

Vliv termosterilace na obsah aminokyselin v potravinách

Martina Zvonková

Bakalářská práce
2006



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav potravinářského inženýrství a chemie
akademický rok: 2005/2006

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Martina ZVONKOVÁ**
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Vliv termosterilace na obsah aminokyselin
v potravinách**

Zásady pro vypracování:

1. Charakterizujte bílkoviny a aminokyseliny v potravinách z hlediska jejich působení v lidském organismu.
2. Popište vliv působení tepla na bílkoviny a aminokyseliny v potravinách se zaměřením na termosterilizaci.
3. V praktické části realizujte modelový pokus se sterilací kaseinu.
4. Provedte analýzu aminokyselin, výsledky vyhodnoťte a vyvodte závěry zaměřené na posouzení vlivu sterilizačního záhřevu na aminokyseliny.



Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Dle doporučení vedoucího BP

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. František Buňka, Ph.D.

Ústav potravinářského inženýrství a chemie

Datum zadání bakalářské práce:

10. října 2005

Termín odevzdání bakalářské práce:

31. května 2006

Ve Zlíně dne 20. dubna 2006


prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
děkan




prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Předkládaná práce je věnována otázkám potřeby bílkovin ve výživě a vlivu sterilace na obsah aminokyselin za použití tepla. Práce je v teoretické části členěna do pěti kapitol, kdy vlastním jádrem práce je kapitola – Změny proteinů při skladování a zpracování potravin. Autor popisuje změny proteinů a případné ztráty aminokyselin vlivem záhřevu. Praktická část obsahuje výsledky získané při laboratorních pokusech, kdy byl sterilován kasein a následnou diskuzi ke zjištěným ztrátám jednotlivých aminokyselin. Byly prokázány ztráty zejména u threoninu, serinu, asparagové a glutamové kyseliny. Při hydrolýze byly nejmenší ztráty zjištěny u cysteinu, methioninu a tyrosinu.

Klíčová slova: Aminokyseliny, bílkoviny, kasein, sterilace, hydrolýza, ztráty

ABSTRACT

The construed work is devoted to the nutrition proteins demand questions and to the heat food processing necessity. This work is structured into five chapters in the theoretical part. The main gist is the chapter called „ Protein changes during food storage and processing”. The author describes protein changes and possible amino-acids waste owing to the heat. Experimental part contains first lab won results where caisen was sterilized and second discussion on ascertained amino-acids waste. Thereonin, serine, asparag and glutam acids wastes were especially proved. The minimal wastes were established in cystein, methionin and tyrosin using hydrolysis.

Keywords: amino-acids, proteins, caseine, sterilation, hydrolysis, losses

Ráda bych tímto poděkovala panu ing. Františku Buňkovi, Ph.D. za odborné vedení při zpracování této bakalářské práce, za rady, připomínky a čas, který mi věnoval při jejím sestavování.

Dále bych chtěla poděkovat panu Ing. Robertu Víchovi, Ph.D. za pomoc a cenné rady především při zpracování a vyhodnocování experimentální části.

Souhlasím s tím, že s výsledky mé práce může být naloženo podle uvážení vedoucího bakalářské práce a ředitele ústavu. V případě publikace budu uvedena jako spoluautor.

Prohlašuji, že jsem na celé bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala.

Ve Zlíně, 27. 05. 2005

.....

podpis bakaláře

OBSAH

ÚVOD.....	7
I TEORETICKÁ ČÁST	9
1 BÍLKOVINY VE VÝŽIVĚ	10
2 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA AMINOKYSELIN	14
3 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA PEPTIDŮ	16
4 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA BÍLKOVIN	17
4.1 STRUKTURA PROTEINŮ	17
4.2 FYZIKÁLNÍ A CHEMICKÉ VLASTNOSTI PROTEINŮ	18
4.3 VÝSKYT A SLOŽENÍ PROTEINŮ V POTRAVINÁCH	19
4.4 MLÉČNÉ PROTEINY	20
4.4.1 Kasein	21
4.4.2 Bílkoviny syrovátky	23
5 ZMĚNY PROTEINŮ PŘI SKLADOVÁNÍ A ZPRACOVÁNÍ POTRAVIN	24
5.1 TEPELNÉ ZPRACOVÁNÍ POTRAVIN	24
5.1.1 Změny proteinů při tepelném zpracování masa	26
5.1.2 Tepelné zpracování a skladování vaječných proteinů	27
5.1.3 Zpracování potravin rostlinného původu	27
II PRAKTICKÁ ČÁST	29
6 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	30
7 METODIKA PRÁCE	31
7.1 POPIS EXPERIMENTU	31
7.2 STANOVENÍ AMINOKYSELIN	31
8 VÝSLEDKY A DISKUZE	34
8.1 VÝSLEDKY STANOVENÍ AMINOKYSELIN	34
8.2 SOUHRNNÁ DISKUSE	41
9.ZÁVĚR	45
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	46
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	49
SEZNAM OBRÁZKŮ	50
SEZNAM TABULEK	51
SEZNAM PŘÍLOH	52

ÚVOD

Aminokyseliny jsou stavebními jednotkami bílkovin. V živočišném organismu jsou velice důležité. Bílkoviny, které jsou syntetizovány ve všech tkáních v těle (nejaktivnější jsou játra a svaly), patří mezi hlavní stavební složky organismu, podílejí se na výstavbě buněčných a kosterních tělesných struktur. Jsou využívány také k tvorbě nových tkání, k růstu, udržování a nápravě tkání stávajících a vytvářejí též funkční složky organismu jako jsou hormony, nukleové kyseliny a trávicí enzymy. Jejich funkce jsou i transportní, umožňující přenos různých sloučenin (hemoglobin), dále pohybové, obranné, zásobní, sensorické a zejména výživové. Bílkoviny jsou nejen zdrojem dusíku v potravě, ale i zdrojem esenciálních aminokyselin, které si tělo neumí syntetizovat a je nutné je přijímat z potravy. Pokud se do organismu nedodají plnohodnotné bílkoviny obsahující všechny esenciální aminokyselina, které si tělo neumí samo vytvořit, je zpomalena či úplně zastavena syntéza bílkovin důležitá pro tvorbu hormonů, enzymů, protilátek, krve, svalů, kůže, kostí a dalších tkání.

Cílem této bakalářské práce bylo nejen vyjádřit důležitost bílkovin ve výživě, ale také nutnost postihnout vliv sterilace na potraviny. Sterilace zvýšenou teplotou (termosterilace) je označována jako metoda konzervace za použití tepla. Tepelnému zpracování je podrobována většina základních potravin. Náš organismus si již dávno odvykl přijímat syrové maso, vejce, obiloviny atd. Dokonce ani takovou základní potravinu jako je mléko bychom se dnes jen těžko z hygienických důvodů odvážili běžně konzumovat po nadojení. Musíme si být tudíž vědomi, že tepelné zpracování většiny potravin je nutné a současně si uvědomit, že v důsledku tepelné přípravy pokrmů dochází k jistým ztrátám. Tepelné opracování je součástí výroby většiny potravin a je používáno zejména ke zvýšení údržnosti potravin (inaktivace mikroorganismů, enzymů nebo látek nežádoucích pro lidský organismus), ke změně konzistence, barvy nebo jiných sensorických znaků. Při tepelném záhřevu dochází zejména k úbytkům některých vitaminů a dále k reakcím dusíkatých látek (zejména bílkovin, peptidů a aminokyselin) mezi sebou či s ostatními složkami potravy, resp. pokrmu, přičemž se mění jejich biologická využitelnost pro člověka.

V teoretické části jsou charakterizovány bílkoviny v potravinách z hlediska jejich působení v lidském organismu a dále vliv sterilace na obsah aminokyselin v potravi-

nách při působení tepla. V praktické části je porovnáván obsah aminokyselin ve sterilovaném a nesterilovaném kaseinu ve třech pokusných řadách.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BÍLKOVINY VE VÝŽIVĚ

V přírodě se vyskytuje množství sloučenin, jejichž stavebními jednotkami jsou aminokyseliny spojené navzájem amidovou vazbou $-\text{CO}-\text{NH}-$, která se nazývá peptidová. Podle velikosti molekuly, resp. počtu vázaných aminokyselin, se tyto sloučeniny dělí na dvě základní skupiny, kterými jsou:

- oligopeptidy obsahující 2-10 vázaných aminokyselin,
- polypeptidy obsahující 11 až 100 vázaných aminokyselin,
- bílkoviny neboli proteiny, které obsahují více než 100, běžně několik set až tisíc aminokyselin. [1], [2]

Kromě peptidové vazby se podílejí ještě jiné vazby, zejména disulfidové ($-\text{S}-\text{S}-$), esterové a amidové (vazby umožňující spojení serinu, threoninu, argininu nebo lysinu prostřednictvím kyseliny fosforečné). Na molekuly bílkovin jsou vázány dále molekuly vody a různé anorganické ionty. Některé bílkoviny obsahují ještě jiné fyzikálně nebo chemicky vázané organické sloučeniny, například lipidy, cukry, nukleové kyseliny aj. Jejich studiem se zabývají především biochemické disciplíny. [1]

Ve výživě člověka a jiných živočichů jsou bílkoviny nezastupitelné, neboť není možné je dlouhodobě nahrazovat jinými živinami. Jsou základními chemickými složkami všech živých buněk, a proto také součástí téměř všech potravin rostlinného, živočišného i jiného původu. Bílkoviny jsou nezbytné k růstu organismu a v dospělosti k stálému obnovování jeho živé hmoty, jejíž jsou základní součástí. [3, 16]

Po rozštěpení proteinů se aminokyseliny využívají pro:

- tvorbu plazmových proteinů (které se dále využívají pro výstavbu a obnovu tkání),
- tvorbu proteinů se specifickou funkcí v organismu- zejména enzymů,
- tvorbu dalších dusíkatých látek se specifickou funkcí v organismu, např. porfirinů (hem), purinů a pyrimidinů (nukleotidy), kreatinu a jiné. [4,6]

Podíl proteinů v potravě by měl odpovídat věku a stavu organismu. Denní příjem proteinů v g na 1 kg tělesné hmotnosti má činit u dětí 0,85 až 1,0 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a u dospělých 0,7 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ denně. Podle doporučení EU je hodnota denního příjmu PRI (Population Reference Intake, populační referenční přívod) 0,75 g bílkovin na 1 kg tělesné

hmotnost, což odpovídá 56 g pro muže a 47 g pro ženy. Zvýšený příjem plnohodnotných bílkovin se doporučuje v období puberty. [9] Denní ztráty bílkovin se pohybují mezi 20-30 g. Bílkoviny mají dle doporučení Světové zdravotnické organizace krýt 11-13% celkové denní spotřeby energie. Polovina bílkovin by měla být živočišného a polovina rostlinného původu. [7]

Z tabulky 1, ve které je uvedena doporučená dávka proteinů na kg tělesné hmotnosti, je patrné, že se potřeba bílkovin s rostoucím věkem neustále snižuje, s výjimkou žen v období těhotenství a laktace, u nichž je potřeba mnohem vyšší.

Absolutní potřeba sice značně závisí na celkové potřebě energie a rychlosti metabolismu, ale poměr potřebných množství jednotlivých aminokyselin zůstává přibližně zachován, jak uvádí tabulka 2

Tab. 1 Doporučené dávky proteinů na kg tělesné hmotnosti [2]

věk	0-4měs.	4-12měs.	1-3 roky	4-6 let	7-10 let	11-14 let	15-18 let	do-spělí	těhotné ženy	kojící ženy
g.kg ⁻¹	2,2	2,0	1,2	1,1	1,0	1,0	0,9	0,75	+ 10g na den	+ 15g na den

Tab. 2 Minimální denní potřeba aminokyselin u člověka [3]

Aminokyselina	Potřeba(mg d-1)	
	u žen	u muže
Histidin	-	-
Isoleucin	450	700
Leucin	620	1100
Lysin	500	800
Methionin	350	200-1100
Cystin	200	800
Fenylalanin	220	300-1100
Tyrosin	900	1100
Threonin	300	500
Valin	650	800
Tryptofan	157	250

Je-li příjem pod touto hladinou, mohou nastat různé zdravotní poruchy. Nedostatečný přísun proteinů žádoucí biologické hodnoty vede k malnutrici (tj. porucha výživy), která se projevuje zpočátku sníženou funkcí imunitního systému, později otoky, jis-

tým opožděním růstu u dětí, průjmy a chudokrevností. Výraznější nedostatek bílkovin má za následek také změny na kůži a vlasech. Ty jsou řídké, nepigmentované a tenké. Malé děti mohou trpět mentální retardací, apatií, nechutí k jídlu, mají opožděný motorický vývoj. [2, 4, 6]

Podle významu člověka ve výživě člověka se aminokyseliny dělí na:

- esenciální: valin, leucin, isoleucin, threonin, methionin, lysin, fenylalanin a tryptofan,
- semiesenciální (pro vývoj malých dětí, protože je nedovedou samy syntetizovat): arginin a histidin,
- neesenciální: ostatní aminokyseliny.

Přehled funkcí esenciálních, semiesenciálních a neesenciálních aminokyselin vyjadřují PŘÍLOHY P 1 až P 3.

Esenciální aminokyseliny nedokáže živočišný organismus syntetizovat a musí je získávat potravou. Tyto aminokyseliny jsou nezbytné pro tkáň dospělého člověka a proteiny, které je obsahují v určitém množství a poměru, jsou velmi kvalitní, tj. mají vysokou biologickou hodnotu. Semiesenciální aminokyseliny jsou nezbytné pro zajištění normálního růstu dětí, popř. za určitých stavů, zejména po některých radikálnějších operačních zákrocích. Neesenciální jsou takové aminokyseliny, které si organismus dokáže vytvořit jejich vzájemnou přeměnou. [2, 10, 11]

Z výživového hlediska se proteiny dále dělí na:

- plnohodnotné, které obsahují všechny esenciální aminokyseliny v množství potřebném pro výživu člověka (např. vaječná a mléčná bílkovina),
- téměř plnohodnotné, u kterých jsou některé esenciální aminokyseliny mírně nedostatkové (např. živočišné svalové bílkoviny),
- neplnohodnotné, u kterých jsou některé esenciální aminokyseliny nedostatkové (např. veškeré rostlinné bílkoviny, bílkoviny živočišných pojivových tkání aj.).

Před vlastním trávením (například při kulinární úpravě) probíhá zpravidla denaturace proteinů, což je změna sekundární, terciární a kvartérní struktury. Z výživového hle-

diska je denaturace zpravidla žádoucí, protože porušením nativní struktury proteinů se zlepší přístup proteolytických enzymů k funkčním skupinám proteinů, a tím se zlepší jejich stravitelnost. Vlastní trávení proteinů v lidském trávicím systému je enzymová hydrolýza (proteolýza) katalyzovaná proteolytickými enzymy (proteázami, peptidázami). Proteázy jsou součástí trávicích šťáv, a to žaludeční, pankreatické a střevní. Proteolýza probíhá v několika stupních. Nejprve vznikají polypeptidy, z nich oligopeptidy a konečnými produkty rozkladu bílkovin jsou aminokyseliny. Vznikající aminokyseliny jsou následně v tenkém střevě vstřebávány a transportovány krevním oběhem do tkání nebo krevním oběhem do jater, kde jsou dále metabolizovány. Nevstřebené aminokyseliny nebo peptidy jsou v tlustém střevě metabolizovány střevní mikroflórou za vzniku tzv. produktů hnití (sulfan, idolové deriváty aj.), které tvoří zápach stolice. [1, 4, 9]

2 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA AMINOKYSELIN

Aminokyseliny se v potravinách nacházejí jako stavební jednotky všech bílkovin, peptidů a také jako volné látky, jejichž význam z hlediska výživy je většinou zanedbatelný vzhledem k malému množství, v jakém se běžně v potravinách vyskytují, představují asi 1% (některé však vykazují význačné biologické účinky, mají např. funkci hormonů). V přírodních materiálech bylo prokázáno asi 700 různých aminokyselin, z nichž za základních je považováno asi 20. Aminokyseliny jsou karboxylové kyseliny, v jejichž molekule je přítomna alespoň jedna primární aminoskupina –NH₂ a současně alespoň jedna karboxylová skupina –COOH. [1, 19, 22]

Základní aminokyseliny vázané ve všech bílkovinách jsou α – aminokyseliny. Nejrozšířenějším způsobem třídění 20 základních aminokyselin je podle struktury postranního řetězce a v něm přítomných funkčních skupin na:

- alifatické aminokyseliny (monoaminomonokarboxylové) kyseliny nesubstituovaným postranním řetězcem, kam se řadí:
glycin, alanin, valin, leucin a isoleucin,
- alifatické hydroxyaminokyseliny, kam náleží: serin a threonin,
- alifatické sírné aminokyseliny cystein a methionin,
- aminokyseliny s karboxylovou skupinou v postranním řetězci (monoaminodikarboxylové kyseliny) : asparagová a glutamová kyselina, jejich monoamidy (aminokyseliny s karboxamidovou skupinou v postranním řetězci), kam náleží asparagin a glutamin,
- aminokyseliny s bazickými funkčními skupinami v postranním řetězci: lysin, arginin, histidin,
- aminokyseliny a aromatickým a heterocyklickým postranním řetězcem: fenylalanin, tyrosin, tryptofan,
- prolin je aminokyselinou, u které se funkční skupina účastní tvorby cyklu.

Grafický přehled jednotlivých aminokyselin uvádějí PŘÍLOHY P 4 až P 10.

Z fyzikálního hlediska má asi polovina aminokyselin zcela nepolární (hydrofobní) charakter (alanin, valin, leucin, isoleucin, prolin, fenylalanin, tryptofan a methyonin). Aminokyseliny jsou krystalické, poměrně dobře rozpustné ve vodě a polárních rozpouštědlech. Rozpustnost ve vodě není u všech aminokyselin stejná, závisí na polaritě postranního řetězce a na pH prostředí. V krevní plazmě, kde se nachází v nízkých koncentracích, jsou rozpustné všechny. Tvorba vnitřních solí je také příčinou vysokého bodu tání nebo rozkladu (obvykle při teplotách vyšších než 200°C). Mají také velmi nízkou těkavost. Základní aminokyseliny vykazují všechny obvyklé vlastnosti karboxylových kyselin. S hydroxidy tvoří soli, mohou tvořit různé funkční deriváty kyselin, zejména amidy a estery, mohou být dekarboxylovány za vzniku aminů. Výraznou vlastností je bipolární charakter jejich molekul. V závislosti na pH prostředí se mohou chovat jako kyseliny i jako zásady. Aminokyseliny proto řadíme mezi látky amfoterní neboli amfolyty. S výjimkou glycinu obsahují všechny ostatní aminokyseliny chirální atom uhlíku v poloze α ke karboxylové skupině, tzv. uhlík C_{α} . V bílkovinách se vyskytují výhradně aminokyseliny s L-konfigurací. Příslušnost aminokyselin k řadě L- nebo D- nesouvisí s jejich optickou otáčivostí. Optická otáčivost závisí značně na pH prostředí (např. leucin je v kyselém a alkalickém prostředí pravotočivý, histidin je pravotočivý v kyselém prostředí a levotočivý v alkalickém prostředí.). [1, 3, 10, 11, 19, 22, 28]

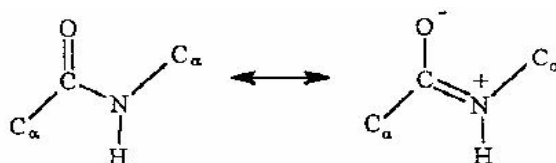
Podle organoleptických vlastností se základní aminokyseliny rozlišují na:

- sladké (glycin, alanin, threonin, prolin a hydroxyprolin),
- kyselé (asparagová a glutamová kyselina),
- hořké (leucin, isoleucin, fenylalanin, tyrosin a tryptofan),
- indiferentní (ostatní aminokyseliny).

Aminokyseliny se jako chuťové látky uplatňují u potravin, při jejichž výrobě probíhá intenzivnější proteolýza, např. u některých sýrů, ale také masa a ryb. Zcela unikátní organoleptické vlastnosti má glutamová kyselina, resp. její monosodná sůl, která je slaná. Používá se jako intenzifikátor chuti masových a zeleninových pokrmů a pro výrobu různých kořenících přípravků. [1]

3 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA PEPTIDŮ

Peptidy jsou polymery aminokyselin, v nichž je karboxylová skupina jedné aminokyseliny vázána na aminovou skupinu druhé aminokyseliny amidovou vazbou, přičemž se odštěpuje molekula vody. Vazba, která se takto vytvoří, se nazývá vazbou peptidovou –CO-NH-. Kromě peptidových vazeb obsahují heterogenní peptidy dále vazby disulfidové (-S-S-), thioesterové nebo esterové. [1, 3, 17, 22]



Obr. 1 Peptidová vazba

Spojením, resp. kondenzací, dvou α -aminokyselin vznikne dipeptid, ze tří molekul aminokyselin tripeptid, deseti dekaeptid, při jedenácti až jednom stu vázaných molekul aminokyselin hovoříme obecně o polypeptidech. Hranice mezi polypeptidy a proteiny není ostrá. Hlavní rys, který odlišuje bílkoviny od peptidů není počet aminokyselinových zbytků, ale definovaná sekundární a terciární struktura bílkovin. [1, 17, 19]

Peptidy, jejichž přehled a funkce uvádějí PŘÍLOHY P 11 až P 16, jsou látky s širokou škálou biologických účinků od hormonálních léčiv až k jedům hadů či muchomůrek. Proto našly použití jak v humánní a veterinární medicíně, tak v základním nebo aplikovaném výzkumu v oblastech biochemie, farmakologie a imunologie. Každý lineární peptid má jednu aminokyselinu s volnou karboxylovou skupinou (C-koncová aminokyselina) a jednu aminokyselinu s volnou aminoskupinou (N-koncová aminokyselina). Kromě lineárních peptidů mohou kondenzací aminokyselin vznikat cyklické struktury, které nemají volnou ani karboxylovou skupinu, ani aminoskupinu. Takové sloučeniny se nazývají cyklické peptidy. Peptidy se v potravinách vyskytují jako produkty metabolismu. V živých organismech vznikají z aminokyselin buď jednoduchou biosyntézou nebo hydrolýzou prekurzorů vyráběných v rámci proteosyntézy. Při zpracování a skladování potravin vznikají také sekundárně enzymovou a neenzymovou hydrolýzou bílkovin (proteolýzou). [1]

4 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA BÍLKOVIN

Bílkoviny (proteiny) jsou polymery aminokyselin, které vznikly procesem proteosyntézy. Obsahují v molekule běžně více než 100 aminokyselin vzájemně vázaných peptidovou vazbou do nerozvětvených (lineárních) řetězců. Bílkoviny mají vždy charakteristické prostorové uspořádání, které je dáno nekovalentními interakcemi mezi úseky řetězce. Toto uspořádání se označuje jako nativní konformace bílkoviny. [1]

4.1 Struktura proteinů

Obecný popis struktury bílkovin se tradičně rozlišuje do čtyř úrovní, které označujeme jako primární, sekundární, terciární a kvartérní struktura. [19]

Nejpřesněji lze určit strukturu stanovením pořadí (sekvence) aminokyselin v peptidovém řetězci. Proteiny jsou totiž složeny z nerozvětvených peptidových řetězců o určitém neměnném a pro daný protein charakteristickém pořadí aminokyselin, které se nazývá primární struktura proteinu. Popisuje počet a pořadí aminokyselinových zbytků v řetězcích. [3, 22]

Aminokyseliny v peptidovém řetězci mají určité prostorové uspořádání. Jsou uspořádány do pravotočivých α -šroubovic, jejichž poloha se udržuje intramolekulárními vodíkovými můstky. Na jednu otáčku šroubovice připadá 3,7 zbytku aminokyseliny, výška závitů je 0,544 nm.. Prostorovému uspořádání peptidového řetězce ve formě šroubovice nebo listu se říká sekundární struktura proteinu.

Šroubovice, jíž je tvořena molekulou globulárních proteinů, nemá dlouhý rovný tvar, ale je různým způsobem zprohýbaná a svinuta v klubko. Toto prostorové uspořádání se označuje jako terciární struktura proteinu. Struktura α -šroubovice je na různých místech porušena, na těchto místech se šroubovice ohýbá a vytvářejí se buď intramolekulární vazby, např. elektrostatické, vodíkové můstky, hydrofobní interakce, nebo kovalentní vazby, jako jsou disulfidické můstky. Příkladem proteinu, u kterého je zcela známa terciární struktura je myoglobin.

Řada proteinových molekul není tvořena jedním, ale několika polypeptidovými řetězci, které vytvářejí definovanou komplexní molekulu. Uspořádání řetězců v této makromolekule označujeme jako kvartérní strukturu proteinu. Příkladem tetramerního proteinu je hemoglobin. [22]

4.2 Fyzikální a chemické vlastnosti proteinů

Ve styku s vodou se molekuly snadno hydratují. Roztoky proteinů se často označují jako roztoky koloidní. Rozpustnost proteinů závisí na povaze rozpouštědla, hodnotě pH roztoku, koncentraci elektrolytů a na terciární struktuře proteinu. V oblasti pH, kde je počet kladných i záporných nábojů stejný, se tvoří vnitřní soli a hydratace proteinů klesá. Proto v tomto tzv. izoelektrickém bodě má protein minimální rozpustnost a jeho roztok minimální viskozitu a bobtnavost. Hodnota izoelektrického bodu je charakteristická pro určitý protein, protože je závislá na složení aminokyselin. [3]

K nejdůležitějším změnám fyzikálních vlastností proteinů patří změny jejich konformace. Soubor konformačních změn se nazývá denaturace proteinů. Tu vyvolávají fyzikální faktory (nejčastěji změny teploty, tlaku, působení ultrazvuku, pronikavé elektromagnetické záření aj.). [1]

Při sterilačních teplotách dochází ke kompletní denaturaci proteinového podílu. Rychlost denaturace ovšem značně závisí na obsahu vody v soustavě. V přítomnosti většího procenta vody proběhne denaturace rychle již při teplotách do 100°C, zatímco u potravinářských materiálů s nízkým obsahem vody je zapotřebí zářev na 120 až 150°C. Krystalické proteiny jsou proti denaturaci velmi odolné. Denaturace nasycenou vodní párou je mnohem účinnější než denaturace horkým vzduchem, kterým se vzorek rychle vysuší. Rovněž při zmrazování nastává často denaturace, a to zvláště v intervalu teplot mezi 0 až -15°C. V materiálu se vytvářejí krystaly ledu, které mohou porušit buněčné membrány. K vlastní denaturaci dochází následně v důsledku povrchových jevů na rozhraní dvou fází (roztoku proteinu a ledových krystalů) a případně v důsledku zmrznutí vody nutné pro zachování nativní konformace proteinu. [3]

Denaturace chemickými činidly nastává např. v přítomnosti solí, kyselin, zásad, resp. změnami pH roztoků nebo v přítomnosti povrchově aktivních látek. [1]

V proteinech jsou aminokyseliny vzájemně vázány peptidovými vazbami, takže se hydrolyzou mohou zpětně štěpit na peptidy až aminokyseliny. Hydrolyza může proběhnout působením enzymů štěpících bílkoviny (proteázy), kyselin a zásad, tudíž bílkovinný hydrolyzát můžeme získat kyselou, alkalickou nebo enzymovou hydroly-

zou. Při kyselé hydrolýze se materiál vaří s přebytkem konstantně vroucí kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 6 mol.l^{-1} , která se z hydrolyzátu nakonec oddestiluje. Použije-li se kyselina sírová, odstraní se jako síran vápenatý nebo barnatý. Výhodou kyselé hydrolýzy je, že nedochází k racemizaci a L-konfigurace tedy zůstává zachována. Během hydrolýzy, která při 100 až 110°C trvá 12 až 70 hodin, se rozkládá tryptofan a sirné aminokyseliny, asparagin se hydrolyzuje na asparagovou kyselinu a glutamin na glutamovou kyselinu za uvolnění amoniaku ve formě amonné soli. Rychlost rozkladu peptidických vazeb se liší podle struktury a druhu jednotlivých aminokyselin. Aminokyseliny uvolněné z peptidických vazeb mohou dále podléhat různým rozkladným reakcím. Pro stanovení přesných obsahů isoleucinu a valinu, které jsou obtížně uvolňovány ze svých peptidických vazeb, se musí použít hydrolýza po dobu 70 hodin, u threoninu a serinu podle různých autorů dochází ke ztrátám ve výši 3 -16 %, u tyrosinu jsou uváděny ztráty kolem 1-14 %. Kyselá hydrolýza se používá v laboratoři i při průmyslové výrobě polévkového koření. Její nevýhodou je, že bílkovinné hydrolyzáty mívají nepříjemnou chuť, užijí-li se ve větším množství. [3, 29, 30]

V alkalickém prostředí, například v roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 6 mol.l^{-1} nebo v roztoku hydroxidu barnatého o koncentraci 3 mol.l^{-1} , který se potom z hydrolyzátu odstraní účinkem oxidu uhličitého jako nerozpustný uhličitán barnatý, proběhne hydrolýza rovněž, ale ve značné míře probíhá racemizace. Alkalická hydrolýza se provádí zřídka, neboť se při ní rozkládá arginin, cystin a částečně lysin, tryptofan je však stabilní i při delším záhřevu. [3, 27, 29]

Enzymová hydrolýza bílkovin je nejšetrnější způsob štěpení peptidových vazeb, protože při ní nedochází k destrukci uvolňovaných aminokyselin. Jednotlivé proteolytické enzymy však štěpí jen určité peptidové vazby (tj. jen vazby mezi určitými aminokyselinami), takže za použití jednoho enzymu nelze bílkovinu úplně hydrolyticky degradovat až na volné aminokyseliny. [29]

4.3 Výskyt a složení proteinů v potravinách

Bílkoviny se dělí podle původu příslušné potraviny na:

- živočišné,
- rostlinné,

- mikrobiální.

Různé druhy potravin se navzájem liší obsahem proteinů. Bohaté na proteiny jsou hlavně potraviny živočišného původu (např. maso, sýry, vejce), z rostlinných produktů zvláště luštěniny (hrách, fazole, čočka) a olejniny (arašídy, mák, ořechy). [3]

4.4 Mléčné proteiny

Z hlediska výživového patří mléko k nejhodnotnějším potravinám, neboť obsahuje téměř všechny látky potřebné pro růst, vývoj a činnost lidského organismu. Zpravidla pod pojmem mléko rozumíme v ČR mléko kravské, které tím, že hlavní složku bílkovin tvoří frakce kaseinová, řadíme k mlékům kaseinovým. V různých oblastech světa se ve výživě obyvatel uplatňují i jiné druhy mlék. Svým chemickým složením se tato mléka liší, jak např. ukazuje tabulka 3, ve které je uveden podíl živin v procentech u vybraných druhů mlék. [1,10, 31]

Tab. 3 Obsah živin ve vybraných druhů mlék [3]

Druh živiny	Mléko		
	Kravské	Kozí	Mateřské
Laktóza (%)	4,8	4,4	7,0
Tuk (%)	4,0	3,3	3,8
Celkové bílkoviny (%)	3,3	3,3	1,0
Kasein (%)	2,7	2,6	0,25
α -laktalbumin (%)	0,1	0,1	0,3
Poměr kasein:sérové bílkoviny	4:01	4:01	0,3:1
Popeloviny (%)	0,7	0,8	0,2
Vápník (mg.100ml ⁻¹)	120	125	31
Draslík (mg. 100ml ⁻¹)	157	202	53
Sodík (mg. 100ml ⁻¹)	48	37	11

Z tabulky je zřejmé, že obsahy živin kolísají u mlék různého druhového zastoupení. Vliv na složení mléka má plemeno, krmivo i způsob krmení, podmínky klimatické, stáří dojníc, doba laktace, dědičné vlastnosti a řada dalších faktorů. V kravském i kozím mléce je obsah živin přibližně stejný. U mateřského mléka je procentuelní obsah laktózy téměř o polovinu vyšší, obsah výše uvedených minerálních látek o třetinu nižší. Obsah hrubých bílkovin v kravském mléce činí 3,2-3,6%, z toho čistých bílkovin 3-3,31% a nebílkovinných dusíkatých látek 25 - 35 mg.100g⁻¹. V mléce se

nachází velmi vhodná směs dvou skupin bílkovin, které umožňují dokonalé využití všech aminokyselin. Mezi bílkovinami mléka převládá kasein v množství 2,5 % w/w. Druhou skupinou bílkovin, nacházejících se v mléce, jsou syrovátkové bílkoviny. [1, 10, 20, 31, 34]

Tepelná úprava se provádí terminací, což je tepelné ošetření mléka, odpovídající účinku při zahřátí na teplotu 57 °C až 68 °C po dobu nejméně 15 sekund. Pasteraci rozumíme tepelné ošetření mléka zahřátím na teplotu nejméně 71,7 °C po dobu nejméně 15 sekund nebo jinou kombinací času a teploty za účelem dosažení rovnocenného účinku. Dalším tepelným ošetřením mléka je vysoká pasterace při teplotě nejméně 85 °C, vysokoteplotní ošetření (UHT) zahřátím na teplotu nejméně 135 °C po dobu nejméně 1 sekundy a sterilace při teplotě nad 100 °C po dobu zajišťující splnění požadavku na mikrobiologickou nezávadnost podle vyhlášky č. 203/2003 Sb. o veterinárních požadavcích na mléko, bez porušení uzávěru (v platném znění). [15]

4.4.1 Kasein

Kasein představuje komplex fosfoproteidů (pro vysoký obsah kyseliny fosforečné, až 0,8%), které jsou syntetizovány mléčnou žlázou a tvoří v mléce přežvýkavců převážnou část bílkovin (76-80%). Kaseinový komplex se skládá z několika bílkovinných druhů molekul, které se liší aminokyselinovým složením, molekulovou hmotností a dalšími chemickými a fyzikálními vlastnostmi. Složení jednotlivých frakcí kaseinového komplexu kravského mléka je uvedena v tabulce 4. Hlavní složkou kaseinové frakce jsou α s-kaseiny. V kravském mléce se vyskytuje α s₁-kasein a α s₂-kasein.

Tab. 4 Složení kaseinu v kravském mléce [1]

Jednotlivé frakce kaseinového komplexu	Obsah v %	Obsah v g.dm ⁻³
α s-kasein	42	13,4
β - kasein	25	8
γ - kasein	4	1,3
κ -kasein	9	2,9

Z tabulky 4 je patrné, že procentuelně největší je obsah α -kaseinu (až 42 %), nejmenší je γ -kaseinu (pouze 4 %), který je produktem degradace β -kaseinů proteolytickými enzymy.

Kasein, stejně jako jiné druhy bílkovin, tvoří dlouhé peptidové řetězce aminokyselin. Prostorová stavba peptidových řetězců se realizuje navzájem přes vodíkové, disulfidové a jiné můstky. Dispergovaná fáze kaseinového komplexu má formu micel. Kaseinové micely se skládají z velkého počtu (400 až 500) menších částic-kaseinových komponent, které jsou vzájemně spojené pomocí vápenatých iontů. Na vápník je v první řadě citlivý α -kasein a β -kasein a naopak necitlivé na vápník jsou různé druhy κ -kaseinu. Komponenty necitlivé na vápník působí jako ochranný koloid na celkový kasein. [20]

Kyselý kasein se vyrábí srážením z odstředěného pasterovaného mléka přidávkem kyselin (chlorovodíkové, sírové, mléčné) nebo po přidávku bakterií mléčného kysání vytvořenou kyselinou mléčnou. Vytvořená sraženina se krájí, vytužuje a pak několikrát propírá teplou a studenou vodou k odstranění rozpustných látek. [31]

Sladký kasein se vyrábí v menší míře než kyselý. Srážení odstředěného mléka se provádí syřidlem a po krájení a vytužování se syřenina opět několikrát pere teplou a studenou vodou. Vytvořená sraženina kyselého nebo sladkého kaseinu je co nejvíce zbavena vody odstředěním nebo lisováním a nakonec sušena, pokud není použita k dalšímu zpracování. [31]

V současné době je častěji vyráběn kaseinát sodný. Výroba je založena na tom, že vysrážený a vypraný kyselý kasein je rozpouštěn v roztoku NaOH za vzniku kaseinátu sodného a tento je sušen v rozprašovacích sušárnách. Tento výrobek je pro vysokou nutriční hodnotu, výbornou schopnost vázat vodu a velmi dobré emulgační schopnosti využíván v masném, mlýnském, pekárenském a mlékárenském průmyslu, případně i v některých dalších odvětvích potravinářského průmyslu. [31]

Po mnoho let se obchodní kasein používal k přípravě nátěrů a povlaků u papíru. Od antiky se používal jako pojídlo barev, zejména v nástěnné malbě baroka a také jako lepidlo. Nověji se stále více uplatňuje kasein jako vysoce kvalitní bílkovina a také drahá surovina ve smíšených potravinách. Mléčné bílkoviny jsou široce využívány

také v pekárenské technologii. Důvodem je především jejich nutriční hodnota a jejich vliv na barvu, vůni a chuť produktu. [20, 25]

4.4.2 Bílkoviny syrovátky

Bílkoviny syrovátky jsou tvořeny asi z 50 % frakcí β -laktoglobulinu, v menším množství jsou v syrovátce zastoupeny albuminy a imunoglobuliny, které mají účinnost protilátek. Jejich procentuelní podíl v kravském mléce je uveden v tabulce 5. Ke změnám složení, struktury a vlastností proteinů mléka, kaseinů a proteinů syrovátky dochází při pasteraci, sterilaci zejména fermentaci, zahušťování, sušení mléka a výrobě sýrů. [3]

Při pasteraci mléka, při teplotě 72 - 74 °C (po dobu 20 - 40 s) např. denaturuje asi 50 až 90 % bílkovin syrovátky a inaktivuje se většina přítomných enzymů. Při teplotách vyšších než 75°C dochází k redukci disulfidových vazeb v molekulách proteinů, eliminaci sulfanu (hlavně z β -laktoglobulinu) a degradací methioninu vznikají sulfidy a bisulfidy, které způsobují tzv. vařivou příchut'. V průběhu sterilaci při 140°C (po dobu 4 s) denaturuje 100% bílkoviny. [1]

Tab. 5 Složení bílkovin syrovátky v kravském mléce [31]

Proteiny	Podíl jednotlivých složek syrovátky kravského mléka v %	Obsah v g.dm^{-3}
Proteiny syrovátky celkem	20	6,4
α -laktalbumin	4	1,3
Sérový albumin	1	0,3
β -laktalbumin	9	2,9
Imunoglobuliny	2	0,6
Polypeptidy (proteosy, peptony)	4	1,3

5 ZMĚNY PROTEINŮ PŘI SKLADOVÁNÍ A ZPRACOVÁNÍ POTRAVIN

5.1 Tepelné zpracování potravin

Změny proteinů při zpracování a skladování potravin, které mají vliv na jejich výživovou hodnotu, mohou být rozdílné v závislosti na druhu potravin a technologických podmínkách. Největší změny proteinového podílu způsobují tepelné zásahy. Při zpracování potravin za vyšších teplot, např. pečením, smažením, grilováním, pražením aj., dochází k rozkladu aminokyselin za vzniku mnoha různých produktů. Některé z nich se uplatňují jako složky aromátu potravin. V tomto ohledu má značný význam rozklad sirtých aminokyselin, cysteinu a methioninu. [1, 10, 14]

Vliv tepelného zpracování může být podle okolností buď příznivý, nebo nepříznivý. U většiny rostlinných proteinů má záhřev příznivý vliv na výživovou hodnotu, zlepšuje stravitelnost a dostupnost sirtých aminokyselin, zvláště u sóji, podzemnice a jiných luštěnin. V chlebu je využitelnost methioninu, tryptofanu a threoninu také lepší než ve výchozí pšenici. Záhřev může mít ovšem také škodlivý vliv, zejména tehdy, jde-li o záhřev nadměrný. Za přítomnosti kyslíku se při záhřevu oxidují některé aminokyseliny; nejvíce se oxidují při záhřevu suchém, kdy má vzduch dobrý přístup k citlivým funkčním skupinám. Nepříznivým důsledkem bývá také jisté snížení výživové hodnoty potravin (snížením obsahu některých esenciálních aminokyselin, snížením stravitelnosti proteinů), někdy vznik nežádoucích vonných a chuťových látek. Největší pozornost je věnována reakcím neenzymového hnědnutí různých typů, Maillardovým reakcím. Jde o reakci redukcujících cukrů s různými aminokyselinami, které dnes patří mezi nejvýznamnější a zároveň nejrozšířenější chemické reakce probíhající během skladování a zpracování potravin. Faktory, které ovlivňují jejich průběh jsou: teplota, doba reakce, pH prostředí, aktivita vody, druh reaktantů a dostupnost reaktantů. Vliv teploty na chemické reakce bývá vyjadřován jako aktivační energie reakce. Čím je aktivační energie vyšší, tím více závisí reakční rychlost na teplotě. Aktivační energie je značně závislá na aktivitě vody i na hodnotě pH prostředí. Jedním z tradičních procesů, ve kterém se výrazně uplatňuje Maillardova reakce je pražení (výroba kaka, pražené kávy, ořechů). Pražení má vliv nejen na barvu, ale především na vůni a chuť zpracovávané suroviny. Vedle pražení existuje řada

dalších procesů, kde je Maillardova reakce žádoucí (např. vaření, pečení, smažení atd.). Maillardova reakce může mít současně negativní důsledky, např. jisté snížení nutriční hodnoty potravin či tvorbu mutagenů, avšak pozitivní aspekty Maillardovy reakce (zejména typická barva, vůně a chuť) značně převažují. Příkladem je vznik chlebové kůrky, vznik aróma vařeného a pečeného masa. [1]

Typickým příkladem tradiční technologie při níž se Maillardova reakce projevuje negativně je sušení, např. sušení mléka, ovoce a zeleniny. V mléce a mléčných výrobcích dochází díky relativně vysoké koncentraci laktosy a přítomnosti termolabilních bílkovin, zejména bílkovin syrovátky, velmi snadno k reakcím neenzymového hnědnutí. Během tepelného zpracování mléka sušením, ale i během nevhodného skladování sušeného mléka destruuji reakce neenzymového hnědnutí téměř výhradně lysin. Tato aminokyselina se tak stává limitující aminokyselinou, ačkoliv byla v původní surovině přítomna v relativně vysoké koncentraci. Ztráty lysinu značně závisí jak na použité technologii zpracování mléka, tak i na dodržování správných technologických postupů. U syrového mléka je z celkového množství lysinu vázáno na laktosu jen nepatrné množství. Při sušení na válcích mohou ztráty lysinu dosáhnout 10-30 %, zatímco při sprejovém sušení se ztráty pohybují do 3 %. [1]

Při těchto reakcích, vznikají různé enzymoresistentní komplexy až nakonec se vytvářejí nevstřebatelné tmavohnědé až černohnědé pigmenty melanoidy. K neenzymového hnědnutí potravin významně přispívají také reakce oxidovaných lipidů s proteiny. [10]

Oxidace aminokyselin působením oxidačních činidel, při níž obecně vzniká karbonylová sloučenina obsahující o jeden atom uhlíku méně než výchozí aminokyselina, dále oxid uhličitý a amoniak, se nazývá Streckerova degradace aminokyselin, někdy také oxidativní dekarboxylace aminokyselin. Streckerova degradace aminokyselin je nesmírně významnou reakcí, ke které dochází při skladování a zejména při termickém zpracování potravin. Hlavní produkty této reakce (tzv. Streckerovy aldehydy) jsou důležitými vonnými látkami řady potravin a četné další vonné a také chuťové látky vznikají následnými reakcemi těchto aldehydů a dalších produktů Streckerovy degradace, zejména α -aminokarbonylových sloučenin, amoniaku, aminu a dalších aminosloučenin a v neposlední řadě také různých sírných sloučenin. [1]

Při teplotách kolem 100°C a vyšších může docházet i k další reakci, při níž dochází ke snižování obsahu aminokyselin, jak volných tak vázaných především v bílkovinách a peptidech. Jedná se o reakci vázaného asparaginu a glutaminu s lisylovým řetězcem za vzniku sloučenin neštěpitelných proteasami člověka. Důsledkem je tedy jisté, ale běžně nepříliš významné, snížení výživové hodnoty proteinu. Snížení nutriční hodnoty může mít význam v případech, v nichž je navíc lysin limitující aminokyselinou. [1]

5.1.1 Změny proteinů při tepelném zpracování masa

K prvním změnám konformace proteinů masa při tepelném zpracování dochází již při teplotách kolem 35°C, kdy sarkoplasmatické proteiny asociují na nestabilní struktury, snižuje se vaznost masa a zvyšuje se jeho tuhost. První viditelné změny nastávají zhruba při 45°C, kdy dochází ke zkrácení svalů při denaturaci myosinu, při 50 - 55°C denaturuje aktomyosin a v rozmezí teplot 55 - 65°C sarkoplasmatické bílkoviny (sarkoplasma, resp. svalová tkáň obsahuje průměrně 1% myoglobinu v sušině a jeho hlavní úlohou je usnadnění transportu kyslíku ve svalech). Vznikají stabilní asociované struktury a pevný gel. Při teplotách 60 - 65°C, kdy koagulace proteinů dosahuje maxima, dochází současně ke změnám konformace (smrštění na třetinu až čtvrtinu původní délky) molekul kolagenu (u rybího masa již asi při 45°C). Při teplotách nad 80°C jsou koagulovány prakticky všechny myofibrilární i sarkoplasmatické proteiny. Při teplotách kolem 90°C kolagen želatinuje a zvyšuje se vaznost masa. Při teplotách kolem 100°C (při vaření masa) dochází také k některým chemickým změnám v molekule proteinů. Významná je zejména tzv. desulfurace a deaminace proteinů, neboť vzniká sulfan a amoniak, které se významně uplatňují při vzniku vonných a chuťových látek masa. Dochází tím k určitým ztrátám cysteinu (cystinu) a lysinu. Při termickém zpracování potravin při teplotách kolem 150°C (např. pečení) probíhají mnohem komplexnější reakce než při teplotě 100°C. Jejich důsledkem je jistá ztráta všech aminokyselin, ale také vznik typických vonných a chuťových látek. Při teplotách kolem 200°C a vyšších (např. smažení, grilování) již dochází ve větším rozsahu k isomerizaci nativních L-aminokyselin a vznikají odpovídající D-aminokyseliny. Z některých aminokyselin vznikají také toxické produkty. Ty se vyskytují ve významném množství např. v připáleném mase. Při zmrazování

masa se rovněž mění výrazně struktura proteinů. Myosin postupně denaturuje a asociuje s aktinem. Tím se zpevňuje struktura masa a klesá vaznost. [1]

5.1.2 Tepelné zpracování a skladování vaječných proteinů

Všeobecně je využitelnost vaječných proteinů vyšší než mléčných. Vejce se nejčastěji konzumují čerstvá nebo chladírensky skladovaná. Zejména pro další zpracování se průmyslově vyrábějí různé vaječné výrobky jako jsou pasterované, mražené nebo sušené bílky, žloutky nebo celé vaječné obsahy. Je velice obtížné stanovit čas, kdy lze vejce ještě považovat za čerstvé a plnohodnotné. Ve snaze přiblížit se Evropské unii, byla v naší legislativě (paragraf 29 odst. 4 vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 326/2001 Sb., která byla změněna novelou č.264/2003 Sb.) stanovena minimální trvanlivost konzumních skořápkových vajec 28 dní ode dne snášky za předpokladu skladování při teplotách v rozmezí 5 až 18°C. Dlouhodobé skladování syrových vajec se projevuje závadami vůně a chuti. Nositeli jsou zejména sirné sloučeniny (sulfan, trioly, sulfidy aj.) vznikající z cysteinu a methioninu a indoly pocházející z tryptofanu. Pasterací se sníží celkové počty mikroorganismů a inaktivují se enzymy. Simeonová uvádí, že kombinace teploty 61°C a doby 4 minut se považuje za dostatečnou k likvidaci 99 % přítomných vegetativních forem mikroorganismů. Z pohledu funkčního uspořádání rozlišujeme pasteraci stacionární a průtokovou. Stacionární pasterace se provádí v míchaných duplikátorových nádobách nebo v obalu zahříváním ve vodní lázni. Pasterační teplota musí být dosažena v celém objemu vaječné hmoty, což trvá poměrně dlouho, obvykle 30 i více minut. Proto se tento způsob pasterace též označuje jako pasterace dlouhodobá. Mnohem větší uplatnění má průtoková pasterace, nazývaná též krátkodobá, obvykle 2,5 až 4 min. [21, 23, 32, 33]

5.1.3 Zpracování potravin rostlinného původu

Během pečení dochází k denuraci proteinů a gluten následně vytvoří typickou trojrozměrnou síťovou strukturu. K hlubokým změnám ve struktuře proteinů dochází také při dalších způsobech termického zpracování cereálií. Při extruzi dochází například k tzv. texturizaci bílkovin, molekuly proteinů ztrácejí převážně globulární strukturu, získávají strukturu vláknitou a denaturují. Dochází k přerušení stávajících ne vazebných interakcí a disulfidových vazeb a vzniku nových vazeb mezi vláknitými

molekulami. Při pečení chleba a dalších cereálních výrobků dochází v poměrně značném rozsahu k Maillardově reakci. [1]

PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem bakalářské práce s názvem **Vliv termosterilace na obsah aminokyselin v potravinách** bylo:

1. Charakterizovat bílkoviny a aminokyseliny v potravinách z hlediska jejich působení v lidském organismu.
2. Popsat vliv působení tepla na bílkoviny a aminokyseliny v potravinách se zaměřením na termosterilaci.
3. V praktické části realizovat modelový pokus se sterilací kaseinu.
4. Provést analýzu aminokyselin.
5. Následně vyhodnotit výsledky a vyvodit závěry zaměřené na posouzení vlivu sterilačního záhřevu na aminokyseliny.

7 METODIKA PRÁCE

7.1 Popis experimentu

V experimentální části práce byla hodnocena série nesterilovaných a sterilovaných kaseinů. Celý experiment byl rozdělen do tří fází. V prvních dvou fázích měření byla využita metodika hodnocení kaseinu podle Hammerstena. V souladu s ní byl kasein ve vodném prostředí sterilován laboratorním zařízením Schoeller teplotou 121 °C po dobu 10 minut. Ve třetí fázi byl použit bovine casein vyráběný a distribuovaný firmou Sigma-Aldrich, který byl pro potřeby experimentu rozmíchán ve vodě. Nejen, že byl v této části zkoumán jiný vzorek kaseinu, ale i sterilační režim byl významně pozměněn. Doba sterilačního záhřevu byla navýšena z původních 10 na 12 minut, přičemž teplota zůstala zachována.

7.2 Stanovení aminokyselin

Vzorek byl navážen do baněk, do kterých bylo poté připipetováno 15 ml destilované vody. Polovina baněk byla sterilována, zbylé baňky sterilovány nebyly. Pro kyselou hydrolyzu bylo přidáno 150 ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 6 mol.l⁻¹. Takto připravené hydrolyzační baňky byly vloženy na 23 hodin do olejové lázně při teplotě 115 °C pod zpětným vzduchovým chladičem, aby se obsah baňky živě vařil. Obsah hydrolyzačních baněk se poté převedl přes filtrační nálevku do odměrných 250 ml baněk a doplní 0,1M kyselinou chlorovodíkovou. Z filtrátu bylo odebráno 25 ml, která se odpařovala na rotační vakuové odparce (RVO 400, Ingos Praha, ČR) do sirupovité konzistence při teplotě maximálně 50 °C. Odparek se pomocí nálevky převedl do 25 ml baňky ředícím tlumivým roztokem o pH 2,2.

Připravená oxidační směs byla složená z 90 ml kyseliny mravenčí a 10 ml peroxidu vodku, která byla ponechána 2 hodiny při laboratorní teplotě a poté 20 minut chlazená v chladícím boxu. 15 ml této směsi bylo přidáno do baněk, které byly připravené již při kyselé hydrolyze. Po opatrném rozmíchání se baňky umístily do chladícího boxu při teplotě 0 až 4 °C na dobu 16 hodin. K oxidovanému vzorku bylo přidáno 2 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové a po vyšumění dalších 150 ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 6 mol.l⁻¹. Takto připravené hydrolyzační baňky byly

vloženy na 23 hodin do olejové lázně při teplotě 110 až 115°C pod zpětným chladičem. Další postup byl stejný jako při kyselé hydrolyze.

Aminokyseliny je možno oddělovat chromatografií založenou na výměně iontů, tzv. iontoměničová chromatografie aminokyselin. Chromatografická kolona je naplněna pryskyřicí s negativním nábojem a aminokyseliny jsou na kolonu zaváděny při nízkém pH. Tím jsou všechny kladně nabity. Za těchto podmínek nenastane chromatografické dělení. Aminokyseliny čekají na počátku kolony na změnu podmínek. Při zvýšení pH, zvýšené teplotě nebo vyšší iontové síle elučního roztoku dojde k dosažení izoelektrického bodu aminokyseliny, tedy pH, při kterém molekuly v roztoku nenesou žádný náboj. Tehdy ztrácí přitažlivost svých iontů k pryskyřici a aminokyselina je eluována z kolony. Podmínky jsou upraveny tak, že izoelektrické body, pro všechny aminokyseliny, se dosahují v různých časech. To umožňuje provést chromatografické dělení.

U pryskyřic (ionexů) používaných pro analýzu aminokyselin, jsou proměnnými parametry rozměry částic, stupeň sulfonace a stupeň zesítnění. Chromatografickou činnost analyzátorů aminokyselin ovlivňují ještě jiné parametry, jako jsou rozměry kolony, rychlost toku eluentu, teplota, přítomnost organických rozpouštědel apod.

Přístroj, na kterém bylo provedeno měření, automatický analyzátor aminokyselin AAA 400, pracuje na principu s ninyhydrinovou detekcí. Ninyhydrin je silné oxidační činidlo, které reaguje s α – aminoskupinami, uvolňuje amoniak, oxid uhličitý, aldehyd a redukovanou formu ninyhydrinu hydrindantin. Uvolněný amoniak pak reaguje s hydrindantinem a další molekulou ninyhydrinu a dává purpurovou substanci (Ruhemanova červeň). Hydrindantin přítomný v detekčním činidle zabraňuje vedlejší reakci, která by redukovala vznikající Ruhemanovu červeň, která má absorpční maximum při 570 nm. Tato absorbance je lineární funkcí množství přítomných α – aminoskupin. Reakce je vhodným základem pro stanovení všech organických sloučenin obsahujících aminoskupiny.

Pro analyzátor byl použit silně kyselý katex s průměrnou velikostí zrna asi 12 μm . Je dodáván zásadně v Na formě v balení po 20 ml. Skladování se provádí ve vlhkém stavu v chladničce, aby se zamezilo případné kontaminaci bakteriemi či plísněmi.

V moderním určení nutriční hodnoty proteinů se vychází ze skutečnosti, že organismus není schopen syntetizovat esenciální aminokyseliny, zatímco skladbu ostatních aminokyselin může regulovat téměř libovolně podle potřeby. Proto se v proteinech stanovuje složení esenciálních aminokyselin přítomných v určeném referenčním proteinu, kde se předpokládá, že zastoupení esenciálních aminokyselin optimální. Ve zkoumaném vzorku se stanoví složení aminokyselin a obsahy jednotlivých aminokyselin se vyjádří v procentech obsahu téže aminokyseliny ve standardním proteinu. Tímto způsobem vypočítané nejnižší procento odpovídá limitující aminokyselině. Tato hodnota CS (chemical score) se tedy vypočte ze vzorce:

$$CS = \frac{A_x}{A_s} \cdot 100$$

kde A_x je obsah aminokyseliny ve zkoumaném proteinu (%)

A_s její obsah ve standardním proteinu (%)

Uvedená hodnota CS bere v úvahu vždy jen jedinou aminokyselinu. Přesnější je hodnota základního aminokyselinového indexu EAAI (Essentials Amino Acid Index), která zahrnuje příspěvek všech esenciálních aminokyselin. Pro každou aminokyselinu se vypočte poměr CS a z těchto hodnot se vypočte geometrický průměr:

$$EAAI = \left(\frac{A_1 \cdot 100}{A_{s1}} \cdot \frac{A_2 \cdot 100}{A_2} \cdot \frac{A_n \cdot 100}{A_{sn}} \right)^{n^{-1}}$$

Jako referenční (standardní) protein byl organizacemi FAO/WHO určen fiktivní protein, který má zcela optimální složení esenciálních aminokyselin. Složení standardního proteinu a vypočtené hodnoty chemického skóre vyjadřuje tabulka 10.

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

8.1 Výsledky stanovení aminokyselin

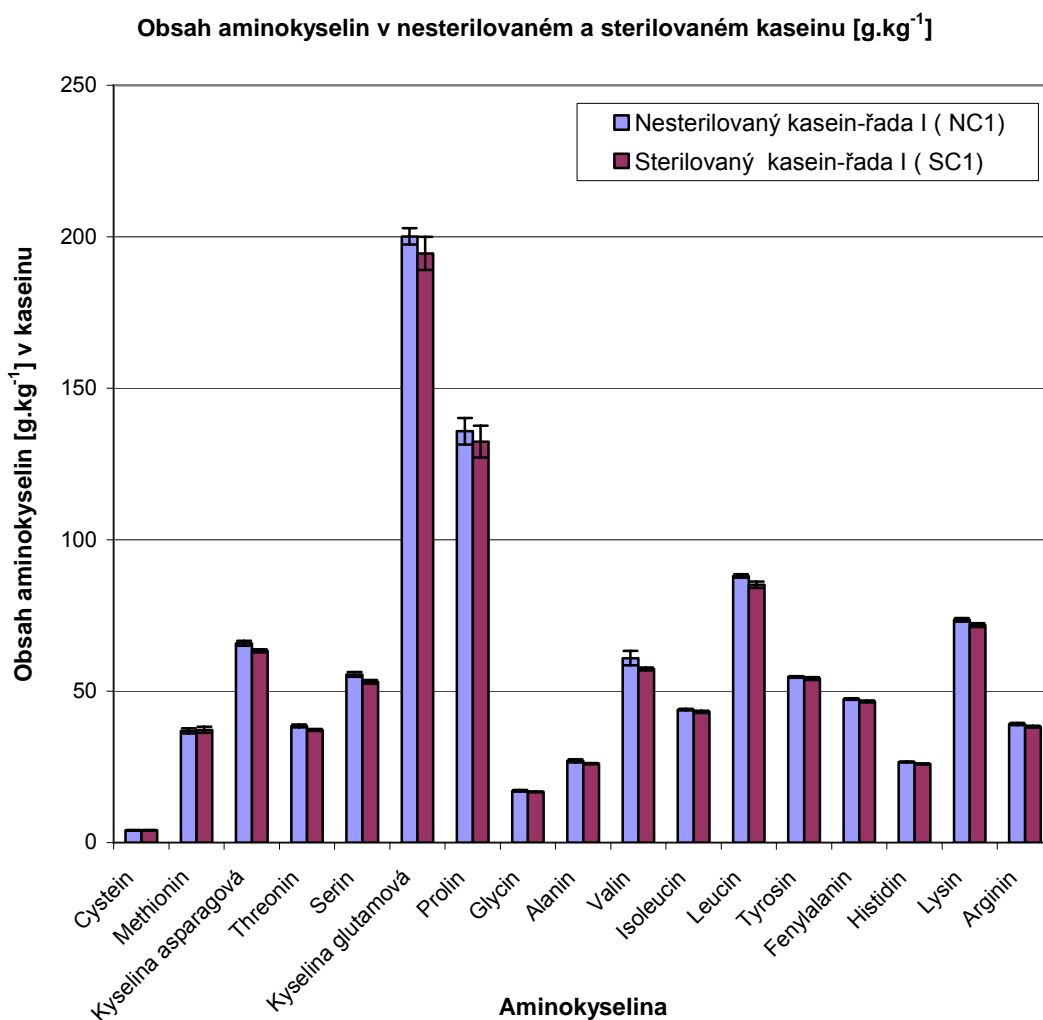
I.fáze experimentu:

V první fázi experimentu byla analyzována série nesterilovaných a sterilovaných kaseinů. Výsledky hodnocení jsou přehledně uvedeny v tabulce 6.

Tab. 6 Obsah aminokyselin v nesterilovaném a sterilovaném kaseinu- řada I [g.kg⁻¹] (n=10, průměr ± S.D.)^a

Aminokyselina (pokus I)	Obsah aminokyselin [g.kg ⁻¹] v kaseinu podle Hammerstena				
	Nesterilovaný kasein-řada I (NC ₁)			Sterilovaný kasein-řada I (SC ₁)	
	Průměr ± SD	CV	Průměr ± SD	CV	
Cystein	4,11 ± 0,09	2,19%	4,10 ± 0,13	3,17%	
Methionin	36,95 ± 0,84	2,27%	37,26 ± 0,99	2,66%	
Kyselina aspa- ragová	65,82 ± 0,86	1,30%	63,28 ± 0,5	0,78%	
Threonin	38,54 ± 0,5	1,29%	37,23 ± 0,32	0,86%	
Serin	55,51 ± 0,78	1,40%	53,06 ± 0,62	1,17%	
Kyselina glu- tamová	200,15 ± 2,72	1,36%	194,53 ± 5,46	2,81%	
Prolin	135,84 ± 4,4	3,24%	132,36 ± 5,25	3,96%	
Glycin	17,12 ± 0,25	1,48%	16,78 ± 0,11	0,63%	
Alanin	26,96 ± 0,52	1,91%	26,1 ± 0,21	0,82%	
Valin	60,91 ± 2,38	3,91%	57,32 ± 0,45	0,78%	
Isoleucin	43,93 ± 0,24	0,55%	43,2 ± 0,35	0,81%	
Leucin	87,99 ± 0,57	0,64%	85,08 ± 1,06	1,24%	
Tyrosin	54,72 ± 0,26	0,47%	54,19 ± 0,5	0,92%	
Fenylalanin	47,39 ± 0,24	0,52%	46,62 ± 0,3	0,64%	
Histidin	26,6 ± 0,16	0,59%	25,97 ± 0,21	0,80%	
Lysin	73,58 ± 0,54	0,73%	71,88 ± 0,63	0,87%	
Arginin	39,17 ± 0,38	0,98%	38,3 ± 0,28	0,72%	

Za statisticky průkazné ($P < 0,05$) byly označeny ztráty kyseliny asparagové, threoninu, serinu, kyseliny glutamové, glycinu, alaninu, valinu, isoleucinu, fenylalaninu, histidinu, lysinu a argininu. Ztráty aminokyselin kaseinovém komplexu, znázorněné v tabulce 9, se pohybovaly přibližně do 5 % w/w jejich původního obsahu v nesterilovaném kaseinu. Největší úbytky byly shledány u valinu (5,89 % w/w), serinu (4,42 % w/w), kyseliny asparagové (3,86 % w/w) a threoninu (3,39 % w/w). Chyby (CV), dosahující maximálně 5 %, je možno považovat v rámci měření za akceptovatelné. V případě prvního experimentu dosahovaly pouze 4 %. Zjištěné obsahy jednotlivých aminokyselin a jejich směrodatné odchylky jsou zobrazeny na obr. 2



Obr. 2 Obsah aminokyselin v nesterilovaném a sterilovaném kaseinu [$\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$]

II. fáze experimentu:

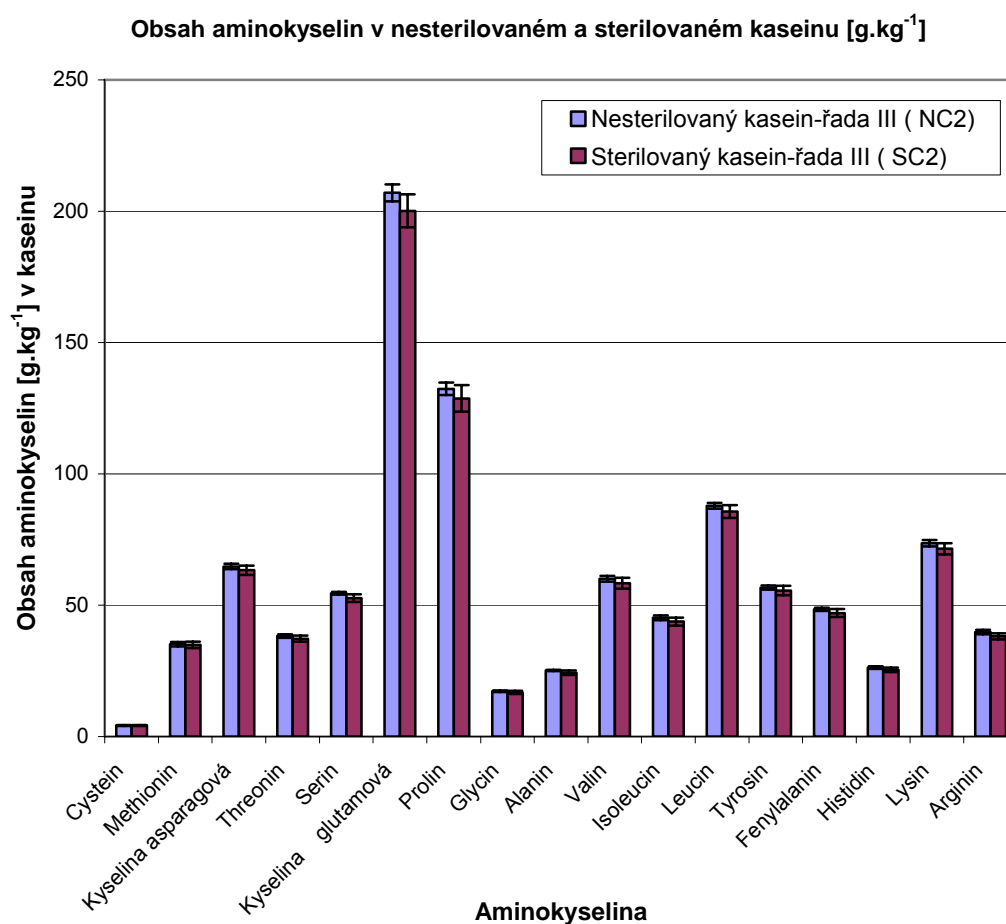
Ve druhé fázi experimentu byla hodnocena série nesterilovaných a sterilovaných kaseinů, jejichž výsledky jsou uvedeny v tabulce 7.

Tab. 7 Obsah aminokyselin v nesterilovaném a sterilovaném kaseinu- řada II [g.kg⁻¹] (n=10, průměr ± S.D.)^a

Aminokyselina (pokus II)	Obsah aminokyselin [g.kg ⁻¹] v kaseinu podle Hammerstena			
	Nesterilovaný kasein-řada II (NC ₂)		Sterilovaný kasein-řada II (SC ₂)	
	Průměr ± SD	CV	Průměr ± SD	CV
Cystein	4,24 ± 0,17	4,01%	4,23 ± 0,21	4,96%
Methionin	35,14 ± 0,84	2,39%	34,91 ± 1,26	3,61%
Kyselina aspa- ragová	64,75 ± 1,03	1,59%	63,33 ± 1,78	2,81%
Threonin	38,29 ± 0,66	1,73%	37,28 ± 1,12	3,01%
Serin	54,55 ± 0,57	1,04%	52,7 ± 1,43	2,71%
Kyselina glutamová	207 ± 3,19	1,54%	200,18 ± 6,3	3,15%
Prolin	132,4 ± 2,39	1,81%	128,77 ± 5,1	3,96%
Glycin	17,22 ± 0,28	1,65%	16,79 ± 0,57	3,39%
Alanin	25,19 ± 0,27	1,06%	24,31 ± 0,82	3,36%
Valin	60,07 ± 1,12	1,86%	58,38 ± 2,08	3,56%
Isoleucin	45,23 ± 0,89	1,96%	43,74 ± 1,49	3,40%
Leucin	87,88 ± 1,11	1,26%	85,64 ± 2,47	2,88%
Tyrosin	56,72 ± 0,79	1,39%	55,61 ± 1,8	3,23%
Fenylalanin	48,41 ± 0,66	1,47%	46,98 ± 1,5	3,20%
Histidin	26,26 ± 0,51	1,92%	25,42 ± 0,89	3,51%
Lysin	73,61 ± 1,2	1,64%	71,49 ± 2,17	3,04%
Arginin	39,79 ± 0,85	2,14%	38,14 ± 1,19	3,12%

Ztráty aminokyselin v kaseinovém komplexu se pohybovaly přibližně do 5 % w/w jejich původního obsahu v nesterilovaném kaseinu. Největší úbytky byly shledány u argininu (4,13 % w/w), alaninu (3,49 % w/w), serinu (3,40 % w/w) a u kyseliny

glutamové (3,30 % w/w), což znázorňuje přehledně tabulka 9. Chyby měření ve druhém experimentu dosahovaly maximálně 5 %, tedy výsledné hodnoty je možno považovat za akceptovatelné. Zjištěné obsahy jednotlivých aminokyselin a jejich směrodatné odchylky jsou zobrazeny na obr. 3.



Obr. 3 Obsah aminokyselin v nesterilovaném a sterilovaném kaseinu [g.kg⁻¹]

III. fáze experimentu

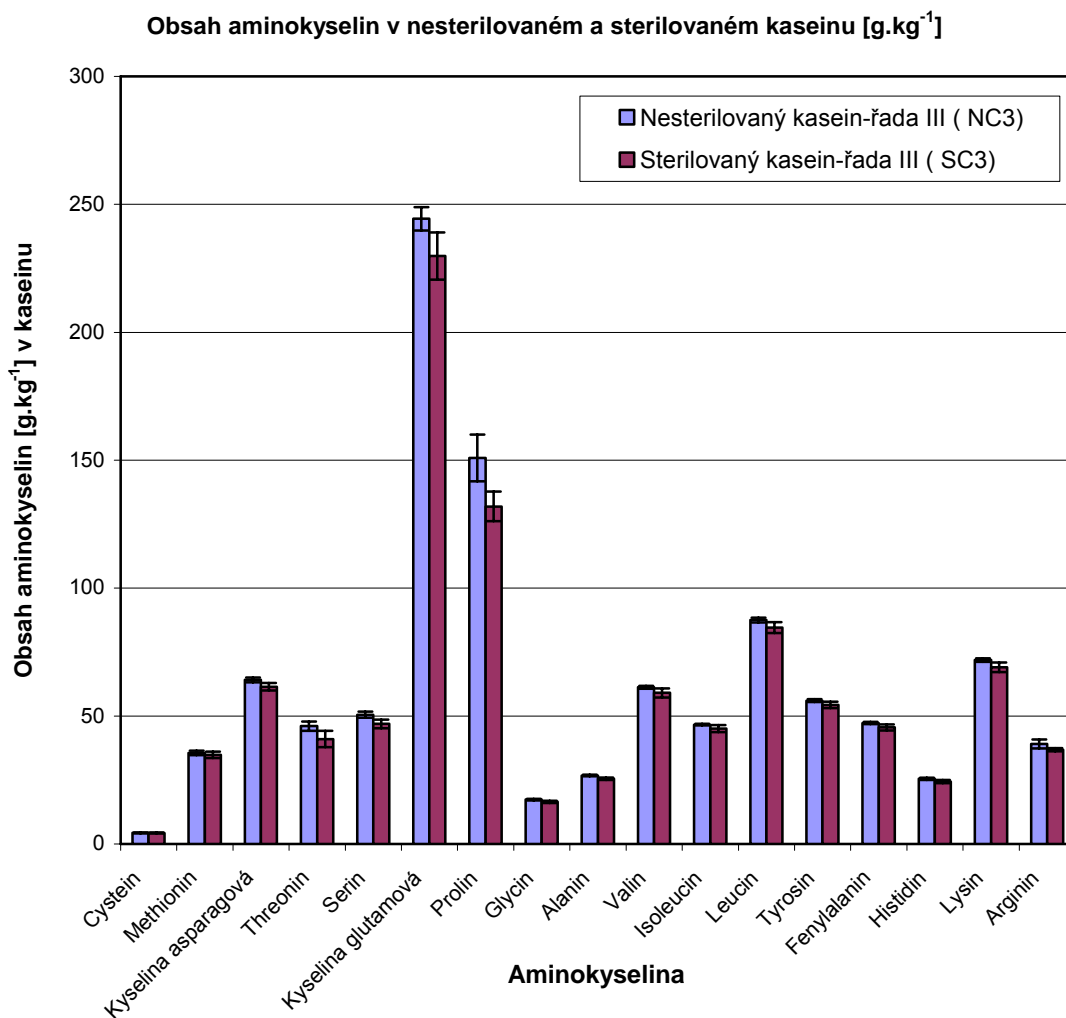
V poslední fázi byla analyzována série nesterilovaných a sterilovaných kaseinů, jejichž výsledky jsou uvedeny v tabulce 8.

Tab. 8 Obsah aminokyselin v nesterilovaném a sterilovaném kaseinu- řada III [g.kg⁻¹] (n=10, průměr ± S.D.)^a

Aminokyselina (pokus III)	Obsah aminokyselin [g.kg ⁻¹] v kaseinu podle Hammerstena				
	Nesterilovaný kasein-řada II (NC ₃)			Sterilovaný kasein-řada II (SC ₃)	
	Průměr ± SD	CV	Průměr ± SD	CV	
Cystein	4,35 ± 0,17	3,91%	4,29 ± 0,21	4,90%	
Methionin	35,58 ± 0,84	2,36%	34,84 ± 1,26	3,62%	
Kyselina aspa- ragová	64,15 ± 0,9	1,41%	61,47 ± 1,52	2,47%	
Threonin	46,03 ± 1,83	3,97%	40,98 ± 3,19	7,79%	
Serin	50,51 ± 1,23	2,43%	46,93 ± 1,69	3,59%	
Kyselina glu- tamová	244,4 ± 4,57	1,87%	229,8 ± 9,25	4,03%	
Prolin	150,9 ± 9,09	6,02%	131,93 ± 5,84	4,43%	
Glycin	17,34 ± 0,32	1,83%	16,43 ± 0,49	3,01%	
Alanin	26,79 ± 0,32	1,21%	25,53 ± 0,51	1,99%	
Valin	61,27 ± 0,52	0,84%	59,02 ± 1,77	2,99%	
Isoleucin	46,64 ± 0,33	0,70%	45,04 ± 1,37	3,04%	
Leucin	87,51 ± 0,94	1,08%	84,54 ± 2,11	2,50%	
Tyrosin	56,01 ± 0,51	0,90%	54,33 ± 1,3	2,40%	
Fenylalanin	47,27 ± 0,44	0,93%	45,54 ± 1,18	2,59%	
Histidin	25,42 ± 0,46	1,81%	24,32 ± 0,65	2,68%	
Lysin	71,91 ± 0,69	0,96%	69,07 ± 1,85	2,67%	
Arginin	39,05 ± 1,73	4,44%	36,85 ± 0,65	1,75%	

Při třetím experimentu byly ztráty aminokyselin v kaseinovém komplexu o něco vyšší než v předchozích dvou tabulkách. Zřejmě je to v důsledku změny sterilačního

režimu, kdy byla pozměněna doba sterilačního záhřevu na 12 minut. Největší úbytky byly shledány u prolinu (12,58 % w/w), což je velice nepravděpodobné. Dále u threoninu (3,49 % w/w), serinu (7,10 % w/w), kyseliny glutamové (5,96 % w/w) a argininu (5,63 % w/w). Ztráty jednotlivých aminokyselin, ke kterým během třetího experimentu došlo, vyjadřuje opět tabulka 9. Zjištěné obsahy aminokyselin a jejich směrodatné odchylky v třetí fázi měření jsou zobrazeny na obr 4.



Obr. 4: Obsah aminokyselin v nesterilovaném a sterilovaném kaseinu [g.kg⁻¹]

Ztráty jednotlivých aminokyselin vzniklé hydrolyzou kaseinu při všech experimentech jsou znázorněny přehledně v tabulce 9.

Tab. 9 Přehled ztrát aminokyselin během experimentů

Aminokyseliny	Diference ^b (SC ₁ - NC ₁)/ NC ₁ [%]	Diference ^b (SC ₂ - NC ₂)/ NC ₂ [%]	Diference ^b (SC ₃ - NC ₃)/ NC ₃ [%]
Cystein	- 0,24	- 0,24	- 1,38
Methionin	+ 0,84	- 0,65	+ 2,08
Kyselina asparagová	- 3,86 *	- 2,20 *	- 4,19 *
Threonin	- 3,39 *	- 2,64 *	- 10,98 *
Serin	- 4,42 *	- 3,40 *	- 7,10 *
Kyselina glutamová	- 2,81 *	- 3,30 *	- 5,96 *
Prolin	- 2,56	- 2,74	- 12,58 *
Glycin	- 1,98 *	- 2,52 *	- 5,21 *
Alanin	- 3,19 *	- 3,49 *	- 4,71 *
Valin	- 5,89 *	- 2,81 *	- 3,66 *
Isoleucin	- 1,65 *	- 3,30 *	- 3,43 *
Leucin	- 3,31 *	- 2,54 *	- 3,39 *
Tyrosin	- 0,95	- 1,95	- 3,01 *
Fenylalanin	- 1,62 *	- 2,94 *	- 3,67 *
Histidin	- 2,38 *	- 3,19 *	- 4,33 *
Lysin	- 2,30 *	- 2,88 *	- 3,94 *
Arginin	- 2,22 *	- 4,13 *	- 5,63 *

kde:

^a hvězdičkou jsou označeny rozdíly, které jsou statisticky významné (P<0,05)

^b pro výpočet procentuelní diference byl jako základ použit obsah aminokyselin v nesterilovaném kaseinu

Abych zjistila procento limitující aminokyseliny, vypočítala jsem pro každou esenciální aminokyselinu chemické skóre CS a z těchto hodnot následně geometrický průměr, aminokyselinový index EAAI dle již výše uvedených vzorců. Jednotlivé výpočty jsou uvedeny v tabulce 10.

$$CS = \frac{A_x}{A_s} \cdot 100 = \frac{36,95}{35} \cdot 100 = 105,57 \% \text{ pro methionin}$$

$$EAAI = \left(\frac{A_1 \cdot 100}{A_{s1}} \cdot \frac{A_2 \cdot 100}{A_2} \cdot \frac{A_n \cdot 100}{A_{sn}} \right)^{n^{-1}} = \sqrt[3]{(105,57 \cdot 96,35 \cdot \dots \cdot 125,70 \cdot 145,52)} = 116,41$$

Tab.10 Vypočtené hodnoty aminokyselinového skóre a indexu esenciálních aminokyselin

Aminokyselina	Protein FAO/WHO (1g/16g N)	CS I [%]		CS II [%]		CS III [%]	
Methionin	3,5	105,57	106,46	100,40	99,74	101,66	99,54
Threonin	4	96,35	93,08	95,73	93,20	115,08	102,45
Valin	5	121,82	114,64	120,17	116,75	122,54	118,04
Isoleucin	4	109,82	108,00	113,08	109,35	116,60	112,60
Leucin	7	125,70	121,54	125,54	122,34	125,01	120,77
Lysin	5,4	145,52	133,11	136,31	132,39	133,17	127,91
EAAI		116,41	112,1	114,34	111,51	118,6	113,11

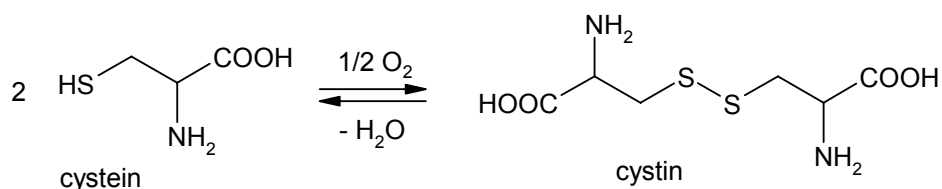
Z tabulky je patrné, že limitující aminokyselinou je threonin, neboť má ze všech esenciálních aminokyselin nejnižší hodnotu kritéria CS. Tato hodnota se pohybuje ve sterilovaném i nesterilovaném kaseinu v průměru kolem 98,65 %.

8.2 Souhrnná diskuse

Obsah cysteinu při všech pokusech, ať už jde o sterilovaný, či nesterilovaný kasein, dosahoval relativně stejných hodnot, v rozmezí od 4,1 do 4,3 g.kg⁻¹. Procentuelní ztráty cysteinu byly u I. i u II. pokusu stejné, při 12 minutové sterilaci nepatrně vyšší. Patrně tyto ztráty byly způsobeny oxidací triolové skupiny –SH na disulfidovou –S–S–, jak ukazuje obrázek 5. Případné ztráty mohly být způsobeny částečnou eliminací sulfanu z vázaného cysteinu, která se nazývá desulfurací proteinů. Jako meziprodukt reakce byl uvažován cystein a reaktivní sulfonovovou kyselinu, jejíž hydrolyzou vzniká kromě sulfanu také reaktivní štěp molekuly proteinu obsahující karbonylovou skupinu. Tato sloučenina reaguje prostřednictvím karbonylové skupiny s ε -aminoskupinou vázaného lysinu, takže důsledkem reakce je nejen jistá ztráta

cystinu, respektive cysteinu, ale také lysinu. Kromě desulfurace zde mohlo docházet rovněž k reakci vázaného asparaginu a glutaminu s vázaným postranním řetězcem lysinu, přičemž se eliminuje amoniak.

Oxidace během hydrolýzy zřejmě proběhla i u druhé sírné aminokyseliny, u methioninu. Ve sterilovaném i nesterilovaném kaseinu byly ztráty methioninu přibližně stejné, kolem 1%, u 12 minutové sterilace jsou ztráty methioninu asi 2 %. Obsah methioninu ve sterilovaném i nesterilovaném kaseinu se pohyboval kolem 35 g.kg^{-1} . Stejně tak je tomu u aminokyseliny s aromatickým řetězcem, tyrosinu, který by mohl být ještě v přítomnosti oxidačních činidel oxidován nebo by mohl přecházet na chloroderiváty. Obsah tyrosinu se při všech pokusech pohyboval kolem 55 g.kg^{-1}

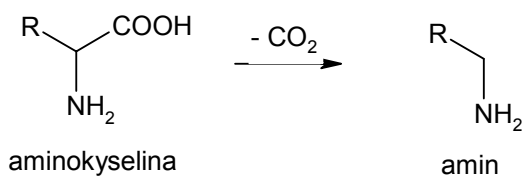


Obr. 5 Oxidace cysteinu

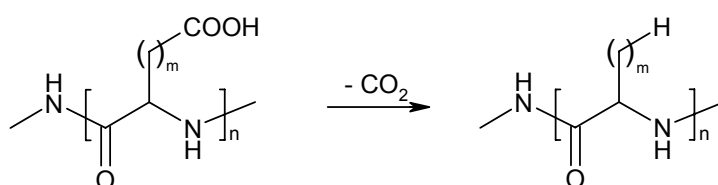
Ztráty byly zjištěny i u aminokyselin s karboxylovou skupinou v postranním řetězci, kyseliny asparagové a glutamové. Během hydrolýzy sírných aminokyselin, asparagin mohl hydrolyzovat na asparagovou kyselinu a glutamin na glutamovou kyselinu za uvolnění amoniaku ve formě amonné soli. Rychlost rozkladu peptidických vazeb se liší podle struktury a druhu jednotlivých aminokyselin. Zahříváním asparagové kyseliny může dojít nejen k eliminaci amoniaku, ale také ke vzniku fumarové kyseliny.

Další reakcí způsobující ztráty aminokyselin, které by mohly při zahřívání na vyšší teploty probíhat, je dekarboxylace na odpovídající aminy. Dekarboxylací, neboli odštěpením oxidu uhličitého, jak ukazuje obrázek 6, došlo zřejmě ke ztrátám zejména u kyselin asparagové a glutamové. Dekarboxylace kyseliny asparagové a glutamové je znázorněna na obrázku 7. Obě tyto aminokyseliny jsou zastoupeny v kaseinu ve větší míře, oproti ostatním aminokyselinám. U kyseliny glutamové se její obsah pohybuje až kolem 200 g.kg^{-1} .

Ztráty serinu, které se pohybovaly v průměru okolo 5%, mohly být způsobeny též jeho dekarboxylací, stejně tak je tomu i u threoninu. Tyto reakce jsou znázorněny na obrázku 8 a 9. Obsah threoninu je vůči serinu nepatrně nižší, nižší jsou i jeho ztráty.



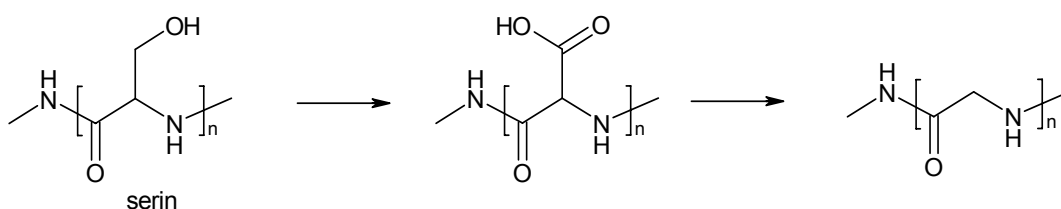
Obr. 6 Dekarboxylace aminokyseliny



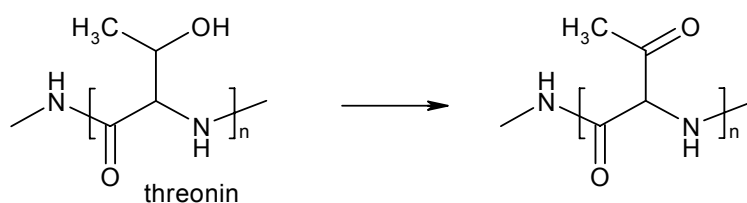
Obr. 7 Dekarboxylace monoamidů

Kde: $m = 1$ - asparagová kyselina,

$m = 2$ - glutamová kyselina.



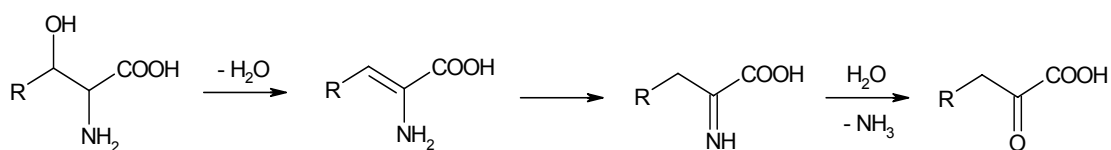
Obr. 8 Oxidace a dekarboxylace serinu



Obr. 9 Oxidace threoninu

Při kyselé hydrolyze mohou vznikat z hydroxyaminokyselin serinu a threoninu β -eliminací vody odpovídající α -ketokyseliny. Ze serinu následně vzniká pyrohroz-

nová kyselina (R=H), z threoninu α -ketomáselná kyselina, jak znázorňuje obrázek 10.



Obr. 10 Přeměna serinu (R=H) na 2-oxokyselinu

Ke snížení nutriční hodnoty mohlo dojít v důsledku Maillardových reakcí. Pokles nutriční hodnoty může být vyvolán faktickými ztrátami aminokyselin nevratnými reakcemi (Streckerova degradace, což je vlastně oxidace aminokyselin působením oxidačních činidel, při níž obecně vzniká karbonylová sloučenina obsahující o jeden atom uhlíku méně než výchozí aminokyselina, dále oxid uhličitý a amoniak. Streckerova degradace aminokyselin se také někdy nazývá oxidační dekarboxylace aminokyselin). Reakce neenzymového hnědnutí postihují ϵ -aminoskupinu lysinu a sirné aminokyseliny. Jejich průběh lze ovlivnit faktory, jako jsou teplota, doba reakce, pH prostředí, aktivita vody, druh reaktantů a dostupnost reaktantů. Ztráty prolinu, které dosahovaly až 12 %, se nezdají být reálné. Důvody pravděpodobně můžeme hledat ve zhoršené separaci a menší odezvy prolinu.

9.ZÁVĚR

K různým biochemickým reakcím, kterých se účastní bílkoviny, peptidy a volné aminokyseliny, dochází v potravinářských surovinách během posklizňového skladování a působením fyzikálních faktorů (teplo, tlak, atd.) a chemických činidel.

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala vlivem termosterilace na obsah aminokyselin v potravinách. Praktická část byla zaměřena na hydrolýzu ve sterilovaném a nesterilovaném kaseinu. Na základě teoretické a praktické části jsem zjistila následující poznatky:

- ztráty jednotlivých aminokyselin byly vyšší v případě delšího sterilačního záhřevu,
- ztráty u glutamové a asparagové kyseliny, které se pohybovaly kolem 3 %, mohly vzniknout následkem toho, že při záhřevu asparagin hydrolyzoval na asparagovou kyselinu a glutamin na glutamovou kyselinu za uvolnění amoniaku ve formě amonné soli,
- u asparagové a glutamové kyseliny mohly být ztráty způsobeny dekarboxylací, neboli odštěpení oxidu uhličitého,
- ztráty serinu, které se pohybovaly kolem 4 %, mohly být způsobeny následkem dekarboxylace,
- dekarboxylace mohla být též příčinou ztrát u threoninu, kde byly ztráty kolem 3 %,
- ke snížení nutriční hodnoty mohlo dojít v důsledku Maillardových reakcí,
- ztráty prolinu můžeme pravděpodobně hledat ve zhoršené separaci a menší odezvy prolinu.

Při průmyslovém a technologickém zpracování potravin dochází nejen ke změnám konformace, ale i ke změnám obsahu aminokyselin. Vzhledem k tomu, že většina potravin se tepelně zpracovává, je vhodné sledovat při záhřevu obsah aminokyselin z hlediska výživy. Toto téma je závažné a z důvodu malého počtu dostupných publikací by bylo přínosné na něj navázat v rámci diplomové práce.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Velíšek, J., *Chemie potravin I.* 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999, 352 s. ISBN 80-902391-3-7.
- [2] Brázdová, Z., *Výživa člověka.* 1.vyd Vyškov: VV3 PV, 1995,74 s.
- [3] Davídek, J., Janíček, g., Pokorný, J., *Chemie potravin.* 1. vyd. Praha: SNT, 1983,632 s. ISBN 04-815-83.
- [4] Červený, *Červený - Vegetariánská kuchařka - vegetariánství v teorii a praxi*, [online], IFA Training Manual & Certification Course, ISBN 1991 [cit. 20. května 2006].
Dostupné na World Wide Web:
<<http://www.aerobics.cz/vyziva.asp?id=2&page=5>>.
- [5] Kolektiv, *Manuál prevence v lékařské praxi II. Výživa.* 1. vyd. Praha: SZÚ, 1995.
- [6] Teplan, V., a kol., *Metabolismus a ledviny*, 1.vyd. Praha: Grada Publishing, 2000.
- [7] Kolektiv, *Poznámky k přednáškám z fyziologie 2.díl*, Praha, 1993.
- [8] Report of the Scientific Committee for Food (Thirty-first series): Nutrient and energy intakes for Evropan [online]. Belgium: COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIENS, 11 December 1992.
- [9] Marounek, M., Březina, P., Šimůnek, J., *Fyziologie a hygiena výživy.* 2. vyd. Vyškov: VVŠ PV, 2003, 68 s. ISBN 80-7231-057-7.
- [10] Janíček, G., Halačka, K., *Základy výživy*, Praha: VŠCHT, 1. vyd. Praha, 1985, ISBN 05-003-85.
- [11] Vodrážka, Zdeněk, *Biochemie I*, Academia Praha, 1992, 184 s. ISBN 80-200-0438-6.
- [12] Šimoníková, J., Klásek, A., *Chemie II.*, 1.vyd. Brno: VUT, 1997, 226 s. ISBN 55-586-77.
- [13] Velíšek, J., *Chemie potravin II.* 1.vyd. Tábor, OSSIS, 1999, 352 s. ISBN 80-902391-4-5.

- [14] Rechcigl, M., *Handbook of Nutritive of Processed Food*, I. Boca Raton, CRC Press, 1982.
- [15] Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 203/2003 Sb., o veterinárních požadavcích na mléko a mléčné výrobky (v platném znění) .
- [16] Mikovcová, L., *Zdravá výživa*, [online], 2002,[cit. 20. května 2006]
Dostupné na World Wide Web:
<<http://lucije.webzdarma.cz/referat.htm>>.
- [17] *Peptidy a bílkoviny*, [online], [cit. 20. května 2006].
Dostupné na World Wide Web:
<<http://www.maturita.cz/referaty/referat.asp?id=4260>>.
- [18] Svršek, J., *Uspořádání bílkovin*, časopis o přírodě, vědě a civilizaci, [online], 1997, [cit. 20. května 2006]. Dostupné na World Wide Web:
<<http://natura.baf.cz/natura/1996/6/9606-6.html>>.
- [19] Dostál, J., Paulová, H., Slanina, J., Táborská, E., *Biochemie pro bakaláře*, 1. vyd. Brno: MU, 2003.
- [20] Březina, P., *Studium výroby kaseinátu sodného a možnosti jeho využití v mlékárenské technologii*, Praha: VŠCHT, 1978.
- [21] Březina, P., Komár, A., Hrabě, J., *Technologie, zbožížnalství a hygiena potravin, II.část*, Vyškov: VVŠ PV, 2001, ISBN 80-7231-879-8.
- [22] Hoza, I., Kramářová, D., *Potravinářská biochemie*, 1. vyd., Zlín, 2005, ISBN 80-7318-295-5.
- [23] *Zdroje proteinů*, [online], [cit. 20. května 2006].
Dostupné na World Wide Web:
<<http://sweb.cz/proteiny.dieta/zdrojeproteinu.htm>>.
- [24] Kодиček, M., *Výkladový slovník biochemických pojmů*, [online], 2004, [cit. 20. května 2006]. Dostupné na World Wide Web:
<http://www.vscht.cz/eds/knihy/uid_es-002/hesla/kasein.html>.

- [25] Alta Czech, s.r.o., *Kasein v mléce*, [online], 2003. [cit. 20. května 2006].
- Dostupné na World Wide Web:
- <http://www.altagenetics.cz/novinky/2003/220403/kasein_vmlece_01.htm>.
- [26] Kolektiv, *CHÉMIA, Průručky základných vedných odborov*. 1. vyd. Bratislava, ALFA, 1967, 500 s. ISBN 63-052-71.
- [27] Vodrážka, Z., Krechl, J., *Bioorganická chemie*. 1. vyd. Praha, SNTL, 1991, 480 s. ISBN 04-602-91.
- [28] Šícho, V., Vodrážka, Z., Králová, B., *Potravinářská biochemie*, 1. vyd. Praha, SNTL, 1981, 360 s. ISBN 04-815-81.
- [29] Douša M., *Stanovení aminokyselin v krmivech*, [online], 2004, [cit. 20. května 2006]. Dostupné na World Wide Web:
- <<http://sweb.cz/HPLC1/Amk/amk.htm>>.
- [30] Gajdůšek, S., *Mlékařství II.*, 1.vyd. Brno:MZLU, 1998, 142 s. ISBN 80-7157-342-6.
- [32] Simonová, J., Míková, K., Kubišová, S., Ingr, I. *Technologie drůbeže, vajec a minoritních živočišných produktů*. 1. vyd. Brno: MZLU, 1999, 247 s. ISBN 80-7151-405-8.
- [33] Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 326/1997 Sb., pro maso, masné výrobky, ryby, ostatní vodní živočichové a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich, změněna novelou č. 264/2003 Sb.
- [34] Turek, B., *Mléko ve výživě*, Státní zdravotní ústav Praha, [online], 2000, [cit. 20. května 2006]. Dostupné na World Wide Web:
- <<http://www.stripky.cz/nemoci/vyziva/mleko.html>>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

g	Gram
kg	Kilogram
%	Procento
°C	Stupeň Celsia
ČR	Česká republika
EU	Evropská Unie
SD	Směrodatná odchylka
CV	Variační koeficient
FAO	Světová organizace pro zemědělství a výživu
WHO	Světová organizace zdravotnická
CS	Chemické skóre
EAAI	Index esenciálních aminokyselin

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Peptidová vazba	16
Obr. 2 Obsah aminokyselin v nesterilovaném a sterilovaném kaseinu [g.kg ⁻¹].....	35
Obr. 3 Obsah aminokyselin v nesterilovaném a sterilovaném kaseinu [g.kg ⁻¹].....	37
Obr. 4 Obsah aminokyselin v nesterilovaném a sterilovaném kaseinu[g.kg ⁻¹].....	39
Obr. 5 Oxidace cysteinu	42
Obr. 6 Dekarboxylace aminokyseliny	43
Obr. 7 Dekarboxylace monoamidů	43
Obr. 8 Dekarboxylace serinu.....	43
Obr. 9 Dekarboxylace threoninu	43
Obr. 10 Eliminace serinu.....	44

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Doporučené dávky proteinů na kg tělesné hmotnosti [2]	11
Tab. 2 Minimální denní potřeba aminokyselin u člověka [3]	11
Tab. 3 Obsah živin ve vybraných druzích mlék [3].....	20
Tab. 4 Složení kaseinu v kravském mléce [1].....	21
Tab. 5 Složení bílkovin syrovátky v kravském mléce [31].....	23
Tab. 6 Obsah aminokyselin v nesterilovaném a sterilovaném kaseinu- řada I [g.kg ⁻¹] (n=10 průměr ± S.D.) ^a	34
Tab. 7 Obsah aminokyselin v nesterilovaném a sterilovaném kaseinu- řada II [g.kg ⁻¹] (n=10 průměr ± S.D.) ^a	36
Tab. 8 Obsah aminokyselin v nesterilovaném a sterilovaném kaseinu- řada III [g.kg ⁻¹] (n=10, průměr ± S.D.) ^a	38
Tab. 9 Přehled ztrát aminokyselin během experimentů	40
Tab.10 Vypočtené hodnoty aminokyselinového skóre a indexu esenciálních aminokyselin.....	41

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P 1: PŘEHLED A CHARAKTERISTIKA ESENCIÁLNÍCH AMINOKYSELIN	53
PŘÍLOHA P 2: PŘEHLED A CHARAKTERISTIKA SEMIESENCIÁLNÍCH AMINOKYSELIN	54
PŘÍLOHA P 3: PŘEHLED A CHARAKTERISTIKA NEESENCIÁLNÍCH AMINOKYSELIN	55
PŘÍLOHA P 4: ALIFATICKÉ AMINOKYSELINY S NESUBSTITUOVANÝM POSTRANNÍM ŘETĚZCEM.....	56
PŘÍLOHA P 5: ALIFATICKÉ HYDROXYAMINOKYSELINY	57
PŘÍLOHA P 6: ALIFATICKÉ SIRNÉ AMINOKYSELINY.....	58
PŘÍLOHA P 7: AMINOKYSELINY S KARBOXYLOVOU SKUPINOU V POSTRANNÍM ŘETĚZCI A JEJICH MONOAMIDY	59
PŘÍLOHA P 8: AMINOKYSELINY S BAZICKÝMI FUNKČNÍMI	60
PŘÍLOHA P 9: AMINOKYSELINY S AROMATICKÝM A HETEROCYKlickÝM POSTARNNÍM ŘETĚZCEM.....	61
PŘÍLOHA P 10: AMINOKYSELINA, U KTERÉ SE FUNKČNÍ SKUPINA ÚČASTNÍ TVORBY CYKLU.....	62
PŘÍLOHA P 11: PŘEHLED A CHARAKTERISTIKA VÝZNAMNÝCH PEPTIDŮ	63
PŘÍLOHA P 12: PŘEHLED A CHARAKTERISTIKA GASTROINTESTINÁLNÍCH PEPTIDŮ	64
PŘÍLOHA P 13: PŘEHLED A CHARAKTERISTIKA NANOPEPTIDŮ	65
PŘÍLOHA P 14: PŘEHLED A CHARAKTERISTIKA PEPTIDOVÝCH ANTIBIOTIK	66
PŘÍLOHA P 15: PŘEHLED A CHARAKTERISTIKA POLYPETIDŮ	67
PŘÍLOHA P 16: PŘEHLED A CHARAKTERISTIKA TOXINŮ.....	68

PŘÍLOHA P 1: PŘEHLED A CHARAKTERISTIKA ESENCIÁLNÍCH AMINOKYSELIN

Název aminokyseliny	Funkce
valin	ovlivňuje absorpci některých nervových přenašečů v mozku
	vyskytuje se v živočišných i rostlinných bílkovinách, v bílkovinách vajec a mléka
	v největším množství jej obsahují strukturní bílkoviny elastiny
	svaly jej mohou využít v pokrytí zvýšené energetické potřeby
Leucin	urychluje hojení pokožky a zlomenin kostí
	vyskytuje se ve všech běžných bílkovinách
	volný leucin vzniká ve větším množství při zrání sýrů činností bakterií
Isoleucin	svaly jej mohou využít v pokrytí zvýšené energetické potřeby
	nejvíce ho obsahují mléčné a vaječné bílkoviny
Threonin	nedostatek způsobuje ukládání tuku v játrech, snížená hladina u vegetariánů
	důležitá složka kolagenu, posiluje imunitní systém
	zdroj: maso a pivovarské kvasnice, vysoký obsah má též pšeničná bílkovina
Methionin	výchozí látka cysteinu, kreatinu a karnitinu
	zvyšuje celkový cholesterol a LDL-cholesterol.
Lysin	nízké hladiny brzdí syntézu bílkovin ve svalech a pojivových tkáních
	působí proti virům, potřebný k tvorbě karnitinu, stimuluje tvorbu kolagenu, chrupavek a pojiv

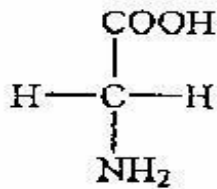
PŘÍLOHA P 2: PŘEHLED A CHARAKTERISTIKA SEMIESENCIÁLNÍCH AMINOKYSELIN

Název amino-kyseliny	Funkce
Arginin	zdroj: arašídý a jiné olejny
	významná složka svalového metabolismu, řídí uvolňování, transport a ukládání dusíku v těle, zpomaluje úbytek svalů po námaze, prospívá při rehabilitaci zranění, tvorbě kolagenu, zvyšuje obranyschopnost
	Stárnutí snižuje sekreci růstového hormonu, což způsobuje přibývání tukové tkáně, ubývání svalové tkáně, zpomalování hojení, snížení elasticity kůže a imunitních reakcí
Histidin	nepostradatelný pro děti
	nedoporučuje se jako doplněk, protože může poškozovat imunitní systém v kombinaci se slunečním zářením

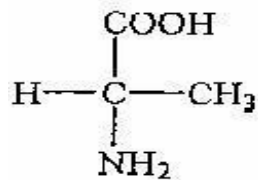
PŘÍLOHA P 3: PŘEHLED A CHARAKTERISTIKA NEESENCIÁLNÍCH AMINOKYSELIN

Název aminokyseliny	Funkce
Glycin	součástí hemoglobinu má uklidňující efekt
	vzniká z něj glukagon, který stimuluje tvorbu glykogenu
	Je obsažen zejména ve strukturních proteinech
Alanin	hlavní součást pojivových tkání, klíčová látka metabolismu glukózy
	umožňuje dodávat svalům energii z aminokyseliny
Serin	důležitý při tvorbě energie, posiluje paměť a nervové funkce
	důležitý při tvorbě imunoglobulinu a protilátek.
Cystein	ze dvou molekul cysteinu tak vzniká bisulfid cystin
	chrání organismus před jedy, účinky alkoholu, tabáku, významný pro růst vlasů, zvyšuje hladinu tripeptidu glutathionu (GSH), zvyšuje imunitu vůči AIDS
	volný cystin je velmi málo rozpustný
Tyrosin	výchozí látka nervového přenašeče dopaminu, hormonu štítné žlázy, růstových hormonů a melaninu (vlasového a kožního pigmentu)
Kyselina glutamová	součást mozkových procesů a metabolismu jiných aminokyselin
Glutamin	nejhojněji se vyskytující aminokyselina
	hraje klíčovou roli v imunitním systému
	důležitý zdroj energie pro ledviny, střeva a játra při dietách
Kyselina asparágová	největší množství z živočišných bílkovin se vyskytuje v globulinech a albuminech

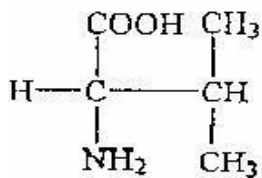
**PŘÍLOHA P 4: ALIFATICKÉ AMINOKYSELINY
S NESUBSTITUOVANÝM POSTRANNÍM ŘETĚZCEM**



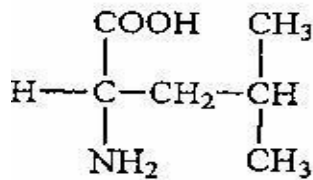
obr.1: glycin



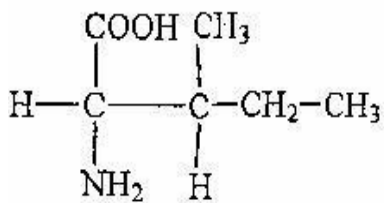
obr.2: alanin



obr.3: valin

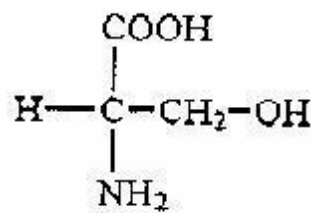


obr.4: leucin

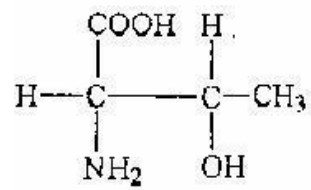


obr.5: isoleucin

PŘÍLOHA P 5: ALIFATICKÉ HYDROXYAMINOKYSELINY

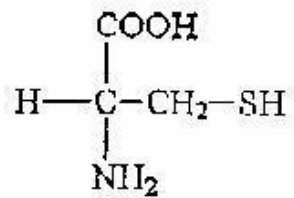


obr.6: serin

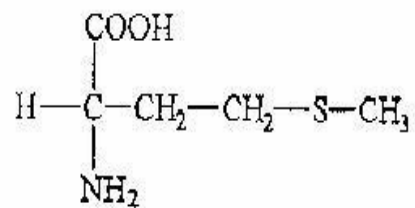


obr. 7: threonin

PŘÍLOHA P 6: ALIFATICKÉ SÍRNÉ AMINOKYSELINY

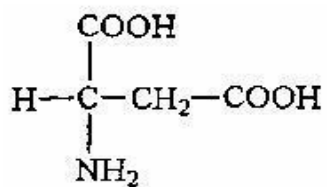


obr.8: cystein

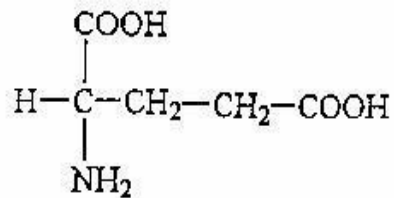


obr. 9: methionin

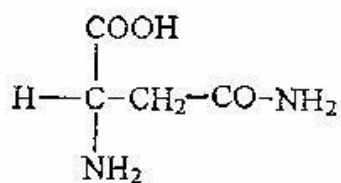
PŘÍLOHA P 7: AMINOKYSELINY S KARBOXYLOVOU SKUPINOU V POSTRANNÍM ŘETĚZCI A JEJICH MONOAMIDY



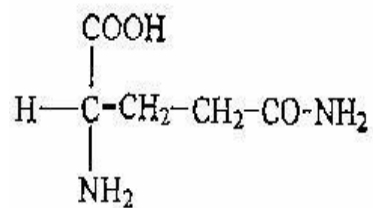
obr. 10: asparágová kyselina



obr. 11: glutámová kyselina

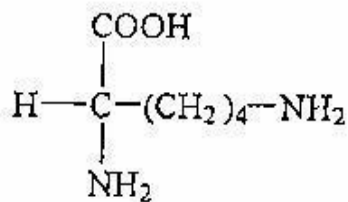


obr. 12: asparagin

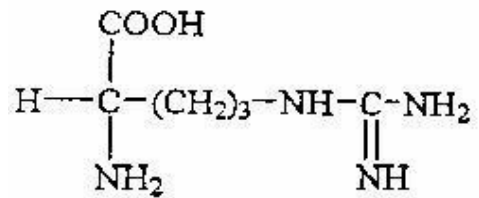


obr. 13: glutamin

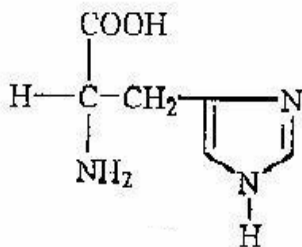
PŘÍLOHA P 8: AMINOKYSELINY S BAZICKÝMI FUNKČNÍMI SKUPINAMI V POSTRANNÍM ŘETĚZCI



obr.14: lysin



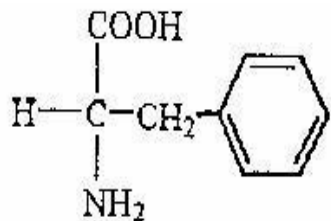
obr. 15: arginin



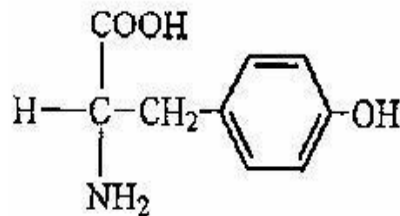
obr. 16: histidin

PŘÍLOHA P 9: AMINOKYSELINY S AROMATICKÝM A HETEROCYKLIKÝM POSTARNNÍM ŘETĚZCEM

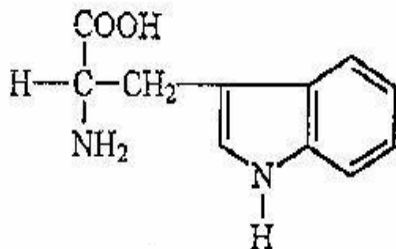
:



obr. 17: fenylalanin

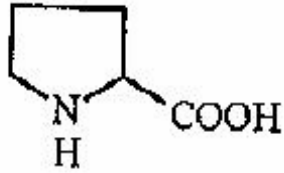


obr. 18: tyroxin



obr. 19: tryptofan

PŘÍLOHA P 10: AMINOKYSELINA, U KTERÉ SE FUNKČNÍ SKUPINA ÚČASTNÍ TVORBY CYKLU



obr. 20: prolin

PŘÍLOHA P 11: PŘEHLED A CHARAKTERISTIKA VÝZNAMNÝCH PEPTIDŮ

Název peptidu	Funkce
glutathion	tripeptid, který je v rostlinných pletivech i živočišných tkáních
	vyskytuje se ve dvou formou, redukované (značí se G-SH) a oxidované (GSSG)
	je v buňkách jedním z nejdůležitějších redukčních prostředků a antioxidantů
thyroliberin	vyvolává sekreci thyzeotropního hormonu adenohypofýzy (histidin, prolin)

PŘÍLOHA P 12: PŘEHLED A CHARAKTERISTIKA GASTROINTESTINÁLNÍCH PEPTIDŮ

Název peptidu	Funkce
gastrin	polypeptid, který vylučuje do krve buňky žaludeční a duodenální stěny je mohutným stimulatorem sekrece HCl žaludeční sliznicí
sekretin	polypeptid, který stimuluje zevní sekreci pankreatu

PŘÍLOHA P 13: PŘEHLED A CHARAKTERISTIKA NANOPEPTIDŮ

Název peptidu	Funkce
vazopresin	antidiuretický hormon, který stimuluje reabsorpci vody v ledvinových tubulech
	regulátor výše krevního tlaku
oxytocin	hormon vyvolávající kontrakci děložní svaloviny při porodu
	stimuluje vylučování mléka z mléčné žlázy
bradykinin	lokální (tkáňový) hormon regulující v omezených oblastech průtok krve cévami
	působí vazodilatačně (stahování a roztahování cév)

PŘÍLOHA P 14: PŘEHLED A CHARAKTERISTIKA PEPTIDOVÝCH ANTIBIOTIK

Název peptidu	Funkce
gramicidin S	cyklický deka-peptid, který obsahuje ve své molekule dva zbytky D-fenylalaninu
aktinomysin D	antibiotikum ze <i>Streptomyces antibioticus</i> (cytostatikum v onkologii)

PŘÍLOHA P 15: PŘEHLED A CHARAKTERISTIKA POLYPETIDŮ

Název peptidu	Funkce
Protaminy	bazické polypeptidy, které obsahují značné množství argininu a lysinu
	některé se pokládají za nízkomolekulové proteiny
	nachází se ve vazbě na nukleonové kyseliny tzv. nukleoprotaminy
Glukagon	způsobuje urychlené odbourávání jaterního glykogenu
Endoteliny	vazoaktivní peptidy regulující průtok krve cévami

PŘÍLOHA P 16: PŘEHLED A CHARAKTERISTIKA TOXINŮ

Název peptidu	Funkce
amanitiny	vysoce toxické bicyklické oligopeptidy, které jsou přítomny v muchomůrce zelené
faloidiny	obsahují jinde se nevyskytující aminokyseliny (např. dihydroxyisoleucin, tryptathionin)