

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Metody laboratorního stanovení kvality bílkovin

Bakalářská práce

Kateřina Reichlová

Chov hospodářských zvířat

Ing. Vladimír Plachý, Ph.D.

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Metody laboratorního stanovení kvality bílkovin" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26.4.2024

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé práce, panu Ing. Vladimíru Plachému, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při psaní mé bakalářské práce. Dále děkuji své rodině za trpělivost a podporu, kterou mi v průběhu studia věnovala.

Metody laboratorního stanovení kvality bílkovin

Souhrn

Bakalářská práce se zaměřuje na sumarizaci metod laboratorního stanovení kvality bílkovin v kontextu krmivářství a chovu zvířat. Cílem práce je poskytnout komplexní přehled o různých metodách používaných k hodnocení kvality bílkovin a jejich vztahu k potřebám a stravitelnosti hospodářských zvířat. Práce je založena na literární rešerši, která pokrývá témata jako funkce, složení a stravitelnost bílkovin, stejně jako nutriční potřeby zvířat. Dále jsou prezentovány a analyzovány různé metody stanovení kvality bílkovin, včetně reologických vlastností, indexu esenciálních aminokyselin, stravitelných aminokyselin a reaktivního lysinu. Poznatky uvedené v práci vychází ze sumarizace, analýzy a syntézy sekundárních dat uvedených v odborné a vědecké literatuře a dalších relevantních zdrojích. Celkový teoretický přehled by mohl být využit odborníky v oblasti krmivářství a chovu zvířat, kteří se zabývají výběrem a aplikací metod pro hodnocení kvality bílkovin v krmivech a potravinách pro zvířata. Takto připravená znalostní báze může být i výchozím základem pro následný výzkum v této oblasti.

Klíčová slova: bílkoviny, kvalita, laboratorní analýza, stravitelnost

Methods of laboratory determination of protein quality

Summary

The bachelor thesis focuses on summarising methods of laboratory determination of protein quality in the context of animal feed and animal breeding. The thesis aims to provide a comprehensive overview of the different methods used to assess protein quality and their relationship to the needs and digestibility of livestock. The work is based on a literature search covering topics such as the function, composition and digestibility of protein, as well as the nutritional needs of animals. In addition, different methods of protein quality determination are presented and analysed, including rheological properties, essential amino acid index, digestible amino acids and reactive lysine. The knowledge presented in this paper is based on the summarisation, analysis and synthesis of secondary data presented in the scientific and technical literature and other relevant sources. The overall theoretical overview could be used by feed and animal husbandry professionals involved in selecting and applying methods for assessing protein quality in animal feed and food. Such a knowledge base can also be the basis for a next research in this field.

Keywords: protein, quality, laboratory analysis, digestibility

Obsah

1 Úvod	7
2 Cíl práce.....	8
3 Literární rešerše	9
3.1 Funkce a složení bílkovin.....	9
3.1.1 Definice a rozdělení aminokyselin.....	11
3.2 Stravitelnost bílkovin.....	14
3.2.1 Metoda in vivo.....	15
3.2.2 Metody in vitro.....	15
3.3 Nutriční potřeby hospodářských zvířat.....	16
3.4 Stanovení kvality bílkovin	17
3.4.1 PDCAAS metoda	19
3.4.2 DIAAS metoda.....	20
3.4.3 Stanovení na základě obsahu dusíku	21
3.5 Reologické vlastnosti bílkovin	22
3.5.1 Emulgace	23
3.5.2 Pěnění	23
3.5.3 Gelování (želírování).....	24
3.5.4 Denaturace.....	24
3.5.5 Rozpustnost a degradovatelnost bílkovin.....	24
3.5.6 Cornellský systém	25
3.6 Index esenciálních aminokyselin (EAAI).....	26
3.7 Stravitelné aminokyseliny a jejich poměry.....	26
3.8 Reaktivní lysin	26
4 Závěr	27
5 Literatura	28
6 Seznam použitých zkratkách a symbolů.....	36

1 Úvod

Význam bílkovin si uvědomili chemici na počátku 19. století, včetně švédského chemika Jönse Jacoba Berzelia, který v roce 1838 vytvořil termín protein, slovo odvozené z řeckého *prōteios*, což znamená "držící první místo".

Hrubé bílkoviny jsou důležitou výživovou složkou. Jsou souborem aminokyselin, které jsou základem základní lidské fyziologie, podporují metabolizující tkáně a enzymy, které řídí chemii organismu. Bílkoviny neboli proteiny jsou základními stavebními bloky buněk a tkání v těle organismů. Další z důležitých funkcí je obranná, zásobní, transportní a pohybová. Účinky bílkovin v organismu jsou nezbytné pro správné fungování těla. V případě nedostatečného obsahu bílkovin obsahující esenciální aminokyseliny ve stravě vede k úbytku svalové hmoty, zhoršení imunity, hormonální a enzymatické činnosti v těle. Pro fungování těchto důležitých funkcí je nutné dodávat tělu kvalitní bílkoviny ve stravě.

Kvalitu určuje dusík, který je nenahraditelným prvkem aminokyselinové páteře bílkovin. Homeostáza dusíku je vysoce regulovaná funkce, která se podílí na fungování hemu, hormonů, imunitních mediátorů, antioxidantů a neurotransmiterů. Tento prvek se podílí na syntéze sloučenin, jako jsou puriny a pyrimidiny, které uchovávají a zpracovávají veškeré genetické informace. Rozvinuté ekonomiky využívají tyto informace ke zlepšení zemědělské produkce, což napomáhá celkovému zdraví, exportním účelům i chovu zvířat pro spotřebu, zatímco rozvojové země se zaměřují na podvýživu a kvalitu každodenní stravy.

V oblasti výživy zvířat hrají bílkoviny neoddiskutovatelnou roli především v oblasti optimalizace výživy. Pro její zajištění je nezbytné správné nastavení kvality bílkovin. Právě laboratorní metody umožňují krmivářům a chovatelům získat informace nejen o obsahu, ale i o biologické dostupnosti bílkovin. Zároveň tyto laboratorní analýzy umožňují sledovat a kontrolovat kvalitu krmiv z pohledu množství živin. Nevyvážené poměry mohou vést k poklesu produkčních výsledků a v některých případech mohou vést až ke zdravotním problémům zvířat. Stanovení kvality bílkovin pak umožňuje sledovat využitelnost krmiv, jejichž složení může pocházet z různých zdrojů. Roli hraje i úprava krmiv, například změnou teploty či pH, což má následně dopad změnu vlastností proteinů, především v oblasti optimalizace. Rozpustnost bílkovin je pak významná především v oblasti schopnosti vztřebávání živin ve střevě.

Používání laboratorních metod a přístupů se nakonec projevuje i v hledisku ekonomickém. Správné nastavení typu krmiva a výživové dávky díky předchozímu stanovení kvality bílkovin může pomoci snížit celkové náklady na krmivo se současnou maximalizací produkčních výsledků. Případné snížení používání pomocných či doplňkových krmiv a přísad, je pak jen dalším bonusem při snižování nákladů.

Výzkum kvantitativní výživy hospodářských zvířat je stále potřebný pro zvýšení účinnosti metabolismu a optimalizaci krmné dávky. V oblasti výživy zvířat má rovněž zásadní význam pro zajištění produkce masa a mléčných výrobků požadované kvality.

Tato práce se proto věnuje přehledu laboratorních metod pro stanovení kvality bílkovin.

2 Cíl práce

Cílem práce je sumarizování přehledu metod stanovení kvality bílkovin na základě laboratorního testování.

3 Literární rešerše

3.1 Funkce a složení bílkovin

Bílkoviny neboli proteiny jsou biopolymerní struktury složené z aminokyselin, kterých je v biologické chemii 20 základních. Bílkoviny slouží jako strukturní podpora, biochemické katalyzátory, hormony, enzymy, stavební kameny a iniciátory buněčné smrti (LaPelusa & Kaushik 2023).

Lze je definovat jako makromolekulární látky složené z aminokyselin, které jsou vzájemně svázány peptidovou vazbou (Davídek 2012). Peptidová vazba spojuje aminoskupinu jedné aminokyseliny a karboxylovou skupinu druhé aminokyseliny jednoduchou kovalentní vazbou (Koolman 2012).

Proteiny v potravě se liší svými chemickými, biologickými, nutričními a funkčními vlastnostmi, které závisí na jejich zdroji, odkud pocházejí. Příjem těchto látek může pocházet z upravených, zpracovaných nebo syrových (neupravených) surovin. Bílkoviny mohou být živočišného nebo rostlinného původu (Li Day 2022). Obecně se uznává, že bílkoviny živočišného původu mají větší nutriční hodnotu než rostlinné, a to hlavně z důvodu aminokyselinového složení. Kromě toho, jsou to také jejich technologické funkce, jako je emulgace, pěnění, gelování (želírování). Tyto funkce dodávají potravinám atraktivní texturu, senzorické vlastnosti a jsou považovány za lepší než u rostlinných bílkovin (Kim at al. 2020).

Aminoskupiny bílkovin zajišťují alkalické vlastnosti a karboxylové skupiny zajišťují kyselé vlastnosti (Nanhar & Kok Siong 2019). V kapalně formě nebo roztoku mají aminokyseliny amfoterní vlastnosti. To znamená, že v zásaditém roztoku se mění na kyselinu a v kyselém roztoku na zásadu, tzv. zwitterionty (Wolfe 2017).

Vlastnosti bílkoviny jsou určovány pořadím v polypeptidovém řetězci a zastoupeným typem aminokyselin. Funkce bílkovin jsou rozděleny podle jednotlivých struktur (Huang at al. 2006; Ningbo & Hua 2017). Konkrétní vlastnost závisí na specifických molekulárních charakteristikách, jako je velikost, primární, sekundární, terciární a kvartérní konformace, distribuce náboje, stejně jako obsah a umístění hydrofobních oblastí (Zhang et al. 2021).

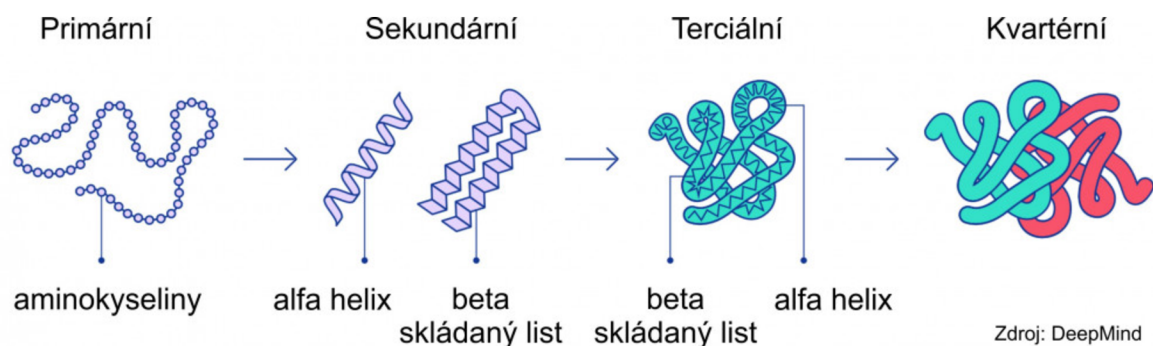
Jak již bylo uvedeno výše, struktury bílkovin se dělí na čtyři skupiny: primární, sekundární, terciární, kvartérní.

- **Primární struktura** určuje sekvenci aminokyselin spojených do polypeptidového řetězce. Specifické sekvence bílkovin jsou tvořeny z dvaceti různých aminokyselin, které mohou být v polypeptidovém řetězci použity i vícekrát (Sanvictores & Farci 2022). Tato struktura má také název páteř bílkoviny (LaPelusa & Kaushik 2023).
- **Sekundární struktura** určuje prostorové uspořádání aminokyselin v řetězci, které jsou spojeny pomocí vodíkových můstků. Toto uspořádání určuje vlastnosti proteinů jako je pevnost a pružnost. Nejčastěji rozlišujeme dva typy sekundární struktury, a to: α -helix, řetězec stočený do pravotočivé šroubovice a β -skládaný list, složený ze dvou rovnoběžně antiparalelně upořádaných řetězců (Kodíček at al. 2015).
- **Terciární struktura** je trojrozměrný tvar proteinu určený oblastmi stabilizovanými interakcemi mezi postranními řetězci polypeptidového řetězce (Rehman at al. 2023). Terciární struktura je v podstatě určena uspořádáním sekundárních struktur,

α -šroubovic a β -skládaných listů, které se spojují do jedné nebo několika jednotek. Těchto kombinací je omezený počet a některé z nich jsou v proteinech obzvláště časté (Cozzone 2022). Výsledný tvar bílkoviny určují kovalentní vazby, které mohou být peptidové nebo disulfidové. Mezi základní typy terciální struktury řadíme: fibrilární struktura, která je vláknitá a globulární struktura, která je kulovitá (Klouta 2013).

- **Kvartérní struktura** je trojrozměrné uspořádání dvou nebo více polypeptidů v bílkovině, z nichž každý se skládá nezávisle na druhém. Na této úrovni se vytvářejí komplexy z více polypeptidových řetězců nazývaných podjednotky. Je důležité poznamenat, že termín podjednotka je možné zaměnit s termínem protomer (LaPelusa & Kaushik 2023).

Grafické znázornění jednotlivých struktur aminokyselin je znázorněno na Obrázku 1.



Obrázek 1 Struktura aminokyselin

(Zdroj: <https://www.ukforum.cz/rubriky/veda/7760-umela-inteligence-alphafold-zpusobila-revoluci-v-biologii>)

Podle různých kritérií lze bílkoviny dále rozdělit:

- Podle chemického složení
- Podle fyzikálních vlastností
- Podle funkce v organismu

Ad a) Podle chemického složení

- **Jednoduché bílkoviny** jsou tvořeny pouze aminokyselinami.
- **Složené bílkoviny** obsahují bílkovinnou i nebílkovinnou část. Složené (též kondenzované) bílkoviny se dále mohou dělit na: lipoproteiny obsahují lipidovou složku, glykoproteiny obsahují sacharidovou složku, fosfoproteiny obsahují zbytky kyseliny fosforečné, metaloproteiny obsahují kationty kovů, hemoproteiny obsahují krevní barvivo hem, nukleoproteiny obsahují části nukleových kyselin (Břížďala 2024).

Ad b) Podle fyzikálních vlastností

- **Tvaru:**
Fibrilární mají tvar dlouhého vlákna (kolagen, keratin).

Globulární mají tvar klubka (enzymy, albuminy, protilátky).

- **Rozpustnosti**

Rozpustné ve vodě (albuminy) nebo v slabých roztocích kyselin, zásad a solí (globuliny)
Nerzpustné ve vodě je většina fibrilárních bílkovin (tzv. skleroproteiny)
a globulárních bílkovin obilných zrn (gluteliny, prolaminy) (Břížďala 2024).

Ad c) Podle funkce v organismu jsou bílkoviny rozděleny následovně (Roubík 2018; Bailey 2023):

- **Strukturní bílkoviny** jsou vláknité, provázané bílkoviny, které jsou podporou jiných bílkovin, jako je keratin, kolagen a elastin. Keratin zpevňuje ochranné vrstvy, jako je kůže, srst, peří, zobáky, rohy. Kolagen a elastin poskytují oporu pojivovým tkáním, jako jsou šlachy a vazy.
- **Enzymatické (katalytické, řídicí) bílkoviny** jsou všechny dosud identifikované enzymy, které jsou katalyzátory všech metabolických reakcí, umožňující organismu vytvářet chemické látky nezbytné pro život, jako jsou bílkoviny, sacharidy, tuky, přeměňovat a rozkládat je na jiné potřebné látky. Život bez enzymů není možný.
- **Transportní bílkoviny** jsou přenašeči, které přemísťují molekuly a ionty z jednoho místa na druhé nebo přes membránu. Nejznámější je hemoglobin, který je zodpovědný za přenos kyslíku v krvi prostřednictvím červených krvinek.
- **Zásobní bílkoviny** jsou zásobárnou aminokyselin, které jsou připraveny k použití. Mezi zásobní bílkoviny lze zařadit například ovoalbumin, který je ve vaječných bílcích, kasein neboli mléčná bílkovina. Ferritin je další zásobní bílkovina, která uchovává železo v transportní bílkovině, hemoglobinu.
- **Pohybové bílkoviny** jsou tzv. kontraktilní bílkoviny zodpovědné za svalovou kontrakci a pohyb. Mezi tyto bílkoviny se řadí například aktin a myozin. Eukaryotické buňky mají obvykle velké množství aktinu, který řídí svalovou kontrakci i pohyb a dělení buněk. Myosin neboli motorový protein, dodává aktinu energii.
- **Obranné bílkoviny** jsou specifické bílkoviny zajišťující protilátky a obrannou schopnost organismu bránit se antigenům a cizím původcům různých nemocí. Mají schopnost pohybovat se krevním řečištěm a tím je umožněno, aby je imunitní systém využíval k identifikaci a obraně před viry, bakteriemi a jinými původci onemocnění. Jedním ze způsobů, jak protilátky působí proti antigenům, je jejich znehybnění a následné zneškodnění bílými krvinkami.
- **Regulační (hormonální) bílkoviny** jsou kurýrní bílkoviny, které pomáhají koordinovat tělesné funkce. Příkladem těchto bílkovin je inzulin (pro řízení koncentrace glukózy v krvi), oxytocin a somatotropin.

3.1.1 Definice a rozdělení aminokyselin

Bílkoviny se skládají z aminokyselin spojených peptidovými vazbami a jsou hlavním zdrojem dusíku ve stravě. Dusík je nenahraditelným prvkem aminokyselinové páteře, který určuje její množství a kvalitu bílkovin. Homeostáza dusíku je vysoce regulovaná funkce, která se podílí na fungování hemu, hormonů, imunitních mediátorů, antioxidantů a neurotransmiterů (Smil 2002). K udržení tělesných funkcí a růstu potřebuje organismus určité minimální

množství přijímaných bílkovin a také dostatečný přísun esenciálních aminokyselin, které si tělo samo nesyntetizuje (Gwin 2020).

Aminokyseliny jsou organické kyseliny, základní stavební kameny bílkovin a slouží také jako signály regulující četné biologické dráhy v organismu (Xiao & Guo 2022). Jejich úloha je důležitá nejen při syntéze bílkovin, ale přispívají i k řadě dalších vnitrobuněčných metabolických pochodů, včetně tvorby ATP (adenosin trifosfát), syntézy nukleotidů a redoxní rovnováhy, které podporují buněčné funkce a funkce organismu (Kelly 2020).

Aminokyseliny podle postradatelnosti jsou děleny na esenciální, podmíněně esenciální a neesenciální (NZIP 2024). Tato klasifikace vyplynula ze studií, které ukázaly, že určité aminokyseliny jsou potřebné pro růst nebo dusíkovou rovnováhu i v případě, že je k dispozici dostatečné množství alternativních aminokyselin (Reeds 2000). Klasifikace esenciálních a neesenciálních aminokyselin byla poprvé uvedena ve studiích na počátku 20. století, kdy jedna studie zjistila, že organismus je schopen vyrovnat dusíkovou rovnováhu při stravě obsahující pouze osm aminokyselin (Rose 1957). Pokud nejsou všechny aminokyseliny

ve stravě přítomné, není možné udržet v rámci homeostázy dusíkovou bilanci a následkem jsou různé poruchy organismu. A to i v případě, že je organismus schopen si některé podmíněně esenciální syntetizovat (Hou et al. 2015).

Ačkoliv se v přírodě vyskytují stovky aminokyselin, k výrobě všech bílkovin v těle člověka a ostatních obratlovců je zapotřebí pouze 20 aminokyselin (Wu 2009). Mezi dvacet aminokyselin patří:

Název	Zkratka	Název	Zkratka
Alanin	ALA	Lysin	LYS
Arginin	ARG	Methionin	MET
Asparagin	ASN	Fenylalanin	PHE
Kyselina asparagová	ASP	Prolin	PRO
Cystein	CYS	Serin	SER
Kyselina glutamová	GLU	Threonin	THR
Glutamin	GLN	Tryptofan	TRP
Glycin	GLY	Tyrosin	TYR
Histidin	HIS	Valin	VAL
Isoleucin	ILE	Selenocystein	SeCYS
Leucin	LEU	Pyrolysin*	PYL

* Pyrrolyzin (nepoužívá se při syntéze lidských bílkovin)

Selenocystein a pyrrolyzin jsou nové objevené aminokyseliny a jsou považovány za dvacátou první a dvaadvacátou aminokyselinu (Lopez & Mohiuddin 2023).

Z celkem dvaceti uvedených aminokyselin je devět řazeno mezi esenciální:

- Fenylalanin
- Valin
- Tryptofan
- Treonin
- Isoleucin

- Metionin
- Histidin
- Leucin
- Lysin

Esenciální aminokyseliny, známé také jako nepostradatelné aminokyseliny, jsou takové, které člověk a ostatní obratlovci nedokážou syntetizovat z meziproductů metabolismu (Hou at al. 2015). Tyto aminokyseliny musí být dodávány z exogenní stravy, protože organismu chybí metabolické cesty potřebné k syntéze těchto aminokyselin (Hou & Wu 2018).

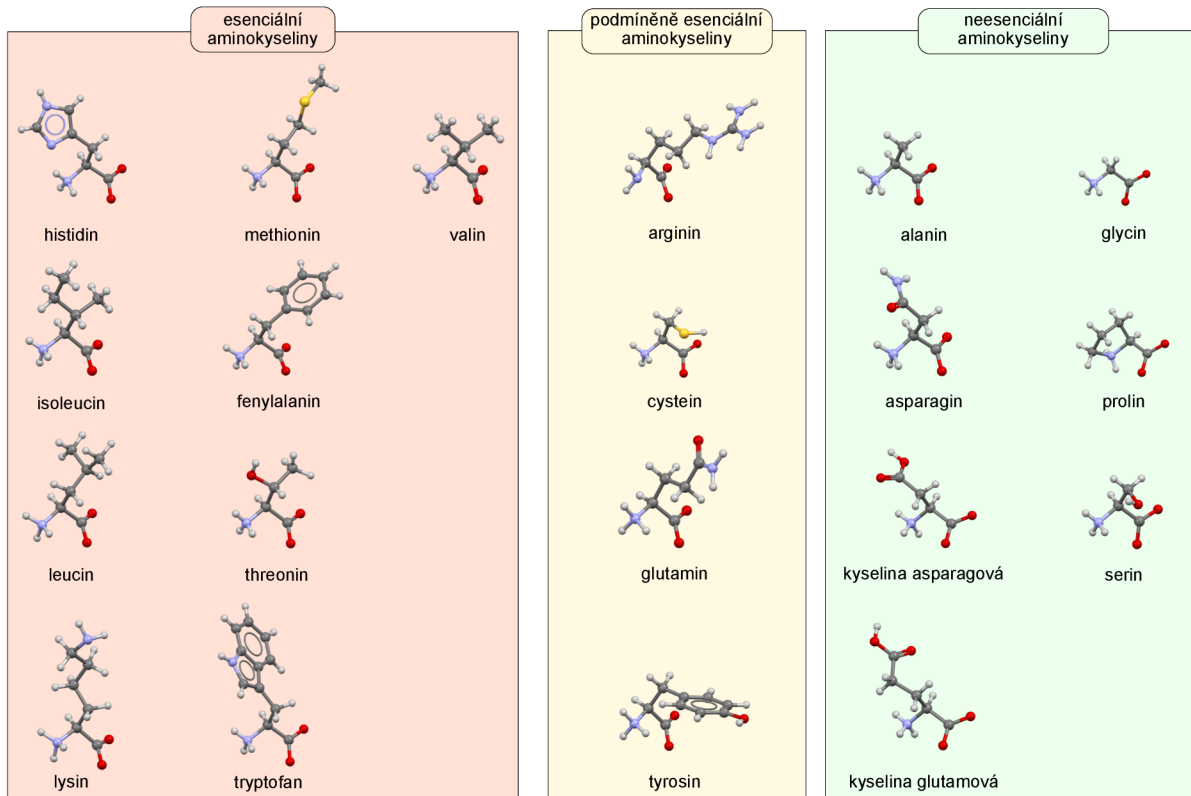
Podmíněně esenciální aminokyseliny jsou nepostradatelné v určitých fázích fyziologického života, např. růst, stres. Zdravý organismus je dokáže za určitých podmínek syntetizovat samo, ale ne při hladovění poruchách metabolismu (Roubík 2018).

Neesenciální aminokyseliny nebo také postradatelné kyseliny. Organismus dokáže tyto aminokyseliny syntetizovat pouze pomocí esenciálních aminokyselin.

Některé neesenciální aminokyseliny, jako např. arginin a histidin lze v určitých fázích považovat za esenciální, protože organismus je nedokáže vytvářet v dostatečném množství v určitých fyziologických obdobích růstu, březosti nebo po úrazech (de Koning 2013).

Grafické znázornění esenciálních, podmíněně esenciálních a neesenciálních aminokyselin je uvedeno v Obrázku 2.

Barevně jsou odlišeny atomy uhlíku (šedá), vodíku (bílá), dusíku (modrofialová), kyslíku (červená) a síry (žlutá).



Obrázek 2: Chemická struktura dvaceti základních aminokyselin, ze kterých se skládají proteiny.

(Zdroj: NZIP 2024)

3.2 Stravitelnost bílkovin

Stravitelný protein je podíl proteinu, který je stráven a absorbován ve formě aminokyselin (Lemme at al. 2004).

Termín disponibilní (dostupné) aminokyseliny je používaný termín v různých oblastech výzkumu. Podle definice Hurrella a Carpentera (Batterham at al. 1979) disponibilní aminokyseliny označují podíl aminokyselin v potravě, které jsou stráveny a vstřebány ve formě, která je vhodná pro syntézu bílkovin, ale neodkazuje na množství skutečně využitých aminokyselin z potravy (Rutherford & Moughan 2012).

Faktory potravní matrice, které ovlivňují stravitelnost bílkovin lze rozdělit na endogenní a exogenní. Endogenní faktory se týkají bílkovin jako takových, tj. strukturních vlastností bílkovin a toho, jak a do jaké míry může zpracování potravin tuto strukturu ovlivnit. Exogenní faktory se vztahují k potravinové matici jako takové a zahrnují interakce bílkovin s jinými sloučeninami, jako jsou sacharidy, lipidy a zejména antinutriční faktory (Orlien at al. 2021).

Stravitelnost bílkovin v potravinách závisí na různých faktorech, jako je zpracování, struktura bílkovin a přítomnost sloučenin, které brání trávení, označovaných jako antinutriční faktory. Zlepšení stravitelnosti rostlinných zdrojů bílkovin vyžaduje zohlednění těchto faktorů (Sá et al. 2019; Fernandez et al. 2020).

3.2.1 Metoda in vivo

Touto metodou je odhad stravitelnosti prováděn tak, že krmná složka podávána určenému zvířeti je následně vyhodnocena na stravitelnost bílkovin a aminokyselin. Stravitelností se míní ta část pozřené potravy, resp. živin, kterou tělo dokáže využít, tj. kterou umí rozložit a vstřebat.

Metoda in vivo je založena na stanovení stravitelnosti jako množství spotřebovaného dusíku organismem vzhledem k množství dusíkatých látek přijatých organismem v potravě a dusíkatých látek vyloučených organismem.

Do metod in vivo lze zahrnout metody, jako je poměr účinnosti bílkovin (PER), hodnocení stravitelnosti bílkovin korigované na aminokyseliny (PDCAAS) a hodnocení stravitelných nepostradatelných aminokyselin (DIAAS) (Sá & House 2024).

3.2.2 Metody in vitro

Metody in vitro si navíc získávají pozornost z etických důvodů a z důvodu nákladové efektivity. Tyto testy by měly věrně simulovat trávicí proces zamýšleného zvířete. V závislosti na povaze výzkumu se očekává, že zamýšlená zkouška in vitro by měla být reprodukovatelná, levnější než dostupné zkoušky in vivo a měla by být jednoduchá

na provedení a zároveň poskytovat rychlé (Sá & House 2024).

Metoda stanovení proteinů in vitro je technika umožňující kvantifikaci množství bílkovin, které jsou přítomny mimo biologický systém. To může být například v buněčných lysátech, v extrahovaných vzorcích, nebo kulturách buněk. Nejznámější metodou stanovení bílkovin in vitro je Bradfordova metoda (Bradford 1976), jež využívá schopnost barviva „Coomassie Brilliant Blue G-250“ navázat se na bílkoviny a měnit svou absorpci v UV/VIS spektru v závislosti na jejich koncentraci. Metoda vyžaduje přípravu standardních vzorků bílkovin různých koncentrací např. z bovinního sérového albuminu (BSA)¹, které se míchají s Bradfordovým reagens (tj. Coomassie Brilliant Blue G-250, kyselina fosforečná a methanol). Roli hraje čerstvost a ochrana před světlem, které může ovlivnit vlastní reakci. Inkubace při pokojové teplotě trvá cca 5-10 min a následně je měřena absorbance každého vzorku spektrofotometrem při vlnové délce 595 nm. Naměřené hodnoty pak vytváří standardní křivku, na jejímž základě je vypočítávána koncentrace bílkovin.

¹ Bovinní sérový albumin (BSA) je protein krevní plazmy izolovaný a popsán u hovězího dobytka, který tvoří přibližně 52-60 % všech plazmatických bílkovin. Jedná se o globulární protein o molekulové hmotnosti 67 kDa skládající se z 583 aminokyselin (Bujacz 2012).

3.3 Nutriční potřeby hospodářských zvířat

Ochrana hospodářských zvířat před hladem a žízní je základem dobrých životních podmínek. Podle hlavních zásad podmiňujících welfare zvířat se v prvním bodě z pěti bodů uvádí, že zvířata by měla mít “svobodu od hladu a žízně“ (Farm Animal Welfare Council 2003).

Cílem chovu hospodářských zvířat určených k výživě lidí je porážet zvířata v mladém věku tak, aby dosahovala co největších přírůstků. V takových případech mají zvířata obvykle přístup ad libitum k dobře vyváženému krmivu s vysokou nutriční hodnotou, která podporuje rychlý růst, nebo může být naopak záměrně zpomalen z důvodu ochrany zvířat před nepříznivými zdravotními vlivy nebo pro uspokojení požadavků trhu na pomaleji rostoucí zvířata (Savory & Maros 1993).

Zvířata lze považovat za “maximalizátory“ ve smyslu, že jejich příjem potravy se řídí “pravidlem“, že chovatel by měl vždy usilovat o maximální příjem živin, aby podpořil maximální produkci (de Jong at al. 2003).

Výzkum výživy hospodářských zvířat je proto stále potřebný, aby se snížily výrobní náklady zvýšením účinnosti metabolismu (Hocquette at al. 2007).

Zvířata musí organické živiny získávat z vnějších zdrojů. Vzhledem k tomu, že obsah bílkovin ve většině rostlin je nízký, potřebují zvířata, jako jsou přežvýkavci (např. krávy), která se živí pouze rostlinným materiálem, aby uspokojila své požadavky na aminokyseliny, velmi velké množství rostlinného materiálu.

Monogastři, včetně člověka, získávají bílkoviny hlavně ze zvířat a jejich produktů - např. masa, mléka a vajec. Semena luštěnin se stále častěji používají k přípravě levných potravin bohatých na bílkoviny (Haurowitz at al. 2024).

Bílkoviny jsou jedna z nejdůležitějších složek ve výživě zvířat. Kromě důležité role při růstu plní také v těle i celou řadu funkcí, jako je enzymatická aktivita, transport živin a dalších důležitých látek přes buněčnou membránu (Wu at al. 2014).

Potřeba bílkovin a jejich poptávka u hospodářských zvířat se stala jedním z kritických problémů ve výživě v celosvětovém měřítku. Požadavek na bílkoviny byl po dlouhou dobu jednoznačně vyjádřen sójovým šrotem a živočišnými bílkovinami, ale v poslední době se

v souvislosti s jejich využitím objevují určitá omezení a dostupnost vysoce kvalitní rybí moučky se neustále snižuje. Z tohoto důvodu se zvyšuje poptávka po hledání nových zdrojů bílkovin, které by mohly být alternativou sójové moučky a rybí moučky (Mezés 2018).

Nedostatečný příjem bílkovin ve stravě obsahujících esenciální aminokyseliny vede ke zvýšenému úbytku svalových bílkovin, což vede ke snížení růstu a úbytku svalové hmoty. Následně může dojít ke zhoršení imunity a ke snížení hormonální a enzymatické aktivity (Wolfe 2006).

Cílem výživy přežvýkavců bílkovinami je zajistit dostatečné množství bílkovin rozložitelných v batoru pro optimální účinnost batoru a dosáhnout požadované užitkovosti zvířat s minimálním množstvím hrubého proteinu v krmivu (Bahrami-yekdangi at al. 2016).

U přežvýkavců lze bílkoviny rozdělit na dva typy: rozložitelné a nerozložitelné bílkoviny v batoru.

- **Rozložitelné bílkoviny** jsou rozkládány enzymy vylučovanými batorovými bakteriemi, jako jsou proteáza, peptidáza a deamináza. Bílkoviny se následně mění na peptidy, aminokyseliny a amoniak. Ten se pak přeměňuje na mikrobiální protein

(obsahuje až 72 % hrubého proteinu), který se posunuje v tekuté a pevné formě tráveniny směrem do střeva, aby se tam vstřebal jako aminokyseliny a peptidy a tím poskytl 50–80 % vstřebatelného pravého proteinu (Bach at al. 2005; Kaufman 2016).

- **Nerazložitelné bílkoviny** jsou tzv. pravé bílkoviny, které nejsou rozkládány bachorovými mikroby, nýbrž se dostávají přímo do bachoru a tenkého střeva, kde je organismus přímo využívá. Bílkoviny jsou tráveny v tenkém střevě, kde se vstřebá přibližně 80 % jako aminokyseliny s mikrobiálním proteinem pro tkáňové využití. Nerazložitelné bílkoviny ve srovnání s mikrobiálním proteinem jsou důležité pro poskytování vysoce produktivních aminokyselin vysoce produktivním přežvýkavcům (Owens at al. 2014).

U přežvýkavců mají bílkoviny tři hlavní funkce (Tedeschi at al. 2015):

- uspokojit požadavky mikrobů bachoru na rozložitelné bílkoviny, důležité pro maximální trávení sacharidů a maximální mikrobiální syntézu bílkovin
- poskytnout bílkoviny potřebné pro udržení zdraví, růst, reprodukci při minimálním příjmu rozložitelných bílkovin
- uspokojit požadavky vysoce produktivních přežvýkavců na aminokyseliny při použití minimálního množství hrubého proteinu v krmivu

Vysoce produktivní přežvýkavci vyžadují vyšší podíl rozložitelných bílkovin ve výživě, aby splnili požadavky na aminokyseliny v postruminální fázi (Sharif 2019).

Efektivní užitkovost přežvýkavců vyžaduje optimální množství bílkovin, energie a poměr rozložitelných a nerazložitelných bílkovin v krmivu. Produktivitu zvířat lze zvýšit zajištěním dostupnosti sacharidů a bílkovin v bachoru (Hall 2013).

Nízká hladina rozložitelných bílkovin může snížit množství amoniaku – dusíku v bachoru, příjem sušiny, a mikrobiálního proteinu. Naopak nadměrné množství rozložitelných bílkovin bude s největší pravděpodobností degradováno na amoniak – dusík, který se vstřebá do krve a poté se v játrech přemění na močovinu a následně je vyloučen močí (Bahrami-yekdangi at al. 2016).

3.4 Stanovení kvality bílkovin

Pojem kvalita bílkovin je nejčastěji spojován s nutriční hodnotou potravin. Nejčastěji se vztahuje ke složení aminokyselin bílkovin. Může se také vztahovat k přítomnosti glykace nebo glykosylace nebo k sekvenci aminokyselin (Marable 1980). Kvalitu bílkovin lze také definovat jako schopnost bílkovin uspokojit potřebu aminokyselin a dusíku v organismu a je dána složením aminokyselin a stravitelností bílkovin a také biologickou dostupností jednotlivých aminokyselin (Boye at al. 2012).

Zjišťování kvality bílkovin ve stravě využívá metod, které se týkají reakcí zvířat (často potkanů) podáním testované bílkoviny. Tyto metody mají výhodu, že odrážejí přísun esenciálních mastných kyselin a stravitelnost bílkovin.

Bílkoviny lze rozlišovat podle schopností uspokojit metabolickou potřebu devíti nepostradatelných aminokyselin a dusíku. Stravitelnost a míra, do jaké se struktura absorbovaných aminokyselin shoduje s potřebnou strukturou, jsou rozhodující pro nutriční kvalitu jednotlivých bílkovin a směsí bílkovin. V minulosti se kvalita bílkovin měřila pouze

v růstových pokusech s potkany a vyjadřovala se parametry jako poměr účinnosti bílkovin PER (Protein Efficiency Ratio) a ukazatel zadrženého dusíku NPU (Net Protein Utilization). PER porovnává růstovou reakci mladých potkanů, kterým bylo podáváno mezní množství testované bílkoviny, s růstovou reakcí kontrolních potkanů, kterým bylo podáváno podobné množství kaseinu, a NPU je vlastně součinem stravitelnosti (trávení a vstřebávání) a biologické hodnoty (množství využitého dusíku děleno množstvím vstřebeného dusíku).

Hlavní nevýhodou těchto metod je, že struktura potřeby aminokyselin u potkanů není totožná se strukturou potřeby aminokyselin u lidí, a proto je jediným správným měřítkem kvality bílkovin hodnocení dusíkové bilance u lidí. To je však pro rutinní použití příliš nákladné (Schaafsma 2012).

Stanovení bílkovin v krmivech nemusí být jednoduchý postup, vzhledem k tomu, že krmiva obsahují řadu jiných složek, jako jsou tuky, sacharidy a jiné mikroživiny. Vzhledem k možným interakcím může docházet k podhodnocení obsahu bílkovin (Wilson & Walker 2010; Chang & Zhang 2017).

Kromě toho jsou různé metody založeny na různých analytických principech a obsah bílkovin určují buď přímo, nebo nepřímo.

- **Přímé stanovení** bílkovin je takové, kdy se obsah bílkovin vypočítá na základě analýzy zbytků aminokyselin.
- **Nepřímé stanovení** bílkovin lze například odvodit po stanovení obsahu dusíku nebo po chemických reakcích s funkčními skupinami v bílkovině.

Dalším faktorem, který může přispět k nepřesnostem při stanovení obsahu bílkovin, je extrakce bílkovin. Některé metody vyžadují před analýzou určitý stupeň extrakce bílkovin, a proto může výtěžnost extrakce ovlivnit výsledky (Wilson & Walker 2010).

Při výpočtech kvality bílkovin se zohledňují měřítka zahrnující biologickou hodnotu bílkovin, kterou lze definovat jako procento absorbovaného dusíku zadrženého v těle, a skutečnou stravitelnost bílkovin, která je definována jako procento skutečného dusíku absorbovaného ze střeva podle Mitchellovy metody (Hayes 2020). Výživnou hodnotu bílkoviny je možné zjistit tak, že bílkovinná hodnota je vynásobena se skutečnou stravitelností.

Existuje několik dalších metod a variant měření kvality bílkovin, včetně poměru účinnosti bílkovin (PER), metody PDCAAS (protein digestibility corrected amino acid score) schválené FAO a nověji metody DIAAS (digestible indispensable amino acid score), která je schválena FAO jako náhrada PDCAAS a která se obvykle provádí na modelu potkanů (Rutherford 2015).

PER (protein efficiency ratio) metoda neboli poměr účinnosti bílkovin je nejjednodušší metoda hodnocení kvality bílkovin. Je založena na obecně přijaté myšlence, že rychlost růstu odstavených potkanů za standardizovaných podmínek poskytuje spolehlivé měřítko hodnoty bílkovin v potravě (Mina et al. 1973). PER lze vyjádřit vzorcem:

$$PER = \frac{\text{Přírůstek tělesné hmotnosti}}{\text{Množství zkonsumovaných bílkovin}}$$

Podmínky sběru údajů PER jsou standardizovány. Používají se potkani, kteří se odstavují ve věku 21 dnů. Pro hodnocení se používají bílkoviny v koncentraci 10 % sušiny krmiva.

PER testované bílkoviny by se měla porovnávat s PER ovoalbuminu, který je podáván kontrolní skupině potkanů. Během třítydenního krmného pokusu se zaznamenává dosažená hmotnost a spotřebované krmivo.

V Kanadě se k určení tvrzení o obsahu bílkovin používá systém hodnocení bílkovin PER prostřednictvím biologického testu, který sleduje přírůstek hmotnosti potkanů po dobu 28 dnů v závislosti na spotřebě bílkovin (Canadian Food Inspection Agency 2021).

Nevýhodou je, že test lze provádět pouze u rostoucích zvířat, nelze jej použít ke stanovení potřeby bílkovin pro udržení, ale pouze kombinované potřeby pro růst a udržení. Dalším problémem je, že PER nemůže rozlišovat mezi hmotností získanou jako tuk a jako svalová tělesná hmotnost.

Výhodou testu je, že jediným potřebným vybavením jsou klece pro potkany, nádoby s krmivem, láhve s vodou a váha (Brody 1999).

3.4.1 PDCAAS metoda

V roce 1989 doporučila FAO/WHO pro hodnocení kvality bílkovin používat metodu PDCAAS (Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score), která zohledňuje jak obsah nepostradatelných aminokyselin v testované bílkovině, tak její stravitelnost (WHO/FAO/UNU 2007). PDCAAS je široce používaný test pro hodnocení kvality bílkovin. Jedná se o chemické skóre (AAS), které je odvozeno z poměru mezi první limitující aminokyselinou v testované bílkovině a odpovídající aminokyselinou v referenčním vzorku aminokyselin a korigováno na skutečnou stravitelnost dusíku ve stolici. Chemické skóre přesahující 100 % je zkráceno na 100 % (Schaafsma 2012).

Ve zprávě WHO/FAO/UNU z roku 2007 se připouští omezení hodnot PDCAAS, které vyplývá ze zkráceného hodnocení aminokyselin, tedy nezapočítávání dalších nepostradatelných aminokyselin. Zpráva navrhuje, že toto omezení lze překonat vytvořením dodatečného indexu kvality bílkovin, v němž je zastoupen obsah esenciálních aminokyselin, které jsou v jednotlivých bílkovinách nejčastěji omezené, např. lysin (obiloviny), sirté aminokyseliny (bílkoviny luštěnin), threonin (některé obiloviny) a tryptofan (kukuřice). Tento index se nazývá SP (Supplementation Power) a jeho použitím pro určitou bílkovinu lze snadno získat vynásobením skóre každé z těchto aminokyselin skutečnými hodnotami stravitelnosti (FAO/WHO/UNU 2007). Hodnoty aminokyselin (mg/g bílkovin) se získají vydělením potřeby esenciálních aminokyselin ve stravě (mg/kg tělesné hmotnosti) minimálním množstvím bílkovin potřebným pro přiměřený růst a udržení (g/kg tělesné hmotnosti). Závisí na věku, fyziologickém stavu a zdravotním stavu. Skórovací vzorce jsou založeny na minimálních požadavcích normálních zdravých jedinců. Nemusí nutně představovat optimální proteinovou výživu. Přístup PDCAAS tvrdí, že zvýšená oxidace aminokyselin odráží neefektivní využití aminokyselin, ale ignoruje role aminokyselin nad rámec požadavků na udržení a růst, jako je například jakýkoli přechodný signální vliv před oxidací (Millward et al. 2008).

Současné hodnocení PDCAAS nebere v úvahu potenciální rozdíly v biologické dostupnosti aminokyselin z potravinového zdroje bílkovin, takže zpracování nebo skladování

potravin při vyšších teplotách může selektivně snížit biologickou dostupnost lysinu Maillardovou reakcí (Moughan 2005).

Ačkoliv je PDCAAS rychlou a relativně levnou rutinní metodou pro hodnocení kvality bílkovin, pro měření skutečné stravitelnosti dusíku je stále nutnost dělat pokusy na zvířatech. Vzhledem k negativnímu postoji lidí k pokusům na zvířatech, by bylo pravděpodobně lepší využívat k ověření kvality bílkovin používat metody *in vitro* (Schaafsma 2012). PDCAAS lze tedy vyjádřit pomocí vzorců:

$$\text{Skutečná stravitelnost [\%]} = ((\text{příjem dusíku} - (\text{ztráty dusíku výkaly} - \text{metabolické ztráty dusíku})) \div \text{příjem dusíku}) \times 100$$

Kde příjem dusíku je stanoven prostřednictvím spotřeby krmiv ztráty dusíku fekálním dusíkem a metabolické ztráty dusíku stanovením dusíku ve stolici u potkanů konzumujících stravu bez bílkovin.

$$\text{PDCAAS [\%]} = \text{Skutečná stravitelnost bílkovin} \times \text{chemické skóre (AAS)}$$

Kde se AAS určuje porovnáním aminokyselinového složení zdroje bílkovin s referenčním vzorcem doporučeným FAO/WHO. Za AAS se považuje nejnižší poměr aminokyselin (Nosworthy 2018).

Připouští se, že metodika PDCAAS má nedostatky. Nicméně i když zprávy FAO uvádějí přesvědčivé důkazy pro nahrazení PDCAAS metodikou DIAAS, důsledky tohoto přechodu by měly být plně zváženy před širokým přijetím DIAAS jako měřítka kvality bílkovin (FAO 2013; FAO 2014).

3.4.2 DIAAS metoda

Do roku 2012 byla metoda PDCAAS, tzv. chemické skóre (AAS) korigované na stravitelnosti bílkovin, pro kvantifikaci a charakterizaci kvality bílkovin v potravinách. Po roce 2012 FAO vydalo zprávu, která prosazuje používání metody DIAAS, tzv. skóre stravitelných nepostradatelných aminokyselin (FAO 2013; FAO 2014). Pro výpočet DIAAS je nutné stanovit stravitelnost jednotlivých aminokyselin na konci tenkého střeva (ilea). Jako vhodný model pro odhad stravitelnosti hrubého proteinu a aminokyselin v potravinách pro lidi bylo zvoleno prase. Tato metoda se jeví jako přesnější, jelikož není ovlivněna schopností střevních bakterií využít aminokyseliny a peptidy, které nepochází z krmiva (Mathai et al. 2017).

Na základě marginálních rozdílů ve stravitelnosti bílkovin mezi potravinami se navrhuje zjednodušené stanovení kvality bílkovin, které je založeno na hodnocení esenciálních aminokyselin spolu s obecnými koeficienty stravitelnosti, které jsou stanoveny metodikami *in vitro* (Marinangeli & House 2017).

Ačkoli je DIAAS nejnovější metodou hodnocení kvality bílkovin, stále se v žádné jurisdikci nepoužívá pro zdůvodnění tvrzení o obsahu bílkovin (Loveday 2019). Kromě toho se s rostoucí averzí vůči pokusům na zvířatech zkoumají metody *in vitro* pro měření PDCAAS a DIAAS jako rychlé a nákladově efektivní alternativy, které jsou dobře v souladu se směrnicemi a předpisy pro výživu bílkovin (Ariëns et al. 2021).

3.4.3 Stanovení na základě obsahu dusíku

Hrubý protein lze definovat jako celkový obsah proteinu bez ohledu na jeho původ, zda je rostlinný nebo živočišný.

Analýzu bílkovin komplikuje skutečnost, že některé složky potravin mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti. Pro měření obsahu bílkovin byla vyvinuta řada metod. Základní principy těchto metod zahrnují stanovení dusíku, peptidových vazeb, aromatických aminokyselin, schopnosti vázat barviva, ultrafialové absorpční schopnosti a vlastností rozptylu světla (Jain et al. 2020).

Níže jsou popsány tyto metody: Kjeldahlova metoda, metoda podle Barnsteina, Dumasova metoda, NIR metoda.

Kjeldahlova metoda je kvantitativní analýza pro stanovení celkového dusíku. Metoda je založena na horkém rozkladu, destilaci a titraci (Saha et al. 2012). Využívá kyselinu sírovou (pro horký rozklad), různé katalyzátory a soli k přeměně vázaného organického dusíku ve vzorcích na amonium s jeho následnou titrací (Sáez-Plaza et al. 2013). Kjeldahlova metoda zjišťuje celkový obsah bílkovin nepřímým měřením dusíku a následným vynásobením konverzním faktorem (Moore et al. 2010). Po stanovení dusíku je nutné pro zjištění obsahu bílkovin převést pomocí konverzního faktoru:

$$\text{Bílkoviny [\%]} = 6,25 \times N [\%]$$

(Owusu-Apenten 2002)

Tato metoda široké využití v oblastech kontroly potravin, krmiv, hnojiv a dalších zemědělských materiálů, biologických tkání a farmaceutických analýz.

Navzdory některým negativním faktorům (tj. je nebezpečná, zdlouhavá a náročná na práci) zůstávají Kjeldahlova metoda a její varianty s instrumentální úpravou přesnými a spolehlivými metodami (Sáez-Plaza et al. 2013).

Stanovení touto metodou je také ukotveno v Nařízení Komise (ES) č. 152/2009 ze dne 27.ledna 2009, kterým se stanoví metody odběru vzorků a laboratorního zkoušení pro úřední kontrolu krmiv.

Metoda podle Barnsteina je používána u stanovení bílkovin v organických krmivech. Principem metody jsou nejprve bílkoviny vysráženy měďnatou solí. Ve vzniklé jsou následně stanoveny dusíkaté látky metodou podle Kjeldahla.

Pro Českou republiku je využívána metoda Barnsteina spolu s metodou podle Kjeldahla. Tyto metody využívá Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř v rámci v Jednotných pracovních postupů – zkoušení krmiv, 10020.1 – Stanovení obsahu bílkovin.

Dumasova metoda je hojně používána ke stanovení dusíku včetně anorganických frakcí. Tato metoda spadá do tzv. spalovacích metod, kterou zavedl v roce 1831 Jean-Baptiste Dumas (Marinangeli & House 2017). Je založena na kvantitativním spalném rozkladu vzorku při teplotě 900 °C v přebytku kyslíku (Mihaljev et al. 2015). Dumasova metoda pro stanovení kvantitativního množství organického dusíku je stejně přesná jako Kjeldahlova metoda, ale výrazněji rychlejší ve stanovení, a to méně než 4 minuty na jedno měření oproti hodinám u Kjeldahlovy metody (McClements 2003). Dumasova metoda je v průmyslovém prostředí

náročná kvůli vysokým nákladům na vybavení zařízení, jejich údržbu a proškolený personál (Ingle et al. 2016).

Near-infrared (NIR) je kontrola jakostních parametrů v potravinářském a krmivářském průmyslu, která v posledních třiceti nabyla na významu a používá se ke stanovení obsahu sacharidů, bílkovin, tuků a vlhkosti v různých potravinách (Alamprese et al. 2013).

Výhodou je, že tato metoda je rychlá, levná a ekologická (bez použití chemikálií a činidel) doplňková metoda (Ingle et al. 2016). Je založena na obsahu bílkovin ve vzorku stanovením metody propustnosti v blízké infračervené oblasti (Mihaljev et al. 2015). Jedná se o nedestruktivní metodu, která se široce používá k určení organických sloučenin v obilovinách na základě interakce elektromagnetických vln. Tato metoda nabízí časově i finančně nenáročnou možnost analýzy kvalitativních parametrů zrna (Chadalavada 2022).

Oblast NIR se rozprostírá od 800 do 2500 nm, mezi viditelnou oblastí od 380 do 780 nm a oblastí MIR od 2500 do 15 000 nm. Všechny molekuly obsahující vodík mají měřitelné NIR spektrum, což vede k tomu, že pro NIR analýzu je vhodná široká škála organických materiálů (Manley 2014).

Jak již bylo uvedeno, hlavní výhodou je rychlost. Na druhou stranu je nutné provádět kalibrace na základě velkého množství vzorků (minimálně 30) (Mihaljev et al. 2015).

3.5 Reologické vlastnosti bílkovin

Reologie je věda, která se zabývá kvalitativním a kvantitativním popisem deformací hmot a tokem látek s ohledem na napětí a čas. Z reologického hlediska, lze potravinářské a krmivářské materiály charakterizovat jako viskózní, viskoelastické a elastické (Zheng 2019). Studium reologických vlastností potravin je užitečné a důležité pro navrhování průběhu procesů, kontrolu kvality a skladování, minimalizaci texturních vad a poznání jejich molekulárních a konformačních změn (Nevara et al. 2021).

Proteiny jsou nejrozšířenější povrchově aktivní polymery v přírodě. Adsorbují se na rozhraní mezi téměř jakýmkoli dvěma různými fázemi a mohou vytvářet vysoce stabilní filmy, které následně propůjčují membránám, pěnám, emulzím a disperzím obecně důležité stabilitní vlastnosti (Murray 2011).

Funkční vlastnosti bílkovin, jako je emulgace, pění, gelování, denaturace, rozpustnost mohou ovlivnit sensorické, hydratační, povrchové a texturní vlastnosti potravin (Stefanović et al. 2017; Gharibzahedi & Smith 2020).

Vzhledem k tomu, že potraviny a krmiva jsou velmi složité strukturované materiály, které zahrnují bílkoviny, sacharidy, tuky a vlákninu, ovlivňuje přítomnost a množství těchto složek chování bílkovin (Ahmed et al. 2017). Kromě složení jsou ještě další vlivy, které ovlivňují reologické chování struktury potravin (gel, emulze, pěna), pH, teplota, iontová síla a podmínky zpracování a skladování (Goff & Guo 2019).

Při zpracování jsou reologické vlastnosti velmi důležité, abychom přesně poznali jejich chování (Jambrak et al. 2009). V různých produktech jsou přítomny bílkoviny, které mohou díky svým želírujícím, zahušťujícím a povrchově aktivním vlastnostem ovlivnit texturu, strukturu, trvanlivost a stabilitu potravin (Xiong et al. 2016). V souladu se svou povahou jsou tyto polymery široce využívány ve stále větším počtu průmyslových a výzkumných aplikací (Migliozzi et al., 2019). Znalost struktury proteinů je důležitá pro pochopení jejich vlastností,

jako je viskozita, která hraje důležitou roli při následném zpracování, trvanlivosti, textury a chuti. Viskozita roztoků izolátů bílkovin souvisí s jejich funkčními skupinami, formou a poměrem, v jakém jsou tyto skupiny uspořádány, molekulovou hmotností, tvarem, velikostí, nábojem a pružností molekuly, jakož i se propletením mezi řetězci a interakcí s rozpouštědly (Vargas et al. 2021).

Strukturní modifikace živočišných a rostlinných bílkovin by proto mohla vést k lepším funkčním vlastnostem díky odhalení skrytých hydrofobních a hydrofilních skupin, a tím k modifikaci reologických vlastností bílkovin (2022).

3.5.1 Emulgace

Bílkoviny díky své amfifilní vlastnosti (obsahují hydrofilní a hydrofobní molekuly), která jim umožňuje snižovat povrchové napětí na rozhraní oleje a vody (Lam & Nickerson 2013).

Emulgační vlastnosti se hodnotí pomocí indexu emulgační aktivity (EAI) a indexu emulgační stability (ESI). Index emulgační aktivity je míra množství oleje, které lze emulgovat na jednotku bílkoviny, a ESI měří odolnost emulze po určitou dobu (Nishinari et al. 2018).

Emulze je definována jako disperze dvou nebo více nemísitelných kapalin, v níž je jedna z kapalin rozptýlena v druhé v podobě malých kapiček (0,1-100 μm) (Bos & van Vliet 2001). Je termodynamicky nestabilní systém, který může být v průběhu času destabilizován fyzikálně-chemickými mechanismy včetně gravitační separace, flokulace, koalescence, Ostwaldova zrání a separace fází. Pro vznik a stabilizaci emulze jsou důležitými faktory adsorpce proteinů a snížení povrchového napětí. Na tomto procesu se podílejí molekulární vlastnosti proteinů, včetně struktury, povrchové hydrofobicity a molekulární hmotnosti, které umožňují tvorbu malých kapiček. Velikost kapek přímo souvisí se stabilitou emulze a také s optickými, reologickými a senzorickými vlastnostmi (McClements & Jafari 2018).

Bílkoviny mohou působit jako emulgátor, který má řadu funkcí. Jako například stabilizátor tuku, povrchově aktivní látka, zvlhčovač a změkčovač v různých potravinářských výrobcích, jako jsou nápoje, cukrovinky, přísady do pečiva a mléčné výrobky (Kim et al. 2020).

3.5.2 Pěnění

Pěnovost je jednou z klíčových vlastností při zpracování potravin a obvykle se používá v potravinách pěnového typu (Li et al. 2022). Pěnu lze definovat jako dvoufázový systém sestávající ze vzduchových komůrek, oddělených tenkou souvislou vrstvou kapaliny nazývanou lamelární fází (Zayas 1997). Potravinářské pěny jsou obvykle velmi složité systémy zahrnující směs plynů, kapalin, pevných látek a povrchově aktivních látek.

Tvorba a stabilizace pěny se obvykle dosahuje pomocí povrchově aktivních molekul bílkovin (Amagiani et al. 2021). Přestože většina z nich obsahuje podobné poměry polárních a nepolárních aminokyselin, jejich povrchová aktivita se může značně lišit. To je způsobeno rozdíly v jejich aminokyselinovém složení a sekvenci, velikosti, tvaru a rozložení náboje. Kromě toho hrají neméně důležitou roli vnější parametry, jako je pH, iontová síla a teplota, a také interakce mezi proteiny a dalšími složkami potravin (Patino & Pilosof 2011).

3.5.3 Gelování (želírování)

Želírování bílkovin je jedním z hlavních způsobů, jak dodat krmivům požadovanou texturu. Gelování jednotlivých bílkovin ve vodném roztoku bylo v minulosti intenzivně zkoumáno, ale ve většině potravinářských výrobků obsahuje systém směsi různých typů bílkovin. Proto je třeba vzít v úvahu interakce mezi různými bílkoviny, jak před želírováním, tak během něj (Nicolai 2019).

Gely se vyznačují vysokou viskozitou, plasticitou a elasticitou. Jedná se o vícesložkový systém tvořený strukturotvornou složkou a absorbovanou kapalinou, obvykle rozpouštědlem s nízkou viskozitou. Konkrétně hydrogely lze definovat jako vysoce hydrofilní trojrozměrné (3 D) síť složené ze zesíťovaných řetězců, buď přírodních nebo syntetických polymerů, které jsou schopny pojmout obrovské množství vody (> 90 %) (Gopalakrishnan at al. 2019).

3.5.4 Denaturace

Denaturace je proces měnící molekulární strukturu bílkovin. Zahrnuje přerušení mnoha slabých vazeb nebo např. vodíkových vazeb v molekule bílkovin, které jsou zodpovědné za vysoce uspořádanou strukturu v jejím přirozeném (nativním) stavu. Většina denaturovaných bílkovin je nerozpustná. Denaturace je nevratný proces pro většinu bílkovin (Britannica 2024).

Podle příčiny mohou být rozlišeny dva typy denaturace: vyvolané biologicky nebo nebiologicky.

- **Biologicky vyvolaná** denaturace probíhá v biologických systémech organismu. Mezi tento typ denaturace patří důležité biologické procesy DNA, jako je replikace nebo transkripce, likvidace patogenů v organismu a také denaturace bílkovin v potravinách působením trávicích enzymů.
- **Nebiologicky vyvolaná** denaturace není biologické povahy, ale je vyvolána vnějšími vlivy, které jsou fyzikální nebo chemické. Mezi fyzikální vlivy se řadí např. tepelná úprava, pH, mezi chemické kyseliny a zásady (změna pH) (Tutorials & Dictionary Online 2019). Význam má tedy například tepelná úprava krmiv (tzv. tepelná denaturace), která může zvýšit dostupnost by-pass proteinů (nedegradovatelné dusíkaté látky, které nejsou rozloženy v bacheru) pro skot (Singh at al. 2019). Například tepelně upravený sójový extrahovaný šrot zvlhčený roztokem xylózy používaný při výrobě krmných doplňků (Harstad & Prestløkken 2000) nebo tepelně upravené řepkové pokruty (Tiefenthaler 2008).

3.5.5 Rozpustnost a degradovatelnost bílkovin

Rozpustnost je základním pojmem, který má zásadní význam pro vědu o proteinech. (Kramer at al. 2012; Navarro & Ventura 2019). Pro rozpustnost je rozhodující náboj a polarita aminokyselin a jejich schopnost reagovat s okolními molekulami vody (Liljas at al. 2016).

V krmivářství jsou rozpustnost bílkovin (protein solubility) a index dispergovatelnosti bílkovin² (protein dispersity index-PDI) parametry, které ovlivňují využitelnost a dostupnost živin pro zvířata.

² Dispergovatelnost = schopnost přechodu do vodného roztoku

Index dispergovatelnosti bílkovin (PDI) je způsob porovnání rozpustnosti bílkovin ve vodě (Dudley-Cash 1999). Jde v podstatě o protein, který je skutečně stravitelný v tenkém střevě. V České republice se tento systém používá pro hodnocení dusíkatých látek v krmivu pro přežvýkavce (Rysová 2018).

K odhadu rozpustnosti bílkovin v bacheru se používají techniky in vivo, in vitro a in situ v krmivech. Nejvíce využívanou metodou pro stanovení degradace bílkovin u přežvýkavců je metoda in situ. Zde je sledována inkubace speciálních sáčků se vzorky krmiv v bacheru přežvýkavců. Jsou k tomu potřeba zakanylovaná zvířata. Výsledky jsou však ovlivněny mnoha faktory jako je například postup vkládání sáčku, vyjímání a oplachování, velikost vzorku, doba inkubace, počet a fyziologický stav zvířat, frekvence krmení, mikrobiální kontaminace (Tunkala at al. 2023). Obsah PDI v krmivu můžeme také stanovit s pomocí regresních rovnic (Rysová 2018):

$$PDIN = PDIA + PDIMN$$

$$PDIE = PDIA + PDIME$$

Kde: PDIMN = množství mikrobiálního proteinu, které může být syntetizováno v bacheru z degradovatelného proteinu, jestliže energie není limitující (dostatek energie)

PDIME = množství mikrobiálního proteinu, které může být syntetizováno v bacheru z využitelné energie v bacheru, jestliže degradovatelný dusík není limitující (dostatek dusíku)

PDIA = nedegradovatelné dusíkaté látky, které jsou přímým zdrojem aminokyselin pro zvíře, nejsou odbourávány mikrobiální činností v bacheru a přecházejí dále do slezu a tenkého střeva)

PDIM = mikrobiální protein skutečně strávený v tenkém střevě

Interpretace a vyhodnocení výsledků:

PDIN = PDIE tj. vyvážený poměr živin

PDIN vyšší tj. nutné doplnit energii

PDIE vyšší tj. nutné doplnit do krmiva dusíkaté látky

3.5.6 Cornellský systém

Jak uvádí Třináctý et al. (2013), praxe, spolu s novými systémy hodnocení krmiv, vyžadují pokročilé metody hodnocení krmiv. Metoda in situ pro stanovení degradovatelnosti umožňuje rozdělit dusíkaté látky do tří základních frakcí: frakce A (ve vodě rozpustná), frakce B (nerozpustná, potenciálně degradovatelná v bacheru), frakce C (nedegradovatelná v bacheru) (Třináctý et al. 2016). Dle Sniffena et al. (1992) je frakce C považovaná v tenkém střevě za nestravitelnou.

Cornellský systém představuje čistě laboratorní metodu, která, ve srovnání s metodou in situ nevyžaduje použití kanylovaných zvířat. Pro intestinální stravitelnosti podílů jednotlivých proteinových frakcí uniklých degradaci v bacheru používá paušální hodnoty: intest. strav. RUP-A = 100 %, intest. strav. RUP-B1 = 100 %, intest. strav. RUP-B2 = 100 %, intest. strav. RUP-B3 = 80 % (Třináctý et al. 2016).

3.6 Index esenciálních aminokyselin (EAAI)

Pomocí indexu esenciálních aminokyselin (EAAI - Essential amino acid index) lze stanovit složení aminokyselin v potravinách nebo krmivech (FAO/WHO 1985).

Starší a klasická metoda měření potřeby esenciálních aminokyselin na základě odhadu bilance potřeby dusíku (Rose 1957) byla chybná z důvodu nadměrného příjmu energie, protože energie snižuje potřebu bílkovin (Machado at al. 2020).

Jak uvádí Kacerovský at al. (1990), obsah esenciálních kyselin testované bílkoviny se porovnává s obsahem týchž aminokyselin standardní bílkoviny, jejíž biologická hodnota se považuje za 100, a vyjadřuje se v procentech obsahu aminokyselin ve standardní bílkovině. EAAI je geometrický průměr takto vypočtených poměrů všech esenciálních kyselin. Vypočítá se podle vzorce:

$$EAAI = \sqrt[n]{\frac{A_1}{V_1} \cdot \frac{A_2}{V_2} \cdot \dots \cdot \frac{A_n}{V_n}} \cdot 100$$

Kde: A_1, A_2, \dots, A_n je obsah jednotlivých esenciálních aminokyselin v testované bílkovině
 V_1, V_2, \dots, V_n je obsah týchž aminokyselin ve standardní bílkovině

3.7 Stravitelné aminokyseliny a jejich poměry

Nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím účinnost využití bílkovin je profil stravitelných esenciálních aminokyselin vstupujících do tenkého střeva. Za předpokladu konstantního ideálního aminokyselinového profilu vstřebávaných bílkovin lze vypočítat potřebu všech aminokyselin, když byla stanovena potřeba jedné konkrétní aminokyseliny (Boisen at al. 2000).

Studie in vitro a na zvířatech ukazují, že glykace, známá také jako Maillardova reakce, což je reakce mezi redukcujícími cukry a primárními aminy (NH_2), bílkovin snižuje stravitelnost bílkovin a zhoršuje dostupnost aminokyselin, zejména lysinu (van Lieshout 2020).

Maillardova reakce na jedné straně může přinášet pozitivní změny (např. lepší chuťové vlastnosti a tím lepší příjem krmiva), na druhé straně, vysoké teploty často vedou k již výše zmiňované nutriční ztrátě především u lysinu a sírných aminokyselin, jako je methionin a cystein (Třináctý at al. 2016).

3.8 Reaktivní lysin

Stanovení reaktivního lysinu je dalším důležitým ukazatel, který se používá při hodnocení kvality bílkovin.

Jak již bylo uvedeno, při zpracování krmiv pro domácí zvířata může docházet k Maillardově reakci. Při této reakci reaguje ϵ -aminoskupina lysinu s redukcujícími cukry a stává se pro metabolismus nedostupnou (van Rooijen 2014). Jak uvádí Třináctý at al. (2016), pro stanovení stravitelného (reaktivního) lysinu, se používají speciální metody. Jedna z nich je fluorodinitrobenzenová metoda dle Carpentera (1960) se spektrofotometrickou koncovkou. Dále je možné využití guanidizační reakce, při které se reaktivní lysin přemění na homoarginin, který se následně stanoví chromatograficky (Pahm et al. 2008).

4 Závěr

Předložená bakalářská práce "Metody laboratorního stanovení kvality bílkovin" zahrnuje teoretický přehled a analýzu metod stanovení kvality bílkovin v kontextu krmivářství v chovu hospodářských zvířat. Hlavním cílem práce bylo zhodnotit různé metody laboratorního testování používané k posouzení kvality bílkovin.

Laboratorní metody stanovení kvality bílkovin hrají klíčovou úlohu v mnoha oblastech. Především jde o zajištění kvality krmiva, optimalizace výživy, prevence onemocnění a zajištění bezpečnosti potravin.

Laboratorní metody stanovení kvality umožňují sledovat a zlepšovat složení a využitelnost krmiva, což má vliv na zdraví a výkonnost zvířat. Optimalizace výživy pak zajišťuje naplnění výživových požadavků zvířat při udržitelných ekonomických nákladech. Sledování účinnosti a stravitelnosti bílkovin mohou předcházet potenciálním onemocněním z nesprávně stanovené krmné dávky. V neposlední řadě jde o zajištění bezpečnosti potravin z pohledu eliminace nežádoucích látek v krmivech.

Ukazatelů, které kvalitu bílkovin hodnotí, je celá řada. Mezi základní se řadí ukazatele založené na měření hodnot dusíku, jehož jsou bílkoviny hlavním zdrojem. Jedná se např. o biologickou hodnotu (Biological Value – BV), ukazatel zadržného dusíku (Net Protein Utilisation – NPU) či dusíkovou bilanci. Jako přesnější se postupem času ukázaly kupříkladu chemické skóre (Amino Acid Score – AAS) a index esenciálních aminokyselin (Essential Amino Acid Index – EAAs), které nás informují o zastoupení jednotlivých aminokyselin.

Přehled o aktuálním stavu poznání v oblasti metod stanovení kvality bílkovin v krmivářství může být užitečný pro odborníky v těchto oblastech při výběru a aplikaci vhodných metod pro hodnocení bílkovin v různých druzích krmiv a potravin pro zvířata. Protože se technologie a poznatky v oblasti výživy hospodářských zvířat neustále vyvíjí, je třeba sledovat i v budoucnu výzkum v této oblasti se zaměřením na další vývoj stávajících metod stanovení kvality bílkovin. Pouze prostřednictvím pokroku v této oblasti můžeme dosáhnout lepšího chovu zvířat a zlepšení výživových standardů v krmivářství.

Závěrem lze konstatovat, že laboratorní metody stanovení bílkovin jsou důležitým nástrojem, díky němuž lze dosáhnout zlepšení výživových standardů v krmivářství a lepšího chovu zvířat.

5 Literatura

- Ahmed J, Ptaszek P, Basu S. 2017. *Advances in food rheology and its applications*. Woodhead Publishing, Krakov
- Alamprese C, Casale M, Sinelli N, Lanteri S & Casiraghi E. 2013. Detection of minced beef adulteration with turkey meat by UV-vis, NIR and MIR spectroscopy. *LWT-Food Science and Technology*, **53**(1): 225-232.
- Amagliani L, Silva VDJ, Saffon M, Dombrowski J. 2021. On the foaming properties of plant proteins: Current status and future opportunities, *Trends in Food Science & Technology*, **118**: 261-272.
- Ariëns RM, Bastiaan-Net S, Van de Berg-Somhorst DB, El Bachrioui K, Boudewijn A, van den Dool RTM, de Jong GAH, Wichers HJ, Mes, JJ. 2021. Comparing nutritional and digestibility aspects of sustainable proteins using the INFOGEST digestion protocol. *Journal of Functional Foods* **87**: 104748.
- Bahrami-yekdangi M, Ghorbani GR, Khorvash M, Khan MA, Ghaffari MH. 2016. Reducing crude protein and rumen degradable protein with a constant concentration of rumen undegradable protein in the diet of dairy cows: Production performance, nutrient digestibility, nitrogen efficiency, and blood metabolites, *Journal of Animal Science*, Volume 94, Issue 2, Pages 718–725, Available from: <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9947> (accessed March 2024).
- Bach A., Calsamiglia S., Stern M.D. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy. Sci.* **88**(E. Suppl): E9–E21.
- Bailey Regina. 2023. Proteins in the Cell. Available from: [thoughtco.com/protein-function-373550](https://www.thoughtco.com/protein-function-373550) (accessed January 2024).
- Barrett GC & Elmore DT. 1998. *Amino acids and peptides*. Cambridge University Press. UK.
- Batterham ES, Murison RD, Lewis CE. 1979. Availability of lysine in protein concentrates as determined by the slope-ratio assay with growing pigs and rats and by chemical techniques. *British Journal of Nutrition* **41**(2): 383-391.
- Boisen S & Hvelplund, Torben & Weisbjerg M. 2000. Ideal Amino Acid Profiles as a Basis for Feed Protein Evaluation. *Livestock Production Science* **64**: 239-251.
- Bos MA, Van Vliet T. 2001. Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: A review *Advances in Colloid and Interface Science* **91**: 437-471.
- Boye J, Wijesinha-Bettoni R & Burlingame B 2012. Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *British Journal of Nutrition*, **108**(S2): S183-S211.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**(1-2): 248-254.
- Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "denaturation". *Encyclopedia Britannica*, 7 Feb. 2024. Available from: <https://www.britannica.com/science/denaturation> (accessed April 2024).
- Brody T. 1999. *Nutritional Biochemistry (Second Edition)*, Academic Press, 1999, Pages 421-489, Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-012134836-6/50011-1> (accessed March 2024).

- Břížd'ala J. 2024. E-ChemBook.cz: Multimediální učebnice chemie: Bílkoviny Available from: <http://e-chembook.eu/bilkoviny> (accessed April 2024).
- Bujacz A. 2012. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **68**: 1278-89.
- Canadian Food Inspection Agency Reasonable Daily Intake for Various Foods (Schedule K). 2021. Gov. Canada. Available from: <https://inspection.canada.ca/food-labels/labelling/industry/nutritionlabelling/nutritionfactstable/eng/1389198568400/1389198597278?chap=6>, (accessed April 2024).
- Carpenter KJ. 1960. The estimation of the available lysine in animal-protein foods. *Biochem J.*, **77**, 604–610.
- Chadalavada K et al. 2022. NIR instruments and prediction methods for rapid access to grain protein content in multiple cereals. *Sensors* **22**.10: 3710.
- Chang Sam KC; Zhang Yan. 2017. Food analysis. Springer Cham. Switzerland.
- Cozzone A.J. 2002. Proteins: Fundamental Chemical Properties. In eLS, (Ed.). John Wiley & Sons Ltd, 1-10.
- Davídek J. 2012. Aminokyseliny, peptidy, bílkoviny. Available from: <https://el.lf1.cuni.cz/p51525121/> (accessed March 2024).
- Day L, Cakebread JA & Loveday SM. 2022. Food proteins from animals and plants: Differences in the nutritional and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, **119**: 428-442.
- De Jong IC, van Voorst AS, Blokhuis HJ. 2003. Parameters for quantification of hunger in broiler breeders. *Physiology and Behaviour*, **78**: 773–783.
- De Koning TJ. 2017. Amino acid synthesis deficiencies. *Journal of inherited metabolic disease*, **40**(4): 609-620.
- Dudley-Cash WA. 1999. Methods for determining quality of soybean meal protein important Feedstuffs. **71**(1): 10-11.
- Farm Animal Welfare Council. 2003. Annual Review. FAWC, London.
- Fernandez MA, Bertolo RF, Duncan AM, Phillips SM, Elango R, Ma DWL, Desroches S, Grantham A and House JD. 2020. Translating “protein foods” from the new Canada’s Food Guide to consumers: knowledge gaps and recommendations. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. **45**(12): 1311-1323.
- FAO/WHO. 1985. Energy and Protein Requirements. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. WHO Technical Report Series No. 724. Geneva.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2013. Dietary Protein Quality Evaluation in Human Nutrition: Paper 92. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Italy.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014. FAO Expert Working Group: Research Approaches and Methods for Evaluating Protein Quality of Human Foods. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Italy.
- Gharibzahedi SMT & Smith B 2020. The functional modification of legume proteins by ultrasonication: A review. *Trends in Food Science & Technology* **98**: 107-116.

- Goff HD and Guo Q. Handbook of Food Structure Development. 2019 ebook collection. The Royal Society of Chemistry. Available from: <https://doi.org/10.1039/9781788016155>.
- Gopalakrishnan A, Shankarappa SA, Rajanikant GK. 2019. Hydrogel scaffolds: Towards restitution of ischemic stroke-injured brain. *Transl. Stroke Res.* **10**: 1–18.
- Gwin Jess A., et al. 2020 Muscle protein synthesis and whole-body protein turnover responses to ingesting essential amino acids, intact protein, and protein-containing mixed meals with considerations for energy deficit. *Nutrients* **12**: 2457.
- Hall MB. 2013. Dietary starch source and protein degradability in diets containing sucrose: Effects on ruminal measures and proposed mechanism for degradable protein effects. *J. Dairy. Sci.* **96**(11): 7093–7109.
- Harstad OM, Prestløkken E 2000. Effective rumen degradability and intestinal indigestibility of individual amino acids in solvent-extracted soybean meal (SBM) and xylose-treated SBM (SoyPass®) determined in situ. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **83**: 31–47.
- Haurowitz F and Koshland Daniel E. 2024. Protein. *Encyclopedia Britannica*. Available from: <https://www.britannica.com/science/protein> (accessed March 2024).
- Hayes M. 2020. Measuring Protein Content in Food: An Overview of Methods. *Foods*. **9**(10): 1340.
- Hocquette JF, Tesseraud S, Cassar-Malek I, Chilliard Y, Ortigues-Marty I. 2007. Responses to nutrients in farm animals: implications for production and quality. *Animal* **1**(9): 1297-1313.
- Hou Y, Yin Y, & Wu G. 2015. Dietary essentiality of “nutritionally non-essential amino acids” for animals and humans. *Experimental Biology and Medicine*, **240**(8): 997-1007.
- Hou Y & Wu G 2018. Nutritionally essential amino acids. *Advances in Nutrition*, **9**(6): 849-851.
- Huang W, Chen M. & Lü Z. 2006. Energy optimization for off-lattice protein folding. *Physical Review E* **74** (74): 041907.
- Ingle PD et al. 2016. Determination of protein content by NIR spectroscopy in protein powder mix products. *Journal of AOAC International* **99**:2: 360-363.
- Jain A, Jain R, Jain S. 2020. Protein Analysis in Food. In: *Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology*. Springer Protocols Handbooks. Humana, New York, NY.
- Jambrak A, Režek et al. 2009. Physical properties of ultrasound treated soy proteins. *Journal of food engineering* **93**:4: 386-393.
- Kacerovský Otto, prof. Ing. DrSc., a kolektiv. 1990, Zkoušení a posuzování krmiv. Státní zemědělské nakladatelství. Praha.
- Kaufman JD. 2016. Effect of Varying Rumen Degradable and Undegradable Protein on Milk Production and Nitrogen Efficiency in Lactating Dairy Cows under Summer Conditions. Master's Thesis, University of Tennessee. Available from: https://trace.tennessee.edu/utk_gradthes/4293 (accessed March 2024).
- Kelly B & Pearce EL. 2020. Amino assets: how amino acids support immunity. *Cell metabolism*, **32**(2), 154-175.
- Kim Woojeong; Wang Yong; Selomulya Cordelia. 2020. Dairy and plant proteins as natural food emulsifiers. *Trends in Food Science & Technology* **105**: 261-272.

- Klouda P. 2013. *Základy biochemie*. Nakladatelství Pavko. Ostrava.
- Klouda P. 2016. *Základy biochemie*. Nakladatelství Pavko. Ostrava.
- Kodíček M, Valentová O, Hynek R. 2015. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. Praha.
- Koolman J a Röhm KH. 2012. *Barevný atlas biochemie*. Grada. Praha.
- Kramer RM, Shende VR, Motl N, Pace CN, Scholtz JM. 2012. Toward a molecular understanding of protein solubility: increased negative surface charge correlates with increased solubility. *Biophys. J.* **102**: 1907–1915.
- Lam R & Nickerson M. 2013. Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure-function approach. *Food chemistry.* **141**: 975-84.
- Lamb MW, Harden ML. 1973. In Pergamon Bio-Medical Sciences Series, *The Meaning of Human Nutrition*, Pergamon, 1973, Pages 153-191, Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-017079-4.50012-9> (accessed April 2024).
- LaPelusa A, Kaushik R. 2023. *Physiology, Proteins*. StatPearls Publishing, Treasure Island.
- Lemme A., Ravindran V., Bryden W.L. 2004. Ileal digestibility of amino acids in feed ingredients for broilers. *World's Poultry Sci. J.* **60**: 423–438.
- Liljas A, Liljas L, Lindblom G, Nissen P, Kjeldgaard M, Ash M-R. 2016. *Textbook of structural biology*. World Scientific.
- Lopez MJ, Mohiuddin SS. 2023. *Biochemistry, Essential Amino Acids*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557845/> (Accessed March 2024).
- Loveday SM. 2019. Food proteins: technological, nutritional, and sustainability attributes of traditional and emerging proteins. *Annual review of food science and technology*, **10**: 311-339.
- Li J, Yang X, Swallah MS, Fu H, Ji L, Meng X, Yu H and Lyu B. 2022. Soy protein isolate: an overview on foaming properties and air-liquid interface. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **57**: 188-200.
- Machado M, Machado S, Pimentel FB, Freitas V, Alves RC, Oliveira MBPP. 2020. Amino Acid Profile and Protein Quality Assessment of Macroalgae Produced in an Integrated Multi-Trophic Aquaculture System. *Foods* **9**(10): 1382.
- Manley M. 2014. Near-infrared spectroscopy and hyperspectral imaging: non-destructive analysis of biological materials. *Chemical Society Reviews* **43**(24): 8200-8214.
- Mathai JK, Liu Y, Stein HH 2017. Values for digestible indispensable amino acid scores (DIAAS) for some dairy and plant proteins may better describe protein quality than values calculated using the concept for protein digestibility-corrected amino acid scores (PDCAAS). *British Journal of Nutrition* **117**(4): 490-499.
- Marable NL, Hinners ML, Hardison NW, Kehrberg NL 1980. Protein quality of supplements and meal replacements. Amino acids and calculated indicators of protein quality. *J. Am. Diet. Assoc.* **77**: 270–276.
- Marinangeli CPF, House JD 2017. Potential impact of the digestible indispensable amino acid score as a measure of protein quality on dietary regulations and health. *Nutrition reviews*, **75**(8): 658-667.

- McClements DJ. 2003. Analysis of food products. Analysis of Proteins. Food Science. University of Massachusetts, Chenoweth Lab, Amherst.
- McClements DJ, Jafari SM. 2018. Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review *Advances in Colloid and Interface Science*, **251**: 55-79.
- Mézes M. 2018. Alternative protein sources in the nutrition of farm animals. *Acta Agraria Debreceniensis*, **150**: 21-31.
- Mihaljev ŽA, Jakšić SM, Prica NB, Čupić ŽN & Živkov-Baloš MM. 2015. Comparison of the Kjeldahl method, Dumas method and NIR method for total nitrogen determination in meat and meat products. *gas*, **2(7)**: 365-370.
- Migliozzi S, Angeli P, Mazzei L. 2019. Gelation kinetics of non-aqueous Carbopol dispersions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **20(577)**: 84-95.
- Millward J, Layman DK, Tomé D et al. 2008. Protein quality assessment: impact of expanding understanding of protein and amino acid needs for optimal health. *American Journal of Clinical Nutrition* **87**: 1576S–1581S.
- Moore JC, DeVries JW, Lipp M, Griffiths JC & Abernethy DR. 2010. Total protein methods and their potential utility to reduce the risk of food protein adulteration. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, **9(4)**: 330-357.
- Moughan PJ. 2005. Absorption of chemically unmodified lysine from proteins in foods that have sustained damage during processing or storage. *J AOAC Int.* **88(3)**: 949-954.
- Murray BS. 2011. Rheological properties of protein films. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **16(1)**: 27-35.
- Nahhar, A, & Siong, KK. 2019. Study on natural rubber absorption of selected actinides. Vol. 555, No. 1, p. 012015. *Materials Science and Engineering*. In IOP Conference Series. IOP Publishing.
- Navarro S, Ventura S. 2019. Computational re-design of protein structures to improve solubility. *Expert Opin. Drug. Dis.* **14**: 1077–1088.
- Národní zdravotnický informační portál. 2024. Ministerstvo zdravotnictví ČR a Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. Praha. Available from: <https://www.nzip.cz>. (accessed March 2024).
- Nevara GA, Muhammad SKS, Zawawi N, Mustapha NA & Karim R. 2021. Dietary fiber: Fractionation, characterization and potential sources from defatted oilseeds. *Foods*, **10(4)**: 754.
- Nicolai T. 2019. Gelation of food protein-protein mixtures. *Adv Colloid Interface Sci.* **270**: 147-164.
- Ningbo L, Hua H. 2017. An artificial neural network classifier for the prediction of protein structural classes. *Int. J. Current Eng. Technol.* **7(3)**: 946-952.
- Nishinari K, Fang Y, Nagano T, Guo S, Wang R. 2018. 6 - Soy as a food ingredient. Editor(s): Rickey Y. Yada, In *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Proteins in Food Processing (Second Edition)*, Woodhead Publishing.
- Nosworthy MG, Medina G, Franczyk AJ, Neufeld J, Appah P, Utioh A, Frohlich P, House JD. 2018. Effect of Processing on the In Vitro and In Vivo Protein Quality of Beans (*Phaseolus vulgaris* and *Vicia Faba*). *Nutrients* **10**: 671.

- Orlien V & Aalaei K & Poojary M & Nielsen D & Ahrné L & Ruiz CJ. 2021. Effect of processing on in vitro digestibility (IVPD) of food proteins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **63**: 1-50.
- Owens FN, Qi S, Sapienza DA. 2014. Invited review: Applied protein nutrition of ruminants current status and future directions. *Prof. Anim. Sci.* **30**(2): 150–179.
- Owusu-Apenten RK. 2002. Food protein analysis: quantitative effects on processing. Eastern Hemisphere Distribution, USA.
- Pahm AA, Pedersen C and Stein HH. 2008. Application of the reactivelysine procedure to estimate lysine digestibility in distillers dried grains withsolubles fed to growing pigs. *J. Agric. Food Chem.* **56**: 9441–9446.
- Patino JMR, Pilosof AMR. 2011. Protein–polysaccharide interactions at fluid interfaces, *Food Hydrocolloids.* **25**(8): 1925-1937.
- Rehman I, Farooq M, Botelho S. 2023. Biochemistry, Secondary Protein Structure. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). PMID: 29262225.
- Reeds PJ. 2000. Dispensable and indispensable amino acids for humans. *The Journal of Nutrition*, **130**(7): 1835S-1840S.
- Rose WC. 1957. The amino acid requirements of adult man. *Nutr Abstr Rev. Jul*; **27**(3): 631-47.
- Roubík Lukáš. 2018. Moderní výživa: Ve fitness a silových sportech. Erasport. Praha.
- Rutherford SM & Moughan PJ. 2012. Available versus digestible dietary amino acids. *British Journal of Nutrition*, **108**(S2): S298-S305.
- Rutherford SM, Fanning AC, Miller BJ, Moughan PJ. 2015. Protein digestibility, corrected amino acid scores and digestible indispensable amino acid scores differentially describe protein quality in growing male rats. *J. Nutr.* **145**: 372–379.
- Rysová. 2018. Dusíkaté látky v krmivu. Výživa a krmení. Agropress. Available from: <https://www.agropress.cz/hodnoceni-dusikatych-latek-krmiv-pro-prezvykavce/>
- Sá AGA, Moreno YMF & Carciofi BAM. 2020. Food processing for the improvement of plant proteins digestibility. *Critical reviews in food science and nutrition*, **60**(20): 3367-3386.
- Sáez-Plaza P, Navas MJ, Wybraniec S, Michałowski T & Asuero AG. 2013. An overview of the Kjeldahl method of nitrogen determination. Part II. Sample preparation, working scale, instrumental finish, and quality control. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **43**(4): 224-272.
- Saha UK, Sonon, L & Kissel DE. 2012. Comparison of conductimetric and colorimetric methods with distillation–titration method of analyzing ammonium nitrogen in total kjeldahl digests. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **43**(18): 2323-2341.
- Sanvictores T, Farci F. 2023. Biochemistry, Primary Protein Structure. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island.
- Savory CJ and Maros K. 1993. Influence of degree of food restriction, age and time of day on behaviour of broiler breeder chickens. *Behavioural Processes* **29**: 179–190.
- Schaafsma G. 2012. Advantages and limitations of the protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS) as a method for evaluating protein quality in human diets. *British Journal of Nutrition* **108**(S2): S333-S336.

- Sharif M, Qamar H, Wahid AA. 2019. Effect of rumen degradable protein concentrations on nutrient digestibility, growth performance and blood metabolites in Beetal kids. *Concepts Dairy Vet. Sci.* **2**(5): 249–253.
- Shokri S, Javanmardi, F, Mohammadi M & Mousavi K A. 2022. Effects of ultrasound on the techno-functional properties of milk proteins: A systematic review. *Ultrasonics Sonochemistry* **83**: 105938.
- Singh A, Sidhu S & Singh P. 2019. Bypass protein technology: A review. *Pharma. Innov. J.* **8**: 150-153.
- Smil V. 2002. Nitrogen and food production: proteins for human diets. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* **31**(2): 126-131.
- Stefanović AB, Jovanović JR, Dojčinović MB, Lević SM, Nedović VA, Bugarski BM & Knežević-Jugović Z D. 2017. Effect of the controlled high-intensity ultrasound on improving functionality and structural changes of egg white proteins. *Food and Bioprocess Technology* **10**: 1224-1239.
- Tedeschi LO, Fox DG, Fonseca MA, Francis L, Cavalcanti L. 2015. Models of protein and amino acid requirements for cattle. *R. Bras. Zootec* **44**(3): 109–132.
- Tiefenthaller F. 2008: Heimische Eiweißfuttermittel-in der Milchviehfütterung. Available from: <http://www.raumberg-gumpenstein.at/cm4/de/forschung/publikationen/Downloadsveranstaltungen>. (accessed March 2024).
- Třináctý J. 2013. Hodnocení krmiv pro dojnice. *AgroDigest*, Pohorelice.
- Třináctý J, Nedělník J, Lang J, Loučka R, Kučera J, 2016. Effect of maizekernel endosperm type and maturity stage on ruminal in situ degradability and post-ruminal in vitro dry matter and starch digestibility. *Czech J. Anim. Sci.* **61**: 351-359.
- Třináctý J, Nedělník J a Richter M. 2016. Hodnocení krmiv na bázi řepky a jejich zařazení do krmných dávek pro dojnice. Uplatněná certifikovaná metodiky 37/16. *Zemědělský výzkum Troubsko*. ISBN 978-80-88000-14-3.
- Tunkala BZ, DiGiacomo K Hess PA, Dunshea FR, & Leury BJ. 2023. In vitro protein fractionation methods for ruminant feeds. *Animal* **17**(12): 101027.
- Van Lieshout GAA, Lambers TT, Bragt MCE & Hettinga KA. 2020. How processing may affect milk protein digestion and overall physiological outcomes: A systematic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **60**(14): 2422–2445.
- Van Rooijen C, Bosch G, van der Poel AFB, Wierenga PA, Alexander L, Hendriks WH. 2014. Reactive lysine content in commercially available pet foods. *Journal of Nutritional Science* **3**: e35.
- Vargas SA et al. 2021, High-intensity ultrasound pretreatment influence on whey protein isolate and its use on complex coacervation with kappa carrageenan: Evaluation of selected functional properties. *Ultrasonics Sonochemistry* **70**: 105340.
- WHO/FAO/UNU Expert Consultation. 2007. Protein and amino acid requirements in human nutrition. World Health Organization technical report series, (935). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18330140/>
- Wilson K, Walker J. 2010. Principles and Techniques of Practical Biochemistry. Cambridge University Press. Cambridge. UK.

- Wolfe RR. 2006. The underappreciated role of muscle in health and disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **84**: 475–482.
- Wolfe RR 2017. Branched-chain amino acids and muscle protein synthesis in humans: myth or reality?. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* **14**: 1-7.
- Wu G. 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino acids* **37**: 1-17.
- Wu GY.; Bazer F. W.; Dai Z. L.; Li D. F., Kim J. J., Wu Z. L. 2014. Amino acid nutrition in animals: Protein synthesis and beyond. *Annu. Rev. Anim. Biosci* **2**: 387–417.
- Xiao F & Guo F. 2022. Impacts of essential amino acids on energy balance. *Molecular metabolism*, **57**: 101393.
- Xiong W, Wang Y, Zhang C, Wan J, Shah BR, Pei Y, Zhou B, Li B, Li J. 2016. High intensity ultrasound modified ovalbumin: Structure, interface and gelation properties. *Ultrasonics sonochemistry* **31**: 302-309.
- Zayas, JF. 1997. Foaming Properties of Proteins. In: *Functionality of Proteins in Food*. Springer. Berlin, Heidelberg.
- Zhang Y, Sharan S, Rinnan Å, Orlie V. 2021. Survey on Methods for Investigating Protein Functionality and Related Molecular Characteristics. *Foods* **10**(11): 2848.
- Zheng H. 2019. Introduction: Measuring Rheological Properties of Foods. In: Joyner, H. (eds) *Rheology of Semisolid Foods*. Food Engineering Series. Springer. Cham.

6 Seznam použitých zkratk a symbolů

AAS.....	chemické skóre
ATP.....	adenosintrifosfát
BV.....	biologická hodnota
DIAAS.....	hodnocení stravitelných nepostradatelných aminokyselin
DNA.....	deoxyribonukleová kyselina
EAAI.....	index esenciálních aminokyselin
EAI.....	index emulgační aktivity
ESI.....	index emulgační stability
FAO.....	Organizace pro výživu a zemědělství
g.....	gram
kg.....	kilogram
mg.....	miligram
NIR.....	near-infrared spectroscopy
NPU.....	ukazatel zadrženého dusíku
PDCAAS.....	hodnocení stravitelnosti bílkovin korigované na aminokyseliny
PDI.....	index dispergovatelnosti bílkovin
PDIA.....	nedegrovatelné dusíkaté látky, které jsou přímým zdrojem aminokyselin pro zvíře, nejsou odbourávány mikrobiální činností v bachoru a přecházejí dále do slezu a tenkého střeva)
PDIME.....	množství mikrobiálního proteinu, které může být syntetizováno v bachoru z využitelné energie v bachoru, jestliže degradovatelný dusík není limitující (dostatek dusíku)
PDIM.....	mikrobiální protein skutečně strávený v tenkém střevě
PDIMN.....	množství mikrobiálního proteinu, které může být syntetizováno v bachoru z degradovatelného proteinu, jestliže energie není limitující (dostatek energie)
PER.....	poměr účinnosti bílkovin
RUP.....	bílkoviny nerozložitelné v bachoru
UNU.....	United Nations University
WHO.....	Světová zdravotnická organizace