absolutní inhibici linatinem (Bekhit et al., 2018).

Problematickou skupinou jsou i kyanogenní glykosidy. Ze lnu byly izolovány diglykosidy linustatin a neolinustatin a monoglykosidy linamarin a lotaustralin. Během trávení se štěpí a uvolňují tím toxický kyanid, nebo případně degradují na thiokyanáty, způsobující deficienci jódu (Bekhit et al., 2018). Jejich poměr (obzvlášť zastoupení monoglykosidů) i množství se přitom v semeni během dozrávání mění od 5 % v nezralých semenech až po 0,1 % ve vyzrálých (Cutler a Conn, 1964, Bacala a Barthet, 2010). Platí přitom, že dospělý jedinec by měl být schopný detoxifikovat dávku 30-100 mg kyanidu, což odpovídá více než 1 kg lněného semene (Daun et al., 2003). Nebezpečnost těchto glykosidů je tedy relativní, obzvlášť vezmeme-li v úvahu, že mají tendenci přirozeně degradovat v poškozených (např. rozemletých) semenech nebo po vystavení vyšším teplotám (Hall et al., 2006; Daun et al., 2003).

Kromě toho má len tendenci kumulovat v semenech kadmium. Jeho množství závisí především na hladině prvku v půdě a na dané odrůdě. Obecně však lze říci, že riziko konzumace lněných semen v tomto kontextu je nižší, než je tomu například u rýže či pšenice (Hocking a McLaughlin, 2000).

V semeni se v menší míře vyskytuje také inhibitor trypsinu, jehož množství je však malé v porovnání se sójou či řepkou. Hlášeny byly i případy alergické reakce po požití produktů s obsahem lněných semen (Daun et al., 2003; Hall et al., 2006).

2 Hydrolýza proteinů

Hydrolýza proteinů je proces, během kterého dochází ke štěpení peptidových vazeb bílkovin za vzniku peptidů různých délek a AK složení (McCarthy et al., 2013;

Panyam a Kilara, 1996). Peptidové fragmenty jsou přitom zároveň produkty i výchozí materiál pro další, paralelně probíhající, štěpení (Qi a He, 2006).

Rozlišujeme několik druhů hydrolýzy: tepelnou, chemickou (a to buď kyselou či alkalickou) a enzymatickou (McCarthy et al., 2013; Schaafsma, 2009). Enzymatická hydrolýza má oproti zbývajícím typům několik výhod – reakce probíhá za mírných podmínek, velmi rychle a specificky a lze ji provádět v mnoha variantách (Schaafsma, 2009). Jejími hlavními důsledky je snížení molekulární hmotnosti, nárůst skupin schopných ionizace a odhalení hydrofobických skupin proteinů (Panyam a Kilara, 1996). Na její průběh má vliv specifita enzymu, stupeň denaturace proteinu, koncentrace substrátu a enzymu, aktivita enzymu, pH, iontová síla, teplota, tlak a přítomnost inhibitorů (Panyam a Kilara, 1996; Qi a He, 2006). V závislosti na podmínkách hydrolýzy může být protein hydrolyzován lehce, středně nebo rozsáhle (Panyam a Kilara, 1996).

Výsledkem částečné proteolýzy je proteinový hydrolyzát, definovaný jako směs polypeptidů, oligopeptidů a AK. „Hrubé“ proteinové hydrolyzáty mohou být dále ošetřeny inaktivací teplem, (ultra)filtrací (která se však nedoporučuje kvůli značnému snížení výnosu při současném zvýšení nákladů na produkci), centrifugací, precipitací, koncentrací, sušením, hydrolýzou exoproteázami nebo ošetřením specifickými enzymy (McCarthy et al., 2013; Schaafsma, 2009; Panyam a Kilara, 1996). Při výrobě proteinových hydrolyzátů vhodných pro potravinářské využití je klíčová zejména kontrola molekulární velikosti vznikajících peptidů, což je však obvykle velmi obtížné, nicméně řešitelné s použitím vysoce specifických proteáz (McCarthy et al., 2013; Qi a He, 2006, Briones-Martínez et al., 1997).

Součástí proteinových hydrolyzátů mohou být i produkty se zvláštním nutričním efektem, které lze podle jejich charakteristik rozdělit do dvou hlavních skupin – na frakce s relativně vysokým obsahem určitých AK a bioaktivní peptidy (3-20 AK dlouhé řetězce, jejichž nutriční hodnota je vyšší než by byla u odpovídající směsi volných AK, aktivované vyštěpením z původního proteinu, přičemž pro jejich aktivitu jsou klíčové kromě AK sekvence i N- a C- termální konce (McCarthy et al., 2013; Schaafsma, 2009).)

3 Proteázy

Enzymatická hydrolýza bílkovin probíhá za katalytické účasti enzymů patřících do třídy 3.4 - proteáz. Jejich společným znakem je schopnost štěpit peptidové vazby za účasti vody. Mnoho z nich však má i další aktivity jako např. esterovou, koagulační či transpeptidázovou (Vodrážka, 1991).

Obecně je lze rozdělit na exoproteázy a endoproteázy. Exoprotezázy odštěpují AK vždy od konce bílkovinného řetězce. Na N-konci štěpí aminopeptidázy a di- a tripeptidyl-peptidázy a na C-konci karboxypeptidázy a peptidyl-dipeptidázy. Endoproteázy štěpí uvnitř AK sekvence bílkoviny. Speciální skupinou jsou oligopeptidázy, které jsou schopné štěpit pouze peptidové fragmenty do maximální délky 17 AK. (Barrett, 2001)

Proteázy se dají dále dělit na základě mechanismu jejich účinku, a to na serinové (viz 4.1), cysteinové (viz 4.2), aspartátové, metalloproteázy, threoninové a glutamátové (Barrett, 2001; Bakardjijeva, 2015).

Aspartátové proteázy, jinak také karboxylové či kyselé (podle jejich pH optima), fungují na principu nekovalentní acidobazické katalýzy (Dunn, 2001). V jejich aktivním centru se nachází aspartátové zbytky s karboxylovými skupinami, mezi nimiž je vodíková vazba (Rao et al., 1998; Dunn, 2001). Tyto zbytky aktivují molekulu vody, která následně nukleofilně napadá peptidovou vazbu a štěpí ji (Bakardjijeva, 2015).

Na principu nekovalentní katalýzy fungují i metalloproteázy, které mají ve svém aktivním místě dvojmocný kov (nejčastěji zinek). Ten působí silným elektrofilním tahem a tím koordinuje vazbu s vodou, s níž se poté váže vodíkovou vazbou zbytek kyseliny glutamové, která poskytne proton k rozštěpení peptidové vazby proteinu. (Dunn, 2001)

Nejnovějšími skupinami jsou threoninoné proteázy, štěpící kovalentní katalýzou s pomocí nukleofilního threoninového zbytku na N-konci enzymu (Bakardjijeva, 2015), a nedávno reklasifikované glutamátové proteázy, jež nekovalentně štěpí prostřednictvím molekul vody aktivovanými katalytickou dyádou glutamátu a glutaminu (Sims et al., 2004).

3.1 Serinové proteázy

Serinové proteázy, někdy nazývané též -OH proteázy, jsou nejvíce prostudovanou skupinou. Mají aktivní centrum ve tvaru mělké prohlubně, jehož klíčovou částí je -OH skupina zbytku serinu ve fyzické blízkosti histidylu a zbytku kyselé AK (např. aspartátu). Tyto AK jsou navzájem propojené vodíkovými vazbami a tvoří tak nábojovou (protonovou) štafetu. Pokud dojde ke spojení substrátu s aktivním místem enzymu, vyvolá to záporný náboj na kyslíku serinové -OH skupiny, v důsledku toho dojde k přenosu protonu na histidyl a z něj na N substrátu, čímž dojde k přerušení peptidové vazby a uvolnění odštěpeného peptidu. Zbytek bílkoviny je kovalentně spojen se serinem a tvoří tak acetylenzym. K uvolnění zbytku bílkoviny z enzymu dochází působením molekul vody. (Vodrážka, 1991)

Serinové proteázy jsou velmi rozšířené. Dle jejich specifity lze identifikovat několik dílčích skupin: trypsinový typ, který štěpí za kladně nabitými AK, jako je arginin a lysin, chymotrypsinový typ, který štěpí za velkými hydrofobními AK jako jsou fenylalanin, tryptofan a tyrozin, a elastázový typ, který štěpí za malými AK, jako např. glycin, alanin a valin (Bakardjijeva, 2015; Rao et al., 1998).

3.1.1 Trypsin (EC 3.4.21.4)

Jedním ze zástupců serinových proteáz je trypsin. Jedná se o živočišnou proteázu, která vzniká odštěpením hexapeptidu (mezi Lys^{6} a Ile^{7}) od N-konce svého proenzymu, trypsinogenu. Enzym má podobu jednořetězcového polypeptidu, dlouhého 223 AK, o molekulární hmotnosti 23,4 kDa. Jeho nativní forma se nazývá β-trypsin a je prekurzorem pro α-trypsin, který z něj vzniká autolýzou (mezi Lys^{131} a Ser^{132}). Sekundární struktura je tvořena 6 disulfidickými můstky. Aktivní centrum je tvořeno His^{46} a Ser^{183}. (Sigma-Aldrich, 2007a)

Trypsin štěpí vysoce specificky na C-terminálním konci substrátu, kde rozeznává peptidové vazby mezi argininem a lysinem (Qi a He, 2006). Rychlost reakce může být omezena, pokud se za těmito AK nachází na jakémkoli konci zbytek kyselé AK, anebo se může dokonce úplně zastavit, následuje-li na C-konci prolinový zbytek (Sigma-Aldrich, 2007a). Výsledným produktem takového štěpení jsou fragmenty velké 15-20 AK s argininem či lysinem na konci (Shannon, 2001; Vodrážka, 1991). Kromě peptidových vazeb je trypsin schopný štěpit i esterové

vazby a amidové vazby syntetických derivátů, jakožto i AK (Sigma-Aldrich, 2007a).

Jeho optimální teplotní podmínky jsou určeny organismem původu, nicméně se většinou jedná o hodnoty kolem 40 °C, pH optimum je mezi 7-9 (Chelulei Cheison et al., 2011; Buck et al., 1962).

3.1.2 Alkaláza (EC 3.4.21.62)

Alkaláza, známá též pod jmény subtilizin A nebo subtilizin Carlsberg, je extracelulární endoproteáza serinového typu, produkovaná bakteriemi *Bacillus licheniformis* (Graycar, 2013).

Je produkovaná ve formě preproenzymu, který obsahuje přibližně 77 AK dlouhý propeptidový segment, jehož vyštěpením vzniká aktivní forma alkalázy (Shinde, 2011). Ta má monomerní podobu s řetězcem dlouhým 274 AK a molekulární váhou 27,5 kDa (DeLange a Smith, 1968; Graycar, 2013). Katalytické místo je tvořeno Ser^{221}, His^{64} a Asp^{32} (Gupta et al., 2002).

Štěpení touto proteázou probíhá nespecificky, díky její schopnosti hydrolyzovat téměř všechny typy peptidových vazeb. Nicméně u ní můžeme pozorovat lehkou preferenci neutrálních či acidických AK v pozici P1 (Bankus a Bond, 2001). Enzym je velmi stabilní v rozmezí pH 7-10, kde také leží bod jeho maximální aktivity, teplotní optimum je mezi 55-60 °C (Graycar, 2013; Sigma-Aldrich, 2007b).

3.2 Cysteinové proteázy

Velmi podobný mechanismus jako serinové proteázy mají i cysteinové proteázy (nazývané taktéž thiolové či sulfhydrylové). V jejich aktivním centru se nachází thiolová skupina zbytku cysteinu a histidyl. Proteolýza probíhá opět přes tvorbu kovalentní vazby mezi substrátem a cysteinem enzymu, která je později uvolněna působením molekul vody. (Vodrážka, 1991) V rámci skupiny rozeznáváme podle specifity několik typů: papainový, trypsinový, specifický pro kyselinu glutamovou a ostatní (Rao et al., 1998).

3.2.1 Papain (EC 3.4.22.2)

Jako zástupce cysteinových proteáz lze uvést papain. Jde o rostlinnou proteázu, nejčastěji používanou ve formě papainového preparátu získávaného ze sušeného

latexu nezralých plodů *Caprica papaya*, které mimo něj obsahují i další enzymy jako jsou chymopapain či lysozym (Vodrážka, 1991).

Má podobu proteinového řetězce čítajícího 212 AK, o velikosti 23,4 kDa, složeného třemi disulfidickými můstky do dvou domén, uspořádaných do tvaru V. Mezi nimi je štěrbina pro substrát s katalytickým jádrem tvořeným Cys^{25}, His^{159} v blízkosti Asn^{175}, které je tudíž analogem aktivního centra serinových proteáz (Mitchel et al., 1970; Storer a Ménard, 2013).

Papain má širokou substrátovou specifitu, přičemž preferuje arginin a lysin na pozici P1 a AK s velkým hydrofobickým řetězcem, jako např. fenylalanin nebo valin, na P2. Neštěpí však, pokud je na pozici P1' valin (Bankus a Bond, 2001). Kromě hydrolýzy peptidových vazeb může papain štěpit i vazby amidové a esterové. Známá je u něj i koagulační a syntetická aktivita (Vodrážka, 1991).

Papain, jakožto cysteinová proteáza, je nakloněna spíše neutrálnímu pH reakce. Stabilní je v rozmezí pH 5-9, jeho pH optimum je však pro většinu substrátů 7 (Rao et al., 1998; Vodrážka, 1991). Enzym je také vysoce termostabilní a funguje i při teplotách 80-90 °C, jeho ideální teplota prostředí se pohybuje kolem 55-60 °C (Frahat et al., 2016).

4 Technologické vlastnosti

Technologické neboli funkční vlastnosti proteinů jsou fyzikálně chemické vlastnosti, ovlivňující zpracování a chování proteinů v konečném produktu (Vojdani a Whitaker, 1994). Běžné potravinové proteiny mají obvykle dobré technologické vlastnosti, nicméně na ně má velký vliv pI konkrétního proteinu, pH, iontová síla a teplota prostředí, přičemž je žádoucí, aby tyto vlastnosti byly stabilní při co nejširším spektru podmínek (Patterson, 2008; Panyam a Kilara, 1996). To je dosažitelné pomocí hydrolýzy proteinů, která může zlepšovat rozpustnost, pěnivost a emulgační vlastnosti (Vojdani a Whitaker, 1994).

Funkční vlastnosti jsou ovlivněny vnitřními faktory, jako je složení proteinu, případně směsi proteinů, jejich monomerní či oligomerní povaha, flexibilita, hydrofobicita, povrchový náboj, koncentrace, pI, vázané ligandy. Dále mají vliv i externí faktory, tj. teplota, pH, oxidační či redukční stav prostředí, nebo přítomnost solí a iontů, vody, karbohydrátů, lipidů, slizů, povrchově aktivních látek či třísloviny.

Ovlivněné mohou být funkční vlastnosti i formou, kterou je s proteiny zacházeno při jejich zpracování, např. ohřev, okyselení, přidání protiiontů, změna iontové síly, vystavení redukčním podmínkám, sušení, skladování nebo různé modifikace. (Kinsella a Whitehead, 1989)

4.1 Rozpustnost

Jednou z nejdůležitějších technologických vlastností je rozpustnost, neboť má zásadní vliv na ostatní funkční vlastnosti. Obzvlášť znatelné je to v případě tvorby gelů, pěnivosti či emulgačních vlastností (Meinlschmidt et al., 2006). Sama o sobě má klíčovou roli například při výrobě nápojů (Vojdani a Whitaker, 1994).

Ideálním stavem je vysoká rozpustnost v širokém spektru pH, teplot, koncentrací a obsahů solí (Neklyudov et al., 2000). Největší vliv na rozpustnost má přitom pH prostředí (McCarthy et al., 2013).

Zlepšení rozpustnosti lze dosáhnout hydrolýzou původního proteinu, to vede ke zmenšení velikosti molekul a odhalení ionizovatelných a karboxylových skupin. Nejvíce pozorovatelné zlepšení nastává při pH 4-5 (Neklyudov et al., 2000).

4.2 Vaznost vody a tuku

Vaznost vody je definovaná jako schopnost zadržovat vodu ve 3D struktuře proteinu. Dle jiných definic jde o množství vody neoddělitelné centrifugací či nezamrazitelné při -40 °C. Tato vlastnost hraje hlavní roli při tvorbě textury jídla. (Zayas, 1997) Toho je využíváno např. při zpracování masa a výrobě párků či chlebových a dortových těst (Vojdani a Whitaker, 1994).

Vaznost vody bývá po hydrolýze proteinu vyšší. Míra zlepšení závisí na použité proteáze, tepelné úpravě výchozího materiálu před izolací proteinu a pH hydrolýzy (Panyam a Kilara, 1996).

Vaznost tuku charakterizuje schopnost proteinů absorbovat a vázat tuky či oleje. Absorbovaný olej je však zpětně velmi špatně oddělitelný. K pohlcení lipidů dochází pomocí nepolárních řetězců proteinu, které interagují s hydrokarbonovými řetězci lipidů. Míra této schopnosti koreluje s velikostí hydrofobického povrchu proteinu a je tedy ovlivněná zdrojem proteinu, jeho zpracováním, složením aditiv, velikostí partikulí a teplotou. Nejlepší vaznost tuků obvykle mají nerozpustné hydrofobické proteiny. (Zaya, 1997) Využívaná je tato vlastnost při zpracování masa,

výrobě párků a přípravě některých těst (např. donutových) (Vojdani a Whitaker, 1994).

4.3 Emulgační vlastnosti

Tvorba emulze (homogenní substance ze dvou odlišných, nemísitelných fazí) vyžaduje mnoho energie, jejíž množství lze snížit přidáním povrchově aktivních látek usnadňujících emulgaci stabilizací rozhraní fází a zcelením emulze. Do této kategorie spadají i některé proteiny, díky jejich amfifilické povaze. Jejich emulgační schopnost je ovlivněna hydrofobicitou, flexibilitou a AK složením proteinu (Panyam a Kilara, 1996). Jedním z kritérií hodnocení je emulgační aktivita, která vyjadřuje max. objem emulze vzniklý po přidání jednotky proteinu.

Změna emulgačních vlastností po hydrolýze proteinu, závisí především na stupni proběhlé hydrolýzy, jelikož limitovaná hydrolýza odhaluje hydrofobické skupiny proteinu. Mírné rozštěpení proteinu vlastnosti zlepšuje, zatímco extenzivně štěpené proteiny mají zhoršené emulgační schopnosti (McCarthy et al., 2013). Mnoho proteinů má limit emulgaceschopnosti u peptidů o molekulární váze 2,4-2,5 kDa. Naopak peptidy o délce 20 AK a více patří mezi silné emulgátory (Neklyudov et al., 2000).

Emulgační vlastnosti proteinů nachází nejčastěji upotřebení při výrobě párků, polévek a dortových těst (Vojdani a Whitaker, 1994).

5 Cíle

Cílem mé diplomové práce byla výroba bílkovinných hydrolyzátů a vyhodnocení stupně jejich hydrolýzy, technologických vlastností a antioxidační aktivity. K výrobě bylo použito tří různých odrůd olejnatého lnu (zastupujících skupiny dle skladby nenasycených mastných kyselin) a tří modelových druhů proteáz (rostlinné, živočišné a mikrobiální). Výroba a analýza proteinových hydrolyzátů byla provedena v těchto krocích:

- odslizení a usušení semen
- vylisování oleje
- rozemletí výlisků a prosátí mouky
- izolace celkového proteinu alkalickou extrakcí a izoelektrickou precipitací
- výroba proteinového koncentrátu lyofilizací
- hydrolýza za optimálních podmínek proteáz
- hodnocení stupně hydrolýzy a spektra peptidů
- hodnocení technologických vlastností:
    - rozpustnosti
    - schopnosti vázat vodu a tuk
    - emulgační aktivity a stability
- hodnocení antioxidační aktivity a obsahu polyfenolů
- statistické vyhodnocení dat a evaluace výsledků

6 Materiál a metody

6.1 Výchozí materiály

Výchozím materiálem pro experimentální část této diplomové práce jsou tři olejné odrůdy lnu setého (*Linum usitatissimum* L.), reprezentující jednotlivé skupiny podle skladby nenasycených mastných kyselin, sklizené 21. 8. 2018 z pokusného pozemku ZF JU (48°97'44,09 s. š., 14°44'85,69 v. d. - 381 m. n. m., obilnářská výrobní oblast, pseudoglej) a následně uskladněné při -4 °C v chladící místnosti v temnu.

Jako zástupce odrůd s nezměněnou skladbou MK, tj. s vysokým obsahem kyseliny α-linolenové a nízkým obsahem kyseliny linolové, byla vybrána odrůda **Libra**, registrovaná v Nizozemsku v roce 2012. Jedná se o středně ranou odrůdu s rostlinami nízkého vzrůstu (60 cm), květy bleděmodré barvy a hnědými semeny s deklarovanou HTS 6,53 g. Řadí se mezi vysoce výnosné odrůdy s výnosem semen 2,10 t/ha a oleje 0,87 t/ha. Obsah oleje v semeni (46,8 %) je vysoký až velmi vysoký, se zastoupením kyseliny α-linolenové 56 % a kyseliny linolové 16,8 %. Jódové číslo je taktéž hodnoceno jako vysoké (Kraus, 2020).

Reprezentantem odrůd se změněným poměrem nenasycených MK na nízký obsah kyseliny α-linolenové a vysoký obsah kyseliny linolové je česká odrůda **Agriol**, registrovaná v roce 2016. Je popisována jako polopozdní odrůda s rostlinami nízkými až středně vysokými (64 cm), s květy středně modré barvy a žlutými semeny o HTS 6,31 g. Jedná se o výnosnou odrůdu s výnosem semen 2,12 t/ha a oleje 0,83 t/ha. Obsah oleje v semeni (44,1 %) je vysoký, se zastoupením kyseliny α-linolenové 3 %, linolové 68,7 % a nízkým jódovým číslem (Kraus, 2020).

Za poslední skupinu odrůd se změněným poměrem nenasycených MK na střední hodnoty, tak aby se obsah kyselin α-linolenové a linolové blížil poměru 1:1, byla vybrána česká odrůda **Raciol**, registrovaná v roce 2011. Je to středně raná odrůda s nízkými až středně vysokými (63 cm) rostlinami, modrofialovými květy a žlutými semeny s HTS 5,96 g. Výnos semen je 2,10 t/ha a oleje 0,80 t/ha. Obsah oleje v semeni je středně vysoký (43,2 %), stejně jako jódové číslo. Zastoupení kyselin α-linolenové a linolové je 30,9 a 40,6 % (Kraus, 2020).

6.2 Příprava materiálu

6.2.1 Odslizení

Prvním krokem v přípravě materiálu je odmytí slizotvorných látek z osemení, neboť by tvorbou gelu a svými elektrostatickými vlastnostmi ztěžovaly průběh dalších operací.

Od každé odrůdy bylo do 2000 ml kádinek naváženo po 200 g semen v pěti opakováních. Následně bylo ke vzorkům přidáno 1,5 l kohoutkové vody a obsah kádinek byl vytemperován ve třepací vodní lázni SW22 (Julabo, Německo) na 50 °C, kde byla semena ponechána 1 h bobtnat. Po uplynutí lhůty byla semena scezena a obdobným způsobem ještě dvakrát promyta. U 2. a 3. promyvu však muselo být použito méně vody kvůli masivnímu nabobtnání semen, konkrétně byla dávka vody snížena na 1,25 l u odrůdy Libra a na 1 l u odrůd Agriol a Raciol. Po promytí byla semena rozprostřena v tenké vrstvě na plastové tácy vyložené pečicím papírem a sušena při 50 °C 2 dny. Po vysušení byly vzorky zváženy, aby mohlo být stanoveno % odmytého slizu.

6.2.2 Lisování oleje a analýza obsahu zbytkového tuku

Dále byl z odslizených semen odstraněn přebytečný olej vylisováním na domácím lisu YODA YD-ZY-02A (Yoda, Čína) za použití programu „flaxseed“. Vzniklé pokrutiny byly ještě jednou vylisovány stejným způsobem. Po vylisování byly zváženy, kvůli určení % vylisovaného tuku.

Po rozemletí vzorků (viz. 4.2.3) byla také provedena analýza zbytkového obsahu tuku semiautomatizovanou Soxhletovou extrakcí. Pro provedení analýzy byl použit 1 g vzorku od každého opakování, který byl zataven do filtračního sáčku a vysoušen v sušárně Universal oven UN75 (Memmert, Německo) při 100 °C 3 h. Vzorky pak setrvaly až do úplného vychladnutí v exikátoru. Poté byla provedena extrakce tuku v extraktoru ANKOM^{XT10} Extractor (ANKOM Technology, USA) promýváním petroletherem po 30 min při 90 °C za mírně vyššího tlaku. Vyextrahované vzorky se dále vysoušely po 30 min při 100 °C a nechaly zchladnout v exikátoru. Nakonec bylo provedeno analytické vážení pro odečet hrubého obsahu tuku.

Ze zjištěných průměrných hodnot pro odrůdu Libra 7,79 %, Agriol 5,16 % a Raciol 5,54 % bylo usouzeno, že další odtučňování hexanem není nutné.

6.2.3 Mletí a prosívání

Získané výlisky byly pro lepší manipulaci se vzorkem a zvětšení povrchu pro následnou izolaci proteinu mlety nožovým mlýnem GRIMDOMIX GM 200 (Retsch, Německo) při 10 000 ot./min po dobu 1 min. Získaná mouka byla zvážena pro určení % výtěžnosti.

Mouka byla dále prosáta na nerezovém sítě (PRECISELECT, Česká republika) o hrubosti 0,250 mm, aby došlo k odstranění zbytků osemení z mouky, jelikož je v osemení soustředěn neodmytý zbytek slizotvorných látek. Přesátá mouka byla zvážena pro stanovení % výtěžnosti hladké mouky.

6.2.4 Izolace celkového proteinu

Připravená mouka byla použita jako výchozí matriál pro izolaci celkového proteinu alkalickou extrakcí a izoelektrickou precipitací. Od každého opakování bylo naváženo 60 g, které byly rozděleny, kvůli lepšímu promíchávání vzorku, do dvou kádinek. K nim bylo přidáno 600 ml vody (taktéž rozdělených do každé z kádinek). Směs byla poté míchána 30 min a následně bylo upraveno pH vzorku na 8,5 s pomocí 1M NaOH. Po úpravě byly vzorky dalších 90 min míchány za občasné kontroly pH a jeho případného doupravení. Potom byla směs přerozdělena po 40 ml do tub (Eppendorf, Německo) a centrifugována 10 min při 4500 ot./min na centrifuze ROTINA 420 R (Hettich, Německo). Vzniklý supernatant byl slit do sběrné nádoby a pelety byly ještě dvakrát promyty 10 ml redestilované vody při stejných centrifugačních podmínkách. Supernatant z promyvů byl taktéž slit do sběrné nádoby, jejíž obsah byl poté upraven na pH 4,5 pomocí 2M HCl. Takto vysrážené bílkoviny byly oddělené centrifugací v tubách a vzniklé pelety byly rozpuštěny v 10 ml redestilované vody. Tato směs byla následně upravena na pH 7 a zamrazena na -20°C. Množství a výtěžnost získaného proteinu bylo určeno z analytického vážení až po následné lyofiliaci (viz. 4.2.5) a po matematické korekci obsahu solí, vzniklých neutralizací alkalických a kyselých činidel použitých k precipitaci.

6.2.5 Lyofilizace

Izolovaný protein byl zbaven vody metodou lyofilizace na lyofilizátoru Alpha 1-4 LSC (Martin Christ, Německo) při nastavení tlaku pod 0,520 mBa, teplotě -50 °C a dobou trvání 72 h. Podstatou metody je sublimace a desorpce zmražené vody. K sublimaci ledu dochází za teplotních a tlakových podmínek pod trojným bodem (tj. 0 °C a 0,611 mBa), vzniklá pára je pak znovu převedena do tuhého stavu na kondenzátoru. Celý proces probíhá ve třech krocích: zmražení vzorku, primární sušení a sekundární dosoušení (Nireesha *et al.*, 2013).

Tato metoda byla zvolena pro svou šetrnost ke vzorkům, jelikož nízké teploty omezují aktivitu enzymů, je omezena oxidace vzdušným kyslíkem, bílkoviny nedenaturují a nízké je též riziko mikrobiální kontaminace (Káš, 2005).

Po lyofilizaci byly vzorky podrceny na prášek na třecí misce.

6.2.6 Hydrolýza proteinu

Získaný lyofilizovaný proteinový izolát byl dále podroben hydrolýze třemi modelovými proteázami. Enzymy byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, Inc. (USA). Jako zástupce živočišných proteáz byl použit trypsin z prasečí slinivky v lyofilizované formě, 1000-2000 BAEE U/mg v pevném stavu (katalogové číslo T4799), jako rostlinná proteáza papain z *Caprica papaya* v práškové formě se specifickou enzymovou aktivitou ≥3 BAEE U/g (katalogové číslo 76220) a jako bakteriální enzym alkaláza (taktéž pod názvem proteáza z *Bacillus licheniformis* či subtilizin A) ve formě vodného roztoku se specifickou enzymovou aktivitou ≥2,4 Anson U/g (katalogové číslo P4860). Podmínky reakce byly přizpůsobeny, tak aby byly pro danou proteázu co nejoptimálnější.

Od každého opakování bylo analyticky navážen 1 g do 50 ml tuby (Eppendorf, Německo). Ke vzorkům byla přidána předtemperovaná redestilovaná voda, tak aby poměr proteinového izolátu vůči tekuté fázi byl po přidání enzymu 1:20. Směs byla krátce vortexována a opětovně dotemperována na požadovanou teplotu ve vodní lázni SW22 (Julabo, Německo). Poté bylo pomocí 1M NaOH a 1M HCl upraveno pH vzorků na 7 pro trypsin, 6,5 pro papain a 8,5 pro alkalázu. Následně byly vzorky umístěny zpět do vodní lázně a vytemperovány na teplotu zvolenou pro jednotlivé hydrolytické reakce: trypsin na 37 °C, papain na 65 °C a

alkaláza na 55 °C. Dalším krokem bylo přidání enzymů rozředěných ve vhodných pufrech (trypsin v 1 mM HCl, papain v 5mM L-cysteinu, alkaláza ve své komerční podobě) v poměru k substrátu 5 % w/w. Hydrolytická reakce probíhala po dobu 4 hodin. Hydrolýza byla zastavena varem ve vodní lázni po 10 min. Vzorky byly dále zchlazeny na ledu a centrifugovány při 4000g po 20 min. Supernatanty byly slity a spolu s pelety zamrazeny na -20 °C. Supernatanty obsahující hydrolyzovaný protein byly později lyofilizovány (0,520 mBa, -50 °C, 72 h) na lyofilizátoru Alpha 1-4 LSC (Martin Christ, Německo) a podrceny na prášek skleněnou tyčinkou.

Během reakce byly postupně odebírány alikvóty v časech 0, 30, 60, 90 a 240 minut a dvě kontroly (tj. materiál připravený k reakci, včetně upraveného pH, a vzorek totožné směsi temperované ve stejných podmínkách jako probíhající reakce bez přidání enzymu). Odebráno bylo vždy 1,5 ml. Jejich hydrolýza byla zastavena ihned po odběru již uvedeným způsobem, shodně proběhla i centrifugace a uskladnění vzorků do -20 °C. Pelety a supernatanty alikvót byly pro další použití lyofilizovány (0,520 mBa, -50 °C, 24 h).

6.3 Laboratorní analýzy

6.3.1 Analýza obsahu dusíku Dumasovou metodou

Lyofilizovaný izolovaný protein a pelety odebraných alikvót byly podrobeny analýze obsahu dusíku (respektive hrubého proteinu) Dumasovou metodou.

Naváženo bylo vždy 25 mg vzorku do cínové folie, ze které byla následně vytvořená peletka. Ta byla v analyzátoru N cube (Elementar, Německo) spálena při 900 °C v kyslíkové atmosféře, čímž byl vzorek přeměněn na plyny (O_2, CO_2, H_2O, N_2 a NO_x). Molekulární dusík a oxidy dusíku byly odděleny průchodem přes kolony od zbytku směsi a oxidy dusíku byly dále redukované na molekulární dusík, který byl hnán s pomocí CO_2 až do detektoru termální vodivosti zaznamenávajícího množství dusíku ve vzorku (Mihaljev et al., 2015). Naměřené hodnoty byly zpracovány počítačem a automaticky přepočítány na obsah dusíku a dusíkatých látek ve vzorku.

6.3.2 Stanovení obsahu bílkovin v hydrolyzátech metodou BCA

Supernatanty odběrů provedených během hydrolýzy byly podrobeny stanovení

obsahu bílkovin bicinchoninovou metodou (BCA), která je založena na kolorimetricky měřitelné barevné změně (ze zelené na fialovou), k níž dochází v důsledku chelatace dvou molekul kyseliny bicinchoninové jedním iontem Cu^{1+}, vzniklým redukcí Cu^{2+} proteinem v alkalickém prostředí během biuretické reakce (Smith et al., 1985).

Ke stanovení bylo použito kitu Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Dle přiloženého návodu byla namíchána různá ředění standardu (bovinního sérového albuminu) s redestilovanou vodou jako ředidlem, které byly základem k sestrojení kalibrační křivky. Před samotnou analýzou byly vzorky 50× naředěny kvůli vysoké koncentraci bílkovin.

Provedení reakce probíhalo následujícím způsobem: do kyvet bylo napipetováno vždy 100 µl naředěného vzorku či standardu, k tomu byly přidány 2 ml pracovního roztoku, připraveného smícháním reagentů A (Na_2CO_3, $NaHCO_3$, kyselina bicinchoninová a vinan sodný v 0,1M NaOH) a B (4% $CuSO_4$) v poměru 50:1. Tato směs byla promíchána a inkubována 30 min při 37 °C, poté byla ponechána zchladnout na pokojovou teplotu a její absorbance byla změřena na spektrofotometru Spectronic BioMate 5 UV-Vis (Thermo electron corporation, USA) při vlnové délce 562 nm.

Obsah bílkovin ve vzorku byl dopočítán podle zjištěné absorbance dosazené do rovnice lineární regrese kalibrační křivky (1).

$$\text{koncentrace } (\mu g/ml) = (A_{562} - 0{,}1420467047)/0{,}0007723707 \quad (1)$$

Kde A_{562} je absorbance naměřená při vlnové délce 562 mn.

6.3.3 SDS-PAGE

Velikost proteinů, vzniklých peptidů a úroveň hydrolýzy byla hodnocena pomocí SDS-PAGE (sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis), fungující na principu pohybu nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Separace molekul touto metodou závisí pouze na jejich velikosti, jelikož přídavek dodecylsulfátu sodného (SDS) vede k denaturaci bílkovin s nimiž pak tvoří komplexy, čímž získávají rovnoměrný elektrický náboj (Káš et al., 2005). K jejich rozdělení dochází na polyakrylamidovém gelu, vzniklém polymerací N, N'-methylenbisakrylamidu a akrylamidu, v diskontinuálním pufračním systému dvou

typů gelů zaostřovacího a separačního, z nichž každý má rozdílnou poréznost a pH (Prosser, 1989).

Gely byly připraveny podle složení (tab. 1) a ponechány přes noc vychladit na 10,5 °C v ledničce:

Tabulka 1: Složení gelů

Složky:	Separační gel (12%)	Zaostřovací gel (3,75%)
ddH_2O	36,7 ml	12,15 ml
AC/BIS	31,9 ml	2,5 ml
Pufr A (pH 8,8, 36,3 g Tris, 48 ml 1M HCl/100 ml)	10 ml	-
Pufr B (pH 6,8, 6g Tris, 48 ml 1M HCl/100 ml)	-	5 ml
Na_2SO_3	60 µl	20 µl
SDS (10%)	800 µl	200 µl
$(NH_4)S_8O_8$ (15%)	400 µl	150µl
TEMED	40 µl	20 µl

K analýze bylo použito tekutých supernatantů z proběhlé hydrolýzy a extraktů z lyofilizovaných izolovaných proteinů.

Extrakce byla provedena následovně: bylo naváženo 25 mg vzorku do 1,5 ml centrifugačních mikrozkumavek (Eppendorf, Německo), k nim byl přidán 1 ml extrakčního činidla (0,065M Tris-HCl, pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) 2-merkaptoethanol), směs byla promíchána a ponechána inkubovat 3 h při 4 °C, po uplynutí doby byl supernatant oddělen centrifugací (10000 ot./min, 4 °C, 15 min) na centrifuze ROTINA 420 R (Hettich, Německo), přepipetován do nové mikrozkumavky a uchován do použití při -20 °C.

Před nanesením na gel bylo ke vzorkům (100 µl) přidáno 25 µl nanášecího pufru s 2-merkaptoethanolem a po promíchání byly inkubovány 3 min v termobloku při 99 °C. Po vychladnutí byly vzorky nanesené na gel společně s ladderem Roti®-Mark TRICOLOR XTRA (Carl Roth GmbH + Co. KG, Německo). Nanáška extraktů byla 15 µl a supernatantů 50 µl.

Připravené gely byly umístěny do elektroforetické vany diskontinuální deskové denaturační elektroforézy SE 600 (Hoefer, USA) s elektrodovým pufrem

(0,025M Tris, 0,192M glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3). Separace probíhala při 4 °C a nastavení proudu na 40 mA a napětí 150 V, které bylo po projití vzorků zaostřovacím gelem zvýšeno na 200 V. Použit byl zdroj PS 300B (Hoeffer, USA).

Po dokončení separace byly vyjmuté, opláchnuté gely barveny přes noc v roztoku 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma Co.) ve směsi metanolu, ledové kyseliny octové a destilované vody v poměru 5:1:4. Následovalo dvoudenní odbarvování ve směsi ethanolu, kyseliny octové a destilované vody v poměru 2,5:1:6,5. Odbarvovací roztok byl třikrát vyměněn. Odbarvené gely byly naskenovány v Gel doc XR+ (Bio-Rad, USA).

6.3.4 Stanovení rozpustnosti, vaznosti vody a tuku

Stanovení rozpustnosti, vaznosti vody a tuku bylo provedeno podle metodiky Bárty et al. (2020) s níže uvedenými úpravami.

Určovány byly tyto parametry jak pro lyofilizované HPI, tak i pro PI. Do zvážených 2ml centrifugačních mikrozkumavek (Eppendorf, Německo) bylo naváženo 90 mg vzorku. K nim bylo přidáno 1,5 ml redestilované vody pro stanovení rozpustnosti a vaznosti vody nebo stejné množství řepkového oleje pro stanovení vaznosti tuku. Po důkladném promíchání byly vzorky ponechány stát 30 min při pokojové teplotě. Poté byly centrifugovány (3600g, 15 min, 20 °C) na centrifuze ROTINA 420 R (Hettich, Německo), supernatant byl slit a mikrozkumavky s mokrými pelety byly zváženy. Pelety vzorků, ke kterým byla přidávána voda byly pro určení rozpustnosti a vaznosti vody lyofilizovány (0,520 mBa, -50 °C, 24 h) na lyofilizátoru Alpha 1-4 LSC (Martin Christ, Německo) a znova zváženy.

Ze zjištěných údajů byly vypočítány rozpustnost (2), vaznost vody lyofilizovaného vzorku (3) a vaznost tuku (4) podle vzorců:

$$S\ (\%) = 100 \times (m_s - m_{lp})/m_s \quad (2)$$

$$WHC\ (g/g) = (m_{wp} - m_{lp})/m_s \quad (3)$$

$$FHC\ (g/g) = (m_{fs} - m_s)/m_s \quad (4)$$

Kde S je rozpustnost uváděná v %, m_s navážka vzorku, m_{lp} váha lyofilizovaného peletu, WHC vaznost vody lyofilizovaného vzorku, vyjdřená v g/g, m_{ws} váha mokrého peletu, FHC vaznost tuku lyofilizovaného vzorku a m_{fs} váha tukem

nasáklého peletu.

6.3.5 Stanovení emulgační aktivity a stability

Emulgační vlastnosti byly stanoveny dle postupu navrženém Djuardi et al. (2020) s drobnými úpravami.

Vzorky byly naváženy po 45 mg do 50 ml centrifugačních tub (Eppendorf, Německo), kde k nim bylo přidáno 15 ml destilované vody a 5 ml řepkového oleje. Obsah byl poté šlehán 2 min na homogenizátoru ULTRA TURRAX T 18 basic (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Německo) při 18000 ot./min. Ze vzniklé emulze bylo odebráno ode dna 10 µl, které byly přidány do připravených kyvet a promíchány s 2 ml 0,1% roztoku SDS. Dále byla měřena absorbance této směsi při vlnové délce 500 nm na spektrofotometru Spectronic BioMate 5 UV-Vis (Thermo Electron Corporation, USA). Tento postup byl aplikován na vzniklé emulze znovu po 30 min pro určení emulgační stability. Výsledné hodnoty byly dosazeny do rovnic pro výpočet emulgační aktivity (5) a stability (6).

$$EAI\ (m^2/g) = (2 \times 2{,}303A \times DF)/(l\Phi C) \quad (5)$$

$$ESI\ (min) = (A_0 \times \Delta t)/(A_0 - A_t) \quad (6)$$

Kde EAI je index emulgační aktivity v jednotkách m^2/g, A absorbance, DF faktor ředění (= 200), l délka kyvety (= 0,1 m), Φ podíl oleje z celkového objemu (= 0,25), C koncentrace proteinu vypočítaná jako (navážka×100)/1,5. ESI je index emulgační stability vyjádřený v min, A_0 absorbance naměřená ihned po vytvoření emulze, Δt časový rozdíl mezi prvním a druhým měřením, A_t absorbance při druhém měření.

6.3.6 Stanovení polyfenolických látek metodou FCM

Polyfenolické látky byly stanoveny spektrofotometricky pomocí Folin-Ciocalteuovy metody (FCM), jejímž základem je Folin-Ciocalteuův roztok, což je směs kyseliny fosforečnowolframové ($H_3PW_{12}O_{40}$) a fosforečnomolybdenové ($H_3PMo_{12}O_{40}$), který tvoří s polyfenoly modře zabarvené komplexy, přičemž intenzita zabarvení je přímo úměrná množství polyfenolů (Blainski et al., 2013).

Ke stanovení bylo použito extraktů z lyofilizovaných proteinových izolátů a hydrolyzátů připravených dle následujícího postupu. Do 2 ml centrifugačních mikrozkumavek (Eppendorf, Německo) bylo naváženo 50 mg vzorku, ke kterým byl přidán 1 ml 80 % ethanolu, jakožto extrakčního činidla. Po důkladném zvortexování

byly vzorky ponechány extrahovat při pokojové teplotě 24 h za občasného promíchání. Poté byl supernatant oddělen na centrifuze ROTINA 420 R (Hettich, Německo) při 8000 ot./min po dobu 15 min při teplotě 20 °C. Po přepipetování do nových mikrozkumavek byly extrakty uloženy do -20 °C až do analyzování.

Pro stanovení bylo do 1 ml kyvety napipetováno 10 µl extraktu, 990 µl destilované vody, 50 µl Folin-Ciocalteuova činidla a 150 µl 20% uhličitanu sodného, vše bylo promícháno a ponecháno při 20 °C po 2 h vyvíjet, načež byla změřena absorbance při vlnové délce 765 nm na spektrofotometru Spectronic BioMate 5 UV-Vis (Thermo electron corporation, USA). Získané hodnoty byly použité pro výpočet celkového obsahu polyfenolů, dosazením do rovnice (7), získané z kalibrační křivky, sestrojené podle kyseliny gallové, jako standardu. Výsledky byly nakonec přepočítány z µg/ml na mg/g sušiny.

$$TPP\ (\mu g/ml) = (1197{,}8967 \times A_{765}) - 31{,}5042 \qquad (7)$$

Kde TPP je množství celkových polyfenolů vyjádřené v µg/ml a A_{765} je absorbance naměřená při vlnové délce 765 nm.

6.3.7 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Antioxidační aktivita proteinových izolátů a hydrolyzátů byla stanovována ABTS radikálovou kationtovou dekolorizační zkouškou. Tyto radikály mají přirozeně modrozelenou barvu, která se v přítomnosti antioxidantů vytrácí úměrně jejich množství (Cano a Arnao, 2018).

Radikálové kationty ABTS (kyseliny 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonové) byly vytvořené oxidací z 54,8 g ABTS, 1 g MnO_2 a 20 ml redestilované vody, které byly míchány 20 min a poté filtrovány přes 5 µm filtr. Dokončeny byly postupným přidáváním pufru PBS (5 mM KH_2PO_4, 5 mM Na_2HPO_4, pH 7,4) až bylo dosaženo absorbance 0,8 (± 0,02) o vlnové délce 734 nm.

Pak byly radikály napipetovány v objemu 1 ml do kyvety a k nim bylo přidáno 100 µl 20× naředěných extraktů, které byly připravené stejným způsobem jako na stanovení polyfenolů (viz. 7.3.7). Absorbance byla změřena po 1 min proti blanku (100 µl dH_2O, 1 ml $ABTS^{\bullet+}$) při vlnové délce 734 nm na spektrofotometru Spectronic BioMate 5 UV-Vis (Thermo electron corporation, USA) a hodnoty byly dosazeny do vzorce (8) kalibrační křivky sestrojené s kyselinou askorbovou jako

standardem. Získané hodnoty byly přepočítány z μg/ml na mg/g sušiny.

$$\text{koncentrace } (\mu g/ml) = 20\times[51{,}4839-(68{,}3952\times A_{734})] \quad (8)$$

Kde A_{734} je absorbance naměřená při vlnové délce 734 nm.

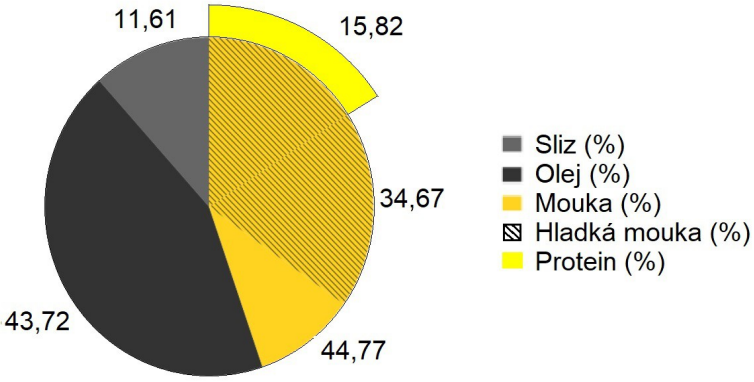
6.4 Zpracování výsledků

Data byla statisticky vyhodnocena v programu STATISTICA 12 (StatSoft, USA).

Analyzovány byly testem ANOVA (Analysis of variance) s hladinou významnosti $\alpha < 0{,}05$. V případě neplatné nulové hypotézy, tj. že průměry sledované závislé proměnné se uvnitř a mezi skupinami neliší, byly provedeny testy mnohonásobných porovnávání, konkrétně Fisherův LSD test, porovnávající všechny dvojice, který byl upřednostněn před jinými testy kvůli vyšší citlivosti. Jeho vyjádření v grafech, bylo provedeno přiřazením písmen ke skupinám (přičemž ***a*** patří nejvyšším hodnotám). Pokud je u jedné skupiny více písmen, nebyla zjištěna průkazná rozdílnost.

7 Výsledky

7.1 Výtěžnost jednotlivých kroků výroby proteinového izolátu



Graf 1: Meziodrůdový průměr výtěžností produktů výroby PI

Během výroby PI byla zkoumána výtěžnost jednotlivých kroků. Statistickou analýzou (příloha 1) bylo prokázáno, že % odmytého slizu se mezi odrůdami liší – nevíce ho bylo odstraněno z odrůdy Agriol, nejméně z odrůdy Libra. Stejně tak byly i meziodrůdové rozdíly v množství vylisovaného oleje, přičemž nejvíce oleje bylo získáno z odrůdy Libra a výnos odrůd Agriol a Raciol byl srovnatelný. Naopak ve výtěžnosti mouky, a potažmo i hladké mouky, nebyly prokazatelné rozdíly. Hodnoty výtěžností konečného PI jsou u Agriolu a Raciolu ve stejném intervalu, z odrůdy Libra ho však bylo získáno prokazatelně více.

Tabulka 2: Průměrné výtěžnosti kroků výroby PI.
(a-c = vyjádřují průkazný rozdíl mezi odrůdami na hladině významnosti α=0,05)

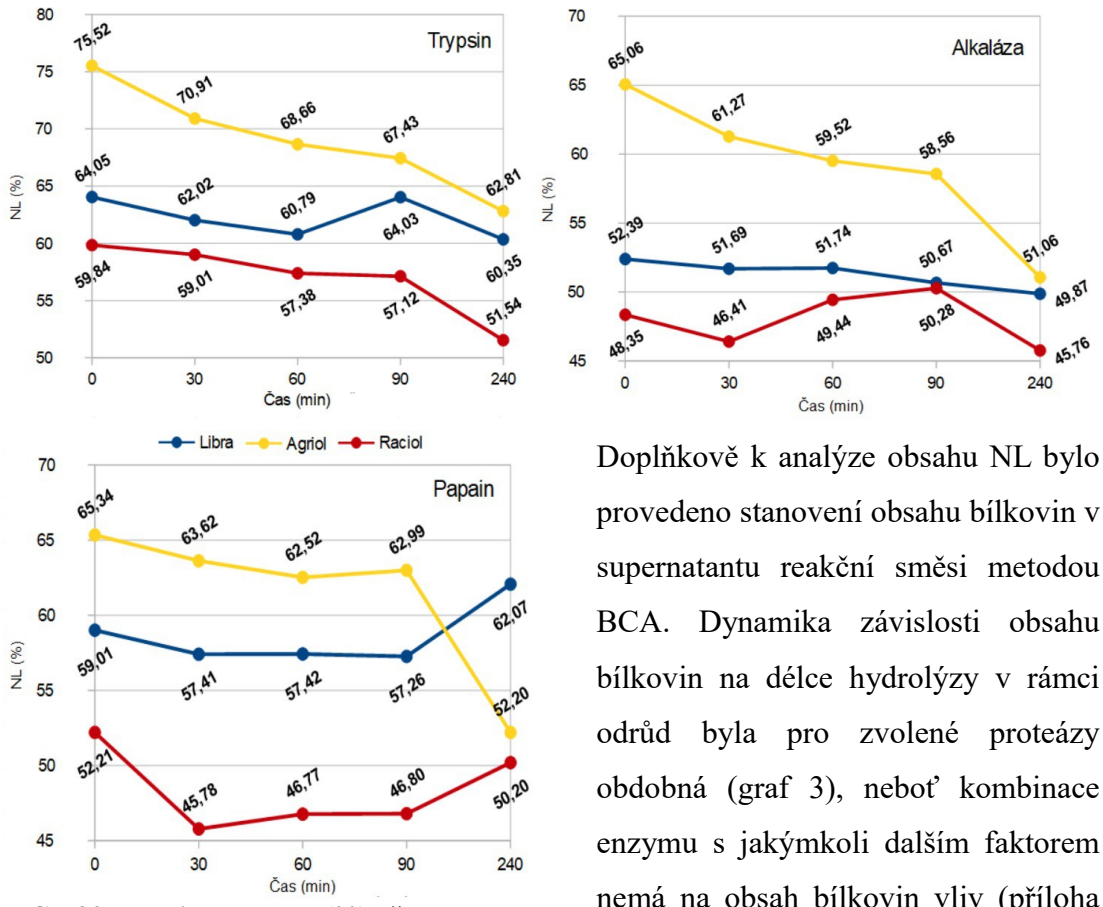
Odrůda	Sliz (%)	Olej (%)	Mouka (%)	Hladká mouka (%)	PI (%)
Libra	9,35 c	46,16 a	44,32 a	35,47 a	17,89 a
Agriol	13,21 a	41,96 b	44,94 a	33,96 a	14,67 b
Raciol	12,27 b	42,68 b	45,08 a	34,57 a	14,90 b

7.2 Vývoj obsahu dusíkatých látek a bílkovin během hydrolýzy

Analýza PI odhalila vliv odrůdy na obsah NL. Průměrný obsah NL v PI odrůd Libra a Raciol si je velmi podobný - 70,67 % a 69 %. Odrůda Agriol obsahuje 77,25 % NL. Bylo prokázáno, že na obsah NL v PI během hydrolýzy má vliv kombinace odrůdy, enzymu a doba jeho působení v libovolné kombinaci faktorů (příloha 2). Naopak měřením prováděných kontrol (vzorků připravených k hydrolýze bez

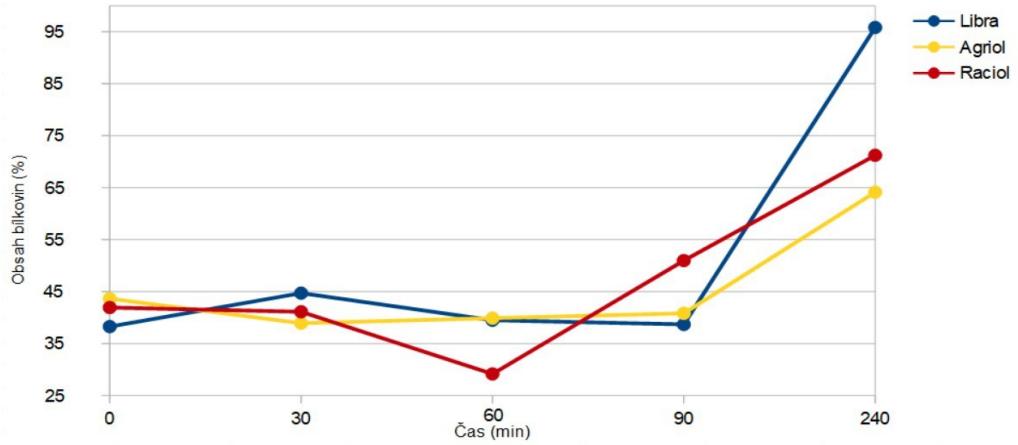
proteáz, odebraných před započetím reakce a inkubovaných za stejných podmínek jako hydrolyzované vzorky) se odhalilo, že rozsah nativně probíhající hydrolýzy je minimální, pokud vůbec nějaký. Testy mnohonásobných porovnávání nedokázaly průkazný rozdíl mezi jednotlivými různě dlouho hydrolyzovanými vzorky, neboť intervaly hodnot se u vzorků s po sobě jdoucí délkou reakce překrývaly. Nejméně znatelný byl tento trend u vzorků papainového HPI.

Dynamika obsahu NL v PI během hydrolýzy je zobrazena v grafu 2, na nichž lze pozorovat sestupná tendence s přibývající délkou reakce, jelikož protein je štěpen na menší peptidy, které se uvolňují do supernatantu reakce.



Graf 2: Vývoj obsahu NL (%) během hydrolýzy

Doplňkově k analýze obsahu NL bylo provedeno stanovení obsahu bílkovin v supernatantu reakční směsi metodou BCA. Dynamika závislosti obsahu bílkovin na délce hydrolýzy v rámci odrůd byla pro zvolené proteázy obdobná (graf 3), neboť kombinace enzymu s jakýmkoli dalším faktorem nemá na obsah bílkovin vliv (příloha 3) S prodlužující se dobou hydrolýzy obsah bílkovin v supernatantu stoupal, v důsledku štěpení proteinu. Nejvíce bílkovinných látek přecházelo během hydrolýzy do supernatantu při štěpení trypsinem, o něco méně při štěpením papainem a nejméně při štěpení alkalázou (tab. 3).



Graf 3: Mezienzymový průměrný vývoj obsahu bílkovin (%) v supernatantu během hydrolýzy

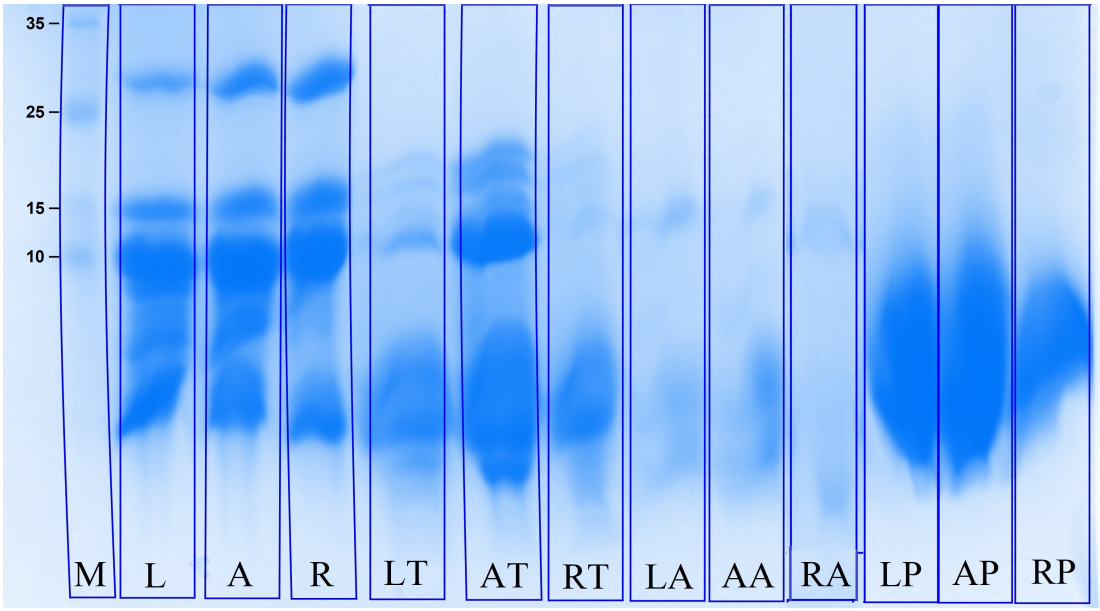
Tabulka 3: Průměrný obsah bílkovin (%) v tekuté fázi hydrolyzované směsi během 4h štěpení

Obsah bílkovin (%)	Libra	Agriol	Raciol	Průměr
Trypsin	60,17	58,29	71,72	63,40
Alkaláza	17,31	19,74	26,67	21,24
Papain	43,39	58,41	53,80	51,87

7.3 Hodnocení rozsahu hydrolýzy a velikosti vzniklých peptidů

Rozsah hydrolýzy a přibližná velikost vzniklých peptidů byla určena z elektroforeogramů metody SDS-PAGE. Proteinové profily odrůd byly navzájem téměř totožné, ať už v proteinových izolátech či hydrolyzátech (obr. 1). Odhadovaná velikost frakcí je kvůli rozmazanosti pruhů spíše orientační, přesto je z nich zřetelná účinnost hydrolýzy jednotlivých enzymů.

Pruhy nehydrolyzovaných PI lze rozdělit do tří skupin 35-25 kDa, 15-10 kDa a méně než 10 kDa, tj. oproti hydrolyzátům obsahují i pruhy o vyšší molekulové hmotnosti okolo 28 kDa. U hydrolyzátů se již nevyskytují, protože byly proteázami naštěpeny na menší peptidy. Trypsinový HPI má také pruhy ve třech skupinách, nicméně frakce největších peptidů je mezi 25-15 kDa. Alkalázový HPI má pouze dvě skupiny pruhů – menší než 10 kDa a malé množství do cca 15 kDa. Papainový HPI má pouze jedinou frakci o velikosti pod 10 kDa. Největší peptidy tedy zbyly pro hydrolýze trypsinem, naopak papain štěpil nejvíce. (tab. 4)



Obrázek 1: Bílkovinný profil PI a HPI
(M = marker, L A, R = Libra, Agriol, Raciol, T, A, P = trypsin, alkaláza, papain)

Tabulka 4: Odhad molekulové hmotnosti (kDa) a relativní zastoupení (%) frakcí
(L, A, R = Libra, Agriol, Raciol, T, A, P = trypsin, alkaláza, papain)

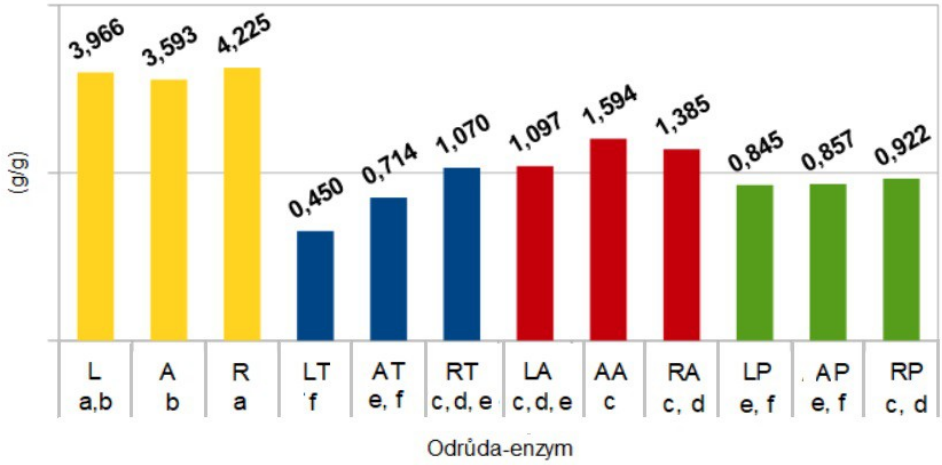
	35 kDa	%	25 kDa	%	15 kDa	%	10 kDa	%
L	28,2	8,6			14,5	12,9	<10	78,5
A	28,2	9,3			14,8	11,8	<10	79,0
R	28,4	16,0			15,2	17,7	<10	66,3
LT			18,3-16,2	10,1	11,7	9,4	<10	80,6
AT			19,1-17,4	11,5	12,7	13,8	<10	74,8
RT			18,2-17,0	8,2	13,7-12,3	15,6	<10	76,4
LA					13,7	16,5	<10	91,8
AA					13,0	8,1	<10	92,0
RA			16,0	24,8			<10	75,3
LP							<10	100
AP							<10	100
RP							<10	100

7.4 Rozpustnost, vaznost vody a vaznost tuku

Zjištěná rozpustnost byla velmi vysoká (nad 99,9 %) u PI i HPI, nicméně u hydrolyzátů je rozpustnost ještě průměrně o 0,05 % vyšší.

V souvislosti s tím byla zjištěná schopnost vázat vodu poměrně nízká. Vliv na

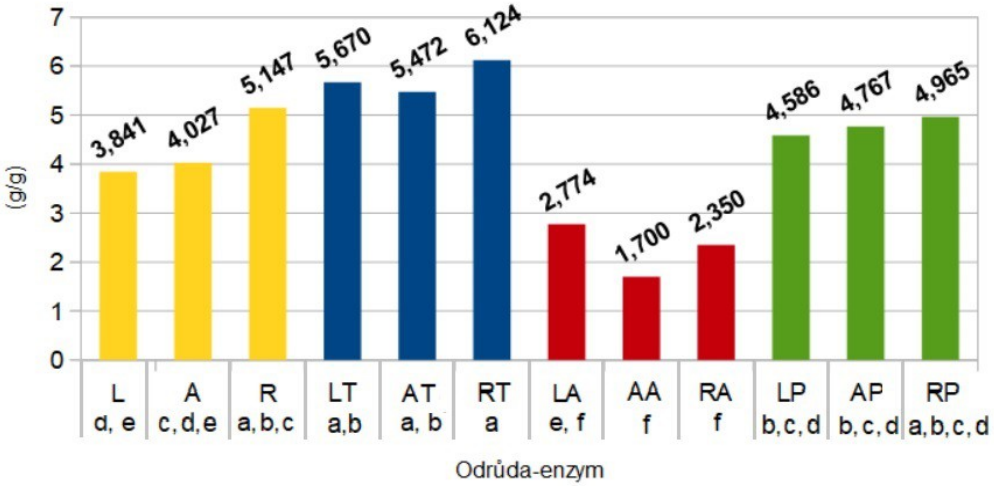
vaznost vody má dle analýzy výsledků pouze použitá proteáza, nikoli odrůda (příloha 4). PI mají průměrnou vaznost vody 3,928 g/g, zatímco trypsinové HPI 0,745 g/g, alkalázové 1,359 g/g a papainové 0,874 g/g. Nejlépe si tedy zachovaly schopnost vázat vodu hydrolyzáty alkalázy, kde byl pokles zhruba trojnásobný, nejhůře naopak trypsinové hydrolyzáty s přibližně pětinásobným poklesem (graf 4).



Graf 4: Vaznost vody (g/g) PI a HPI

(L, A, R = Libra, Agriol, Raciol, T, A, P = trypsin, alkaláza, papain, a-f = a-c = vyjádření průkazného rozdílu mezi skupinami na hladině významnosti α=0,05)

Vaznost tuku byla vyšší než vaznost vody, nicméně byla stejně ovlivněna pouze použitým enzymem (příloha 4). U výchozích PI činila 4,338 g/g. Trypsinové a papainové hydrolyzáty mohou vázat tuk dle naměřených údajů ještě více, 5,755 a 4,773 g/g, alkaláza naopak téměř dvakrát méně – 2,275 g/g (graf 5).

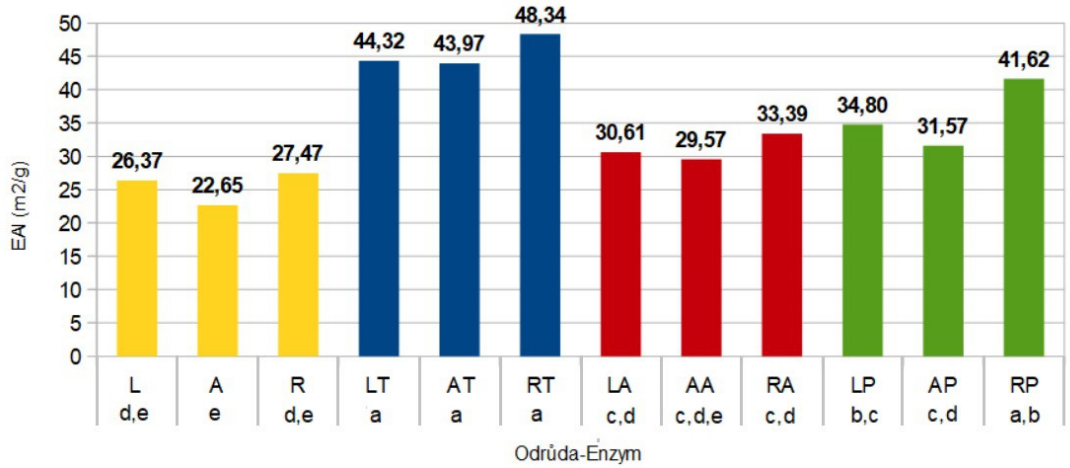


Graf 5: Vaznost tuku (g/g) PI a HPI

(L, A, R = Libra, Agriol, Raciol, T, A, P = trypsin, alkaláza, papain, a-f = vyjádření průkazného rozdílu mezi skupinami na hladině významnosti α=0,05)

7.5 Emulgační aktivita a stabilita

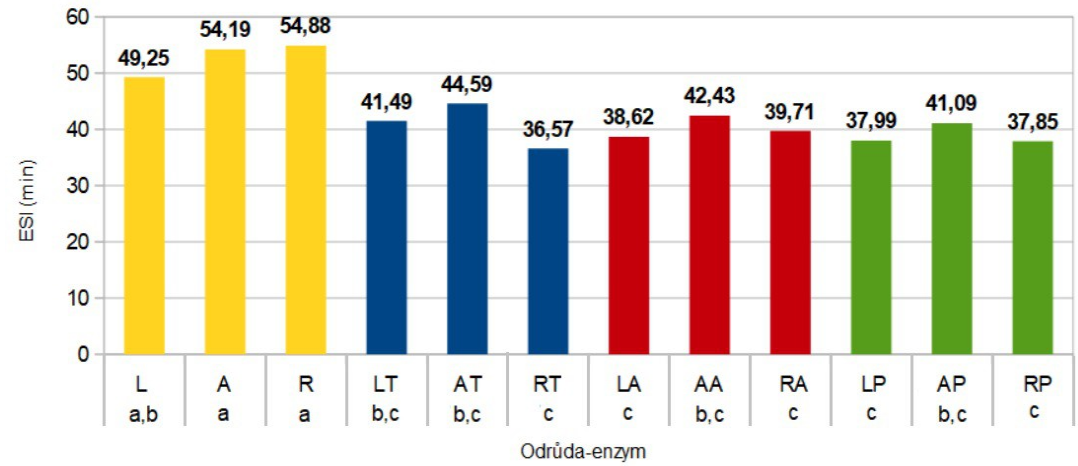
Analýzou dat byl potvrzen vliv zvoleného enzymu a odrůdy na emulgační aktivitu výsledného HPI, nicméně u emulgační stability byl zaznamenán pouze vliv enzymu, nikoli odrůdy (příloha 5). Testy emulgační aktivity se potvrdila výchozí hypotéza, že HPI má vyšší emulgační aktivitu než výchozí nehydrolyzovaný PI, u trypsinových HPI narostly hodnoty 1,79×, u alkalázových 1,22× a u papainových 1,41×. U všech použitých proteáz byla emulgační aktivita hydrolyzátů nejvyšší pro odrůdu Raciol a nejmenší pro Agriol s odrůdou Libra mezi nimi (graf 6).



Graf 6: Emulgační aktivita (jako index emulgační aktivity v m^2/g)

(L, A, R = Libra, Agriol, Raciol, T, A, P = trypsin, alkaláza, papain, a-e = vyjádření LSD testu)

Schopnost emulgační stability byla naopak u HPI snížená oproti nehydrolyzovaným PI. Pokles byl pro všechny proteázy podobný – u trypsinových HPI 1,29×, u alkalázových 1,31× a u papainových 1,35× (graf 7).

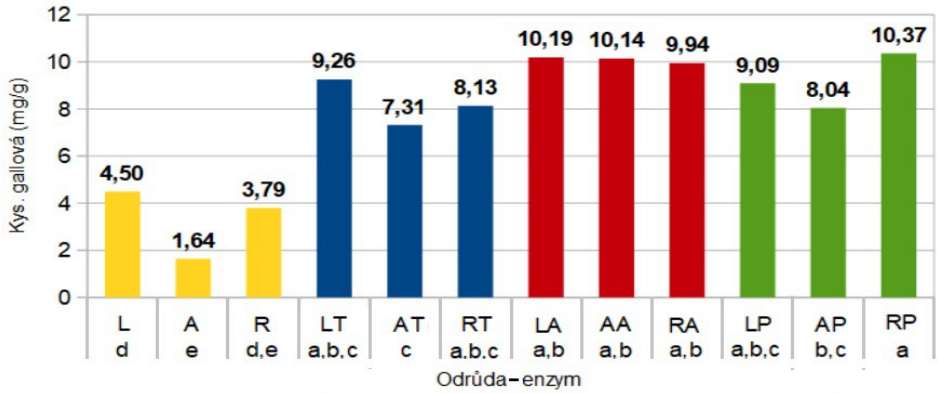


Graf 7: Emulgační stabilita (jako index emulgační stability v min)

(L, A, R = Libra, Agriol, Raciol, T, A, P = trypsin, alkaláza, papain, a-c = vyjádření LSD testu)

7.6 Obsah celkových polyfenolů a antioxidační aktivita

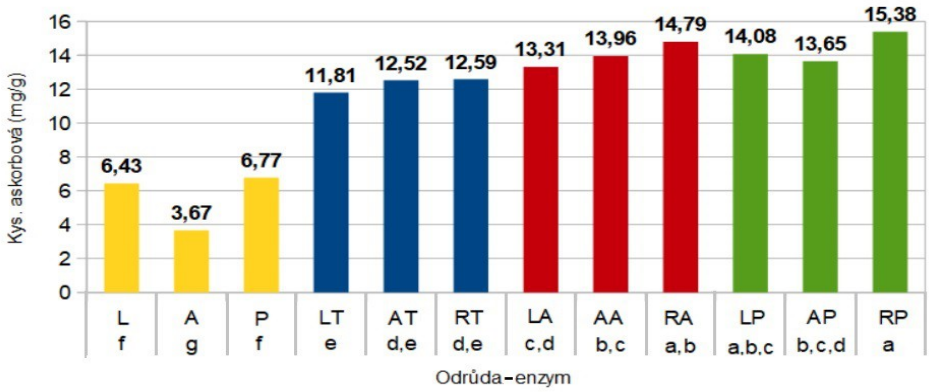
Dle získaných hodnot bylo zjištěno, že na obsah polyfenolů v HPI má vliv volba proteázy a použitá odrůda (příloha 6). U HPI byl pozorován značný nárůst v obsahu celkových polyfenolů oproti nehydrolyzovaným PI. Trypsinové HPI měly obsah polyfenolů 2,49× vyšší, a papainové 2,78× vyšší, alkalázové dokonce až 3,05× vyšší. Nevýraznější přírůstek měly odrůdy Libra a Raciol. Obsah polyfenolů u odrůdy Agriol byl ve většině případů nižší než u zbývajících odrůd (graf 8).



Graf 8: Obsah celkových polyfenolů (mg/g GAE)

(L, A, R = Libra, Agriol, Raciol, T, A, P = trypsin, alkaláza, papain, a-e = vyjádření průkazného rozdílu mezi skupinami na hladině významnosti α=0,05)

S obsahem polyfenolů souvisí i antioxidační aktivita, která byla u HPI taktéž vyšší ve srovnání s neštěpenými PI. Nejvíce se v tomto ohledu osvědčilo použití papainu, kde byla naměřená antioxidační aktivita 2,56× vyšší. Jen o něco menší byl nárůst aktivity u alkalázových HPI, které měly 2,49× více antioxidantů něž původní neštěpený vzorek. Trypsinový HPI měl antioxidační aktivitu vyšší 2,19×. Z použitých proteázy dosahovala obvykle nevyšších hodnot odrůda Raciol, nejméně naopak Libra (graf 9).



Graf 9: Antioxidační aktivita (mg/g AAE)

(L, A, R = Libra, Agriol, Raciol, T, A, P = trypsin, alkaláza, papain, a-g = vyjádření průkazného rozdílu mezi skupinami na hladině významnosti α=0,05)

8 Diskuze

8.1 Výtěžnost výroby proteinového izolátu

Zjištěný **obsah odmytého slizu**, obzvlášť u odrůdy Agriol, byl velmi podobný výsledkům, které získal ve své práci Zhang et al. (2009), kteří máčením v horké vodě odstranili 13,44 % slizu ze semene.

Množství vylisovaného oleje odpovídá více než 95 % průměrného celkového obsahu oleje daných odrůd, deklarovaného Krausem (2020) a orientačně zjišťované množství zbytkového tuku v pokrutinách bylo v případě odrůdy Libra shodné s údaji uváděnými Muellerem et al. (2010).

Množství získané mouky je lehce vyšší než matematicky predikovaná hmotnost zbytku semene po odslizení a vylisování, což je pravděpodobně způsobeno navlhavostí materiálu. Očekávané množství osemení v sušině odtučněné mouky je 38 % (Kadivar, 2001). Pokud tuto hodnotu srovnáme se získaným množstvím hrubé frakce získané prosíváním a připočteme i množství odmytého slizu, který byl původně v osemení obsažen, zjistíme, že bylo odstraněno přibližně 60 % osemení.

V patentu na **výrobu lněného PI** je uváděna výtěžnost 29,3 % (Burcon Nutrascience MB Corp, 2007). V této práci bylo dosaženo trochu odlišným postupem výtěžnosti od 14,9 do 17,89 % v závislosti na odrůdě.

8.2 Vývoj obsahu dusíkatých látek a bílkovin během hydrolýzy

Obsah NL byl po izolaci proteinu, dle očekávání, násobně vyšší ve srovnání s moukou, která sloužila jako výchozí materiál. Naměřené hodnoty NL v PI byly u vybraných odrůd následující: Libra 70,67 %, Agriol 77,25, Raciol 69 %. Podobných výsledků jako má odrůda Libra dosáhli i Silva et al. (2013). Hodnoty odrůdy Raciol se zase blíží údajům uváděným Kaushikem et al. (2016). Byly hlášeny i vyšší naměřené obsahy NL v PI (Rabetafika et al., 2011; Dev a Quensel, 1988), což může být způsobeno odlišným postupem přípravy PI, obzvlášť odstraňováním osemení a použitými extrakčními metodami.

Rostoucí trend **obsahu proteinu** v HPI během hydrolýzy byl pozorován i Tangem et al. (2009) na konopných HPI vyrobených trypsinem nebo alkalázou a Khalil et al. (2006) na papainem vytvořených sójových HPI. Bližší srovnání

konkrétních hodnot je obtížné i kvůli různorodosti použitých analytických metod (Nwachukwu a Aluko, 2019).

8.3 Bílkovinný profil proteinového izolátu a hydrolyzátů

Výsledky SDS-PAGE potvrdily předpokládaný rozklad PI proteázami. Přibližný bílkovinný profil PI se skládal z frakcí kolem 28, 15 a pod 10 kDa. Podobné výsledky uvádí ve své práci i Tirgar et al. (2017), který však navíc uvádí i vyšší frakce o velikosti 35-40 a 50 kDa. Absence těchto frakcí ve zkoumaných vzorcích může být způsobena přirozenou hydrolýzou během skladování či během přípravy proteinového izolátu.

Trypsinový HPI má oproti alkalázovému a papainovému širší spektrum bandů, což je v souladu s předpokladem, že se jedná o specifickou proteázu. Obdobných závěrů bylo dosaženo i u jiných olejnin (Karamać et al., 2016; Tang et al., 2006; Xinhuai a Hou, 2009)

Shodné se zjištěnými výsledky jsou i alkalázové HPI s většinou proteinů o velikosti pod 6,5 kDa uváděné v pracích Karamać et al. (2016) a Silva et al. (2013), kteří taktéž zaznamenali slabé bandy ve vyšších frakcích.

Naopak papainový HPI v provedeném experimentu byl nejvíce naštěpený ze všech vyprodukovaných hydrolyzátů, to je protichůdné tomu, co uvádí Karamać et al. (2016). Naopak Meinlschmidt et al. (2016) označili papain jako jedenu z nejúčinnějších proteáz při hydrolýze sójového proteinu, který je svým složením velmi podobný lněnému. Rozdílné výsledky mohou být způsobeny odlišnými podmínkami reakce.

8.4 Rozpustnost, vaznost vody a vaznost tuku

Rozpustnost získaných PI a HPI byla exrémně vysoká, což se dalo předvídat, vzhledem k tomu, že HPI byly získány lyofilizací naštěpených proteinů rozpuštěných v supernatantu hydrolytické reakce. S takto vysokou rozpustností PI jako celku musí být i rozpustnost samotného proteinu v PI obsaženém téměř stoprocentní. Vysoká rozpustnost proteinu (94,8 %) při neutrálním pH byla u lněných proteinových koncentrátů pozorována i Tirgarem et al. (2017). Bylo potvrzeno, že rozpustnost proteinu lze hydrolýzou (trypsinem, alkalázou i papainem) dále zvyšovat (Jones a Tung, 1993; Taha a Ibrahim, 2002).

V souvislosti s vysokou rozpustností, bylo možné domnívat se, že **vaznost vody** nebude příliš vysoká. Oomah a Mazza (1993) publikovali, že vaznost vody komerční lněné mouky (která obsahovala sliz z osemení) je 7,55 g/g. Bylo tedy předpokládáno, že vaznost vody samotného PI bez slizu bude nižší, což se i u naměřených hodnot (3,928 g/g) potvrdilo. Velmi podobných výsledků při analýze vaznosti vody PI dosáhli i Kaushik et al. (2016). Enzymatické štěpení PI vedlo u všech použitých proteáz ke snížení vaznosti vody. Podobný jev zaznamenali i Jones a Tung (1983) při štěpení sójového proteinového koncentrátu trypsinem, i když zdaleka ne v takové míře (tj. zhruba trojnásobně). Naopak Taha a Ibrahim (2002) a Govindaraju (2003) ve svých pracích uvádějí zvýšení vaznosti vody po hydrolýze sójové mouky a PI papainem či alkalázou. Příčinou může být kromě odlišného výchozího materiálu a produktu, či odlišných analytických metod, především různý rozsah provedené hydrolýzy.

Vaznost tuku PI byla oproti ostatním publikacím překvapivě vyšší než vaznost vody (4,338 g/g). Pokud však zaměříme na samotnou vaznost tuku, tak podobné hodnoty uvedli i Dev a Quensel (1988) a Rabetafika et al. (2011). Hydrolýza PI vybranými enzymy (kromě alkalázy) vedla ke zvýšení vaznosti tuku. Yin et al. (2008) během svého výzkumu vlivu hydrolýzy trypsinem na konopný PI dosáhli jak vyšší, tak i nižší vaznosti tuku v závislosti na míře proteolýzy. Vliv může mít i velikost částic a jejich povrchový náboj. Zlepšené vaznosti tuku bylo docíleno i u alkalázou a papainem hydrolyzovaných sójových PI (Govindaraju, 2003).

8.5 Emulgační aktivita a stabilita

V dostupných publikací o emulgačních vlastnostech lněného PI se hodnoty **EAI** značně liší – 375 m^2/g (Kaushik et al., 2016) i 40,1 m^2/g (Karaca et al., 2011) – což naznačuje nakolik tato vlastnost závisí na konkrétní přípravě PI a podmínkách emulgace (pH, koncentrace, teplota atd.). PI vyrobené v rámci tohoto experimentu měly EAI 25,5 m^2/g. Téměř identický výsledek při pH 7 uvedl i Elsorady (2020).

Vliv hydrolýzy na emulgační vlastnosti není jednoznačný. Zatímco EAI u některých plodin hydrolyzováním narůstá, u jiných naopak klesá (Wouters et al., 2016). Tsumura et al. (2005) navíc potvrdil, že zlepšení či zhoršení emulgační aktivity vůči PI závisí na pH a zatímco trypsinem vytvořené sójové HPI měly při

pH 4 lepší emulgační aktivitu, při pH 7 byly naopak horší. Experimentem získané HPI projevily u všech použitých proteáz nárůst EAI – u trypsinu 45,5 m^2/g, alkalázy 31,19 m^2/g a papainu 36 m^2/g.

ESI se také u semen olejnin projevil jako dost individuální parametr a v literatuře se pohybuje od extrémních 180 h (po stabilizaci emulze proteiny) (Kaushik et al., 2016) až k 10,5-15,5 min (Karaca et al., 2011). V této práci byl u PI zjištěný ESI 52,77 min. K tomu nejbližší dohledaný výsledek (81-70 min při pH 4-9) zveřejnili Rabetafika et al. (2011). Vliv hydrolýzy na ESI je závislý na její délce, pokud je míra hydrolýzy malá, může dojít ke zlepšení ESI, avšak vlivem extenzivní hydrolýzy dochází k poklesu, jelikož kratší peptidy tvoří slabší elastický film na rozhraní oleje a vodné fáze (Wounters et al., 2016). K tomu došlo i u tohoto pokusu trypsinové HPI měly ESI 40,88 min, alkalázové 40,25 min a papainové 38,98 min. Hydrolyzáty s obdobným ESI získal i Padial-Domínguez et al. (2020) po ošetření sójového PI trypsinem.

8.6 Obsah polyfenolů a antioxidační aktivita

Obsah polyfenolů v PI, které byly později ošetřeny proteázami, byl ekvivalentní 3,31 mg GAE/g. Silva et al. (2013) a Alu'datt et al. (2013) naměřili o něco menší obsah (2,2 mg/g a 1,27 mg/g).

Hydrolýza zapříčinila další nárůst, což může být způsobeno částečným rozkladem lignanů vlivem alkalického prostředí v němž probíhá enzymatické štěpení či rozrušením interakcí mezi fenoly, proteiny a lipidy. Oomah a Mazza (1998) uvedli, že celkový obsah polyfenolů ve lněných semenech je 8,8-8,77 mg/g dle obsahu oleje. Po hydrolýze byly získané výsledky u trypsinového HPI 8,23 mg/g, u alkalázového 10,09 mg/g a u papainového 9,17 mg/g. Hodnoty jsou vyšší vůči uváděnému celkovému obsahu polyfenolů, jelikož PI jsou ve srovnání se semeny zbaveny oleje a osemení se slizotvornými látkami, výchozí základ je tedy odlišný.

Bylo prokázáno, že antioxidační aktivita je ve srovnání s výchozím PI po hydrolýze u všech vybraných enzymů vyšší, a to jak v této práci, tak i u jiných autorů (Khalil et al., 2006; Karamać et al., 2014; Sbroggio et al., 2016). Přesněji byl nárůst v této práci 2,19-2,56násobný v závislosti na použité proteáze. Nejúčinnější byl z tomto ohledu podle získaných údajů papain, poté alkaláza a nakonec trypsin.

Podobnému nárůstu se přiblížil s antioxidační aktivitou 1,6× až 2,1× vyšší i Karamać et al. (2016), avšak jako nejvíce antioxidační vlastnosti indukující enzym uvádí alkalázu, poté trypsin a teprve až poté papain. Důvodem jsou nejspíš odlišné podmínky proteolytické reakce.

Závěr

Během výroby PI se prokázalo, že množství odmytého slizu a vylisovaného oleje je dependentní na odrůdě. Množství z pokrutin získané mouky (a její hladké frakce) bylo u všech odrůd velmi podobné. Nejvíce proteinového izolátu bylo získáno z odrůdy Libra – 17,9 %.

Průběh hydrolýzy byl sledován jako obsah NL v hydrolyzovaném proteinovém izolátu pomocí Dumasovy metody. Tento obsah, dle očekávání u všech variant odrůd i enzymů klesal, neboť vlivem hydrolýzy byl uvolňován naštěpený protein a peptidy do vodné fáze reakce. Ta byla analyzována na obsah bílkovinných látek metodou BCA, čímž byl potvrzen komplementární nárůst daných složek. Rozsah naštěpení proteinů byl určen pomocí techniky SDS-PAGE, jež odhalila, že výchozí proteinový izolát obsahuje tři velikostní frakce proteinů, stejně tak i trypsinové hydrolyzáty, jejichž molekulární velikost však byla oproti proteinovému izolátu nižší. Alkalázové hydrolyzáty měly proteiny rozděleny do dvou frakcí, přičemž zastoupení molekulárně větší frakce bylo velmi malé. Papainové hydrolyzáty byly rozštěpeny nejvíce – byla u nich zjištěna pouze jedna frakce proteinů pod 10 kDa.

Zjištěná rozpustnost proteinových izolátů i hydrolyzátů byla velmi vysoká (téměř 100 %). V souvislosti s tím, byla vaznost vody poměrně nízká (3,93 g/g) a štěpením proteinu došlo k dalšímu, až pětinásobnému, poklesu (nejvíce u trypsinových hydrolyzátů). Vaznost tuku byla naopak vyšší (4,34 g/g) než vaznost vody a hydrolyzovaním (s výjimkou alkalázy) se tento rys u většiny odrůd nadále zvýraznil.

Emulgační aktivita vlivem proteolýzy stoupala, avšak emulgační stabilita poklesla zhruha 1,3×. Největší nárůst emulgační aktivity (1,79×) a nejmenší pokles stability byl zaznamenán po hydrolýze trypsinem, jelikož tyto hydrolyzáty měly největší peptidové fragmenty. Z použitých odrůd prokázal nejvyšší emulgační aktivitu Raciol.

Obvzlášť znatelný vliv měla hydrolýza proteinových izolátů na obsah polyfenolických látek, který byl až 3× vyšší (podle použité proteázy). Nejvíce

polyfenolických látek se uvolnilo po štěpení alkalázou. Nejméně polyfenolů bylo zjištěno z použitých odrůd u odrůdy Agriol. Ve spojitosti s nárůstem polyfenolů byla zjištěna i vyšši antioxidační aktivita, a to až 2,5×. Účinnost v její idukci jednotlivými proteázami je od nejúčinnější po nejméně účinnou následující: papain, alkaláza, trypsin, tudíž platí, že čím více je protein naštěpen, tím vyšší má antoxidační aktivitu. Z použitých odrůd měl nejvíce antioxidantů Raciol.

Ze získaných poznatků nelze vyvodit jednoznačné doporučení. Vysoce naštěpený lněný protein bude mít například vynikající antioxidační vlastnosti, ale dobrých emulgačních vlastností budou dosahovat spíše částečně štěpené hydrolyzáty. Proto bude praktická aplikace výsledků velmi záviset na zamýšleném využití produktu.

Použitá literatura a zdroje

Alu'datt, M. et al. (2013). Phenolic–protein interactions in oilseed protein isolates. *Food Research International*, **52** (1): 178-184.

Bacala, R. a Barthet, V. (2007). Development of Extraction and Gas Chromatography Analytical Methodology for Cyanogenic Glycosides in Flaxseed (Linum usitatissimum). *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. **90**(1): 153-161.

Bakardjieva, M. (2015). *Proteolytický systém krevniček rodu Schistosoma*. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Přirodovědecká fakulta.

Bankus J. a Bond J. (2001). Apendix II: Some commercialy available proteases. In: *Proteolytic enzymes.: A practical aproach*. 2. Oxford University press, Oxford. ISBN 0-19-963663-1. pp. 295-316.

Barrett, A. (2001). Proteolytic enzymes: nomenclature and classification. In: *Proteolytic enzymes.: A practical aproach*. 2. Oxford University press, Oxford. ISBN 0-19-963663-1. pp. 1-21.

Bárta, J. et al. (2020). Effect of Boiling on Colour, Contents of Betalains and Total Phenolics and on Antioxidant Activity of Colourful Powder Derived from Six Different Beetroot (Beta vulgaris L. var. conditiva) Cultivars. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*.**70** (4): 377-385

Bekhit, A. et al. (2018). Flaxseed: Composition, detoxification, utilization, and opportunities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* **13**: 129-152.

Bernacchia R. et al. (2014). Chemical Composition and Health Benefits of Flaxseed. *Austin Journal of Nutrition and Food Sciences,* 2(8): 1045.

Blainski, A. et al. (2013). Application and Analysis of the Foiln CiocalteuMethod for the Determination of the Total Phenolyc Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules.* 18: 6852-6865

Briones-Martínez, R. et al. (1997). Influence of enzymatic hydrolysis on functionality of plant proteins. *Journal of Thermal Analysis*. **49**: 831-837.

Buck, F. et al. (1962). On the mechanism of enzyme action. LXXIII. Studies on trypsins from beef, sheep and pig pancreas. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **97**(2): 417-424.

Burcon Nutrascience MB Corp. Process for preparation of flaxprotein isolate. Vynálezci: Green B. et al. Spojené státy americké. Worldwide application. US7309773B2. 18. 12. 2007.

Cano, A. a M. Arnao. (2018). ABTS/TEAC (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-

sulfonic acid)/TroloxR-Equivalent Antioxidant Capacity) radical scavenging mixed-mode assay. In: *Measurement of antioxidant activity and capacity: recent trends and applications*. 1. Wiley, Hoboken, NJ, USA. ISBN 9781119135357. pp. 117-139.

Coskuner, Y. a Karababa E. (2007). Some physical properties of flaxseed (Linum usitatissimum L.). *Journal of Food Engineering*. **78**: 1067–1073.

Cutler, A. a Conn E. (1981). The biosynthesis of cyanogenic glucosides in Linum usitatissimum (linen flax) in Vitro. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **212**(2): 468-474.

Daun, J. a Przybylski R. (2000). Enviromental effects on the composition of four Canadian flax cultivars.In: *Proceedings f the 58th Flax Institute of the United States*. Fargo, North Dakota, pp. 80-91.

Daun, J. et al. (2003). Structure, composition, and variety development of flaxseed. In: *Flaxseed in human nutrition*. AOCS Press, Champaign. ISBN 1893997383. pp. 7-46.

DeLange, R. a Smith E. (1968). Subtilisin Carlsberg: Amino acid composition, isolation and composition of peptides from tryptic hydrolysate. *The Journal of Biological Chemistry*. **243**(9): 2134-2142.

Dev, D. a Quensel E. (1988). Preparation and Functional Properties of Linseed Protein Products Containing Differing Levels of Mucilage. *Journal of Food Science*. **53**(6): 1834-1837.

Diviš, J. (2010). *Pěstování rostlin: (učební texty pro obor provozní podnikatel a pozemkové úpravy a převody nemovitostí)*. 2. dopl. vyd. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, České Budějovice. ISBN 978-80-7394-216-8.

Djuardi, A. et al. (2020). Emulsifying properties and antioxidant activity of soy protein isolate conjugated with tea polyphenol extracts. *Journal of Food Science and Technology*, **57**(10), 3591-3600

Dorrell, D. (1970). Distribution of fatty acids within the seed of flax. *Canadian Journal of Plant Science*. (50): 71-75.

Dunn, B. (2001). Determination of protease mechanism. In: *Proteolytic enzymes.: A practical aproach*. 2. Oxford University press, Oxford. ISBN 0-19-963663-1. pp. 77-104.

Elsorady, M. (2020). Characterization and functional properties of proteins isolated from flaxseed cake and sesame cake. *Croatian journal of food science and technology.***12** (1): 77-83.

Frahat, F. et al. (2016). Production and Evaluation of Papain and Pectinesterase

Enzymes from Papaya Fruits. In: *3nd International Conference On Biotechnology Applications In Agriculture (ICBAA),* Benha University, Moshtohor a Sharm El-Sheikh, Egypt. pp.1-11

Govindaraju K. (2003). *Studies on the preparation and characterisation of the protein hydrolysates from groundnut and soybean isolates.* Disertační práce. University of Mysore, Department of protein chemistry and techology.

Graycar, T. et al. (2013). Subtilisins.In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier. ISBN 9780123822192. pp. 3148-3155.

Gupta R. et al. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **59**(1): 15-32.

Hall, C. et al. (2006). Flaxseed. In: *Advances in Food and Nutrition Research.* Elsevier. ISBN 9780120164516. pp. 1-97.

Harland, B. a Morris E. (1995). Phytate: A good or a bad food component? *Nutrition Research*. **15**(5): 733-754.

Hocking, P. a McLaughlin M. (2000). Genotypic variation in cadmium accumulation by seed of linseed, and comparison with seeds of some other crop species. *Australian Journal of Agricultural Research*. **51**(4): 427-433.

Chelulei Cheison, S. et al. (2011). Analysis of the Effect of Temperature Changes Combined with Different Alkaline pH on the β-Lactoglobulin Trypsin Hydrolysis Pattern Using MALDI-TOF-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **59**(5): 1572-1581.

Jones, L. a Tung, M. (1983). Functional properties of oilseed protein concentrates and isolates. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*. **16** (1): 57-62.

Kadivar, M. (2001). *Studies on integrated processes for the recovery of mucilage, hull, oil and protein from solin (Low Linolenic acid flax).* PhD Thesis, University of Saskatchewan, Department of Applied Microbiology and Food Sciences.

Kajla, P. et al. (2015). Flaxseed—a potential functional food source. *Journal of Food Science and Technology*. **52**(4): 1857-1871

Karaca, A. et al. (2011). Emulsifying properties of canola and flaxseed protein isolates produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Research International.* **44** (9): 2991-2998.

Karamać, M. et al. (2014). Antioxidant Activity of Hydrolysates Prepared from Flaxseed Cake Proteins Using Pancreatin. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences.* **64** (4): 227-233.

Karamać, M. et al. (2016). Use of Different Proteases to Obtain Flaxseed Protein Hydrolysates with Antioxidant Activity. *International Journal of Molecular Sciences.* **17** (7):1027.

Káš, J. et al. (2005). *Laboratorní techniky biochemie*. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha. ISBN 80-708-0586-2.

Kaushik P. et al. (2016). Preparation, characterization and functional properties of flax seed protein izolate. *Food Chemistry.* **197**: 212-220.

Khalil A. et al. (2006). Production of functional protein hydrolysates from Egyptian breeds of soybean and lupin seeds. *African Journal of Biotechnology.* **5**(10): 907-916.

Kinsella, J. a Whitehead D. (1989) Proteins in Whey: Chemical, Physical, and Functional Properties. In: *Advances in Food and Nutrition Research.* Elsevier. ISBN 9780120164332. pp. 343-438

Kraus, P. (2020). *Seznam doporučených odrůd lnu setého 2020*. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno - Národní odrůdový úřad, Brno. ISBN 978-80-7401-180-1.

Marcone, M. et al. (1998). Salt-soluble seed globulins of various dicoletydonous and monocoletydonous plants - I. Isolation/purification and characterization. *Food Chemistry.* **62**(1): 27-47.

Mazza, G. a Biliaderis C. (1989). Functional Propertiens of Flax Seed Mucilage. *Journal of Food Science*. **54**(5): 1302-1305.

McCarthy, A.et al. (2013). Protein Hydrolysates from Agricultural Crops—Bioactivity and Potential for Functional Food Development. *Agriculture*. **3**(1): 112-130.

Meagher, L. et al. (1999). Isolation and Characterization of the Lignans, Isolariciresinol and Pinoresinol, in Flaxseed Meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **47**(8): 3173-3180.

Meinlschmidt, P. et al. (2016). Enzymatic treatment of soy protein isolates: effects on the potential allergenicity, technofunctionality, and sensory properties. *Food Science and Nutrition.* **4**(1): 11-23.

Mihaljev, Ž. et al. (2015). Comparison of the Kjeldahl method, Dumas method and NIR method for total nitrogen determination in meat and meat products. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*. **21**(4): 365-370.

Mitchel, R. et al. (1970). The Complete Amino Acid Sequence of Papain. *The Journal of Biological Chemistry.* **245**(14): 3485-3492.

Mueller, K. et al. (2010). Functional properties and chemical composition of

fractionated brown and yellow linseed meal (Linum usitatissimum L.). *Journal of Food Engineering*, **98**(4): 453-460.

Neklyudov, A. et al. (2000). Properties and Uses of Protein Hydrolysates (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. **36**(5): 452-459.

Nireesha, G. et al. (2013). Lyophilization/Freeze Drying – An Review. *International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences*. **4**(4): 87-98.

Nwachukwu, I. a Aluko, R. (2019). A systematic evaluation of various methods for quantifying food protein hydrolysate peptides. *Food Chemistry*, **270**:25-31.

Oomah, B. a Mazza, G. (1998). Flaxseed products for disease prevention. In: *Functional foods: Biochemical and processing aspects.* Technomic Pub Co Inc, Lanchester, PA, USA. ISBN 9780367400415. pp. 91–138.

Oomah, D. a Mazza, G. (1993). Processing of Flaxseed Meal: Effect of Solvent Extraction on Physicochemical Characteristics. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, **26**(4), 312-317.

Padial-Domínguez, M. et al. (2020). Optimization of the Emulsifying Properties of Food Protein Hydrolysates for the Production of Fish Oil-in-Water Emulsions. *Foods.* **9** (5): 636.

Panyam, D. a Kilara A. (1996). Enhancing functionality of the food proteins by enzymatic modificaton. *Trends in Food Science& Technology*. **7**: 120-125.

Patterson, C. (2008). *Bioactive proteins and peptides: Essential, functional and beneficial.* Agriculture and Agri-food Canada, Otawa.

Prosser, V. (1989). *Experimentální metody biofyziky: celostátní vysokoškolská učebnice pro studující matematicko-fyzikálních a přírodovědných fakult oboru 11-66-8 Biofyzika a chemická fyzika*. Academia, Praha. ISBN 80-200-0059-3.

Qi, W. a He Z. (2006). Enzymatic hydrolysis of protein: Mechanism and kinetic model. *Frontiers of Chemistry in China*. **1**(3): 308-314.

Rabetafika H. et al. (2011). Flaxseed proteins: food uses and health benefits. *International Jornal of Fod Science and Technlogy*. **46** (2)**:** 221-228.

Rao, M. et al. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*. **62**(3): 597-635.

Sbroggio, M. et al. (2016). Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. *Food Science and Technology.* **36** (2): 375-381.

Shannon, J. (2001). Using proteinases for Edman sequence analysis and peptide

mapping.In: *Proteolytic enzymes.: A practical aproach*. 2. Oxford University press, Oxford. ISBN 0-19-963663-1. pp. 187-210

Shim, Y. et al. (2014). Flaxseed (Linum usitatissimum L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review. *Trends in Food Science & Technology.* **38**(1): 5-20.

Shinde, U. a Thomas G. (2011). Insights from Bacterial Subtilases into the Mechanisms of Intramolecular Chaperone-Mediated Activation of Furin. In: *Proprotein Convertases*. NJ: Humana Press, Totowa. ISBN: 978-1-61779-204-5. pp. 59-106.

Schaafsma, G. (2009). Safety of protein hydrolysates, fractions thereof and bioactive peptides in human nutrition. *European Journal of Clinical Nutrition*. **63**(10): 1161-1168.

Sigma-Aldrich. (2007a). *Product Information: Trypsin from porcine pancreas. T4799.* [online] [13. 3. 2021] Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/t4799pis.pdf

Sigma-Aldrich. (2007b). *Product Information: Protease from Bacillus licheniformis.* [online] [14. 3. 2021] Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/p5380pis.pdf

Silva F. et al. (2013). Antioxidant cpacity of flaxseed products: The Effect of In vitro Digestion. *Plant Foods for Human Nutrition.* **68** (1): 24-30.

Silva, F. et al. (2013). Antioxidant Capacity of Flaxseed Products: The Effect of In vitro Digestion. *Plant Foods for Human Nutrition*, **68**(1): 24-30.

Sims, A. et al. (2004). Glutamic protease distribution is limited to filamentous fungi. *FEMS Microbiology Letters*. **239**(1): 95-101.

Smith, P. et al. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry.* **150**(1): 76-85.

Storer, A. a Ménard R. (2013). Papain. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier. ISBN 9780123822192. pp. 1858-1861.

Špaldon, E. (1986). *Rostlinná výroba*. 1. Statní zemědělské nakladatelství, Praha.

Taha, F. a Ibrahim M. (2002). Effect of degree of hydrolysis on the functional properties of some oilseed proteins. *Grasas y Aceites*. **53** (3): 273-281

Tang, C. et al. (2009). Enzymatic hydrolysis of hemp (Cannabis sativa L.) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates. *Food Chemistry*, **114**(4): 1484-1490.

Tirgar, M., et al. (2017). Effect of extraction method on functional properties of flaxseed protein concentrates. *Food Chemistry*, **215:** 417-424.

Tsumura, K.et al. (2005). Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. *LWT - Food Science and Technology.* **38** (3): 255-261.

Tzen, J. et al. (1993). Lipids, Proteins, and Structure of Seed Oil Bodies from Diverse Species. *Plant Physiology.* **101**(1): 267-276.

Vodrážka, Z. et al. (1991). *Enzymologie*. 2. přepracované vyd. VŠCHT, Praha. ISBN 80-708-0124-7.

Vojdani, F. a Whitaker J. (1994). Chemical and Enymatic Modification of Proteins for Improved Functionality. In: *Protein Functionality in Food Systems*. Marcel Dekker, New york. ISBN 9780367402051. s. 261-310.

Wouters, A. et al. (2016). Relevance of the Functional Properties of Enzymatic Plant Protein Hydrolysates in Food Systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* **15** (4): 786-800.

Wu, S. et al. (2019). Bioactive protein/peptides of flaxseed: A review. In: *Trends in Food Science & Technology.* **92**(1): 184-193.

Xinhuai Z. a Hou Y. (2009). Limited hydrolysis of soybean protein concentrate and isolate with two proteases and the impact on emulsifying activity index of hydrolysates. *African Journal of Biotechnology.* **8**(14): 3314-3319

Yin, SW. et al. (2008). Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (Cannabis sativa L.) protein isolate. *Food Chemistry*, **106** (3): 1004-1013.

Zayas, J. (1997). *Functionality of Proteins in Food*. Springer, Berlín. ISBN 978-3-642-59116-7.

Zhang, W. et al. (2009). Demucilaging and dehulling flaxseed with a wet process. *LWT - Food Science and Technology*, **42**(6): 1193-1198.

Seznam zkratek

- MK – mastná kyselina
- AK – aminokyselina
- CLs – cyklinopeptidy
- HTS – hmotnost tisíce semen
- SDS-PAGE
- Lys – lysin
- Ile – izoleucin
- Ser – serin
- His – histidin
- Asn – asparagin
- P1 – první AK zbytek od štěpené peptidové vazby směrem k N-konci
- P1' – první AK zbytek od štěpené peptidové vazby směrem k C-konci
- P2 druhý AK zbytek od štěpené peptidové vazby směrem k N-konci
- SDS – dodecylulfát sodný
- AC/BIS - akrylamid a N, N'-methylenbisakrylamid
- TEMED – tetramethylethylendiamin
- PI – proteinový izolát
- HPI – hydrolyzovaný proteinový izolát
- GAE – ekvivalent kyseliny gallové
- AAE – ekvivalent kyseliny askorbové

Seznam ilustrací

Obrázek 1: Bílkovinný profil PI a HPI 35

Seznam grafů

Graf 1: Meziodrůdový průměr výtěžností produktů výroby PI.....32
Graf 2: Vývoj obsahu NL (%) během hydrolýzy.....33
Graf 3: Mezienzymový průměrný vývoj obsahu bílkovin (%) v supernatantu během hydrolýzy.....34
Graf 4: Vaznost vody (g/g) PI a HPI.....36
Graf 5: Vaznost tuku (g/g) PI a HPI.....36
Graf 6: Emulgační aktivita (jako index emulgační aktivity v m2/g) 37
Graf 7: Emulgační stabilita (jako index emulgační stability v min).....37
Graf 8: Obsah celkových polyfenolů (mg/g GAE).....38
Graf 9: Antioxidační aktivita (mg/g AAE).....38

Seznam tabulek

Tabulka 1: Složení gelů.....27
Tabulka 2: Průměrné výtěžnosti kroků výroby PI.....32
Tabulka 3: Průměrný obsah bílkovin (%) v tekuté fázi hydrolyzované směsi během 4h štěpení.....34
Tabulka 4: Přibližné molekulové hmotnosti (kDa) a relativní zastoupení (%) frakcí 35

Přílohy

Příloha 1: ANOVA - Hodnocení závislosti výtěžnosti jednotlivých kroků výroby PI na odrůdě

Sliz (%)	Σ čtverců	Stupeň volnosti	Průměr čtverců	F	p
Absolutní člen	2022,39	1	2022,39	5582,854	0,000000
Odrůda	40,651	2	20,326	56,11	0,000001
Chyba	4,347	12	0,362		
Olej (%)					
Absolutní člen	26321,13	1	26321,13	108153,6	0,000000
Odrůda	47,52	2	23,76	97,6	0,000000
Chyba	2,68	11	0,24		
Mouka (%)					
Absolutní člen	27761,6	1	27761,6	53952,13	0,000000
Odrůda	1,59	2	0,79	1,54	0,256739
Chyba	5,66	11	0,51		
Hladká mouka (%)					
Absolutní člen	18025,04	1	18025,04	9336,508	0,000000
Odrůda	5,81	2	2,91	1,505	0,261029
Chyba	23,17	12	1,93		
PI (%)					
Absolutní člen	3755,311	1	3755,311	2036,415	0,000000
Odrůda	32,132	2	16,066	8,712	0,004601
Chyba	22,129	12	1,844		

Příloha 2: ANOVA - Hodnocení závislosti obsahu NL (%) v PI a HPI na odrůdě, použité proteáze a délce trvání reakce

NL (%) v PI	Σ čtverců	Stupeň volnosti	Průměr čtverců	F	p
Absolutí člen	78429,6	1	78429,6	19048,72	0,000000
Odrůda	190,02	2	95,01	23,08	0,000077
Chyba	49,41	12	4,12		

NL (%) v HPI:					
Absolutní člen	755034,9	1	755034,9	15225,92	0,000000
Enzym	3728	2	4864	37,59	0,000000
Odrůda	5712,3	2	2856,1	57,6	0,000000
Odběr	295	4	73,7	1,49	0,207971
Enzym×odrůda	1553,6	4	388,4	7,83	0,000008
Enzym×trvání	16,56	8	207	4,17	0,000133
Odrůdy×trvání	2666,6	8	333,3	6,72	0,000000
Enzym×odrůda×trvání	2586,6	16	161,7	3,26	0,000056
Chyba	8926	180	49,6		

Příloha 3: ANOVA- Hodnocení vlivu enzymu, odrůdy a délky hydrolýzy na obsah bílkovin (%) zjišťovaný metodou BCA v tekuté fázi hydrolyzovaného vzorku

Bílkoviny (%)	Σ čtverců	Stupeň volnosti	Průměr čtverců	F	p
Absolutní člen	265741,3	1	265741,3	243,5176	0,000000
Odběr	68135,9	4	17034	15,6094	0,000000
Enzym	31766,2	2	15883,1	14,5548	0,000013
Odrůda	12006,8	2	6003,4	5,5013	0,007288
Odběr×enzym	3728,2	8	466	0,427	0,898624
Odběr×odrůda	51229,3	8	6403,7	5,8681	0,000038
Enzym×odrůda	2465,9	4	616,5	0,5649	0,689334
Odběr×enzym×odrůda	3198,8	16	199,9	0,1832	0,999702
Chyba	49106,8	45	1091,3		

Příloha 4: ANOVA - Hodnocení vlivu enzymu a odrůdy na vaznost vody a tuku (g/g) u PI a výsledného HPI

Vaznost vody (g/g)	Σ čtverců	Stupeň volnosti	Průměr čtverců	F	p
Absolutní člen	107,3054	1	107,3054	1095,537	0,000000
Enzym	60,0503	3	20,0168	204,361	0,000000
Odrůda	0,6052	2	0,3026	3,090	0,063979
Enzym×odrůda	0,9647	6	0,1608	1,642	0,179100
Chyba	2,3507	24	0,0979		

Vaznost tuku (g/g)					
Absolutní člen	661,1069	1	661,1069	1135,469	0,000000
Enzym	57,9979	3	19,3326	33,204	0,000000
Odrůda	2,6527	2	1,3263	2,278	0,124210
Enzym×odrůda	2,9806	6	0,4968	0,853	0,542431
Chyba	13,9736	24	0,5822		

Příloha 5: ANOVA - Hodnocení vlivu zvoleného enzymu a odrůdy na emulgační vlastnosti výchozího PI a výsledného HPI

Emulgační aktivita (m^2/g)	**Σ čtverců**	**Stupeň volnosti**	**Průměr čtverců**	**F**	**p**
Absolutní člen	42991,4	1	42991,4	2326,3	0,000000
Enzym	1946,33	3	648,78	35,106	0,000000
Odrůda	204,34	2	102,17	5,528	0,010598
Enzym×odrůda	50,49	6	8,41	0,455	0,834058
Chyba	443,53	24	18,48		
Emulgační stabilita (min)					
Absolutní člen	67251,18	1	67251,18	2785,314	0,000000
Enzym	1112,05	3	370,68	15,352	0,000009
Odrůda	100,73	2	50,37	2,086	0,146131
Enzym×odrůda	97,37	6	16,23	0,672	0,673117
Chyba	579,48	24	24,14		

Příloha 6: ANOVA - Hodnocení vlivu použité proteázy a odrůdy na obsah polyfenolů a antioxidační aktivitu PI A HPI

Polyfenoly (mg/g GAE)	**Σ čtverců**	**Stupeň volnosti**	**Průměr čtverců**	**F**	**p**
Absolutní člen	2134,363	1	2134,363	1145,653	0,000000
Enzym	246,826	3	82,275	44,163	0,000000
Odrůda	15,365	2	7,682	4,124	0,028883
Enzym×odrůda	11,858	6	1,976	1,061	0,412676
Chyba	44,412	24	1,863		
Antiox. látky (mg/g AAE)					

Absolutní člen	4826,891	1	4826,891	7898,792	0,000000
Enzym	447,796	3	149,265	244,26	0,000000
Odrůda	12,897	2	6,449	10,553	0,000515
Enzym×odrůda	13,860	6	2,31	3,78	0,008610
Chyba	14,666	24	0,611		