

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Celkové a travitelné bílkoviny v kaseinových a syrovátkových proteinových
koncentrátech
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Michaela Pešková**
Osobní číslo: **C18099**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Celkové a travitelné bílkoviny v kaseinových a syrovátkových proteinových koncentrátech**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

Vypracujte literární rešerši:

1. V první části bakalářské práce popište a definujte bílkoviny vyskytující se v mléce a mléčných výrobcích. Dále popište jejich aminokyselinové složení a problematiku čistých bílkovin jako doplňku stravy. Vymenujte a vysvětlete metody na stanovení bílkovin v potravinách.
2. Vhodnou metodou stanovte celkové a travitelné bílkoviny ve vzorcích kaseinových a syrovátkových proteinových koncentrátů, které se využívají jako doplňky stravy.
3. Získané poznatky kriticky zhodnoťte a porovnejte s literaturou.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Tomáš Hájek, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **5. února 2021**
Termín odevzdání bakalářské práce: **7. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Celkové a travitelné bílkoviny v kaseinových a syrovátkových proteinových koncentrátech jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 S., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 12. 7. 2021

Michaela Pešková

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Tomáši Hájkovi Ph.D. za odborné vedení, za pomoc a rady při zpracování této práce. Dále děkuji mé rodině a blízkým za podporu během studia.

ANOTACE

Teoretická část bakalářské práce přibližuje problematiku bílkovin ve stravě, jejich popis a vysvětlení důležitosti jejich přítomnosti ve stravě. Bílkoviny jsou zde popsány i z hlediska chemického složení a podrobněji jsou charakterizovány bílkoviny v mléce a mléčných výrobcích. Dále tato kapitola obsahuje metody stanovení bílkovin. Praktická část se zabývá stanovením celkových a travitelných bílkovin ve vzorcích kaseinových a syrovátkových proteinových koncentrátech.

KLÍČOVÁ SLOVA

Bílkoviny, aminokyseliny, kasein, syrovátka

TITLE

Total and digestible proteins in casein and whey protein concentrates

ANNOTATION

The theoretical part of the Bachelor thesis approximates the issue of proteins in the diet, their description and explanation of the importance of their presence in the diet. Proteins are also described in terms of chemical composition and proteins in milk and dairy products are described in more detail. Moreover, methods for determination of proteins are listed and explained. The practical part deals with the determination of total and digestible proteins in samples of casein and whey protein concentrates.

KEYWORDS

Proteins, aminoacids, casein, whey

OBSAH

Úvod.....	11
1 Teoretická část	12
1.1 Bílkoviny	12
1.1.1 Aminokyseliny	12
1.1.2 Denní příjem bílkovin	13
1.1.3 Zdroje bílkovin	14
1.1.4 Onemocnění související s příjmem bílkovin	15
1.1.4.1 Fenyلكetonurie	15
1.1.4.2 Leucinóza	16
1.2 Mléko a mléčné výrobky	16
1.2.1 Mléčné bílkoviny	17
1.2.1.1 Kaseinové bílkoviny	17
1.2.1.2 Druhy kaseinových bílkovin.....	19
1.2.1.3 Bílkoviny syrovátky	20
1.3 Proteinové doplňky stravy	23
1.3.1 Surovátkové proteiny	23
1.3.1.1 Surovátkový proteinový koncentrát	25
1.3.1.2 Surovátkový proteinový izolát	26
1.3.1.3 Hydrolyzovaný surovátkový protein	26
1.3.2 Kaseinové proteiny	26
1.4 Stanovení hrubých bílkovin	27
1.4.1 Metoda podle Kjeldahla.....	27
1.4.2 Metoda podle Winklera	28
1.4.3 Metoda podle Conwaye	28
1.4.4 Spektrofotometrické metody.....	29
1.4.4.1 Stanovení amidočerní 10B	29
1.4.4.2 Stanovení Nesslerovým činidlem	29
1.4.4.3 Stanovení biuretovou reakcí	30
1.4.4.4 Stanovení v ultrafialové oblasti spektra	30
1.4.5 Hanušova metoda.....	30
1.4.6 Dumasova metoda.....	30
1.5 Stanovení čistých bílkovin.....	31

1.6	Stanovení travitelných bílkovin	31
1.6.1	Stanovení pepsinem	31
1.6.2	Stanovení trypsinem	32
2	Experimentální část.....	33
2.1	Stanovení hrubých bílkovin ve vzorku	33
2.1.1	Přístroje a zařízení	33
2.1.2	Chemikálie a standardy.....	33
2.1.3	Vzorky	33
2.1.4	Pracovní postup.....	34
2.1.5	Standardizace roztoků.....	35
2.2	Stanovení travitelných bílkovin ve vzorku	36
2.2.1	Přístroje a zařízení	36
2.2.2	Chemikálie	36
2.2.3	Pracovní postup.....	37
3	Výsledky a diskuze	38
3.1	Stanovení hrubých bílkovin	38
3.2	Stanovení travitelných bílkovin	39
4	Závěr	41
5	Seznam použité literatury	42
6	Přílohy.....	45

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 - Obecný vzorec aminokyseliny [2]	12
Obrázek 2 - Obsah bílkovin ve vybraných potravinách [7]	15
Obrázek 3 - Struktura kaseinové micely [14]	18
Obrázek 4 - Struktura a) β -laktoglobulinu a b) α -laktalbuminu [21].....	21
Obrázek 5 - Proteinový prášek [29]	25
Obrázek 6 - Zařízení pro ultrafiltraci [30]	25
Obrázek 7 - Parnas-Wagnerův přístroj [31].....	28
Obrázek 8 - Půdorys a nárys Conwayovy nádobky [31]	29
Tabulka 1 - Rozdělení aminokyselin [2].....	13
Tabulka 2 - Druhy mléka a jejich složení [12]	17
Tabulka 3 - Obsah bílkovin, laktózy a tuku v syrovátkových proteinech [28].....	24
Tabulka 4 - Použité vzorky a jejich výrobci	34
Tabulka 5 - Navážka kyseliny šťavelové, objem a koncentrace NaOH	35
Tabulka 6 - Objemy NaOH na standardizaci H_2SO_4	36
Tabulka 7 - Obsah celkových bílkovin	39

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

BV Biologická hodnota (Biological value)

β -Lg β -laktoglobulin

HWP Hydrolyzovaný syrovátkový protein (Hydrolyzed whey protein)

α -La α -laktalbumin

LF Laktoferin

LP Laktoperoxidáza

WPC Syrovátkový proteinový koncentrát (Whey protein concentrate)

WPI Syrovátkový proteinový izolát (Whey protein isolate)

Úvod

Jídlo je každodenní součástí našeho života, přičemž si ani neuvědomujeme, z jaké potraviny jsme schopni přijmout bílkoviny, sacharidy či tuky. Většina potravin se skládá v různém poměru z těchto tří makroživin a zajišťují energii pro organismus. Otázkou tedy je, jaký je optimální denní příjem bílkovin? Bude záležet na aktivitě a věku daného jedince, či bude pro všechny stejný? Na tyto otázky se budu snažit odpovědět v první části bakalářské práce, která se také blíže zabývá bílkovinami v mléce a mléčných výrobcích.

Cílem práce je zjistit použitelné metody pro stanovení bílkovin v potravinách. Vybrat nejvhodnější metodu pro stanovení bílkovin v doplňcích stravy, přesněji v syrovátkových a kaseinových proteinech. Téma jsem si vybrala na základě mé zkušenosti s nedostatkem bílkovin ve stravě, s čímž mi pomohly právě tyto doplňky stravy. Výsledkem experimentální části bude porovnání naměřených hodnot s hodnotami, které udává výrobce.

1 Teoretická část

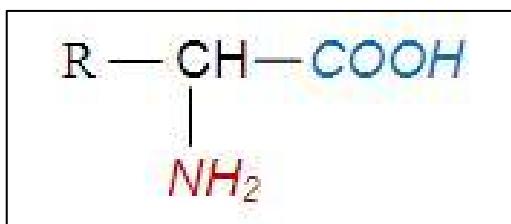
1.1 Bílkoviny

Bílkoviny, jiným názvem proteiny, jsou základem všech živých buněk a jsou jednou ze tří základních živin přijímaných ve stravě, dále to jsou sacharidy a tuky. Důležitou funkcí těchto živin je zdroj energie pro naše tělo. Energetická hodnota bílkovin je 4 kcal/g stejně jako sacharidů. Nejvíce kalorickou živinou jsou tuky s energetickou hodnotou 9 kcal/g. Dalšími složkami v naší stravě musí být minerální látky, vitamíny a voda.

Dostatečný příjem bílkovin je důležitý pro tvorbu a obnovu tkání v našem těle, vyskytují se v hormonech a enzymech a v neposlední řadě by se bez bílkovin neobešel transport látek v našem organismu [1].

1.1.1 Aminokyseliny

Bílkoviny jsou složené z aminokyselin, které jsou spojeny peptidovou vazbou (-CO-NH-). Molekula aminokyseliny musí obsahovat alespoň jednu aminoskupinu (-NH₂) a skupinu karboxylovou (-COOH), obecný vzorec je uveden na Obrázku 1.



Obrázek 1 - Obecný vzorec aminokyseliny [2]

Karboxylová skupina je schopna H⁺ ionty odštěpovat a aminoskupina naopak přijímat. Řetězec, který má méně, než sto aminokyselin se nazývá peptid, v našem těle je to např. hormon inzulin. Ze stravy přijímáme dvacet základních aminokyselin, díky nimž naše tělo správně funguje. Těchto dvacet aminokyselin je rozděleno do čtyř skupin. Esenciální aminokyseliny jsou ty, které si naše tělo neumí vyrobit samo a je tedy nutné je přijmout ve stravě. Mezi tyto aminokyseliny patří valin, leucin, izoleucin, fenylalanin, tryptofan, treonin, metionin a lysin. Dvě aminokyseliny se řadí mezi semiesenciální, což znamená, že jsou esenciálními pouze v období dětství (arginin, histidin). Další skupinou jsou podmíněně postradatelné aminokyseliny, které ke své syntéze nutně potřebují některou z esenciálních aminokyselin. Poslední skupinou jsou aminokyseliny neesenciální, které nemusíme přijímat ve stravě. Přehled skupin spolu se zástupci AMK je uveden v Tabulce 1 [3][4].

Tabulka 1 - Rozdělení aminokyselin [2]

Druh aminokyselin	Aminokyseliny	Poznámka
Esenciální aminokyseliny	Valin Leucin Isoleucin Fenylalanin Tryptofan Treonin Methionin Lysin	
Semiesenciální – relativně postradatelné aminokyseliny	Histidin Arginin	Jsou postradatelné jen v dospělosti, v dětství jsou esenciální
Podmíněně postradatelné	Tyrosin (Fenylalanin) Cystein (Methionin)	Jsou postradatelné pouze při dostatku esenciálních aminokyselin, z nichž se tvoří
Neesenciální	Glycin Alanin Serin Aspartát Glutamát Asparagin Glutamin Prolin	

1.1.2 Denní příjem bílkovin

O kvalitě bílkovin rozhoduje biologická hodnota a dusíková bilance. Biologická hodnota (BV) vyjadřuje, kolik je tělo schopno vstřebat bílkovinného dusíku z dané potraviny. Nejvyšší hodnotu má vaječný bílek, který slouží zároveň jak standard (hodnota 100).

Dalším faktorem je dusíková bilance, která udává rozdíl mezi přijatým a vyloučeným dusíkem. V ideálním případě je dusíková bilance v rovnováze. Dusík naše tělo vylučuje hlavně močí a potem. Rovnováhy dosáhneme, pokud dodáme tělu dostatečný příjem bílkovin. Negativní bilance nastává tehdy, pokud máme bílkovin ve stravě nedostatek. Tělo si s nedostatkem poradí tím, že rozloží bílkoviny ze svalů na aminokyseliny, které mu chybí. Může však nastat i pozitivní bilance, která se většinou vyskytuje u dětí a u kulturistů, kteří mají příjem bílkovin velmi vysoký. Nadbytek bílkovin je vyloučen močí v podobě amoniaku, močoviny a kreatininu. Vysoký příjem bílkovin není obecně doporučován z důvodu možného poškození ledvin [5][6].

O tom, kolik naše tělo potřebuje bílkovin rozhoduje nejen věk, výška, váha, ale i naše sportovní aktivita. Sportovci a kulturisti musí přijímat o dost více bílkovin ve své stravě, aby si vybudovali a zároveň udrželi svalovou hmotu než průměrný člověk, který má pohybu méně. Obecně se doporučuje 0,8 g a u sportovců až 2,2 g na 1 kg tělesné hmotnosti [5].

Výjimkou jsou novorozenci, kteří mají na bílkoviny vyšší nároky a měli by přijmout 2,7 g na kilo své tělesné hmotnosti, ale pomocí mateřského mléka není většinou problém těchto

























hodnot dosáhnout. Množství těchto bílkovin jim zajišťuje správný vývoj a růst jejich organismu. S tím souvisí i příjem bílkovin u těhotných žen, které by jich měly mít o 15 g na den více a ženy kojící dokonce o 20 g. Více bílkovin se musí podávat i lidem po těžké operaci nebo u pacientů, kteří mají zánět v těle (v lékařském prostředí nazýváno sepse) [6].

1.1.3 Zdroje bílkovin

Bílkoviny jako takové mohou být rostlinného nebo živočišného původu. V dnešní době je velice moderní být vegetariánem, který ze svého jídelníčku vyloučí potraviny živočišného původu. Bílkoviny jim však nesmí chybět, proto je musí dostatečně nahradit rostlinnými zdroji. Pro jedince, kteří žádný výživový směr nezastávají a konzumují vše, je nejlepší variantou kombinace potravin rostlinného a živočišného původu.

U potravin rostlinného původu je problém, že obsahují tzv. nekomplexní bílkoviny, což znamená, že jim chybí jedna nebo více esenciálních aminokyselin. Výjimkou je sója, která jako jediná obsahuje všech 8 esenciálních aminokyselin. Naopak mezi výhody patří vysoký obsah vlákniny a cena těchto potravin. Mezi rostlinné zdroje bílkovin se považují obiloviny, ovoce, zelenina, luštěniny nebo ořechy. Příklady potravin rostlinného původu a jejich obsah bílkovin na 100 g dané potraviny je uveden na Obrázku 2 [5].

Živočišné zdroje bílkovin jsou mnohem plnohodnotnější kvůli obsahu komplexních bílkovin, obsahují tedy všechny esenciální aminokyseliny. Pomocí těchto potravin je mnohem snazší vybudovat svalovou hmotu a také svaly zregenerovat. Patří mezi ně hlavně maso, ryby, vejce, mléčné výrobky i syrovátka. Na Obrázku 2 si můžeme prohlédnout, z kterých potravin můžeme získat živočišné bílkoviny [5].

Rostlinné bílkoviny			Živočišné bílkoviny		
obsah ve 100g					
cizrna  7g bílkovin	oves  11g bílkovin	tofu  13g bílkovin	vajíčka  14g bílkovin	mletá kachna  25g bílkovin	kuřecí prsa  25g bílkovin
hnědá rýže  3g bílkovin	quinoa  4g bílkovin	čočka  6g bílkovin	krevety  18g bílkovin	tuňák  25g bílkovin	losos  25g bílkovin
kešu  18g bílkovin	burákové máslo  28g bílkovin	mandle  29g bílkovin	vepřová kotlety  19g bílkovin	hovězí svíčková  19g bílkovin	kachna  27g bílkovin
avokádo  2g bílkovin	brokolice  4g bílkovin	edamame  12g bílkovin	mléko  4g bílkovin	řecký jogurt  9g bílkovin	eidam sýr  26g bílkovin
Některé neobsahují celé aminospektrum			Obsahují celé aminospektrum		

Obrázek 2 - Obsah bílkovin ve vybraných potravinách [7]

1.1.4 Onemocnění související s příjmem bílkovin

1.1.4.1 Fenylyketonurie

U každého novorozence je hned po narození proveden laboratorní screening, jde o odběr kapky krve z paty. Následné laboratorní testy mohou odhalit až 13 nemocí. Fenylyketonurie je metabolická porucha, která souvisí s metabolismem bílkovin. Jedná se o dědičné onemocnění, které lze odhalit až po narození dítěte, avšak při včasném zjištění lze předejít mentální retardaci dítěte a poškození jeho mozku. Nemoc je způsobena chybějícím enzymem fenylyalaninhydroxyláza, který má štěpit fenylyalanin na další aminokyseliny. Dochází tedy k hromadění meziproduktu fenylpyruvátu, který je pro tělo toxický a dochází k již zmíněnému poškození mozku. Pokud se fenylyketonurie potvrdí, je nutná přísná dieta, ve které se nebude aminokyselina fenylyalanin vyskytovat. Bohužel je tato dieta na celý život, ale za cenu normálního a plnohodnotného života [8].

1.1.4.2 Leucinóza

Stejně jako fenylketonurie je leucinóza metabolickou a dědičnou poruchou, označována jako nemoc javorového sirupu. Obě tyto nemoci mají v podstatě stejný princip, tělo není schopné zpracovávat určité aminokyseliny. V tomto případě se jedná o aminokyseliny valin, leucin a izoleucin. Při nedodržování diety by se v těle hromadily meziprodukty, které by způsobily poškození mozku. Tedy stejně jako o fenylketonurie je důležitá celoživotní dieta [8].

1.2 Mléko a mléčné výrobky

Mléko je jednou z nezákladnějších potravin, kterou do své stravy zařazovali lidé už před několika tisíci lety. Jedná se o bílou tekutinu, kterou produkují samice savců za účelem dodání plnohodnotné výživy svým mláďatům. Stejně tak se i my lidé setkáme s mateřským mlékem jako s první potravinou v našem životě. Po zdomácnění mnoha zvířat (krávy, ovce, kozy) slouží jejich mléko i pro výživu lidí. Největší spotřeba je u nás zaznamenána u mléka kravského, avšak jsou mezi námi i tací, kteří dávají přednost mléku kozímu či ovčímu. Z výzkumu z roku 2013 vyplývá, že občan České republiky spotřebuje 234,1 kg mléka za rok, mezi tyto údaje se nepočítají nápoje, které jsou rostlinného původu (ovesný a pohankový nápoj). Dříve se totiž jako mléka chybně označovala. Název mléko tedy můžou mít pouze nápoje živočišného původu (kravské mléko, kozí mléko, ovčí mléko). Tekutina rostlinného původu se jako mléko označovat nesmí, používá se tedy označení nápoj. Tyto rostlinné nápoje konzumují většinou ti, kteří mají alergii na některou složku mléka. Nejčastěji se jedná o laktózu nebo mléčné bílkoviny. Mléko je zdrojem velice důležitých látek, jako jsou např. bílkoviny, tuk, laktóza, vápník a mnoho vitamínů a minerálních látek. Poměr těchto látek se u každého mléka liší, záleží na tom, od jakého zvířete pochází (viz Tabulka 2). Z Tabulky 2 je patrné, že nejvíce všech uvedených živin a vitamínů obsahuje mléko ovčí, nicméně to nemění fakt, že nejoblíbenější a nejpoužívanější je mléko kravské. Mléko je základní surovinou pro výrobu sýrů, jogurtů, tvarohů atd. Jedná se tedy o velice důležitou a nepostradatelnou surovinu ve světovém potravinářském průmyslu [9][10].

Každý z nás, kdo se alespoň trochu zajímá o vyváženou stravu, pravděpodobně zařazuje do své stravy výrobky z mléka, jako jsou např. sýry, jogurty, zakysané mléčné výrobky, tvarohy atd. Tyto potraviny nám mohou být nápomocny při budování svalové hmoty, pomáhají snižovat krevní tlak a v neposlední řadě působí jako prevence proti obezitě a cukrovce [11].

Tabulka 2 - Druhy mléka a jejich složení [12]

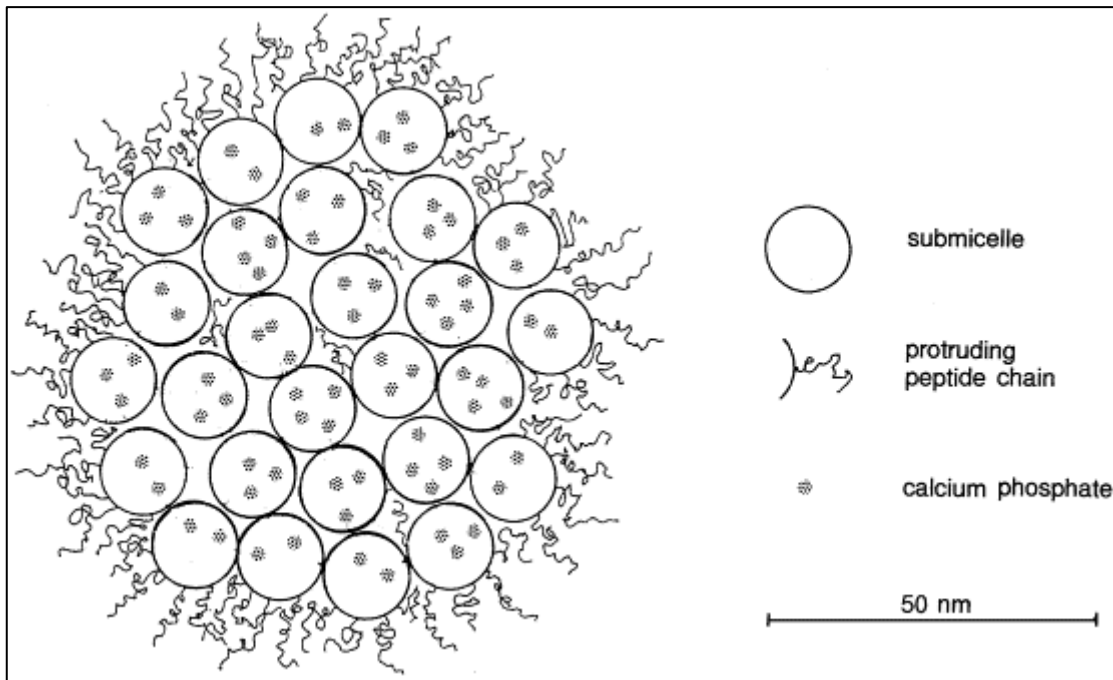
Parametr	Druh mléka		
	Kravske	Kozí	Ovčí
Celková bílkovina (g/100 ml)	3,4 ± 0,1	3,7 ± 0,1	5,5 ± 1,1
Bílkovina syrovátková (g/100 ml)	0,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1	0,8 ± 0,5
Bílkovina kaseinová (g/100 ml)	3,0 ± 0,1	2,4 ± 0,1	4,7 ± 0,5
Sacharidy (g/100 ml)	4,7 ± 0,4	4,1 ± 0,4	4,8 ± 0,4
Tuky (g/100 ml)	3,3 ± 0,2	3,8 ± 0,1	5,9 ± 0,3
Vápník (mg/100 ml)	112 ± 14,5	130 ± 4,0	197,5 ± 2,5
Hořčík (mg/100 ml)	11,0 ± 0,5	14,5 ± 1,5	19,5 ± 3,0
Zinek (mg/100 ml)	0,4 ± 0,0	0,43 ± 0,1	0,6 ± 0,1
Železo (mg/100 ml)	0,1 ± 0,1	0,06 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Vitamin D (µg/100 ml)	0,2 ± 0,1	0,15 ± 0,1	0,2 ± 0,0

1.2.1 Mléčné bílkoviny

Jak je uvedeno v Tabulce 2, mezi bílkoviny se řadí kasein a syrovátka, často společně nazývány jako mléčné bílkoviny. Tyto bílkoviny se řadí mezi plnohodnotné. Jak je uvedeno v kapitole 1.1.3, plnohodnotné bílkoviny obsahují všechny esenciální aminokyseliny. V tabulce si můžeme všimnout, že nejvyšší obsah bílkovin má mléko ovčí, avšak průměrný obsah ve všech druzích mlék se udává 3,2 % [10].

1.2.1.1 Kaseinové bílkoviny

Kasein je hlavní bílkovina v mléce, procentuálně je to přibližně 78 % z výše uvedených 3,2 % celkového množství bílkovin v mléce. Obecně jsou mléčné bílkoviny schopny snížit riziko kazivosti zubů a kasein dokáže obnovovat minerální látky v zubní sklovině. Z chemického hlediska patří kasein do skupiny fosfoproteinů. Jedná se o bílkovinu, která v mléce vytváří útvary zvané micely a vysráží při pH 4,6. Pro představu se v jedné micelle nachází až pět tisíc molekul kaseinu a její průměrná velikost je 120 nm (viz Obrázek 3). Tato frakce je tvořena čtyřmi druhy kaseinů, přesněji α_1 -, α_2 -, β -, κ -kaseinem [13].



Obrázek 3 - Struktura kaseinové micely [14]

Při poruše stability těchto micel, například snížením pH, dochází k jejich srážení, díky němuž následně vznikají mléčné výrobky. Srážení kaseinu může probíhat dvěma způsoby. Kyselé srážení je způsobeno kyselinou mléčnou, kterou produkují bakterie mléčného kvašení, mimo jiné lze použít kyselinu octovou, citronovou i chlorovodíkovou. Tento postup se nejčastěji uplatňuje při výrobě tvarohů a sýrů, jako je například sýr typu cottage. Jev je založen na uvolnění fosforečnanu vápenatého z micel a postupnému vzniku kyselého sraženého mléka, které svou strukturou připomíná gel [15].

Gel zachovává svoji strukturu a tvar pomocí vodíkových můstků a Van der Walsových sil. Srážení musí probíhat při teplotě vyšší než 6 °C, nejvhodnější je teplota okolo 20 °C [16].

Druhým způsobem je tzv. sladké srážení, které je založeno na působení syřidla. Syřidlo chymosin je enzym, který najdeme v telecích žaludcích, ale z důvodu jeho nedostatku je nahrazován jinými enzymy (proteázami) [16]. Sladké srážení je používáno při výrobě většiny sýrů. Během procesu se přidává chlorid vápenatý, díky němuž obsahují sýry více vápníku, který je v naší stravě nepostradatelný pro správný vývoj kostí [13].

1.2.1.2 Druhy kaseinových bílkovin

α 1-kasein

Tento druh kaseinu zastupuje procentuálně největší podíl (cca 40 %) v mléce z celkového obsahu kaseinu. Mimo jiné existuje i další dělení, a to podle toho, kolik fosfátových skupin kasein obsahuje ve své struktuře. Přesněji se u tohoto druhu objevují skupiny s 8, 9 a 10 fosfátovými skupinami označovanými jako α 1-CN-8P, α 1-CN-9P, α 1-CN-10P. Je to velmi cenná složka z hlediska obsahu aminokyselin. V α 1-kaseinu se vyskytuje 199 aminokyselin [16]. Jeho molekulová hmotnost je přibližně 24 000, obsahuje dvě hydrofobní části a jednu část polární [17].

α 2-kasein

V mléce je obsah kaseinu, jak už víme z kapitoly 1.2.1.1 přibližně 78 %, v tomto podílu se frakce s názvem α 2-kasein vyskytuje asi z 10 %. Stejně jako u α 1-kaseinu také můžeme rozdělit α 2-kasein na několik skupin podle navázaných fosfátových skupin, přesněji s 10–13 fosfátovými skupinami (α 2-CN-10P až 13P). Jeho aminokyselinové složení je o něco bohatší (207 aminokyselin) a molekulová hmotnost též vyšší (25 230) než u α 1-kaseinu [16].

β -kasein

Třetí druh je zastoupen v celkovém obsahu kaseinu z 35 % [16]. Podobně jako předchozí typ kaseinu se skládá z podobného počtu aminokyselin, přesněji z 209. Molekulová hmotnost je přibližně 24 000. Při teplotě méně jak 1 °C tvoří tento kasein s Ca^{2+} ionty rozpustnou sůl a při vyšší teplotě sůl nerozpustnou [18].

κ -kasein

Poslední a zároveň druhý nejméně zastoupený typ kaseinu je κ -kasein, tvoří pouze 12 % z celkového obsahu kaseinu. Bez κ -kaseinu by nebyl možný vznik micel a ani proces sýření mléka. Je složen ze 169 aminokyselin a tvoří ho dvě frakce (κ -CN-A, κ -CN-B-1P) [16].

V jiném zdroji jsou tyto dvě frakce označovány jako varianta A a varianta B. Narozdíl od všech typů kaseinů se v κ -kaseinu vyskytují sacharidy, které jsou na bílkovinu vázány glykosidovou vazbou [18].

1.2.1.3 Bílkoviny syrovátky

Druhou velkou skupinou mléčných bílkovin jsou bílkoviny syrovátky. Jiné často používané označení jsou tzv. sérové proteiny. Z celkového obsahu bílkovin v mléce tvoří sérové proteiny přibližně 20 % [18]. Na rozdíl od kaseinů jsou syrovátkové bílkoviny termolabilní, což znamená, že při zvýšení teploty nad 60–70 °C dochází k jejich denaturaci (změna struktury vlivem teploty). Další jejich vlastností je schopnost spojování se s κ -kaseinem, což má za následek zvětšení kaseinových micel. Negativně ovlivňují sladké srážení, protože tyto bílkoviny zpomalí přístup syřidla ke kaseinu a tím se celý proces prodlouží. Mezi bílkoviny syrovátky řadíme α -laktalbumin a β -laktoglobulin (viz Obrázek 4), dalšími zástupci jsou imunoglobuliny, sérový albumin, proteózo-peptonová frakce, laktoferin a další [15].

β -laktoglobulin

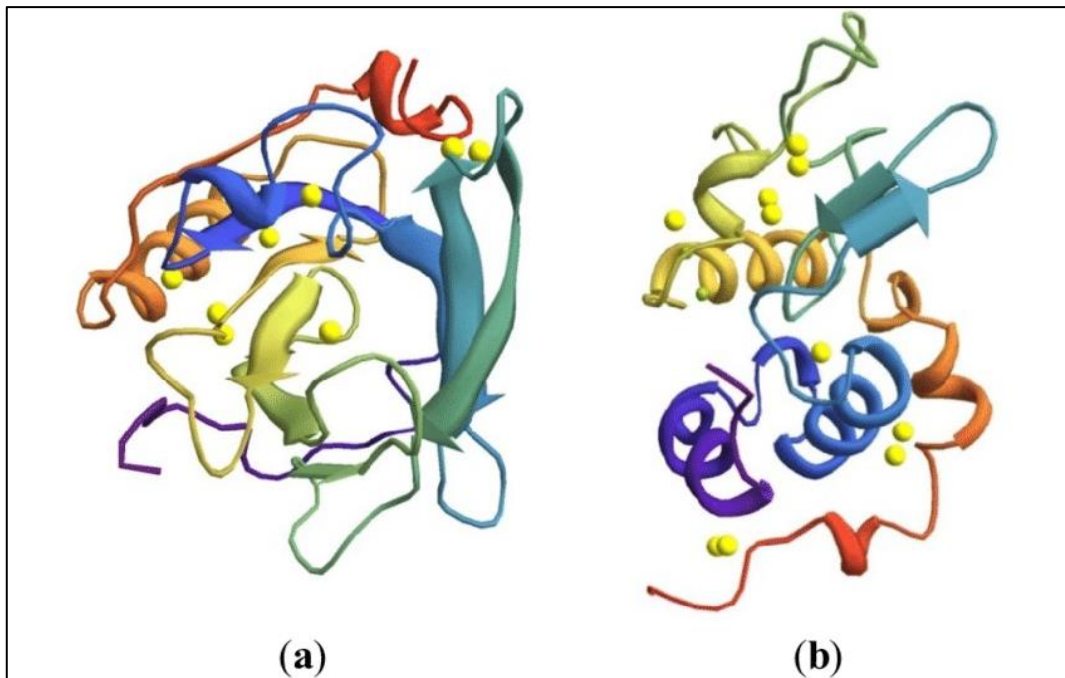
β -laktoglobulin (β -Lg) je hlavní bílkovinou syrovátky a syrovátku tvoří z cca 50 %. Jeho chemickou specifikací je molekulová hmotnost 18 277 a je složen ze 162 aminokyselin [16].

Tento druh syrovátkové bílkoviny se vyskytuje ve třech genetických variantách. Pokud se β -Lg vystaví podmínkám jako je vysoká teplota, pH větší než 8,6 a vyšší koncentrace vápenatých iontů, pak denaturuje. Ve své struktuře obsahuje jednu thiolovou skupinu, díky níž se může spojit s ostatními bílkovinami (např. κ -kasein či α -laktalbumin) [18].

β -Lg najdeme nejen v mléce krav a ovcí, ale i u zvířat jako je pes, prase, kočka nebo kůň. U přežvýkavců, tedy u krav a ovcí se tato bílkovina vyskytuje jako dimer, u ostatních druhů jako monomer. Zajímavostí je, že β -Lg nenajdeme v lidském mléce [19].

α -laktalbumin

α -laktalbumin (α -La) je složen ze 123 aminokyselin, především esenciálních a jeho molekulová hmotnost je 14 070. Jedná se o druhý nejdůležitější protein v syrovátce a jeho procentuální zastoupení je 20–25 %. Patří do skupiny globulárních proteinů, který najdeme v mléce skotu, a dokonce i v lidském mléce. Mezi jeho chemické vlastnosti patří vysoká rozpustnost ve vodě a tepelná stabilita při vázání se na vápník. Bez α -laktalbuminu by se neobešla syntéza a štěpení laktózy v našem těle a jako čistý je často používán k výrobě výživy pro kojence, protože je svojí strukturou velmi podobný mateřskému mléku. Dnešní technologie už jsou natolik vyspělé, že pokud kojení nejde přirozeně, tak novorozenci kojenecká výživa nahradí to, co by získal z mateřského mléka [20].



Obrázek 4 - Struktura a) β -laktoglobulinu a b) α -laktalbuminu [21]

Imunoglobuliny

Imunoglobuliny hrají velice důležitou roli v našem imunitním systému, fungují totiž jako protilátky. Rozdělují se do pěti skupin a to IgA, IgD, IgE, IgG a IgM. Lidské tělo obsahuje imunoglobuliny v krvi, avšak dalším zdrojem je i mléko. V našem těle hrají nezastupitelnou roli.

- IgA – dělí se na dvě podskupiny a nachází se především ve střevech, molekulová hmotnost 360–720 000
- IgD – zastoupení v krvi je ve velmi nízkých koncentracích, molekulová hmotnost je 172 000
- IgE – molekulová hmotnost je 196 000, v krvi se vyskytuje pouze v nízké koncentraci
- IgG – z celkových protilátek tvoří cca 75 %, tedy největší podíl ze všech skupin, molekulová hmotnost je 150 000
- IgM – molekulová hmotnost největší ze všech a to 935 000, při kontaktu s cizím tělesem se jako první imunoglobulin vytvoří právě IgM [22]

Sérový albumin

Hovězí sérový albumin (BSA), který řadíme mezi jednu z bílkovin syrovátky, je shodný s krevním sérovým albuminem, tedy tím, který se nachází v lidské krvi. Jeho důležitou funkcí je schopnost vázat volné mastné kyseliny a umožnit jejich transport v krvi. Bez sérového

albuminu by se neobešla tvorba glutathionu, což je peptid, který vzniká v játrech. Glutathion a jeho dostatek je důležitý pro naši imunitu, a především je jeho správná hladina nepostradatelná pro lidi, kteří jsou HIV pozitivní [23].

Proteózo-peptonová frakce

Struktura proteózo-peptonové frakce je složena z polypeptidů β -kaseinu. Tato frakce je další nedílnou součástí syrovátky, v níž se vyskytuje v rozmezí 1–3 g/l mléka. Obsah této frakce závisí jak na původu mléka, tak i na jeho délce skladování [23].

Laktoferin a laktoperoxidáza

Laktoferin (LF) a laktoperoxidáza (LP) jsou bílkoviny mléka, které se v něm nachází v mnohem menším množství než ostatní bílkoviny syrovátky. LF plní v mléčné žláze antibakteriální funkci a mimo jiné je schopen vázat železo. LP má podobné účinky, avšak nejen v mléčné žláze, ale i v trávicí soustavě působí proti bakteriím. Podle studií bylo zjištěno, že oba druhy bílkovin mají příznivé účinky na nižší výskyt průjmů [23].

Dostatek LF v těle je velice důležitý nejen kvůli jeho antibakteriálním a antiparazitním vlastnostem, ale podporuje i růst kostí. Dále je nápomocen při léčbě žloutenky typu C, při Alzheimerově chorobě nebo působí pozitivně proti nádorovým onemocněním. Laktoferin mimo jiné nenajdeme pouze v mléce savců, ale i ve slinách, slzách nebo bílých krvinkách. Najdeme ho tedy i v lidském těle, jelikož hovězí a lidský laktoferin je totožný. Hovězí laktoferin najde v průmyslu spoustu využití. Používá se k výrobě výživy pro kojence, mléčných produktů, kosmetických přípravků, do žvýkaček nebo do krmiv pro zvířata. Laktoferin se dále používá v potravinářském průmyslu a spolu s dalšími látkami zajišťuje delší trvanlivost. Díky jeho antibakteriálním vlastnostem působí např. proti bakterii *Listeria monocytogenes* nebo *E. coli*. Závěrem bychom mohli říct, že je tato bílkovina velice prospěšná našemu celkovému zdraví, a proto bychom neměli opomenout její přísun ve stravě. V současné době jako vitamíny a minerály, tak i laktoferin můžeme přijímat jako doplněk stravy ve formě kapslí [24].

1.3 Proteinové doplňky stravy

Jak je již v bakalářské práci uvedeno, bílkoviny patří mezi jednu ze tří nepostradatelných makroživin přijímaných ve stravě. Jejich denní příjem je ovlivněn spousty faktory, mezi něž zařazujeme výšku, váhu, věk i aktivitu během dne daného člověka. Obecně je doporučováno přijímat ve své stravě 15–20 % energie právě z bílkovin. Výhodou této makroživiny je tzv. vysoký termický efekt, který se procentuálně pohybuje v rozmezí 20–30 %. Termický efekt lze vysvětlit jako energii, kterou musí naše tělo vynaložit na to, aby tuto živinu zpracovalo a rozložilo, v případě bílkovin jde o rozklad na jednotlivé aminokyseliny. Je velice výhodné mít ve své stravě dostatek bílkovin kvůli delší sytosti a termickému efektu. Pro představu se termický efekt u sacharidů pohybuje kolem 5–10 % a u tuků pouze 0–3 %. Bílkoviny bychom tedy v naší stravě neměli opomenout, avšak jak pro sportovce, tak i obyčejného člověka může být obtížné přijmout tolik bílkovin, kolik by měl jeho denní příjem obsahovat. Žijeme v 21. století a asi by nás překvapilo, kdyby v dnešní době neexistovalo něco, co nám jednoduše bílkoviny ve stravě doplní. Pro lidské tělo však nejsou proteinové doplňky v doporučeném denním množství škodlivé, a proto není nic špatného na tom si těmito doplňky pomoci v příjmu bílkovin. Pravděpodobně tyto doplňky více užívají sportovci, kulturisti a ti, co chtějí nabrat svalovou hmotu, ale i člověk, který je mnohem méně sportovně aktivní si je může dovolit [25]. Mezi tyto doplňky řadíme proteiny získané z mléka, tedy syrovátku a kasein, které zajistí přísun aminokyselin do svalů. Na trhu existují i přípravky pro vegany nebo osoby s nějakým druhem potravinové intolerance, například sójový protein nebo syrovátkový izolát [26].

1.3.1 Syrovátkové proteiny

Syrovátka, která zůstane například při výrobě sýru, byla dříve považována za odpad a vylévána do řek, avšak po změně zákonů o odpadech byli nuceni výrobci přijít na efektivnější využití syrovátky. Pro představu, na 1 kg sýru je potřeba přibližně 10 litrů mléka, z čehož je až 9 kg odpadu, tedy syrovátky. Syrovátka jako taková prošla mnoha vědeckými výzkumy od dob, kdy byla objevena, což bylo zhruba před 8 000 lety. Mezi šířitele těchto doplňků patří Bob Hoffman, který byl ve své době velice známým ve světě kulturistiky. Vyrobený proteinový doplněk pojmenoval Hi-Proteen a v té době byly dostupné pouze 4 příchutě, avšak negativními vlastnostmi tohoto proteinu byly jeho špatné trávení a chuť. V šedesátých letech se snažil Irvin Johnson protein vylepšit. Jeho výrobek pojmenovaný Blairův proteinový prášek obsahoval i bílkoviny ze sušených vajec, což v té době bylo novinkou. Tento výrobek byl velice populární až do 80. let 20. století. Až roku 1970 došlo

k objevení membránové filtrace. V tomto technologickém kroku se používají polopropustné membrány vyrobené z keramiky, oxidu zirkoničitého nebo z polysulfonu. Membrány jsou v podstatě síta, které jsou velikostně vyrobeny tak, aby skrz prošla pouze syrovátka a ostatní nežádoucí látky nebyly propuštěny. Filtračních metod existuje mnoho a pro výrobu proteinových prášků se jich používá celkem pět. Metoda se vybírá v závislosti na tom, jaký procentuální obsah bílkovin má výsledný protein obsahovat. Mezi tyto metody patří ultrafiltrace, mikrofiltrace, elektrodialýza, nanofiltrace a reverzní osmóza. Závěrečný technologický krok je u všech metod shodný, jedná se o sušení na požadovanou vlhkost méně jak 5 % [27].

Syrovátkové proteiny jsou často označovány za rychlé proteiny, z důvodu rychlého vstřebání v našem těle, a proto je doporučováno tento druh bílkovin doplňovat po tréninku [26]. Syrovátkové proteiny rozdělujeme na několik druhů podle koncentrace bílkovin (viz Tabulka 3). Mimo jiné všechny mají vysoký obsah aminokyselin s rozvětveným řetězcem, mezi které zařazujeme leucin, izoleucin a valin, často označovány pod zkratkou BCAA [28]. Proteiny jako doplňky stravy mají formu prášků, které se nejčastěji míchají s vodou, mlékem (Obrázek 5) nebo se přidávají do různých pokrmů.

Tabulka 3 - Obsah bílkovin, laktózy a tuku v syrovátkových proteinech [28]

Součást syrovátky	Syrovátkový proteinový koncentrát (%)	Syrovátkový proteinový izolát (%)	Hydrolyzovaný syrovátkový protein (%)
Bílkoviny	25–89	≥ 90	Proměnlivé
Laktóza	10–55	0,5	Proměnlivé s koncentrací bílkovin
Mléčný tuk	2,0–10	0,5	Proměnlivé s koncentrací bílkovin



Obrázek 5 - Proteinový prášek [29]

1.3.1.1 Syrovátkový proteinový koncentrát

Syrovátkový proteinový koncentrát (WPC) obsahuje různý poměr bílkovin, který se pohybuje v průměru okolo 60–85 %. Koncentrát se nejčastěji vyrábí za pomoci ultrafiltrace (zařízení na Obrázku 6). Jedná se o filtrační metodu, která slouží ke snížení obsahu nežádoucí laktózy, tuku a popela pro získání co nejčistšího produktu. Po ultrafiltraci může následovat diafiltrace, díky níž se obsah nežádoucích látek ještě sníží a výsledný protein obsahuje až 85 % bílkovin [30]. Obsah bílkovin, tuku a laktózy v koncentrátech je uveden v Tabulce 3.



Obrázek 6 - Zařízení pro ultrafiltraci [30]

1.3.1.2 Syrovátkový proteinový izolát

Filtrační metodou, zvanou mikrofiltrace a iontová výměna je vyráběn syrovátkový proteinový izolát (WPI). Tato metoda je pokročilejší, díky čemuž obsahuje izolát mnohem větší koncentraci bílkovin (procentuálně 90 % a více) a zároveň splňuje stopové množství laktózy a mléčného tuku (přesnější obsah uveden v Tabulce 3). Do izolátu jsou často přidávány tělu prospěšné látky jako například laktoferin nebo imunoglobuliny [28].

1.3.1.3 Hydrolyzovaný syrovátkový protein

Hydrolyzovaný syrovátkový protein (HWP) se vyrábí procesem zvaným hydrolyza. Obecně lze říct, že slovo hydrolyza značí rozklad. Zde se jedná o rozklad na menší části bílkoviny, tedy peptidy. Tělo tento protein stráví mnohem jednodušeji, právě díky rozkladu na jednodušší peptidy. Jeho další výhodou je malá pravděpodobnost jakékoliv alergické reakce. Hydrolyzát je nejčastěji používán k výrobě potravin pro starší osoby, osoby s poruchou trávicí soustavy, osoby trpící cukrovkou, ale je hojně využíván i sportovci. Je součástí výrobků jako jsou tyčinky, nápoje, náhražky jídel i jako doplněk právě pro sportovce [28].

1.3.2 Kaseinové proteiny

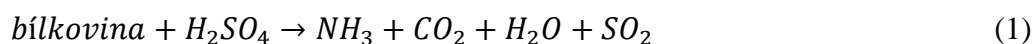
Kaseinové proteiny jsou dalším doplňkem stravy, kterým můžeme doplnit ve své stravě bílkoviny. Jak už bylo zmíněno, jedná se o mléčnou bílkovinu, kterou přirozeně najdeme v mléce. Tento druh je často nazýván jako pomalý protein, protože se mnohem déle tráví a do svalů dopravuje aminokyseliny mnohem pomaleji než protein syrovátkový [26]. Lidské tělo může kasein trávit dokonce až šest hodin. Díky jeho pomalejšímu trávení je obecně doporučováno tento protein přijímat spíše večer, aby tělo mělo dostatek času ho během noci strávit a vstřebat. Dle několika studií bylo zjištěno, že je kaseinový protein vhodný nejen pro ty, kteří chtějí nabrat svaly, ale i pro ty, kteří chtějí zhubnout. Tento doplněk stravy je schopen zrychlit metabolismus, díky čemuž lidské tělo spálí během dne mnohem více kalorií v porovnání bez užívání kaseinového proteinu. Další velkou výhodou je pocit sytosti na velmi dlouho dobu [29].

1.4 Stanovení hrubých bílkovin

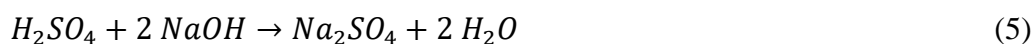
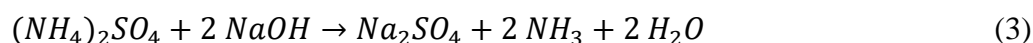
Vzorek dané potraviny můžeme nejdříve podrobit řadě reakcí, díky nimž můžeme zjistit, zda se vůbec nějaké bílkoviny ve vzorku vyskytují. Mezi takové reakce patří srážecí, jako je například reakce s Esbachovým činidlem, což je kyselina pikrová a citronová v destilované vodě. Tyto roztoky vytvoří v roztoku za přítomnosti bílkovin sraženinu. Dalším možným důkazem jsou barevné reakce, například s ninhydrinem, se kterým bílkoviny reagují při zahřevu fialovým zbarvením. Pokud jsme si jisti, že vzorek bílkoviny obsahuje, mohou následovat různé metody pro přesnější zjištění jejich obsahu. Tato kapitola se zaměřuje na metody, pomocí kterých lze stanovit obsah hrubých bílkovin ve vzorku potravin. Obsah hrubých bílkovin je roven obsahu všech dusíkatých látek. Aminokyseliny, které tvoří bílkovinu mají ve své struktuře dusík ve formě skupiny $-NH_2$, ale do hrubých bílkovin jsou zahrnuty i látky, které dusík obsahují, ale nejsou bílkovinné povahy [31].

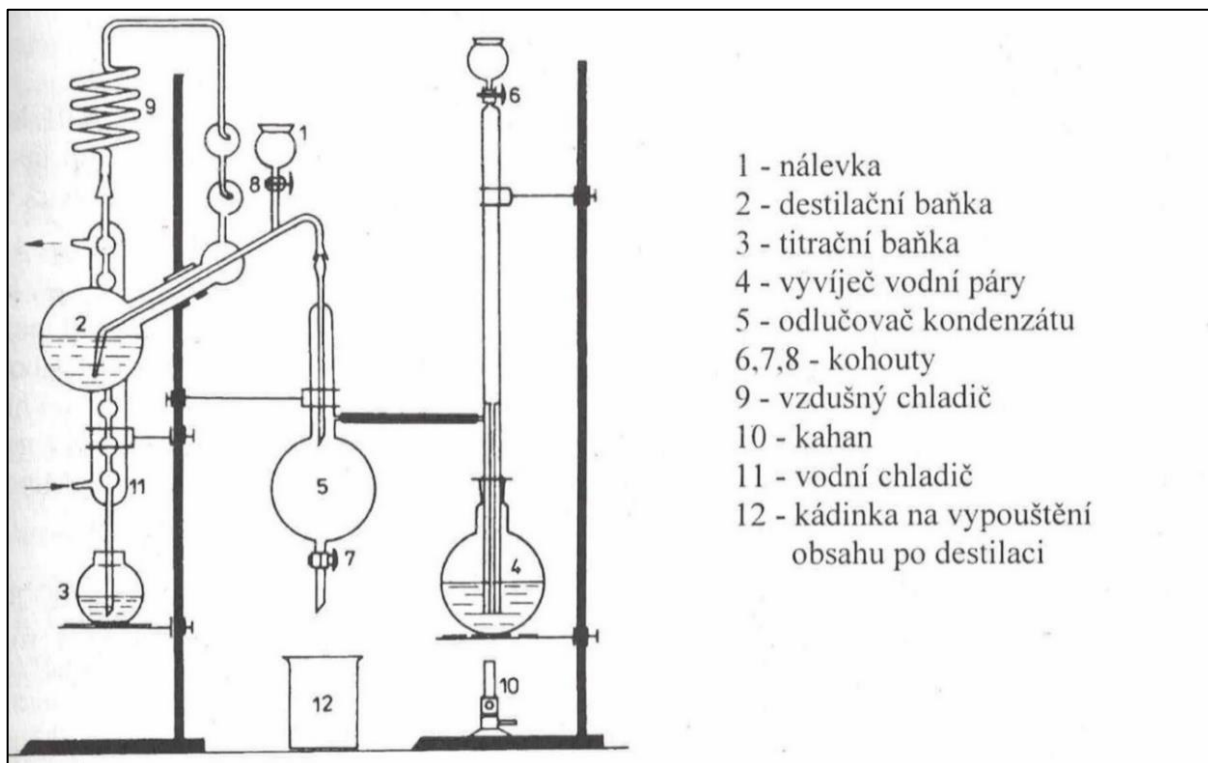
1.4.1 Metoda podle Kjeldahla

Tato metoda patří mezi jednu z nejčastěji používaných, která sice určí obsah i nebílkovinných látek, ale je rychlá a spolehlivá. Princip spočívá v mineralizaci vzorku kyselinou sírovou v přítomnosti katalyzátoru (selen, rtuť, síran měďnatý) dle rovnice (1). Touto reakcí se dusík ve vzorku převede na síran amonný (rovnice (2)):



Další krok probíhá v Parnas-Wagnerově přístroji (Obrázek 7). Principem je uvolnění amoniaku ze síranu amonného za pomoci roztoku hydroxidu sodného (rovnice (3)), který se vpraví pomocí nálevky (číslo 1 na Obrázku 7) do destilační baňky (číslo 2 na Obrázku 7). V baňce číslo 4 se vyvíjí vodní pára a uvolněný amoniak se s vodní parou předestiluje do předlohy s kyselinou sírovou (číslo 3 na Obrázku 7, rovnice (4)). Závěrečným krokem je alkalimetrické stanovení přebytku kyseliny sírové za pomoci indikátoru methylčerveně či Tashiro (rovnice (5)).





Obrázek 7 - Parnas-Wagnerův přístroj [31]

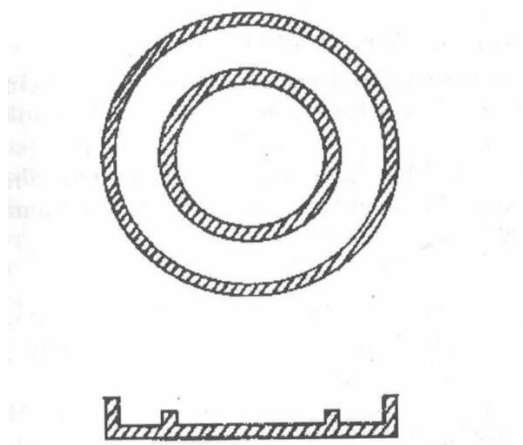
Z obsahu potřebného hydroxidu sodného na ztitrování přebytku kyseliny sírové se vypočítá obsah dusíku. Na základě skutečnosti, že bílkoviny obsahují cca 16 procent dusíku, se používá přepočítávací faktor (vztaženo na 100 g vzorku, tedy $100/16 = 6,25$). Pro většinu potravin se používá přepočítávací faktor 6,25, avšak například pro obiloviny a těstoviny je tento faktor 5,7 a pro ořechy 5,3. Obsah dusíku vynásobený přepočítávacím faktorem udává obsah hrubých bílkovin [31][32].

1.4.2 Metoda podle Winklera

Metoda podle Winklera je vhodná především pro maso a masné výrobky. K této metodě je potřeba mít vzorek upravený dle metody podle Kjeldahla a metoda se liší pouze tím, že v předloze pro destilaci máme kyselinu orthoboritou. Předestilováním vznikne boritan amonný, který je nutno dále stanovit kyselinou sírovou nebo chlorovodíkovou v přítomnosti indikátoru methylčerveň. Výpočet je shodný s metodou předchozí [31].

1.4.3 Metoda podle Conwaye

Tato metoda je vhodná především pro vzorky, ve kterých se nachází pouze malé množství bílkovin. Vzorek musí být nejdříve podroben mineralizaci podle Kjeldahla a následný proces celé metody probíhá v nádobce, která jak už název metody napovídá se nazývá Conwayova nádobka (Obrázek 8).



Obrázek 8 - Půdorys a nárys Conwayovy nádoby [31]

Do vnějšího okraje nádoby je napipetován na jednu stranu uhličitan nebo hydroxid draselný a na druhou stranu vzorek. Ve vnitřním prostoru se nachází kyselina boritá, která absorbuje uvolněný amoniak, který se uvolnil při promíchání roztoků ve vnějším prostoru. Závěrečným krokem je titrace vnitřního prostoru do červeného zbarvení pomocí kyseliny chlorovodíkové. Pro výsledek je nutné přepočítat spotřebu kyseliny chlorovodíkové na 1 g vzorku, přičemž 1 ml 0,01M kyseliny chlorovodíkové odpovídá 0,14 mg dusíku a abychom získali obsah hrubých bílkovin výsledek vynásobíme faktorem 6,25 [32].

1.4.4 Spektrofotometrické metody

1.4.4.1 Stanovení amidočerní 10B

Metoda je specifická pro mléko, ať už se jedná o syrové nebo pasterované. Stanovení je založeno na schopnosti bílkovin vázat barvivo z mléka, úbytek barviva se proměří spektrofotometricky a odpovídá koncentraci bílkovin. Pro přesnější pochopení je postup následovný, 5 ml mléka je doplněno do 100 ml vodou, přidá se barvivo a ze vzniklé sraženiny jsou odebrány 3 ml, které zředíme též vodou do 100 ml. Tento roztok je připraven ke změření absorbance při 615 nm. Po proměření několika roztoků dojde k vytvoření kalibrační křivky, pomocí níž zjistíme obsah bílkovin ve vzorku. Křivka je grafem závislosti absorbance na obsahu bílkovin, které byly zjištěny při metodě podle Kjeldahla. Stejný postup by byl proveden při stanovení pomocí Oranže G až na měření absorbance, které by muselo být provedeno při 485 nm [33].

1.4.4.2 Stanovení Nesslerovým činidlem

Stanovení s Nesslerovým činidlem je použitelné spíše pro vzorky, které obsahují bílkoviny s menším množstvím dusíku. Dusík obsažený v bílkovinách se díky mineralizaci s kyselinou

sírovou a s katalyzátorem převede na amonnou sůl. K roztoku se přidá Nesslerovo činidlo a hydroxid sodný a proměříme ve spektrofotometru při 450 nm. Obsah dusíku vypočítáme ze vzniklé kalibrační křivky. Kalibrační křivka je vytvořena pomocí standardního roztoku, který je napipetován v různém objemu do několika odměrných baněk, doplněny vodou. Po přidání Nesslerova činidla se roztoky proměří při 450 nm. Obsah hrubých bílkovin se získá vynásobením faktorem 6,25 [31][32].

1.4.4.3 Stanovení biuretovou reakcí

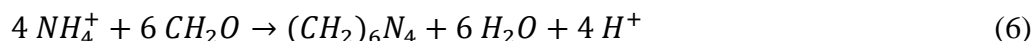
Při použití této metody je nezbytné odstranit nízkomolekulární látky tím, že se roztok odstředí za pomoci kyseliny trichloroctové a k vytvořené usazenině se přidá biuretovo činidlo (směs vinanu sodno draselného, hydroxidu sodného, síranu měďnatého a jodidu draselného) za vzniku modrých sloučenin mědi. Roztok se promíchá, nechá odležet a následně se spektrofotometricky proměří při 546 nm. Absorbance vynásobená číslem 17 udává množství bílkovin ve vzorku uvedeno v miligramech. Biuretova reakce je velmi rychlá na rozdíl od metod, kde je předem nutná mineralizace vzorku. Metoda je méně citlivá, a proto určí obsah bílkovin pouze orientačně [32].

1.4.4.4 Stanovení v ultrafialové oblasti spektra

Výhodou metody je její časová a technická nenáročnost. Nevýhodou je nízká citlivost a použití spíše pro čisté bílkoviny. Vzorek se zředí fyziologickým roztokem a proměří se spektrofotometricky při 150-220 nm [31].

1.4.5 Hanušova metoda

Prvním důležitým krokem je mineralizace vzorku metodou podle Kjeldahla, při níž vzniknou amonné ionty. Následuje reakce amonných iontů s formaldehydem za vzniku vodíkových iontů a hexamethyltetramin jako produktů (rovnice (6)). Přebytek vodíkových iontů se stanoví alkalimetricky, ztitruje se tedy zásadou, v tomto případě se používá hydroxid sodný [31].



1.4.6 Dumasova metoda

Dumasova metoda patří mezi ty rychlejší díky přístroji, který průběh celé metody usnadní. Vzorek je spalován při velmi vysokých teplotách (900 °C) spolu s oxidem měďnatým. Vzorek je zoxidován na oxidy dusíku a pomocí mědi dojde k redukci až na dusík, jehož výsledný

obsah je zjištěn pomocí tepelně-vodivostního detektoru. Detektor porovnává tepelnou vodivost nosného plynu (referentní hodnota) a daného vzorku [34][35].

1.5 Stanovení čistých bílkovin

Ve zjištěném obsahu hrubých bílkovin je přibližně 6 % dusíkatých látek, které však mezi bílkoviny neřadíme, jedná se například o močovinu, kreatin nebo kreatinin. Pokud tyto látky odstraníme, získáme obsah čistých bílkovin. Přepočítávání dusíku (uvedeno v kapitole 1.4.1) na bílkoviny se u většiny zdrojů liší, tento zdroj uvádí faktor 6,38. Obsah bílkovin se tedy může lišit na základě použitého faktoru [36].

Stanovit obsah čistých bílkovin můžeme v podstatě u jakýchkoliv potravin. Jak je již výše uvedeno, je však nutné se zbavit dusíkatých látek, které bílkoviny nejsou. Dopomohou nám k tomu látky, díky nimž se čisté bílkoviny vysrážejí. Těchto látek je několik, avšak nejpoužívanější je tanin, mezi další patří síran měďnatý nebo kyselina trichloroctová. Postup s taninem je následovný, až k 10 gramům vzorku (podle druhu potraviny) přidáme 50 ml roztoku taninu, směs se zfiltruje a vzniklá usazenina je připravena na mineralizaci a podrobení metody podle Kjeldahla. Výsledný obsah dusíku se pro získání obsahu čistých bílkovin ve vzorku vynásobí faktorem 6,25 jako u stanovení hrubých bílkovin [32].

1.6 Stanovení travitelných bílkovin

Lidské tělo není schopno vstřebat bílkoviny v potravě v té formě, ve které je přijme. Je nezbytné tyto bílkoviny rozštěpit na základní elementy pomocí látek zvaných enzymy, které v trávicí soustavě zajistí jejich rozklad neboli hydrolýzu. Metabolismus bílkovin probíhá převážně v žaludku v kyselém prostředí, které zajišťuje kyselina chlorovodíková. Než se bílkovina rozloží na základní elementy, jímž jsou aminokyseliny musí projít několika kroky štěpení. Každý krok hydrolýzy zajišťuje jiný enzym (v žaludku pepsin a v tenkém střevě trypsin). Vzniklé aminokyseliny jsou vstřebávány v tenkém střevě nebo metabolizovány v játrech [18]. Metody pro stanovení travitelných bílkovin musí splňovat podobné podmínky jako v lidském těle, tedy kyselé prostředí a aktivitu enzymů [32].

1.6.1 Stanovení pepsinem

V této metodě je využíván enzym pepsin, který zahajuje trávení bílkovin v žaludku, tedy jejich štěpení na menší řetězce (aminokyseliny). Pepsin je v trávicím traktu v neaktivní formě a zaktivuje se až při kontaktu s kyselinou chlorovodíkovou, která se nachází právě v žaludku. Další trávení probíhá v tenkém střevě, kde působí další enzym (trypsin), který dokončuje

trávení bílkovin [37]. Principem této metody je hydrolýza vzorku v kyselém prostředí, které zajišťuje kyselina chlorovodíková, další podmínkou je teplota 38 °C a nezbytnou součástí je přítomnost enzymu, v tomto případě pepsinu. Metoda je časově náročná z důvodu potřebných 48 hodin pro štěpení daných bílkovin v termostatu. Roztok se po 48 hodinách zfiltruje a vzniklá usazenina je připravena ke stanovení dusíku podle Kjeldahla [32]. Výsledný obsah travitelných bílkovin získáme odečtením zjištěné hodnoty od celkového obsahu bílkovin [35].

1.6.2 Stanovení trypsinem

Metoda je velice podobná té předchozí. Liší se pouze v daném prostředí, ve kterém se hydrolýza provede. Zde se jedná o alkalické prostředí, které zajistí přídavek toluenu, dále se přidá teplá voda a trypsin. Roztok se nechá následných 48 hodin v termostatu a dalším krokem je filtrace. V nerozpustné směsi se stanoví obsah dusíku podle Kjeldahla a výsledek obsahu travitelných bílkovin vypočítáme stejně jako u stanovení s pepsinem [32].

2 Experimentální část

2.1 Stanovení hrubých bílkovin ve vzorku

Stanovení celkových (hrubých) bílkovin bylo provedeno metodou podle Kjeldahla podle postupů z předmětu Laboratoř analýzy potravin [38].

2.1.1 Přístroje a zařízení

- Mineralizátor (systém Turbotherm TT440, Gerhardt)
- Analytické váhy (Výrobce KERN)
- Titrační baňky (250 ml)
- Odměrná baňka (100 ml)
- Pipeta (10 ml)
- Kádinky (50, 100 ml)
- Odměrný válec (50 ml)
- Byreta (25 ml)
- Destilační aparatura s destilační baňkou (250 ml)
- Varné kamínky

2.1.2 Chemikálie a standardy

- Hydroxid sodný (NaOH), 0,1 M a 30%
- Kyselina sírová (H₂SO₄), 0,05 M a konc. H₂SO₄
- Indikátor Tashiro a Fenolftalein
- Selenový katalyzátor
- Kyselina šťavelová, pevná (COOH)₂ · 2H₂O

2.1.3 Vzorky

Stanovení hrubých a travitelných bílkovin bylo provedeno ve vzorcích syrovátkových a kaseinových proteinových prášcích. Vzorky proteinů byly objednány na www.fitness007.cz. V Tabulce 4 jsou uvedeny druhy proteinů a jejich výrobce. Složení vzorků proteinů viz Příloha A.

Tabulka 4 - Použité vzorky a jejich výrobci

Číslo vzorku	Název produktu	Druh proteinového prášku	Výrobce
1	CFM EVOLUTION BANANA	Syrovátkový koncentrát	PROM-IN
2	CFM EVOLUTION PISTACHIO	Syrovátkový koncentrát	PROM-IN
3	ISO WHEY ZERO SALTED CARAMEL	Syrovátkový izolát	BioTechUSA
4	ISO WHEY ZERO VANILLA	Syrovátkový izolát	BioTechUSA
5	PURE MICELLAR CHOCOLATE	Micelární kasein	PROM-IN
6	PURE MICELLAR VANILLA	Micelární kasein	PROM-IN

2.1.4 Pracovní postup

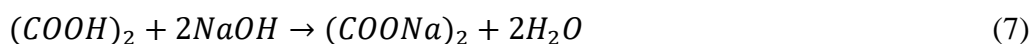
Na analytických vahách byl navážen 1 g vzorku (s přesností na 4 desetinná místa) a kvantitativně vpraven do mineralizační zkumavky. Byly přidány 3 g selenového katalyzátoru, 25 ml koncentrované kyseliny sírové a varné kamínky. Stojan s mineralizačními zkumavkami byl vložen do topného hnízda mineralizátoru Turbotherm a přiklopen nerezovým boxem s odsávacím zařízením, které bylo napojeno na vodní vývěvu. Na přístroji byl nastaven teplotní program (80% výkon, čas 100 min.). Reakční směs se vařila až do vyjasnění a odbarvení (slabě nazelenalé zbarvení v přítomnosti Cu^{2+} soli). Po skončení mineralizace byl vytáhnout celý blok z topného hnízda, zavěšen na střed konzole a blok se zkumavkami se nechal zchladnout. Po vychladnutí byl obsah zkumavek převeden do 100 ml odměrných baněk. Po vytemperování na laboratorní teplotu byly odměrné baňky doplněny destilovanou vodou po rysku a promíchány.

Dalším krokem byla příprava aparatury pro oddestilování amoniaku. Do destilační baňky bylo odpipetováno 10 ml roztoku vzorku a po začátku destilace bylo připouštěno 20–25 ml 30 % NaOH. Destilace probíhala do předlohy s 10 ml 0,04958 M H_2SO_4 spolu s přiměřeným množstvím destilované vody a s indikátorem Tashiro (narůžovělá barva). Destilační baňka byla zahřívána a amoniak se uvolnil cca do 10 minut. Po skončení destilace byl konec aparatury opláchnut destilovanou vodou. Přebytek H_2SO_4 byl titrován odměrným roztokem 0,10223 M NaOH do zeleného zbarvení. Pro každý vzorek bylo stanovení provedeno dvakrát.

2.1.5 Standardizace roztoků

Standardizace 0,1 M NaOH

Standardizace byla provedena na základní látku kyseliny šťavelové a jako indikátor byl použit fenolftalein. Reakce probíhá podle rovnice (7):



S přesností na 4 desetinná místa bylo naváženo vypočítané množství kyseliny šťavelové (dle rovnice (8)), navážka byla vpravena do titrační baňky a zředěna přiměřeným množstvím destilované vody. Dále byl přidán indikátor fenolftalein a roztok byl titrován odměrným roztokem 0,1 M NaOH do prvního stálého růžového zbarvení.

Výpočet navážky $(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:

$$m = \frac{1}{2} \cdot M_{(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} \cdot c_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}} = \frac{1}{2} \cdot 126,066 \cdot 0,1 \cdot 0,01 = \mathbf{0,063 \text{ g}} \quad (8)$$

Výpočet přesné koncentrace:

Přesné koncentrace byly vypočteny podle rovnice (9) z hodnot uvedených v Tabulce 5, v níž jsou uvedeny i výsledné koncentrace.

Tabulka 5 - Navážka kyseliny šťavelové, objem a koncentrace NaOH

Hmotnost $(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [g]		Objem NaOH [ml]		Koncentrace NaOH [mol/l]	
m_1	0,0630	V_1	9,8	c_1	0,1020
m_2	0,0633	V_2	9,8	c_2	0,1025

Ukázkový výpočet koncentrace:

$$c_1 = \frac{2 \cdot m_1}{M_{(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} \cdot V_1} = \frac{2 \cdot 0,0630}{126,066 \cdot 0,0098} = 0,1020 \text{ mol/l} \quad (9)$$

Průměrná koncentrace:

$$c = \frac{c_1 + c_2}{2} = \mathbf{0,1023 \text{ mol/l}} \quad (10)$$

Standardizace 0,05 M H₂SO₄

Do titrační baňky bylo odpipetováno 10 ml 0,05 M roztoku H₂SO₄. Kyselina byla naředěna přiměřeným množstvím destilované vody a byl přidán indikátor Tashiro. Roztok byl titrován odměrným roztokem 0,1023 M NaOH z fialového do zeleného zbarvení.

Výpočet přesné koncentrace:

Výpočet byl proveden podle rovnice (11) s využitím objemů z Tabulky 6.

Tabulka 6 - Objemy NaOH na standardizaci H₂SO₄

Objem NaOH [ml]	
V ₁	9,7
V ₂	9,7

Ukázkový výpočet koncentrace:

$$c_1 = c_2 = \frac{\frac{1}{2}(c \cdot V)_{NaOH}}{V_{H_2SO_4}} = \frac{\frac{1}{2}(0,1023 \cdot 9,7)}{10} = 0,0496 \text{ mol/l} \quad (11)$$

2.2 Stanovení travitelných bílkovin ve vzorku

Travitelné bílkoviny byly stanoveny ve dvou vybraných proteinových prášcích (CFM EVOLUTION BANANA, CFM EVOLUTION PISTACHIO), ve kterých byly zároveň stanoveny i hrubé bílkoviny. Postup pro stanovení travitelných bílkovin byl použit z Laboratorní příručky analýzy potravin [32].

2.2.1 Přístroje a zařízení

- Vodní lázeň Memmert
- Lahev (2x 1000 ml, 2x 500 ml)
- Pipeta (5 ml)
- Filtrační papír
- Büchnerova nálevka
- Sušárna

2.2.2 Chemikálie

- Pepsin (Sigma Aldrich)
- Kyselina chlorovodíková (HCl), 25%

2.2.3 Pracovní postup

Na analytických vahách byl navážen 1 g vzorku (s přesností na 4 desetinná místa) a kvantitativně vpraven do uzavíratelné laboratorní lahve o objemu 1 l. Do laboratorní lahve bylo následně přidáno 0,5 g pepsinu, 240 ml destilované vody a 5 ml 25% kyseliny chlorovodíkové. Lahve byly vloženy do vodní lázně (38 °C), kde byly za stálého míchání ponechány 24 h. Po uplynutí této doby bylo přidáno do každé lahve 5 ml 25% kyseliny chlorovodíkové. Obsah byl znovu ponechán ve vodní lázni dalších 20 hodin. Po 20 hodinách byl roztok zfiltrován na Büchnerově nálevce a několikrát byl promyt horkou vodou. Filtr s nerozpustným zbytkem byl vložen na 10 minut do sušárny při 105 °C. Filtr byl vložen do Kjeldahlovy baňky a byl proveden stejný postup jako v kapitole 2.1.4. Pro každý vzorek bylo stanovení provedeno dvakrát.

3 Výsledky a diskuze

Cílem experimentální práce bylo stanovení obsahu hrubých a travitelných bílkovin ve vzorcích proteinových prášcích a porovnání mezi sebou a s deklarovanou hodnotou uvedenou výrobcem na obale. Pro stanovení hrubých i travitelných bílkovin byla zvolena metoda podle Kjeldahla. V této kapitole jsou uvedeny výsledky měření formou tabulek. Měření bylo provedeno u 6 vzorků proteinového prášku uvedených v kapitole 2.1.3 a každý vzorek byl stanoven dvakrát.

3.1 Stanovení hrubých bílkovin

V experimentální části byla vyzkoušena i metoda pro stanovení čistých bílkovin, přičemž byl výsledek v porovnání s hrubými bílkovinami srovnatelný. Bylo tedy zvoleno pouze stanovení hrubých bílkovin. Obsah hrubých bílkovin byl stanoven metodou podle Kjeldahla. Principem je převedení bílkovinného dusíku na síran amonný tzv. mineralizací vzorku s koncentrovanou kyselinou sírovou. Dalším krokem je uvolnění amoniaku za pomoci hydroxidu sodného do předlohy s přesně daným množstvím standardizované kyseliny sírové a indikátorem Tashiro. Přebytek kyseliny sírové byl titrován standardizovaným hydroxidem sodným do zeleného zbarvení. Podrobný postup je uveden v kapitole 2.1.4.

Obecný výpočet obsahu celkových bílkovin v % podle rovnice (12), kde F_z je zředovací faktor a F_{em} [38] je přepočítávací faktor (byl použit přepočítávací faktor pro mléko 6,38):

$$x = \frac{M_{N_2} \cdot [(c \cdot V)_{H_2SO_4} - \frac{1}{2}(c \cdot V)_{NaOH}] \cdot F_z \cdot F_{em}}{m_{VZ}} \cdot 100 \quad (12)$$

Ukázkový výpočet pro vzorek 1:

$$x = \frac{28 \cdot [(0,0496 \cdot 0,01) - \frac{1}{2}(0,1023 \cdot 0,002)] \cdot \frac{100}{10} \cdot 6,38}{1,01} \cdot 100 = 69,63\% \quad (13)$$

Tabulka 7 - Obsah celkových bílkovin

Vzorek	Navážky vzorku (g)		Spotřeba NaOH (ml)		Obsah celkových bílkovin (%)			
	m ₁	m ₂	V ₁	V ₂	1. měření	2. měření	Průměr	Obal
1	1,0100	1,0105	2	1,5	69,63	74,12	71,88	76,3
2	1,0077	1,009	1,7	1,9	72,51	70,61	71,56	75,3
3	1,0094	1,0016	1	1,2	78,73	77,52	78,13	84,0
4	1,0056	1,0090	1,2	1,4	77,21	75,14	76,18	84,0
5	1,0077	1,0010	2	2,1	69,80	69,35	69,58	75,4
6	1,0026	1,0068	1,8	1,6	71,97	73,49	72,73	79,0

Z Tabulky 7 vyplývá, že je obsah celkových bílkovin při stanovení v porovnání s deklarovanými hodnotami na obale u všech vzorků nižší. Největší rozdíl mezi výsledným obsahem při stanovení a na obale je u vzorku 4 (ISO WHEY ZERO VANILLA). Naopak nejvíce se shoduje stanovení s hodnotou na obalu u vzorku 2 (CFM EVOLUTION PISTACHIO). Nejvíce bílkovin obsahují vzorky číslo 3 a 4 (78,13 a 76,18 %), které řadíme mezi tzv. syrovátkové izoláty. Oproti syrovátkovým izolátům mají syrovátkové koncentráty (vzorky 1 a 2) a kaseinové proteiny (vzorky 5 a 6) v průměru o cca 5–7 % méně bílkovin. Dle mého názoru jsou všechny tyto druhy proteinů výborným zdrojem bílkovin ve stravě.

3.2 Stanovení travitelných bílkovin

Podstatou stanovení travitelných bílkovin ve vzorku bylo vystavení vzorku působení enzymů v kyselém prostředí, v tomto případě pepsinu, který se vyskytuje v žaludku člověka dokáže štěpit bílkoviny. Roztok spolu s enzymem, kyselinou chlorovodíkovou a vodou byl ponechán ve vodní lázni (38 °C) po dobu 44 hodin, což simuluje trávení v organismu. Po uplynutí této doby byly roztoky zfiltróvány, vysušeny a v nerozpuštěném zbytku byl stanoven obsah bílkovin metodou podle Kjeldahla. Celý postup je uveden v kapitole 2.2.3, který byl převzat z laboratorní příručky [32].

Při titraci přebytku kyseliny sírové odměrným roztokem hydroxidu sodného byl u všech měření objem $10 \pm 0,2$ ml, což znamená, že ve vzorcích nebyl přítomen žádný dusík. Je tedy velice pravděpodobné, že veškeré bílkoviny obsažené ve vzorku byly během 44 hodin pomocí pepsinu a kyseliny chlorovodíkové dokonale stráveny. Domnívám se, že bílkoviny přešly na

rozpustné aminokyseliny, čemuž pomohly i enzymy obsaženy ve vzorku (laktáza, bromelain a papain viz Příloha A). Tato teorie je potvrzena v článku, kde je popsána studie, v níž byl podroben hovězí sérový albumin (jedna z bílkovin syrovátky) hydrolýzou pepsinem i trypsinem. Závěrem studie potvrzuje, že hydrolýza pomocí pepsinu a trypsinu vede k neúčinnější celkové hydrolýze. V článku jsou zmíněny vlivy, které trávení bílkovin zpomalují, mezi něž patří např. další potraviny či věk. Avšak u stanovení vzorků žádný z vlivů enzymatickou hydrolýzu nenarušoval, i z tohoto důvodu proběhlo trávení vzorku velmi rychle [39]. Závěrem v experimentální části lze říct, že syrovátkový koncentrát lze považovat za velmi kvalitní zdroj aminokyselin, přičemž nezatěžuje trávení.

4 Závěr

Bakalářská práce se v první části zabývá definicí bílkovin, blíže specifikuje bílkoviny mléka a mléčných výrobků. Další část se zaměřuje na charakterizaci bílkovin jako doplňků stravy. V poslední části bakalářské práce bylo cílem stanovit jak celkové, tak travitelné bílkoviny v syrovátkových a kaseinových proteinech jako doplňcích stravy. V diskusi byly porovnány naměřené hodnoty s deklarovanými hodnotami na obale.

V experimentální části byla vyzkoušena i metoda pro stanovení čistých bílkovin, přičemž byl výsledek v porovnání s hrubými bílkovinami srovnatelný. Bylo tedy zvoleno pouze stanovení hrubých bílkovin. Ke stanovení hrubých bílkovin byla použita metoda podle Kjeldahla, přičemž u všech druhů proteinů byly naměřeny nižší hodnoty, než uvádí výrobce na obalu výrobku. Při porovnání syrovátkových koncentrátů, izolátů a kaseinových proteinů, bylo zjištěno, že nejvyšší obsah bílkovin mají syrovátkové izoláty. Průměrný obsah bílkovin byl o 5–7 % vyšší.

Travitelné bílkoviny byly stanoveny metodou, která spočívala v simulaci prostředí při trávení v organismu. Vzorek byl po 44 hodinách plně stráven a rozštěpen na rozpustné aminokyseliny. Závěrem lze konstatovat, že komerčně dostupné syrovátkové koncentráty, které byly pro stanovení travitelných bílkovin použity, jsou velmi kvalitním zdrojem aminokyselin a nezatěžují trávení organismu.

Syrovátkové a kaseinové proteiny bych doporučila jak sportovcům, tak i těm, kteří mají problém se splněním optimálního denního příjmu bílkovin. Cena těchto proteinů záleží na výrobci, obsahu bílkovin i příchuti, avšak v průměru vychází na cca 500 Kč/kg. Dnes existuje spousta druhů příchutí, ze kterých si určitě každý vybere.

5 Seznam použité literatury

- [1] PÍŤHA, Jan a Rudolf POLEDNE. *Zdravá výživa pro každý den*. Praha: Grada, 2009. Zdraví & životní styl. ISBN 978-80-247-2488-1.
- [2] ELUC. *Aminokyseliny: Vlastnosti a zdroje aminokyselin* [online]. Elektronická učebnice [cit. 2021-06-27]. Dostupné z: <https://eluc.ikap.cz/verejne/lekce/2501>
- [3] HOLEČEK, Milan. *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1562-7.
- [4] VÍŠ CO JÍŠ. *Základní živiny: Bílkoviny* [online]. 2016 [cit. 2021-03-06]. Dostupné z: <https://viscojis.cz/vyziva/zakladni-ziviny/194-bilkoviny>
- [5] MACH, Ivan a Jiří BORKOVEC. *Výživa pro fitness a kulturistiku*. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4618-0.
- [6] ZLATOHLÁVEK, Lukáš. *Klinická dietologie a výživa*. Praha: Current Media, 2016. Medicus. ISBN 978-80-88129-03-5.
- [7] MARIENKA, Ondra. Velký souhrn informací o BÍLKOVINÁCH, ve kterém nalezneš vše, co potřebuješ znát! *Kulturistika* [online]. Fitness Trade, 9. 5. 2019 [cit. 2021-03-10]. Dostupné z: <https://www.kulturistika.com/vyziva/vyziva/vyzivove-tipy/kratky-prehled-bilkovin-obsazenych-jak-v-rostlinnych-tak-v-zivocisnych-potravinach>
- [8] SKUPNÍKOVÁ, Barbora. *Genové mutace jako příčina mentálních retardací* [online]. Brno, 2016 [cit. 2021-03-11]. Dostupné z: <https://theses.cz/id/vgrlpo/>. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Mgr. Markéta Wayhelová.
- [9] GRIFFITHS, Mansel, ed. *Improving the safety and quality of milk*. Boca Raton: CRC Press, 2010. Woodhead Publishing series in food science, technology and nutrition. ISBN 978-1-84569-806-5.
- [10] DOSTÁLOVÁ, Jana. Mléko a mléčné výrobky ve výživě. In: *Sborník prezentací: XXXII. Mezinárodní kongres SKVIMP*. Hradec Králové, 2016, 61–64. ISBN 978-80-7177-954-4.
- [11] TUNICK, Michael H. a Diane L. Van HEKKEN. Dairy Products and Health: Recent Insights. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015, **63**(43), 9381–9388. ISSN 0021-8561
- [12] CHCEME JÍST ZDRAVĚ. *Mýty a fakta ohledně mléka a mléčných výrobků* [online]. 2015 [cit. 2021-03-19]. Dostupné z: <http://hcemejistzdrave.cz/jidlo/myty-a-fakta-ohledne-mleka-a-mlecnych-vyrobku/>
- [13] SLUKOVÁ, Marcela. *Výroba potravin a nutriční hodnota*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-947-1.

- [14] WALSTRA, Pieter. Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal*. 1999, 189–192. ISSN 0958-6946.
- [15] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-7080-510-2.
- [16] FORMAN, Ladislav. *Mlékárenská technologie II*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1994. ISBN 80-7080-214-6.
- [17] WALSTRA, Pieter a Robert JENNESS. *Dairy chemistry and physics*. New York: Wiley, 1984. ISBN 0-471-09779-9.
- [18] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. 3. rozš. a přeprac. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [19] SAWYER, L. „Beta-lactoglobulin“. In: FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L., eds. *Advanced Dairy Chemistry: 1. Proteins*. Elsevier Applied Science, 1992, 141–190. ISBN 978-1-4419-8602-3.
- [20] KAMAU, Samuel Mburu et al. Alpha – Lactalbumin: Its Production Technologies and Bioactive Peptides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2010, **9**, 197–212. ISSN 1541-4337.
- [21] HAMMANN, Felicia a Markus SCHMID. 2014. „Determination and Quantification of Molecular Interactions in Protein Films: A Review“. *Materials*. 2014, **7**(12), 7975–7996. ISSN 1996-1944.
- [22] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [23] DE WIT, J. N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of Dairy Science*. 1998, **81**(3), 597–608. ISSN 0022-0302.
- [24] NIAZ, Bushra et al. Lactoferrin (LF): a natural antimicrobial protein. *International Journal of Food Properties*. 2019, **22**(1), 1626–1641. ISSN 1532-2386.
- [25] KLIMEŠOVÁ, Iva. *Základy sportovní výživy*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2016. ISBN 978-80-244-4971-5.
- [26] KLEINER, Susan M. a Maggie GREENWOOD-ROBINSON. *Fitness výživa: Power Eating program*. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-3253-4.
- [27] SCHINETSKY, Robert. The Complete History of Protein Powder. *Tiger fitness* [online]. 2. 11. 2018 [cit. 2021-04-22]. Dostupné z: <https://www.tigerfitness.com/blogs/supplements/the-complete-history-of-protein-powder>
- [28] KASSEM, Jihan M. Future challenges of whey proteins. *International Journal of Dairy Science*. 2015, **10**(4), 139–159. ISSN 1811-9743.

- [29] HAVLOVÁ, Barča. Komplexní průvodce různými druhy proteinů a jejich využití. *Kulturistika* [online]. Fitness Trade, 21. 4. 2020 [cit. 2021-04-24]. Dostupné z: <https://www.kulturistika.com/vyziva/ostatni/vse-o-suplementech/komplexni-pruvodce-ruznymi-druhy-proteinu-a-jejich-vyuzitim>
- [30] TSAKALI, Efstathia et al. A review on whey composition and the methods used for its utilization for food and pharmaceutical products. In: *6th International Conference on Simulation and Modelling in Food and Bio Industries*. Bragança: Eurosis, 2010, 195–201. ISBN 978-90-77381-56-4.
- [31] HÁLKOVÁ, Jana, Marie RUMÍŠKOVÁ a Jana RIEGLOVÁ. *Analýza potravin*. Újezd u Brna: Ivan Straka, 2000. ISBN 80-902775-3-5.
- [32] DAVÍDEK, Jiří. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1977.
- [33] LUKÁŠOVÁ, Jindra. *Praktická cvičení z hygieny a technologie mléka*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2000. ISBN 80-7305-388-8.
- [34] SERRANO, Salud, Francisco RINCÓN a Juan GARCÍA-OLMO. Cereal protein analysis via Dumas method: Standardization of a micro-method using the EuroVector Elemental Analyser. *Journal of Cereal Science*. 2013, **58**(1), 31–36. ISSN 0733-5210.
- [35] HÁJEK, Tomáš. *Přednášky předmětu Chemie a analýza potravin*. Pardubice: Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, 2020.
- [36] LYNCH, Joanna M. a David M. BARBANO. Kjeldahl nitrogen analysis as a reference method for protein determination in dairy products. *Journal of AOAC International*. 1999, **82**(6), 1389–1398. ISSN 1060-3271.
- [37] LUKÁŠ, Karel. *Gastroenterologie a hepatologie pro zdravotní sestry* [online]. Praha: Grada, 2005 [cit. 2021-7-5]. ISBN 978-80-247-6694-2.
- [38] ADAM, Martin. *Laboratoř analýzy potravin*. Pardubice: Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, 2020.
- [39] DEL RIO, Andrea Rivera et al. Protein acidification and hydrolysis by pepsin ensure efficient trypsin-catalyzed hydrolysis. *Food & Function*. 2021, **12**(10), 4570–4581. ISSN 2042-6496.

6 Přílohy

Příloha A – Složení použitých vzorků v experimentální části.....	46
--	----

Příloha A – Složení použitých vzorků v experimentální části

Vzorek 1 - CFM EVOLUTION BANANA

Složení: Syrovátkový proteinový koncentrát zpracovaný metodou CFM (syrovátkový proteinový koncentrát – mléko), Glutamin, L-leucin, L-soleucin, L-valin, protispěková látka: oxid křemičitý, náhradní sladidla: sukralosa a neohesperidin E959, trávicí enzymy: laktáza, bromelain, papain, aroma, barvivo: extrakt carthamus.

Vzorek 2 - CFM EVOLUTION PISTACHIO

Složení: Syrovátkový proteinový koncentrát zpracovaný metodou CFM (syrovátkový proteinový koncentrát – mléko), Glutamin, L-leucin, L-soleucin, L-valin, protispěková látka: oxid křemičitý, náhradní sladidla: sukralosa a neohesperidin E959, trávicí enzymy: laktáza, bromelain, papain, aroma, barvivo: koncentrát světlice barvířské a mořských řas.

Vzorek 3 - ISO WHEY ZERO SALTED CARAMEL

Složení: Syrovátkový proteinový izolát (88 %) (syrovátkový proteinový izolát, emulgátor (sójový lecitin)), krémující látky (částečně ztužený kokosový tuk, sušené odstředěné mléko, emulgátory (E471, E472a), glukózový sirup, sacharóza, mléčná bílkovina, stabilizátor (fosforečnany draselné), protispěkové látky (fosforečnany vápenaté)), L-glutamin 3,1 %, aromata, potravinářská sůl, emulgátor (sójový lecitin), zahušťovadla (karagenan, xanthanová guma), barvivo (amoniakový karamel), protispěková látka (oxid křemičitý), L-leucin 0,2 %, sladidlo (sukralóza), L-soleucin 0,1 %, L-valin 0,1 %.

Vzorek 4 - ISO WHEY ZERO VANILLA

Složení: Syrovátkový proteinový izolát (88 %) (syrovátkový proteinový izolát (mléko), emulgátor (sójový lecitin)), krémující směs (částečně ztužený kokosový tuk, sušené odstředěné mléko, emulgátory (E471, E472a), glukózový sirup, sacharóza, mléčná bílkovina, stabilizátory (fosforečnany draselné), protispěkové látky (fosforečnany vápenaté)), L-glutamin 2,5 %, aromata, emulgátor (lecitiny (sója), zahušťovadlo (karagenan, xanthanová guma), potravinářská sůl, protispěková látka (oxid křemičitý)), L-leucin (0,2 %), sladidlo (sukralóza), L-soleucin (0,1 %), L-valin (0,1 %), barvivo (tartrazin).

Vzorek 5 - PURE MICELLAR CHOCOLATE

Složení: Micelární kasein (z mléka), L-Glutamin, sladidla: sukralosa a neohesperidin E959, odtučněný kakaový prášek (sójový lecitin), aroma čokoládové.

Vzorek 6 - PURE MICELLAR VANILLA

Složení: Micelární kasein (z mléka), L-Glutamin, sladidla: sukralosa a neohesperidin E959, aroma vanilkové, extrakt carthamus.