

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Katedra: Katedra rostlinné výroby a agroekologie

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Produkce hydrolyzátů bramborových bílkovin pomocí vybraných potravinářských
proteas

Autor diplomové práce: Anna Brabcová

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

Konzultant diplomové práce: Ing. František Lorenc

České Budějovice 2016

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury, uvedených v seznamu citované literatury.

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

Datum: 25. Dubna 2016

.....

Poděkování

Velice ráda bych poděkovala vedoucímu práce panu doc. Ing. Janu Bártovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné připomínky při tvorbě méj diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala konzultantovi Ing. Františku Lorencovi za pomoc při vytváření laboratorních analýz. Můj velký dík patří i kolegyni Bc. Kláře Mikové za psychickou podporu a spolupráci v laboratoři.

Abstrakt

Pomocí čtyř vybraných potravinářských proteáz byly vytvořeny částečné hydrolyzáty dvou typů bramborových proteinových koncentrátů (PC). Komerčně produkováný proteinový koncentrát společnosti Lyckeby a laboratorně vyrobený proteinový koncentrát odrůdy Ornella byly podrobeny enzymatické hydrolýze enzymy Fromase 220TL, Fromase 220XLG, Maxiren XDS (komerčně dostupné formy chymosinu) a neutrální proteasa z *Bacillus subtilis*. Pomocí metody SDS-PAGE byl vytvořen proteinový profil hydrolyzátů. U všech hydrolyzátů byla stanovena rozpustnost a antioxidační aktivita metodou DPPH. Hlavním cílem bylo hodnocení účinnosti štěpení bramborových proteinů vybranými proteázami. Z výsledků práce vyplývá, že neúčinnějším enzymem použitým pro hydrolýzu PC byl enzym neutrální proteasa z *Bacillus subtilis*.

Klíčová slova: částečná hydrolýza, potravinářské proteázy, bramborový proteinový koncentrát

Abstract

Partial hydrolysates of two types potato protein concentrates were produced by four selected food proteases. Commercially produced (company Lyckeby) protein concentrate and laboratory prepared concentrate from tubers of Ornella cultivar were subjected of enzymatic hydrolysis by Fromase 220TL, Fromase 220XLG, Maxiren XDS (commercially available forms of chymosin) and Neutral proteases from bacterial *Bacillus subtilis*. Protein profile of hydrolysates was created using SDS-PAGE. All hydrolysates were determined by solubility and antioxidant activity using DPPH method. The main aim of this study was to evaluate the efficiency of digestion potato protein concentrate by these selected proteases. Based on the results, the most effective enzyme used for hydrolysis of PC was Neutral proteases form *Bacillus subtilis*.

Key words: partial hydrolysis, food proteases, potato protein concentrate

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Literární přehled.....	9
2.1 Rostlinné proteiny v lidské výživě.....	9
2.2 Funkční vlastnosti proteinů.....	10
2.2.1 Rozpustnost proteinů.....	12
2.2.2 Emulgační vlastnosti.....	12
2.2.3 Tvorba pěn – pění.....	15
2.2.4 Koagulace a tvorba gelů.....	16
2.3 Modifikace proteinů a zlepšování funkčních vlastností.....	16
2.3.1 Enzymová hydrolýza.....	16
2.3.2 Proteolytické enzymy.....	18
2.3.3 Vlastnosti proteinových hydrolyzátů.....	22
2.4 Hlízové proteiny bramboru.....	25
2.4.1 Patatin.....	26
2.4.2 Inhibitory proteáz.....	26
2.4.3 Ostatní bílkoviny hlíz bramboru.....	28
2.5 Nutriční kvalita bramborových proteinů.....	28
2.6 Produkce hlízových proteinů brambor.....	28
2.6.1 Další možnosti separace proteinů.....	28
2.7 Funkční vlastnosti bramborových proteinů.....	30
2.7.1 Enzymová hydrolýza bramborových proteinů.....	30
3. Cíle práce.....	32
4. Metodika a použitý materiál.....	33
4.1 Bramborový proteinový koncentrát (PPC).....	33
4.1.1 Příprava hlízové šťávy z brambor odrůdy Ornella.....	33
4.1.2 Separace bramborových proteinů – příprava PPC.....	33
4.1.3 Enzymatická hydrolýza PPC vybranými preparáty.....	33
4.1.4 Stanovení rozpustnosti hydrolyzátů.....	35
4.1.5 Elektroforetické analýza hydrolyzátů PC.....	35
4.1.6 Peptidová elektroforéza.....	36
4.1.7 Stanovení antioxidační aktivity hydrolyzátů.....	37
4.1.8 FPLC – kapalinová chromatografie.....	38
4.1.9 Statistické vyhodnocení dat.....	38
5. Výsledky.....	39

5.1	Rozpustnost částečných hydrolyzátů	39
5.2	Antioxidační aktivita hydrolyzátů.....	44
5.3	SDS-PAGE – profily proteinových koncentrátů.....	47
5.4	Peptidová elektroforéza – vizualizace peptidových frakcí.....	49
5.5	Chromatografický profil hydrolyzátů	50
5.6	Statistické zhodnocení výsledků práce	53
6.	Diskuze	55
6.1	Rozpustnost proteinového koncentrátu	55
6.2	Výběr enzymových preparátů	55
6.3	Částečná hydrolýza a rozpustnost bramborových proteinů	56
6.4	Antioxidační aktivita hydrolyzátů.....	57
7.	Závěr	58
8.	Seznam použité literatury.....	59
9.	Přílohy.....	65

1. Úvod

Nutriční kvalita bramborových proteinů je vysoká. Sušina hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.) obsahuje kolem 10 % proteinů. Na základě aminokyselinového složení je kvalita bramborových proteinů ze 70 % srovnatelná s kvalitou proteinů obsažených ve vejcích. Bylo prokázáno, že nutriční hodnota bramborových proteinů je lepší, než nutriční hodnota proteinů z hlavních rostlinných zdrojů primárně určených pro jejich produkci a následné spotřebě v lidské výživě (Ralet & Guéguen, 2000).

V současné době jsou bramborové proteiny produkovány z hlízové šťávy brambor, která je odpadním produktem v průmyslové výrobě škrobu. V průmyslovém měřítku probíhá izolace proteinů z hlízové šťávy brambor (PFJ) kombinovaným procesem kyselé precipitace a následné tepelné koagulace. Vlivem těchto použitých procesů dochází k vysokému stupni denaturace bramborových proteinů, což vede ke ztrátě jejich funkčních vlastností. Tímto způsobem vyprodukované proteiny nacházejí své využití především jako součást potravy hospodářských zvířat. Jejich využití pro lidskou spotřebu, například jako součástí potravinářských výrobků, je vzhledem ke špatné rozpustnosti a dalším funkčním charakteristikám omezené (Ralet & Guéguen, 2000).

Enzymová hydrolýza je jednou z možností jak zlepšovat nepříznivý stav průmyslově vyprodukovaných bramborových proteinů, jejich fyzikálních, chemických, funkčních a nutričních vlastností (Wei & Zhimin, 2006). Bylo prokázáno, že peptidy s krátkým řetězcem, vzniklé z proteinů procesem enzymové hydrolýzy, mají vyšší nutriční hodnoty a mohou být efektivněji využity, než odpovídající směsi volných aminokyselin. Díky těmto vlastnostem je lze označit jako bioaktivní peptidy. (McCarthy et al., 2013).

Pro zlepšení funkčních vlastností bramborových proteinů procesem enzymové hydrolýzy - produkci bramborových proteinových hydrolyzátů s příznivými vlastnostmi, které by bylo možné využít jako součást potravinářských výrobků je nutné využití preparátů, jejichž použití je pro tyto účely v potravinářství povoleno (Spök, 2006).

2. Literární přehled

2.1 Rostlinné proteiny v lidské výživě

Rostlinné proteiny, byly vždy součástí lidské stravy. Ve srovnání s živočišnými bílkovinami jsou rostlinné proteiny relativně levné a dostupné, přesto je jejich přímá konzumace v konvenční stravě člověka, v potravinářských výrobcích, limitována (Day, 2013).

V současnosti je většina rostlinných proteinů využita jako součást krmných směsí pro hospodářská zvířata, tedy pro konverzi na funkční živočišné proteiny v mléce, ve vejcích a mase. Proces je ve své podstatě neefektivní. Řada autorů uvádí hodnoty konverze rostlinného proteinu v podobě objemových krmných směsí nižší než 15 %, celých 85 % je v přeměně nevyužito (Day, 2013; Aiking, 2011; Pimentel & Pimentel, 2003).

Živočišná výroba, ve srovnání s rostlinnou a tedy i tvorba potravin založených na živočišných proteinech (maso, vejce, mléko) je spojena s nepřiměřenou zátěží životního prostředí (de Boer & Aiking, 2011). Příkladem je spotřeba vody na množství vyprodukovaného proteinu, která je ve srovnání až stokrát nižší pro produkci rostlinných proteinů (Pimentel & Pimentel, 2003).

Zajištění dostatku kvalitních potravin je vzhledem k neustále rostoucí populaci velkou výzvou pro zemědělství a potravinářský průmysl. Pro udržení dostatečného množství potravy je nutná menší závislost na potravinách živočišného původu a tedy lepší využití potravin vyrobených z rostlinných zdrojů. Příkladem je zrychlující se vývoj v oblasti analogů masných výrobků. Nejslibnějšími alternativami se zdají být produkty na bázi proteinů ze sóji nebo hrachu. Náhračky masa a mléčných výrobků mohou přinést srovnatelnou kvalitu za nižší náklady při splnění priorit jako je snížení emisí skleníkových plynů a omezení ničení lesních ploch v souvislosti s výrobou potravin (Day, 2013; Dijkstra et al., 2003). Zároveň mohou splňovat kvalitativní požadavky na ochranu lidského zdraví - správná kombinace rostlinných bílkovin může zajistit přísun dostatečného množství nezbytných aminokyselin (Day, 2013).

Většina rostlinných proteinů je uložena v semenech rostlin, které kumulují většinu dusíkatých zdrojů. Z pohledu lidské rostlinné výživy, příjmu rostlinných proteinů, hrají nejvýznamnější roli skupiny obilovin a luštěnin, včetně rostlin

pěstovaných pro výrobu olejů, kdy jsou proteiny obsažené v produktech jako je mouka (obiloviny) a meziproduktech vzniklých při extrakci olejů (Day, 2013).

Využití rostlinných proteinů pro výrobu potravin je stále nízké a Day (2013) ve své práci definoval řadu důvodů.

- Nízká nutriční hodnota některých bílkovin rostlinného původu oproti bílkovinám živočišného, je dána především jednoduchostí zastoupení aminokyselin.
- Obtížné zlepšování fyzikálních funkčních vlastností v důsledku molekulové hmotnosti a velikosti rostlinných bílkovin a s tím spjatá malá rozpustnost rostlinných proteinů ve vodě
- Ekonomické náklady spojené s izolací proteinů

2.2 Funkční vlastnosti proteinů

Proteiny jsou základní strukturní a funkční elementy v řadě potravinářských systému a jejich využití je závislé na fyzikálně-chemických vlastnostech, které lze společně označit jako funkční vlastnosti. Funkční vlastnosti ovlivňují chování proteinů uvnitř systému a tedy i jejich interakce s ostatními složkami jako je voda, sacharidy, nebo tuky. Pro aplikaci proteinů v potravinářství je klíčová jejich chemická struktura (zastoupení polárních aminokyselin v primárním řetězci, molekulová hmotnost proteinu, tvar molekuly (konformace), distribuce náboje (isoelektrický bod), která určuje klíčové funkční vlastnosti jako rozpustnost bílkovin v prostředí a s tím spjatou retenční vodní kapacitu, interakce proteinů s tuky, pění, gelovatění a emulgaci (Zayas, 1997). Jinak řečeno, funkční vlastnosti představují souhrn interakcí mezi konformací, strukturou, složením a fyzikálně-chemickými vlastnostmi proteinu, který je ovlivněn řadou dalších složek systému a vnějšími faktory (Mirmoghtadaie et al., 2016). Proteiny mají v potravinářských systémech řadu funkcí, jejich přehled je uveden v tabulce č. 1.

Tab. č. 1 – Přehled funkčních vlastností proteinů v potravinářských systémech (Převzato a upraveno podle Hettiarachchy, 2012).

Funkční vlastnost	Způsob účinku	Využití v: (potravině)
rozpustnost	solvatace proteinu	nápoje, polévky
absorpce vody	tvorba vodíkových vazeb	maso, pečené produkty
viskozita	zahušťování, tvorba vodíkových vazeb	polévky, omáčky, salátové dresinky
tvorba gelů	vlákna proteinu vytvářejí matici	maso, tvaroh, želatina
adheze (přilnavost)	protein jako pojídlo	maso, pečené výrobky, těstoviny
elasticita	deformace (př. rozrušení disulfidických můstků)	maso, pečené výrobky
plasticita	deformace (př. rozrušení vodíkových vazeb)	těsta z pšeničné mouky
emulgace	redukce na rozhraní vody a tuků	zmrzlina, salámy
adsorpce tuků	proteiny vážou volné tuky	maso, salámy, koblihy, kreky
vazba příchutí	adsorpce, uvolnění, zachycení	náhražky masa, pečené produkty, mikroenkapsulace chutí
tvorba pěn	formace filmu na rozhraní pevné a tekuté fáze, zachycení plynu	šlehané polevy, dorty, zmrzlina, proteinové nápoje
enzymatická katalýza	syntéza nebo degradace chemických sloučenin	sýry - příchut'
formování vláken	formování vláken po denaturaci proteinů	náhražky masa (tofu), extrudované cereálie
barva	Maillardova reakce (neenzymatické hnědnutí)	pečené výrobky, smažené výrobky atd.
příchuť	proteolýza	umělá příchuť (př. čokoládová příchuť)

2.2.1 Rozpustnost proteinů

Rozpustnost je termodynamický parametr definovaný jako koncentrace proteinu v nasyceném roztoku, která je v rovnovážném stavu vůči pevné fázi (krystalické, amorfní fázi) ve specifických podmínkách (Karmer et al., 2012).

Na základě rozpustnosti proteinů v různých roztocích, lze proteiny rozdělit do následujících frakcí (Horax et al., 2010).

- Albuminy - proteiny rozpustné ve vodě
- Globuliny - proteiny rozpustné v roztocích solí
- Prolaminy - proteiny rozpustné v koncentrovaných roztocích alkoholu
- Gluteliny - proteiny rozpustné v roztocích zásad

Toto rozdělení není zcela jednoznačné, jelikož mezi skupinami proteinů neexistují jasné hranice (Kalač, 2001).

Již bylo předesláno, že rozpustnost je nejdůležitější funkční vlastnost proteinů a je ovlivněna mnoha faktory, které lze rozdělit na vnitřní a vnější. Jedním z vnitřních faktorů je samotné složení aminokyselin (obsah polárních a nepolárních skupin ve struktuře proteinu) a jejich sekvence v primární struktuře proteinu. Dalšími vnitřními faktory jsou molekulová hmotnost celého proteinu a konformace proteinu, která zahrnuje hydrofobní a hydrofilní vlastnosti molekuly. Vnějšími faktory které mají vliv na rozpustnost určitého proteinu je pH, typ rozpouštědla, iontová síla, teplota a stav proteinu po jeho produkci (Zayas, 1997). Na rozpustnosti určitého proteinu jsou závislé i další procesy.

2.2.2 Emulgační vlastnosti

Emulze vznikají smísením dvou nebo více navzájem nesmíselných kapalin. Jedna z tekutin je ve druhé rozptýlena v podobě malých kapek o velikosti mezi 0,1 – 100 nm. Typickým příkladem emulze v potravinářském průmyslu je směs oleje (O) ve vodě (W) - mléko, různé krémy, dresinky majonéza, nebo polévky. Nebo disperze vody (W) v oleji (O) – máslo, margarín. Objevují se i dokonalejší systémy vícenásobných emulzí (W/O/W, O/W/O). Emulze jsou vytvářeny v přítomnosti dalších látek v systému, jejichž úkolem je stabilizace rozptýlené tekutiny. Emulgátory, jak se nazývají tyto látky, mají z chemického hlediska jak hydrofobní tak hydrofilní část molekuly a jsou funkčně uspořádány na rozhraní kapalin v emulzi,

kde vytvářejí elastický film a snižují povrchové napětí. Tímto způsobem stabilizují celý systém emulze po určitou dobu (Lam & Nickerson, 2013).

2.2.2.1 Stabilizace emulzí proteiny

Řada rostlinných proteinů může být využita v procesu emulgace. Oproti menším molekulám (např. estery glycerolu), které jsou v procesu využívány, mají tyto biologické makromolekuly menší emulgační kapacitu (tj. množství proteinu, které je nutné k udržení určitého množství oleje). Zároveň je často potřeba vystavit proteiny částečné tepelné denaturaci, tak aby byl povrch olejové kapky obalen hydrofobními aminokyselinami a do vodné fáze emulze směřovaly hydrofilní řetězce aminokyselin, což je v nativním stavu, kdy je protein do určité míry sbalen, nemožné. Výhodou je, že na povrchu olejových kapek je při využití větších makromolekul, proteinů, vytvořen silný viskoelastický film, který odolává mechanickému působení. V závislosti na použitém rozpouštědle film poskytuje elektrostatickou stabilitu, v závislosti na použitém proteinu stabilitu sterickou (Lam & Nickerson, 2013).

Protein, bariéra kolem olejové kapky, snižuje rychlost agregace olejové fáze prostřednictvím svého elektrostatického náboje a vytvořením prostorové bariéry mezi oběma fázemi. Z toho důvodu jsou proteiny jako emulgátory nejvíce stabilní v prostředí, které podporuje elektrostatické odpuzující síly, jako podmínky o odlišném pH než je izoelektrický bod proteinu, nebo nízká iontová síla prostředí (Karaca et al., 2015).

Proces emulgace je ovlivněn řadou fyzikálněchemických vlastností proteinů. Povrchová hydrofobicita proteinů souvisí s relativním zastoupením hydrofobních skupin vystavených na povrch molekuly proteinu, kde větší množství těchto skupin umožňuje větší adsorpci na olejovou fázi, tedy vyšší emulgační kapacitu (Karaca et al., 2015, Sikorski, 2001).

Velikost molekuly proteinu ovlivňuje rychlost, jakou se protein stabilizuje na rozhraní fází během tvorby emulze. Malé proteiny mají vyšší rychlost difúze a dostanou se během tvorby emulze na rozhraní olejové kapky a vody dříve, než proteiny, jejichž molekuly jsou větší. Výhodou emulgátorů s velkými molekulami je, že vytváří silnější film na povrchu fází, který poskytuje větší ochranu (Karaca et al., 2015, Sikorski, 2001).

Rozpustnost proteinu ovlivňuje rychlost jeho migrace na rozhraní jednotlivých fází emulze. Je ovlivněna typem rozpouštědla, jeho pH a iontovou silou. Tyto faktory mají vliv i na velikost přitažlivých a naopak odpudivých sil mezi kapkami v emulzi a zapříčiňují celkovou stabilitu, nebo nestabilitu systému (Karaca et al., 2015, Sikorski, 2001).

2.2.2.2 Emulgace masových produktů rostlinnými proteiny

V procesu emulgace masových produktů jsou celosvětově nejvíce uplatněny rostlinné proteiny. Rostlinné proteiny v masových produktech zadržují vlhkost, emulgují tuky a díky nim mají výrobky celistvý vzhled.

Nejvíce využívanými proteiny pro emulgaci masových výrobků jsou sójové proteiny ve formě ISP (sójový proteinový izolát). Hydratovaný sójový protein je typicky využíván k nahrazení až 15 % libového masa ve výrobě masových systémů. Sójový proteinový izolát má vysokou rozpustnost a dobré vlastnosti pro tvorbu gelů.

V Evropě je stejným způsobem využíván i hrachový protein. Jeho využití se zvýšilo zejména se zavedením geneticky modifikované sóji a postojem EU k jejímu využití.

Dalším proteinem, který je využíván v masových výrobcích, je pšeničný protein. Jeho využití není příliš rozšířené, používá se především v severní Americe, Austrálii a na Novém Zélandu. Existují různé typy pšeničných proteinových výrobků používajících se ve výrobě masných produktů, jako je pšeničná mouka, vitální směsi pšeničného glutenu (lepku), vitální pšeničný lepek a modifikované pšeničné proteiny. Nejlepší emulgační vlastnosti má modifikovaný pšeničný protein, ale má i své nevýhody. V systému do systému přináší strukturní problémy – výrobek špatně drží tvar. Naopak pšeničná mouka zajišťuje celistvost výrobků, ale nemá tak dobré emulgační vlastnosti (Egbert & Payne, 2009).

Emulgačními vlastnostmi čočkových a cizrnových proteinů se zabýval A. C. Karaca a jeho kolegové. Optimalizovali podmínky využití těchto proteinů pro přípravu emulzí s dobrými vlastnostmi.

2.2.3 Tvorba pěn – pění

Hlavním rozdílem mezi systémem emulze a pěny je zastoupení jednotlivých fází. Při procesu pění je plynná fáze mikroenkapsulována za využití surfaktantů a rozšířena po fázi tekuté. V potravinářství se procesu pění využívá při přípravě šlehaných polev, zmrzlin, dortů a nespočet dalších výrobků. Pěny jsou tedy koloidní systémy obsahující bubliny plynu rozptýlené ve vodné fázi. V závislosti na objemu plynné fáze mají bubliny sférický nebo mnohostěnný tvar (Sikorski, 2001).

Faktory, které ovlivňují stabilitu pěn, jsou velice podobné faktorům, které ovlivňují stabilitu emulzí. Ovšem existují určité rozdíly mezi oběma systémy. Na rozhraní plynné a tekuté fáze pěny je oproti rozhraní fází v emulzi mnohem větší fázové napětí a interakce proteinu v mezifázovém regionu jsou jiné (Sikorski, 2001). Stabilitu a tvorbu pěny ovlivňují především faktory jako povrchové napětí, viskozita a charakter filmu vytvořeného na povrchu tekuté fáze. Celý systém (pěna) je stabilní při nízkém povrchovém napětí a vysoké viskozitě filmu, jehož tvorba, popsaná jako adsorbční efekt, je závislá na koncentraci proteinu v roztoku a jeho schopnosti denaturace a precipitace na rozhraní fází (Cherry & McWatters, 2009).

Schopnost proteinů vytvářet pěnu je popsána dvěma faktory - pěnivou silou a stabilitou pěny. Síla pěnivosti je měřena jako zvětšení objemu pěny při zavádění plynné fáze do roztoku proteinu. Stabilita pěny je stanovována jako míra úniku tekuté fáze z pěny, nebo jako míra snížení objemu pěny za jednotku času. I přes jasné stanovení těchto faktorů je velice obtížné porovnání jednotlivých proteinů (surfaktantů), jelikož celý systém je ovlivněn řadou dalších faktorů - pH, teplota, metodika tvorby pěny (Kato et al., 2009).

Kato a jeho kolektiv (2009) popsal ve svém článku jednoduchou metodu pro charakterizaci pěnivých vlastností proteinů, která je založena na vodivosti pěny měřené na skleněné koloně s vodivým článkem.

2.2.4 Koagulace a tvorba gelů

Další důležitou funkční vlastnost proteinů, tvorbu gelů, popsal J. D. Culbertson (2005). Gel je trojrozměrná síť tvořená tekutou složkou a navzájem propojenými molekulami proteinů. Ve struktuře proteinů je zachycena tekutina a další složky. V potravinářství jsou na základě procesu gelovatění vytvářeny produkty jako jsou sýry, jogurty a mnoho dalších. Ve struktuře gelů je zadrženo velké množství vody (95 – 98 %) a i přesto si zachovávají charakter pevných látek.

Gely jsou vytvářeny procesem zahřívání a v potravinářství rozlišujeme dva typy gelů. Prvním typem jsou gely, jejichž struktura je po dalším zahřátí zachována (irreverzibilní gely). U druhého typu gelů dochází po zahřátí k rozpadnutí struktury a navrácení tekuté formy (Culbertson, 2005).

2.3 Modifikace proteinů a zlepšování funkčních vlastností

Jednou z cest jak zlepšit funkční vlastnosti proteinů, je jejich modifikace chemickým, fyzikálním, nebo enzymatickým procesem. Ve většině případů jde jednoduše o zlepšení rozpustnosti proteinu, která ovlivňuje všechny další funkční možnosti proteinu (Culbertson, 2005).

Funkční vlastnosti proteinů jsou obecně citlivé na změny ve struktuře molekuly proteinu, její velikost, konformaci a míru rozložení iontového náboje na povrchu molekuly. Proteiny mohou být upraveny enzymaticky, nebo jinými metodami jako je teplotní denaturace, ionizace, chemická úprava a další, tak aby došlo ke zlepšení jejich funkčních vlastností.

2.3.1 Enzymová hydrolýza

Enzymová hydrolýza je důležitý nástroj pro zlepšování fyzikálních, chemických, funkčních a nutričních vlastností proteinů a zároveň je účinnou metodou pro tvorbu biogenních (aktivních) peptidů, které nesou řadu zajímavých fyziologických vlastností. Aktivní peptidy interagují s minerálními látkami, mají opioidní aktivitu, pozitivně ovlivňují růst bakterií trávicího traktu, mají význam při regulaci vysokého krevního tlaku, nebo regulaci imunitního systému a bojují proti rakovinnému bujení (Wei & Zhimin, 2006).

Oproti chemické hydrolýze, kde se využívá extrémních teplot a hodnot pH požadovaných pro proběhnutí reakce, nedochází v procesu enzymatické hydrolýzy

k destrukci jednotlivých aminokyselin a výživové vlastnosti proteinových hydrolyzátů jsou do jisté míry zachovány (McCarthy et al., 2013).

Produkty enzymatické hydrolýzy, hydrolyzáty, mohou být rozděleny na základě jejich velikosti na dvě kategorie. První kategorií jsou produkty s vysokým obsahem aminokyselin, druhou kategorií tvoří produkty s nízkým obsahem aminokyselin, tzv. bioaktivní peptidy. Bioaktivní, nutričně prospěšné peptidy jsou v rámci struktury celého proteinu v procesu jejich trávení neaktivní, ale po vyštěpení ze struktury proteinu se stávají aktivními (McCarthy et al., 2013).

Snížená velikost enzymových hydrolyzátů v důsledku hydrolýzy peptidových vazeb a tím pádem zvýšený počet snáze ionizovatelných skupin (- NH₄⁺, - COOH⁻) mají vliv na zvýšení jejich rozpustnosti a tedy i na jejich další aplikace (Miedzianka et al., 2014).

2.3.1.1 Kontrola procesu enzymové hydrolýzy

Za účelem získání žádoucích organoleptických vlastností hydrolyzátů, musí být proces hydrolýzy kontrolován, tak aby bylo možné stanovit optimální stupeň hydrolýzy (DH). Stupeň hydrolýzy je obecně definován jako procentuální podíl rozštěpených vazeb uvnitř molekuly hydrolyzovaného proteinu (Nissen, 1997).

$$DH = h/h_{tot} * 100$$

h_{tot} = celkový počet peptidických vazeb v ekvivalentním proteinu (v závislosti na obsahu a složení aminokyselin v čistém proteinu)

h = počet hydrolyzovaných vazeb

V literatuře je popsána řada metod pro stanovení stupně hydrolýzy. Například pH – statická technika kontroluje stupeň hydrolýzy na základě udržování konstantního pH během procesu. Konstantní pH je udržováno přidáváním zásady, nebo kyseliny v závislosti na pH prostředí, ve kterém hydrolýza probíhá. Množství přidané zásady (kyseliny) indikuje stupeň hydrolýzy. V praxi je metoda limitovaná vyššími hodnotami pH (Nielsen et al., 2001).

Osmometrická metoda je založena na měření změny bodu tuhnutí směsi. Změny této hodnoty, korelují se stupněm hydrolýzy (DH). Osmometrie je rychlá

metoda. Její použití je omezeno pouze u velice viskózních roztoků, nebo roztoků s vysokou koncentrací rozpuštěných látek (Nielsen et al., 2001).

Metoda TNBS je založena na reakci TNBS (trinitrobenzensulfonová kyselina) s aminokyselinami. Tato reakce je měřena spektrofotometricky a stupeň DH je stanoven v závislosti na kolorimetrickém zabarvení roztoku (Nissen, 1997).

P. M. Nielsen a jeho kolektiv (2001) vytvořili novou metodu pro stanovení DH. Metoda je v principu podobná metodě, která využívá TNBS. Rozdílem je využití optaldialdehydu (OPA), který rovněž reaguje s jednotlivými aminokyselinami. OPSA je na rozdíl od OPA nestabilní a k prostředí nešetná chemikálie.

2.3.1.2 Částečná enzymová hydrolýza

Hydrolyzáty proteinů mohou být zahrnuty do dvou základních skupin, které se navzájem liší stupněm hydrolýzy peptidových vazeb (viz. Kap. X). Proteiny u kterých došlo působením enzymu k rozštěpení méně než 10 % peptidových vazeb ve struktuře, jsou označovány jako částečné hydrolyzáty. Takto připravené hydrolyzáty se vyznačují zlepšenými funkčními vlastnostmi (rozpustnost, emulgace, tvorba pěn). Naopak intenzivně štěpené proteiny, kde došlo k rozštěpení více jak 10 % peptidových vazeb, můžeme označit jako úplné hydrolyzáty vyznačující se především dobrými nutričními vlastnostmi, ale co je důležité špatnými funkčními vlastnostmi (Baráč et al., 2011).

2.3.2 Proteolytické enzymy

Proteolytické enzymy, které jsou využívány v procesu enzymatické hydrolýzy, jsou obecně nazývány jako endopeptidázy. Štěpí peptidovou vazbu mezi dvěma sousedícími aminokyselinami v primárním řetězci proteinu za vzniku kratších řetězců, peptidů. Proces štěpení je ovlivněn specifitou enzymu využitého v procesu, rozsahem denaturace štěpeného proteinu, koncentrací enzymu a substrátu v reakci, dále pH a iontovou silou prostředí reakce. Celý proces ovlivňuje i jeho teplota a přítomnost inhibičních látek (Panyam & Kilara, 1996). Stejně jako proces štěpení, tak i funkční vlastnosti proteinových hydrolyzátů, jsou ovlivněny výše uvedenými faktory (Martínez et al., 1997).

Všechny proteolytické enzymy hydrolyzující peptidickou vazbu ve struktuře proteinů, jsou běžně popisovány několika názvy jako proteázy, proteinázy, nebo peptidázy. Historicky mají tyto termíny mírně odlišný význam, ale dnes jsou tyto rozdíly zapomenuté, a výrazy jsou autory používány jako synonyma. Jako všeobecný termín pro všechny enzymy, které štěpí peptidovou vazbu, byl společností NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) doporučen termín peptidázy a autoři podporují jejich rozhodnutí (Barrett et al., 2004).

2.3.2.1 Klasifikace proteolytických enzymů

V současné době jsou proteázy zařazovány do kategorie na základě tří hlavních kritérií. Prvním kritériem je typ reakce, kterou katalyzují, druhým chemická povaha katalytického místa enzymu a posledním kritériem jsou evoluční vztahy mezi strukturami katalytických míst.

Nejjednodušeji lze skupinu peptidáz rozdělit na endopeptidázy a exopeptidázy a to v závislosti na místě působení. Exopeptidázy, jak již název napovídá, štěpí peptidické vazby od konce proteinového řetězce (N – konec / C – konec) a analogicky je lze označit jako karboxypeptidázy, nebo aminopeptidázy. Naopak endopeptidázy štěpí peptidové vazby uprostřed řetězce, tedy vazby vzdálené od konců (Rao et al., 1998).

Na základě charakteru funkčních skupin v aktivním místě je možné proteázy rozdělit do 4 skupin:

- Serinové proteázy
- Aspartátové proteázy
- Cysteinové proteázy
- Metalloproteázy

Klasifikace některých proteáz výše popsaným způsobem, je v některých případech obtížná. Příkladem je enzym ATP-dependentní proteáza, který vyžaduje aktivitu ATP.

Na základě sekvenční podobnosti jsou proteázy rozděleny do různých rodin. V rámci jednotlivých rodin jsou dále klasifikovány do podskupin nazývaných jako klany, v nichž jsou shromážděny proteázy na základě evoluce. Každá rodina je

označena velkým písmenem, které odpovídá typu katalytické reakce: S – serinové proteázy, C – cysteinové proteázy, A – asparaginové proteázy, M – metallopeptidázy, U – neznámý typ (Rao et al., 1998).

Pro štěpení proteinů se využívají proteázy získané ze zvířecích, rostlinných, nebo houbových a bakteriálních producentů. Z živočišných tkání jsou izolovány nejčastěji enzymy rennin, trypsin, chymotrypsin a pepsin. Z rostlinných pletiv se provádí izolace papainu a bromelainu a keratinázy. Posledním a velice významným zdroje proteáz jsou mikrobiální organismy - houby, bakterie a viry (Rao et al., 1998).

2.3.2.2 Mikrobiální peptidázy

Mikrobiální proteázy jsou jednou z nejvýznamnějších skupin hydrolytických enzymů. Mikroorganismy, jejich producenti, vytváří velkou řadu intercelulárních a extracelulárních proteáz. V jejich buňkách jsou intercelulární proteázy důležité pro různé metabolické procesy uvnitř buněk, jako je sporulace, diferenciací, dozrávání hormonálních látek a dalších. Extracelulární proteázy jsou pro buňky mikroorganismů důležité z pohledu výživy. Jsou vylučovány do okolního prostředí a umožňují příjem proteinů v podobě hydrolyzátů. Proteázy produkované mikroorganismy je možné klasifikovat do různých skupin podle jejich aktivity v neutrálním, zásaditém, nebo kyselém prostředí a také podle povahy skupin v aktivním místě enzymu. V tomto případě, analogicky se základním rozdělením všech proteáz, na metalloproteázy, aspartátové proteázy, cysteinové/sulfhydrylové proteázy a serinové proteázy (Gupta et al., 2002).

2.3.2.2.1 Bakteriální proteázy

Největším producentem komerčně dostupných proteáz, zejména neutrálních a alkalických enzymů, jsou bakterie rodu *Bacillus* (Rao et al 1998).

Bakteriální neutrální proteázy jsou aktivní v prostředí pH 5 – 8 a jsou relativně málo termotolerantní. Jejich reakční rychlost je nižší, než reakční rychlost ekvivalentů produkovaných živočišnými producenty a díky tomu se v procesu hydrolýzy produkuje méně hořkosti v produktech, která je výsledkem vystavení množství hydrofobních skupin na povrch hydrolyzátů. Tato vlastnost je cenná při jejich použití v potravinářství. Další výhodou neutrálních proteáz je jejich necitlivost k přírodním rostlinným inhibitorům proteáz a díky tomu se využívají v pivovarnictví. Na základě charakteru aktivního místa enzymu, jsou některé neutrální proteázy

zařazené do skupiny metalloproteáz a pro svou funkci vyžadují přítomnost dvojmocných kovových iontů (Rao et al., 1998).

Alkalické bakteriální proteázy jsou aktivní v zásaditém prostředí a mají širokou substrátovou specifitu. Optimální teplota pro funkci enzymu je kolem 60 °C. Využívají se ve výrobě čisticích prostředků. Funkce serinových alkalických proteáz je inhibována působením diisopropylfluorofosfátu (DFP) a inhibitory obsaženými v bramborách. Nejznámější alkalickou serinovou proteázou je subtilisin produkovaný bakteriemi rodu *Bacillus*, další proteázy tohoto typu jsou produkovány bakteriemi rodu *Arthrobacter*, *Streptomyces* a *Flavobacterium* (Rao et al., 1998).

Subtilisin, je produkován bakteriemi rodu *Bacillus*, konkrétně druhy *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquifaciens* a *B. licheniformis*. Bakterie tento enzym produkuje extracelulárně, tj. vypouštějí enzym do prostředí za účelem zachycení živin. Tento typ proteáz je specifický pro aromatické, nebo hydrofobní zbytky aminokyselin jako je tyrosin, fenylalanin a leucin. Subtilisin je citlivý vůči působení fenylmethylsulfonylfluoridu, diisopropylfluorofosfátu a bílkovinným inhibitorům bramboru. Jejich molekulární hmotnost se pohybuje mezi 15 – 30 kDa a nejaktivnější jsou při pH 10. Izoelektrický bod subtilisinu je blízko hodnoty 9 (Gupta et al., 2002).

2.3.2.2.2 Houbové proteázy

Vysoký zájem o houbové producenty mikrobiálních proteáz je především z důvodu jejich vysoké rozmanitosti, široké substrátové specifity a jejich stability za extrémních podmínek prostředí. Nespornou výhodou je jednoduchá kultivace houbových producentů v pevné fázi fermentace a jednoduchá separace mycelia a kultivačního média filtrací. Houboví producenti produkuje širokou škálu enzymů. Proteázy produkováné houbami jsou aktivní v širokém rozmezí pH (pH 4 – 11). Příkladem rozmanitosti produkce enzymů je houba *Aspergillus oryzae*, která produkuje různé druhy proteáz, které jsou aktivní v prostředí o odlišných hodnotách pH (kyselé, neutrální, alkalické proteázy). Oproti bakteriálním proteázám mají houbové proteázy nižší reakční rychlost a horší teplotní toleranci (Rao et al 1998).

Z houbových producentů bylo izolováno několik aspartátových proteáz, které byly dále charakterizovány jako proteázy reninového typu a pepsinového typu. Podle producenta *Endothia parasitica* jsou proteázy reninového typu nazývány také jako endothiapepsin a jeho dalšími producenty jsou houby rodu *Mucor* a *Rhizomucor*.

Molekulová hmotnost těchto enzymů se pohybuje mezi 30 – 45 kDa a aktivní místo obsahuje jeden, nebo dva konzervované aspartátové zbytky. Optimální pH pro jejich funkci se pohybuje mezi pH 3 – 5 a jejich funkce je specificky inhibována papstatinem A. Díky výše popsaným vlastnostem jsou tyto enzymy využívány v potravinářství, konkrétně jako syřidla při výrobě sýrů (Hsiao et al., 2014).

2.3.2.3 Enzymy v potravinářství – legislativa

V roce 2008 vydala Evropská unie nové nařízení (1332/2008), kterým stanovuje jednotný systém používání a označování enzymů v potravinách. V rámci tohoto nařízení budou enzymy zařazeny na pozitivní seznam společenství, kde bude uvedeno označení enzymu, specifikace enzymu (zvláštnost původu), čistota, druhy potravin do nichž může být enzym aplikován, podmínky jeho použití a případné omezení přímého prodeje enzymového přípravku. Jednotlivé enzymy budou posuzovány úřadem EFSA - *European Food Safety Authority* (Suková, 2009).

Od roku 2011 dochází ke sběru dat, kdy každý výrobce nebo uživatel enzymu či enzymatického přípravku by měl sám požádat o povolení takového přípravku. Povolení určitého enzymu či enzymatického přípravku je tak záležitostí každého konkrétního subjektu, který má zájem na tom, aby se takový přípravek dostal na seznam povolených látek (anonym₂).

2.3.3 Vlastnosti proteinových hydrolyzátů

Proteinové hydrolyzáty byly definovány jako směsi polypeptidů, oligopeptidů a aminokyselin, vyrobené v procesu částečné hydrolýzy. Bylo prokázáno, že peptidy s krátkým řetězcem, vzniklé z proteinů, mají vyšší nutriční hodnoty a mohou být efektivněji využity, než odpovídající směsi volných aminokyselin. Díky těmto vlastnostem je lze označit jako bioaktivní peptidy. Dále byly prokázány změny funkčních vlastností produktů enzymatické hydrolýzy (McCarthy et al., 2013).

2.3.3.1 Antioxidační aktivita rostlinných hydrolyzátů

Antioxidanty jsou definovány jako látky, které omezují aktivitu kyslíkových radikálů. Skrze interakce molekul antioxidantů s radikály dochází ke snížení nebo úplnému zastavení jejich aktivity (anonym₁).

Výsledky mnoha studií potvrdily antioxidační aktivitu rostlinných proteinových hydrolyzátů, tedy peptidů, které v průběhu hydrolýzy vznikají. Tyto hydrolyzáty mohou být využity jako přírodní zdroje antioxidantů v potravinách prodlužující trvanlivost potravin. Antioxidační vlastnosti hydrolyzátů jsou závislé na celé řadě faktorů včetně rostlinného proteinu a enzymu využitých pro jejich přípravu. Schopnost peptidů (hydrolyzátů) zabránit nežádoucím změnám v průběhu oxidace složek potravin je závislá i na jejich aminokyselinovém složení, konkrétně na přítomnosti určitých aminokyselinových zbytků v jejich sekvenci. Zásadní roli ve spojitosti s antioxidační aktivitou těchto peptidů hrají aminokyseliny tyrosin, histidin, metionin a tryptofan (Amarowicz, 2008).

Antioxidační aktivita (AA) hydrolyzátů byla zkoumána v řadě případů. Antioxidační aktivitu sójových proteinových hydrolyzátů zkoumali Peñta-Ramos a Xiong (2002). Sójový protein podrobili hydrolýze třemi čistými biochemickými typy peptidáz (pepsin, papain a chymotrypsin) a třemi typy komerčně dostupných enzymů (Alcalase®, Protamex™, Flavourzyme™). Antioxidační aktivita jednotlivých hydrolyzátů byla stanovena jako koncentrace TBARS (kyselina thiobarbiturová). Nejvyšší inhibiční efekt oxidace lipidů vykazovali hydrolyzáty chymotrypsinu a Flavourzymu.

2.3.3.2 Antihypersenzitivní vlastnosti rostlinných hydrolyzátů

Medikamentózní léčba vysokého tlaku je založena na působení inhibitorů angiotensin konvertujícího enzymu. V současné době je velký zájem o nové látky, které mohou inhibovat funkci této konvertázy. Bylo prokázáno, že některé metabolity bioaktivních peptidů mohou být metabolizovány trávicími enzymy za vzniku inhibitorů tohoto enzymu. Prokazatelný efekt byl sledován u hydrolyzátů pohankových proteinů, proteinů slunečnicových semen, špenátu a dalších (McCarthy et al., 2013).

2.3.3.3 Hydrolyzáty a jejich funkční vlastnosti

Enzymatická hydrolyza proteinů je jednou z možností, jak měnit funkční vlastnosti proteinů. Po štěpení se projevuje zvýšená rozpustnost hydrolyzátů a s tím spojené změny dalších funkčních vlastností jako je emulgace a tvorba gelů.

Erkan Yalcin a S. Celik zkoumali rozpustnost ječmenného proteinu v podobě ječmenné mouky, ječmenného proteinového izolátu a také ječmenného proteinového hydrolyzátu v závislosti na pH a iontové síle prostředí. Pro hydrolyzu ječmenného proteinového izolátu využili enzym alkalasa a vytvořili hydrolyzáty o různém stupni hydrolyzy (3%, 6%). Zjistili, že rozpustnost proteinů i proteinových ječmenných hydrolyzátů, je ovlivněna hodnotami pH a iontovou silou roztoku ve všech případech. Také bylo zjištěno, že rozpustnost ječmenných hydrolyzátů oproti rozpustnosti ječmenných proteinů se v prostředí o hodnotách okolo izoelektrického bodu zvýšila a to právě díky omezené hydrolyze.

Wu a jeho spolupracovníci se zabývali funkčními vlastnostmi hydrolyzátů, získaných štěpením sójových proteinů enzymem papain. Hydrolyzáty dále rozdělili na jednotlivé frakce ultracentrifugací. U peptidové frakce, stejně jako u celého hydrolyzátu a pro srovnání i u kontrolního nemodifikovaného proteinu stanovili hodnoty povrchové hydrofobicity (S_0), rozpustnost (PS), index emulgační aktivity (EAI) a index emulgační stability (ESI). U sójových hydrolyzátů zaznamenali významné zvýšení S_0 , PS, EAI a ESI. Peptidová frakce měla ve srovnání s hydrolyzáty vyšší rozpustnost, a index emulgační aktivity, ale naopak nižší povrchovou hydrofobicitu. Jinak řečeno, tyto peptidy měli lepší emulgační vlastnosti, nižší molekulovou hmotnost a lepší rozpustnost, než celkové hydrolyzáty a intaktní sójový protein.

Barac (2001) a jeho kolegové podrobili hrachový proteinový izolát enzymatické hydrolyze za využití enzymu chymosin v komerčně dostupné formě Maxiren. Sledovali efekt enzymatické hydrolyzy na rozpustnost a další funkční vlastnosti izolátu. Působením enzymu byly vytvořeny hydrolyzáty s nízkým stupněm hydrolyzy (3,9 – 4,7%) v odlišných pH podmínkách (3, 5, 7 a 8 pH). U hydrolyzátů byly sledovány zlepšené funkční vlastnosti (rozpustnost, emulgační aktivita, stabilizace pěn) zejména v pH 3 a 5.

X. Zao a I. Hou (2009) použili enzym neutrázu a trypsin pro částečnou hydrolýzu sójových proteinů. V podobě sójového proteinového izolátu (SPI) a sójového proteinového koncentráту. Pomocí SDS-PAGE charakterizovali velikost vzniklých hydrolyzátů. Vzhledem k rozdílné specifitě enzymů, peptidy připravené působením enzymu trypsin měly větší velikost, než peptidy připravené působením neutrázy. Dále stanovili index emulgační aktivity hydrolyzátů. Z jejich výsledků je zřejmé, že lepší emulgační schopnosti měli hydrolyzáty připravené trypsinem, tedy hydrolyzáty o větší molekulové hmotnosti.

2.4 Hlízové proteiny bramboru

Názory na klasifikaci bramborových proteinů nejsou jednotné. Ve dřívější literatuře bylo rozdělení bílkovin postaveno na základě rozpustnosti jednotlivých frakcí na globuliny, albuminy a prolaminy. Globulinová frakce brambor je označována jako tuberin, a albuminová frakce jako tuberinin. Jejich zastoupení je 70% a 30%, respektive. Dnešní autoři využívají rozdělení postaveného na základě velikostních charakteristik proteinů získaných zobrazovacími elektroforetickými technikami (Bárta & Bártová, 2007).

Bramborové proteiny jsou běžně rozdělovány do tří hlavních frakcí (Waglay et al 2014). Pots (1995) použil separační metodu k charakterizaci jednotlivých bílkovinných spekter bramborových proteinů a definoval jejich molekulové hmotnosti.

- Patatinová frakce (patatin) je složena z glykoproteinů o molekulové hmotnosti 43 kDa. a představuje 20 - 40 % všech extrahovatelných bílkovin bramboru (Waglay et al 2014, Bárta & Bártová, 2007).
- Frakce zahrnující inhibitory proteáz – Inhibitory proteáz tvoří 20 – 30 % bílkovin bramboru. Molekulární hmotnosti heterogenní skupiny bílkovin se pohybují mezi 8,1 – 25 kDa (Bárta & Bártová, 2007).
- Ostatní proteiny – Z celkového obsahu bílkovin představují ostatní bílkoviny 20 – 30%. Tyto proteiny jsou charakteristické vysokou molekulovou hmotností a do skupiny patří enzymy jako je syntáza škrobu, hlízový lektin, nebo fosforyláza (Bárta & Bártová, 2007).

2.4.1 Patatin

Patatin, také známý jako tuberin, je bramborový glykoprotein, který je nejvíce zastoupen v hlízách a stolonech bramboru, kde je uložen zejména ve vakuolách parenchymatických pletiv. Patatinový komplex tvoří zhruba 40 % rozpustných proteinů hlíz a je skupinou glykoproteinů o molekulové hmotnosti 40 – 45 kDa. Molekula patatinu je tvořena až 366 aminokyselinami a izoelektrický bod patatinu byl stanoven v pH 4.9 (Waglay & Karboune, 2016).

Ve struktuře molekuly patatinu jsou tři charakteristická glykosilační místa tvořená rezidui asparaginu umožňující vazbu molekul oligosacharidů na protein. V organismu jsou spojována s ochrannou proti proteolytickým enzymům, mezibuněčnými signály a udržováním proteinové stability pomocí tvorby krátkých lineárních struktur v molekule (Waglay & Karboune, 2016).

Struktura patatinu je ze 45 % tvořena strukturou β – řetězce a z 33 % strukturou α – helixu. K denaturaci patatinu dochází při teplotě 55 °C a vyše (Pots et al., 1998).

Patatin vykazuje antioxidační aktivitu a z pohledu funkčních vlastností má vynikající pěnové, želírovací a emulgační vlastnosti (Seo et al., 2014).

2.4.2 Inhibitory proteáz

Tuberinin je souhrnné označení pro velice diverzifikovanou skupinu inhibitorů proteáz. Z celkového množství bramborových proteinů tvoří, stejně jako patatin, 30 – 40 %. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje mezi 5 – 25 kDa. Jak název napovídá, inhibují proces působení některých proteáz (Waglay & Karboune 2016). Jednotlivé inhibitory jsou rozdělené na základě jejich molekulové hmotnosti, stavby molekuly, hodnoty izoelektrického bodu a počtu sulfidických můstků. Vlastnosti jednotlivých skupin inhibitorů proteáz, jejichž rozdělení provedli Pouvreau a jeho kolegové (2001) popsali Bárta a Bártová (2007) následovně.

1. **Bramborový inhibitor I (PI-1)** – Tento sérinový inhibitor proteáz je složen z pěti podjednotek o velikosti 7,7 - 7,9 kDa. Ve šťávě brambor představují asi 4,5 % ze všech přítomných bílkovin.
2. **Bramborový inhibitor II.** – Stejně jako PI-1 je PI-II sérinový inhibitor proteáz. Molekula je složena ze dvou podjednotek spojených disulfidickým

můstkem o velikosti 10,2 kDa. V bramborové šťávě bylo doposud označeno 7 isoformem, které dohromady zastupují 22 % z celkových bílkovin.

3. **Bramborový cysteinový inhibitor (PCP1)** – Skupina zahrnuje především inhibitory cysteinových proteáz jako je papain, svojí aktivitu mají i vůči trypsinu a chymotrypsinu. Ve šťávě odrůdy Elkana bylo nalezeno nejméně 9 různých inhibitorů lišící se svou molekulovou hmotností.
4. **Bramborový aspartátový inhibitor proteáz** – Ve šťávě odrůdy Elkana je přítomno 6 různých inhibitorů této skupiny a dohromady tvoří 6 % z celkových bílkovin. Molekulová hmotnost kolísá v rozmezí 19,9 – 22 kDa. Inhibují zejména proteázy cathepsinu D, ale vykazují i chymotrypsinovou a trypsinovou inhibiční aktivitu.
5. **Bramborové inhibitory proteáz Kunitzova typu** – Skupina zahrnuje dvě bílkoviny o molekulové hmotnosti 20,2 kDa. Skupina představuje 2 % z celkové chymotrypsinové a 3 % trypsinové inhibiční aktivity inhibitorů proteáz.
6. **Ostatní serinové inhibitory proteáz** – Skupina je tvořena dvěma zástupci o molekulové hmotnosti 21 kDa a 21,8 kDa. Z celkové chymotrypsinové aktivity inhibitorů tvoří 2 %, z trypsinové aktivity 3 %. Izoelektrický bod těchto bílkovin je v rozpětí 7,5 až 8,8.
7. **Bramborový karboxypeptidázový inhibitor proteáz** – Pouze jediná bílkovina této skupiny, jejíž molekulová hmotnost je 4,3 kDa, tvoří přibližně 1 % ze všech bílkovin šťávy bramboru. Inhibiční aktivitu vykazuje vůči proteáze – karboxypeptidáze A. Molekula je pozoruhodně tepelně odolná.

2.4.3 Ostatní bílkoviny hlíz bramboru

Do skupiny jsou zařazeny bílkoviny o vyšší molekulové hmotnosti (nad 45 kDa), jenž na základě jejich vlastností nelze zařadit ani do jediné skupiny předešlých bílkovin. Patří sem hlízový lektin, polyfenoloxidázy, protein kináza a enzymy účastnící se v syntéze škrobu (Bárta & Bártová, 2007).

2.5 Nutriční kvalita bramborových proteinů

Sušina bramborových hlíz obsahuje kolem 10 % proteinů. Na základě aminokyselinového složení je kvalita bramborových proteinů ze 70 % srovnatelná s kvalitou proteinů obsažených ve vejcích. Aminokyselinové složení je bohaté na lysin, ale některé sirmé aminokyseliny jako je methionin, nebo cystein jsou spíše v nedostatku. Za nutričně nejvýhodnější složku bílkovinného spektra je považován patatin. Index esenciálních aminokyselin (EAAI) patatinu je 86,1% (Bártová et al., 2015)

2.6 Produkce hlízových proteinů brambor

V současné době jsou bramborové proteiny součástí vedlejších produktů při průmyslové výrobě škrobu. Pro představu, při zpracování jedné tuny brambor určených pro produkci škrobu, je vyprodukováno 5 – 12 m³ bramborové šťávy, která obsahuje 300 – 410 g proteinů na jeden kilogram její sušiny. Z odpadního produktu, hlízové vody, jsou bramborové proteiny izolovány procesem tepelné koagulace a následně cestou kyselé precipitace. Vlivem tepelné koagulace dochází k vysokému stupni denaturace proteinů, což vede ke ztrátě jejich funkčních vlastností (Ralet & Guéguen, 2000).

2.6.1 Další možnosti separace proteinů

Volba metody separace proteinů v malém měřítku, ale i v průmyslovém (obrovském) měřítku závisí na konečném využití samotného proteinu. Šetrné metody jejich separace, díky nimž lze získat proteiny v nativním stavu, umožňují zachování funkčních vlastností proteinů, které rozhodují o jejich dalším využití například v potravinářství. Méně šetrné metody mohou být využité pro separaci proteinů určených ke zkrmování hospodářskými zvířaty (Løkra & Strætkevren, 2009).

Cena bramborových proteinů na trhu je závislá na jejich čistotě, kdy proteiny určené ke zkrmování mají mnohem nižší cenu, než proteiny určené k lidské výživě,

nebo pro farmaceutický průmysl. Cena jednoho kilogramu krmného proteinu se pohybuje mezi 0,5 – 1 US\$ a cena proteinu určeného pro potravinářství nebo farmacii mezi 8 – 10 US\$ (Løkra & Strætqvern, 2009).

Bramborové proteiny lze izolovat i jinými metodami, než je jejich precipitace kyselinami. Precipitace proteinu může být navozena i jinými činidly, Bárta a Bártová (2008) izolovali bramborové proteiny precipitací ethanolem.

Separace proteinu na membránách je běžný způsob separace pšeničného a sójového glutenu, ale pro separaci bramborových proteinů není metoda vhodná, vzhledem ke znečištění membrány množstvím vlákniny obsažené v bramborové šťávě. Další možností šetrné izolace proteinů jsou chromatografické metody (Løkra & Strætqvern, 2009).

Amanda Waglay a její kolegové (2014) zkoumali vliv koncentrace a typ precipitačního činidla na výnos a čistotu bramborového proteinového izolátu (PI). Celkovým cílem jejich práce bylo porovnat účinek několika extrakčních technik pro izolaci proteinů z brambor. Mezi sebou porovnávali následující techniky – kombinace tepelné a kyselé precipitace proteinů, kyselá precipitace proteinů, precipitace za využití FeCl_3 s MnCl_2 , precipitace ethanolem a precipitace za využití $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. U jednotlivých výše popsaným způsobem připravených PI (proteinových) izolátů porovnávali následující: Obsah proteinů, rozpustnost proteinů, spektra proteinů na SDS-PAGE a aktivitu inhibitorů proteáz v jednotlivých PI. Ve svojí práci rovněž charakterizovali efekt pH a teploty na rozpustnost PI.

Výsledky ukazují, že relativní rozpustnost proteinu získaného kombinací kyselé a tepelné koagulace je méně než 15%. Podle autora je nízká rozpustnost způsobena konformačními změnami, zasítováním a změnou elektrického náboje na povrchu částic a následně změnou izoelektrického bodu.

2.7 Funkční vlastnosti bramborových proteinů

Jak už bylo předesláno, nejvíce využívanou metodou pro separaci proteinů v průmyslu je jejich kyselá precipitace a následná tepelná koagulace (pH 3,5 – 5,5). Získaný tepelný koagulát je charakteristický vysokým obsahem proteinů (> 80 %), světlým zabarvením, nízkým obsahem popelovitých složek, nízkou rozpustností a sníženou schopností adsorpce vody, nebo oleje. Tyto vlastnosti jsou limitující pro jeho další využití v potravinářství a z toho důvodu je využíván především jako krmivo pro hospodářská zvířata (Miedzianka et al., 2012). Autor popsal rozpustnost tímto způsobem získaného PI v různých podmínkách pH.

Vzhledem k tepelnému působení v jednotlivých procesních krocích výroby PI jako je sušení, koncentrování PFJ (*potato fruit juice*), sterilizace PFJ, se autoři Bárta a Bártová (2008) rozhodli charakterizovat jednotlivé proteinové frakce na základě jejich zpětné rozpustnosti, jako vlastnosti, která může být přímo spojována se stupněm jejich denaturace. Jejich výsledky ukazují rozdíly v tepelné stabilitě jednotlivých složek bramborových proteinů. Patatin byl v jejich práci klasifikován jako termolabilní složka, kdy k jeho nerozpustnosti došlo při teplotách vyšších než 40 °C. O něco stabilnější se v jejich práci jevila skupina inhibitorů proteáz, ale už teploty nad 45 °C způsobily denuraci většiny inhibitorů. Jako teplotně nejstabilnější byl charakterizován karboxypeptidázový inhibitor o molekulové hmotnosti 4,3 kDa, který si zachoval zpětnou rozpustnost i při vystavení vysokým teplotám (nad 70 °C).

M. Ch. Ralet a J. Guéguen (2001) ve své práci porovnávali funkční vlastnosti hrubě rozdělených proteinových frakcí bramboru. Jednotlivé proteinové frakce bramboru separovali na základě jejich rozdílného náboje. Cílem jejich práce bylo uplatnit separační metodu v průmyslovém měřítku a vytvořit tak postup pro vytvoření PI obohacených o určité frakce. Nutností bylo porovnání funkčních vlastností jednotlivých frakcí i nedenaturovaných proteinů.

2.7.1 Enzymová hydrolýza bramborových proteinů

J. Miedzianka a její kolegové (2014) podrobili bramborový protein určený ke krmným účelům enzymové hydrolýze. Cílem jejich práce bylo zkoumat vliv prodloužené enzymatické hydrolýzy za využití proteázy alkaláza, na levný a snadno dostupný bramborový proteinový hydrolyzát s nežádoucími funkčními vlastnostmi.

Sledovali změny funkčních vlastností v důsledku vystavení proteinu enzymatické hydrolýze, jako je schopnost hydrolyzátu zadržovat vodu, nebo olej (vodní, olejová kapacita), index rozpustnosti hydrolyzátu (PSI) a jeho pěnové vlastnosti, dále analyzovali chemické složení hydrolyzátnů (aminokyselinový profil).

Pro hydrolýzu PPC (bramborový proteinový koncentrát) využili bakteriální endopeptidázu z kmene *Bacillus licheniformis*. Podmínky enzymatické hydrolýzy stanovili v závislosti na využitém enzymu. Teplota procesu byla stanovena na 50 °C a pH 8,5. Množství enzymu stanovili na základě deklarované účinnosti výrobcem (2,4 AU/g proteinu). V prvním případě byl PPC inkubován společně s enzymem 2h, v druhém hodiny 4 (PPC-Alc2, PPC-Alc4). U PPC-Alc2 došlo ke zlepšení všech funkčních vlastností, jakožto i aminokyselinového složení, kdy PCI hydrolyzátu byl 98%, pěnový výkon více než 150 % a olejová kapacita 5,4 cm³/g, ve srovnání s nemodifikovaným proteinem (PCI = 13%, olejová kapacita 2,1 cm³/g a pěnový výkon 5,33 %). Jejich výsledky poukázaly na potenciální využití PPC v přípravě přípravků přímo využitelných v potravinářství (Miedzianka et al., 2014).

Ch. Kamnerpdtch a jeho kolegové využili k hydrolýze bramborových proteinů čtyř různých enzymů: Alkaláza (ALC), Novo-Pro-D (NPD), Flavourzyme (FLA), Coloráza (COR). Podmínky enzymové hydrolýzy stanovili na 50 °C po dobu 26 h. bez kontroly pH. Z výsledků (stupeň hydrolýzy) jejich práce došli k závěru, že nejvhodnějšími enzymy pro hydrolýzu bramborových proteinů je endopeptidáza Alkaláza a exopeptidáza Flavourzyme, naproti tomu enzym NPD – endopeptidáza a exopeptidáza COR mají velmi nízkou hydrolyzační aktivitu pro tento typ proteinu.

3. Cíle práce

Za pomoci vybraných potravinářských proteáz byly vytvořené hydrolyzáty dvou typů proteinových koncentrátů a jednotlivé cíle práce byly:

1. Vytvoření proteinového koncentráту z hlíz odrůdy Ornella
2. Podrobení laboratorně připraveného koncentrátu z hlíz odrůdy Ornella a průmyslově produkovaného koncentrátu enzymové hydrolýze vybranými preparáty
3. Stanovení zpětné rozpustnosti bramborových hydrolyzátů připravených pomocí enzymových preparátů
4. Hodnocení efektu hydrolýzy jednotlivých hydrolyzátů pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu
5. Hodnocení efektu hydrolýzy pomocí testu antioxidační aktivity u všech vytvořených hydrolyzátů

4. Metodika a použitý materiál

4.1 Bramborový proteinový koncentrát (PPC)

Jednotlivé analýzy probíhaly souběžně na dvou vzorcích bramborových proteinových koncentrátů. Jeden z koncentrátů byl připraven laboratorně z hlíz odrůdy Ornella, druhý koncentrát byl získán z komerčního zdroje, konkrétně švédské společnosti Lyckeby, která se zabývá výrobou škrobu. Analogicky jsou v celé práci koncentráty nazývány jako PC Lyckeby a PC Ornella.

4.1.1 Příprava hlízové šťávy z brambor odrůdy Ornella

Pro vytvoření PPC byly vybrány hlízy odrůdy Ornella, která je charakteristickou odrůdou využívanou ve výrobě škrobu. Hlízy byly pečlivě omyty a osušeny. Za využití odšťavňovače typu Catler JE 4010 byla získána hlízová šťáva, ze které byl procesem kyselá precipitace a následné tepelné koagulace získán PPC.

4.1.2 Separace bramborových proteinů – příprava PPC

Pomocí H_2SO_4 bylo upraveno pH hlízové šťávy na pH 5. Hlízová šťáva s takto upraveným pH byla přelita do tub o známé hmotnosti a ve vodní lázni zahřata na teplotu 80 °C po dobu 10 minut. Následně byla provedena centrifugace tub (4500 rpm, 10 min.) pro oddělení proteinových složek. Pelety byly následně promyty deionizovanou vodou (10 ml) a znovu centrifugovány (10 min, 4500 rpm). Zamražené pelety (-80 °C) byly lyofilizovány na lyofilizátoru Alpha 1-4 LSC, (Martin Christ, Germany), za následujících podmínek: $t = -65$ °C, $p = 0,420$ mbar, trvání (doba) asi 72 h (do neměnné hmotnosti). Tímto způsobem byl připraven PC Ornella.

4.1.3 Enzymatická hydrolýza PPC vybranými preparáty

4.1.3.1 Použité preparáty

Laboratorně vytvořený proteinový koncentrát z hlíz odrůdy Ornella i druhý PPI Lyckeby byly vystaveny enzymatické hydrolýze komerčně dostupnými preparáty: Fromase 220 TL, Fromase XGL, Maxiren XDS a Proteasa neutrální z *Bacillus subtilis*. Rovněž podmínky enzymatické hydrolýzy byla stanovené na základě informací o jednotlivých přípravcích. První tři jmenované přípravky jsou

produkovány švédskou firmou DMS food specialities B. V. a primární směr jejich využití je v mlékárenství, kde se využívají jako syřidla ve výrobě sýrů. Konkrétně Fromase 220 TL a Fromase 220 XLG jsou mikrobiální syřidla připravené fermentací *Rhizomocur Mihei* s certifikací non-GMO. Jedná se o analogy chymosinu. Aktivita enzymů je distributorem deklarována 220 IMCU/ml.

Maxiren je kvasinkou *Kluyveromyces laris* produkovaný rekombinantní chymosin. Aktivita enzymu deklarována výrobcem je 600IMCU/ml.

Přípravek Proteasa neutrální, *Bacillus subtilis* (EC 3.4.24.28) byl získán od distributora, který uvádí, že přípravek je v potravinářské čistotě a jeho enzymová aktivita je 50 000 U/g. Efektivní rozpětí přípravku je pH: 6,0 – 7,5, efektivní rozmezí teplot pro jeho funkci je 20 – 60 °C.

4.1.3.2 Podmínky enzymové hydrolýzy

Podmínky enzymové hydrolýzy byly stanoveny na základě dostupných informací o jednotlivých enzymových přípravcích následovně:

Jako prostředí pro hydrolýzu přípravky Fromase 220 TL, Fromase XLG a Maxiren XDS byl zvolen 50 mM roztok acetátového pufru o pH 4,5 a teplotě 37 °C, Pro srovnání byly zvoleny dva různé časy, po které hydrolýza probíhala: 2 hodiny/24hodin.

Pro enzym neutrální proteasa byly podmínky následující: 50 mM TRIS-HCl pufr o pH 7, teplota štěpení 50 °C a dvě různé varianty doby štěpení: 2 hodiny/24 hodin.

Vzorky určené pro štěpení přípravky Fromase TL, Fromase XLG a Fromase XDS byly naváženy v množství 99 – 101 mg do předem zvážených tub ve čtyřech opakování. Zároveň byly naváženy vzorky pro kontroly, kdy ke každé variantě štěpení byla vytvořena kontrola obsahující pouze pufr (P) určený k danému enzymu a druhá kontrola obsahující pouze vodu (V).

Vzorky určené pro štěpení přípravkem neutrální proteasa byly naváženy v množství 199 – 201 mg do předem zvážených tub ve dvou opakováních. Pro srovnání byly rovněž vytvořeny kontrolní vzorky bez přítomnosti enzymu v podobě pufru s PC a vody s PC.

4.1.3.2.1 Koncentrace preparátů - enzymů

Koncentrace preparátů Fromase 220 TL, Fromase 220 XLG, a Maxiren XDS byla zvolena následovně: 30 µl tekutého přípravku bylo přidáno k 10 ml acetátového pufru o pH 4,5 s příslušným vzorkem PC (99 – 101 mg). Koncentrace enzymového přípravku neutrální proteasa byla zvolena v poměru 1:20, tedy 1 mg enzymu na 20 mg substrátu v objemu 1 ml. Pro celkový objem 10 ml byl k 9 ml pufru se vzorkem přidán 1 ml pufru s rozpuštěnými 10 mg enzymového preparátu. Celková směs pro hydrolýzu: 99 – 101 mg vzorku + 1 ml 0,5 M TRIS HCl o pH 7 + 10 mg enzymu.

4.1.3.2.2 Proces enzymové hydrolýzy

Před započítím procesu enzymové hydrolýzy, jsme zkontrolovali pH v celkové směsi. Proteinový koncentrát má své určité pH, které může ovlivnit celkové pH směsi, které musí být optimální pro funkci zvoleného enzymu. Hodnota pH byla v případě potřeby upravena.

Samotný proces štěpení proběhl ve vodní lázni v určené teplotě po výše zmíněnou dobu (2/24 hodin). Po dokončení štěpení byla aktivita enzymu zastavena zahřátím vzorku na 100 °C po dobu 10 minut. Tuby se vzorky byly následně ochlazeny a zcentrifugovány po dobu 15 minut při 45000 rpm. Supernatant byl uchován a využit pro stanovení antioxidantní aktivity hydrolyzátů. Pelety byly promyty 5 ml destilované vody a znovu centrifugovány za stejných podmínek.

Z úbytku hmotnosti vzorků byla dále stanovována rozpustnost hydrolyzátů, a proto byly pelety ve zvážených dózách lyofilizovány. Lyofilizace měla stejné parametry popsané výše.

4.1.4 Stanovení rozpustnosti hydrolyzátů

Rozpustnost byla stanovena jako procentuální podíl hmotnosti vzorků před enzymatickým štěpením a po enzymatickém štěpení, tedy jako rozdíl hmotnosti vzorku naváženého pro enzymatické štěpení a hmotnosti lyofilizovaného peletu po enzymatickém štěpení.

4.1.5 Elektroforetické analýza hydrolyzátů PC

Na SDS-PAGE analýzu byl vytvořen 15% separační gel a 3,75% zaostřovací gel. Zaostřovací gel měl následující složení: 12,15 ml dH₂O, 2,5 ml 30% akrylamidu, 5 ml pufru B, 200 µl 10% SDS, 20 µl siřičitanu sodného, 150 µl 15% persíranu

amonného a 20 μl tetramethylethylendiaminu (TEMED). Separální gel obsahoval 28,6 ml dH_2O , 40 ml akrylamidu, 10 ml pufru A, 800 μl sodiumdodecylsulfátu (SDS), 400 μl persíranu amonného, 60 μl siřičitanu sodného, a 40 μl TEMED.

4.1.5.1 Extrakce a příprava vzorků pro SDS-PAGE

Do mikrozkušavek bylo naváženo 20 mg lyofilizovaného proteinového hydrolyzátu ke kterému bylo přidáno 200 μl extrakčního pufru s přidavkem merkaptoethanolu. Vzorky byly řádně promíchány a umístěny na led, kde probíhala extrakce po dobu 4 hodin. V průběhu byly vzorky s extrakčním pufrem několikrát promíchávány. Po dokončení extrakce byly mikrozkušavky centrifugovány po dobu 10 minut při 4500 rpm. Vzniklý supernatant byl přepipetován do nových mikrozkušavek (1,5 μl).

Pro nanášení na gel byly vzorky zředěny extrakčním pufrem v poměru 1:4 (celkový objem 50 μl). K takto naředěné směsi bylo přidáno 10 μl nanášecího pufru (loading buffer) a po jeho přidání byly vzorky zahřáty na 100 °C po dobu 3 minut. Nanáška na gel byla 20 μl takto připraveného vzorku.

Pro snadné stanovení případných změn souvisejících s rozdílným působením enzymových přípravků byly vzorky různých hydrolyzátnů a jejich příslušné kontroly nanášeny na gel vedle sebe.

4.1.5.2 Průběh SDS-PAGE

Gel s nanesenými vzorky byl vložen do vertikální elektroforetické vany (model SE 600, Hofer) s pufrem o složení: 192 mM glycin + 25 mM Tris + 0,1 % SDS (dodecylsírán sodný). Celá soustava byla zapojena do elektrického proudu a vložena do chladničky, z důvodu chlazení sestavy.

Po skončení běhu elektroforézy byly bílkovinné hydrolyzáty detekovány ponořením gelu do roztoku obsahujícího barvivo Coomassie Brilliant Blue R-250 a následným odbarvením gelu odbarvovacím roztokem. Následně byly gely digitalizovány a pro lepší zřetelnost jednotlivých pruhů upraveny v grafickém editoru Gimp.

4.1.6 Peptidová elektroforéza

Pro analýzu štěpů, menších peptidových frakcí vzniklých v průběhu proteinové hydrolyzy byla využita modifikace metod SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

Systém je založen na separaci malých peptidů v systému tří gelů, jejichž složení je uvedeno v tab. č. 2 v kapitole přílohy.

4.1.6.1 Příprava vzorků pro peptidovou elektroforézu

Supernatanty získané po štěpení byly zakoncentrovány. 5 ml supernatantu bylo přepipetováno do tub o objemu 15 ml a ty byly lyofilizovány. Peptidy rozpuštěné v této tekuté frakci byly tímto způsobem převedeny do pevné fáze. Následně byly peptidy rozpuštěny ve 250 μ l dH₂O. Z tohoto objemu bylo pro analýzu na peptidovou elektroforézu odebráno 80 μ l vzorku, ke kterému bylo přidáno 20 μ l nanášecího pufru. Tímto způsobem připravené vzorky byly zahřáty na 100 °C po dobu 3 minut. Konečná nanáška vzorku na gely byla 60 μ l.

4.1.6.2 Průběh peptidové elektroforézy

Elektroforéza probíhala v systému dvou různých vanových pufrů, horního vanového pufru – katodového pufru (1M Tris, 1 M Tricine, 1 % SDS, 10 x zředěné) a dolního vanového pufru – anodového pufru (2 M Tris, 10 x zředěné). Pro průběh byl zvolen konstantní proud 50 mA na gel. Po skončení byly proteiny v gelu fixovány a gel odbarven. Gel byl digitalizován a pro lepší zřetelnost “bendů” upraven v grafickém editoru Gimp.

4.1.7 Stanovení antioxidační aktivity hydrolyzátů

Antioxidační aktivita jednotlivých hydrolyzátů byla stanovena metodou DPPH. Metoda využívá schopnosti antioxidantů zhaset radikál DPPH (difenyltrinitrofenylhydrazyl). Díky své struktuře je DPPH akceptorem atomů vodíku a v procesu zhasení přechází z volné formy na formu stabilní. Aktivita antioxidantů, v našem případě proteinů, je stanovena spektrofotometricky a převedena na hodnotu ekvivalentu TROLOX. Společně s přechodem DPPH na jeho stabilní formu dochází ke změně barevné intenzity, která je měřena při 517 nm.

4.1.7.1 Příprava zásobního roztoku radikálu DPPH

0,025 g radikálu DPPH bylo rozpuštěno v metanolu a doplněno do 100 ml v odměrné baňce. Takto připravený roztok o koncentraci 0,634 mmol/l byl uložen do tmy do chladničky.

4.1.7.2 Příprava kalibračních roztoků standardu TROLOX

Množství 0,0501 g TROLOXu (kyselina hydroxytetramethylchromankarboxylová) bylo kvantitativně převedeno do 100 ml 80% metanolu. Koncentrace TROLOXu v takto připraveném kalibračním roztoku byla $c = 2 \text{ mmol/l} = 0,002 \text{ mol/l}$. Koncentrace jednotlivých kalibračních roztoků, u kterých jsme měřili absorbanci, byla 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 1,0; 1,2 mmol/l, na základě těchto hodnot byla sestavena kalibrační křivka TROLOXu, která posloužila jako standard k výpočtu antioxidační aktivity jednotlivých vzorků.

4.1.7.3 Příprava pracovního roztoku radikálu DPPH

Těsně před začátkem měření bylo 10 ml zásobního roztoku o známé koncentraci ($c = 0,000634 \text{ mmol/l}$) v odměrné baňce doplněno do 100 ml. Koncentrace pracovního roztoku byla $c = 0,0000634 \text{ mol/l}$.

4.1.7.4 Měření absorbance vzorků

Nejprve byla změřena absorbance pracovního roztoku DPPH. Celkový úbytek absorbance pro určení celkové antioxidační aktivity vzorku byl měřen po 30 minutách. Hodnota antioxidační aktivity jednotlivých vzorků byla stanovena v jednotkách ekvivalentu TROLOX (g/kg). Jednotlivá měření probíhala při 517 nm na kyvetovém spektrofotometru BioMate 5.

4.1.8 FPLC – kapalinová chromatografie

Charakterizace hydrolyzátů vytvořených působením enzymu neutrální proteasa proběhla metodou vysokorychlostní kapalinové chromatografie (BioLogic DuoFlow Pathfinder 20 System) za využití kolony ENrich SEC. 70. Software digitalizoval průběh frakcionace hydrolyzátů připravených působením enzymu Neutrální proteasa z *Bacillus subtilis*. Protokol o průběhu chromatografie je konkrétně popsán v tab. č. 3 v kapitole přílohy.

4.1.9 Statistické vyhodnocení dat

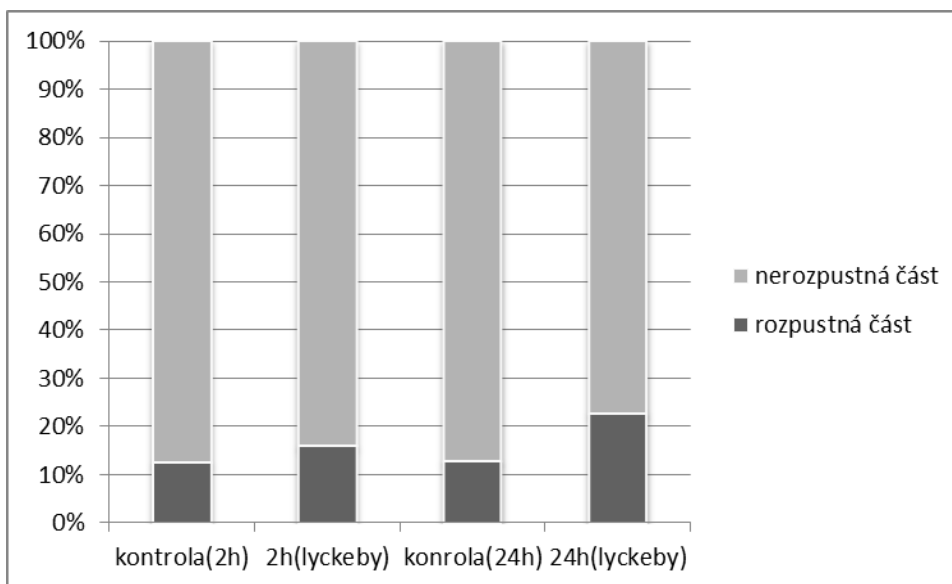
Pro statistické vyhodnocení dat byla využita třífaktorová analýza rozptylu – ANOVA test.

5. Výsledky

5.1 Rozpustnost částečných hydrolyzátů

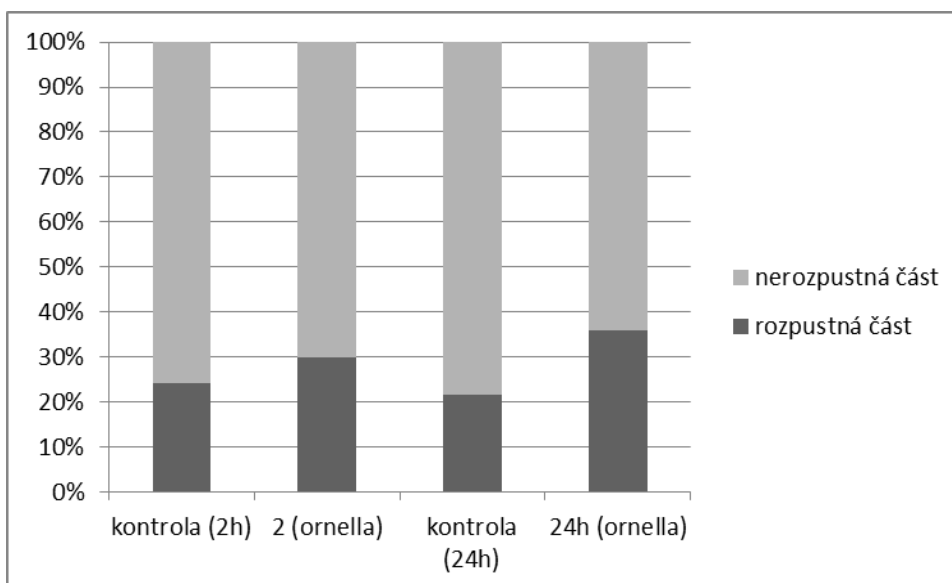
Jednotlivé hodnoty byly převedeny do formy grafů pro lepší znázornění změn, které nastaly po částečné enzymatické hydrolyze jednotlivými preparáty.

Graf č. 1 - Fromase TL: změna rozpustnosti hydrolyzátu (PC – LYCKEBY)



PC - LYCKEBY – proteinový koncentrát Lyckeby

Graf č. 2 - Fromase TL: změna rozpustnosti hydrolyzátu (PC – ORNELLA)



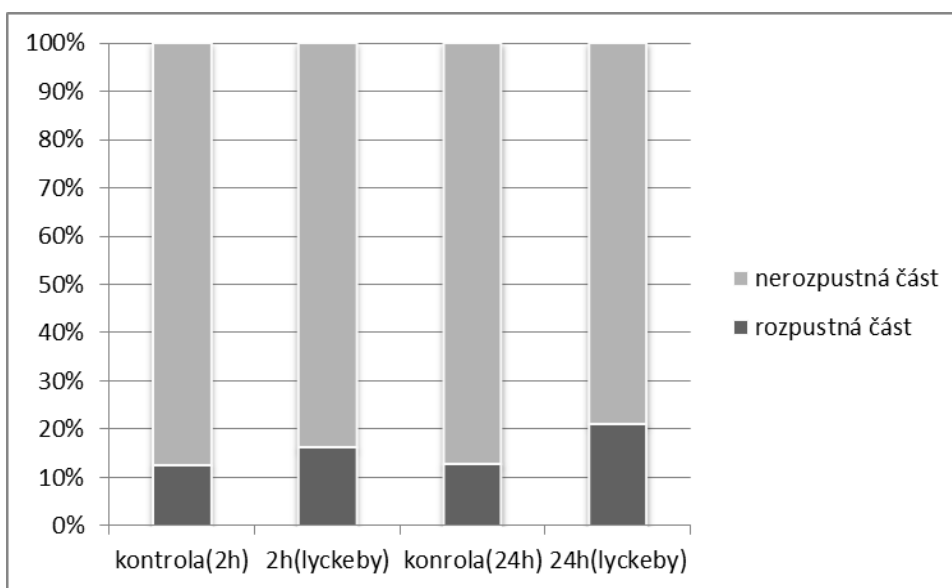
PC – ORNELLA – proteinový koncentrát Ornella

Z grafů (č. 1; č. 2) je zřejmé že vlivem enzymové hydrolýzy se rozpustnost obou proteinových koncentrátů, komerčního koncentráту Lyckeby (graf č. 1) a laboratorně získaného koncentráту z odrůdy Ornella (graf č. 2), zvýšila. U PC Lyckeby se vlivem enzymové hydrolýzy trvající 2 hodiny rozpustnost zvýšila o 3,5 %, po delším působení preparátu (24 hodin), došlo ke zvýšení rozpustnosti o přibližně 10 %.

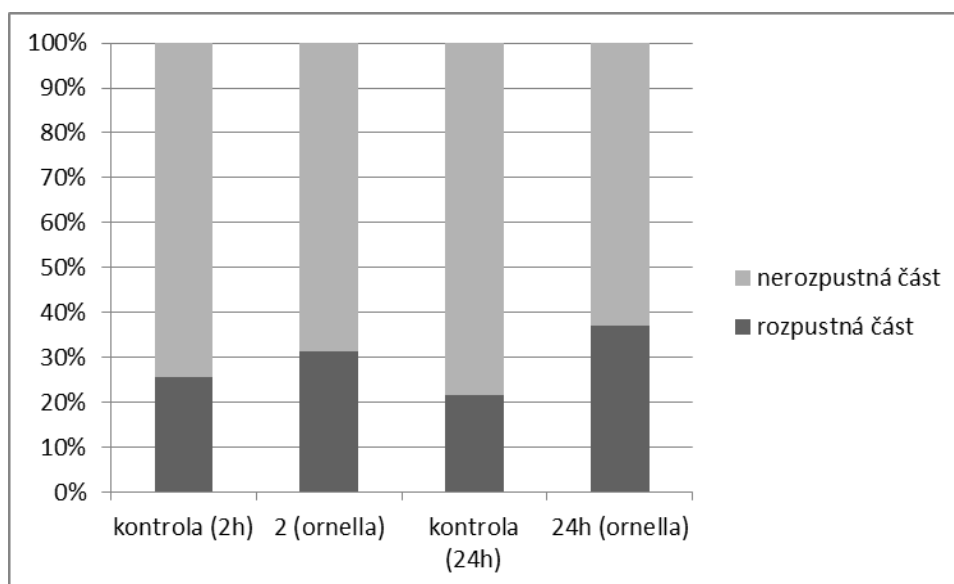
U PC Ornella rovněž došlo ke zvýšení rozpustnosti vlivem štěpení. Ve variantě štěpení po dvou hodinách došlo ke zlepšení rozpustnosti o 4,3 %, ve variantě štěpení, která probíhala 24 hodin o 10,3 %.

V důsledku enzymové hydrolýzy preparátem Fromase 220 TL se rozpustnost obou PC zlepšila. Ve variantě štěpení po dobu 2 hodiny přibližně o 4 %, ve variantě štěpení 24 hodin přibližně o 10 %.

Graf č. 3 - Fromase 220 XLG: změna rozpustnosti hydrolyzátu (PC – LYCKEBY)



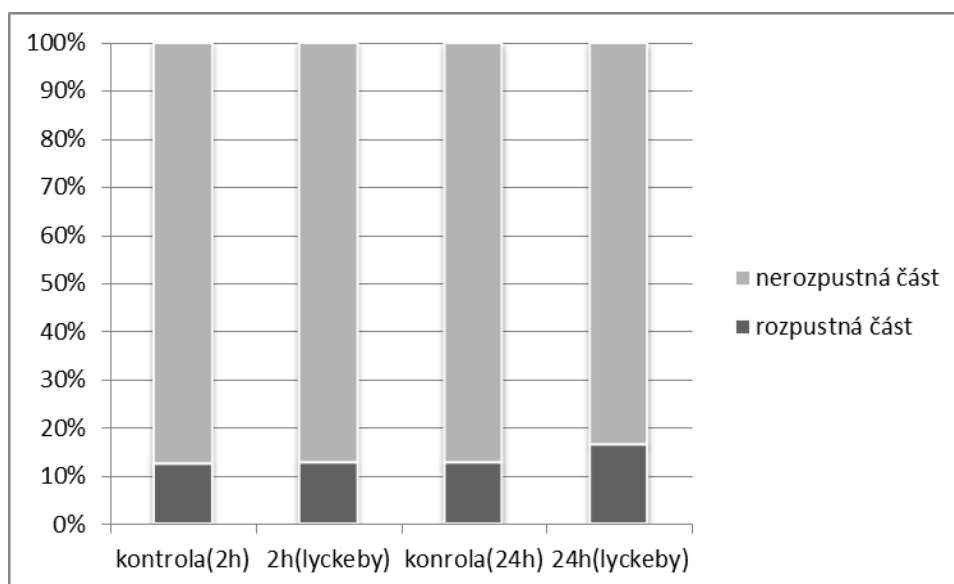
Graf č. 4 – Fromase 220 XLG: změna rozpustnosti hydrolyzátu (PC – ORNELLA)



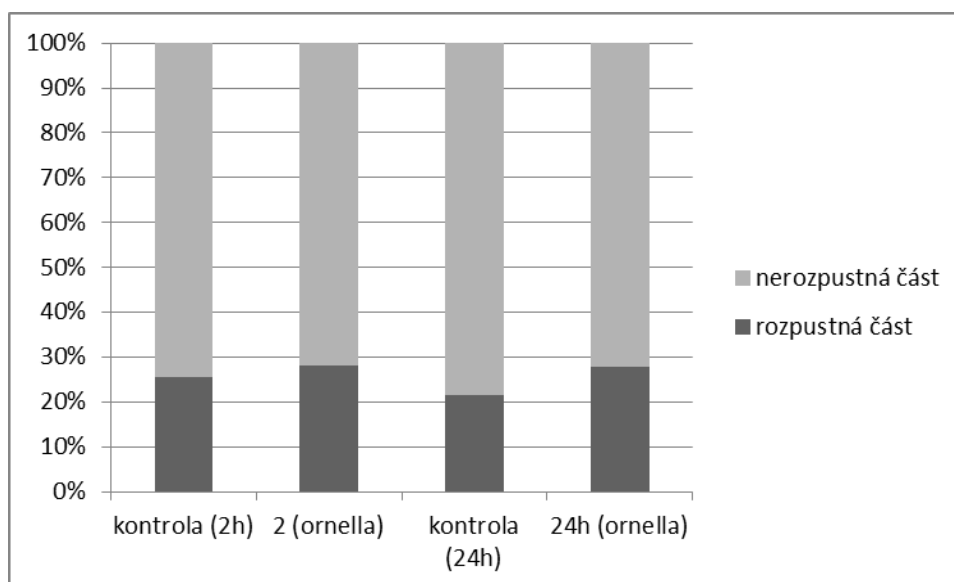
Z grafů č. 3 a 4 je zřetelné malé zlepšení rozpustnosti hydrolyzátů. Ve variantě, kdy štěpení probíhalo 2 hodiny, došlo u PC Lyckeby ke zlepšení o 3,5 % a rozpustnost tohoto hydrolyzátu byla 16%. Po hydrolýze přípravkem Fromase 220 XLG, trvajícím 24 hodin, došlo k nárůstu rozpustnosti proteinového koncentráту Lyckeby z 12,6 % na 21,2 %.

Rozpustnost proteinového koncentráту Ornella se vlivem štěpení enzymatickým preparátem Fromase 220XLG, které probíhalo 2 hodiny, zvýšila o 7,2 % a byla 31,2%. U dvacetičtyřhodinové varianty štěpení došlo ke zlepšení o 13 %, výsledná rozpustnost hydrolyzátu byla 37%.

Graf č. 5 – Maxiren XDS: změna rozpustnosti hydrolyzátu (PC – LYCKEBY)



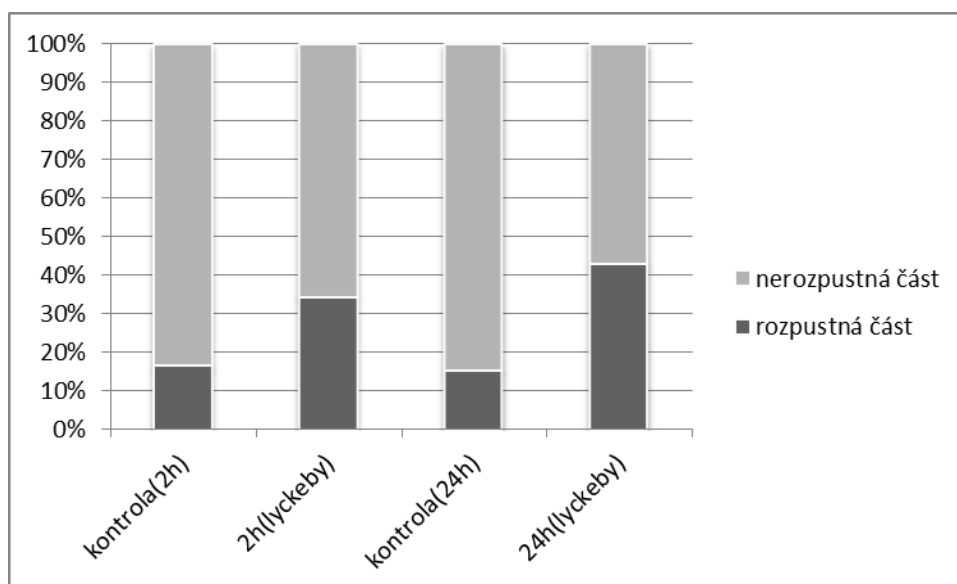
Graf č. 6 – Maxiren XDS: změna rozpustnosti hydrolyzátu (PC – ORNELLA)



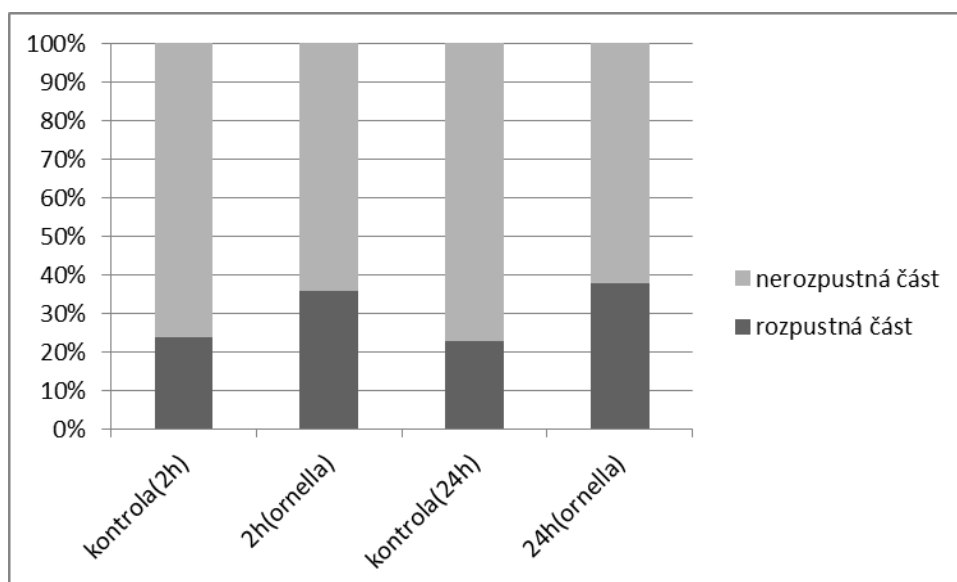
Vlivem štěpení došlo pouze k malé změně rozpustnosti. Po dvou hodinách štěpení se rozpustnost zvýšila oproti kontrole pouze o jediné procento, ale tento výsledek je diskutabilní vzhledem k vážkové metodě stanovení rozpustnosti. O něco zřetelnější je výsledek hydrolyzy v druhém případě, kdy byl PC Lyckeby vystaven štěpení po dobu 24 hodin. Rozpustnost se zvýšila o necelé 4 %.

Hydrolyzát (2 hodiny) proteinů získaných z odrůdy Ornella vykazoval 28,1% rozpustnost, oproti 24,1% rozpustnosti kontrolního vzorku. Působením enzymového preparátu na bramborový protein Ornella po dobu 24 h došlo ke změně rozpustnosti v rozsahu 6 %.

Graf č. 7 – Proteasa neutrální: změna rozpustnosti hydrolyzátu (PC – LYCKEBY)



Graf č. 8 - Proteasa neutrální: změna rozpustnosti hydrolyzátu (PC – ORNELLA)



Posledním enzymem využitým pro hydrolýzu obou PC byla neutrální proteasa z *Bacillus subtilis*. Rozpustnost proteinového koncentráту Lyckeby, jehož rozpustnost v kontrole byla 16,7% , se zvýšila téměř o 18 % na hodnotu 34,4 %. V delší variantě štěpení (24 hodin) došlo ke zvýšení rozpustnosti o téměř 27,5 %.

Rozpustnost proteinového koncentráту Ornella vlivem enzymové hydrolýzy rovněž vzrostla. V kratší variantě štěpení (2 hodiny) o 12,2 % v delší variantě štěpení o 15,1 %, výsledná rozpustnost hydrolyzáту byla 35,8% a 37,8%.

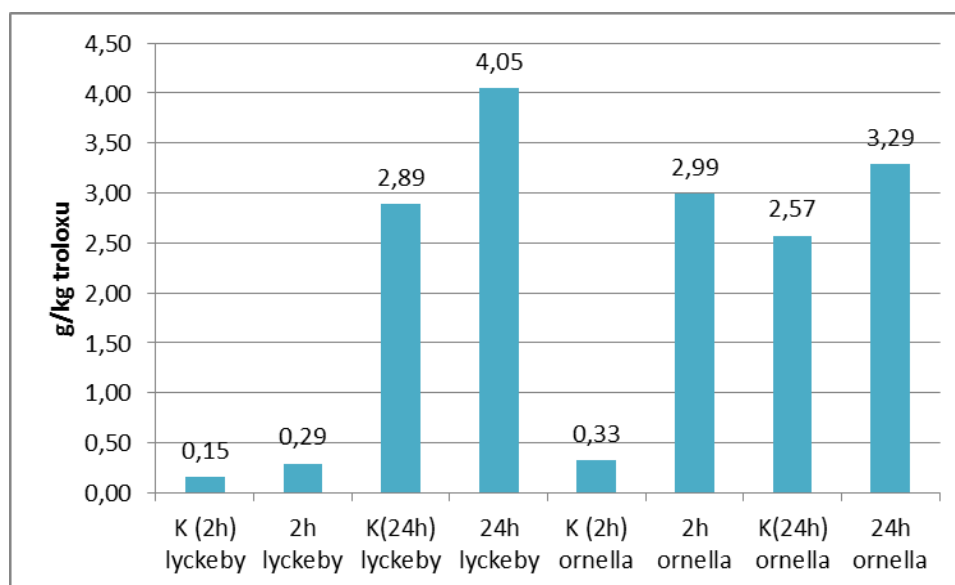
Z jednotlivých grafů, které jsou pro přehlednost uspořádány ve dvojicích je jasné, že proteinový koncentrát získaný od komerčního subjektu měl nižší zpětnou rozpustnost, než proteinový koncentrát z odrůdy Ornella, který jsme připravili laboratorně.

Obecně došlo vlivem hydrolyzy námi vybranými preparáty k malému nárůstu rozpustnosti hydrolyzátů. To je způsobeno typem použitého preparátu, tedy konkrétně jeho specifitou. Z výsledků je jasné, že preparáty na bázi chymosinu, tedy enzym chymosin je specifitější, než enzym neutrální proteasa z *Bacillus subtilis*.

5.2 Antioxidační aktivita hydrolyzátů

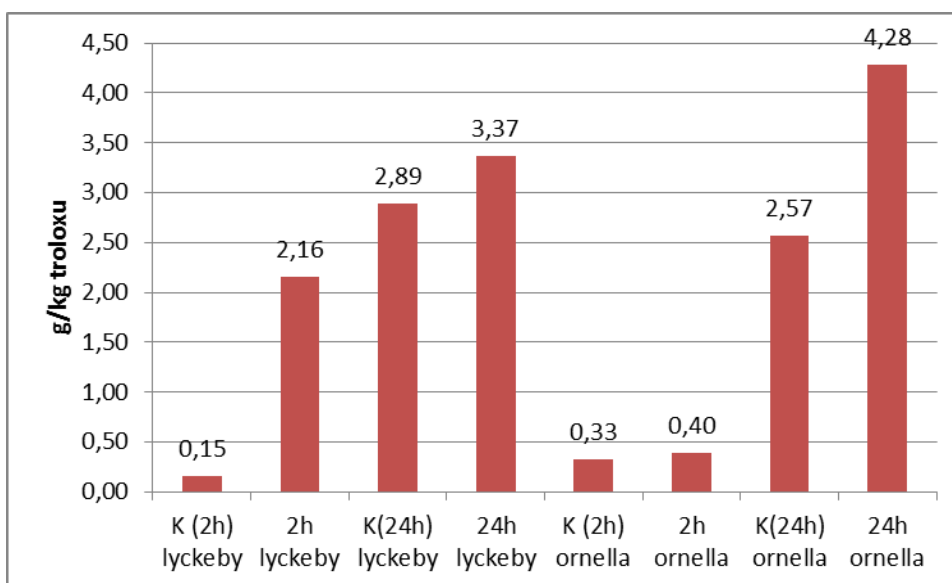
Hodnoty antioxidační aktivity hydrolyzátů byly převedeny do podoby grafů, pro jejich snadné srovnávání.

Graf č. 9 – Fromase TL – antioxidační aktivita hydrolyzátů



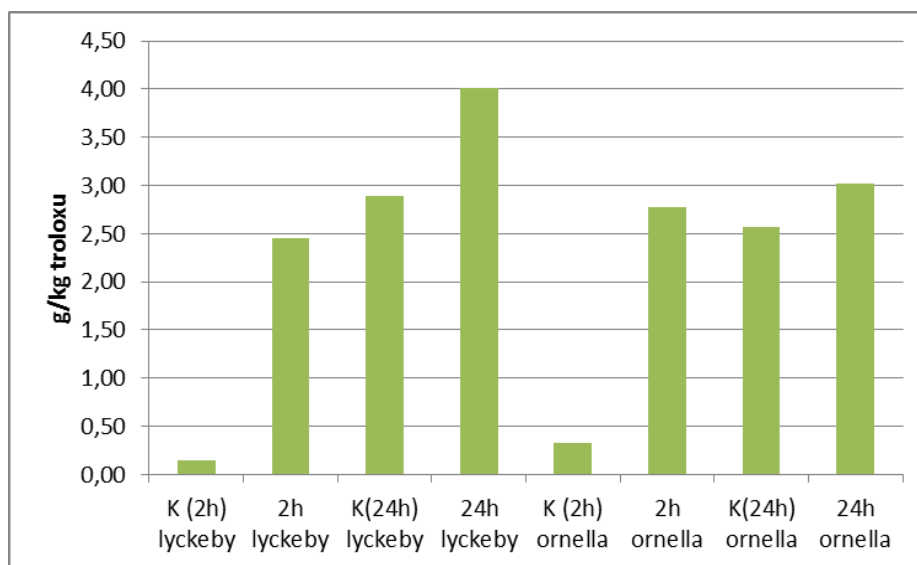
Antioxidační aktivita hydrolyzátů připravených působením enzymu Fromase TL se oproti kontrolním vzorkům zvýšila ve všech případech. V nejmenším rozsahu došlo ke zvýšení antioxidační aktivity u hydrolyzátu připraveného v kratší variantě štěpení (2 hodiny), konkrétně o 0,14 g/kg troloxového ekvivalentu. Naopak v největším rozsahu došlo ke zvýšení antioxidační aktivity u hydrolyzátu PC Ornella, který byl vystaven působení enzymu po delší dobu (24 hodin), došlo zde ke zvýšení o celých 2,66 g/kg troloxového ekvivalentu. Změny antioxidační aktivity proteinových hydrolyzátů připravených působením Fromase 220 TL jsou uvedeny v grafu č. 9

Graf č. 10 – Fromase XLG – antioxidační aktivita hydrolyzátů



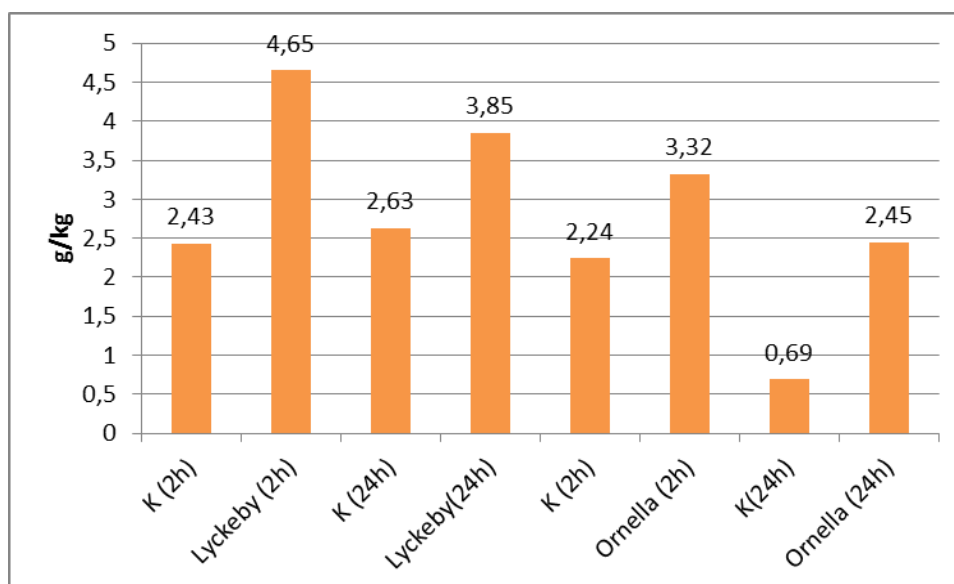
Graf č. 10 popisuje změny antioxidační aktivity, ke kterým došlo v důsledku působení enzymu Fromase 220XLG. U hydrolyzátu PC Lyckeby připraveného kratší variantou štěpení došlo k největšímu nárůstu antioxidační aktivity, konkrétně o 2,1 g/kg troloxového ekvivalentu. Jeho výsledná antioxidační aktivita byla 2,16 g/kg. Vůbec nejvyšší antioxidační aktivita byla naměřena u hydrolyzátu připraveného štěpením enzymem Fromase XLG, konkrétně bylo naměřeno 4,28 g/kg troloxového ekvivalentu.

Graf č. 11 – Maxiren – antioxidační aktivita hydrolyzátů



Dalším využitým enzymem byl Maxiren XDS. Vysoký nárůst antioxidační aktivity (až 16 x) byl oproti kontrolním vzorkům, sledován především u hydrolyzátů připravených kratší variantou štěpení po dobu 2 hodin a to u PC Lyceby i Ornella. U hydrolyzátů připravených delší variantou štěpení, 24 hodin, byl také zaznamenán nárůst antioxidační aktivity. Konkrétní výsledky jsou zobrazeny v grafu č. 11.

Graf č. 12 – Neutrální proteasa - antioxidační aktivita hydrolyzátů

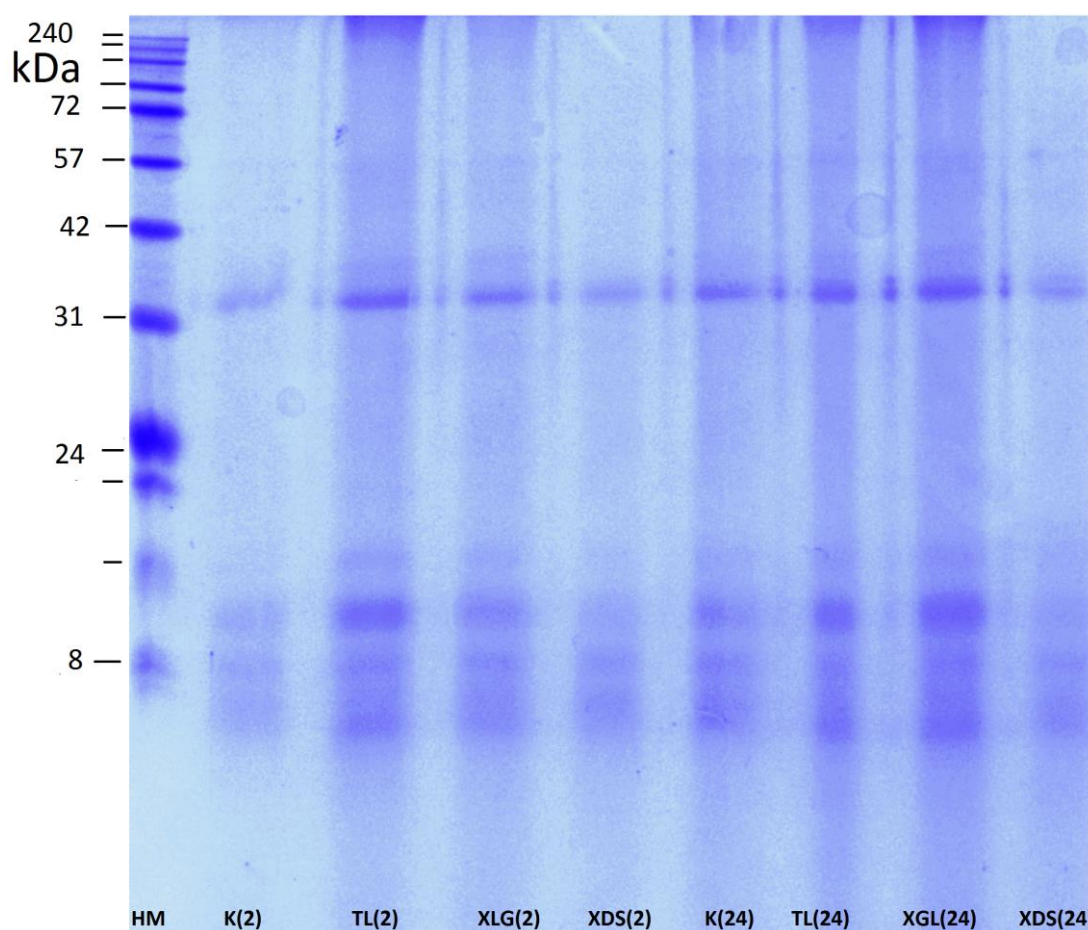


Je zřejmé, že antioxidační aktivita hydrolyzátů připravených působením enzymu Neutrální proteasa se zvýšila a odpovídá to skutečnosti, že se změnila i

jejich rozpustnost. Vlivem hydrolýzy enzymem neutrální proteasa došlo ke zvýšení antioxidační aktivity u všech vzorků. Největší rozdíl byl zaznamenán u hydrolyzátu PC Lykeby kdy došlo ke zvýšení antioxidační aktivity o více než 2 g/kg troloxového ekvivalentu. Vyšší antioxidační aktivitu měl proteinový koncentrát Lykeby.

5.3 SDS-PAGE – profily proteinových koncentrátů

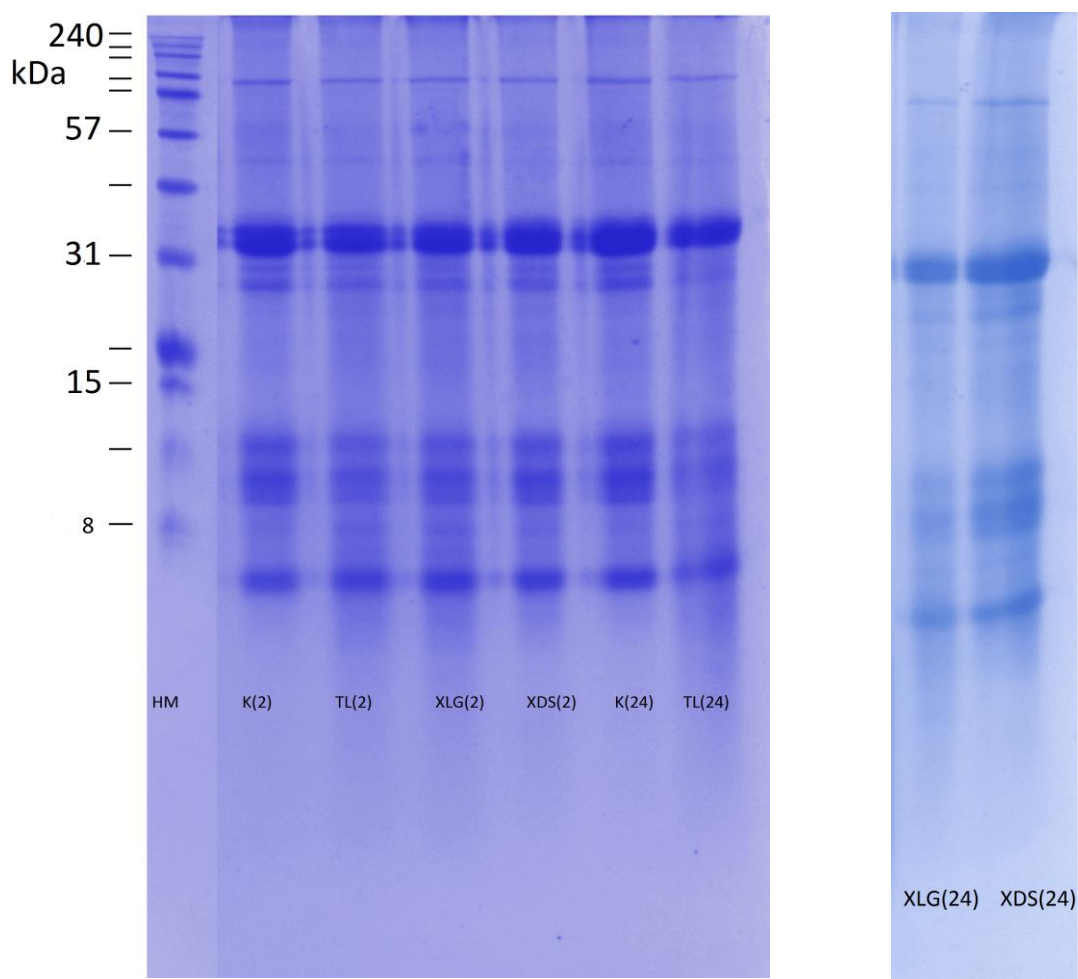
Byly vytvořeny profily proteinových koncentrátů podrobených enzymové hydrolýze.



Obr. č. 1 – Digitalizovaný a upravený gel se vzorky peletů PC Lykeby; HM – hmotnostní marker; K(2) - kontrola štěpení (2h); TL(2) - Fromase 220TL, 2 hodiny; XLG(2) - Fromase 220XLG, 2 hod.; XDS(2) – Maxiren XDS, 2 hodiny. Analogicky štěpení 24 hodin.

Na digitalizovaném gelu (obr. č. 1) jsou nejvýraznější proteinové pruhy v profilu koncentráту Lykeby (kontroly) viditelné na úrovni 57, ~36, ~33, 8 kDa. Na profilu jsou viditelné charakteristické proteinové skupiny jako bílkoviny patatinu o molekulové hmotnosti 43 kDa a inhibitory proteáz o hmotnosti 8 – 25 kDa. Podle

intenzity pruhů označující charakteristické skupiny lze tedy usuzovat o jejich destrukci v důsledku nešetrného postupu výroby proteinového koncentráту. Mezi profilem proteinového koncentráту Lyckeby a profily jeho hydrolyzátů připravených námi zvolenými proteázami nejsou zřetelné rozdíly v molekulové hmotnosti zastoupených bílkovin, ale spíše v jejich množství. U hydrolyzátu připraveného enzymy Fromase 220TL a Fromase 220XLG jsou bílkoviny výše popsaných velikostí zastoupené ve větším množství, což se na gelech projevuje intenzivnějšími pruhy.



Obr. č. 2 – Digitalizovaný a upravený gel se vzorky peletů PC Ornella; HM – hmotnostní marker; K(2) - kontrola štěpení (2h); TL(2) - Fromase 220TL, 2 hodiny; XLG(2) - Fromase 220XLG, 2 hod.; XDS(2) – Maxiren XDS, 2 hodiny. Analogicky štěpení 24 hodin.

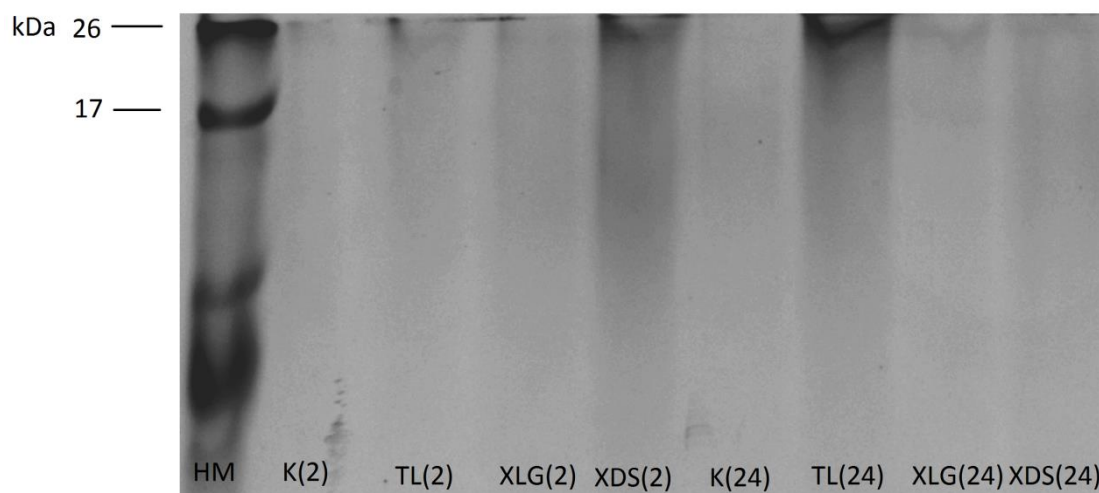
Profil proteinového koncentráту Ornella se liší od profilu PC Lyckeby. Na gelu (obr. č. 2) jsou viditelné charakteristické proteinové skupiny jako patatin a

inhibitory proteáz (8 – 23 kDa) Pruhy na gelech jsou v této oblasti u kontrol jasnější, než u jednotlivých hydrolyzátů, lze tedy usuzovat o destrukci části proteinů o této velikosti v průběhu enzymové hydrolýzy preparáty. Na gelu je viditelná i počínající separace menších proteinů vzniklých v průběhu hydrolýzy u hydrolyzátů připravených preparáty Fromase 220TL a 220 XLG.

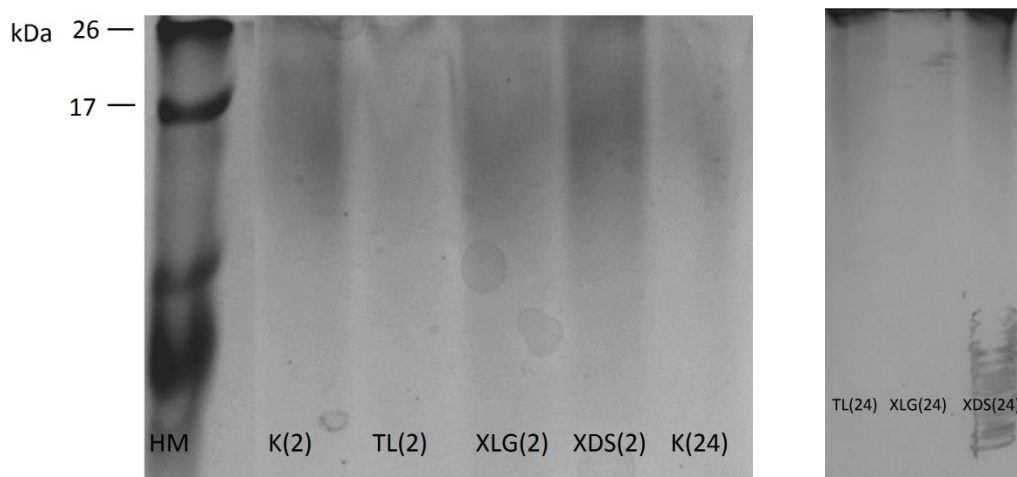
Z celkového pohledu na gely je jasný rozdíl mezi jednotlivými použitými koncentráty. Bílkovinný profil PC Lyckeby je v rozsahu možností našeho separačního systému je mnohem méně zřetelný, než bílkovinný profil PC Ornella. Tyto rozdíly, stejně jako rozdíly v zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí jsou s největší pravděpodobností způsobeny metodikou přípravy koncentrátů a dalšími vlivy jako je například typ odrůdy.

5.4 Peptidová elektroforéza – vizualizace peptidových frakcí

Peptidové frakce rozpuštěné ve vodné fázi, krátké úseky proteinů vzniklé v průběhu enzymové hydrolýzy, byly charakterizovány na peptidové elektroforéze.



Obr. č. 3 - Digitalizovaný a upravený peptidový gel se vzorky hydrolyzátů PC Lyckeby; HM – hmotnostní marker; K(2) - kontrola štěpení (2h); TL(2) - Fromase 220TL, 2 hodiny; XLG(2) - Fromase 220XLG, 2 hod.; XDS(2) – Maxiren XDS, 2 hodiny. Analogicky štěpení 24 hodin.

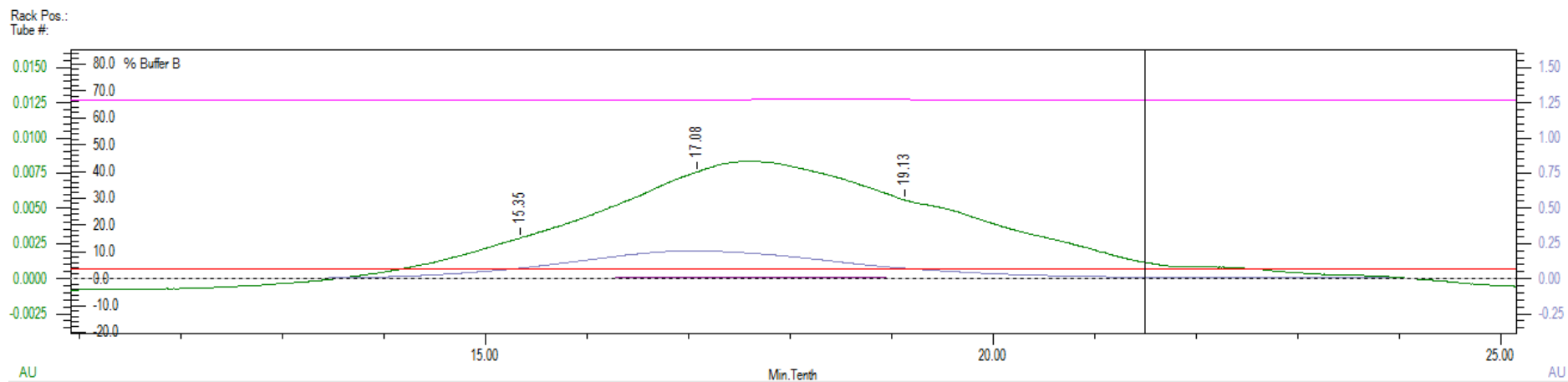


Obr. č. 4 – Digitalizovaný gel a upravený peptidový gel se vzorky hydrolyzátů PC Ornella: HM: hmotnostní marker; K(2) – kontrola štěpení (2h); TL(2) - Fromase 220TL, 2 hodiny; XLG(2) - Fromase 220XLG, 2 hod.; XDS(2) – Maxiren XDS, 2 hodiny. Analogicky štěpení 24 hodin.

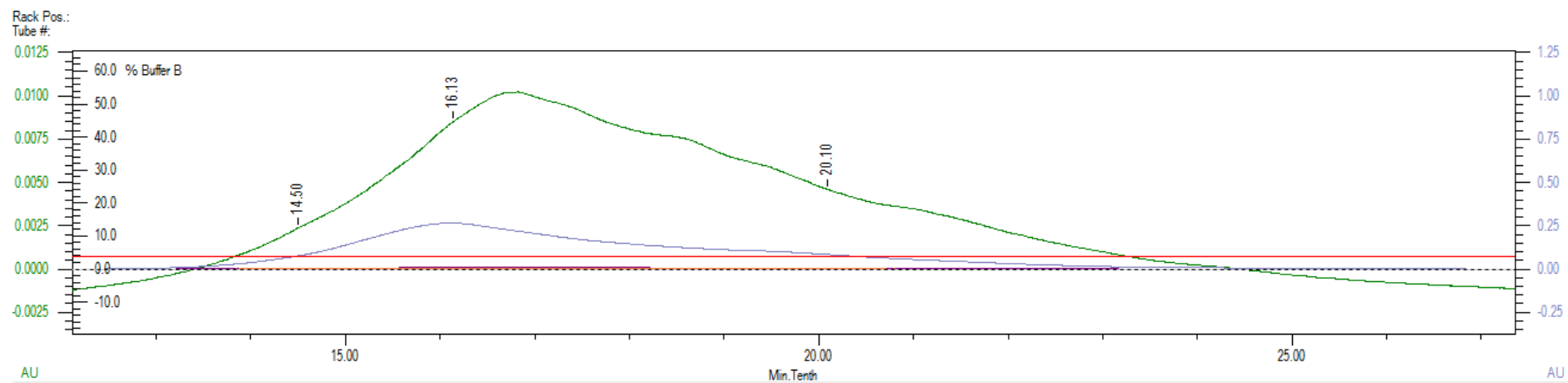
V profilu jednotlivých hydrolyzátů je velice málo viditelná, ale oproti kontrolním vzorkům PC Lyckeby zřetelná separace bílkovin o molekulové hmotnosti ~25 kDa. Podobně je tomu tak i v případě peptidového profilu hydrolyzátů PC Ornella a to zejména u hydrolyzátů připravených delším působením enzymů (24 hodin).

5.5 Chromatografický profil hydrolyzátů

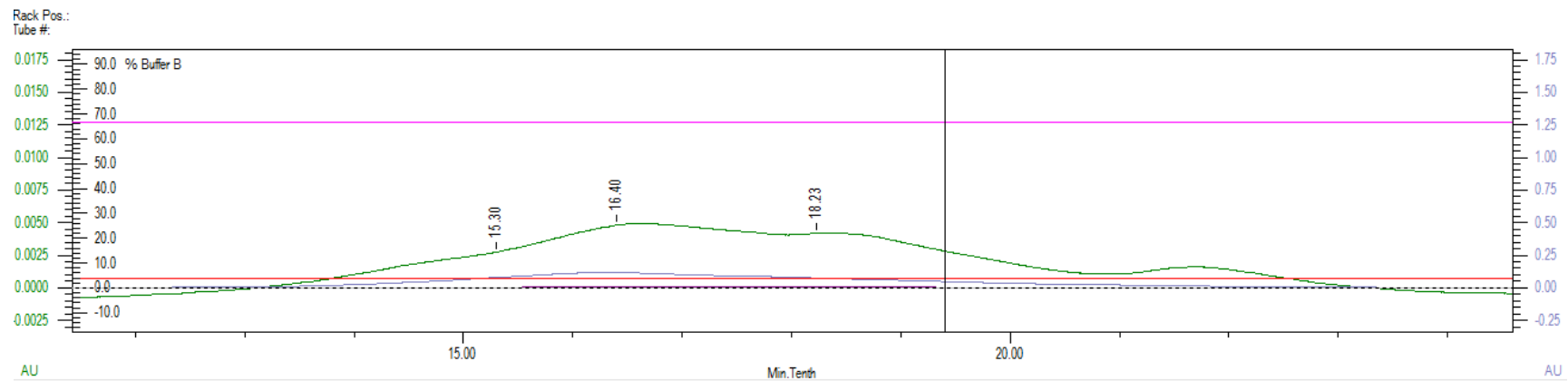
Na obrázku č. 5 a č. 6 je znázorněn průběh chromatografické analýzy vzorků hydrolyzátů PC Lyckeby Na obrázku č. 7 a č. 8 chromatogramy popisují analýzu vzorků vzniklých enzymovou hydrolýzou PC Ornella. Čísla na křivkách popisují zastoupení peptidů ve vzorcích, udávají čas, ve kterém byly peptidy na koloně zachyceny. Z této hodnoty lze usuzovat o jejich velikosti.



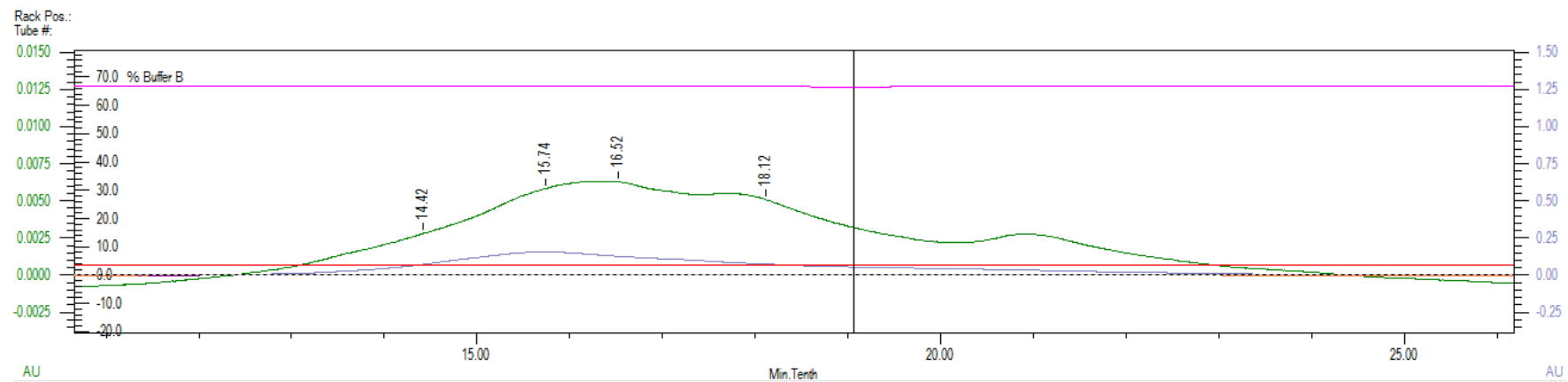
Obr. č. 5 – Profil hydrolyzátu PC Lyceby - Neutrální proteasa (doba štěpení: 2 hodiny)



Obr. č. 6 – Profil hydrolyzátu PC Lyceby - Neutrální proteasa (doba štěpení: 24. hodin)



Obr. č. 7 - Profil hydrolyzátu PC Ornella - Neutrální proteasa (doba štěpení: 2 hodiny)



Obr. č. 8 - Profil hydrolyzátu PC Ornella - Neutrální proteasa (doba štěpení: 24. hodin)

Z programově digitalizovaného průběhu vysokorychlostní kapalinové chromatografie na koloně ENrich SEC 70 je vidět rozdílný profil jednotlivých štěpení PC Lyckeby, kdy obr. č. 5 charakterizoval velikost proteinů hydrolyzátu připraveného dvěma hodinami štěpení. Obrázek č. 6 ukazuje profil proteinů získaných delší variantou, dvaceti čtyřhodinovým štěpením. Stejným způsobem jsou uspořádané chromatogramy popisující zastoupení frakcí v hydrolyzátech PC Ornella (obr. č. 6; obr. č. 8).

Po srovnání výsledků se standardem, konkrétně vitamínem B₁₂ (Mr = 1,350), kdy podle informací o koloně se pík označující jeho přítomnost objevuje v čase okolo 16 minuty běhu vzorku, je zřejmé, že hlavní skupinu hydrolyzátu tvoří peptidy, jejichž relativní molekulová hmotnost je menší než 1,350.

5.6 Statistické zhodnocení výsledků práce

Statistickými metodami byl zhodnocen vliv jednotlivých faktorů na námi stanovovanou rozpustnost připravených bílkovinných hydrolyzáatů. Tři rozměrným testem bylo na hladině významnosti > 0.05 potvrzeno, že na rozpustnost proteinového koncentrátu má vliv typ použitého koncentrátu, doba štěpení i použitý enzym. Bohužel nebyl potvrzen vliv těchto tří faktorů zároveň (tab. č. 2).

Tab. č. 2 – ANOVA test – Vyhodnocení vlivů jednotlivých faktorů na rozpustnost PC

efekt interakce	suma čtverců	stupeň volnosti	čtverec	F	P
absolutní člen	34033,77	1	34033,76	3183,21	0,000000
proteinový koncentrát	983,36	1	983,36	91,97	0,000000
doba štěpení	306,39	1	306,39	28,66	0,000006
enzym	1403,54	3	467,85	43,76	0,000000
proteinový koncentrát*doba štěpení	8,30	1	8,30	0,78	0,384457
proteinový koncentrát*enzym	435,08	3	145,03	13,56	0,000006
doba štěpení*enzym	130,91	3	43,64	4,08	0,014063
proteinový koncentrát*doba štěpení*enzym	40,97	3	13,66	1,28	0,297774
Chyba	363,52	34	10,69		

Tab. č. 3 – ANOVA test – Vyhodnocení vlivů jednotlivých faktorů na antioxidační aktivitu hydrolyzátů

efekt interakce	suma čtverců	stupeň volnosti	čtverec	F	P
absolutní člen	280,62	1	280,62	2211,89	0,000000
proteinový koncentrát	0,20	1	0,20	1,55	0,230982
doba štěpení	8,45	1	8,45	66,62	0,000000
enzym	5,12	3	1,71	13,46	0,000122
proteinový koncentrát*doba štěpení	0,59	1	0,59	4,67	0,046263
proteinový koncentrát*enzym	3,66	3	1,22	9,63	0,000720
doba štěpení*enzym	18,11	3	6,04	47,57	0,000000
proteinový koncentrát*doba štěpení*enzym	9,85	3	3,28	25,87	0,000002
Chyba	2,03	16	0,13		

Statistickými metodami byl rovněž zhodnocen vliv jednotlivých faktorů na antioxidační aktivitu. Z našich výsledků nebyl jednoznačně prokázán vliv použitého proteinového koncentrátu, avšak byl prokázán vliv proteinového koncentrátu, enzymu, kterým byl štěpen i doby po kterou enzymová hydrolýza probíhala (tab. č. 3).

6. Diskuze

6.1 Rozpustnost proteinového koncentráту

Miedzianka J. a její kolektiv (2014) zkoumali různé funkční vlastnosti bramborového proteinového koncentráту. Materiál (PC) získali z komerčního subjektu zabývajícího se výrobou škrobu v Lomže v Polsku. Dá se tedy předpokládat, že proces výroby PC z hlízové šťávy probíhal cestou kyselé precipitace a následné tepelné koagulace za využití páry ohřáté na vysokou teplotu. Bohužel nejsme schopni zjistit přesnou specifikaci těchto podmínek, ale v zásadě se dá říci, že PC Lyckeby použitý pro naši práci byl získán za stejných, průmyslových, podmínek. V práci charakterizovali rozpustnost proteinového koncentráту pomocí indexu rozpustnosti, stejně jako v naší práci byl stanoven procentuální podíl rozpustné části stanovené ve vztahu k celkovému množství PC. Z jejich výsledků vyplynulo, že index rozpustnosti PC byl 13 %. Z výsledků je zřetelné, že rozpustnost PC Lyckeby byla 12,4%. Velice malý rozdíl mezi našimi výsledky může být způsoben mírně odlišnými charakteristikami průmyslové výroby PC.

6.2 Výběr enzymových preparátů

Barač a jeho kolegové (2011) se zabývali částečnou hydrolýzou hrachových proteinů za využití enzymu chymosin v komerčně dostupné formě Maxiren. Jejich hlavním cílem bylo prokázat vliv činnosti tohoto enzymu, v podobě levného a dostupného přípravku, na zlepšení funkčních vlastností hrachového proteinu. V naší práci jsme pro tvorbu bramborových hydrolyzátů využili hned tři forem chymosinu. Jako první jsme použili nerekombinantní chymosin pod komerčním názvem Fromase ve dvou odlišných termostabilních formách. Stejně jako ve studii, kterou publikoval Barač a jeho kolektiv, jsme využili přípravek Maxiren.

Dalším využitým enzymem v naší práci byla Neutrální proteasa z *Bacillus subtilis*. Stejný enzymový přípravek pod obchodním názvem Neutrasa byl využit pro částečnou enzymovou hydrolýzu proteinů v sójové extrudované mouce, za účelem zlepšení funkčních vlastností a vytvoření nové funkční složky potravin (Surówka et al., 2004). Stejný enzym byl použit pro hydrolýzu sójového proteinového koncentráту. Byl sledován vliv hydrolýzy na jeho funkční vlastnosti, rozpustnost, schopnost tvorby gelu a další (Hou & Zhao, 2011; Jung et al., 2005).

V dostupné literatuře nebyly nalezeny informace o využití chymosinu, proteolytického enzymu, pro zlepšení funkčních vlastností bramborových proteinů. Byla nalezena pouze jediná zmínka o použití tohoto enzymu pro částečnou hydrolýzu hrachových proteinů. Naše práce je tedy zaměřena především na objasnění, zdali je enzym použitelný pro bramborový proteinový koncentrát (bramborový protein).

Využití neutrální proteasy pro zlepšování funkčních, popřípadě nutričních vlastností rostlinných proteinů a to zejména sójových proteinů je v literatuře již popsáno, ale chybí informace o jeho využití konkrétně pro bramborový protein.

6.3 Částečná hydrolýza a rozpustnost bramborových proteinů

Miedzianka a její kolegové (2014) vystavili bramborový proteinový koncentrát působení enzymu alkaláza. Ve své studii vytvořili dvě různé varianty štěpení o výsledném rozdílném stupni hydrolýzy proteinů. Rozpustnost (index rozpustnosti) hydrolyzátu vytvořeného kratší variantou štěpení, tedy hydrolyzátu s nižším stupněm hydrolýzy se vlivem působení enzymu zvýšila, konkrétně z 13 % na 99 %. Stejný enzym použili Wang a Xiong (2005) a zjistili, že rozpustnost hydrolyzátů o různém stupni hydrolýzy (0,72; 1,9; 2,3) se zvýšila 14 – 19 x.

V naší práci došlo vlivem hydrolýzy rovněž ke zvýšení rozpustnosti obou hydrolyzátů. Při použití nerekombinantně připraveného chymosinu ve formě přípravků Fromas 220TL a Fromase 220XLG došlo u hydrolyzátu Lyckeby připraveného hydrolýzou trvajícím 2 hodiny ke zvýšení rozpustnosti o 3,5 %, jeho rozpustnost byla 15,9%. U hydrolyzátu připraveného delší variantou došlo ke zvýšení rozpustnosti o 10,3 %, jeho celková rozpustnost byla 22,6%. Z našich výsledků a výsledků jiných studií je jasné, že námi použité enzymy štěpily bramborový protein v mnohem menším rozsahu, než enzymy použité v jiných studiích, odpovídá tomu malá změna jejich rozpustnosti.

Baráč a jeho kolektiv (2011) použili enzym Maxiren pro hydrolýzu hrachových proteinů v poměru 1:200 (enzym:substrát). Rozpustnost hrachového proteinového izolátu jako výchozího materiálu pro hydrolýzu a rozpustnost vytvořených hydrolyzátů zkoumali v odlišných pH podmínkách. Ve všech stanovených podmínkách došlo ke zlepšení rozpustnosti vlivem hydrolýzy.

V naší práci nebyl vliv hydrolýzy enzymem chymosin, v podobě Maxirenu, na rozpustnost bramborového proteinu ve srovnání s pokusy na hrachovém proteinu tak velký.

6.4 Antioxidační aktivita hydrolyzátů

Na základě stanovené antioxidační aktivity metodou DPPH se podařilo potvrdit hydrolýzu PC. Zvýšená antioxidační aktivita naměřená u všech námi vytvořených hydrolyzátů je s největší pravděpodobností výsledkem tvorby peptidů s charakteristickým zastoupením aminokyselin v jejich struktuře, které hrají důležitou roli v procesu stabilizace radikálů.

Antioxidační aktivitu bramborových bílkovinných hydrolyzátů studovali L. L. Wang a I. L. Xiong (2005). Připravili hydrolyzáty působením enzymu Alkaláza o různém stupni hydrolýzy. Antioxidační aktivitu jednotlivých hydrolyzátů charakterizovali pomocí metody FRAP (Ferric reducing/antioxidant aktivity) a ABTS a zjistili, že antioxidační aktivita hydrolyzátů se oproti intaktnímu proteinu mnohokrát zvýšila.

7. Závěr

Na základě výsledků práce a okolností, které byly v průběhu práce zjištěny, je možné vyvodit následující závěry.

- Nejlepší rozpustnost měly proteinové hydrolyzáty připravené působením enzymu neutrální proteasa. Došlo zde k nejvýraznějšímu zlepšení rozpustnosti, hlavního limitujícího faktoru využitelnosti průmyslově produkovaných bramborových proteinových koncentrátů. V rámci hydrolyzátů připravených enzymem neutrální proteasa měl nejlepší rozpustnost hydrolyzát PC Lyckeby připravený delší variantou štěpení (24 hodin). Jeho rozpustnost byla 43%, oproti 16% rozpustnosti kontrolního vzorku. U ostatních hydrolyzátů připravených enzymy Fromase došlo k mírnému zlepšení rozpustnosti. Hydrolyzáty enzymu Maxiren vykazovaly spíše zanedbatelné zlepšení rozpustnosti a to zejména u PC Lyckeby. Obecně lze říci, že PC Lyckeby měl horší počáteční rozpustnost než PC Ornella, to je nejspíše způsobeno rozdílnými podmínkami výroby PC.
- Antioxidační aktivita všech hydrolyzátů se oproti kontrolním vzorkům zvýšila. Z tohoto faktu lze usuzovat o změně zastoupení jednotlivých proteinových frakcí vlivem štěpení, tedy o tvorbě peptidů s antioxidační aktivitou. Nejvyšší antioxidační aktivitu měl hydrolyzát PC Lyckeby připravený působením enzymu neutrální proteasa z *Bacillus subtilis*, konkrétně 4,65 g troloxového ekvivalentu na kg hydrolyzátu.

Statistickými metodami byl prokázán vliv jednotlivých faktorů (typ proteinového koncentráту, použitý enzym, doba štěpení) na rozpustnost PC. Statisticky se nepodařilo prokázat vliv proteinového koncentráту na antioxidační aktivitu hydrolyzátů.

Další výzkum by se měl věnovat především navazujícímu tématu a to dalším funkčním schopnostem bramborových hydrolyzátů jako je emulgace, nebo tvorba pěn, které jsou stěžejní pro jejich využití v potravinářství.

8. Seznam použité literatury

Aiking H. (2011): Future Protein Supply, *Trends in Food Science & Technology*, 22: 112 – 120.

Amarowicz R. (2008): Antioxidant activity of protein hydrolysates, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110, 489 – 490.

Barać M., Čabrilo S., Pešić M., Stanojević S., Pavličević M., Mačej O., Ristić N. (2011): Functional Properties of Pea (*Pisum sativum*, L.) Protein Isolates Modified with Chymosin, *Int J Mol Sci*, 12: 8372–8387.

Barrett A. L., Rawlings N. D., Woessner J. F. (2004): Handbook of Proteolytic Enzymes, Asparatic and Mettalo Peptidases, 1. Vyd, *Elsevier Academic Press*, 1045 s.

Bárta J., Bártová V. (2007): Bílkoviny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.), vědecká monografie, *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta*, 116 s. ISBN- 978-80-7394-036-2.

Bártová V., Bárta J. (2008): Vliv tepelného ošetření na zpětnou rozpustnost hlízových proteinů brambor izolovaných z průmyslové hlízové vody. *Res. Agr. Eng.*, 54: 170 - 175.

Bártová V., Bárta J., Brabcová A., Zdráhal Z., Horáčková V. (2015) Amino acid composition and nutritional value of four cultivated South American potato species, *Journal of Food Composition and Analysis*, 40: 78 – 85.

Culbertson J. D. (2005): Food Protein Functionality. In: Hui Y. H. (Eds.): Handbook of Food Science, Technology and Engineering, 4. Vyd., *CRC Press, NW*, 71 – 93.

Day L. (2013): Proteins from land plants - Potential resources for human nutrition and food security, *Trends in Food Science & Technology*, 32: 25 – 42.

de Boer J., Aiking H. (2011): On the merits of plant-based proteins for global food security: marrying macro and micro perspectives, *Ecological Economics*, 70: 1259 - 1265.

Dijkstra D. S., Linnemann A. R., van Boekel, T. (2003): Towards sustainable production of protein-rich foods: appraisal of eight crops for Western Europe. Part II: analysis of the technological aspects of the production chain, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43: 481 - 506.

Egbert W. R., Payne C. T. (2009): Plant Protein, In: Tarté R. (Eds.): Ingredients in Meat Products: Properties, Functionality and Applications, *Springer*, 111 – 131.

Fidler M., Kolářová L. (2009): Analýza antioxidantů v chmelu a pivu, *Chem. Listy* 103: 232 - 235.

Gupta R., Beg Q. K., Lorenz P. (2002): Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59: 15 – 32.

Horax R., Hettiarachchy N., Over K., Chen P., Gbur E. (2010): Extraction, fractionation and characterization of bitter melon seed proteins, *J Agric Food Chem.*, 58: 1892 – 1897.

Hou Y., Zhao X. H. (2011): Limited Hydrolysis of Two Soybean Protein Products with Trypsin or Neutrase and the Impacts on their Solubility, Gelation and Fat Absorption Capacity, *Biotechnology*, 190 – 196.

Hsiao N. W., Chenb Y., Kuan Z. Ch., Leed Y. Ch., Lee S. K., Chan H. H., Kao Ch. H. (2014): Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, Peptidase R, *Electronic Journal of Biotechnology*, 17: 89 – 94.

Cherry J. P., McWatters K. H. (2009): Protein Functionality in Foods, *ACS Symposium Series*, 147: 149 – 176.

Judd R. C. (2002): SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of peptides. In: Walker J. M. (ed.). The protein protocols – Handbook (2nd edition). *Humana Press*, Totowa, New Jersey, 1146 s.

Jung S., Murphy P. A., Johnson L. A. (2006): Physicochemical and Functional Properties of Soy Protein Substrates Modified by Low Levels of Protease Hydrolysis, *Journal of Food Science*, 70: 180 – 187.

Kalač P., (2001): Organická chemie přírodních látek a kontaminantů, 1. Vyd, *České Budějovice, Jihočeská univerzita*, ISBN 80-7040-520-1.

Kammerdpetch C., Weiss M., Kasper C., Scheper T. (2007): An improvement of potato pulp protein hydrolyzation process by the combination of protease enzyme systems, *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 508 – 514.

Karaca A. C., Low N. H, Nickerson M. T. (2015): Potential use of plant proteins in the microencapsulation of lipophilic materials in food, *Trends in Food Science & Technology*, 42: 5 – 12.

Karaca A. C., Nickerson M. T., Low N. H. (2011): Lentil and Chickpea Protein-Stabilized Emulsions: Optimization of Emulsion Formulation, *J. Agric. Food Chem.*, 59: 13203 – 13211.

Kato A., Takahashi A., Matsudomi N., Kobayashi K. (2006): Determination of Foaming Properties of Proteins by Conductivity Measurements, *Journal of Food Science*, 4: 62 – 65.

Kramer R. M., Varad R., Shende, V. R., Motl N., Pace C. N., Scholtz M. (2012): Toward a Molecular Understanding of Protein Solubility: Increased Negative Surface Charge Correlates with Increased Solubility, *Biophys J.*, 102: 1907 – 1915.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–695.

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

Løkra S., Strætkevørn K. O. (2009): Industrial Proteins from Potato Juice. A Review, *GBS*, 3: 88-95.

Martínez R. B., Juráez J. M., Salvador M. C. O., Vázquez M. I. C. (1997) Influence of enzymatic hydrolysis on functionality of plant proteins, *Journal of thermal analysis*, 49: 831 – 836.

Miedzianka J., Peksa A., Aniolowska M. (2012) Properties of acetylated potato protein preparations, *Food Chemistry*, 133: 1283 – 1291. Waglay A., Karboune S., Alli I. (2014): Potato protein isolates: Recovery and characterization of their properties, *Food Chemistry*, 142: 373 – 382.

- Miedzianka J., Peksa A., Pokora M., Rytel E., Tajner-Czopek A., Kita A. (2014): Improving the properties of fodder potato protein concentrate by enzymatic hydrolysis, *Food Chemistry*, 159: 512 – 518.
- Mirmoghtadaie L., Aliabadi S. S., Hosseini S. M. (2016): Recent approaches in physical modification of protein functionality, *Food Chemistry*, 199: 619 – 627.
- Nielson P. M., Petersen D., Dambmann C. (2001): Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis, *Journal of Food Science*, 66: 642 – 646.
- Nissen A. J. (1997): Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid, *J. Agric. Food Chem.*, 27: 1256 – 1262.
- Panyam D., Kilara A. (1996): Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification, *Trends in Food Science & Technology*, 7: 120 – 125.
- Peñta-Ramos E. A., Xiong Y. L. (2002): Antioxidant Activity of Soy Protein Hydrolysates in a Liposomal System, *Journal of Food Science*, 67: 2952 – 2956.
- Pimentel D., Pimentel M. (2003): Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment, *American Journal of Clinical Nutrition*, 78: 660 - 663.
- Pots A. M., Dejongh H. H. J., Gruppen H., Hamer R. J., Voragen G. J. (1998): Heat-induced conformational changes of patatin, the major potato tuber protein, *Eur. J. Biochem*, 252: 66 – 72.
- Pouvreau L., Gruppen H., Piersma S. R., Van den Broek L. A., Van Koningsveld G. A., Voragen A. G. (2001): Relative abundance and inhibitory distribution of protease inhibitors in potato juice from cv. Elkana, *J Agric Food Chem.*, 49: 2864 - 74.
- Ralet M. Ch., Guéguen J. (2000): Fractionation of Potato Proteins: Solubility, Thermal Coagulation and Emulsifying Properties, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 33: 380 – 387
- Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S., Deshpande V. V (1998): Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 597 – 635.

- Seo S., Karboune S., Archelas A. (2014): Production and characterisation of potato patatin–galactose, galactooligosaccharides, and galactan conjugates of great potential as functional ingredients, *Food Chemistry*, 158: 480 – 489.
- Sikorski Z. E. (2001): Functional properties of proteins in food systems, In: Sikorski Z. E. (Eds.): Chemical and functional properties of food proteins, *CRC Press, Boca Raton, FL, USA*, 113 – 135.
- Spök A. (2006): Safety Regulations of Food Enzymes, *Food Technol, Biotechnol.*, 44: 197 - 209.
- Suková I. (2009): Nová regulace enzymů v EU nařízením 1332/2008, *Dtsch. Lebensm. Rdsch.*, 105: 228-235.
- Surówka K., Żmudzińska D., Fik M., Macura R., Łasocha W. (2004): New protein preparations from soy flour obtained by limited enzymic hydrolysis of extrudates, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 225 – 234.
- Waglay A., Karboune S. (2016) Potato Proteins: Functional Food Ingredients, In: Singh J., Kaur L. (Eds.): Advances in Potato Chemistry and Technology, 2. Vyd., *Elsevier, London*, 75 – 105.
- Wei Q., Zhimin H. (2006): Enzymatic hydrolysis of protein: mechanism end kinetic model, *Front. Chem. China*, 3: 308 – 314.
- Wu W. U., Hettiarachchy N. S., Qi M. (1998): Hydrophobicity, Solubility, and Emulsifying Properties of Soy Protein Peptides Prepared by Papain Modification and Ultrafiltration, *JAACS*, 75: 845 – 850.
- Yalcin E., Celik S. (2007): Solubility properties of barley flour, protein isolates and hydrolysates. *Food Chem.*, 104: 1641–1647.
- Zayas F. J. (1997): Introduction. In: Functionality of Proteins in Food, *Springer, Berlin*, 1 – 5.
- Zhao X., 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: 3314 – 3391.

Anonym₁

URL:<http://cit.vfu.cz/ivbp/wpcontent/uploads/2011/07/ANTIOXIDA%C4%8CN%C3%8D-KAPACITA-POTRAVIN.pdf>

Anonym₂;

URL:<http://www.foodnet.cz/slozka/?jmeno=Food+Improvement+Agents+Package&iid=1104>

9. Přílohy

Tab. č. 4 – Složení gelů pro analýzu peptidů

Separáční gel	
13.4 ml	dH ₂ O
20 ml	separační/spacer gelov� pufr (3 M Trizma base, 0.3 % SDS, upravit HCl na pH 8.9)
20 ml	separační/spacer akrylamid: 1 X crosslinker (AC/bis = 48/1.5 g)
6.4 ml	glycerol
20 �l	TEMED
200 �l	10 % persíran amonn�
Spacer gel	
13.8 ml	dH ₂ O
10 ml	separační/spacer gelov� pufr (3 M Trizma base, 0.3 % SDS, upravit HCl na pH 8.9)
6 ml	separační/spacer akrylamid: 1 X crosslinker (AC/bis = 48/1.5 g)
10 �l	TEMED
100 �l	10 % persíran amonn�
Zaostřovací gel	
20.6 ml	dH ₂ O
3.8 ml	zaostřovací gelov� pufr (1 M Tris-HCl, pH 6.8)
5 ml	zaostřovací akrylamid (AC/bis = 30/0.8 g)
300 �l	EDTA
15 �l	TEMED
300 �l	10 % persíran amonn�

Tab. č. 5 – Protokol k chromatografické (FPLC) pomocí kolony ENrich SEC. 70

fáze	Objem v dané fázi	Popis průběhu dané fáze	Prováděcí komponenty	Objem pufru a průtoky
1.	0,00 ml	Vynulování základní čáry	Quad Tec	
2.	0,00 ml	Isokratická eluce	Pufr A	Objem: 30 ml
			Pufr B	Průtok: 1 ml/min
3.	1,00 ml	Vynulování základní čáry	Quad Tec	
4.	1,00 ml	Přidání vzorku	vzorek	
			Statická smyčka	
5.	1,00 ml	Isokratická eluce	Pufr A	Objem: 30 ml
			Pufr B	Průtok: 1 ml/min
	31,1 ml	Konec protokolu		