

Enzymatická hydrolýza sacharidů a proteinů

Tomáš Valenta

Bakalářská práce
2009



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav potravinářského inženýrství
akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Tomáš VALENTA**
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Enzymatická hydrolýza sacharidů a proteinů**

Zásady pro vypracování:

- Dělení, názvosloví a chemická struktura enzymů.
- Sacharidy a jejich enzymatická hydrolýza.
- Proteiny a jejich enzymatická hydrolýza.
- Izolace vitaminů enzymatickou hydrolýzou.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] prof. Ing. HOZA, Ignác. CSc. KRAMÁŘOVÁ, Daniela. Ph.D. Potravinářská biochemie I. 1. vydání Zlín: UTB ve Zlíně, 2005.

[2] prof. Ing. HOZA, Ignác. CSc. KRAMÁŘOVÁ, Daniela. Ph.D. MUDr. BUDÍNSKÝ, Pavel. Potravinářská biochemie II. 1. vydání Zlín: UTB ve Zlíně, 2007.

[3] MURRAY, Robert K. GRANNER, Daryl K. MAYES, Peter A. RODWELL, Victor W. Harperova biochemie 3. vydání Jinočany: Nakladatelství H+H, 2002.

[4] <http://utb.cepac.cz/>.

Vedoucí bakalářské práce:

MVDr. Ivan Holko, Ph.D.

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

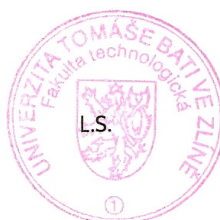
10. února 2009

Termín odevzdání bakalářské práce:

31. května 2009

Ve Zlíně dne 31. května 2009


doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan




prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Abstrakt česky

Bakalářská práce je zaměřena na popis enzymatické hydrolýzy sacharidů a proteinů enzymy zvanými *hydrolasy*, které katalyzují štěpení chemických vazeb za účasti vody. Bakalářská práce obsahuje popis potravinářského využití této hydrolýzy. Principem enzymatické hydrolýzy sacharidů je štěpení α - nebo β -glykosidových vazeb *glykosidasami*. Hydrolýzu peptidových vazeb proteinů a peptidů katalyzují *peptidasy*. Bakalářská práce také popisuje izolaci hydrofilních vitaminů použitím příslušných *glykosidas* či *peptidas*, v případě lipofilních vitaminů *lipas*. Obsahuje studie, které popisují využití příslušných *hydrolas* k izolaci jednotlivých vitaminů a srovnávají použití enzymatické, kyselé či alkalické hydrolýzy.

Klíčová slova: enzymy, enzymatická hydrolýza, *hydrolasy*, *glykosidasy*, *peptidasy*, sacharidy, proteiny, potraviny, vitaminy

ABSTRACT

Abstrakt ve světovém jazyce

Bachelor thesis is focused on the description of enzymatic hydrolysis of carbohydrates and proteins by hydrolytic enzymes, which catalyse the cleavage of chemical bonds with the participation of water. Bachelor thesis contains a description of the food using of this hydrolysis. The principle of enzymatic hydrolysis of carbohydrates is the cleavage of α - or β -glycosidic bonds using *glycosidases*. The principle of enzymatic hydrolysis of proteins and peptides is the cleavage of peptide bonds using *proteinases*. Bachelor thesis also describes the isolation of hydrophilic vitamins using appropriate *glycosidase* or *proteinase*, in the case of lipophilic vitamins using appropriate *lipase*. This work contains studies which describe using of relevant hydrolytic enzymes to isolate individual vitamins and compare the use of enzymatic, acid or alkaline hydrolysis.

Keywords: enzymes, enzymatic hydrolysis, hydrolytic enzymes, *glycosidases*, *proteinases*, carbohydrates, proteins, foodstuffs, vitamins

Poděkování, motto

Dovoluji si touto cestou poděkovat za odborné vedení, cenné rady, podporu a návrhy k vypracování bakalářské práce svému vedoucímu MVDr. Ivanu Holkovi, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uveden jako spoluautor.

Ve Zlíně

.....

Podpis diplomanta

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 ENZYMY	11
1.1 Kofaktory enzymů.....	11
1.2 Mechanismus účinku enzymů.....	11
1.3 <i>Hydrolasy</i>	12
1.3.1 Dělení <i>hydrolas</i> podle jejich funkční charakteristiky.....	13
1.3.2 <i>Hydrolasy</i> produkované mikroorganismy a jejich potravinářské využití.....	13
2 SACHARIDY	15
2.1 OLIGOSACHARIDY	15
2.1.1 Sacharosa.....	16
2.1.2 Maltosa.....	16
2.1.3 Laktosa	16
2.2 POLYSACHARIDY	16
2.3 ZÁSOBNÍ POLYSACHARIDY	17
2.3.1 Škrob	17
2.3.2 Glykogen	18
2.3.3 Inulin	19
2.4 STAVEBNÍ POLYSACHARIDY	19
2.4.1 Celulosa.....	19
2.4.2 Hemicelulosa.....	19
2.4.3 Chitin.....	20
2.4.4 Pektinové látky	20
3 ENZYMATICKÁ HYDROLÝZA SACHARIDŮ A JEJÍ POTRAVINÁŘSKÉ VYUŽITÍ	21
3.1 <i>GLYKOSIDASY</i> A JEJICH DĚLENÍ	21
3.2 ENZYMATICKÁ HYDROLÝZA OLIGOSACHARIDŮ	21
3.2.1 Enzymatická hydrolýza sacharosy a její potravinářské využití.....	21
3.2.2 Enzymatická hydrolýza maltosy.....	22
3.2.3 Enzymatická hydrolýza laktosy a její potravinářské využití	22
3.2.4 Sladké mléčné výrobky bez přídavku cukru	22
3.2.5 Glykosidy a jejich enzymatická hydrolýza.....	22
3.3 ENZYMATICKÁ HYDROLÝZA POLYSACHARIDŮ.....	23
3.3.1 Enzymatická hydrolýza škrobu	23
3.3.2 Potravinářské využití amylolytických enzymů.....	24
3.3.3 Enzymatická hydrolýza inulinu	24
3.3.4 Enzymatická hydrolýza celulosy	25
3.3.5 Potravinářské využití celulolytických enzymů.....	25
3.3.6 Enzymatická hydrolýza chitinu	25
3.3.7 Enzymatická hydrolýza pektinových látek.....	26

3.3.8	Potravinářské využití <i>polygalaktouronidasy</i> a její dělení	26
4	PROTEINY	28
4.1	STRUKTURNÍ PROTEINY	28
4.1.1	Kolageny	28
4.1.2	Elastiny	28
4.1.3	Keratiny	29
4.2	MLÉČNÉ PROTEINY	29
5	ENZYMATICKÁ HYDROLÝZA PROTEINŮ A JEJÍ POTRAVINÁŘSKÉ VYUŽITÍ.....	30
5.1	<i>PEPTIDASY</i> A JEJICH DĚLENÍ	30
5.1.1	<i>Pepsin A</i>	31
5.1.2	<i>Trypsin</i>	31
5.1.3	<i>Chymotrypsin</i>	32
5.1.4	<i>Katepsiny</i>	33
5.1.5	Rostlinné <i>proteinasy</i>	33
5.1.6	Plísňové <i>proteinasy</i>	34
5.2	ENZYMATICKÁ HYDROLÝZA KOLAGENU A JEJÍ POTRAVINÁŘSKÉ VYUŽITÍ.....	34
5.3	ENZYMATICKÁ HYDROLÝZA KERATINU A JEJÍ POTRAVINÁŘSKÉ VYUŽITÍ	35
5.4	ENZYMATICKÁ HYDROLÝZA MLÉČNÝCH PROTEINŮ A JEJÍ POTRAVINÁŘSKÉ VYUŽITÍ	35
5.5	HYDROLYTICKÝ ÚČINEK PLASMINU V MLÉCE	36
5.6	ENZYMOVÁ HYDROLÝZA KONCENTRÁTU BÍLKOVIN SYROVÁTKY	37
5.7	ENZYMATICKÁ MODIFIKACE SYROVÁTKOVÉHO KONCENTRÁTU.....	37
5.8	PRODUKCE BIOLOGICKY AKTIVNÍCH PEPTIDŮ Z CIZRNÝ VYUŽITÍM <i>PROTEINAS</i>	38
5.9	ENZYMOVĚ HYDROLYZOVANÝ PŠENIČNÝ LEPEK	39
5.10	DETEKČNÍ VYUŽITÍ HYDROLÝZY PEPTIDOVÝCH VAZEB.....	39
5.11	PROTEOLYTICKÉ ŠTĚPENÍ KATALYTICKY NEAKTIVNÍCH PROENZYMŮ	40
5.11.1	Význam selektivní proteolýzy katalyticky neaktivních proenzymů.....	40
5.11.2	Fyziologická potřeba katalyticky aktivních enzymů	41
6	VITAMINY	42
6.1	VÝSKYT, VLASTNOSTI A FUNKCE VITAMINŮ	42
6.1.1	Vitamin B ₁ - thiamin	44
6.1.2	Vitamin B ₂ - riboflavin.....	44
6.1.3	Vitamin B ₃ - kyselina nikotinová, nikotinamid	45
6.1.4	Vitamin B ₅ - kyselina pantotenová.....	45
6.1.5	Vitamin B ₆ - pyridoxin	46
6.1.6	Vitamin B ₉ - kyselina listová.....	46
6.1.7	Biotin.....	47
6.1.8	Vitamin E - tokoferoly, tokotrienoly	48

7	IZOLACE VITAMINŮ ENZYMATICKOU HYDROLÝZOU	49
7.1	VYUŽITÍ <i>GLYKOSIDAS</i> , <i>PEPTIDAS</i> A <i>LIPAS</i> K IZOLACI VITAMINŮ	49
7.1.1	Izolace vitamínu B ₁ enzymatickou hydrolýzou.....	49
7.1.2	Izolace vitamínu B ₂ enzymatickou a kyselou hydrolýzou.....	49
7.1.3	Izolace vitamínu B ₃ alkalickou a enzymatickou hydrolýzou	50
7.1.4	Enzymatická extrakce pro kapalinové chromatografické stanovení vitamínu B ₃ v potravinách	50
7.1.5	Izolace vitamínu B ₅ enzymatickou hydrolýzou	51
7.1.6	Izolace vitamínů B ₁ , B ₂ a B ₆ enzymatickou hydrolýzou pro jejich stanovení HPLC analýzou	51
7.1.7	Využití enzymatické hydrolýzy (enzymatického přečištění) pro stanovení folátů v zelenině a ovoci HPLC analýzou.....	51
7.1.8	Izolace biotinu kyselou hydrolýzou.....	52
7.1.9	Využití enzymatické hydrolýzy pro stanovení biotinu v potravinách HPLC analýzou	52
7.1.10	Optimalizace enzymatické hydrolýzy pro stanovení vitamínu E v destilátu kyseliny palmitové.....	52
8	KOMERČNĚ DOSTUPNÉ ENZYMATICKÉ PREPARÁTY	55
	ZÁVĚR	57
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	59
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	62
	SEZNAM OBRÁZKŮ	64
	SEZNAM TABULEK.....	65

ÚVOD

Enzymatickou hydrolýzou sacharidů a proteinů je chápáno štěpení příslušných chemických vazeb za účasti vody enzymy *hydrolasami*. *Hydrolasy* jsou po chemické stránce jednoduché proteiny, které se podílejí na hydrolytickém rozkladu živin. Mají významné využití v potravinářském průmyslu a při izolaci vitaminů z potravin.

Sacharidy jsou látky, které ve své molekule obsahují minimálně tři alifaticky vázané uhlíkové atomy (monosacharidy) a také sloučeniny, které se z nich tvoří vzájemnou kondenzací za vzniku glykosidových vazeb (oligosacharidy, polysacharidy). *Glykosidasy* jsou enzymy, jež katalyzují hydrolýzu glykosidových vazeb.

Proteiny jsou polymery aminokyselin, jež ve své molekule obsahují více než 100 aminokyselin vzájemně spojených peptidovou vazbou. Kromě peptidových vazeb se na utváření jejich struktury podílejí ještě jiné vazby, zejména disulfidové, esterové a amidové. *Peptidasy* jsou enzymy, které katalyzují hydrolýzu peptidových vazeb proteinů a peptidů.

Vitaminy jsou nízkomolekulární exogenní esenciální látky. V lidském organismu mají funkci katalyzátorů biochemických reakcí, hrají významnou úlohu při procesech vstřebávání a výměny látek mezi vnějším prostředím a živým organismem. Pro lidský organismus jsou esenciálními látkami a tak je člověk odkázán na jejich příjem v potravě. Z potravin lze hydrofilní vitaminy (rozpustné ve vodě) izolovat enzymatickou hydrolýzou při použití příslušných *glykosidas* či *peptidas*, lipofilní vitaminy (rozpustné v tucích) s využitím *lipas*.

Cílem bakalářské práce je popsat vlastní působení a potravinářské využití enzymatické hydrolýzy sacharidů a proteinů. Zabývá se také využitím příslušných *glykosidas*, *peptidas*, případně *lipas* k izolaci příslušných vitaminů z potravin.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ENZYMY

Před sto lety bylo známo jen několik enzymů, katalyzujících většinou hydrolyzu kovalentních vazeb. Tyto katalytické bílkoviny byly pojmenovány přidáním přípony *-asa* (*-áza*) ke jménu hydrolyzované substance nebo substrátu: *lipasy* tedy hydrolyzovaly tuk (lipos), *amylasy* škrob (amylon) a *proteinasy* proteiny. Tato terminologie přetrvává částečně dodnes, ukázala se však nevyhovující po objevu enzymů katalyzujících odlišné reakce. V současných názvech enzymů sice zůstává zachována přípona *-asa* (*-áza*), název však přihlíží též k typu katalyzované reakce. S objevy dalších a dalších enzymů se však v názvosloví nevyhnutelně objevovaly dvojznačnosti a často nebylo jasné, o který enzym se jedná. K odstranění tohoto nedostatku přijala Mezinárodní biochemická unie (International Union of Biochemistry, IUB) komplexní, ale jednoznačný systém nomenklatury enzymů, založený na reakčním mechanismu. Každý enzym má své kódové číslo (E.C.), sestávající ze čtyř čísel oddělených tečkami. První číslo zařazuje reakci podle typu do příslušné třídy, druhé a třetí do příslušné podtřídy, resp. podpodtřídy. Čtvrté číslo pak označuje specifický enzym [1].

1.1 Kofaktory enzymů

Enzymy mají jako biologické katalyzátory vysoce selektivní účinek. Řada enzymů katalyzujících přenos skupin či jiné reakce vyžaduje kromě příslušného substrátu další organickou molekulu zvanou koenzym; bez její přítomnosti je enzym neaktivní. Kofaktory, které je třeba odlišit od enzymů samotných, jsou definovány jako nízkomolekulární neaminokyselínové organické sloučeniny nezbytné pro aktivitu enzymů. Mnohé z nich jsou deriváty adenosinmonofosfátu (AMP) či vitaminů skupiny B. Hovoříme pak o koenzymech. Většina kofaktorů je na enzymy vázána nekovalentními vazbami, ty, které jsou vázány kovalentně se nazývají prostetické skupiny [1].

Koenzymy nejsou nutné při lytických reakcích, včetně hydrolytických reakcí katalyzovaných trávicími enzymy [1].

1.2 Mechanismus účinku enzymů

Způsob účinku různých enzymů je rozdílný a závisí na druhu katalyzované reakce. Při všech reakcích katalyzovaných enzymy se tvoří komplexy enzym-substrát (ES), ve kterých

je substrát, resp. substráty v mimořádně reaktivní formě. Tvorbou těchto komplexů se snižuje aktivační energie potřebná na přeměnu substrátu, přičemž se vytváří komplex enzym-produkt (EP), který se rozpadá na enzym a produkt (resp. produkty). Přeměna komplexu ES na komplex EP se uskutečňuje velkou rychlostí. Zmíněné přeměny jsou při mnohých enzymových reakcích vratné. Podle počtu substrátů zúčastněných na reakci rozlišujeme:

a) jednosubstrátové reakce - patří k nim reakce katalyzované *isomerasami* a *hydrolasami*

Např. *glukosa-6-fosfatasa* (*D-glukosa-6-fosfát-fosfohydrolasa*, E.C. 3.1.3.9) katalyzuje reakci: $D\text{-glukosa-6-fosfát} + H_2O \rightarrow D\text{-glukosa} + P_1$ (monofosfát)

b) dvousubstrátové reakce - patří k nim reakce katalyzované *oxidoreduktasami*, *transferasami* a *ligasami*

Např. *hexokinasa* (*ATP: D-hexosa-6-fosfotransferasa*, E.C. 2.7.1.1) katalyzuje reakci:

ATP (adenosintrifosfát) + D-hexosa \rightarrow ADP (adenosindifosfát) + D-hexosa-6-fosfát [2].

1.3 Hydrolasy

K enzymatické hydrolýze se využívají enzymy zvané *hydrolasy*. Katalyzují štěpení chemických vazeb (zejména C-C, C-O a C-N) za účasti vody. *Hydrolasy* jsou po chemické stránce jednoduché proteiny (bez kofaktorů) a podílejí se na hydrolytickém rozkladu živin. Velmi často se enzymy z této třídy připravují uměle pro různé průmyslové využití. Příkladem může být výroba plísňové *amylasy* štěpící škrob. Na jednotlivé podtřídy se dělí podle typu štěpených vazeb. Katalyzují hydrolýzu esterů (*esterasy*), glykosidů (*glykosidas*), amidů (*amidasy*), aminů (*aminohydrolasy*), peptidů a proteinů (*peptidas*, *proteinasy*) a jiných látek. Reakční mechanismus je založen na přenosu radikálu z hydrolyzovaného substrátu na vodu. Lytické enzymy tedy působí na specifické chemické vazby, např. *pepsin* a *trypsin* na peptidové vazby. Mohou působit na mnoho různých peptidových substrátů, čímž se zmenšuje počet potřebných trávicích enzymů. *Proteinasy* mohou katalyzovat též hydrolýzu esterů, což má jen omezený fyziologický význam. Použití esterů jako syntetických substrátů však významně přispělo právě ke studiu mechanismu působení *proteinas*. Některé lytické enzymy jsou velmi specifické. *Chymotrypsin* hydrolyzuje peptidové vazby, v nichž přísluší karboxylová skupina aromatickým aminokyselinám (fenylalanin, tyrosin, tryptofan). *Karboxypeptidas* odbourávají aminokyseliny z karboxylového, zatímco *aminopeptidas* z aminového konce polypeptidového řetězce [1].

Podstatou trávení je hydrolýza makromolekulárních látek z potravy účinkem hydrolytických enzymů. Vznikají jednodušší látky procházející biomembránami [3].

Za normálních fyziologických podmínek tvoří žlázy v zažívacím ústrojí šťávy s velkým nadbytkem enzymů. Kolb (1970) udává, že aktivita *trypsinu*, *chymotrypsinu*, *pepsinu* a *α -amylasy* je asi stonásobná, než je třeba ke trávení přijatých bílkovin a škrobů a stejně tak v nadbytku je sekrece *lipasy* a žlučových kyselin, i když ne v takovém stupni jako u předchozích enzymů [4].

Enzymy jsou stále odbourávány *proteinasami*. Odbourávání nastává při malých strukturálních změnách enzymů (např. rozvinutí peptidového řetězce) a nebo při oddělení enzymů vázaných na membránách. Takovéto změny „rozeznávají“ *proteinasy* přítomné ve všech buňkách a začínají rozklad změněných enzymů. Enzymy s kratším poločasem rozkladu jsou méně stabilní než enzymy s delším poločasem rozkladu. Při nedostatku bílkovin se prodlužuje poločas rozkladu většiny enzymů, přičemž syntéza a odbourávání se omezují [2].

1.3.1 Dělení *hydrolas* podle jejich funkční charakteristiky

Hydrolasy, které katalyzují hydrolýzu esterů, amidů a peptidů, se vyznačují zpravidla určitou funkční charakteristikou nebo vlastností charakteristickou pro jejich působení. Rozeznáváme podle toho:

- a) peptidové a karboxylové *esterasy* s aktivním serinovým zbytkem,
- b) peptidové a karboxylové *hydrolasy* s aktivním cysteinovým zbytkem,
- c) *hydrolasy* závislé na určitých kovových iontech,
- d) peptidové *hydrolasy* s působením při nízkém pH [5].

1.3.2 *Hydrolasy* produkované mikroorganismy a jejich potravinářské využití

Mikroorganismy produkují do prostředí extracelulární *proteinasy*, které odbourávají molekuly proteinů na molekuly o menší molekulové hmotnosti a usnadňují tak průnik těchto molekul přes cytoplazmatickou membránu. *Endopeptidasy* štěpí vnitřní peptidové vazby a *exopeptidasy* štěpí terminální peptidové vazby proteinů a peptidů. Bakterie, kvasinky i mikromycety obsahují *proteinasy*, které se prakticky využívají v sýrašství, pivovarnictví a při zpracování textilních vláken a kůží [6].

Esterasy hydrolyzují estery, např. *lipasa* štěpí estery vyšších mastných kyselin a glycerolu, fosfatidylcholin štěpí *lecitinasu* (α -toxin *Clostridium perfringens* je *lecitinasu C*), metoxylovou skupinu pektinů hydrolyzují enzymy *pektasy* vyskytující se u bakterií a hub rodů *Aspergillus* a *Penicillium* [6].

Hydrolyzu velkých molekul polysacharidů na menší molekuly urychlují exoenzymy, které umožňují snadnější průnik molekul přes cytoplazmatickou membránu. Mezi *glykosidasy* produkované mikroorganismy lze zařadit *amylasu*, *chitinasu*, *hyaluronidasu*, *maltasu*, *galaktosidasu* a další enzymy. *Celulasu* produkují bakterie, plísňe i prvoci [6].

Fosfatasy katalyzují štěpení fosfolipidů, adenosinfosfátů, nukleových kyselin a dalších esterů kyseliny fosforečné. Tyto enzymy se významně uplatňují při syntéze bílkovin a při kvasných procesech [6].

Amidasy otevírají vazby C-N a zároveň ze substrátu uvolňují amoniak. Příkladem může být *ureasa*, která štěpí močovinu na amoniak a oxid uhličitý, nebo *penicilinasu* štěpící laktamový kruh penicilinu za vzniku neúčinné formy tohoto antibiotika [6].

2 SACHARIDY

Názvem sacharidy se označují polyhydroxyaldehydy a polyhydroxyketony, které obsahují v molekule minimálně tři alifaticky vázané uhlíkové atomy a také sloučeniny, které se z nich tvoří vzájemnou kondenzací za vzniku glykosidových vazeb [7].

Jsou základními složkami všech živých organismů, biologicky aktivními molekulami a nejrozšířenějšími organickými sloučeninami v biosféře. Většina monosacharidů a oligosacharidů má sladkou chuť, protože vyvolávají konformační změny chuťových receptorů. Tato konformační změna se projeví právě vjemem sladké chuti [7].

Podle počtu cukerných jednotek vázaných v molekule sacharidu je dělíme na monosacharidy, oligosacharidy a polysacharidy [7].

Společný název pro monosacharidy, oligosacharidy a polysacharidy je hologykosidy, což znamená, že daný sacharid je složen pouze z cukerných jednotek. Nejjednoduššími cukry jsou monosacharidy. Ty nemohou být dále hydrolyzovány na jednodušší cukry. Oligosacharidy se skládají ze dvou až deseti kovalentně vázaných monosacharidových jednotek spojených pomocí glykosidové vazby. Polysacharidy obsahují řádově stovky až tisíce monosacharidů nebo jejich derivátů spojených rovněž glykosidovými vazbami. Heteroglykosidy nesou na sobě glykosidicky vázanou necukernou složku, tzv. aglykon (např. peptidy, proteiny, lipidy, nukleotidy...) [7].

2.1 Oligosacharidy

Oligosacharidy jsou cukry složené z 2-10 monosacharidových jednotek. Mají podobné vlastnosti jako monosacharidy. Jsou rozpustné ve vodě a mají většinou sladkou chuť. Z oligosacharidů jsou významné především disacharidy složené ze dvou monosacharidových jednotek. Disacharid může vznikat kondenzací α - nebo β -anomerní hydroxylové skupiny monosacharidu s libovolnou hydroxylovou skupinou jiného monosacharidu. Je-li v molekule oligosacharidu zachován alespoň jeden poloacetalový hydroxyl volný, má redukční vlastnosti (redukuje Fehlingův roztok). Redukující disacharid vykazuje v roztocích mutarotaci a vyskytuje se jako α - nebo β -anomer. Mezi redukující disacharidy patří maltoza, isomaltoza, cellobiosa a laktosa. Jsou-li všechny poloacetalové hydroxylové skupiny zablokovány, jde o cukr neredukující. Mezi neredukující disacharidy řadíme např. sacharosu [7].

2.1.1 Sacharosa

Sacharosa (β -D-fruktofuranosyl- α -D-glukopyranosid) je nazývána taktéž jako cukr třtinový (z cukrové třtiny, *Saccharum officinarum*) nebo řepný (z cukrové řepy, *Beta vulgaris*). Sacharosa tvoří ve vodě velmi dobře rozpustné krystalky sladké chuti, známé jako kuchyňský cukr. Při ztrátě vody v molekule za vyšší teploty se mění na karamel. V potravinářství se používá při slazení potravin a je výchozí surovinou kvasného průmyslu [7].

2.1.2 Maltosa

Maltosa (O- α -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glukopyranosa) se taktéž nazývá sladovým cukrem. Jako produkt enzymové hydrolýzy škrobu je přítomna v klíčících semenech ječmene (sladu). Vzniká hydrolýzou škrobu působením kyselin nebo enzymů *amylas*. V chlebovém těstě vzniká maltosa hydrolýzou škrobu působením enzymů kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a enzymů přítomných v mouce [7].

2.1.3 Laktosa

Laktosa (O- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glukopyranosa) je méně sladká krystalická látka (mléčný cukr), vyskytující se v mléce savců. V kravském mléce je její množství 4,7 %, v mateřském až kolem 6 %. Většinou kvasinek je nezkvasitelná, bakterie ji však dokáží zkvasit na kyselinu mléčnou, čehož se využívá při výrobě zakysaných mléčných výrobků, jež obsahují 3 až 4 % laktosy [7].

2.2 Polysacharidy

Polysacharidy jsou vysokomolekulární látky, z nichž některé jsou ve vodě rozpustné na koloidní roztoky nebo mají schopnost bobtnat, některé jsou nerozpustné. Polysacharidy jsou často amorfní, ve vodě převážně nerozpustné a na rozdíl od monosacharidů a nižších oligosacharidů nemají sladkou chuť. Jsou složeny z více než 10 monosacharidových jednotek, zpravidla však z několika set, tisíců a někdy i milionů stavebních jednotek. Jednotlivé molekuly jsou vzájemně vázány α - nebo β -glykosidovými vazbami. Hydrolýzou se štěpí na nižší jednotky oligosacharidů a dále až na monosacharidy. Stavebními jednotkami polysacharidů bývají disacharidy (s výjimkou některých bakteriálních polysacharidů). Mezi nejběžnější zástupce polysacharidů patří škrob, glykogen, celulóza a chitin, které rozdělujeme

podle jejich funkce do dvou základních skupin: na polysacharidy stavební a polysacharidy se zásobní funkcí [8].

2.3 Zásobní polysacharidy

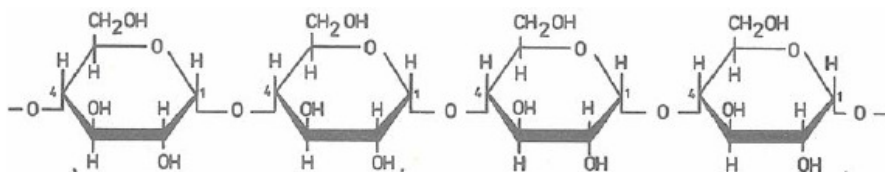
Rezervní polysacharidy tvoří zásobu chemické energie, kterou lze uvolnit jejich odbouráním. Nacházíme je v hlízách rostlin (škrob, inulin), u mikroorganismů (dextran), v játrech a svalech živočichů (glykogen) apod. Metabolismus rozkladu zásobních polysacharidů poskytuje většinu energie potřebné pro ostatní biochemické a biologické pochody. Velmi rozšířeným pohotovým zdrojem energie je glukosa, její přebytek se skladuje v játrech a ve svalech jako glykogen [7].

2.3.1 Škrob

Škrob je zásobním polysacharidem většiny rostlin. Jeho dvěma hlavními složkami jsou amylosa, která má nevětvenou šroubovicovou strukturu a amylopektin, který sestává z větvených řetězců složených z glukosových jednotek spojených $\alpha(1\rightarrow4)$ - a $\alpha(1\rightarrow6)$ glykosidovými vazbami [8].

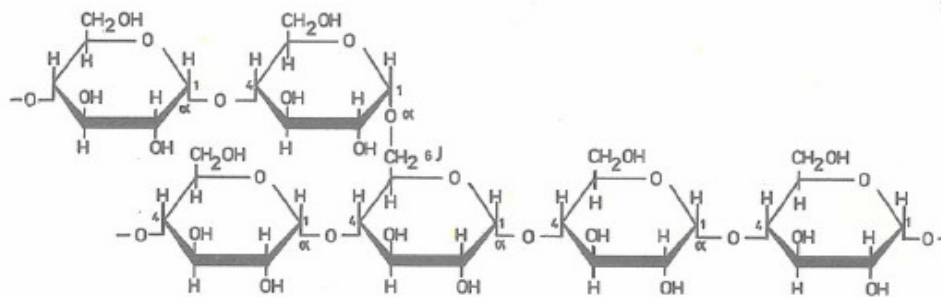
Škrob je syntetizován rostlinami jako jejich hlavní pohotový zdroj glukosy. Ukládá se v semenech, kořenech, hlízách, listech, v organelách cytoplasmy nazývaných plastidy, zejména v amyloplastech (patří mezi bezbarvé leukoplasty). Hlavními zdroji škrobu v potravinách i jeho průmyslovými zdroji jsou brambory a obiloviny, zejména pšenice a žito. Škrob je hygroskopický bílý prášek, který se v horké vodě rozpouští na koloidní lepkavý roztok škrobového mazu. Příkladem může být pudinkový prášek [7].

Amylosa je glukan, jehož základní stavební jednotku tvoří maltosa. Amylosa se rozpouští v teplé vodě, roztokem jodu se barví modře. Její obsah ve škrobu kolísá v závislosti na jeho původu (většinou zaujímá 15 - 20 %) [7].



Amylosa [7]

Amylopektin je nerozpustný ve vodě, v teplé vodě pouze bobtná. Jodem se barví fialově. Není tvořen pouze přímými řetězci maltosových jednotek spojených $\alpha(1\rightarrow4)$ glykosidovou vazbou, ale má i boční větvení (stavební jednotkou je isomaltosa) s glykosidovými vazbami $\alpha(1\rightarrow6)$, a to přibližně po každých dvaceti až pětadvaceti glukosových zbytcích. Obsahuje také malé množství esterově vázané kyseliny fosforečné (asi 0,17 % P_2O_5) [7]. Amylopektin zahřevem mazovatí, tvoří 80 - 85 % škrobu. Makromolekula amylopektinu může obsahovat až jeden milion glukosových jednotek, což ji řadí mezi největší přírodní molekuly na světě [1].



Amylopektin [7]

2.3.2 Glykogen

Glykogen je zásobní polysacharid živočichů. Nejvíce se vyskytuje v buňkách kosterního svalstva, ve svalech (srdečním) a v jaterních buňkách je uložen ve formě granulí. Při hladovění jeho obsah klesá a glykogen může z jater úplně vymizet. Rovněž při práci ubývá i svalového glykogenu. *Post mortem* dochází k jeho rychlé degradaci, v mase se pak po proběhlém zranění vyskytují jen monosacharidy, resp. jejich fosforečné estery (glukosa-1-fosfát, fruktosa-1,6-bisfosfát) v množství až 0,15 %. Glykogen je také obsažen ve vyšších houbových, plísních, kvasinkách a bakteriích. Vzniká syntézou z cukrů přijatých potravou. Slouží jako pohotovostní, čerpatelný zdroj glukosy, jejímž odbouráním získává organismus energii. Je to bezbarvá látka ve vodě rozpustná na koloidní roztok, jodem se barví hnědočerveně až červeně. Při parciální hydrolýze glykogenu lze získat maltotriosu, dextriny a glukosu, jako u hydrolýzy amylopektinu [8].

2.3.3 Inulin

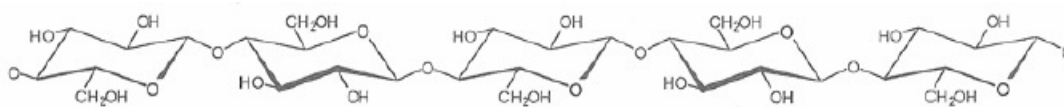
Je zásobním polysacharidem čeledi hvězdnicovitých rostlin (*Asteraceae*, *Compositae*). Vyskytuje se např. v hlízách a kořenech jirín, artyčoků, pampelišek a čekanek [1]. Z jejich kořenů se také připravuje (tepelným zpracováním lze z kořenů čekanky získat náhražku kávy). Skládá se z méně než sta D-fruktofuranosových zbytků vázaných $\beta(1\rightarrow2)$ -glykosidovými vazbami zpravidla ukončenými molekulou D-glukosy [7].

2.4 Stavební polysacharidy

Stavební polysacharidy jsou ve vodě nerozpustné, vyztužují a zpevňují pletiva rostlin (celulosa, hemicelulosa) i tkáň některých živočichů (chitin u korýšů) [7].

2.4.1 Celulosa

Celulosa je základním strukturním polysacharidem buněčných stěn vyšších rostlin. Je možno ji nalézt i v některých houbách a zelených řasách. Ve vodě a zředěných kyselinách je nerozpustná a s jodem nedává žádné zbarvení [7].



Celulosa [7]

Celulosa je lineární polymer obsahující až 15 000 D-glukosových zbytků spojených $\beta(1\rightarrow4)$ -glykosidovými vazbami. Každá z vázaných glukosových jednotek v řetězci je otočena vzhledem k předchozí a v této poloze je udržována intramolekulárními vodíkovými vazbami. Celulosa prochází trávicím traktem člověka jako vláknina [8]. Strukturně jsou celulosová vlákna pojena vodíkovými můstky, což jim dává výjimečnou pevnost a nerozpustnost. Ve stěně rostlinných buněk jsou uložena a navzájem propojena hmotou, skládající se z necelulosových polysacharidů a proteinů (např. extensin). Ve dřevě tato hmota obsahuje hemicelulosity a lignin [7].

2.4.2 Hemicelulosity

Hemicelulosity jsou strukturní necelulosové polysacharidy buněčných stěn rostlin, které v přírodě doprovázejí celulosu. Řadí se mezi ně hlavně heteroglukany, heteroxylany, hetero-

mannany aj. Hydrolýzou poskytují různé cukry (D-galaktosu, L-arabinosu, D-glukosu, D-xylosu) a uronové kyseliny, nejvíce D-galaktouronovou nebo D-glukuronovou [8].

2.4.3 Chitin

Je stavebním polysacharidem buněčné stěny většiny hub a bezobratlých živočichů. Vyskytuje se například v krunýřích korýšů a hmyzu. Strukturně chitin sestává z N-acetyl-D-glukosaminových jednotek spojených $\beta(1\rightarrow4)$ -glykosidovými vazbami [1]. Za základní stavební jednotku chitinu se obecně považuje disacharid chitobiosa [8].

2.4.4 Pektinové látky

Jsou skupinou polysacharidů zahrnujících pektinové kyseliny a jejich soli pektany. V rostlinách se vyskytují ve formě protopektinů a pektocelulos, které jsou nerozpustné ve vodě. Jsou složeny z jednotek poly-D-galaktouronové kyseliny esterifikované metanolem, obsahují glykosidové vazby $\alpha(1\rightarrow4)$. Samotný pektin je definován jako lineární polymer metylesteru poly-D-galaktouronové kyseliny s glykosidovými vazbami $\alpha(1\rightarrow4)$. Je rozpustný ve vodě [7].

3 ENZYMATICKÁ HYDROLÝZA SACHARIDŮ A JEJÍ POTRAVINÁŘSKÉ VYUŽITÍ

3.1 Glykosidasy a jejich dělení

Enzymy katalyzující hydrolýzu glykosidových vazeb (*glykosidasy*) jsou stereospecifické, takže katalyzují štěpení buď jen α - nebo β -glykosidových vazeb. Kyselinami se glykosidová vazba hydrolyticky štěpí za uvolnění složek, ze kterých glykosid vznikl, v alkalickém prostředí je poměrně odolná [7].

Glykosidasy (E.C. 3.2) tvoří z potravinářského hlediska velmi významnou skupinu *esteras*. Dělí se na podskupinu *glykosidhydrolas* (*sacharidas*, E.C. 3.2.1, katalyzující hydrolýzu O-glykosylových sloučenin), podskupinu *glykosidas* (E.C. 3.2.2, katalyzující štěpení N-glykosylových sloučenin) a na podskupinu katalyzující štěpení S-glykosylových sloučenin (E.C. 3.2.3). Potravinářsky významné jsou enzymy podskupiny *glykosidhydrolas*. Jsou to zejména *α -amylasa* (*α -1,4-glukan-4-glukanhydrolasa*, E.C. 3.2.1), *β -amylasa* (*α -1,4-glukan-maltohydrolasa*, E.C. 3.2.1.2), *glukoamylasa* (*α -D-1,4-glukan-glukohydrolasa*, E.C. 3.2.1.3) a *celulasa* (*β -D-1,4(1,3)-glukan-4-glukanhydrolasa*, E.C. 3.2.1.4) [5].

3.2 Enzymatická hydrolýza oligosacharidů

3.2.1 Enzymatická hydrolýza sacharosy a její potravinářské využití

Hydrolýza sacharosy poskytuje směs glukosy a fruktosy zvanou invertní cukr. Název je odvozen od vzniku silně levotočivé fruktosy, která se při tom tvoří. Ta vyvolává změnu (inverzi) předchozího pravotočivého působení sacharosy [1]. Enzym, který hydrolýzu sacharosy na glukosu a fruktosu katalyzuje, se nazývá *invertasa* [7].

Invertasa (*β -fruktosidasa*, *sacharasa*, *β -D-fruktofuranosid-fruktohydrolasa*, E.C. 3.2.1.26) má praktické uplatnění při výrobě umělého medu, což je v podstatě invertní cukr. Nejpoužívanější je tento enzym v průmyslu cukrovinkářském, a to při výrobě cukrovinek s měkkou fondánovou náplní. Ta se získá inverzí určitého podílu sacharosy na glukosu a fruktosu [5].

3.2.2 Enzymatická hydrolýza maltosy

Enzym *maltasa* (α -D-glukosid-glukohydrolasa, E.C. 3.2.1.20) katalyzuje hydrolýzu maltosy na glukosu, avšak ve formě enzymového přípravku se v potravinářském průmyslu neuplatňuje [5].

3.2.3 Enzymatická hydrolýza laktosy a její potravinářské využití

Hydrolýzou enzymem *laktasou* poskytuje laktosa své stavební jednotky, D-galaktosu a D-glukosu [7]. β -galaktosidasa (β -D-galaktosid-galaktohydrolasa, *laktasa*, E.C. 3.2.1.23) se uplatňuje v mlékařském průmyslu při výrobě tzv. delaktosovaného mléka, tj. mléka zbaveného laktosy, ke které jsou některé děti i dospělí intolerantní [5].

3.2.4 Sladké mléčné výrobky bez přídavku cukru

Účinkem *laktasy* se laktosa štěpí na glukosu a galaktosu, které jsou sladší než samotný disacharid. Na tomto principu je možné vyrobit nízkokalorické sladké mléčné produkty (s nepatrným nebo žádným přídavkem cukru) [9].

Tyto výrobky mohou konzumovat i osoby, které trpí nesnášenlivostí vůči laktose. Na Technické univerzitě v Mnichově vyvinuli postup, v němž se do zakysaného mléčného výrobku, těsně před jeho plněním do obalu, přidává malé množství enzymu *laktasa* z kmene *Aspergillus oryzae*. Hydrolýza probíhá v obalu během fáze distribuce: 3 až 5 dnů při teplotě 4 - 10 °C. Množství přídavku se musí volit tak, aby došlo k hydrolýze minimálně 80 % laktosy. Výrobek se označuje jako „se sníženým obsahem laktosy“ [9].

3.2.5 Glykosidy a jejich enzymatická hydrolýza

Glykosidy jsou definovány jako deriváty cyklických forem sacharidů, u nichž je vodík poloacetalového hydroxyly nahrazen alkylem nebo arylem. Nacházejí se zejména v rostlinách. Glykosidy se snadno hydrolyzují zředěnými kyselinami. Důležité je využití jejich enzymatické hydrolýzy, která se vyznačuje značnou stereospecifitou. α -Glykosidasy (např. *maltasa*) štěpí jen α -glykosidy, β -glykosidasy (např. *emulsin*) hydrolyzují pouze β -glykosidy. Pomocí těchto enzymů lze určit, jde-li o α - nebo β -glykosid. Např. amygdalin (nachází se v hořkých mandlích, jádrech peckovin) poskytuje hydrolýzou dvě molekuly glukosy, benzaldehyd a kyanovodík [10].

3.3 Enzymatická hydrolýza polysacharidů

3.3.1 Enzymatická hydrolýza škrobu

Produkty neúplné hydrolýzy škrobu nazýváme dextriny (maltosa, maltotriosa, isomaltosa, maltotetraosa aj.). Jsou to mírně nažloutlé látky, rozpustné ve vodě, které se jodem barví různě, podle délky řetězce. Např. dextriny složené ze čtyř až šesti glukosových jednotek se nebarví vůbec (achrodextriny), řetězce z osmi až dvanácti glukosovými zbytky se barví červeně (erytodextriny) [8]. Limitní dextriny jsou první produkty, které se tvoří, jakmile hydrolýza dosáhne určitého stupně větvení. Vznikají typicky ze škrobu působením rostlinné *amylasy*, která štěpí řetězce amylopektinu od neredukujících konců pouze k místům větvení [1]. Dextriny vznikají také zahříváním škrobu na teplotu asi 160 °C (při pečení chleba) [8].

Trávení škrobu začíná již v ústech působením slinné α -*amylasy* (*1,4- α -D-glukan-4-glukanhydrolasa*, *diastasa*, *ptyalin*, E.C. 3.2.1.1), která hydrolyzuje $\alpha(1\rightarrow4)$ -glykosidové vazby a v žaludku je inaktivována. Trávení pokračuje v tenkém střevě účinkem pankreatických enzymů α -*amylasy*, *isomaltasy* aj. Tyto enzymy rozloží škrob na směs disacharidu maltosy, trisacharidu maltotriosy, oligosacharidy a dextriny, které obsahují $\alpha(1\rightarrow6)$ větvení. Vzniklé meziproducty jsou pak rozkládány specifickými enzymy střevní sliznice *α -glukosidasou* (*maltasa*, *α -D-glukosid-glukohydrolasa*, E.C. 3.2.1.20), která odbourá po jedné glukose z oligosacharidu, *α -dextrinasou* (*1,6- α -D-glukon-6-glukohydrolasa*, E.C. 3.2.1.11), která hydrolyzuje $\alpha(1\rightarrow4)$ - a $\alpha(1\rightarrow6)$ -vazby a *sacharasou* (*β -D-fruktofuranosid-fruktohydrolasa*, E.C. 3.2.1.26). Monosacharidy jsou poté vstřebávány do krevního oběhu [8].

Všechny *amylasy* katalyzují štěpení α -1,4-glukanových vazeb, a to tak, že α -*amylasa* (*α -1,4-glukan-4-glukanhydrolasa*, E.C. 3.2.1.1), která se označuje jako dextrinogenní, umožní štěpení škrobu zprvu za vzniku sacharidů o 6 až 7 glukosových jednotkách a potom se štěpené produkty postupně odbourávají na maltosu [5].

Enzym α -*amylasa* je *endoglykosidasa*, zatímco β -*amylasa* je *exoglykosidasa*. β -*Amylase* (*α -1,4-glukan-maltohydrolasa*, E.C. 3.2.1.2), označovaná jako sacharogenní, zasahuje od neredukujícího konce molekuly tak, že obě poslední glukosové jednotky se odštěpí v β -formě maltosy. Novější výzkumy nasvědčují tomu, že α -*amylasa* je metaloenzym, který vyžaduje na jednu svou molekulu jeden ion Ca^{2+} . Odstraní-li se vápenaté ionty, ztrácí en-

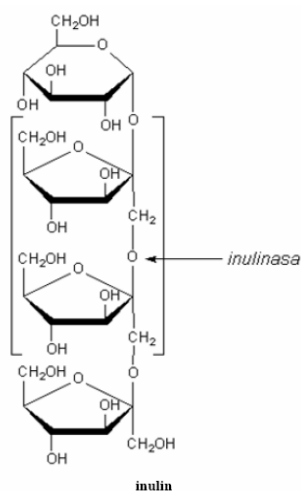
zym svoji aktivitu. Rostlinné β -amylasy se inaktivují činidly reagujícími s tiolovými skupinami. Proto se při jejich katalytickém působení předpokládá významná úloha tiolových skupin. α -Amylasy je termostabilnější (působí ještě v rozmezí 65 až 75 °C) než β -amylasy [5].

3.3.2 Potravinářské využití amylolytických enzymů

Amylasy se uplatňují při ztekucení a zcukření škrobu (např. při výrobě škrobových, maltosových a glukosových sirupů). Hydrolyzované škroby slouží jako sladidla a nosiče aromatu při výrobě cukrovinek, nápojů, zmrzliny. V potravinářství se používají různé amylolytické přípravky, označované jako sladové amylasy, plísňové enzymy apod. Dnes se hojně používají plísňové amylasy v pečárenském průmyslu ke zlepšení technologických hodnot pšeničných mouk. K tomu účelu se používají i bakteriální amylasy, které jsou termostabilnější než amylasy plísňové. K výrobě glukosy ze škrobu slouží *glukoamylasa* (*1,4- α -D-glukan-glukohydrolasa*, E.C. 3.2.1.3), mnohdy ve formě imobilizované. Je účinná po předchozím ztekucení škrobu, ať již kyselinami nebo α -amylasou [5].

3.3.3 Enzymatická hydrolýza inulinu

Inulin je bezbarvá látka mikrokrytalické struktury, dobře rozpustná v horké vodě. Zředěnými kyselinami nebo enzymem *inulinasou* (*2,1- β -D-fruktan-fruktanohydrolasa*, E.C. 3.2.1.7) se snadno štěpí na D-fruktosu (obr. 1) [7]. Hydrolýzou poskytuje inulin fruktosu [1].



Obrázek 1. Štěpení inulinu *inulinasou* [7]

3.3.4 Enzymatická hydrolýza celulosy

Celulosu nemůže mnoho savců, mezi nimi ani primáti, tedy ani člověk strávit, poněvadž jim chybí *hydrolasa*, která by atakovala $\beta(1\rightarrow4)$ -glykosidové vazby tohoto polysacharidu. Celulosa je tedy významným zdrojem objemného nestravitelného zbytku v potravě. Ve střevě přežvýkavců a jiných býložravců jsou mikroorganismy (střevní mikroflóra), které mohou svými enzymy tuto β -vazbu atakovat [1]. Vylučují komplex celulolytických enzymů pod společným názvem *celulasy* (*1,4-(1,3; 1,4)- β -D-glukan-4-glukan-hydrolasy*, E.C. 3.2.1.4). Pomocí těchto enzymů si býložravci rozkládají celulosu až na konečný produkt glukosu, která je dále bakteriemi fermentována na nižší organické kyseliny [7]. Tím vytvářejí z celulosy energeticky dostupný zdroj. Tento mikrobiální pochod se může uplatňovat v omezeném rozsahu také v lidském tlustém střevě [1]. Klasickým zdrojem *celulas* jsou i hlemýždi *Helix pomatia* a nově se zjistilo, že i termity [5].

Částečnou hydrolýzou celulosy vzniká směs disacharidů, trisacharidů a tetrasacharidů, z nichž asi 50 % tvoří disacharid cellobiosa, která je pokládána za stavební jednotku celulosy [8]. Cellobiosa je enzymově štěpena *cellobiasou* (*β -D-glukosid-glukohydrolasa*, *β -glukosidasa*, E.C. 3.2.1.21) na dvě molekuly D-glukosy [7].

3.3.5 Potravinářské využití celulolytických enzymů

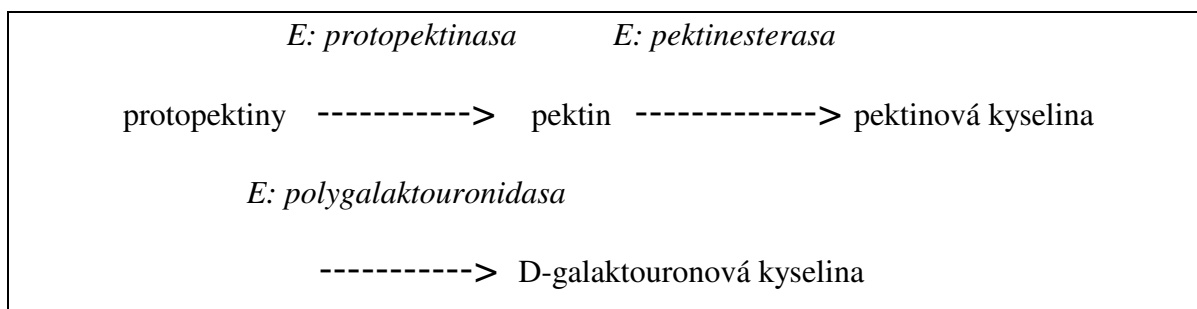
Celulolytické enzymy slouží k průmyslovému získávání cukrů z celulosy, ale též k odstraňování zákalů vyvolaných celulosou a hemicelulosami v citrusových a jiných ovocných šťávách. V konzervářském průmyslu se celulasové přípravky používají k odstraňování celulosových vláken z fazolových lusků i jiných zelenin. Tím se podstatně zvyšuje stravitelnost a využitelnost přítomných živin. Mimořádné uplatnění mají celulasové přípravky i v průmyslu krmivářském [5].

3.3.6 Enzymatická hydrolýza chitinu

Ve vodě je nerozpustný a poměrně odolný vůči chemickým činidlům. Rozkládá se pouze bakteriálními enzymy *chitinasami*, enzymem *lysozymem* (ten štěpí chitodextriny) a koncentrovanými kyselinami. Vzhledem k tomu, že lidský organismus není schopen zcela štěpit chitin, jsou houby pro člověka jen částečně stravitelné. Navíc, chitin tvoří komplexy s většinou těžkých kovů (Hg, Pb), které mohou být příčinou intoxikací [8].

3.3.7 Enzymatická hydrolýza pektinových látek

Pektin se připravuje kyselou hydrolýzou z protopektinů či jejich enzymatickou degradací. Působením *protopektinasy* se protopektin (v rostlinách) hydrolyzuje na pektin, který je dále degradován *pektinesterasou* na kyselinu pektinovou. *Polygalaktouronidasa* katalyzuje hydrolytické štěpení pektinové kyseliny na galaktouronovou kyselinu [5].



Obrázek 2. Enzymatická degradace protopektinů [8]

Enzymy *protopektinasa* a *polygalaktouronidasa* katalyzují hydrolýzu glykosidických vazeb, *pektinesterasa* katalyzuje hydrolýzu esterových vazeb, odštěpení methanolu. Trávicí enzymy neštěpí jejich glykosidové vazby, podobně jako u jiných složek vlákniny, část z nich však podléhá hlubokému rozkladu působením bakteriální mikroflóry tlustého střeva. Během zrání ovoce a zeleniny nastává enzymatická i neenzymatická degradace pektinových látek, jež se projevuje měknutím plodů, např. jablek či rajčat. Pektinové látky se připravují k výrobě džemů a marmelád. Vyrábějí se extrakcí vhodného materiálu jako tzv. jablečný nebo citrusový pektin [8].

3.3.8 Potravinářské využití *polygalaktouronidasy* a její dělení

V potravinářské praxi, zvláště při výrobě různých ovocných nápojů, se používají různé pektolytické enzymové přípravky, převážně původu mikrobiálního, jejichž účinnou složkou je *polygalaktouronasa* (*polygalaktouronidasa*), označovaná též jako *pektinasa* (*poly-1,4- α -D-galaktouronid*, *glykanohydrolasa*, E.C. 3.2.1.15). Ta svým působením přispívá k čiření ovocných šťáv, neboť zabraňuje jejich rosolovatění, jehož hlavní příčinou bývá pektin. Rovněž se uplatňuje při čiření vín. Je použitelná též v imobilizované formě. Deuel a Stutz zahrnují pod název *polygalaktouronasa* tři enzymy:

- a) ztekující *polygalaktouronasa*, která katalyzuje štěpení 1,4-glykosidických vazeb pektinových polyuronidů,
- b) ztekující *polymethylgalaktouronasy*, které katalyticky hydrolyzují vysokoesterifikované pektiny,
- c) zcukřující *polygalaktouronasa* hydrolyzující pektin, pravděpodobně na konci redukujícího řetězce molekuly [5].

4 PROTEINY

Proteiny jsou polymery aminokyselin, které vznikly procesem proteosyntézy. Ve své molekule obsahují více než 100 aminokyselin vzájemně spojených peptidovou vazbou. Kromě peptidových vazeb se na utváření struktury proteinů podílejí ještě jiné vazby, zejména disulfidové (-S-S-), esterové a amidové (umožňuje spojení serinu, treoninu, argininu nebo lysinu prostřednictvím kyseliny fosforečné). Pořadí (sekvence) a počet jednotlivých aminokyselinových zbytků v řetězci jsou pro každý protein specifické, determinované genovou výbavou buněk. Všechny proteiny v naší biosféře mají stejnou základní stavbu a liší se jen pořadím převážně 20 kódovaných aminokyselin jako stavebních jednotek. Podle biologické funkce, kterou vykonávají v biologických systémech se proteiny dělí na: strukturní, katalytické, pohybové, ochranné, zásobní, sensorické, regulační, výživové [7].

4.1 Strukturní proteiny

Strukturní proteiny jsou složkami všech živých buněčných struktur – cytoskeletu, buněčných organel a biomembrán. Extracelulární fibrilární proteiny (keratiny, kolageny a elastiny) společně s peptidoglykany a adhezivními proteiny (fibronektin, laminin) dodávají tkáním mechanickou pevnost a pružnost [7].

4.1.1 Kolageny

Kolageny se vyskytují skoro ve všech pojivových tkáních jako jsou kůže, chrupavky, cévní stěny, zuby a kosti. Základní struktura kolagenních vláken je tvořena molekulami tropokolagenu, které jsou složeny ze tří vzájemně stočených stejně dlouhých vláken (převážně α -helixů), které samovolně agregují za vzniku kolagenních vláken [8].

4.1.2 Elastiny

Elastiny doprovázejí kolageny ve šlachách, pojivových tkáních a ve stěnách cév. Jejich základní stavební jednotkou je tropoelastin, který je tvořen jedním polypeptidovým řetězcem. Tvoří se z rozpustného prekurzoru proelastinu. Jedním z typů příčných vazeb je desmosin a jeho isomer isodesmosin. Desmosinové vazby jsou pevné, odolávají i kyselé hydrolýze a způsobují úplnou nerozpustnost elastinů. Elastiny lze odbourat specifickými proteolytickými enzymy *elastasami* [8].

4.1.3 Keratiny

Keratiny jsou produkty buněk epitelu. Vyskytují se na vnější straně pokožky (*epidermis*), v srsti, rozích, kopytech, nehtech, peří apod. Obsahují vysoké množství glycinu, serinu a cysteinu. Tvrdost, nerozpustnost a roztažnost dodávají keratinům disulfidové vazby, zpevňující celou strukturu keratinů. Trávicí enzymy je mohou degradovat až po předešlém přerušení disulfidových vazeb [8].

4.2 Mléčné proteiny

Kasein je hlavní protein v kravském mléce, v němž tvoří asi 80 % všech mléčných bílkovin. Kaseiny obsahují relativně vysoký podíl prolinu a hydrofobních aminokyselin, též fosfoserinových zbytků. Existuje řada různých variant kaseinů, které se od sebe liší chemickou strukturou a vlastnostmi (např. α_{s1} -, α_{s2} -, β_{s1} -, κ_{s1} -kasein). Kasein je velmi termostabilní, což znamená, že se zvýšením teploty nesráží [11]. Degradací β -kaseinů proteolytickými enzymy mléka vznikají γ kaseiny. Kasein je obsažen v mléce ve formě vápenaté soli [10].

Syrovátkové (sérové) proteiny (např. α -laktalbumin, β -laktoglobulin, imunoglobuliny) tvoří přibližně 20 % bílkovin kravského mléka. Jsou termolabilní, tepelnou úpravou se denaturují. Mají vysoký obsah cystinu a tryptofanu, na který je kasein chudý [12].

5 ENZYMATICKÁ HYDROLÝZA PROTEINŮ A JEJÍ POTRAVINÁŘSKÉ VYUŽITÍ

5.1 *Peptidasy* a jejich dělení

Peptidasy (E.C. 3.4) jsou enzymy, které katalyzují hydrolýzu peptidových vazeb proteinů a mnoha peptidů. Je to velmi rozsáhlá skupina enzymů, z nichž mnohé (především enzymy digestivní) patří k nejlépe prostudovaným. Dělí se na dvě hlavní skupiny: *peptidasy* (*exo-peptidasy*) a *prokinasy*. K *peptidasám* patří podskupiny α -*aminopeptidasy* (E.C. 3.4.11), *acyl-amino-acidhydrolasy*, též označené jako *peptidylamino-acidhydrolasy* (E.C. 3.4.12), *dipeptidhydrolasy* (E.C. 3.4.13), *dipeptidylpeptidasy* (E.C. 3.4.14) a *peptidylpeptidasy* (E.C. 3.4.15). *Proteinasy* (*proteasy*) se dělí na *serinové proteinasy* (E.C. 3.4.21), *tiolové proteinasy* (*SH-proteinasy*, E.C. 3.4.22), *kyselé proteinasy* (*acidproteinasy*, E.C. 3.4.23), *metaloproteinasy* (E.C. 3.4.24) a *proteinasy*, u nichž není dosud znám mechanismus jejich působení (E.C. 3.4.25) [5].

Peptidasy jsou nepostradatelné pro štěpení, trávení a autolýzu proteinů, a proto jsou též hojně rozšířeny. Některé jsou produkovány pouze v trávicím ústrojí živočichů a jsou pro ně typické. Některé tyto enzymy jsou produkovány ve formě inaktivních proenzymů a musejí být aktivovány v místě svého působení. Tato aktivace bývá někdy autokatalytická. Přestože většina *peptidas* není zvláště specifická k určitému substrátu, neboť katalyzuje štěpení několika substrátů, přece jen umožňují štěpení takových peptidových vazeb, které se vyskytují v místě určitého uspořádání, např. polárních skupin s kladným nebo záporným nábojem a některých nepolárních radikálů, jako jsou aromatická jádra aromatických aminokyselin. Členění *peptidas* na podskupiny vychází z jejich specifity, s jakou katalyzují hydrolýzu peptidových vazeb terminálních aminokyselinových zbytků, tj. buď s volnou aminovou nebo s volnou karboxylovou skupinou. Proto se tyto *peptidasy* označují též jako *exo-peptidasy*. α -*Aminoacylpeptidasy* jsou *aminopeptidasami* o různé specifitě a *peptidylamino-acidhydrolasy* jsou *karboxylpeptidasami*. Takovou *aminopeptidasou* je např. *mikrosomální aminopeptidasa* (*mikrosomální α -aminoacylpeptidasa*, E.C. 3.4.11.2), která katalyzuje hydrolýzu aminoacylpeptidu na aminokyselinu a oligopeptid. *Karboxypeptidasou* je např. *karboxypeptidasa A* (*peptidyl-L-aminoacidhydrolasa*, E.C. 3.4.12.2), která katalyzuje hydrolýzu peptidyl-L-aminokyseliny za vzniku peptidu a L-aminokyseliny [5].

5.1.1 *Pepsin A*

Pepsin A (E.C. 3.4.23.1) patří k *hydrolasam* působícím při nízkém pH, jeho optimální pH se pohybuje kolem 2. Katalyzuje přednostně hydrolýzu vazeb Glu (glutamová kyselina) (Leu) (leucin) - Tyr (tyrosin) (Phe) (fenylalanin). Hydrolýzou asi 10 % peptidových vazeb vznikají polypeptidy o molekulové hmotnosti od 600 do 3000. *Pepsin A* je produkován hlavními buňkami žaludeční sliznice, a to ve formě inaktivního pepsinogenu. Ten se aktivuje na *pepsin* katalyticky protonem [5]. Vlivem iontů H^+ , při pH 1,5 - 2,5 a již aktivních molekul *pepsinu*, se z molekul pepsinogenu odštěpuje více peptidů, přičemž se uvolní katalyticky aktivní centrum. Při slabě kyselém pH žaludkového obsahu se aktivace zpomaluje. Odštěpený peptid (inhibiční peptid) se může při slabě kyselém, resp. neutrálním pH vázat s *pepsinem* a intenzivně snižovat jeho aktivitu. Při kyselém pH (menším než 4,5) se inhibiční peptid z *pepsinu* odštěpí. Pro účinek *pepsinu* je tudíž potřebná dostatečná sekrece HCl. Během sekrece žaludeční šťávy se malé množství pepsinogenu přepravuje z hlavních buněk do krevní plazmy a močí se vylučuje jako uropepsinogen. Vylučování uropepsinogenu stoupá při poškození žaludeční sliznice [2]. *Pepsin A* se získává ze žaludeční sliznice vepřů [5].

5.1.2 *Trypsin*

Trypsin (E.C. 3.4.21.4) katalyzuje hydrolýzu vazeb -Lys- (lyzin) -x- a -Arg- (arginin) -x-, kde x je libovolná aminokyselina. Katalyzuje též hydrolýzu těch esterů a amidů, které jsou odvozeny pouze od L-aminokyselin a které mají bazický postranní řetězec. Jeho účinnost je optimální při pH 7 až 8. Inaktivní formou *trypsinu* je trypsinogen. V této formě se nalézá v pankreatické šťávě. V tenkém střevě se aktivuje *enteropeptidasou* (*enterokinasou*) [5]. Trypsin vytvořený vlivem této *peptidasy* potom aktivuje další molekuly trypsinogenu i jiné zymogeny [2]. Aktivují jej též některé plísňové *proteínasy*. Aktivace *trypsinu* spočívá v odštěpení hexapeptidu, jehož sekvence aminokyselin je Val- (valin) -Asp- (asparagin) -Asp-Asp-Asp-Lys (lyzin) [5]. *Trypsin* může být inhibován různými inhibitory. Samotná pankreatická šťáva obsahuje účinný trypsinový inhibitor. Jedním z dalších živočišných inhibitorů *trypsinu* je ovomukoid, glykoprotein vaječného bílku. Kiermeyer a Semper prokázali trypsinový inhibitor i v mléku. Antitrypsinový účinek lze vysvětlit tvorbou komplexů s *trypsinem* - předpokládá se vznik dimerních i trimerních komplexů. U ovomukoidu je prokázáno, že se tento inhibitor váže na jednu aminoskupinu *trypsinu*. Steve a Podrazky

potvrdili svými pracemi, že je *trypsin* inhibován tioly. Jednotlivé trypsinové inhibitory se liší mezi sebou zpravidla jen rozdílnou molekulovou hmotností a rozpustností v 2,5% kyselině trichloroctové, avšak ani v tomto směru nebyly shledány podstatné rozdíly mezi inhibitory rostlinnými a živočišnými. Většina z nich se inaktivuje vyššími teplotami v důsledku konformačních změn bílkovinné molekuly [5].

5.1.3 *Chymotrypsin*

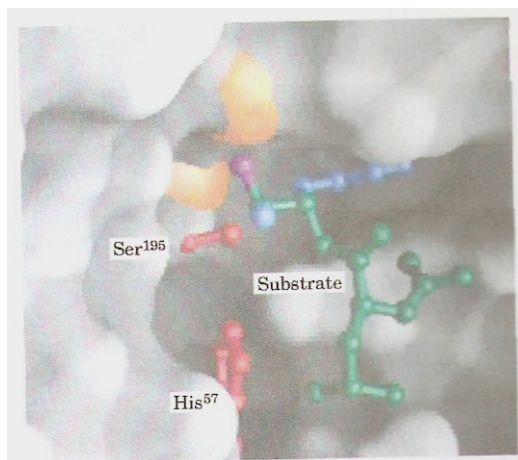
Chymotrypsin (E.C. 3.4.21.4) katalyzuje hydrolýzu peptidových vazeb, v nichž je karboxylová skupina poskytována aromatickými aminokyselinami (Phe - fenylalanin, Tyr - tyrosin, Trp - tryptofan), či aminokyselinami s velkým nepolárním zbytkem (např. Met - metionin) [1].

Ser 195 (serin, číslo udává pořadí aminokyseliny v aminokyselinovém řetězci) *chymotrypsinu* je vodíkovou vazbou vázán k His 57 (histidinu), který je vodíkovou vazbou vázán k Asp 102 (kyselině asparagové). Tyto tři aminokyselinové zbytky *chymotrypsinu* jsou nazývány katalytickou triádou. Zatímco kyslík Ser 195 napadá uhlík peptidové vazby, slouží His 57 jako báze k serinovému protonu a záporně nabitá Asp 102 stabilizuje kladný náboj, který se utváří na histidinovém zbytku. To brání vzniku nestabilního kladného náboje na hydroxylové skupině Ser 195 (obr. 3). *Chymotrypsin* nekatalyzuje přímé působení vody na peptidovou vazbu, namísto toho vytváří přechodný kovalentní acyl-enzym. Probíhající reakce mají dvě hlavní fáze. V acylační fázi je rozštěpena peptidová vazba a utvořena esterová vazba mezi peptidovým uhlíkem a enzymem. V deacylační fázi je esterová vazba hydrolyzována a neacetylovaný enzym je obnoven [13].

Podobně jako řada dalších *proteinů* katalyzuje *chymotrypsin* také hydrolýzu některých esterů. Tato schopnost *chymotrypsinu* sice nemá fyziologický význam, usnadňuje však studium mechanismu katalýzy [1]. Např. štěpí etylester tyrosinu na tyrosin a etanol, vyznačuje se tedy esterasovou aktivitou [5]. Hydrolýza nižších esterů a amidů *chymotrypsinem* probíhá mnohem pomaleji než hydrolýza peptidů, jelikož je při reakci s menšími substráty dosaženo nižší vazebné energie [13].

Chymotrypsin sestává ze tří polypeptidových řetězců spojených disulfidovými můstky [13]. Inaktivní formou *chymotrypsinu* je chymotrypsinogen. Aktivuje se působením *trypsinu*, kterému je strukturou a vlastnostmi blízký [5]. *Chymotrypsin* je derivatizací Ser 195, svého velmi reaktivního serinového zbytku, inaktivován reakcí s diisopropylfosfluoridem

(DIPF), se kterým ostatních 27 serinových zbytků *chymotrypsinu* nereaguje. DIPF inaktivuje stejným mechanismem také řadu dalších *proteinás* zvaných "serinové *proteinasy*" [1].



Obrázek 3. Struktura *chymotrypsinu* s navázaným substrátem [13]

5.1.4 *Katepsiny*

Významnými *peptidasami* jsou *katepsiny* (E.C. 3.4.4.23), z nichž *katepsin C* je *dipeptidyl-peptidasou* (E.C. 3.4.14.1), zatímco *katepsin B* (E.C. 3.4.22.1) a *katepsin D* (E.C. 3.4.23.5) patří k *proteinásam*. *Katepsiny* hrají důležitou úlohu při autolýze proteinů a tedy i při procesu zrání masa. *Katepsin C* se uplatňuje i při transpeptidaci [5].

5.1.5 Rostlinné *proteinasy*

Z hlediska potravinářského jsou důležité některé rostlinné *proteinasy*, které je možno využít k různým účelům. Patří sem *papain* (E.C. 3.4.22.2) přítomný v mléčné šťávě melounovitých plodů *Carica papaya*, *chymopapain* (E.C. 3.4.22.6) a *ficin* (E.C. 3.4.22.3) vyskytující se v mléčné šťávě plodu jednoho druhu fíkovníku a *bromelain* (E.C. 3.4.22.4) obsažený ve šťávě ananasu. Jde převážně o enzymy, které jsou aktivovány některými tiolovými sloučeninami, jmenovitě cysteinem a glutationem. *Papain* je aktivován i sulfanem a kyanovodíkem. Naopak oxidační činidla, jako jodičnany a vzdušný kyslík, enzymy inaktivují. *Papain* inhibuje *trombokinasu*, čímž zabraňuje přeměně protrombinu na *trombin* a tedy i tvorbě fibrinogenu. V potravinářské praxi se *papain*, *ficin* a *bromelain* používají k umělému zkrášení masa, *papain* i v pivovarnictví k odstranění nežádoucího proteinového zákalu [5].

5.1.6 Plísňové *proteinasy*

Důležitými producenty *peptidas* a *proteinas* jsou různé mikroorganismy, zejména plísně z rodu *Penicillium* a *Aspergillus*. *Aspergillopeptidasa* konvertuje trypsinogen na *trypsin*. Některé streptokoky produkují *streptococcuspeptidasu*. Tento enzym je méně specifický, avšak neschopný katalyzovat štěpení vazeb s glycylovými zbytky [5].

5.2 Enzymatická hydrolýza kolagenu a její potravinářské využití

Nativní a denaturovaný kolagen mohou hydrolyticky štěpit speciální *proteinasy kolagenasy* produkované mikroorganismy rodu *Clostridium*, zvláště *kolagenasa 2* (E.C. 3.4.99.5), kterou produkuje *Clostridium histolyticum* [5]. Působením *kolagenasy* na kolagen se odštěpují převážně peptidy, které mají na konci aminokyselinu glycin (Gly) [14].

Ve svalech denaturovaný kolagen kyselinou mléčnou je hydrolyzován při zrání masa také jinými enzymy, např. *cysteinproteinasou (katepsinem B₁)*. Teplem denaturovaný kolagen je možno hydrolyzovat *pepsinem* nebo *trypsinem*. Jeho charakteristickou vlastností je smršťování molekuly při zahřívání na určitou teplotu, které můžeme pozorovat při vaření a pečení masa. Při vyšší teplotě (kolem 90 °C) se narušuje struktura molekul kolagenu, přerušují se vazby mezi polypeptidovými řetězci, molekuly tropokolagenů se uvolní a vzniká sol rozpustné želatiny. Při ochlazení se náhodně obnovují vazby mezi částmi původních řetězců. Tyto struktury pak zachycují značné množství vody a vzniká gel (želatina). Želatina vzniká také při vaření, pečení a jiné tepelné úpravě masa. Potravinářská želatina se vyrábí z kolagenu kůží a kostí extrakcí vodou po částečné alkalické nebo kyselé hydrolýze. Z kolagenu se vyrábějí také klihovková střívka jako jedlé obaly pro masné výrobky [8].

Vzhledem k nízkým požadavkům na energii je v poslední době upřednostňován před hydrolytickým rozkladem kolagenu v kyselém nebo zásaditém prostředí rozklad enzymatický, pomocí kterého lze v závislosti na zvolených podmínkách hydrolýzy získat produkty s různými vlastnostmi a různými molárními hmotnostmi. Hlavními výhodami hydrolýzy katalyzované proteolytickými enzymy jsou mírné reakční podmínky dané maximální teplotou 80 °C, alkalitou směsi v rozmezí pH 8-9 a atmosférickým tlakem. Získaný bílkovinný hydrolyzát obsahuje nízký podíl anorganických solí. Využití hydrolyzátů je velmi široké. Mohou být použity v potravinářství jako látky uchovávací vůni nebo chuť. Jsou hojně využí-

vány také v kosmetice, kde se přidávají do krémů či pleťových masek. Méně kvalitní proteinické hydrolyzáty jsou vhodnější jako přísady do krmiv a hnojiv [14].

5.3 Enzymatická hydrolýza keratinu a její potravinářské využití

Peptidové vazby keratinu umožňuje štěpit *keratinasa* (E.C. 3.4.99.11) produkovaná některými mikroorganismy z rodu *Streptomyces* [5]. Využití keratinů pro potravinářské účely je omezeno pouze na výrobu tzv. potravinářského keratinu, který se někdy používá ve směsi s jinými surovinami pro výrobu proteinových hydrolyzátů [8]. K jejich výrobě slouží tzv. *kyselá proteinasa*, tj. mikrobiální enzym katalyzující hydrolýzu peptidových vazeb v poměrně širší oblasti pH (2 až 6) [5]. Alkalickou hydrolýzou lze z keratinů vyrobit lepidla [8].

5.4 Enzymatická hydrolýza mléčných proteinů a její potravinářské využití

Sladké srážení mléka je uskutečněno pomocí enzymů, tzv. syřidel, které se získávají z žaludků mladých telat [11]. Hlavním požadavkem na syřidlové enzymy je úzká substrátová specifita a vysoká schopnost koagulace sladkého mléka (při teplotě pod 10 °C ke koagulaci nedochází) [12]. Tyto enzymy jsou schopny štěpit kasein na specifickém místě, čímž dojde k rozdělení molekuly kaseinu na dvě části. První část se nazývá para κ_{s1} kasein, který vytváří sraženinu. Druhá část se nazývá glykomakropeptid, který je rozpustný a přechází do syrovátky. Sladké srážení se využívá pro výrobu sýrů [11].

Mléko lze koagulovat téměř všemi *proteinasami*, ale pouze omezený počet z nich vyhovuje výše uvedeným požadavkům. Dříve se používalo výhradně chymosinových syřidel získaných z telecích slezů sajících telat, avšak chymosinová syřidla byla v důsledku nedostatku výchozí suroviny nahrazována jinými typy *proteinas* živočišného a mikrobiálního původu [12].

Chymosin (*rennin*, E.C. 3.4.23.4) umožňuje přeměnu kaseinů mléka na nerozpustné parakaseiny. Tato koagulace mléčných kaseinů je velmi důležitá v sýrařství. Proto *rennin* získávaný ze žaludků telat je hlavní součástí syřidel. Protože je ho nedostatek, nahrazuje se v současné době syřidly připravenými z mikrobiálních *proteinas*. *Rennin* je produkován v žaludeční sliznici mláďat savců, kde vznikl aktivací prorenninu [5].

Alkalická fosfatasa (ortofosforečný monoester-fosfohydrolasa, E.C. 3.1.3.1) je přítomna v živočišných organismech a též v mléku. Má optimální pH v rozmezí 7 až 9. Vyznačuje se také transferasovými účinky. V mlékárenské kontrole slouží tzv. fosfatázový test k důkazu pasterace mléka. Frahm prokázal reaktivaci *fosfatasy* v pasterovaném mléku. K této reaktivaci dochází za určitých podmínek, např. během přechovávání pasterovaného mléka při běžné teplotě místnosti [5].

5.5 Hydrolytický účinek plasminu v mléce

Enzym *plasmin* - hlavní *proteinasa* mléka - ovlivňuje vzhledem ke svému proteolytickému účinku kvalitu mléka během skladování, průběhu výroby a kvalitu mléčných výrobků. Studie uvádí výsledky účinku plasminu při chladírenském uchovávání mléka [15].

Plasmin má vzhledem ke svému hydrolytickému účinku vliv i na kvalitu mléčného výrobku. Působení plasminu je spojováno s řadou defektů při výrobě mléčných výrobků, včetně těch týkajících se kvality a výtěžnosti sýřeniny nebo vytváření hořké pachuti. Při zrání řady sýrů má naopak hydrolýza kaseinů plasminem pozitivní vliv. Cílem studie bylo zjistit faktory, které ovlivňují proteolýzu vyvolanou *plasminem* během chladírenského skladování mléka, a také zjistit, jak tato proteolýza ovlivňuje některé vlastnosti kaseinových micel. Aktivitu *plasminu* během skladování mléka při různých teplotách ovlivňují dva konkurující si mechanismy: autolýza a aktivace plasminogenu, což je zymogen obsažený v kaseinových micelách (tzn. enzym v neaktivním stavu). Při 5 °C má větší význam autolýza, při 37 °C v raných stadiích skladování převažuje aktivace plasminogenu. Mění se aktivita plasminu působí na rozsah hydrolýzy β -kaseinu. Při 37 °C hydrolýza β -kaseinu stoupá, dokud nedosáhne asi 40 % z původního β -kaseinu [15].

Disociace β -kaseinu během skladování je významně ovlivňována teplotou (se zvyšující teplotou se zvyšuje). Disociovaný β -kasein v mléčném séru je rychle hydrolyzován aktivním *plasminem*. Po tepelném ošetření mléka (90 °C po dobu 10 min) se aktivita *plasminu* sníží a disociace zvýší. Přídavek exogenního *plasminu* do ohřátého mléka podporuje rozpad komplexu [β -laktoglobulin/ κ -kasein], což je první krok k želírování UHT-mléka v průběhu jeho skladování. Všeobecně platí, že skladovací podmínky mají rozhodující vliv na plasminový systém a jeho působení na kaseinové micely [15].

5.6 Enzymová hydrolýza koncentráту bílkovin syrovátky

Cílem práce výzkumných pracovníků z Ústavu technologie mléka a tuků VŠCHT bylo najít vhodné enzymy pro hydrolýzu koncentrátu syrovátkových bílkovin (WPC, Whey Protein Concentrate) [16].

Byl sledován vliv tepelné denaturace bílkovin na průběh hydrolýzy a sensorická přijatelnost vzniklých hydrolyzátů. Bylo zjištěno, že pro většinu enzymů je podíl rozštěpených peptidových vazeb vyšší u 5% (w/w) koncentrátu syrovátkových bílkovin (WPC) v porovnání s 20% (w/w) WPC. Výjimkou je *pepsin*, u kterého se stupeň hydrolýzy ve 20% (w/w) WPC zvýšil třikrát oproti 5% (w/w) WPC. Ze sledování vlivu koncentrace enzymu na průběh hydrolýzy vyplývá, že v rozmezí poměru enzym : substrát = 1 : 100 až 1 : 500 probíhá hydrolýza při vyšší koncentraci enzymu do vyššího stupně hydrolýzy, ne vždy je však zvýšení úměrné koncentraci enzymu. Při sensorickém hodnocení hydrolyzátů z předložených pěti vzorků (*Fermizym*, *Flavourzyme*, *Neutrase*, *papain*, *Protamex*) vykazovaly nejnižší intenzitu hořké chuti hydrolyzáty *Flavourzymu* a *Protamexu*. Velmi hořké hydrolyzáty byly získány hydrolýzou *papainem* a *Fermizyem*. Tepelná denaturace bílkovinného substrátu usnadňuje ve většině případů jeho enzymovou hydrolýzu [16].

5.7 Enzymatická modifikace syrovátkového koncentrátu

Působení *pepsinu* na různě koncentrovaný syrovátkový substrát (za různých podmínek a s různou mírou hydrolýzy) bylo systematicky zkoumáno za účelem zlepšení pěnotvorných a emulgačních vlastností syrovátkové bílkoviny [17].

Syrovátkový koncentrát s obsahem bílkovin 35 % funkčně nedostačuje pro použití jako samostatný emulgátor a pojivo šlehatelných dezertů. Proto byl společný výzkumný projekt Vysoké školy v Köthen (SRN) a Německého Institutu potravinářské techniky v Quakenbrücku podporovaný Spolkovým ministerstvem hospodářství a práce (projekt č. AiF FV 13180 BG) zaměřen na enzymatickou modifikaci (hydrolýzu) s cílem zlepšení šlehatelnosti a emulgačních vlastností syrovátkové bílkoviny [17].

K ošetření byl zvolen *pepsin*, který neštěpí hlavní bílkovinu syrovátky – β -laktoglobulin, což by mělo být důvodem, že se dají symbioticky kombinovat známé výhodné povrchové vlastnosti β -laktoglobulinů s vlastnostmi peptidů vytvořených při hydrolýze. V závislosti na stupni hydrolýzy mohou být tyto vlastnosti velmi rozdílné [17].

Prokázalo se, že čím vyšší byla koncentrace substrátu (5 až 15 % sušiny), tím více enzymu muselo být použito k dosažení určité míry hydrolýzy. Nejvyšší reakční rychlosti se dosahovalo při teplotě 42 °C, zatímco při 44 °C již docházelo k inaktivaci enzymu. Reakce se urychluje se snižováním pH, podle požadovaného stupně hydrolýzy bylo zvoleno pH 1,8 nebo 3,0. Na počátku (1% hydrolýza) *pepsin* nejprve plně štěpí sérový albumin, zatímco α -laktalbumin a β -laktoglobulin štěpí jen nepatrně, později (2% hydrolýza) dochází k výraznému štěpení imunoglobulinů a α -laktalbuminu, a štěpení β -laktoglobulinu se zastavuje. Tato tendence pokračuje i při vyšších stupních hydrolýzy – do 5 %. Byly získány vzorky sprejově sušeného syrovátkového hydrolyzátu se stupněm hydrolýzy od 0 do 6,5 %, aby byly dále využity v modelových systémech s cílem posouzení využitelnosti jejich vlastností v reálných výrobcích – dezertech [17].

5.8 Produkce biologicky aktivních peptidů z cizrný využitím *proteinasy*

Biologicky aktivní peptidy se mohou vyskytovat v potravinách jako takové, nebo vznikají hydrolýzou bílkovin při výrobě potravin, např. během zrání sýrů, jogurtu a jiných mléčných výrobků. Bioaktivní peptidy vznikají rovněž během hydrolýzy bílkovin trávicími enzymy, např. *trypsinem*, *chymotrypsinem* nebo *pepsinem*. Další možností vzniku bioaktivních peptidů je řízená hydrolýza proteinů. Vychází se z bílkovinných koncentrátů nebo izolátů, na které se v reaktorech působí exogenními *proteinasami* [18].

Bioaktivní peptidy tvořené pouze několika aminokyselinami jsou schopné procházet skrz bariéru epitelu v trávicím traktu do krvinek. Tak se tyto peptidy dostávají do různých orgánů (na periferiích), kde se projevují jejich prospěšné účinky na organismus. Zjistilo se, že mají schopnost modulovat imunitu, mají antimikrobiální, antitrombotické účinky i schopnost zamezovat vysokému tlaku. Antihypertenzní aktivita, kterou vykazují určité peptidy, spočívá v inhibici enzymu *ACE* konvertujícího angiotenzin I (Angiotensin Converting Enzyme). Peptidy, které inhibují enzym *ACE*, se již podařilo izolovat z různých zdrojů, např. z mléka, ryb a pšenice. *ACE* hydrolyzuje deka-peptid angiotenzin I na oktapeptid angiotenzin II, což je silná vazokonstrikční látka (vazokonstriktor). *ACE* hydrolyzuje dále peptid bradykinin, což je silný vazodilatátor. Výsledkem všech těchto účinků je snížení krevního tlaku. Inhibitory *ACE* lze tak využívat v prevenci hypertenze (vysokého tlaku) [18].

Cizrna neboli římský hrách (*Cicer arietinum* L.) je třetí nejdůležitější luštěnina na světě pěstovaná na zrna (FAO, Organizace pro výživu a zemědělství, Food and Agriculture Organization, 1994). Představuje velmi důležitý zdroj bílkovin. Hlavní zásobní bílkovinou cizrny je legumin. Na vnější straně molekuly leguminu se nacházejí hydrofilní α -řetězce, zatímco hydrofóbní jádro bílkoviny tvoří β -řetězce [18].

Enzym *alkalasa* je nespecifická *proteinasa*, která je k dispozici za nízkou cenu. Používá se při výrobě vysoce rozpustných bílkovinných hydrolyzátů, např. ze slunečnice, řepky nebo cizrny. Zjistilo se, že *alkalasa* je vhodná také pro výrobu bioaktivních peptidů z jiných bílkovin. Ve Španělsku byl udělen grant výzkumu, který se zaměřoval na vyšetřování, zda legumin z cizrny, hlavní zásobní protein v této luštěnině, může představovat zdroj bioaktivních peptidů po hydrolýze *alkalasy*. Zjistilo se, že hydrolyzáty leguminu z cizrny získané za použití *alkalasy* jsou dobrým zdrojem peptidů schopných inhibovat ACE. To zvyšuje hodnotu bílkovinných hydrolyzátů cizrny vyráběných *alkalasy* [18].

5.9 Enzymově hydrolyzovaný pšeničný lepek

Japonská společnost Kikkoman vyvinula jako alternativu komerčně vyráběných hydrolyzovaných rostlinných bílkovin enzymově hydrolyzovaný pšeničný lepek. Pšeničný lepek, který byl vybrán jako surovina vzhledem k poměrně dobré degradovatelnosti, byl hydrolyzován přírodní rýžovou kulturou (*Aspergillus oryzae*), produkující proteolytické enzymy. Hydrolýza byla uskutečněna za přítomnosti solí a při vysoké teplotě, zabraňující mikrobiální kontaminaci. Hydrolyzát byl po dozrání zfiltrován, sterilován a dva práškové produkty získané po usušení byly nazvány NFE-PN, resp. NFE-S. Pšeničné hydrolyzáty se vyznačují intenzivní vůní bez postranních pachů a světlou barvou. Neobsahují přídavek glutamátu sodného. Podle názoru výrobce se mohou používat jako nová generace přírodních ochucovadel a aromat pro nejrůznější druhy potravin. Za nejoblíbenější přírodní ochucovadla, vyrobená enzymovou hydrolýzou proteinů jsou dosud považována sójová omáčka a kvasničný extrakt [19].

5.10 Detekční využití hydrolýzy peptidových vazeb

Kyselou nebo enzymatickou hydrolýzou lze kondenzační peptidové vazby mezi aminoskupinami a hydroxyly zrušit (alkalická hydrolýza se nepoužívá, poněvadž způsobuje racemizaci uvolněných aminokyselin). Hydrolyzát lze poměrně snadno analyzovat a za pomoci

chromatografických metod stanovit, ze kterých aminokyselin byl peptidický řetězec složen, i jejich kvantitu. K zjištění sekvence aminokyselin se používají zvláštní metody, které využívají buď chemické značení koncových aminokyselin a jejich detekci po hydrolýze, nebo specifické enzymatické štěpení peptidových vazeb mezi určitými aminokyselinami [10].

5.11 Proteolytické štěpení katalyticky neaktivních proenzymů

Řada *proteinas* a dalších proteinů je vylučována ve formě biologicky inertních, neaktivních prekurzorových proteinů zvaných proproteiny, které musí být na biologicky aktivní enzym nebo hormon upraveny selektivním proteolytickým štěpením. V případě enzymů se tyto proproteiny nazývají proenzymy nebo zymogeny. Konverze proproteinů na zralé proteiny zahrnuje selektivní proteolýzu, která převádí proprotein jedním nebo několika následnými proteolytickými „střihy“ do formy, v níž se projevuje charakteristická, např. enzymová aktivita zralého proteinu. Mezi proteiny vyráběné jako proproteiny patří např. insulin (proprotein = proinsulin), trávicí enzymy *pepsin*, *trypsin* a *chymotrypsin* (proproteiny = pepsinogen, trypsinogen a chymotrypsinogen), *proteinasy* tvorby a rozpouštění krevních sraženin a protein vazivových tkání kolagen (proprotein = prokolagen) [1].

Sekrece enzymů ve formě inaktivních prekurzorů zajišťuje ochranu proti jejich účinku, dokud nevznikne jeho potřeba a usnadňuje též rychlou mobilizaci aktivity bez nutnosti syntézy nových proteinů. Jedna nebo více proteolytických reakcí přitom spouští změny konformace, kterými se přibližují a přiřazují dříve vzdálené zbytky za vzniku katalytického místa. Peptidy vzniklé selektivní proteolýzou mohou být uvolněny, nebo mohou zůstat spojeny disulfidovými vazbami [1].

Konverze prochymotrypsinu (pro-CT), polypeptidu s 245 zbytky aminokyselin, na aktivní enzym *α -chymotrypsin* zahrnuje tři proteolytické střihy a vznik aktivního meziprojektu zvaného *π -chymotrypsin* (*π -CT*) [1].

5.11.1 Význam selektivní proteolýzy katalyticky neaktivních proenzymů

Konverze proproteinu na jeho zralou a fyziologicky účinnou formu vede k několika důležitým poznatkům:

a) proces zahrnuje selektivní proteolýzu, vyžadující v některých případech jen jeden proteolytický střih,

- b) polypeptidový produkt se může oddělit nebo zůstat asociován se zralým proteinem,
 - c) proces může ale nemusí být spojen s významnou změnou molekulové hmotnosti,
 - d) hlavním výsledkem selektivní proteolýzy je dosažení nové konformace,
 - e) je-li proproteinem enzym, vzniká změnou konformace katalytické místo enzymu.
- Ve skutečnosti lze považovat selektivní proteolýzu proenzymu za proces spouštějící změny konformace nezbytné pro „stvoření“ katalytického místa [1].

5.11.2 Fyziologická potřeba katalyticky aktivních enzymů

Zatímco některé proteiny jsou potřebné stále, jsou jiné (např. enzymy tvorby a rozpouštění krevních sraženin) zapotřebí jen občas. Jestliže potřeba těchto příležitostných enzymů nastane, pak jsou obvykle potřebné rychle. Některé fyziologické procesy, např. trávení, jsou sice jen příležitostné, ale zcela pravidelné a předpověditelné. Naproti tomu k zapojení jiných enzymů (účastnících se např. tvorby a rozpouštění krevních sraženin či reparace tkání) dochází jen v odpovědi na naléhavou fyziologickou či patofyziologickou potřebu. Syntéza *proteas* ve formě katalyticky inaktivních prekurzorů navíc chrání tkáně, v nichž vznikají, před samotrávením; autodigestce může nastávat např. při pankreatitidě. Syntéza potřebných proteinů *de novo* nemusí být dostatečně rychlá pro požadavky naléhavé patofyziologické potřeby, např. při ztrátě krve. Navíc pro ni musí být v pohotovosti odpovídající kompletní zásoba prekurzorových aminokyselin. Také proces jejich sekrece může být pomalý vzhledem k fyziologické poptávce [1].

6 VITAMINY

Vitaminy jsou nízkomolekulární exogenní esenciální látky, které spolu s bílkovinami, tuky a sacharidy patří k základním složkám lidské stravy. V lidském organismu mají funkci katalyzátorů biochemických reakcí, hrají významnou úlohu při procesech vstřebávání a výměny látek mezi vnějším prostředím a živým organismem. Podílejí se na metabolismu bílkovin, tuků a sacharidů. Lidský organismus si, až na některé výjimky (jako je syntéza niacinu z tryptofanu), nedokáže vitaminy sám vyrobit, a proto je musí získávat prostřednictvím stravy [20].

Mezi vitaminy rozpustné ve vodě (hydrofilní) náleží vitaminy skupiny B: vitamin B₁ (thiamin), B₂ (riboflavin), B₃ (kyselina nikotinová a její amid), B₅ (kyselina pantotenová), B₆ (pyridoxin), B₉ (kyselina listová), B₁₂ (kyanokobalamin), kyselina lipoová, biotin, bioflavonoidy a vitamin C (kyselina L-askorbová a L-dehydroaskorbová). K vitamínům rozpustným v tucích (lipofilní) patří vitamin A (retinol) a jeho provitaminy (karotenoidy), vitaminy D (kalciferoly), vitaminy E (tokoferoly, tokotrienoly), vitaminy K (fylochinony, farnochinony), vitamin F (esenciální mastné kyseliny) [20].

6.1 Výskyt, vlastnosti a funkce vitaminů

Významnými zdroji vitaminů jsou zejména základní potraviny, které většinou dostatečně pokrývají jejich potřebu (maso a masné výrobky, mléko a mléčné výrobky, vejce - především žloutek, chléb a jiné cereální potraviny, ovoce a zelenina). Některé vitaminy jsou omezeny jen na určitou skupinu potravin (např. vitamin B₁₂ vyskytující se v potravinách živočišného původu) [21].

Vitaminy nejsou pro organismus ani zdrojem energie ani stavebními jednotkami tkání. Plní v živých objektech významnou úlohu prekurzorů kofaktorů různých enzymů (vitaminy skupiny B), jiné se uplatňují v oxidačně redukčních systémech (vitamin C, vitamin E) apod. Potřeba jednotlivých vitaminů může být zásadně ovlivněna některou ze složek potravin, které zabrání plnému využití daného vitaminu nebo jej inhibují. Takovým látkám pak říkáme antivitaminy. Inhibují určitým mechanismem funkci daného vitaminu, což může vést až k projevům deficiencie (nedostatku) [20].

V potravinách se vitaminy vyskytují zpravidla v množství od $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ po stovky až tisíce $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ podle druhu vitaminu, ročního období, druhu potravin a způsobu jejího zpraco-

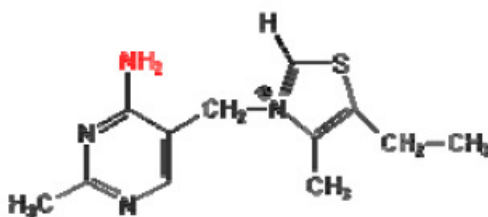
vání. Vyskytují se volné nebo vázané na jednotlivé složky potravy, nejčastěji na sacharidy a proteiny. U potravin živočišného původu závisí obsah vitaminů na způsobu skladování a zpracování suroviny, u potravin rostlinného původu je významný především stupeň zralosti, klimatické podmínky během růstu, hnojení apod. Vitaminy patří mezi labilní složky potravin, proto slouží zároveň jako indikátory četných technologických a kulinárních úprav. Dnes jsou vitaminy využívány k obohacování potravinářských výrobků, k tzv. fortifikaci a restituci. Restitucí se myslí doplnění jejich obsahu na původní hladinu v surovině, fortifikace je obohacování na koncentrace vyšší, než bylo jejich původní množství [20].

Za prekurzory vitaminů jsou považovány provitaminy. Jedná se o organické sloučeniny bez vitaminosního účinku, které se však v živočišném těle mění působením UV záření nebo pomocí enzymů ve vitaminy. Např. provitaminy vitamínu A jsou označovány jako karotenoidy. Na vitamín A jsou přeměňovány oxidačním štěpením za katalytického působení *karotenasy* [20].

Nedostatek každého vitamínu se projevuje u živých objektů chorobnými příznaky, které v lehčích formách označujeme jako hypovitaminosa, v těžších jako avitaminosa. Příčinou nedostatečné resorpce vitaminů bývá většinou onemocnění zažívací soustavy, např. zánětlivá a průjemová onemocnění. Při těchto chorobách je třeba dbát na dostatečný přísun vitaminů. Deficience vitaminů byla dříve jednou z hlavních příčin mnoha nemocí. Pelagra vznikala z nedostatku některých vitaminů B-komplexu, především vitamínu B₃, kurděje vznikaly nedostatkem vitamínu C, beri-beri nedostatkem thiaminu, křivice nedostatkem vitamínu D apod. Naopak nadbytek některých vitaminů se označuje jako hypervitaminosa. V našich klimatických podmínkách se s ní prakticky nesetkáváme, objeví se většinou ve spojitosti s nadměrným přísunem pomocí aditivních preparátů. Zde jsou zejména nebezpečné zvýšené dávky vitaminů A a D. Přebytečných vitaminů rozpustných ve vodě se organismus dokáže zbavit a pokud přestane vitamín přijímat, organismus z těla nadbytečné množství vyloučí močí. U vitaminů rozpustných v tucích to však nefunguje – jsou ukládány v játrech. Vitaminy jsou nutné pro udržení mnohých tělesných funkcí a jsou schopny posilovat a udržovat imunitní reakce [20]. Např. vitamín C patří mezi nízkomolekulární antioxidační sloučeniny (jako je kyselina močová, bilirubin, tioly, vitamín E, karotenoidy či koenzym Q) schopné zbavovat tělo volných radikálů [22]. Vitamín A₁ (*all-trans-retinol*) se zase uplatňuje v biochemických reakcích zrakového vjemu [20].

6.1.1 Vitamin B₁ - thiamin

Vitamin B₁ se skládá ze substituovaného pyrimidinového a tiazolového kruhu, které jsou vzájemně spojeny metylenovou skupinou. V buňkách se vyskytuje především ve formě kofaktoru thiamindifosfátu (TDP) v různých enzymech: je např. kofaktorem řady enzymů *dekarboxylas*, koenzymem *pyruvátdehydrogenasy* apod. Podílí se rovněž na konečném odbourávání metabolických produktů lipidů a proteinů (svými biochemickými funkcemi zasahuje do metabolismu sacharidů, tuků i aminokyselin). V rostlinných potravinách se thiamin nachází převážně ve volné formě, v živočišných produktech je vázán především ve formě TDP, který musí být před absorpcí v organismu enzymaticky rozštěpen. Oxythiamin, antagonist thiaminu, vzniká z vitamínu B₁ v silně kyselém prostředí a proto se vyskytuje v kyselých hydrolyzátech proteinů, jako jsou polévková koření. *Thiaminasa*, enzym vyskytující se u některých druhů ryb, štěpí thiamin na pyrimidinovou a thiazolovou složku, které již nemají účinek vitamínu. Ve výživě člověka thiamin tímto enzymem ohrožen není, protože při tepelné úpravě se *thiaminasa* inaktivuje [23].

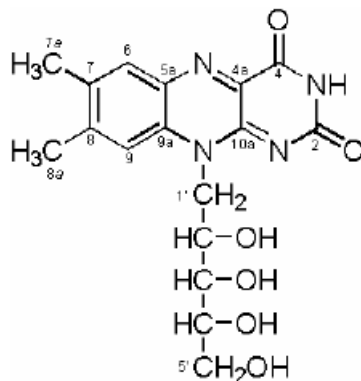


Thiamin [23]

6.1.2 Vitamin B₂ - riboflavin

Základem struktury riboflavinu je isoalloxazinové jádro, na které je vázán ribitol, alditol odvozený od D-ribosy. Vitamin B₂ se účastní oxidačně redukčních reakcí (v potravinách se nejvíce vyskytuje jako součást flavinových kofaktorů FMN-Flavinmononukleotid a FAD-Flavinadeninukleotid oxidoredukčních enzymů). Z potravin živočišného původu je riboflavin daleko lépe adsorbován v trávicím traktu než z rostlinné stravy, kde převládají kovalentně vázané formy, obtížně štěpitelné *proteinasami* [2]. Riboflavin je poměrně značně stálý vůči teplu, především v kyselých roztocích. V neutrálních a alkalických roztocích je velmi labilní a rozkládá se za vzniku fyziologicky neúčinných produktů. Je velmi citlivý především na světelné záření. Účinkem světla v neutrálním nebo kyselém prostředí přechází odštěpením postranního řetězce na lumiflavin, v alkalickém prostředí pokytuje za stej-

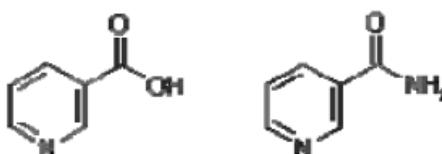
ných podmínkách lumichrom. V kravském mléce se riboflavin váže na α a β -kaseiny v množství asi 25 až 30 %, přičemž takto vázaný riboflavin je vůči fotochemickému rozkladu odolnější [24].



Riboflavin [23]

6.1.3 Vitamin B₃ - kyselina nikotinová, nikotinamid

Vitamin B₃ je odvozen od pyridinového cyklu. Biologicky účinnými formami jsou kyselina nikotinová a nikotinamid. V rostlinách převažuje volná kyselina, v živočišných tkáních její amid. V potravinách je vitamin B₃ přítomen nejvíce ve formě koenzymů NAD⁺ a NADP⁺ *pyridinových dehydrogenas*, z nichž nejvýznamnější jsou *alkoholdehydrogenasa*, *malátdehydrogenasa*, *glutamátdehydrogenasa* aj. NAD⁺ a NADP⁺ se mj. účastní také syntézy a odbourávání sacharidů [20].

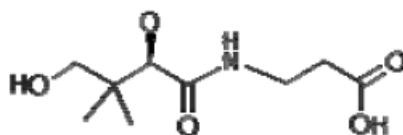


Kyselina nikotinová a nikotinamid [23]

6.1.4 Vitamin B₅ - kyselina pantotenová

V přírodě se kyselina pantotenová nejčastěji vyskytuje jako přirozená součást CoA-SH (koenzymu A), který vzniká v heterotrofních organismech z volné kyseliny pantotenové. CoA-SH se účastní klíčových reakcí v metabolismu aminokyselin, tuků a sacharidů. Hlavní biochemickou funkcí koenzymu A je přenos acylových skupin. Kyselina pantotenová zasahuje prostřednictvím CoA-SH do významných metabolických cyklů, jako je β -oxidace

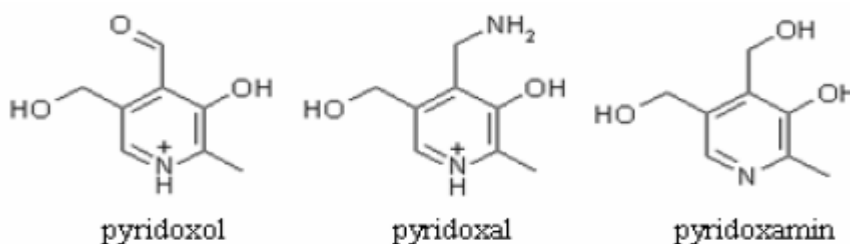
mastných kyselin a citrátový cyklus. Vyskytuje se též vázána v nosném proteinu, označovaném jako ACP-SH (Acyl Carrier Protein), který má významnou úlohu při biosyntéze mastných kyselin [20]. Kyselina pantotenová a její soli jsou opticky aktivní látky, ale v přírodě se vyskytují pouze jejich D(+) formy, L(-) forma nevykazuje v lidském organismu vitamínovou aktivitu [25].



Kyselina pantotenová [23]

6.1.5 Vitamin B₆ - pyridoxin

Vitaminem B₆ (pyridoxinem) se označují všechny tři fyziologicky účinné vitaminy B₆, tzv. pyridoxinová triáda, tvořená pyridoxolem, pyridoxalem a pyridoxaminem [25]. Všechny tři látky mají bazický charakter a vytvářejí s minerálními kyselinami soli rozpustné ve vodě. V biochemických procesech vystupuje pyridoxin ve formě fosfátových derivátů pyridoxalfosfátu a pyridoxaminfosfátu. Pyridoxalfosfát se jako kofaktor *dekarboxylas* zúčastňuje reakcí v metabolismu aminokyselin. Tyto koenzymy jsou nezbytné i v metabolismu sacharidů při štěpení glykogenu [20].



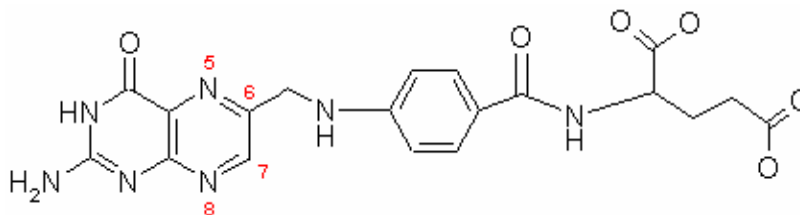
Pyridoxol, pyridoxal a pyridoxamin [23]

6.1.6 Vitamin B₉ - kyselina listová

Kyselina listová vzniká vazbou aminoskupiny kyseliny glutamové na karboxylovou skupinu kyseliny pteroové. Její molekula se skládá z pteridinového kruhu a kyseliny p-aminobenzoové, na jejíž karboxylovou skupinu je navázána molekula kyseliny glutamové. Pod název foláty se zahrnuje skupina dalších látek odvozených od kyseliny listové. V pří-

rodě se vyskytují deriváty kyseliny listové, které mají ve své molekule navázáno až šest zbytků kyseliny glutamové [23].

Tetrahydrofoláty (FH₄) (kyselina listová v redukované formě) jsou významnými kofaktory *transferas* přenášejících jednouhlíkaté zbytky. Jsou to přenašeče formylových, metylových a hydroxymetylových skupin, zasahují do biosyntézy purinových a pyrimidinových nukleotidů, tyminu, serinu a glycinu i do regenerace metioninu [23].

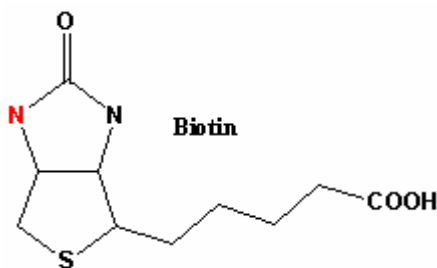


Kyselina listová [23]

6.1.7 Biotin

Biotin má molekulu složenou ze dvou částí: z imidazolového a tiofanového kruhu, spojených v *cis*-konfiguraci. V přírodě se vyskytuje jeho osm stereoisomerů, ale pouze jeden, D-biotin, je biologicky aktivní. Je to hydrofilní, slabě kyselá látka, v neutrálním prostředí termostabilní. Biotin se vyskytuje jako prostetická skupina mnoha enzymů katalyzujících přenos CO₂. V přírodě je nejčastěji vázán na protein přes ε-aminoskupinu lyzinu. Při hydrolyze tohoto proteinu se získá biocytin, který je považován za aktivní formu biotinu. V živočišném organismu se biocytin enzymaticky štěpí na biotin a lyzin. Komplex aktivního biotinu s proteinem se označuje BCCP (Biotin Carboxyl Carrier Protein) [20].

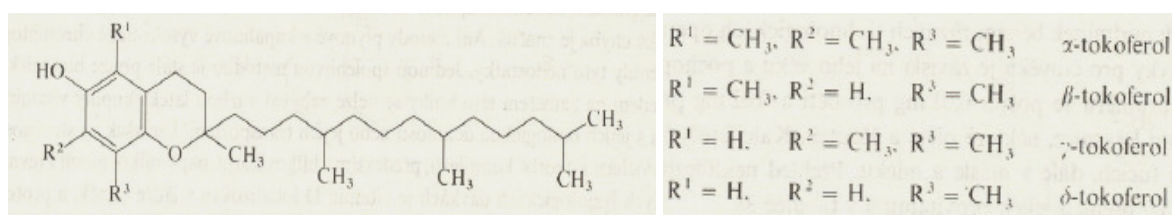
Biotin vyžadují všechny živé buňky, ale syntetizován je jen většinou mikroorganismů, některými houbami a vyššími rostlinami. Z potravy je absorbován pouze volný biotin. Biotin vázaný na proteiny musí být předem hydrolyzován *biotinidasou*. Z biocytinu, který je produktem proteolýzy ve střevě, je biotin uvolňován buď v tenkém střevě *pankreatickou biotinidasou*, nebo po absorpci ve střevní sliznici a v plazmě *plazmatickou biotinidasou* [20].



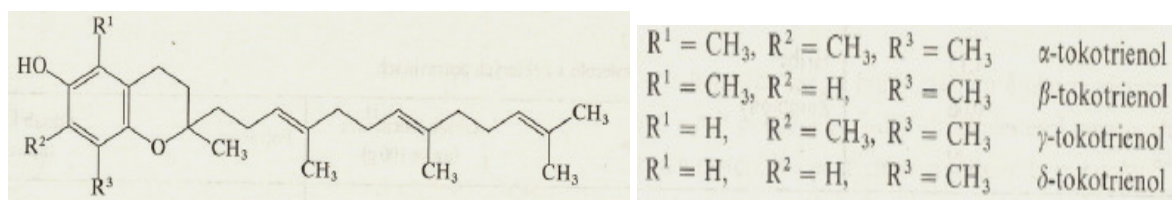
Biotin [23]

6.1.8 Vitamin E - tokoferoly, tokotrienoly

V přirozených formách (α , β , γ , δ) se jedná o skupinu tokoferolů. Základem molekuly je chromanový (benzopyranový) kruh s bočním řetězcem odvozeným od fytolu a rozdíl mezi jednotlivými deriváty spočívá v poloze metylových skupin na chromanovém kruhu. α -forma je nejčastější a biologicky nejúčinnější, ostatní formy mají účinnost výrazně nižší [4]. V přírodních materiálech se vyskytují i jim příbuzné α -, β -, γ -, δ -tokotrienoly s třemi dvojnými vazbami v postranním řetězci [20]. Tokoferoly jsou přítomné v potravě většinou ve volné formě. Estery tokoferolů jsou hydrolyzovány v tenkém střevě. Na dobré využití tokoferolů je potřebná žluč, která podporuje tvorbu nejjemnějších tukových kuliček a micel [2]. Vitamin E je důležitý pro dělení buněk, dále pro nervstvo a příčně pruhované svalstvo. Má výrazný antioxidační účinek [4].



Tokoferoly [24]



Tokotrienoly [24]

7 IZOLACE VITAMINŮ ENZYMATICOU HYDROLÝZOU

7.1 Využití *glykosidas*, *peptidas* a *lipas* k izolaci vitaminů

K izolaci vitaminů ze vzorků zkoumaných látek či potravin se využívají odpovídající enzymy nebo směsi enzymů v rámci použitých metod enzymatické hydrolýzy. Hydrofilní vitaminy je možné uvolnit použitím příslušných *glykosidas* či *peptidas* v závislosti na surovině (vzorku), z níž je vitamin uvolněn.

Při analýze lipofilních vitaminů se většinou k hydrolýze (zmýdelnění) vzorku využívá alkalická hydrolýza, enzymatickou hydrolýzu je možné provést za pomoci příslušných *lipas* [26].

7.1.1 Izolace vitamínu B₁ enzymatickou hydrolýzou

Thiamin je v kyselém prostředí (pH < 5) relativně stabilní. V neutrálním a alkalickém prostředí je značně nestálý a snadno se hydrolyzuje. K hydrolýze přispívá také působení oxidu siřičitého a hydrogensířičitanů [25].

Thiamin je většinou vázán na koenzym *karboxylasy* (*dekarboxylasy*), proto se musí uvolnit z těchto vazeb enzymatickou hydrolýzou, nejčastěji *takadiastasou* či *β-amylasou*. Při použití enzymatické hydrolýzy se vzorek potravin nejprve hydrolyzuje kyselinami (nejčastěji v autoklávu) 0,1 mol.dm⁻³ HCl, 0,1 mol.dm⁻³ H₂SO₄ při teplotě 100 až 120 °C po dobu 30 min. Po ochlazení na laboratorní teplotu a úpravě pH na 4 - 5 se vázaný thiamin uvolňuje *takadiastasou* nebo *β-amylasou* při teplotě 37 °C po dobu 16 hod nebo při teplotě 45 - 50 °C po dobu 3 hod až 15 hod [27].

7.1.2 Izolace vitamínu B₂ enzymatickou a kyselou hydrolýzou

Riboflavin je vázán esterickou vazbou na kyselinu fosforečnou ve formě koenzymu FAD a FMN, které jsou vázané na svůj specifický bílkovinný nosič (apoenzym) a nejčastěji vystupují ve formě barevné bílkoviny, žlutého flavoproteinu. K uvolnění vázaného riboflavínu na bílkovinu se používá hydrolýzy zředěnými minerálními kyselinami (HCl, H₂SO₄) a tato kyselá hydrolýza je popsána jako dostačující. Kromě kyselé hydrolýzy se používá enzymatická hydrolýza. Enzymatická hydrolýza je nezbytná k uvolnění riboflavínu z este-

rické vazby s kyselinou fosforečnou - používají se enzymy *takadiastasa*, *trypsin* nebo *clarasa* [27].

Byla rovněž publikována metoda, ve které byla porovnávána enzymatická hydrolýza *takadiastasou* a kyselá hydrolýza 0,1 mol.dm⁻³ HCl na čistém preparátu FAD. Kyselá hydrolýza probíhala při teplotě 70 °C, enzymatická při teplotě 38 °C a pH 5,2 po dobu 2 hod. FAD byl hydrolyzován enzymatickou hydrolýzou z 90 % a kyselou hydrolýzou ze 45 %. Při analýze celkového obsahu riboflavinu v krmivech nebo potravinách by neměla být enzymatická hydrolýza opomenuta [27].

7.1.3 Izolace vitamínu B₃ alkalickou a enzymatickou hydrolýzou

Kyselina nikotinová je relativně stabilní, k její izolaci se spíše než enzymatická hydrolýza používá kyselá či alkalická hydrolýza, jež může být použita k převodu nikotinamidu na kyselinu nikotinovou, která se pak stanoví jako celkový obsah obou vitamérů, tj. jako suma kyseliny nikotinové a nikotinamidu (jako činidla k alkalické hydrolýze se používá Ca(OH)₂ nebo NaOH, přičemž se nikotinamid hydrolyzuje na kyselinu nikotinovou). Alkalická hydrolýza je doplňována enzymatickou hydrolýzou a k tomuto účelu se používají enzymy *takadiastasa*, *papain* nebo *clarasa* [27].

7.1.4 Enzymatická extrakce pro kapalinové chromatografické stanovení vitamínu B₃ v potravinách

Enzymatická extrakční procedura pro stanovení vitamínu B₃ v potravinách prostřednictvím *NAD-glykohydrolasy* (*NADasy*) byla navržena jako náhrada za obvykle používanou hydrolýzu HCl. Stanovením kyseliny nikotinové a nikotinamidu metodou HPLC s fluorimetrickou detekcí bylo možné prokázat, že působení kyselinou nevedlo k uvolnění biologicky účinných forem kyseliny nikotinové z některých potravin (pšeničné mouky, pšeničných klíčků, arašídů), narozdíl od hydrolýzy *NADasou* z *Neurospora crassa* (37 °C, 18 hod, pH 4, koncentrace 24 µg.g⁻¹ vzorku), která umožnila přesné stanovení vlastního obsahu kyseliny nikotinové a nikotinamidu a spolehlivý odhad biologicky účinných forem vitamínu B₃ v různých analyzovaných potravinách. Kombinované dodání *proteinasy* a *amylasy* k *NADase*, někdy po předešlém využití kyselé hydrolýzy, se ukázalo být zbytečným [28].

7.1.5 Izolace vitamínu B₅ enzymatickou hydrolýzou

Vitamin B₅ je dobře rozpustný ve vodě a zahříváním s kyselinami nebo zásadami se hydrolyzuje [1]. Nejstabilnější je kyselina pantotenová v slabě kyselém prostředí (pH 4 - 5). V kyselém i alkalickém prostředí dochází k její rozsáhlé hydrolýze [25].

Uvolnění kyseliny pantotenové z jejích vazeb se pomocí enzymatické hydrolýzy uskutečňuje za použití *papainu*, *clarasy*, *takadiastasy*. Samotné stanovení kyseliny pantotenové v krmivech a potravinách je poměrně obtížný úkol a existuje poměrně málo metod stanovení (např. metoda GC - Gas Chromatography, Plynová chromatografie) [27].

7.1.6 Izolace vitamínů B₁, B₂ a B₆ enzymatickou hydrolýzou pro jejich stanovení HPLC analýzou

Hydrolýza různých vzorků potravin za pomoci směsi enzymů *α-amylasy*, *papainu* a *kyselé fosfatasy* vedla v jediném kroku k uvolnění vitamínů B₁, B₂ a B₆ (fosforylovaných a vázaných v proteinech), jež byly přítomny v těchto vzorcích, které nebyly nijak obohaceny (fortifikovány) o vitaminy. Analýza pomocí metody HPLC (High Performance Liquid Chromatography, Vysokoučinná kapalinová chromatografie) se získanými výtažky ukázala, že obsah vitamínů byl přinejmenším stejně vysoký jako u vzorků, jejichž enzymatická hydrolýza byla provedena působením nejefektivnější *amylasy*. Hydrolýza HCl, velmi často kombinovaná působením enzymů a role této kyselé hydrolýzy, která má vést k denaturaci proteinů, se ukázala být nadbytečnou vzhledem k přítomnosti *proteinasy* ve směsi používaných enzymů. Analýza výsledků studie ukázala, že použitím daných enzymů je možné získat obsah vitamínů v souladu s certifikovanými hodnotami [29].

7.1.7 Využití enzymatické hydrolýzy (enzymatického přečištění) pro stanovení folátů v zelenině a ovoci HPLC analýzou

5 - 7g vzorků zeleniny a ovoce bylo umístěno do skleněných lahví, bylo k nim přidáno 10 - 12 ml chladného extrakčního pufru. Před stanovením folátů byly skladovány maximálně několik týdnů [30].

Pro hydrolýzu vzorků byla použita vepřová *konjugasa*. Vzorky byly inkubovány při 37 °C během 3 hod (pomeranč 5 hod) při pH 4,9. Extrakty byly následně ponechány 5 min ve vroucí vodní lázni, než došlo k inaktivaci enzymu a následně byly zchlazeny ledem. Vzor-

ky bohaté na škrob (syrové a vařené brambory, smažené hranolky, řepka olejka, banán, mražený hrášek, hrachový polévkový koncentrát) byly před dekonjugací přečištěny α -amylasou. 200 μ l α -amylasy o koncentraci 500 mg.ml⁻¹ bylo přidáno k extraktu (3 ml) a vzorek se ponechal inkubovat 3 hod, jeho pH bylo upraveno HCl opět na 4,9, nežli byl ošetřen vepřovou *dekonjugasou*. Následně byla provedena chromatografická analýza folátů v inkubovaných extraktech vzorků [30].

7.1.8 Izolace biotinu kyselou hydrolýzou

Biotin je převážně vázán na proteiny a tyto vazby jsou relativně velmi stabilní. Proto jsou podmínky extrakce obtížné a vlastnímu stanovení biotinu v krmivech musí předcházet kyselá hydrolýza. Jako optimální byla popsána hydrolýza v 6 mol.dm⁻³ HCl nebo 3 mol.dm⁻³ H₂SO₄ při teplotě 120 °C po dobu 2 hodin v autoklávu [27].

7.1.9 Využití enzymatické hydrolýzy pro stanovení biotinu v potravinách HPLC analýzou

Metoda stanovení obsahu biotinu v různých potravinách reverzní fází kapalinové chromatografie zahrnovala extrakci vitamérů (D-biotin, D-biocytin) enzymatickou hydrolýzou *papainem* a v případě potřeby *takadiastasou*, postkolonovou derivatizací avidinem-FITC (fluorescein 5-isotiokyanát) a fluorimetrickou detekcí získaného komplexu. Enzymatické hydrolýze byla dávána přednost před hydrolýzou H₂SO₄, protože nevyvolávala degradaci vitamínu a umožňovala dobrý odhad biologicky využitelných forem vitamínu. Navrhovaná metoda měla dobrou výtěžnost (90 - 106 %), uspokojivou opakovatelnost (variační koeficient nižší než 7 %) a velmi nízký detekční limit (0,005 μ g.g⁻¹) [31].

7.1.10 Optimalizace enzymatické hydrolýzy pro stanovení vitamínu E v destilátu kyseliny palmitové

Vitamin E byl koncentrován z destilátu kyseliny palmitové (PFAD, Palmitic Fatty Acid Distillate) pomocí komerční imobilizované *Candida antartica lipasy* (Novozyme 435) [32].

PFAD (jodové číslo 56,8 g I₂ . 100 g⁻¹ oleje, koncentrace vitamínu E 0,37 %) byl poskytnut firmou Jomalina Pte., s. s. r.o., Tanjung Panglima Garang, Selangor, Malajsie. Komerční

imobilizovaná tepelně stabilní *Candida antarctica lipasa* (Novozyme 435) byla darována od Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dánsko [32].

Celkem 100 g směsi PFAD a vody bylo umístěno do 250 ml Erlenmeyerovy baňky. *Novozyme 435 lipasa* byla přidána do reakční směsi, baňka byla propláchnuta dusíkem a uzavřena gumovým uzávěrem. Baňka poté byla umístěna do vodní lázně o teplotě 65 ± 1 °C a hydrolýza začala mícháním směsi pomocí magnetického míchadla. Reakce byla zastavena vyfiltrováním *lipasy*. Několik mililitrů reakční směsi pak bylo vzato pro stanovení obsahu volných mastných kyselin (FFA, Free Fatty Acids) a zbývající část byla použita pro extrakci tokoferolů a tokotrienolů [32].

Vzorek reakční směsi pro stanovení FFA byl podroben centrifugaci: 1400 g po dobu několika sekund, aby se přerušila emulze. 0,500 g PFAD bylo naváženo do 250 ml Erlenmeyerovy baňky a bylo přidáno 50 ml zneutralizované isopropanolu kvůli rozpuštění vzorku. Volné mastné kyseliny byly následně titrovány (zneutralizovány) $0,05 \text{ mol.dm}^{-3}$ NaOH na fenolftalein. Vzorek pro extrakci a stanovení vitamínu E byl odstředěn na centrifuze (1400 g) kvůli oddělení vody z PFAD. 15 g PFAD bylo odebráno z centrifugy a rozpustěno v 30 ml etanolu. Vzorek byl poté zneutralizován $0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$ NaOH na fenolftalein a bylo dodáno 100 ml hexanu. Směs byla převedena do separátoru, třepána 1 min a ponechána stát do vzniku dvou odlišných vrstev. Spodní vrstva (vodná fáze), která obsahovala soli volných mastných kyselin, byla oddělena. Vrchní vrstva obsahující vitamín E byla odstředěna: 2500 g po dobu 30 s, aby se odstranily zbytky vody. Hexanová vrstva byla nakonec převedena do 250ml baňky a vypařována při 60 °C za vakua [32].

Vitamín E (suma tokoferolů a tokotrienolů) ve vzorku byl stanoven pomocí metody HPLC. 0,05 g vzorku bylo rozpuštěno ve 2 ml hexanu a 5 ml bylo injektováno do HPLC systému vybaveného UV detektorem na 280 nm. Použitou kolonou byla Purospher STAR RP-18, zatímco mobilní fází byl metanol : voda (95 : 5 v/v). Průtok byl udržován na 1 ml.min^{-1} a teplota byla nastavena na 40 °C. Srovnáním s publikovanými chromatogramy a přirozeným výskytem byly α -tokoferol, α -, γ - a δ -tokotrienoly identifikovány. Plocha píku byla použita pro kvantifikaci vitamínů E. Vzhledem k nedostupnosti standardů α -, γ - a δ -tokotrienolů byl použit D- α -tokoferol jako vnější standard pro kvantifikaci všech čtyř vitamínů s předpokladem, že mají stejnou intenzitu UV. Celková koncentrace stanovených α -tokoferolů, α -, δ - a γ -tokotrienolů byla vyjádřena jako koncentrace vitamínu E [32].

Faktory ovlivňující enzymatickou hydrolýzu a koncentraci vitamínu E z extrahované frakce byly optimalizovány použitím reakční povrchové metody (RSM, Response Surface Method). Centrální kompozitní návrh byl zaměřen na studium reakcí, tj. procenta FFA (Y_1) a koncentrace vitamínu E (Y_2), zatímco koncentrace *lipasy* (X_1), reakční doba (X_2) a obsah vody v reaktantu (X_3) byly nezávisle proměnné. Pro oba regresní modely FFA a vitamínu E byl obsah vody nejvýznamnějším faktorem. Byly stanoveny optimální reakční parametry pro maximální výtěžek FFA a vitamínu E. Ukázalo se, že pro maximální koncentraci vitamínu E by měla být hydrolýza prováděna s 2,5 % (w/w) *lipasy* a 45,2 – 47,3 % (v/w) vody po dobu 5,5 - 5,7 hod. Jinou optimální volbou je hydrolýza PFAD s využitím 5,3 % (w/w) *lipasy* a 45,6 - 50,0 % (v/w) vody po dobu 5,9 hod. Přestože ostatní kombinace by mohly mírně zvýšit stupeň hydrolýzy, vyžadují mnohem více *lipasy* a/nebo delší reakční dobu [32].

8 KOMERČNĚ DOSTUPNÉ ENZYMATICKÉ PREPARÁTY

Průmyslově vyráběné enzymatické preparáty se významně uplatňují v potravinářství při výrobě chleba, vína a ovocných šťáv, využívají se také při zpracování textilu a kůží, při výrobě detergentů a krmiv. Enzymatické přípravky často nahrazují tradiční chemické nebo přídatné (aditivní) látky a přispívají k úsporám vody a energie v různých výrobních procesech. Získávají se nejčastěji jako enzymy produkované mikroorganismy, lze je izolovat také z rostlin a orgánů živočichů. Jsou dodávány ve formě pevné látky, roztoku nebo prášku, případně lyofilizovaného prášku [33].

Mezi nejpoužívanější komerčně dostupné enzymatické preparáty patří *Papain* z *Carica papaya*, *Pankreatin* z vepřové slinivky břišní, *Clarasa 300* (*Clara-Diastasa*), *Taka-Amylase A* (*Taka-Amylase* z *Aspergillus oryzae*), *Rennin* (*Chymosin*) z žaludku telat a *Trypsin* z hovězí slinivky břišní, které je možno objednat např. u firmy Sigma-Aldrich.

V praxi lze také použít např. enzymatické preparáty *Macerozyme R-10* (*Pektinase* z *Rhizopus* sp.) a *TDF-100A* (*Amyloglukosidase* z *Aspergillus niger*) od firmy Sigma-Aldrich, *Novozyme 435* (*Candida antarctica lipase*) a *Fungamyl 800L* (α -*Amylase* z *Aspergillus oryzae*) od firmy Novozymes.

Tabulka 1. Významné komerčně dostupné enzymatické preparáty [34]

E.C.	Obchodní název	Enzymy	Využití	Firmy
3.2.1.1	<i>Fungamyl 800L</i>	<i>α-Amylase z Aspergillus oryzae</i>	hydrolýza $\alpha(1\rightarrow4)$ - glykosidových vazeb amylosy	Novozymes
3.2.1.3	<i>AMG 300L, TDF-100A</i>	<i>Amyloglukosidasa z Aspergillus niger (glukoamylasa)</i>	hydrolýza škrobu na glukosu	Novozymes, Sigma-Aldrich
3.2.1.4	<i>Carezyme 1000L</i>	<i>Celulasa z Aspergillus sp.</i>	hydrolýza $\beta(1\rightarrow4)$ - glykosidových vazeb celulosity	Novozymes
3.2.1.26	-	<i>Invertasa z pekařského droždí (Saccharo- myces cerevisiae)</i>	hydrolýza sacharosity na glukosu a fruktosu (invertní cukr)	Sigma-Aldrich
3.2.1.23	<i>Lactozym</i>	<i>β-Galaktosidasa</i>	hydrolýza β -D-glykosidů, izolace β -galaktosy	Novozymes
3.1.1.3	<i>Lipase G50 Amano</i>	<i>Lipasa z Penicillium camemberti</i>	přednostní hydrolýza 1,3- vazeb triacylglycerolů	Sigma-Aldrich
3.1.1.3	<i>Novozyme 435</i>	<i>Lipasa z Candida antarctica</i>	hydrolýza lipidů	Novozymes
3.2.1.15	<i>Macerozyme R-10</i>	<i>Pektinasa z Rhizopus sp.</i>	hydrolýza pektinové kyseliny na galaktourono- vou kyselinu	Sigma-Aldrich
3.4.21.14	<i>Subtilisin A</i>	<i>Proteinasa z Bacillus licheniformis</i>	hydrolýza kaseinů	Novozymes

ZÁVĚR

Bakalářská práce dokazuje značné využití enzymatické hydrolýzy sacharidů a proteinů v potravinářském průmyslu.

Hydrolytické štěpení glykosidových vazeb oligosacharidů a polysacharidů katalyzují *glykosidas*. Z *glykosidas* mají v potravinářství významné uplatnění amylolytické přípravky, označované jako sladové *amylasy*. Uplatňují se při ztekucení a zcukření škrobu, plísňové a bakteriální *amylasy* se používají v pekárenském průmyslu ke zlepšení technologických hodnot pšeničných mouk. V konzervářském i v krmivářském průmyslu hrají důležitou roli přípravky celulasové. Používají se k odstraňování celulosových vláken z fazolových lusků i jiných zelenin. Tím podstatně zvyšují stravitelnost a využitelnost přítomných živin. Pektolytické enzymové přípravky se používají při čiření ovocných nápojů a vín.

Peptidasy katalyzují hydrolytický rozklad peptidových vazeb bílkovin a peptidů. Enzymatická hydrolýza zde nachází významné uplatnění při uvolnění aminokyselin pro jejich chromatografické stanovení v bílkovinném hydrolyzátu. Ke zjištění sekvence aminokyselin se používají zvláštní metody, které využívají buď chemické značení koncových aminokyselin a jejich detekci po hydrolýze, nebo specifické enzymatické štěpení peptidických vazeb mezi určitými aminokyselinami. Použitá enzymatická hydrolýza je oproti kyselé či alkalické hydrolýze šetrnější (alkalická hydrolýza způsobuje racemizaci uvolněných aminokyselin), výtěžek enzymatické hydrolýzy je však často neúplný.

Z bílkovinných hydrolyzátů mají široký význam hydrolyzáty kolagenu. V potravinářství mohou být použity jako látky uchovávací vůni nebo chuť. Jejich příklad velmi dobře ukazuje výhody použití enzymatické hydrolýzy, která je v poslední době vzhledem k nižším nárokům na energii upřednostňována před hydrolytickým rozkladem kolagenu v kyselém nebo zásaditém prostředí. Důležitými výhodami hydrolýzy kolagenu katalyzované proteolytickými enzymy jsou též mírné reakční podmínky dané maximální teplotou 80 °C, alkaliitou směsi v rozmezí pH 8 - 9 a použitým atmosférickým tlakem. Lze předpokládat, že v budoucnosti bude enzymatické hydrolýze kolagenu i jiných bílkovin dáována stále větší přednost před hydrolýzou kyselou a alkalickou.

V mlékárenství nachází významné uplatnění proteolytické enzymy, které zajišťují sladké srážení mléka, tzv. syřidla. Sladké srážení se využívá pro výrobu sýrů. Dříve se používalo výhradně chymosinových syřidel získaných ze slezů sajících telat, avšak chymosinová sy-

řidla byla v důsledku nedostatku výchozí suroviny nahrazována jinými typy *proteinů* živočišného i mikrobiálního původu.

Hydrolasy se využívají také při izolaci vitaminů ze vzorků potravin. Hydrofilní vitaminy je možné uvolnit použitím příslušných *glykosidas* či *peptidas*, vitaminy lipofilní s využitím *lipas*.

U hydrofilních vitaminů, zvláště vitaminů skupiny B, nachází enzymatická hydrolýza široké uplatnění. Nejčastěji používanými enzymy jsou *papain*, *clarasa* či *takadiastasa*. Při analýze lipofilních vitaminů se většinou k hydrolýze (zmýdelnění) vzorku využívá alkalická hydrolýza. Také při izolaci lipofilních vitaminů však začíná v současné době enzymatická hydrolýza nabývat značné důležitosti, své uplatnění nachází např. enzym *Candida antartica lipasa*.

Enzymatická hydrolýza napomáhá extrakci vitaminů, která je potřebná pro jejich následné chromatografické stanovení, nejčastěji metodou HPLC. Podobně jako enzymatické hydrolýze kolagenu je také enzymatické hydrolýze za účelem izolace vitaminů dáována pro její šetrnost stále větší přednost před hydrolýzou kyselou nebo alkalickou. Lze předpokládat, že i v budoucnosti bude tento trend nadále pokračovat.

Mezi nepoužívanější komerčně dostupné enzymatické preparáty patří *Papain* z *Carica papaya*, *Pankreatin* z vepřové slinivky břišní, *Clarasa 300* (*Clara-Diastasa*), *Taka-Amylase A* (*Taka-Amylase* z *Aspergillus oryzae*), *Rennin* (*Chymosin*) z žaludku telat a *Trypsin* z hovězí slinivky břišní, které je možno objednat např. u firmy Sigma-Aldrich.

V praxi lze také použít např. enzymatické preparáty *Macerozyme R-10* (*Pektinase* z *Rhizopus* sp.) a *TDF-100A* (*Amyloglukosidase* z *Aspergillus niger*) od firmy Sigma-Aldrich, *Novozyme 435* (*Candida antartica lipasa*) a *Fungamyl 800L* (α -*Amylase* z *Aspergillus oryzae*) od firmy Novozymes.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A., RODWELL, V. W. *Harperova biochemie*, 3. vyd., Jinočany: Nakladatelství H+H, 2002, ISBN 80-7319-013-3.
- [2] SCHENCK, M., KOLB, E. *Základy fyziologickej chémie*, 1. vyd., Bratislava: PRÍRODA, vydavateľstvo knih a časopisov, 1991, ISBN 80-07-00418-1.
- [3] HANČOVÁ, H., VLKOVÁ, M. *Biologie II. v kostce*, 2. vyd., Havlíčkův Brod: Fragment, 2003, ISBN 80-7200-341-0.
- [4] ZALABÁK, V. a kol. *Specificky účinné látky ve výživě zvířat*, 1. vyd., Praha: Academia, nakladatelství Československé akademie věd, 1980, ISBN 509-21-857.
- [5] Enzymy [online]. [cit. 2-2-2009].
Dostupné na: <<http://www.ft.utb.cz/czech/upich/vyuka/chap/prednasky/enzymy.pdf>>.
- [6] ČECHOVÁ, L., JANALÍKOVÁ, M. *Obecná mikrobiologie*, 1. vyd., Zlín: UTB ve Zlíně, Academia Centrum, 2007, ISBN 978-80-7318-516-9.
- [7] Biochemie - Vzdělávací portál Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně [online]. [cit. 17-11-2008].
Dostupné na: <<http://utb.cepac.cz/Screens/Explorer.aspx?id=16>>.
- [8] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D. *Potravinářská biochemie I.*, 1. vyd., Zlín: UTB ve Zlíně, Academia Centrum, 2005, ISBN 80-7318-295-5.
- [9] Sladké mléčné výrobky bez přídavku cukru, *DMZ*, sv. 121, č. 15, 2000, 635–639 s.
- [10] HUBÁČEK, J. a kol. *Chemie pro vysoké školy zemědělské*, 1. vyd., Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1988.
- [11] Kasein - Wikipedie, otevřená encyklopedie [online]. [cit. 6-2-2009].
Dostupné na: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Kasein>>.

- [12] HRABĚ, J., BUŇKA, F., HOZA, I., BŘEZINA, P. *Technologie výroby potravin živočišného původu pro kombinované studium*, 1. vyd. Zlín: UTB ve Zlíně, Academia Centrum, 2007, ISBN 978-80-7318-521-3.
- [13] NELSON, D. L., COX, M. M. *Principles of biochemistry*, 4. vyd., Lehninger.
- [14] PECHÁČKOVÁ, M. *Charakterizace hydrolyzátů kolagenu pomocí gelové permeační chromatografie s refraktometrickou a viskozitní detekcí*, diplomová práce, Zlín: FT UTB ve Zlíně, 2008.
- [15] CRUDDEN, A., FOX, P. F., KELLY, A. L. Factors affecting the hydrolytic action of plasmin in milk, *International Dairy Journal*, sv. 15, č. 4, 2005, 305-313 s.
- [16] ČURDA, L., TOVAROVÁ, I., TEJČKOVÁ, E. Enzymová hydrolýza koncentráту bílkovin syrovátky, *Sborník semináře Mléko a sýry 2002*, 174-178 s.
- [17] Enzymatická modifikace syrovátkového koncentráту, *Deutsche Milchwirtschaft*, sv. 55, č. 18, 2004, 722 – 723 s.
- [18] YUST, M. M., PEDROCHE, J., GIRÓN-CALLE, J., ALAIZ, M., MILLÁN, F., VIOQUE, J. Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase, *Food Chemistry*, sv. 81, č. 3, 2003, 363–369 s.
- [19] Enzymově hydrolyzovaný pšeničný lepek, *Food Technology*, sv. 55, č. 5, 2001, 41 s.
- [20] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., BUDÍNSKÝ, P. *Potravinářská biochemie II.*, 1. vyd., Zlín: UTB ve Zlíně, Academia Centrum, 2006, ISBN 80-7318-395-1.
- [21] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2.*, 2. vyd., Tábor: OSSIS, 1999, ISBN 80-902391-4-5.
- [22] MAURO, S. The role of antioxidants in disease prevention [online]. [cit. 20-9-2008]. Dostupné na: <<http://www.sciencedirect.com>>.
- [23] Základy biochemických procesů - Vzdělávací portál Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně [online]. [cit. 14-11-2008].
Dostupné na: <<http://utb.cepac.cz/Screens/Explorerer.aspx?id=25>>.
- [24] Vitaminy [online]. [cit. 27-11-2008].
Dostupné na <<http://www.ft.utb.cz/czech/upich/vyuka/index.html>>.

- [25] BUŇKA, F., NOVÁK, V., KADIDLOVÁ, H. *Ekonomika výživy a výživová politika I.*, 1. vyd., Zlín: UTB ve Zlíně, Academia Centrum, 2006, ISBN 80-7318-429-X.
- [26] DAVÍDEK, J. *Laboratorní příručka analýzy potravin*, 1. vyd., Praha: SNTL, 1977, ISBN 04-830-77.
- [27] Vitamin - water methods [online]. [cit.27-3-2008].
Dostupné na: <http://hplc1.sweb.cz/Vitamin/methods_water.htm>.
- [28] NDAW, S., BERGAENTZLÉ, M., AOUDÉ-WERNER, D., HASSELMANNLL, C. Enzymatic extraction procedure for the liquid chromatographic determination of niacin in foodstuffs, *Food Chemistry*, sv. 78, č. 1, 2002, 129-134 s.
- [29] NDAW, S., BERGAENTZLÉ, M., AOUDÉ-WERNER, D., HASSELMANNLL, C. Extraction procedures for the liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and vitamin B₆ in foodstuffs, *Food Chemistry*, sv. 71, č. 1, 2000, 129-138 s.
- [30] VAHTERISTO, L. a kol. Determination of folates in vegetables and fruits by HPLC analysis, *Food Chemistry*, sv. 59, č. 4, 1997, 589-591 s.
- [31] LAHÉLY, S., NDAW, S., ARELLA, F., HASSELMANN, C. Determination of biotin in foods by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorimetric detection, *Food Chemistry*, sv. 65, č. 2, 1999, 253-258 s.
- [32] CHU, B. S., QUEK, S. Y., BAHARIN, B. S. Optimisation of enzymatic hydrolysis for concentration of vitamin E in palm fatty acid distillate, *Food Chemistry*, sv. 80, č. 3, 2003, 295-302 s.
- [33] Novozymes, enzymes [online]. [cit. 8-5-2009].
Dostupné na: <<http://www.novozymes.com>>.
- [34] Sigma-Aldrich [online]. [cit. 8-5-2009].
Dostupné na: <<http://www.sigmaaldrich.com>>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

<i>ACE</i>	angiotenzin-konvertující enzym, Angiotensin Converting Enzyme
<i>ACP-SH</i>	nosný protein, Acyl Carrier Protein
<i>ADP</i>	adenosindifosfát
<i>ATP</i>	adenosintrifosfát
<i>BCCP</i>	komplex aktivního biotinu s proteinem, Biotin Carboxyl Carrier Protein
<i>CoA-SH</i>	koenzym A
<i>DIPF</i>	diisopropylfosfofluorid
<i>E.C.</i>	kódové číslo enzymu, Enzyme Commission
<i>FAD</i>	flavinadeninukleotid
<i>FAO</i>	Organizace pro výživu a zemědělství, Food and Agriculture Organization
<i>FFA</i>	volné mastné kyseliny, Free Fatty Acids
<i>FH₄</i>	tetrahydrofolát
<i>FMN</i>	flavinmononukleotid
<i>GC</i>	plynová chromatografie, Gas Chromatography
<i>HPCL</i>	vysokoúčinná kapalinová chromatografie, High Performance Liquid Chromatography
<i>IUB</i>	Mezinárodní biochemická unie, International Union of Biochemistry
<i>NAD⁺</i>	nikotinamidadeninukleotid
<i>NADP⁺</i>	nikotinamidadeninukleotidfosfát
<i>NADasa</i>	<i>NAD-glykohydrolasa</i>
<i>PFAD</i>	destilát kyseliny palmitové, Palmitic Fatty Acid Distillate
<i>P_i</i>	monofosfát
<i>RSM</i>	reakční povrchová metoda, Response Surface Method
<i>TDP</i>	thiamindifosfát

WPC	koncentrát syrovátkových bílkovin, Whey Protein Concentrate
Arg	arginin
Asp	kyselina asparagová
Cys	cystein
His	histidin
Glu	glutamová kyselina
Gly	glycin
Leu	leucin
Lys	lyzin
Met	metionin
Phe	fenylalanin
Pro	prolin
Ser	serin
Trp	tryptofan
Tyr	tyrosin
Val	valin
pro-CT	prochymotrypsin
π -CT	π -chymotrypsin

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Štěpení inulinu <i>inulinasou</i> [7].....	24
Obrázek 2. Enzymatická degradace protopektinů [8].....	26
Obrázek 3. Struktura <i>chymotrypsinu</i> s navázaným substrátem [13].....	33

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Významné komerčně dostupné enzymatické preparáty [34]	56
--	----