

Kinetika hydrolyzačních procesů proteinů pivovarské biomasy

Bc. Alena Veličková

Diplomová práce
2010

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav biochemie a analýzy potravin

akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Alena VELIČKOVÁ**
Osobní číslo: **T08935**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Hydrolýza biomasy pivovarských kvasnic pomocí
kyseliny mléčné**

Zásady pro vypracování:

1. Charakterizujte pivovarskou biomasu.
2. Zabývejte se hydrolýzou proteinů s využitím různých kyselin.
3. Hydrolýzujte proteiny biomasy pivovarských kvasnic.
4. Popište průběh hydrolýzy pro kyselinu asparagovou, threonin, serin, glutamovou kyselinu, prolin, glycin, alanin, valin, isoleucin, leucin, fenylalanin, tyrozin, histidin, lysin a arginin.
5. Hydrolýzu provedte různě koncentrovanou kyselinou mléčnou. item Srovnajte získaná data se standartním hydrolyzačním procesem využívajícím HCl.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] World Dictionary of Collections of Cultures of Mikroorganism – Bacteria, Fungi and Yeasts – 4. edition, 1993

Fountoulakis, M., & Lahm, H.W. (1998). Hydrolysis and amino acid composition [2] analysis of proteins. Journal of Chromatography A, 826, 109-134

[3] Darragh, A.J., & Moughan, P.J. (2005). The effect of hydrolysis time on amino acid analysis. Journal of AOAC International, 88, 888-893

[4] Albin, D.M., Wubben, J.E., & Gabert, V.M. (2000). Effect of hydrolysis time on the determination of amino acids in samples of soybean products with ionexchange chromatography of precolumn derivatization with phenyl isothiocyanate.

[5] Journal of Agriculture and Food Chemistry, 48, 1684-1691

[6] <http://chemie.utb.cz/anorg/priklady/07.pdf>

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. František Buňka, Ph.D.

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

4. ledna 2010

Termín odevzdání diplomové práce:

19. května 2010

Ve Zlíně dne 8. dubna 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



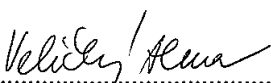
prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 29. dubna 2010


.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlázení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

V této práci bylo sledováno 15 aminokyselin (asparagová kyselina, threonin, serin, glutamová kyselina, prolin, glycin, alanin, valin, izoleucin, leucin, fenylalanin, tyrozin, histidin, lysin a arginin) v pivovarské biomase. Byl sledován vliv kyseliny chlorovodíkové a 20, 40 a 80% kyseliny mléčné na průběh hydrolyzačních křivek a hodnotu korekčních faktorů pro sledované aminokyseliny. Iontově-výměnnou chromatografií byl v automatickém analyzátoru AAA 400 stanoven obsah aminokyselin. Hydrolyzační křivky byly sestaveny pomocí nelineární regrese za použití 13 hydrolyzačních intervalů. Na základě sestavených hydrolyzačních křivek byly vypočteny korekční faktory pro sledované aminokyseliny a použité kyseliny pro zvýšení přesnosti a spolehlivosti stanovení aminokyselin.

Byl pozorován významný rozdíl v průběhu hydrolyzy pro použité koncentrace kyseliny mléčné ve srovnání s hydrolyzou pomocí HCl. Aplikace kyseliny mléčné v porovnání s hydrolyzou HCl menší výtěžek aminokyselin uvolněných z proteinů.

Klíčová slova: aminokyselina, biomasa, kyselá hydrolyza, kyselina mléčná, hydrolyzační křivka, korekční faktor

ABSTRACT

Fifteen amino acids (aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid, proline, glycine, alanine, valine, isoleucine leucine, phenylalanine, tyrosine, histidine, lysine and arginine) were determined in brewer's biomass. It was observed influence hydrochloric acid and 20, 40 and 80% (v/v) lactic acid of a course of hydrolysis and value of correction factors for monitored amino acids. Amino acids were separated and determined by using ion-exchange chromatography onto an Amino Acid Analyser AAA 400. Hydrolysis curves were provided by nonlinear regression using 13 hydrolysis intervals. According hydrolysis curves were calculated correction factors for monitored amino acids with the aim of higher accuracy of amino acids determination.

It was observed significant difference in course of hydrolysis for using concentrations of lactic acid compared with hydrochloric acid. During application of lactic acid compared with HCl hydrolysis, we obtained lower of amino acids liberated from proteins.

Keywords: amino acid, biomass, acid hydrolysis, lactic acid, hydrolysis curve, correction factors

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracování mé diplomové práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 PIVOVARSKÁ BIOMASA	12
1.1 VÝZNAM BIOMASY.....	12
1.2 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA KVASINEK.....	13
1.2.1 Kvasinky spodního a svrchního kvašení.....	14
1.2.2 Zdroje kvasinek	15
1.2.3 Pivovarské kvasnice jako potravinářský doplněk.....	15
2 PIVOVARSKÁ TECHNOLOGIE	17
2.1 HISTORIE VÝROBY PIVA	17
2.2 TECHNOLOGIE VÝROBY PIVA	17
2.2.1 Výroba sladu, sladiny.....	18
2.2.2 Chmel, chmelovar.....	20
2.2.3 Proces kvašení	21
2.2.4 Filtrace, pasterace piva	23
3 AMINOKYSELINY	25
3.1 STANOVENÍ AMINOKYSELIN V BÍLKOVINÁCH	25
3.2 HYDROLÝZA AMINOKYSELIN	25
3.2.1 Kyselá hydrolýza.....	26
3.2.2 Alkalická hydrolýza.....	28
3.2.3 Enzymatická hydrolýza.....	28
3.3 DETEKCE A KVANTIFIKACE AMINOKYSELIN.....	28
4 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA KYSELINY MLÉČNÉ	30
II PRAKTICKÁ ČÁST	31
5 CÍL PRÁCE	32
6 METODIKA PRÁCE	33
6.1 POPIS EXPERIMENTU	33
6.2 KYSELÁ HYDROLÝZA	33
6.3 ANALÝZA DAT	34
7 VÝSLEDKY A DISKUZE	35
7.1 REGRESNÍ PARAMETRY	36
7.2 HYDROLYZAČNÍ KŘIVKY.....	39
7.2.1 Kyselina asparagová	39
7.2.2 Threonin.....	40
7.2.3 Serin.....	42
7.2.4 Glutamová kyselina	43
7.2.5 Prolin	44
7.2.6 Glycin	45
7.2.7 Alanin	47
7.2.8 Valin	48

7.2.9	Isoleucin.....	49
7.2.10	Leucin	51
7.2.11	Tyrosin.....	53
7.2.12	Fenylalanin.....	54
7.2.13	Histidin	55
7.2.14	Lysin	56
7.2.15	Arginin.....	58
7.3	DISKUZE	59
ZÁVĚR.....		61
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		62
SEZNAM TABULEK		66
SEZNAM PŘÍLOH		68

ÚVOD

Tato práce se zaměřuje na stanovení aminokyselin v pivovarské biomase, vliv doby hydrolyzy na stanovení obsahu aminokyselin a popisuje rozdílnou účinnost dvou kyselin použitých k hydrolyze. Pivovarská biomasa je zdrojem cenných látek, zejména bílkovin, což nabízí možnost jejího dalšího využití v otázce výživy lidstva a ve výrobě potravinářských doplňků. Tato práce řeší možnost potencionálního využití kyseliny mléčné v potravinářském průmyslu a vhodnost jejího použití.

Teoretická část nabízí stručnou charakteristiku kvasinek, popis výroby piva a základních hydrolyzačních metod – kyselé, zásadité a enzymatické hydrolyzy, možnosti jejich použití. Dále metody separace, detekce a kvantifikace aminokyselin (zejména HPLC a iontově-výměnnou chromatografií).

V praktické části byl popsán postup hydrolyzy a analýzy dat. Na základě hydrolyzy pomocí dvou různých kyselin byly sestaveny hydrolyzační křivky pro jednotlivé aminokyseliny a určen vliv použité kyseliny na uvolňování aminokyselin z matrice.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 PIVOVARSKÁ BIOMASA

Pod pojmem pivovarská biomasa rozumíme různým způsobem odloučené kvasnice po pivovarské výrobě [1][2]. Pivovarské kvasnice jsou významným přírodním zdrojem velkého množství biologicky aktivních látek. Stejně jako ve všech živých organismech, probíhá i v kvasinkách neustálá přeměna látek, která zajišťuje buňkám dostatečné množství energie a stavebního materiálu pro veškeré životní projevy, mj. také pro růst a rozmnožování. Na intenzitě této látkové přeměny neboli metabolismu se výrazným způsobem podepisuje vnější prostředí. Během kvašení, kdy je cukr v nevykvašeném pivu (mladině) přeměňován na alkohol, dochází až k několikanásobnému množení kvasnic [2][3]. Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jsou schopny za optimálních podmínek zdvojnásobit buněčnou hmotu během 20 minut. Tato vysoká biosyntetická aktivita mikroorganismů je způsobena řadou faktorů. K těm významným patří: mimořádně vyvinutý proteosyntetický aparát, což je zřejmé z vysokého obsahu ribozómů a ribonukleových kyselin v buňkách, přijímání živin celým povrchem a velice aktivní katabolický metabolismus [2].

1.1 Význam biomasy

Mikroorganismy se v dnešní době stávají značně perspektivními především v otázkách zajišťování výživy lidstva. Díky vysoké rychlosti syntézy buněčné hmoty jsou mikroorganismy schopny během velmi krátké doby a přitom efektivně přeměnit i méně hodnotné nebo odpadní suroviny v buněčnou hmotu bohatou na bílkoviny a vitaminy.

Buňka kvasinkových organismů obsahuje 40-60% bílkovin v sušině. Obsah dusíkatých látek je závislý především na prostředí, v jakém vzniká. Na krmné účely se zpravidla rozmnožují kvasinky na různých odpadech průmyslových nebo hospodářských výrob, které nejsou vhodné pro jiné účely. Takto vytvořená biomasa může být cennou surovinou nejen pro zemědělský a potravinářský průmysl, ale také pro oblast biotechnologií. Řadu takovýchto odpadů lze využít pro přímou izolaci enzymů nebo jako substrát pro fermentaci mikroorganismů vykazujících požadovanou enzymovou aktivitu [2][4].

Kvasinky, obsažené jako přísada v krmných směsích, mají tu přednost, že obsahují antioxidační látky a zabraňují tuhnutí lipidových složek krmiv. Mají vysoký obsah vitaminů, hlavně komplexu B, volných aminokyselin a fosfolipidů. Komplexní využití mikroorganismů však má uplatnění jak ve výživě tak i ve zdravotnictví. V takovém případě je třeba

klást důraz na dostatečnou sterilizaci média, jeho složení a dodržování aseptických podmínek apod. Překážkou pro objemnější využití biomasy zůstává vysoký obsah nukleových kyselin a nestravitelnost buněčných stěn [5][19],[21].

Kvasnicová biomasa slouží již dnes jako bílkovinné krmivo, a droždí se pak stále více uplatňuje jako bílkovinný a vitaminový doplněk výživy člověka, protože buněčná hmota pekařských a pivovarských kvasinek je bohatým zdrojem vitaminů skupiny B [2][5].

1.2 Obecná charakteristika kvasinek

Kvasinky jsou jednobuněčné eukaryotní organismy. Taxonomicky však jsou nejednotnou skupinou. Botanicky je spolu s plísněmi řadíme mezi houby – vzhledem k jejich velikosti mezi mikroskopické houby (mikromycety). Své české pojmenování získaly díky schopnosti zkvašovat jednoduché cukry (mono-, di- nebo trisacharidy) na ethanol a CO₂ [7]. Kvasinky se rozmnožují převážně nepohlavně – pučením nebo dělením, což přímo ovlivňuje tvar buněk. Nejčastější tvar kvasinek je vejčitý, elipsoidní nebo kulový. Tvar buněk nebývá stálý a v čisté kultuře závisí na stáří kultury a kultivačním prostředí. Velikost buněk se pohybuje v rozmezí 3-15 μm [2][5].

Během pučení se na mateřské buňce vytvoří pupen, který se postupně zvětšuje. Po dosažení dostatečné velikosti dojde k oddělení od mateřské buňky. Podle místa, kde pupen na kvasince vzniká, rozlišujeme pučení monopolární, bipolární a multipolární, popřípadě vznikají pupeny zcela náhodně.

Několik málo druhů tzv. pohlavních kvasinek se však může rozmnožovat pohlavně za vzniku pohlavních spor. Při pohlavním rozmnožování dochází ke spojení jader dvou buněk (karyogamií). Po takovémto splynutí dvou buněk (konjugaci) vzniká zygota, která později sporuluje za vzniku asku či bazidia, v nichž jsou uloženy spory [6].

Kvasinky jsou aerobní mikroorganismy, ale mají schopnost změnit metabolismus za anaerobních podmínek na fermentační a při silně omezeném růstu hmoty produkovat ethanol a CO₂. Kvasinky rostou v širokém rozmezí pH 3-11, teplot 0-45 °C. Některé druhy rostou i při teplotě -10 °C a hodnotách pH až 1,5. Existují i osmotolerantní druhy [9].

Pivovarské kvasinky jsou jednobuněčné organismy, jež taxonomicky řadíme do domény *Eukaryota*, říše *Fungi*, oddělení *Eumycota* (vlastní houby), pododdělení *Ascomycotina*

(houby vřeckovýtrusé), třídy *Hemiascomycetes* (*Endomycetes*), řádu *Saccharomycetales* (*Endomycetales*), čeledi *Saccharomycetaceae*, podčeledi *Sacchyromycoideae*. Kvasinky pivovarské a divoké se dále taxonomicky nijak nerozlišují [1][11],[13]. Pro označování druhu pivovarských kvasinek se nejčastěji používá dělení na spodní pivovarské kvasinky - *Saccharomyces pastorianus* [2], (někdy také dělené na *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum* a na *Saccharomyces cerevisiae* var. *carlsbergensis*), a na svrchní pivovarské kvasinky - *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *cerevisiae* [1][2],[11]. Je však nutné říci, že se v kvasícím substrátu se mohou nacházet desítky druhů a kmenů kvasinek, jež spoluvytváří výslednou chuť a aroma piva. Pro pivovarskou výrobu je možné využít druhy jako např. *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kudriavzevii*, *Saccharomyces mikatae* a *Saccharomyces paradoxus*. Tyto druhy vykazují pro pivovarnictví vhodné vlastnosti jako je rychlý růst, dobrá schopnost produkce ethanolu a tolerance stresových faktorů jako je vysoká koncentrace ethanolu či nízká koncentrace kyslíku [2],[10][21].

1.2.1 Kvasinky spodního a svrchního kvašení

Svrchní kvasinky slouží dnes hlavně pro výrobu piva typů:

- „ale“ (obecně svrchně kvašené pivo, původem z Anglie a Irsko, o různém obsahu původního extraktu a různé barvy, vyrábí se v různých druzích),
- „porter“ (tmavé, chuťově výrazné svrchně kvašené pivo, vysokoprocentní, silně chmelené, původem z Londýna),
- „stout“ (téměř černé, hutné pivo typu „ale“, často sladké, většinou se pije nechladené), spodní kvasinky pro výrobu piva plzeňského typu.

Technologií spodního kvašení jsou u nás vyráběny piva plzeňského typu, v zahraničí jsou to piva mnichovská (neboli bavorská) a dortmundská. Kvasinky spodního i svrchního kvašení se liší svým genetickým materiálem, proto se odlišují také svým buněčným složením i vlastnostmi. Díky rozdílnému složení buněčných stěn kvasinky spodního kvašení na konci kvašení sedimentují na dně kvasných nádob. Naopak kvasinky svrchního kvašení jsou CO₂ vynášeny na povrch kvasící mladiny. Spodní kvasinky úplně zkvašují rafinosu na fruktosu a melibiosu, kdežto svrchní zkvašují rafinosu pouze z jedné třetiny. Mají rovněž rozdílné

technologicky významné vlastnosti – v různé míře tvoří sensoricky významné látky [1]. Kvasinky svrchního kvašení vytvářejí obecně více vedlejších produktů kvašení. Jsou to především estery, které dávají pivu ovocné a sladové aroma. Kvasinky spodního kvašení produkují výrazné sirnaté látky, jež dávají pivu sirnaté aroma. Asi 80% konečného obsahu sensoricky aktivních látek se vytváří při kvašení [1][11][12].

1.2.2 Zdroje kvasinek

Droždářenský průmysl vznikl již v polovině 19. století. Droždí bylo nejprve vyráběno v tekuté podobě, později se přešlo na lisovanou formu kvasnic, která umožňuje snadné využití v domácnostech.

Kvasinky jsou také speciálně pěstovány například na obilí, melase či sladu - odtud různorodost jejich chuti. Druh pěstovaný na dřevěných pilinách se nazývá „Torula kvasnice“. Tento druh je velmi oblíbený pro svůj vysoký obsah stopových prvků [3]. Zdrojem kvasinek pro přípravu nové kultury může být provozní kvasící mladina, popřípadě banka kvasničných kmenů. Sbírký kvasinek v bankách kvasničných kmenů obsahují většinou kmeny získané z pivovarských provozů. Někdy jsou v laboratorních podmínkách připravovány nové kmeny pro získání nových, resp. pro vylepšení stávajících vlastností.

Pivovarské kvasinky ke konzumaci člověkem se prodávají v různých formách – v prášku, jako vločky či tablety. Každá z nich má své výhody, ale ze všech forem se obvykle v závěrečné fázi jejich výroby odstraňuje hořkost uhličitánem sodným, popř. draselným [3].

1.2.3 Pivovarské kvasnice jako potravinářský doplněk

Pivovarské kvasnice se u nás používají především pro svou významnou výživovou hodnotu. Jsou vysoce vyváženou potravou, která má vysokou koncentraci všech vitaminů řady B. Pro vysoký obsah vitaminů a bílkovin jsou velice výhodným doplňkem výživy. Distribuují se ve formě tablet, jako je PANGAMIN, nebo v obohacené formě se zelenými řasami (ALGIMIN) nebo s kulturami mléčného kvašení (BIFIPANGAMIN).

Jsou to potraviny s vysokým obsahem bílkovin a nukleových kyselin, jejich konzumace podporuje vznik purinu, jenž je prekurzorem kyseliny močové, což může u lidí trpících na dnu či artritidu vyvolat zhoršení těchto chorob.

Pivovarským kvasnicím jsou připisovány další významné účinky, jako ochrana proti infekcím, podpora metabolického procesu, prevence proti zácpě, potlačování depresí, nechutenství, podrážděnosti. Díky obsahu železa a mědi působí proti chudokrevnosti. Ve větších dávkách se kvasnice ukázaly být jako prospěšné pro diabetiky, jelikož jsou bohatým zdrojem faktoru tolerance glukózy. Tato látka posiluje působení insulínu u diabetiků a hypoglykemiků [3[19].

2 PIVOVARSKÁ TECHNOLOGIE

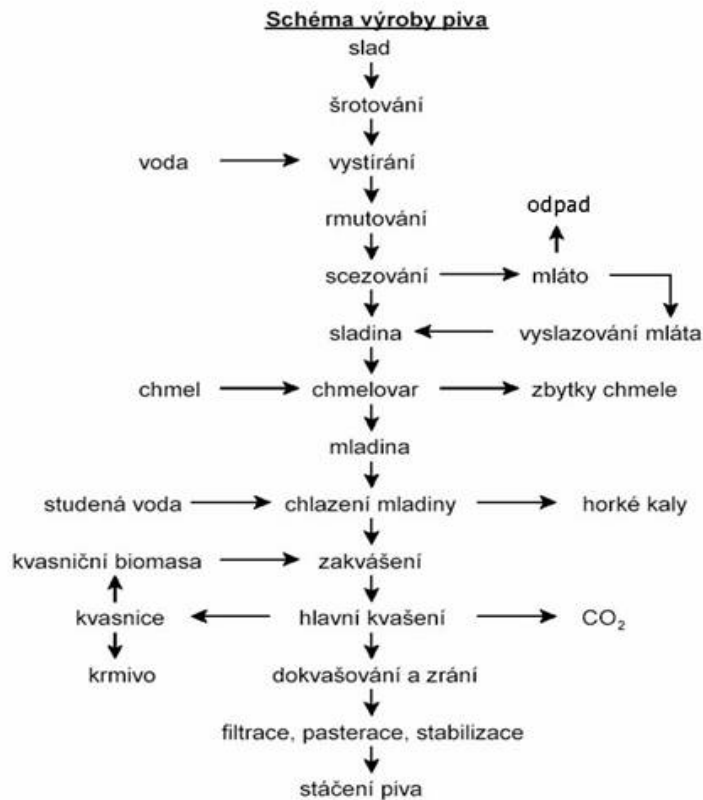
2.1 Historie výroby piva

První zmínky o výrobě piva pocházejí ze starého Egypta. Již staří Egypťané používali ječmen k výrobě sladu a místo chmelu různé druhy pšenice, která způsobovala sladkou chuť piva. První doložený postup výroby piva pochází z Číny a to z roku 300 př.n.l. Největší přelom ve výrobě piva spočíval v přechodu od tzv. divokých kvasinek k čistým kulturám. Důležitým krokem pro zvýšení mikrobiologické údržnosti byl boj proti chorobám piva a také jeho filtrace. Za průkopníka je považován Louis Pasteur - díky svému dílu Studie o pivu z roku 1876.

Dalším mezníkem bylo založení sbírky kvasinek pro výrobu piva, jímž se proslavil dánský mikrobiolog Emil Christian Hansen. Tato sbírka je na Carlsbergské univerzitě dodnes [2],[15]. Pivo se dnes vyrábí na celém světě, i v zemích střední Evropy, kde jsou jeho výroba a konzumace již dlouholetou tradicí. Pivo je považováno za jeden ze symbolů naší země a od roku 2008 je název „české pivo“ chráněno jako zeměpisné označení [16],[27] .

2.2 Technologie výroby piva

Sladařství a pivovarnictví patří k významným oborům s mnohaletou tradicí také u nás. Pivo je nápoj připravený ze sladu a vody, ochucený chmelem a zkvašený kulturními pivovarskými kvasinkami [1].



Obr. 1. Schéma výroby piva [6]

2.2.1 Výroba sladu, sladiny

Výroba sladu se nazývá sladování a uskutečňuje se ve sladovnách. Pro výrobu sladu se u nás pěstují vybrané odrůdy jarního, dvouřadého ječmene *Hordeum distichum* var. *nutans*. Pro účely sladařské výroby se využívá zrna ječmene – obilka, která se skládá z endospermu, který zaujímá největší část zrna, z obalových částí, zárodku, z něhož při klíčení vycházejí podněty k aktivaci enzymů [5].

Proces sladování trvá několik dní, často se již jedná o proces poloautomatický. Slad, který je potřebný k výrobě piva, se vyrábí naklícením a hvozděním sladovnického ječmene. Před naklícením se nechá zrna namočit, načež se v chladné místnosti, do níž nemá přístup světlo, nechá vyklíčit. Když je zrna dostatečně naklíceno, přemístí se na hvozd, kde dochází k jeho sušení. Hvozděním se převede zelený slad s vysokým obsahem vody do skladovatelného a stabilního stavu. V zrně se zastaví životní projevy a vytvoří se aromatické a barev-

né látky, jakož i vlastnosti charakteristické pro daný druh sladu. Po hvozdění je slad zba-ven klíčků a rozemlet [1[17]

V některých státech se však z ekonomických důvodů často používají také náhražky sladu, např. nesladový ječmen, kukuřice, cukerné sirupy, či rýže [1[18].

Nejběžněji vyráběnými druhy sladů v České republice jsou světlý slad a bavorský slad. Ostatní druhy sladů jsou využívány jen v malém měřítku pro speciální účely (diastatický, nakuřovaný slad). Světlý slad neboli plzeňský je určený pro výrobu světlých piv plzeňského typu. Bavorský neboli polotmavý slad je určen po mírné dobarvení světlých či k výrobě tmavých a polotmavých piv [17]. Dalším neméně důležitým technologickým krokem je šrotování sladu. Jedná se o proces zdánlivě jednoduchý, který ovšem může zásadním způsobem ovlivnit proces rmutování, scezování i samotný varní výtěžek. Při šrotování je snaha co nejméně poškodit pluchu a dobře vymlít endosperm zrna. Kromě nerozpustné celulosy obsahuje plucha rovněž polyfenoly, pentosany a hořké a barevné látky. S mírou poškození pluchy roste míra vyluhování těchto látek, a ty negativně ovlivňují chuť piva. Jemné rozemletí endospermu tvoří předpoklad pro vysoký varní výtěžek. Šrot má mít co nejmenší podíl hrubé krupice, naopak co největší podíl krupice jemné [1].

Smísení sladového šrotu s vodou se nazývá vystírání. Praktikuje se mísení sladového šrotu se čtyřnásobným množstvím vody, za intenzivního míchání a zvýšení teploty. Při vystírání musí být slad dokonale rozmíchán tak, aby se vytvořila hustá tekutina. Rmutování je proces, při kterém se snažíme o převedení žádoucích složek extraktu varních surovin do roztoku. Jedná se především o škrob a vhodný podíl bílkovin a dalších složek jako jsou lipidy, fosforečnany a hemicelulosa. Princip rmutování je založen na působení sladových enzymů, které rozrušují škrob, bílkoviny a také další skupiny. Škrob je postupně pomocí sladových amylas zcukřován. Rmutovacím postupem vzniká hustá suspenze mláta ve vodném roztoku extraktivních látek tj. sladina, je vytvořen základní chuťový charakter piva. Sladina má zlatavou barvu, sladkou chuť a výraznou sladovou vůni. Hořké chmelové látky chmele se do sladiny dostávají až v průběhu operací, jež probíhají chmelovaru a díky působení alkoholu, který vzniká při kvašení kvasinek [1[18[20].

Scezování sladiny patří z pohledu technologie mezi nejnáročnější operace. Scezování sladiny je převážně fyzikálním procesem, který probíhá ve dvou fázích, při nichž se snažíme oddělit zbytek sladového šrotu od roztoku, do něhož již byly převedeny pivovarsky cenné látky. V první fázi – scezování předku – se díky filtrační vrstvě oddělí hlavní podíl sladiny

ze suspenze. V druhé fázi – vyslazování mláta – probíhá promývání a opětovné scezování sladových zbytků horkou vodou. Promytím (vyslazením) se získá zředěná sladina zvaná výstřelky. Oba takto získané podíly se smíchají ve sběrači mladiny nebo v mladinové pánvi [1].

2.2.2 Chmel, chmelovar

Jednou ze tří vstupních surovin je chmel otáčivý (*Humulus lupulus*), z něhož jsou používány sušené chmelové hlávky. K pivovarským účelům se používají pouze rostliny samičí. Chmel je popínavá vytrvalá rostlina původem z Evropy, Asie a Severní Ameriky. Odrůdy chmele jsou však zdárně šlechtěny i v Austrálii a na Novém Zélandu [18].

V České republice je pěstování chmele na vysoké úrovni a značné procento produkce se vyváží do zahraničí. Pěstuje se několik druhů chmele, každá odrůda má své kvalitativní faktory, jimiž se odlišuje od ostatních. U nás je v současné době povoleno pěstování několika odrůd Žateckého červeňáku. Ze zahraničních jsou nejznámější odrůdy Hersbrucker, Tettang, Norther Brewer a další. Typicky hořkou chuť chmele tvoří α -hořké kyseliny a β -hořké kyseliny, které se nacházejí v chmelových pryskyřicích. Při charakteristice odrůd se uvádí jejich poměr, který je důležitý pro výslednou chuť piva. K pivovarsky cenným látkám patří také silice a polyfenoly. Chmelové silice jsou směsí několika stovek látek převážně terpenického charakteru. Těkavé složky silic tvoří aroma chmele.

Z důvodu usnadnění manipulace, skladování, a lepšího využití nejdůležitějších chmelových složek při výrobě piva se dnes využívají různé typy chmelových výrobků, které nahradily celé chmelové hlávky. Jsou to:

- výrobky připravené mechanickými úpravami hlávkového chmele (mleté a granulované chmele, bez nebo se standardizovaným obsahem α -hořkých kyselin)
- výrobky připravené fyzikálními úpravami přírodního hlávkového chmele (nemodifikované chmelové extrakty připravené pomocí různých rozpouštědel)
- výrobky připravené chemickými úpravami (chemicky upravený celý hlávkový chmel nebo jeho jednotlivé složky – např. α -hořké kyseliny ve formě výluhu nebo extraktu).

Poslední operací varného procesu je chmelovar. Sladina, získaná scezováním, se vaří v mladinové pánvi s chmelem 90-120 minut, u moderních systémů kratší dobu. Výsledným produktem je horká mladina, od níž jsou odděleny zbytky chmele a vysrážené látky. Při tomto procesu dochází k fyzikálně-chemickým změnám, které stabilizují koncentraci a složení mladiny. V mladině se rozpouštějí se hořké látky chmele. Intenzita hořkosti a její charakter jsou dány nejen odrůdou, ale i technologií chmelovaru. Horká mladina je nakonec ochlazená na zákvasnou teplotu [1][13][18].

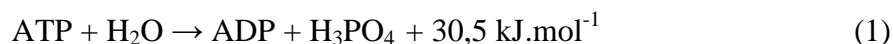
2.2.3 Proces kvašení

Další technologický krok výroby piva v kvasných kádích je zakvašování a provzdušňování. Cílem zakvašování je rozšíření kvasinek do celého objemu zchlazené mladiny a zvýšení obsahu kyslíku tak, aby byl nastartován metabolismus kvasinek. Kvašení probíhá v prostoru, který se nazývá spilka. Je to místnost, která musí být náležitě větrána, tepelně izolována a udržována na maximální hygienické úrovni. Původní kvasné kádě byly z dubového či modřínového dřeva. Dnes se z důvodu snadnější sanitace přistoupilo ke kádím betonovým, kde speciální nátěr znemožňuje tvorbu pivního kamene. Ze stejného důvodu se využívají také kádě smaltované železné, hliníkové či ocelové. Za současného provzdušnění je do kvasných kádí přiváděna mladina. Obvyklá hodnota rozpuštěného kyslíku je 6 až 8 mg.l⁻¹. Zakvašuje se „na ujato“, kdy se míchá rozkvašená mladina s provzdušněnou mladinou. Nebo se po zředění a vitalizaci aplikují lisované či sušené kvasnice [1].

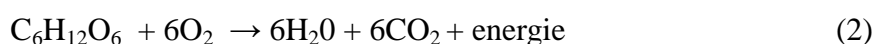
Následuje hlavní kvašení, při němž v metabolismu kvasnic dochází ke zpracování podstatné části zkvasitelného extraktu. Kmen kvasinek má zásadní význam při vytváření charakteru hotového výrobku. Má vliv na průběh technologického procesu – rychlost a hloubku prokvašování, rychlost sedimentace, filtrovatelnost i sensorické vlastnosti piva. Běžně se dává 15 až 30.10⁶.ml⁻¹ mladiny. Větší zákvasná dávka se používá z důvodu potlačení kontaminace na začátku kvašení. Start kvašení a celý jeho průběh je rychlejší. Menší zákvasná dávka zpomaluje kvašení a v případě jejího použití se tvoří více sensoricky aktivních látek. Na konci kvašení kvasinky sedimentují, čímž s sebou strhávají část kalicích látek, a dopomáhají tak k čištění. Celková doba hlavního kvašení je 6 až 10 dní. Počet dnů by měl být stejný nebo nižší, než byl původní extrakt (tzv. stupňovitost) mladiny [1].

Pivo není příliš vhodné prostředí pro růst mikroorganismů. Díky nízkému pH, anaerobním podmínkám (CO₂), hořkým chmelovým látkám, obsahu alkoholu a klesajícímu obsahu zkvasitelných cukrů tvoří pivo selektivní prostředí pro řasu mikroorganismů. V tomto prostředí část mikroorganismů rychle odumírá, část se vyskytuje v latentní formě. K těmto mikroorganismům náleží většina tepelně rezistentních bakterií vytvářející endospory, hlavně bacily a klostridia. Proto se někdy provádí ošetření piva krátkodobým šetrným zahřevem či pasterací přímo v lahvích nebo ještě před plněním v průtokovém nebo tunelovém pastéru. Tento tepelný zákrok také zmírní rozmnožování a vegetování patogenních mikroorganismů [1].

Cílem kvašení piva je řízená přeměna sacharidů na alkohol a CO₂, zároveň vytvoření vhodných organoleptických vlastností piva. Při kvašení se vytváří chuťový charakter piva, jenž je ovlivňován nejen hlavními produkty kvašení, ale i obsahem vyšších alkoholů, esterů, ketonů, aldehydů, sloučenin síry aj. Průběh kvašení je závislý na mnoha faktorech, jako jsou složení mladiny, druh použitých kvasnic, zákvasná dávka, teplota kvašení, tlak, objem a tvar nádob apod. Kvasinky nejlépe využívají jednoduché cukry (glukosa, fruktosa, manosa, galaktosa), disacharidy (sacharosa, maltosa) a trisacharidy (rafinosa, maltotriosa). Jednoduché cukry jsou přes buněčnou stěnu transportovány difuzí, sacharosa je v buňce přeměňována na fruktosu a glukosu prostřednictvím enzymu invertasy. Jednoduché cukry jsou v buňce následně přeměňovány na fruktosu-6-fosfát, jež vstupuje do glykolýzy cukrů. Glykolýzou získává buňka energii v podobě adenodintrifosfátu -ATP, jež má schopnost akumulovat energii. Energie se uvolňuje při reakci:



Významným meziproduktem glykolýzy je pyruvát, od něhož může metabolická dráha probíhat dvěma směry. V aerobním prostředí pokračuje metabolismus citrátovým cyklem. Odbourávání uhlíkového řetězce pokračuje až do CO₂. Proces dýchání lze vyjádřit rovnicí:



Pivovarsky nejvýznamnější částí metabolismu kvasinek je anaerobní přeměna pyruvátu na alkohol, což představuje energetický zisk představuje 2 molekuly ATP.

Při dalších reakcích dochází ke ztrátám energie, což se projevuje jako zahřívání kvasící mladiny. Změnu metabolismu kvasinek při přechodu z anaerobní do aerobní fáze popsal poprvé Louis Pasteur. Zjistil, že kyslík potlačuje produkci alkoholu a zvyšuje produkci CO₂ a biomasy. Tento efekt se nazývá Pasteurův efekt [1].

Dalším krokem je dokvašování piva. Jeho cílem je získání optimálních organoleptických vlastností, nasycení oxidem uhličitým a vyčření. Dokvašování probíhá v prostoru zvaném ležácký sklep - nejčastěji v ležáckých sudech či ležáckých tancích. V tancích je udržován přetlak CO₂ nad hladinou piva – tzv. „hradící tlak“, jenž umožní vytvořit v pivu požadovaný obsah rozpuštěného CO₂. Pro optimální průběh dokvašování musí být ležácký sklep větrán a chlazen [3]. Při dokvašování probíhá celá řada chemických procesů, klesá obsah SO₂, thiolů, mastných kyselin, dochází ke změnám složení, vznikají sensoricky aktivní látky. Důležité jsou interakce bílkovin s polyfenoly, při nichž vznikají nerozpustné zákaly. Při dokvašování je velice důležité čiření piva, které ovlivní průběh filtrace, pěnovost, chuť a kolidní stabilitu piva. Čiřením se rozumí několik procesů, při kterých dochází k fyzikálně-chemickým reakcím a odlučování kalů. Velký význam má čiřící plocha, která je dána nejen tvarem nádob, nýbrž i obsahem kvasnic a bublinek CO₂. Kvasnice během čiření sedimentují a jejich obsah klesá. Při klasické technologii se doporučuje doba dokvašování u výčepních piv (10%) 21 dnů, u ležáků (12%) 70 dnů. Řada piv má své odlišné výrobní postupy. Celková doba dokvašování může potom kolísat v rozmezí 1 až 10 týdnů. Po vyprázdnění ležáckých nádob zůstanou na dně kvasnice, jež spadají do kategorie odpadů [1].

2.2.4 Filtrace, pasterace piva

Filtrace piva je nutná pro odstranění zákalotvorných částic, zbylých kvasničných buněk a snížení obsahu bakterií, které se neoddelily sedimentací po skončení hlavního kvašení. Zákalotvorné podíly by již ve stočeném pivu v transportním obalu mohly vytvořit zákaly. Oddělování kalových částic probíhá na několika principech. Síťový efekt – při něm se oddělují hrubé částice, které jsou natolik velké že neprojdou do filtrační přepážky. Pevné částice vytvářejí stále silnější, méně propustnou vrstvu. Mechanické zachycování částic ve filtrační vrstvě – částice se mechanicky zachycují na filtrační přepážce, tvořené vysokopo-

rézním materiálem. Adsorpční efekt – nejjemnější částice se zachycují uvnitř přepážky adsorpcí, což je důsledek rozdílného elektrického náboje [1].

Dalším možnou technologickou operací je pasterace. Pasterace se provádí za účelem zvýšení biologické trvanlivosti a mikrobiologické nezávadnosti. V dnešní době se používá ke stabilizaci exportních piv, kde je nezbytné zaručit několikaměsíční trvanlivost. Díky pasteraci dochází k odstranění látek jako jsou vysokomolekulární dusíkaté složky, polyfenoly, kovové ionty a rozpuštěný kyslík, které mohou později vést k vytvoření zákalu piva [5]. V praxi se používají dva druhy pastérů – průtokový a tunelový (sprchový). Průtokový pastér vyžaduje dobrou a účinnou regulaci teploty v závislosti na průtoku, neboť už jen krátké prodloužení vydžovací teploty vede k přepasterování, s negativními důsledky na chuť a vůni piva. Pasterace v průtokovém pastéru se realizuje při pasteračních teplotách 70 až 74 °C. Pasterace piva v tunelovém pastéru je energeticky náročnější, avšak je zde dosaženo pasterizačního efektu spolehlivěji, protože se pasteruje celá uzavřená láhev. Díky používání pasteračních teplot cca o 10 °C nižších dochází k menšímu ovlivnění chuti a vůně piva [1].

3 AMINOKYSELINY

Aminokyseliny se v potravinách vyskytují jako volné (1 %) nebo jako vázané v peptidech a proteinech, v nichž tvoří jejich základní stavební složku. V lidské těle je pro výstavbu bílkovin využíváno 22 aminokyselin. Některé z nich si lidský organismus neumí vytvořit (esenciální aminokyseliny), proto je nezbytné, aby byly přijímány v potravě. Jednotlivé aminokyseliny jsou v těle využívány pro syntézu vlastních bílkovin a jiných dusíkatých látek [29,[36].

Aminokyseliny se dále mohou zapojovat do rozličných derivátů s různými substráty, jako např. sacharidy, lipidy aj. Všechny aminokyseliny lze po vhodné úpravě vzorku určit chromatografickými metodami. Určení obsahu aminokyselin obsahuje 2 kroky: hydrolýzu polymeru a detekci, dále pak jejich kvantifikace. Kvantifikace skutečné hodnoty aminokyselin je důležitá pro farmaceutické a potravinářské účely. Není to tak dávno, co se proteiny identifikovaly pouze díky analýze aminokyselin [23,24].

3.1 Stanovení aminokyselin v bílkovinách

Stanovení celkového obsahu aminokyselin v potravě je soubor analytických procesů. První a nezbytný krok je hydrolýza proteinu, důležitá pro uvolnění aminokyselin a dále jejich detekce a kvantifikace [28][30][35].

Stanovení obsahu a druhu aminokyselin je nezbytné pro identifikaci proteinu z databáze. Kvantifikace skutečné hodnoty aminokyselin v proteinu je důležitá pro potravinářské, ale i farmaceutické účely. Určení obsahu aminokyselin v potravinách je důležité pro sledování nutriční hodnoty potraviny, což souvisí i se současným trendem zdravé výživy. Hraje také významnou roli při klinických, diagnostických a mikrobiologických studiích.

3.2 Hydrolýza aminokyselin

Hlavním předpokladem úspěšné analýzy je uvolnění všech aminokyselin z proteinu. Provádí se hydrolýza, která se volí podle účelu analýzy. Faktory, které zásadně ovlivňují průběh hydrolýzy jsou: teplota, čas, hydrolyzační činidla a další příměsi. Pro správný výběr hydrolyzační metody je důležitý optimální poměr těchto faktorů, při němž musíme brát na zřetel méně stabilní aminokyseliny. Hydrolýza je považována za nejvíce problematický a kritický krok. Kvantitativní uvolnění všech aminokyselin je hlavní předpoklad pro zdařilou

analýzu, proto se často přistupuje ke kombinaci několika hydrolyzačních metod. Přizpůsobení podmínek hydrolýzy musí být kompromisem mezi provedením reakce a zachováním reakčních produktů. V průběhu let se laboratoře snažily o zdokonalení hydrolyzačních postupů, byly vyvinuty plně automatizované přístroje, stále nebyla nalezena optimální metoda, kterou bychom dokázali uvolnit všechny aminokyseliny, aniž by docházelo ke ztrátám. Automatické přístroje jsou dnes používány především pro přesnější kontrolu podmínek hydrolýzy. Pro dosažení uspokojivé přesnosti výsledků se používá modelace závislosti obsahu aminokyselin na čase hydrolýzy, přičemž by měly být dodrženy následující podmínky [30][31]:

- 1) s použitím nejméně 10 hydrolyzačních intervalů
- 2) minimálně s 1 – 2 hydrolyzačními intervaly většími než 100 hodin
- 3) s maximem hydrolyzačních intervalů, které se blíží maximu na hydrolyzační křivce

Hydrolýzu lze provést obecně třemi způsoby: kysele, zásaditě a enzymaticky.

3.2.1 Kyselá hydrolýza

Nejběžnější používanou kyselinou, která se již řadu let využívá pro kyselou hydrolýzu v potravinářství je HCl. Vyzkoušeno bylo již však spoustu jiných kyselin, např. metansulfonová kyselina, p-toluensulfonová a sulfonová kyselina. Hlavní výhodou HCl je, že může být použita jak v kapalně, tak v plynné fázi (vhodné pokračování elektroforetických metod). Kyselá hydrolýza je běžně prováděna jako zahřívání vzorku působením tepelné či radiační energie za přítomnosti kyseliny. Po hydrolýze může být odpařena a hydrolyzát je následně regenerovaný v malém množství pufru. Takováto hydrolýza může být provedena i při analýze malého množství vzorku a limitující pro zdařilou analýzu je pouze množství proteinu ve vzorku. Obvykle je používána 6 mol.l^{-1} HCl, při které je vzorek vystaven teplotě $110 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 20 – 24 hodin bez přítomnosti vzduchu. Obdobný účinek vykazuje také hydrolýza 6 mol.l^{-1} HCl při $145 \text{ }^\circ\text{C}$, doba působení 4 hodiny [30][31][34].

U některých aminokyselin dochází při kyselé hydrolýze k jejich uvolňování, zatímco u jiných již k jejich destrukci. Příčinou postupného uvolňování či destrukce aminokyselin je rozdílná pevnost peptidové vazby a její stabilita v kyselém prostředí mezi jednotlivými aminokyselinami, což má významný efekt v jejich soudržnosti ve struktuře proteinu [33].

Například nedostatečně dlouhá doba hydrolýzy vede k neúplnému rozštěpení peptidové vazby u některých aminokyselin a tak k jejich nedostatečnému uvolnění a nepřesnému stanovení peptidu či proteinu.

Tryptofan je většinou destruován úplně, zatímco sirné aminokyseliny jen částečně. Za podmínek kyselé hydrolýzy dochází také ke konverzi asparaginu a glutaminu na kyselinu asparagovou a glutamovou [37]. Ztráty vykazují také cysteová kyselina, serin a tyrozin, jenž je citlivý na přítomnost nečistot. Bezprostředně před analýzou se k vzorku přidávají ochranná činidla, která mají snížit ztráty aminokyselin během hydrolýzy, bývá to např. fenol, thioglykolová kyselina, merkaptoetanol, indol a tryptamin [28[30].

Občas se pro kyselou hydrolýzu používá také kyselina methansulfonová, jejíž výhodou je možnost stanovení tryptofanu a metionin sulfidu (produkt oxidace metioninu).

Některé vazby mezi alifatickými aminokyselinami (isoleucin-isoleucin, valin-valin, isoleucin-valin) [33] jsou obtížně hydrolyzovatelné a jsou vůči hydrolýze do 24 hodin částečně odolné. Pro rozštěpení takovýchto vazeb musíme vzorek vystavit působení teploty 110 °C v časovém intervalu 92 - 120 hodin. To ale znamená ještě větší ztrátu málo stabilních aminokyselin jako jsou serin a threonin. Dobu hydrolýzy lze zkrátit působením mikrovlnného záření, při němž je vzorek díky vyzařování energie ohříván až na teplotu 180 °C. Přenos energie se uskutečňuje na základě polarizace. Pro kapalnou fázi se čas zahřívání vzorku zkrátí na 1-30 minut a pro plynou 20 – 45 minut. Výsledky jsou obdobné jako u hydrolýzy s působením tepelné energie [28[30].

Řešením může být modelování uvolňování a degradace jednotlivých aminokyselin pomocí nelineární regresní analýzy a stanovení korekčního faktoru. Korekční faktory lze stanovit pro standardní dobu hydrolýzy:

- a) extrapolací obsahu aminokyselin v čase 0
- b) s použitím maxima na hydrolyzační křivce [33].

3.2.2 Alkalická hydrolýza

Alkalická hydrolýza se používá především pro stanovení tryptofanu, jenž je při hydrolýze kyselý destruován. Tryptofan je jedna z esenciálních aminokyselin, která je důležitá pro správné fungování centrálního nervového systému. Tryptofan je v alkalických podmínkách poměrně stabilní, dochází však ke částečným nebo úplným ztrátám serinu, threoninu, argininu a cysteinu. Pro alkalickou hydrolýzu se nejčastěji používá NaOH, KOH, LiOH nebo Ba(OH)₂ [37].

3.2.3 Enzymatická hydrolýza

Enzymatická hydrolýza probíhá v mnohem mírnějších podmínkách než hydrolýza kyselá a alkalická. Je to často děj zdlouhavý a díky specifitě proteáz také nedokonalý. Její hlavní předností je, že umožňuje stanovení asparaginu a glutaminu.

3.3 Detekce a kvantifikace aminokyselin

V tomto kroku dochází i stanovení a druhu a množství aminokyseliny. Aminokyseliny lze stanovit mnoha chromatografickými a elektromigračními metodami, z nichž se některé vyvinuly speciálně pro detekci aminokyselin. Před samotnou detekcí je nutná derivatizace aminokyselin.

K nejběžněji používaných technikám patří iontově-výměnná chromatografie a vysokoučinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography) vybavená zejména UV/VIS nebo fluorescenčními detektory. Obě tyto metody využívají před- kolonovou, častěji však post-kolonovou derivatizaci aminokyselin. U HPLC s předkolonovou derivatizací a UV/VIS detekcí bývá nevýhodou poměrně náročná a drahá příprava vzorků a nižší mez stanovitelnosti, také experimentálně náročná předkolonová derivatizace uvolněných aminokyselin.

Jako post-kolonové hydrolyzační činidlo se využívá nejčastěji ninhydrin a o-ftthalaldehyd (OPA). Využití ninhydrinu je značně široké, lze jej využít při stanovení mnoha aminokyselin. OPA je využíván pro svou vysokou citlivost, nevýhodou je ovšem malá stabilita vzniklých derivátů.

Postupem času vzniklo spoustu nových a moderních metod, které zrychlovaly a rozšiřovaly analýzu. Avšak tyto metody ukázaly řadu nedostatků. Nejspolehlivější a nejvýznamnější metodou zůstává i nadále klasické stanovení aminokyselin.

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda založená na separaci urychlených ionizovaných částic (iontů) ve vakuu, kde se tyto částice dělí podle jejich hmotnosti při průchodu magnetickými a elektrickými poli.

Plynová chromatografie – je jedna z chromatografických metod, jež je založena na nepřetržitě ustalování rovnováhy mezi mobilní (plynnou) a stacionární fází (pevná látka nebo kapalina) dělené látky. Každá molekula dělené látky neustále přechází z pohybující se plynné fáze na povrch adsorbentu nebo do filmu kapaliny a zase zpět do plynné fáze[30].

4 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA KYSELINY MLÉČNÉ

Kyselina mléčná patří mezi typické organické kyseliny, jež jsou používány v různých, především potravinářských odvětvích jako např. výroba nutričních doplňků. V uplynulých letech proběhly také studie zaměřující se na využitelnost kyseliny mléčné při biodegradaci plastů. Je to látka, která tvoří bezbarvé krystaly. Disociační konstanta (K_D) kyseliny mléčné je 3,86 [26].

Disociační konstanta je typem rovnovážné konstanty podle Guldberg-Waagova zákona. Disociace kyselin a zásad v roztocích vede k ustavení protolytické rovnováhy [23][26], kterou charakterizují disociační konstanty – disociační konstanta kyselin K_A a disociační konstanta zásad K_B , které udávají sílu kyselin a zásad, kdy obecně platí, že vyšší disociační konstanta odpovídá většímu množství disociovaných molekul a vyšší síle kyselin a zásad.

Disociace je není u všech elektrolytů stejná. Míru disociace určuje disociační stupeň α , což je poměr počtu disociovaných molekul k počtu všech rozpuštěných molekul.

$$\alpha = \frac{\text{množství disociovaných molekul}}{\text{množství všech molekul}} \quad (3)$$

Podle stupně disociace dělíme elektrolyty na silné a slabé.

Slabé elektrolyty jsou ve vodném prostředí disociovány jen málo, jejich převážná část se vyskytuje ve formě nedisociovaných molekul. Mezi slabé elektrolyty patří slabé kyseliny jako jsou organické kyseliny, kyselina uhličitá, sirovodíková a slabé zásady. U slabých elektrolytů se mezi ionty a nedisociovanými molekulami ustanoví rovnováha. Tento jev lze popsat rovnicí disociace jednosytné slabé kyseliny.



Tento rovnovážný stav lze vyjádřit konstantou, kterou u elektrolytické disociace nazývá disociační konstantou K_D :

$$K_D = \frac{[H^+] \cdot [A^-]}{[HA]} \quad (5)$$

$[H^+]$ a $[A^-]$ vyjadřují rovnovážné koncentrace iontů a $[HA]$ molární koncentraci nedisociovaných molekul kyseliny [23][24][38].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo:

- pomocí nelineární regrese modelovat závislost obsahu sledovaných aminokyselin na době kyselého hydrolyzy u bílkoviny pivovarské biomasy
- porovnat hydrolyzační křivky pro sledovaných patnáct aminokyselin pro hydrolyzu pomocí HCl, 20, 40 a 60% kyselinu mléčnou
- na základě hydrolyzačních křivek vypočítat korekční faktory pro jednotlivé aminokyseliny pro hydrolyzu pomocí HCl

6 METODIKA PRÁCE

6.1 Popis experimentu

Byl analyzován vysušený vzorek kvasničné biomasy, který byl pro experiment poskytnut pivovarem Zubr. Vzorek byl hydrolyzován různými způsoby, a následně byl sledován průběh hydrolýzy.

6.2 Kyselá hydrolýza

Byl analyzován vzorek biomasy získané jako odpadní produkt při výrobě piva. Přesně navážené množství vzorku bylo zalito 15 ml HCl (6mol.l^{-1}) a pro vytěsnění kyslíku ze skleněné lahvičky byl vzduch vytěsněn argonem po dobu 1 minuty. Uzavřené lahvičky byly umístěny do termobloku, kde byly vystaveny teplotě $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1, 3, 6, 9, 12, 18, 21, 24, 48, 72, 96, 120 a 144 hodin. Pro kontrolu a přesnější měření byl tento postup pro jednotlivé vzorky opakován až devětkrát. Po ukončení hydrolýzy byl vzorek v lahvičce ochlazen a kvantitativně převeden do odpařovací baňky, ve které byl posléze odpařen. Poté byl dávkovacím pufrům 2,2 rozředěn do 25ml odměrných baněk. Směs byla přefiltrována přes mikrofiltr ($0,45\mu\text{m}$) a následně vložena v ampulkách do analyzátoru a podrobena analýze.

Pomocí iontově-výměnné chromatografie byla provedena detekce a kvantifikace vzorku. Množství $100\ \mu\text{l}$ hydrolyzátu v dávkovacím pufru bylo nastříknuto do analyzátoru aminokyselin AAA400 opatřeného kolonou ($370\times 3,7\text{ mm}$, naplněná ionexem Ostion LG ANG – Ingos, Praha). Vzorky byly podrobeny post-kolonové derivatizaci s ninhydrinem a vyhodnoceny spektrofotometrickým detektorem (440 nm pro prolin a 570 nm pro ostatní aminokyseliny). Aminokyseliny z kolony vycházely podle programu: 0-5 min. pufr A; 5-32 min. pufr B; 32-44 min. pufr C; 44-73 min. pufr D. (Složení sodno-citrátových pufrů je uvedeno v tabulce 1, je doporučeno výrobcem AAA 400). Teplota kolony byla nastavena na $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 0-60 min a 90-102 min. a na $74\text{ }^{\circ}\text{C}$ v době 60-90 min.

Tato práce se nezabývala aminokyselinami cystein, tryptofan a methionin pro jejich labilitu v podmínkách kyselé hydrolýzy.

6.3 Analýza dat

Závislost obsahu uvolněných aminokyselin (B) na době hydrolyzy (t) v kvasničné biomase lze vyjádřit následující rovnicí:

$$B(t) = \frac{A_0 h}{h-l} (e^{-lt} - e^{-ht}) + \varepsilon \quad (6)$$

kde:

$B(t)$ značí obsah uvolněných aminokyselin (g/kg) v čase t (h);

A_0 je původní hodnota aminokyselin v proteinu před hydrolyzou (g/kg), v čase $t=0$;

h je míra uvolňování vázané aminokyseliny do volné, stanovitelné formy;

l je míra degradace aminokyseliny;

ε je nahodilá zbytková chyba způsobená různými faktory při měření [30][33],[34].

Regresní analýza byla provedena pro modelaci hydrolyzační křivky pro HCl. Parametry A_0 , h a l pro konkrétní protein byly odvozeny použitím nelineární regrese za podmínek, že $A_0 > 0$, $h > 0$ a $l \geq 0$ z hodnot naměřených pro různé hydrolyzační časy. Byla použita Marquardt-Levenburg metoda aplikovaná ve statickém softwaru Unistat 5.5. Tento model lze použít pro všechny aminokyseliny včetně těch, které vykazují během hydrolyzy ztráty. Studie prokázaly, že při použití tohoto hydrolyzačního modelu lze získat objektivní výsledky již při aplikaci pěti hydrolyzačních intervalů. S rostoucím počtem hydrolyzačních intervalů lze však dosáhnout lepšího a přesnějšího výsledku, který umožní reálnější odhad složení aminokyselin v proteinu [33]. Na základě odhadnutých parametrů (A_0 , h a l) byly vypočítány hodnoty obsahu sledovaných aminokyselin pro hydrolyzační časy 21, 48 a 144 hodin a srovnány se skutečně naměřenými hodnotami.

Tabulka 1 Použité sodno-citrátové pufrů pro objem 1l.

CHEMIKÁLIE	PUFR				
	A	B	C	D	dávkovací pufr
Citronová kyselina monohydrát	11.11	10.00	7.53	0	14
Citran sodný dihydrát	4.04	5.60	9.06	19.60	0

Chlorid sodný	9.29	8.36	18.00	52.60	11.50
Kyselina boritá	0	0	0	2.05	0
Azid sodný	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Hydroxid sodný	0	0	0	0.50	0
Thioglykol (ml)	2.50	2.50	2.50	0	5.00

Kvalita navrženého modelu byla posouzena pomocí korekčních faktorů (r). Hodnota korekčních faktorů byla vypočtena pro hydrolýzu HCl jako podíl hodnoty A_0 z nelineární regrese a výtěžku chemické analýzy za 24 h.

Korekční faktory pro sledované aminokyseliny byly již popsány i v některých studiích [34]

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Regresní parametry

V praktické části byla sledována bílkovina pivovarské biomasy. Byl sledován obsah 15 aminokyselin v jednotlivých hydrolyzačních časech a druhu použité kyseliny.

Tabulka 2 znázorňuje regresní analýzou odhadnuté hodnoty regresních parametrů pro hydrolyzu HCl pro stanovované aminokyseliny v pivovarské biomase. Průběh závislosti obsahu jednotlivých aminokyselin na době hydrolyzy znázorňují grafy 1-15. Lze obecně říci, že k největšímu uvolňování aminokyselin docházelo mezi 10 a 20 hodinou hydrolyzy. O uvolňování po 20 hodině hydrolyzy svědčí nízké hodnoty rychlosti uvolňování (h) pro valin, isoleucin a leucin. Obtížná hydrolyzovatelnost valinu a isoleucinu byla popsána i v literatuře [28][31].

Vyšší míra ztráty (l) při podmínkách kyselé hydrolyzy byly zjištěny pro nestabilní aminokyseliny threonin, serin a tyrozin.

Nestandardní hodnoty vykazuje histidin, který má ve srovnání s ostatními aminokyselinami netypický průběh hydrolyzační křivky, s čímž jsme se již dříve setkali při hydrolyze kaseinu a modelových vzorků tavených sýrů [30].

Tabulka 2. Hodnoty odhadnutých parametrů A_0 (zjištěný obsah aminokyselin v biomase), h (rychlost uvolňování aminokyselin) a l (míra ztráty aminokyselin) získaných nelineární regresí

Aminokyseliny	A_0	h	l
Asparagová kyselina	35,2605	1,1116	0,0008
Threonin	17,0823	0,6914	0,0030
Serin	17,7486	1,3414	0,0065
Glutamová kyselina	39,4021	1,3435	0,0005
Prolin	13,1671	0,9249	0,0001
Glycin	16,1650	1,0968	0,0001
Alanin	20,4272	1,7105	0,0001

Valin	19,9185	0,3620	0,0001
Isoleucin	15,5865	0,3081	0,0001
Leucin	15,5865	0,3081	0,0001
Tyrozín	12,3257	15,6873	0,0056
Fenylalanin	13,3738	0,8111	0,0001
Histidin	7,8903	85,0602	0,0011
Lysin	24,5250	0,6023	0,0002
Arginin	17,8825	0,6439	0,0009

Tabulka 3. Korekční faktory pro obsah aminokyselin (podíl hodnoty A_0 z nelineární regrese a výtěžku chemické analýzy za 24 h.)

Aminokyseliny	KOREKČNÍ FAKTORY			
	Γ_{HCl}	Γ_{MK20}	Γ_{MK40}	Γ_{MK80}
Asparagová kyselina	0,9237	1,7445	2,0629	5,7230
Threonin	0,9631	18,9088	15,4439	23,6195
Serin	1,0420	12,0771	12,9490	42,5125
Glutamová kyselina	0,9031	27,8692	23,8369	37,9108
Prolin	0,9667	12,3150	10,0403	13,3163
Glycin	0,9009	6,5646	6,4023	5,7833
Alanin	0,8838	2,4606	3,6753	3,3154
Valin	0,9010	13,7423	13,7272	19,3520
Isoleucin	0,8574	13,1312	10,3857	9,3410
Leucin	0,8574	8,5911	9,2742	9,2973
Tyrozín	1,0257	3,6941	10,1801	11,4545
Fenylalanin	0,9223	1,3233	1,7082	2,4180
Histidin	0,9943	24,5884	2,9876	3,2106
Lysin	0,8825	16,4423	12,4347	15,9090
Arginin	1,0487	15,2438	16,0020	28,0521

Tabulka 3 obsahuje přehled korekčních faktorů pro jednotlivé aminokyseliny hydrolyzované pomocí HCl, 20, 40 a 80% kyseliny mléčné.

Pro hydrolyzu HCl se korekční faktory pohybovaly pro většinu aminokyselin kolem hodnoty 1,00. Výjimku tvořily aminokyseliny isoleucin a leucin, u kterých byla hodnota korekčního faktoru nejnižší - 0,85. Poměrně nízký korekční faktor 0,88 vykazoval také alanin a lysin. Nejvyšší korekční faktor byl u serinu a argininu – 1,04.

Pro hydrolyzu organickou kyselinou mléčnou v koncentracích 20, 40 a 80% byly zjištěny velice vysoké korekční faktory pro téměř všechny aminokyseliny. Ze tří použitých koncentrací kyseliny mléčné vykazovala nejvyšší účinnost uvolňování aminokyselin 20% kyselina mléčná. Avšak u žádné z nich nedocházelo k dosažení výtěžku jako u hydrolyzy s použitím HCl. Vypočtené korekční faktory pro kyselinu mléčnou jsou vysoké a nelze je prakticky využít pro analytické účely.

Tabulka 4. Obsah uvolněných aminokyselin vypočtený z regresního modelu pro 21., 48. a 144. hodinu hydrolyzy pomocí HCl a srovnání s hodnotami skutečně naměřenými*

Aminokyseliny	Doba hydrolyzy a srovnání se skutečně naměřenými hodnotami					
	21h		48h		144h	
Asparagová kyselina	38,6 ± 1,46	90,0%*	38,0 ± 2,50	89,50%	30,1 ± 3,06	104,9%
Threonin	16,5 ± 1,54	97,3%	17,1 ± 1,26	87,00%	10,3 ± 1,08	108,9%
Serin	16,2 ± 1,86	97,3%	15,0 ± 1,14	87,00%	6,1 ± 0,66	115,0%
Glutamová kyselina	38,9 ± 3,33	100,3%	44,4 ± 3,01	86,80%	34,4 ± 3,37	107,2%
Prolin	13,4 ± 0,94	98,1%	13,4 ± 0,57	97,80%	12,8 ± 0,43	101,4%
Glycin	15,7 ± 1,02	102,7%	19,1 ± 1,35	84,20%	15,7 ± 1,43	101,5%
Alanin	21,0 ± 1,81	97,1%	22,5 ± 0,43	90,40%	18,7 ± 1,94	107,6%
Valin	19,3 ± 1,10	103,0%	22,1 ± 0,45	89,70%	18,8 ± 1,98	104,5%
Isoleucin	14,8 ± 0,92	105,0%	18,1 ± 0,12	85,70%	14,7 ± 1,76	104,5%
Leucin	23,1 ± 0,92	67,2%	25,4 ± 0,12	61,10%	21,0 ± 1,76	73,1%
Tyrosin	11,4 ± 1,41	96,1%	11,0 ± 0,90	85,60%	4,8 ± 1,01	115,0%
Fenylalanin	13,4 ± 0,72	99,6%	14,5 ± 0,40	91,80%	13,1 ± 1,25	100,6%
Histidin	7,4 ± 0,62	104,2%	8,3 ± 0,27	90,10%	6,5 ± 0,50	103,5%
Lysin	25,0 ± 2,00	97,8%	27,1 ± 0,56	89,70%	22,5 ± 2,30	106,2%
Arginin	18,9 ± 1,93	92,9%	19,4 ± 2,31	88,40%	14,7 ± 1,34	106,9%

*podíl hodnot vypočítaných z modelu a skutečně naměřených

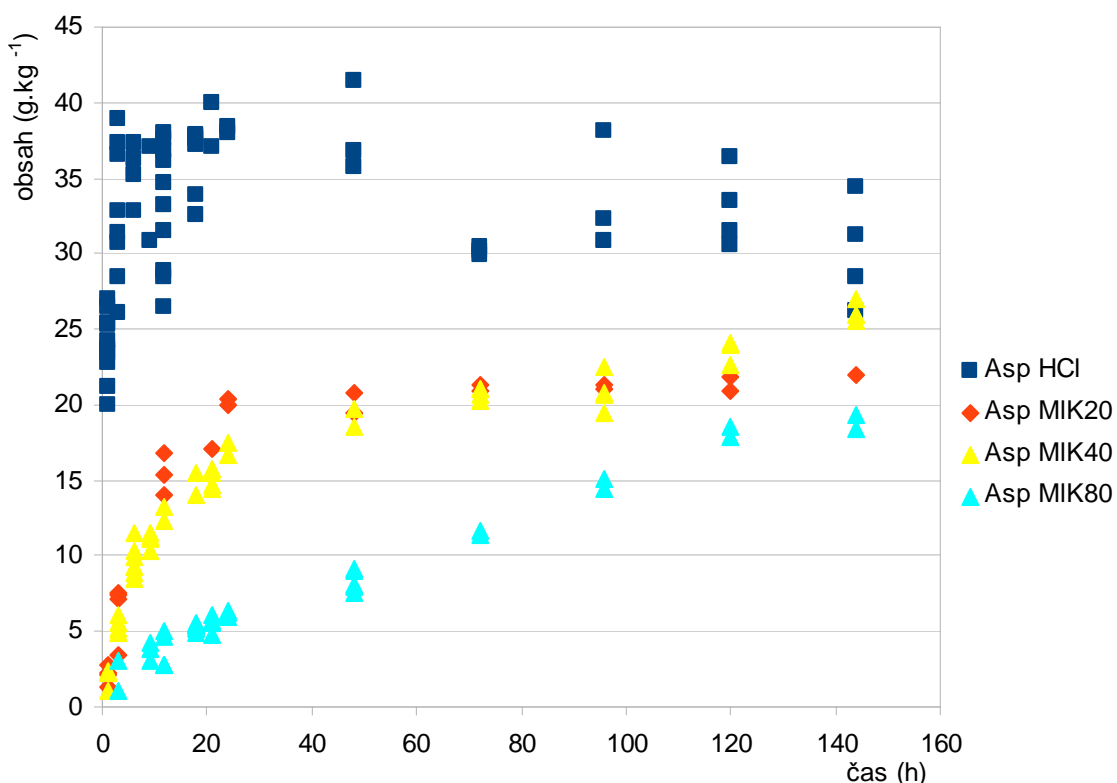
Tabulka 4 vyjadřuje stanovený obsah uvolněných aminokyselin a jejich odchylku od skutečné hodnoty pro. Poměrně relevantních výsledků a to v rozmezí 90-110% odchylky od skutečné hodnoty bylo dosaženo pro 21. a 144 hodinu hydrolyzy. Největší odchylku od spočítané hodnoty vykazoval leucin, serin a tyrozin.

7.2 Hydrolyzační křivky

7.2.1 Kyselina asparagová

Graf 1 znázorňuje průběh uvolňování kyseliny asparagové v závislosti na době hydrolyzy při aplikaci HCl (6 mol.l⁻¹) a kyseliny mléčné o koncentraci 20, 40 a 80%.

Graf 1. Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro kyselinu asparagovou



*Tabulka 5. Obsah kyseliny asparagové v 21., 48. a 144. hodině hydrolyzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolyzou HCl) **

čas (h)	HCl	MIK20	MIK40	MIK80
21	100,00%	44,23%	39,10%	14,37%
48	100,00%	53,06%	50,36%	21,90%
144	100,00%	76,10%	86,81%	62,79%

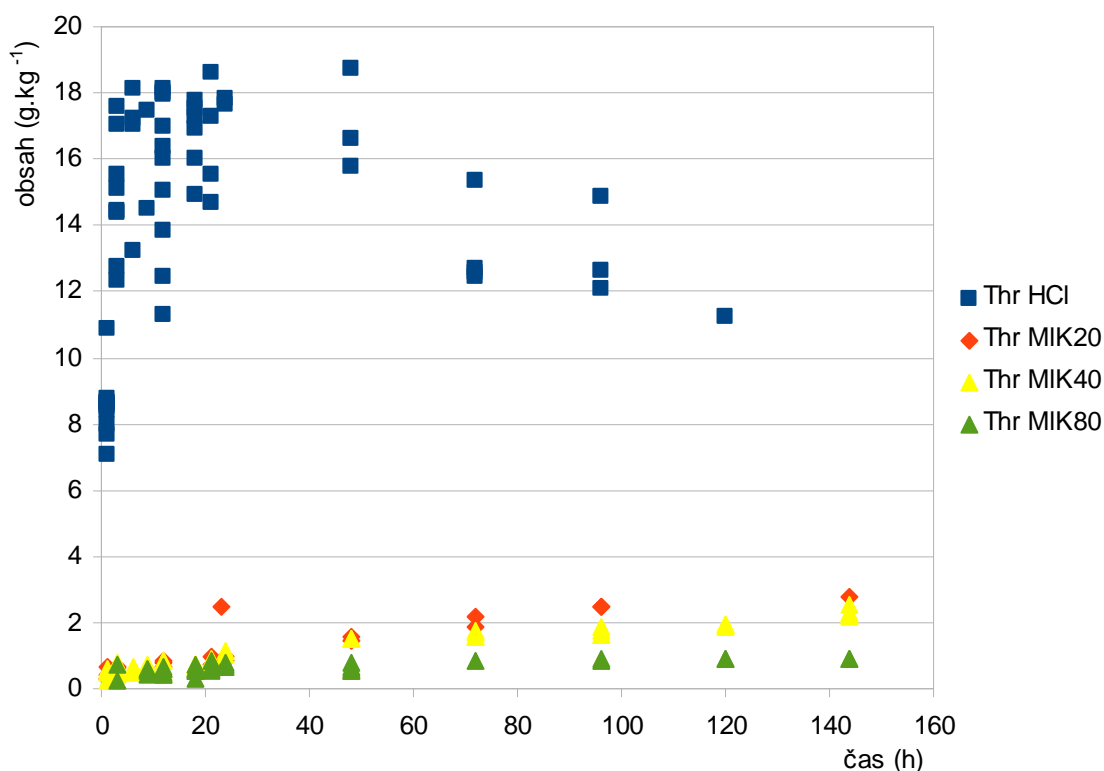
** platí i v pro všechny následující případy*

K největšímu uvolňování kyseliny asparagové docházelo pro všechny použité kyseliny v intervalu hydrolyzy 10 až 20 hodin. Po dosažení 21. hodiny hydrolyzy byl pro 20% kyselinu mléčnou zaznamenán obsah 44,23% hodnoty získané hydrolyzou HCl. Pro 40 a 80% kyselinu mléčnou byly hodnoty ve srovnání s HCl nižší – a to 39,10 a 14,27%. Po 20. hodině hydrolyzy měla křivka pro HCl klesající trend, naopak pro všechny koncentrace kyseliny mléčné rostoucí trend. Po 144. hodině hydrolyzy HCl se hodnoty blížily k obsahu kyseliny asparagové uvolněné hydrolyzou HCl a 20, 40 a 80% kyselinou mléčnou. Pro 20% kyselinu mléčnou to bylo 76,10%, pro 40% kyselinu mléčnou 86,81% a pro 80% kyselinu mléčnou 62,79% hodnoty získané hydrolyzou pomocí HCl. Zdůvodnění vysokého procenta shody s HCl lze hledat v pomalém nárůstu uvolněné kyseliny asparagové využitím kyseliny mléčné a zároveň narůstajícím ztrátám při hydrolyze HCl.

7.2.2 Threonin

Graf 2 znázorňuje uvolňování threoninu v závislosti na době hydrolyzy za použití HCl (6 mol.l^{-1}) a kyseliny mléčné o koncentrace 20, 40 a 80%.

*Graf 2. Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy)
pro threonin*



Tabulka 6. Obsah threoninu v 21., 48. a 144. hodině hydrolyzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolyzou HCl)

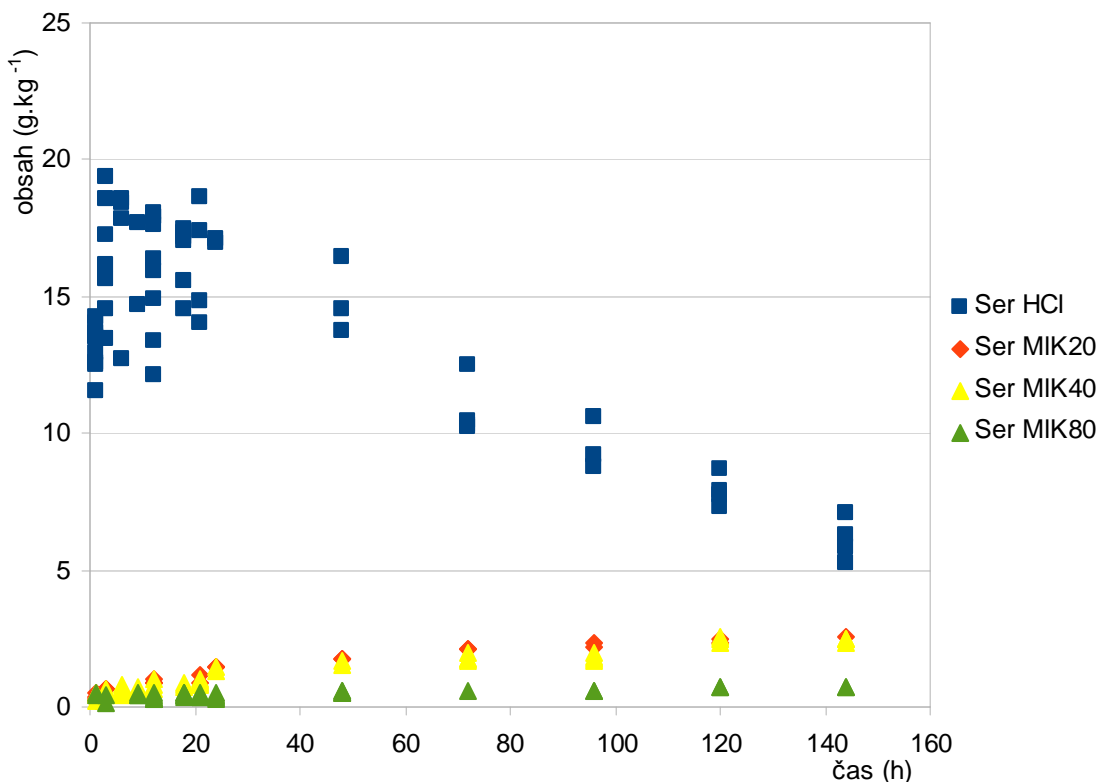
čas (h)	HCl	MIK20	MIK40	MIK80
21	100,00%	5,15%	4,99%	4,04%
48	100,00%	8,71%	8,95%	3,67%
144	100,00%	25,79%	22,67%	8,96%

Z grafu je zřejmý rozdíl, který vyplývá z použití HCl a kyseliny mléčné. Aplikace kyseliny mléčné přináší velice pozvolné uvolňování threoninu. Při aplikaci HCl docházelo k největšímu uvolňování threoninu v intervalu hydrolyzy 10 až 20 hodin. Po 20. hodině hydrolyzy měla hydrolyzační křivka pro HCl značně klesající trend, pro použité koncentrace kyseliny mléčné pozvolna rostoucí trend. V 21. hodině hydrolyzy byl pro použité koncentrace kyseliny mléčné zaznamenán obsah 4-5% uvolněného threoninu ve srovnání s hydrolyzou pomocí HCl. Po 144. hodině hydrolyzy dosáhl obsah threoninu uvolněného 20% kyselinou mléčnou 25,79%, hodnoty získané hydrolyzou pomocí HCl. Pro 40 a 80% kyselinou mléčnou byl obsah nižší.

7.2.3 Serin

Graf 3 znázorňuje průběh uvolňování serinu v závislosti na době hydrolyzy při aplikaci HCl (6 mol.l^{-1}) a kyseliny mléčné o koncentraci 20, 40 a 80%.

Graf 3. Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro serin



Tabulka 7. Obsah serinu v 21., 48. a 144. hodině hydrolyzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolyzou HCl)

čas (h)	HCl	MIK20	MIK40	MIK80
21	100,00%	6,18%	5,71%	2,46%
48	100,00%	11,71%	10,63%	3,61%
144	100,00%	41,17%	39,90%	11,93%

Z grafu 3 je zřejmý rozdíl plynoucí z použití HCl a kyseliny mléčné. Při aplikaci HCl docházelo k největšímu uvolňování serinu v intervalu hydrolyzy 10 až 20 hodin. Po 20. hodině hydrolyzy má křivka pro HCl výrazně klesající trend.

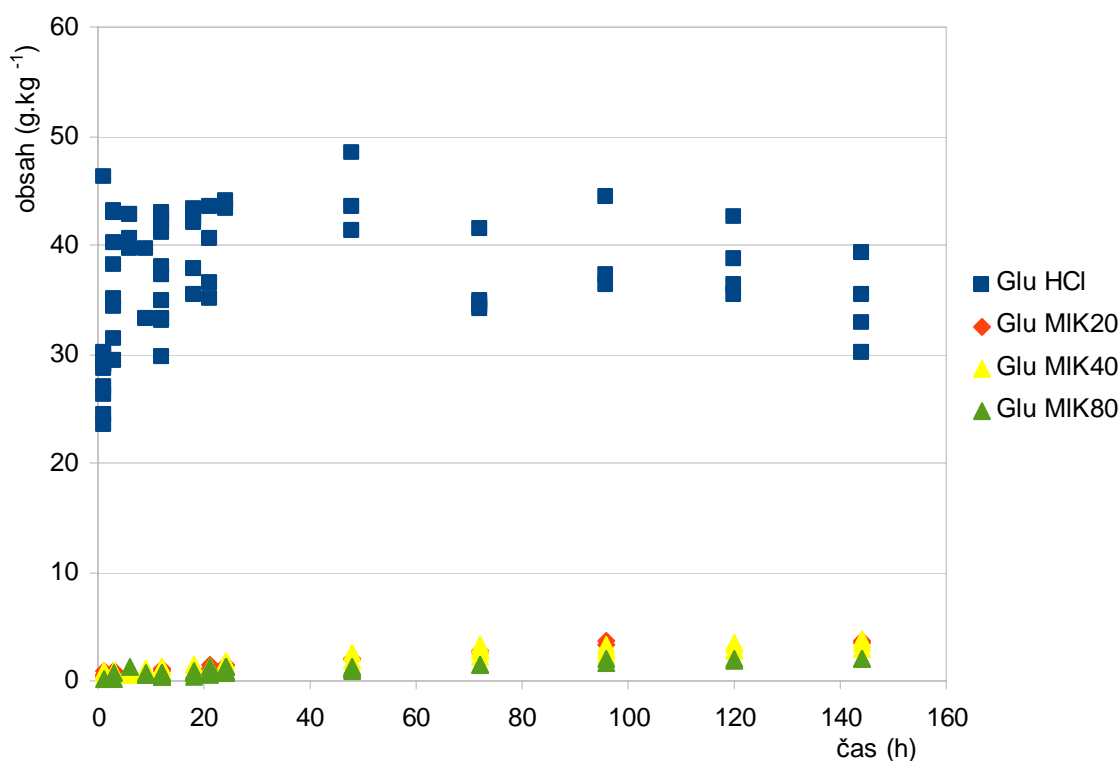
Při použití různě koncentrované kyseliny mléčné docházelo k postupnému a pozvolnému uvolňování serinu, jehož maximální obsah byl zjištěn po 144. hodině hydrolyzy. V 144.

hodině hydrolýzy byl obsah serinu při použití 20 a 40% kyseliny mléčné 41,17 a 39,90% hodnoty získané hydrolýzou pomocí HCl a pro 80% kyselinu mléčnou 11,93%. Vysoké procento shody může být způsobeno ztrátami při hydryze pomocí HCl.

7.2.4 Glutamová kyselina

Graf 4 znázorňuje uvolňování kyseliny glutamové v závislosti na době hydrolýzy za použití HCl (6 mol.l^{-1}) a kyseliny mléčné o koncentraci 20, 40 a 80%.

Graf 4. Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolýzy) pro kyselinu glutamovou



Tabulka 8. Obsah kyseliny glutamové v 21., 48. a 144. hodině hydrolýzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolýzou HCl)

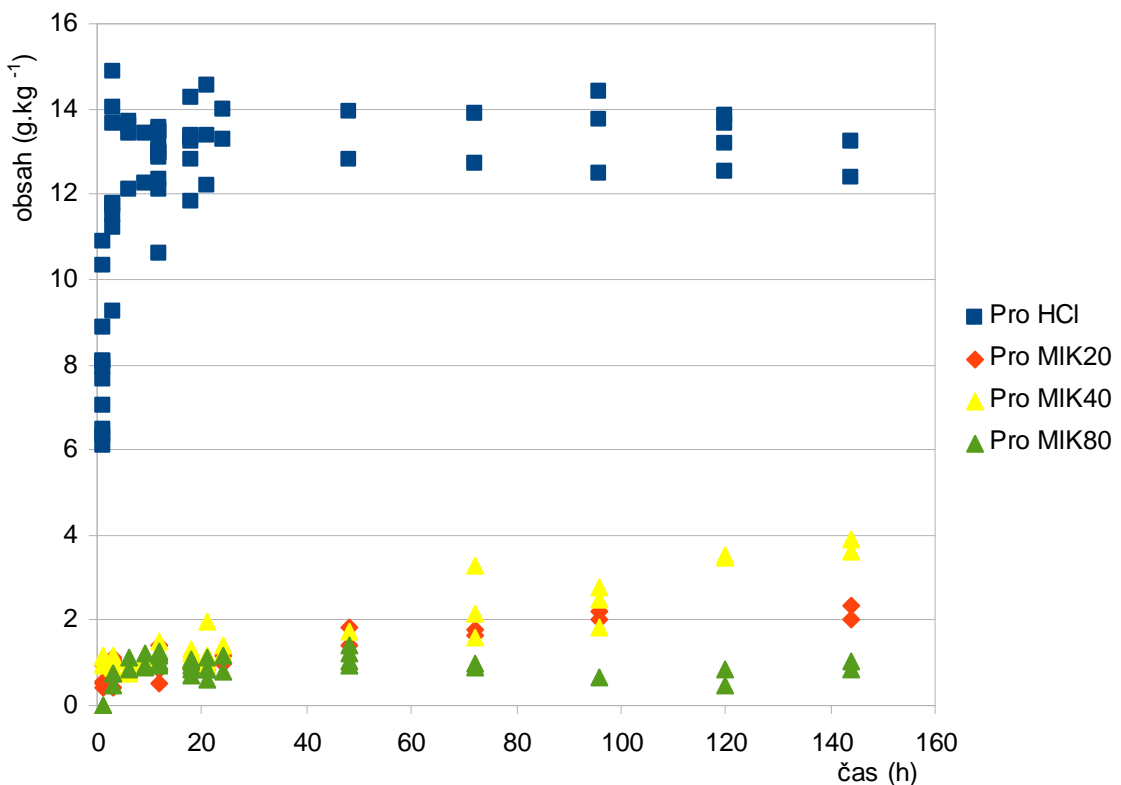
čas (h)	HCl	MIK20	MIK40	MIK80
21	100,00%	3,35%	3,33%	2,21%
48	100,00%	4,66%	4,97%	2,50%
144	100,00%	10,27%	10,00%	5,79%

Z grafu je zřejmý rozdíl, plynoucí z použití HCl a kyseliny mléčné. Při aplikaci HCl docházelo k největšímu uvolňování kyseliny glutamové v intervalu hydrolyzy 10 až 20 hodin. Po 40. hodině hydrolyzy měla hydrolyzační křivka pro HCl mírně klesající trend. Aplikace kyseliny mléčné přináší velice malé a pozvolné uvolňování aminokyseliny. Po 144. hodině hydrolyzy byl pro 20 a 40% kyselinu mléčnou zjištěn obsah kolem 10% hodnoty získané hydrolyzou HCl a pro 80% kyselinu mléčnou 5,79% obsahu uvolněného pomocí HCl.

7.2.5 Prolin

Graf 5 znázorňuje uvolňování prolinu v závislosti na době hydrolyzy za použití HCl (6 mol.l^{-1}) a kyseliny mléčné o koncentraci 20, 40 a 80%.

Graf 5. Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro prolin



Tabulka 9. Obsah prolinu v 21., 48. a 144. hodině hydrolyzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolyzou HCl)

čas (h)	HCl	MIK20	MIK40	MIK80
21	100,00%	6,86%	9,57%	6,41%
48	100,00%	12,03%	13,12%	8,61%
144	100,00%	17,06%	29,20%	7,34%

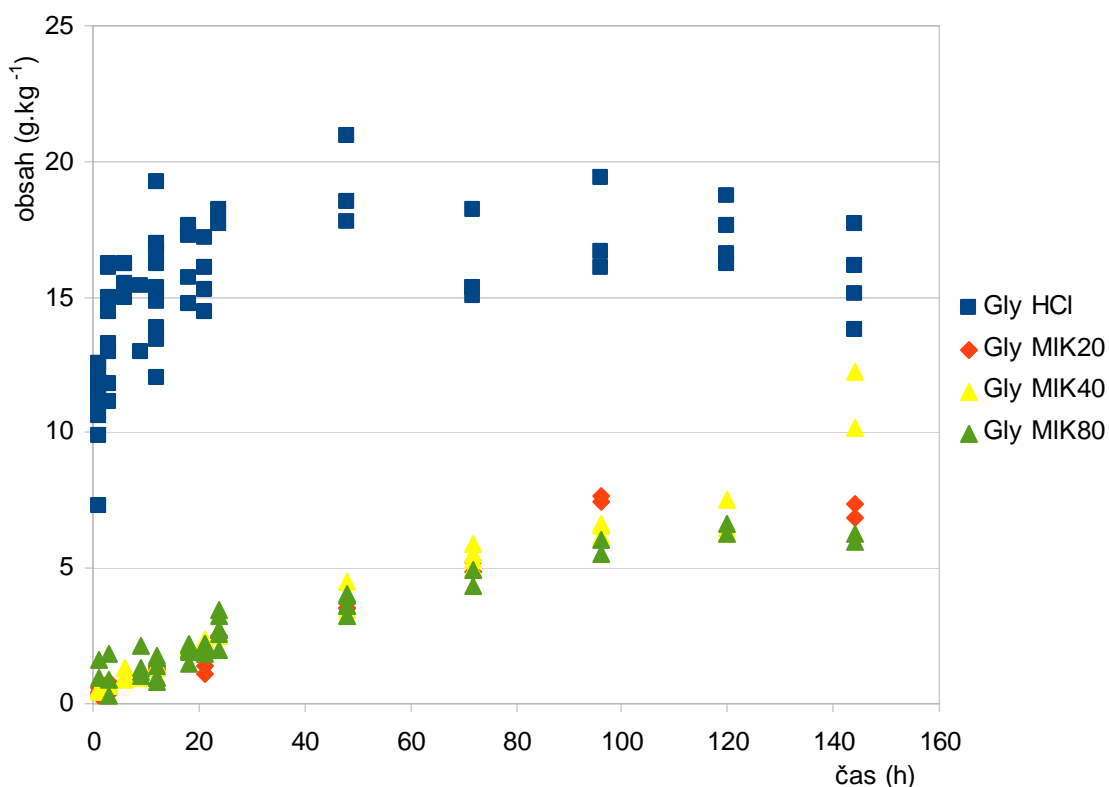
Z grafu je zřejmý rozdíl, který vyplývá z použití HCl a kyseliny mléčné. Aplikace kyseliny mléčné přináší velice malé a pozvolné uvolňování prolinu. Při aplikaci HCl docházelo k největšímu uvolňování prolinu v intervalu hydrolyzy 10 až 20 hodin.

V 21. hodině hydrolyzy se obsah prolinu uvolněného 20, 40 a 80% kys. mléčnou pohyboval pod 10% hodnoty získané hydrolyzou HCl. Pro 144. hodinu hydrolyzy jsme dosáhli nejvyššího obsahu prolinu při použití 40% kyseliny mléčné a to 29,20% hodnoty získané hydrolyzou HCl. Pro 20% kyselinu mléčnou byl obsah v 144. hodině hydrolyzy 17,06% a pro 80% kyselinu mléčnou 7,34% hodnoty získané hydrolyzou pomocí HCl.

7.2.6 Glycin

Graf 6 znázorňuje průběh uvolňování glycinu v závislosti na době hydrolyzy při aplikaci HCl (6 mol.l^{-1}) a kyseliny mléčné o koncentraci 20, 40 a 80%.

Graf 6. Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro glycin



Tabulka 10. Obsah glycinu v 21., 48. a 144. hodině hydrolyzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolyzou HCl)

čas (h)	HCl	MIK20	MIK40	MIK80
21	100,00%	8,07%	14,39%	13,17%
48	100,00%	18,60%	20,86%	19,45%
144	100,00%	45,22%	71,35%	38,88%

K největšímu uvolňování glycinu docházelo pro HCl v intervalu hydrolyzy 10 až 20 hodin, pro použité koncentrace kyseliny mléčné bylo uvolňování glycinu od počátku hydrolyzy pozvolné, hydrolyzační křivky mají mírně rostoucí trend. Od dosažení 48. hodiny hydrolyzy byl u HCl zaznamenán mírně klesající trend hydrolyzační křivky.

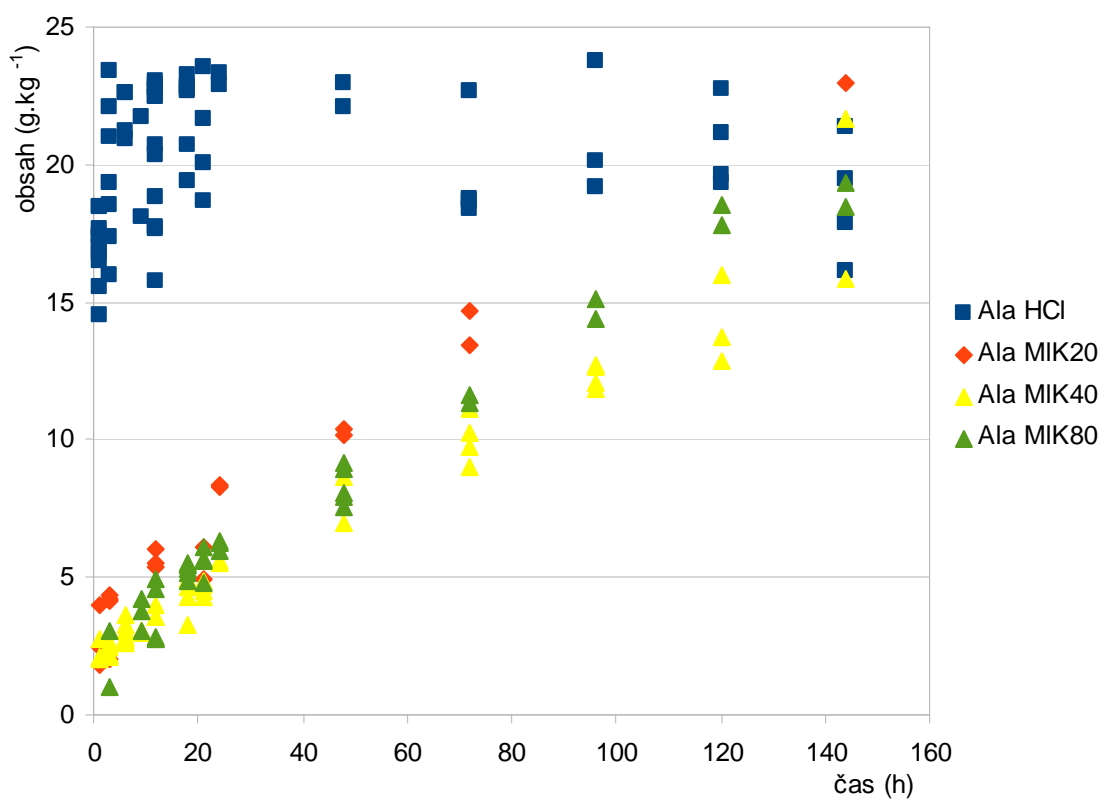
V 21. hodině hydrolyzy byl pro použité koncentrace kyseliny mléčné zjištěn obsah 8-14% hodnoty získané hydrolyzou HCl. V 144. hodině hydrolyzy došlo k přiblížení obsahu glycinu uvolněného pomocí 20% kyselinou mléčné na 71,35% obsahu uvolněného HCl, pro 20 a 80% kyselinou mléčnou 45,22 a 38,88% hodnoty získané hydrolyzou HCl. Poměrně

vysoké procento shody pro 40% kyselinu mléčnou může být způsobeno ztrátami při hydrýze pomocí HCl.

7.2.7 Alanin

Graf 7 znázorňuje průběh uvolňování alaninu v závislosti na době hydrolyzy při aplikaci HCl (6 mol.l^{-1}) a kyseliny mléčné o koncentraci 20, 40 a 80%.

Graf 7. Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro alanin



Tabulka 11. Obsah alaninu v 21., 48. a 144. hodině hydrolyzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolyzou HCl)

čas (h)	HCl	MIK20	MIK40	MIK80
21	100,00%	26,45%	21,97%	26,44%
48	100,00%	45,68%	34,72%	36,93%
144	100,00%	122,76%	100,05%	100,84%

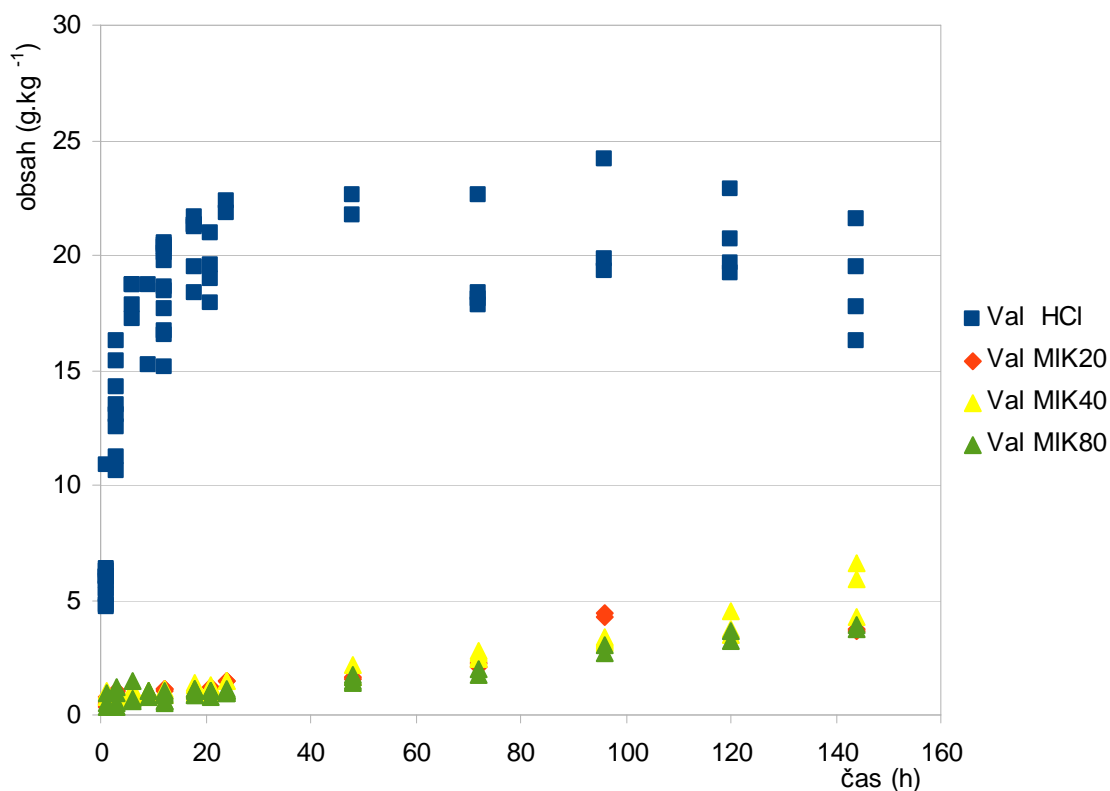
K největšímu uvolňování alaninu docházelo pro HCl mezi 10 až 20 hodinou hydrolýzy, pro 20, 40 a 80% kyselinu mléčnou byla rychlost uvolňování alaninu přímo úměrná době hydrolýzy a po celou dobu hydrolýzy měla hydrolyzační křivka prudce rostoucí trend. Ve srovnání s ostatními aminokyselinami je z grafu zřejmý rozdíl v účinnosti použité kyseliny mléčné.

V 21. hodině hydrolýzy byl pro 20, 40 a 80% kyselinu mléčnou zjištěn obsah alaninu od 22-26%, v 48. hodině hydrolýzy 35-45% hodnoty ve srovnání s hydrolýzou pomocí HCl. Po 144. hodině hydrolýzy došlo pro 40 a 80% kyselinu mléčnou k dosažení 100%, pro 20% kyselinu mléčnou 123% hodnoty ve srovnání s hydrolýzou HCl. Vysoké procento shody může být způsobeno ztrátami při hydryze pomocí HCl.

7.2.8 Valin

Graf 8 znázorňuje uvolňování valinu v závislosti na době hydrolýzy za použití HCl (6 mol.l^{-1}) a kyseliny mléčné o koncentraci 20, 40 a 80%.

Graf 8. Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolýzy) pro valin



Tabulka 12. Obsah valinu v 21., 48. a 144. hodině hydrolyzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolyzou HCl)

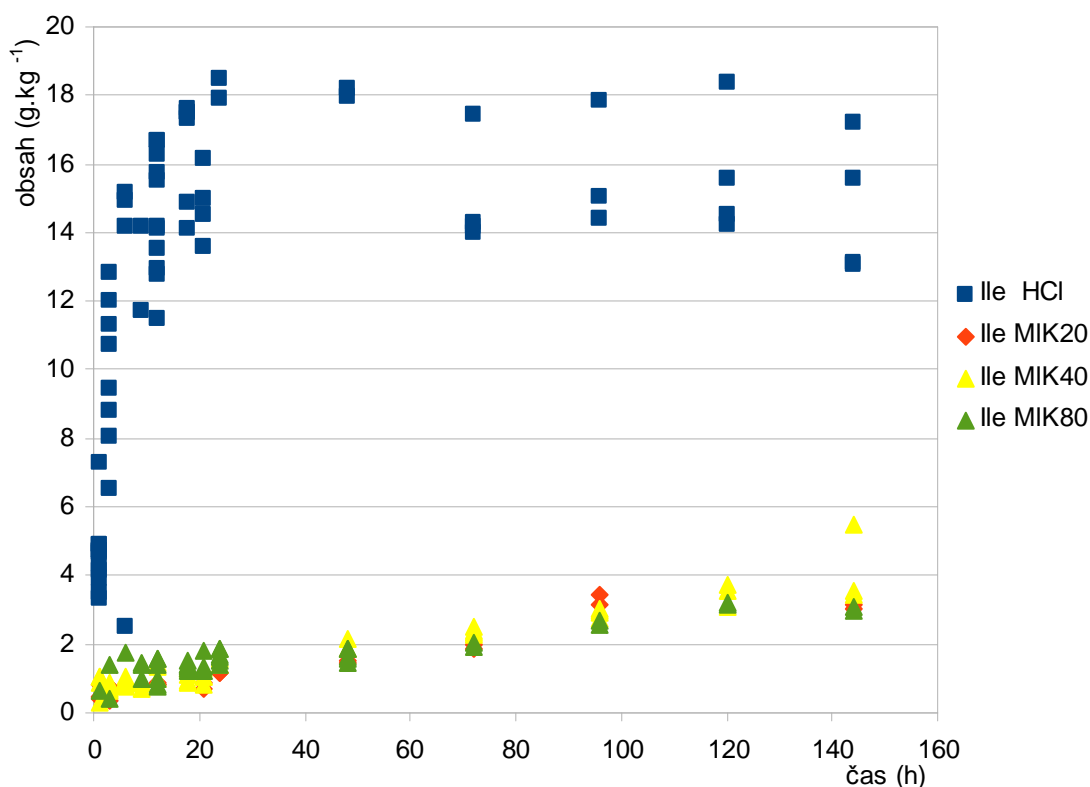
čas (h)	HCl	MIK20	MIK40	MIK80
21	100,00%	5,30%	5,86%	5,12%
48	100,00%	7,40%	8,58%	7,08%
144	100,00%	19,73%	29,81%	20,44%

Z grafu je zřejmý rozdíl, který vyplývá z použití HCl a kyseliny mléčné. Aplikace kyseliny mléčné přináší velice malé a pozvolné uvolňování valinu. Při použití HCl docházelo k největšímu uvolňování valinu po 20. hodině hydrolyzy. Hydrolyzační křivka pro HCl měla po dosažení 48. hodiny hydrolyzy stagnující, po 120. hodině mírně klesající charakter. V 21. hodině hydrolyzy se obsah valinu uvolněného 20, 40 a 80% kys. mléčnou pohyboval kolem 5% hodnoty stanovené při hydrolyze HCl. Pro 144. hodinu hydrolyzy bylo dosaženo nejvyššího výtěžku při použití 40% kyseliny mléčné a to 29, 81% obsahu uvolněného pomocí HCl. U 20 a 80% kyseliny mléčné byla tato hodnota kolem 20%.

7.2.9 Isoleucin

Graf 9 znázorňuje uvolňování isoleucinu v závislosti na době hydrolyzy za použití HCl (6 mol.l^{-1}) a kyseliny mléčné o koncentraci 20, 40 a 80%.

Graf 9. Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro isoleucin



Tabulka 13. Obsah izoleucinu v 21., 48. a 144. hodině hydrolyzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolyzou HCl)

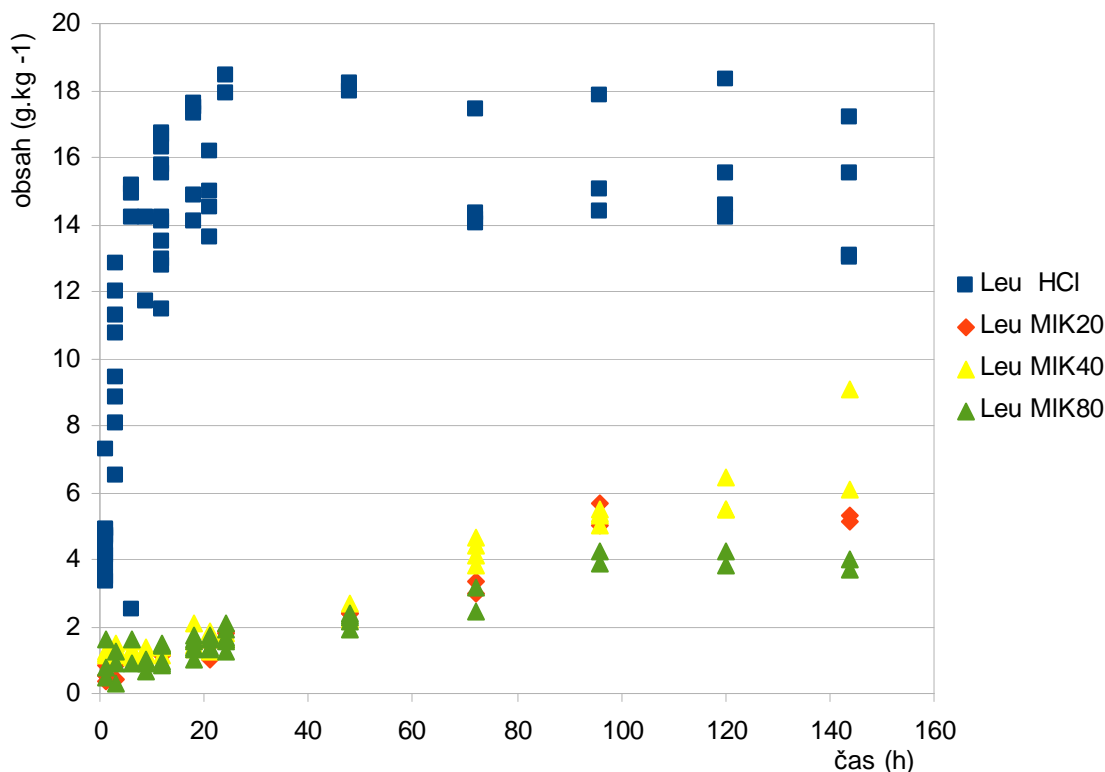
čas(h)	HCl	MIK20	MIK40	MIK80
21	100,00%	5,32%	7,07%	9,39%
48	100,00%	8,25%	11,15%	9,28%
144	100,00%	20,99%	28,20%	20,71%

Z grafu je patrný rozdíl, který vyplývá z použití HCl a kyseliny mléčné. Aplikace kyseliny mléčné přináší malé a pozvolné uvolňování isoleucinu. Při použití HCl docházelo k největšímu uvolňování kolem 20. hodiny hydrolyzy. Hydrolyzační křivka pro HCl měla po dosažení 40. hodiny hydrolyzy stagnující, po 120. hodině mírně klesající charakter. V 21. hodině hydrolyzy se obsah isoleucinu uvolněného 20, 40 a 80% kyselinou mléčnou pohyboval pod 10% hodnoty zjištěné hydrolyzou HCl. Pro 144. hodinu hydrolyzy byl obsah uvolněného isoleucinu pro 20 a 80% kyselinou mléčnou 21% a pro 40% kyselinou mléčnou 28, 20% hodnoty ve srovnání s hydrolyzou HCl.

7.2.10 Leucin

Graf 10 znázorňuje uvolňování leucinu v závislosti na době hydrolyzy za použití HCl (6 mol.l^{-1}) a kyseliny mléčné o koncentraci 20, 40 a 80%.

Graf 10. Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro leucin



Tabulka 14. Obsah leucinu v 21., 48. a 144. hodině hydrolyzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolyzou HCl)

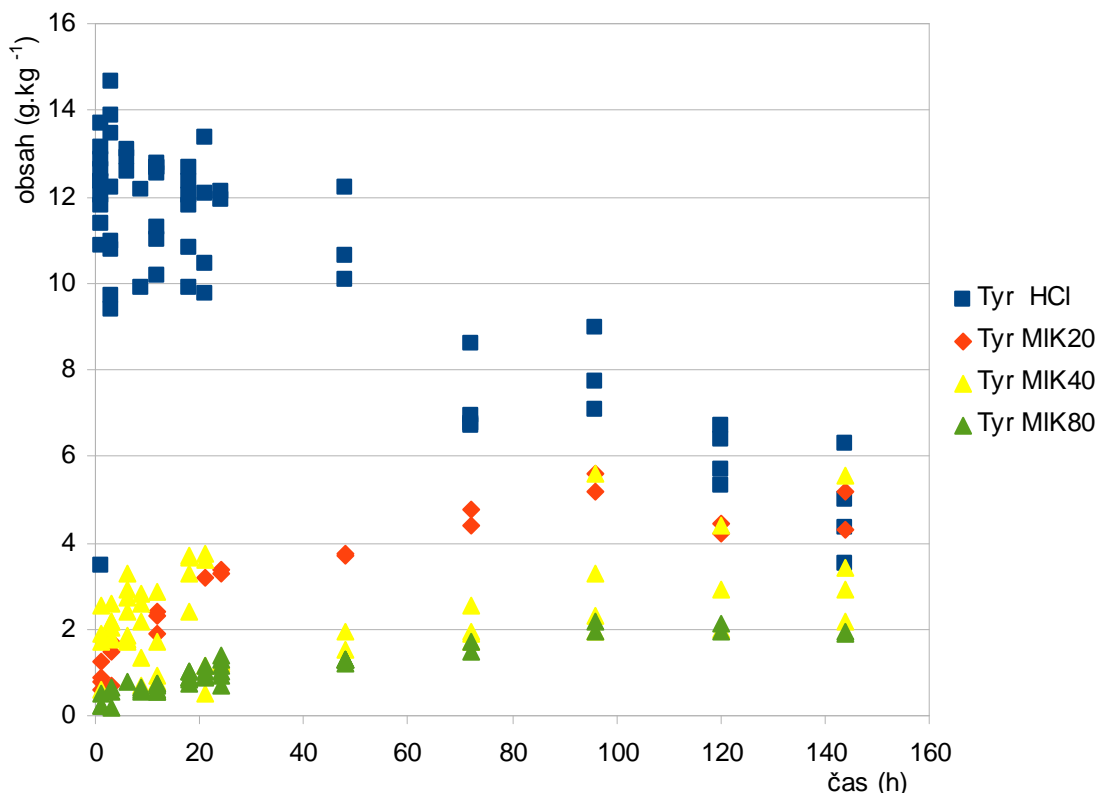
čas (h)	HCl	MIK20	MIK40	MIK80
21	100,00%	8,23%	10,92%	10,07%
48	100,00%	13,24%	13,60%	12,19%
144	100,00%	35,55%	51,53%	26,12%

Z grafu je zřetelný rozdíl, který vyplývá z použití HCl a organické kyseliny mléčné. Aplikace kyseliny mléčné přináší pozvolné uvolňování leucinu. Při použití HCl docházelo k největšímu uvolňování kolem 20. hodiny hydrolyzy. Po dosažení 20. hodiny hydrolyzy měla křivka pro HCl stagnující charakter. Hydrolyzační křivky pro použité koncentrace kyseliny mléčné vykazovaly od počátku hydrolyzy rostoucí trend. V 21. hodině hydrolyzy se obsah leucinu uvolněného 20, 40 a 80% kyselinou mléčnou pohyboval mezi 8 -10% hodnoty stanovené hydrolyzou HCl. Pro 144. hodinu hydrolyzy bylo dosaženo nejvyššího obsahu leucinu při použití 40% kyseliny mléčné a to 51,53% hodnoty HCl. Vysoké procento shody může být způsobeno ztrátami při hydrýze pomocí HCl.

7.2.11 Tyrozin

Graf 11 znázorňuje uvolňování tyrozinu v závislosti na době hydrolyzy za použití HCl (6 mol.l⁻¹) a kyseliny mléčné o koncentraci 20, 40 a 80%.

Graf 11. Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro tyrozin



Tabulka 15. Obsah tyrozinu v 21., 48. a 144. hodině hydrolyzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolyzou HCl)

čas (h)	HCl	MIK20	MIK40	MIK80
21	100,00%	27,84%	19,75%	8,59%
48	100,00%	33,90%	15,69%	11,68%
144	100,00%	99,23%	73,37%	41,59%

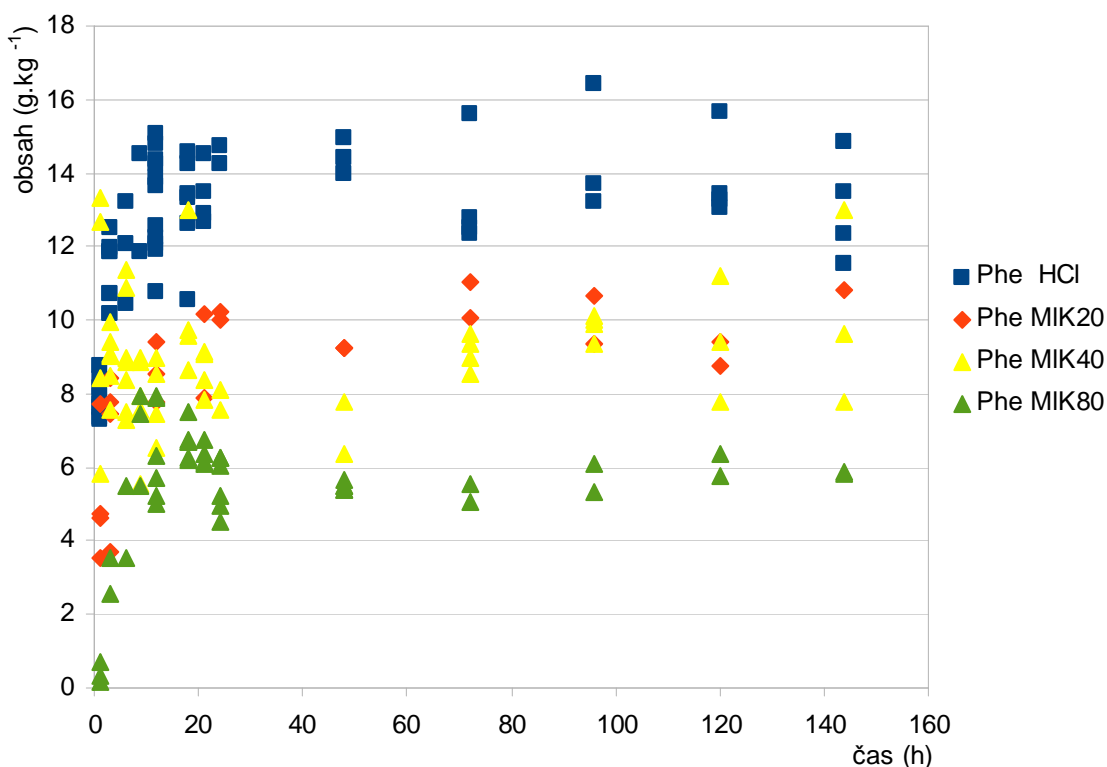
K největšímu uvolňování tyrozinu docházelo při hydrolyze pomocí HCl atypicky již v prvních hodinách hydrolyzy. Po dosažení 20. hodiny hydrolyzy má hydrolyzační křivka pro HCl výrazně klesající trend. Aplikace kyseliny mléčné přináší pozvolné uvolňování tyrozinu, s rostoucím trendem. Nejrychleji dochází k uvolňování tyrozinu pomocí 20% mléčné, kdy bylo v 21.hodině hydrolyzy dosaženo 28%, v 48. hodině hydrolyzy 34% a ve 144. ho-

dině hydrolyzy 99% hodnoty ve srovnání s hydrolyzou HCl. V 144. hodině hydrolyzy byl obsah pro 40 a 80% kyselinu mléčnou 73,37% a 41,59% hodnoty ve srovnání s HCl. Vysoké procento shody může být způsobeno ztrátami při hydrýze pomocí HCl.

7.2.12 Fenylalanin

Graf 12 znázorňuje uvolňování fenylalaninu v závislosti na době hydrolyzy za použití HCl (6 mol.l^{-1}) a kyseliny mléčné o koncentraci 20, 40 a 80%.

Graf 12. Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro fenylalanin



Tabulka 16. Obsah fenylalaninu v 21., 48. a 144. hodině hydrolyzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolyzou HCl)

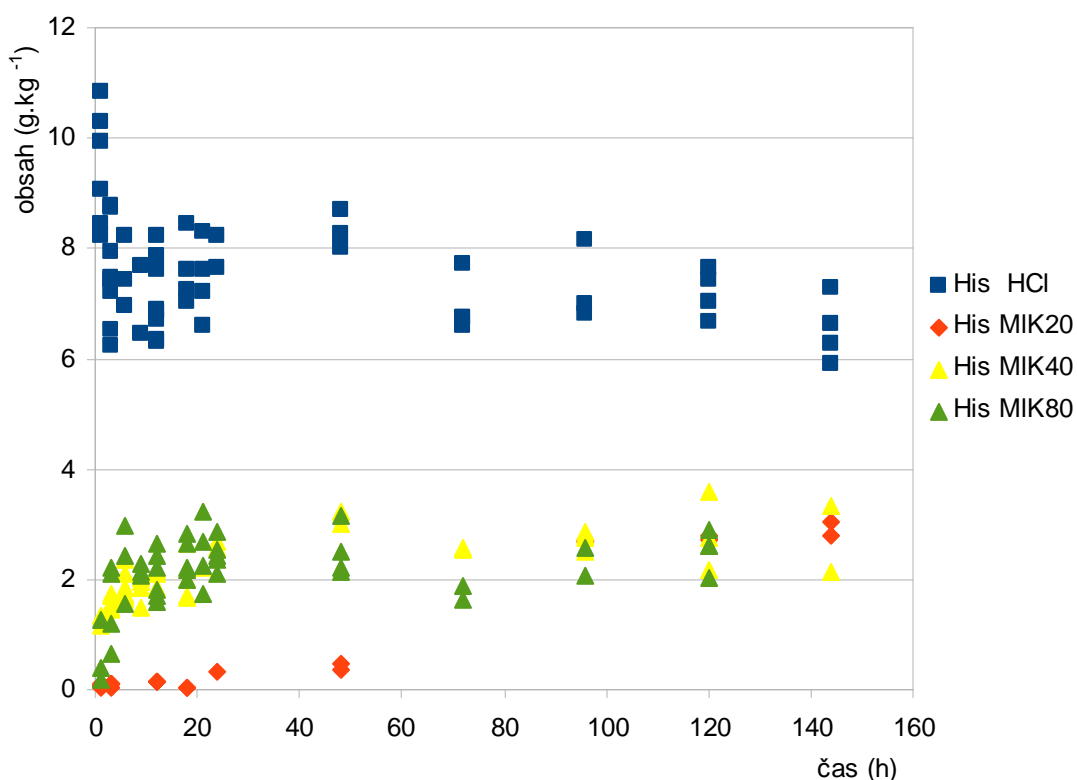
čas (h)	HCl	MIK20	MIK40	MIK80
21	100,00%	67,54%	64,34%	47,37%
48	100,00%	63,80%	48,95%	37,89%
144	100,00%	82,80%	82,80%	44,81%

Jak je zřejmé z grafu, použití kyseliny mléčné je poměrně účinné při uvolňování fenylalaninu. K největšímu uvolňování fenylalaninu dochází pro všechny použité kyseliny do 20. hodiny hydrolyzy. V 21. hodině hydrolyzy byl obsah uvolněného fenylalaninu pro 20 a 40% kyselinu mléčnou 67,54 a 64,34%, a pro 80% kyselinu mléčnou 47,37% obsahu fenylalaninu uvolněného pomocí HCl. V 48. hodině hydrolyzy byl zjištěn obsah fenylalaninu pro 20% kyselinu mléčnou 63,80%, pro 40% kyselinu mléčnou 48,95% a pro 80% kyselinu mléčnou 37,89% hodnoty fenylalaninu ve srovnání hydrolyzou HCl. Vysoké procento shody může být způsobeno ztrátami při hydrolyze pomocí HCl.

7.2.13 Histidin

Graf 13 znázorňuje uvolňování histidinu v závislosti na době hydrolyzy za použití HCl (6 mol.l^{-1}) a kyseliny mléčné o koncentraci 20, 40 a 80%.

Graf 13. Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro histidin



Tabulka 17. Obsah histidinu v 21., 48. a 144. hodině hydrolyzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolyzou HCl)

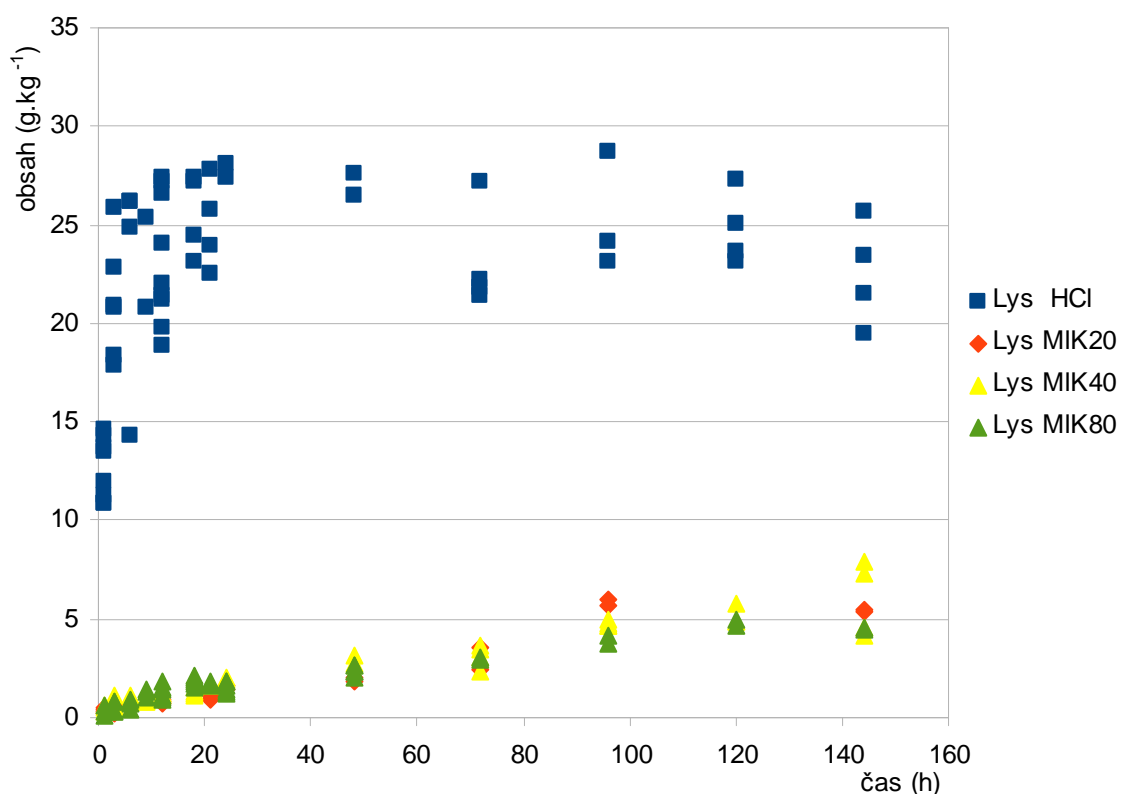
čas (h)	HCl	MIK20	MIK40	MIK80
21	100,00%	4,32%	29,88%	33,31%
48	100,00%	5,17%	37,45%	30,01%
144	100,00%	44,69%	41,78%	0,00%

Z grafu je patrný rozdíl, plynoucí z použití HCl a kyseliny mléčné. Při aplikaci HCl docházelo k největšímu uvolňování histidinu v intervalu hydrolyzy 10 až 20 hodin. V 21. hodině byl při aplikaci 20% kyseliny mléčné zjištěn obsah histidinu 4,32%, pro 40 a 80% kyseliny mléčné obsah 29,88 a 33,31% hodnoty získané hydrolyzou HCl. Pro 144. hodinu hydrolyzy bylo dosaženo nejvyššího obsahu histidinu při použití 20% kyseliny mléčné a to 44,69%, při použití 40% kyseliny mléčné 41,78% a při použití 80% kyseliny mléčné nebyl obsah histidinu pro 144 hodinu hydrolyzy zjištěn.

7.2.14 Lysin

Graf 14 znázorňuje uvolňování lysinu v závislosti na době hydrolyzy za použití HCl (6 mol.l^{-1}) a kyseliny mléčné o koncentraci 20, 40 a 80%.

Graf 14. Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro lysin



Tabulka 18. Obsah lysinu v 21., 48. a 144. hodině hydrolyzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolyzou HCl)

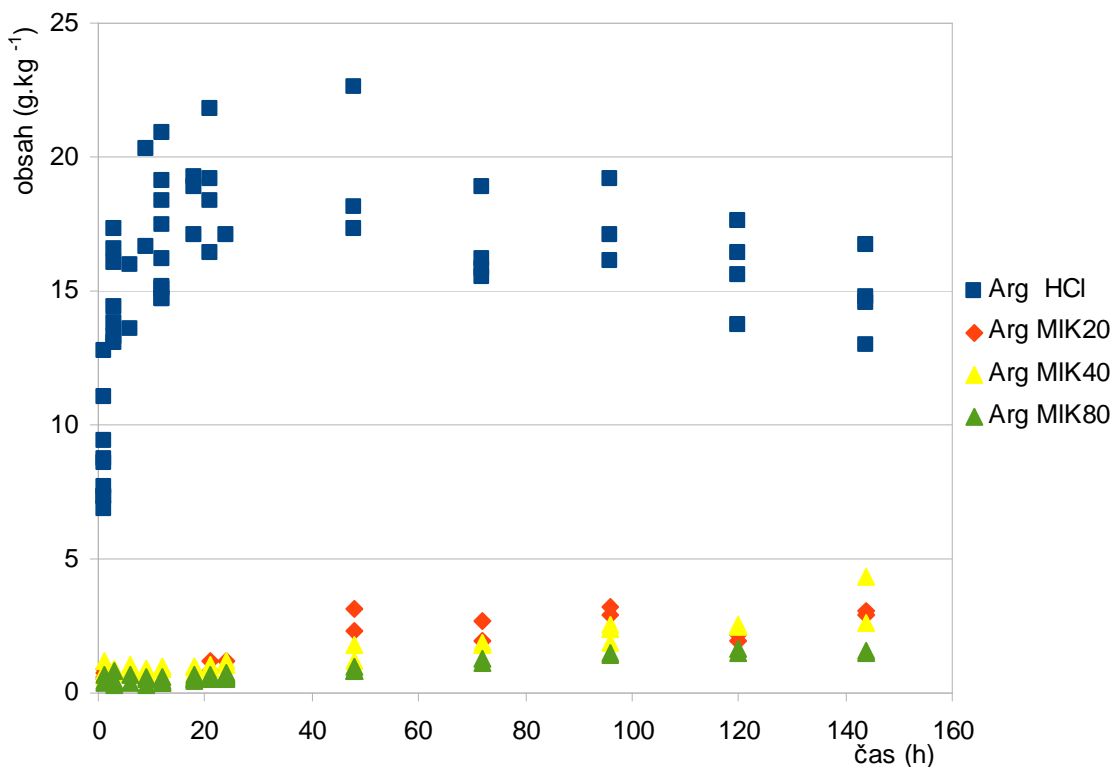
čas (h)	HCl	MIK20	MIK40	MIK80
21	100,00%	4,06%	6,58%	6,92%
48	100,00%	7,01%	10,76%	8,89%
144	100,00%	24,12%	26,59%	19,92%

Z grafu je zřejmý rozdíl, který vyplývá z použití HCl a kyseliny mléčné. Aplikace kyseliny mléčné přináší velice malé a pozvolné uvolňování lysinu. Při aplikaci HCl docházelo k největšímu uvolňování lysinu v intervalu hydrolyzy 10 až 20 hodin. Od 40. hodiny hydrolyzy má hydrolyzační křivka pro HCl mírně klesající trend. V 21. hodině hydrolyzy byl obsah lysinu uvolněného 20% kyselinou mléčnou 4,06%, pro 40 a 80% kyselinou mléčnou 6,58 a 6,92% hodnoty získané hydrolyzou HCl. Pro 144. hodinu hydrolyzy byl pro 20% kyselinou mléčnou zjištěn obsah 24,12%, pro 40% kyselinou mléčnou 26,59% a pro 80% kyselinou mléčnou 19,92% hodnoty získané hydrolyzou HCl.

7.2.15 Arginin

Graf 15 znázorňuje uvolňování argininu v závislosti na době hydrolyzy za použití HCl (6 mol.l^{-1}) a kyseliny mléčné o koncentraci 20, 40 a 80%.

Graf 15. Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro arginin



Tabulka 18. Obsah argininu v 21., 48. a 144. hodině hydrolyzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolyzou HCl)

čas (h)	HCl	MIK20	MIK40	MIK80
21	100,00%	5,22%	5,00%	3,13%
48	100,00%	13,96%	7,73%	4,49%
144	100,00%	20,13%	23,70%	10,42%

Z grafu je zřejmý rozdíl, který vyplývá z použití HCl a kyseliny mléčné. Aplikace kyseliny mléčné přináší velice malé a pozvolné uvolňování argininu. Při aplikaci HCl docházelo k největšímu uvolňování argininu v intervalu hydrolyzy 10 až 20 hodin. Od 40. hodiny hydrolyzy má hydrolyzační křivka pro HCl mírně klesající trend. V 21. hodině hydrolyzy byl obsah argininu uvolněného 20 a 40% kyselinou mléčnou 5,22 a 5,00%, pro 80% kyselinu

mléčnou 3,13% hodnoty získané hydrolýzou HCl. Pro 144. hodinu hydrolýzy byl pro 20% kyselinu mléčnou zjištěn obsah 20,13%, pro 40% kyselinu mléčnou 23,7% a pro 80% kyselinu mléčnou 10,42% hodnoty získané hydrolýzou HCl.

7.3 Diskuze

V praktické části byla pozorována hydrolýza bílkoviny pivovarské biomasy. Byla sledována závislost obsahu uvolněných aminokyselin (asparagová kyselina, threonin, serin, glutamová kyselina, prolin, glycin, alanin, valin, izoleucin, leucin, fenylalanin, tyrozin, histidin, lyzin a arginin) na jednotlivých časech hydrolýzy (znázorněno v grafech 1-15). Lze říci, že u sledovaných 15 aminokyselin docházelo při hydrolýze HCl k největšímu uvolňování v intervalu hydrolýzy 10 až 20 hodin, kdy byl zaznamenán nejvyšší výtěžek. Atypický průběh počátku hydrolýzy byl zaznamenán pro histidin a tyrozin, o čemž svědčí i jejich vysoké hodnoty uvolňování h . Naopak k maximální uvolňování až kolem 20. hodiny hydrolýzy docházelo pro valin, leucin a izoleucin, což dokládají jejich nízké hodnoty uvolňování h . Míru degradace aminokyseliny a její ztráty vyjadřuje parametr l . Poměrně vysoká hodnota parametru l a z toho plynoucí ztráty při hydrolýze byly pozorovány pro threonin, serin a tyrozin. Citlivost těchto aminokyselin k náročným podmínkám kyselé hydrolýzy byla již popsána v literatuře [33]. Netypický průběh hydrolyzační křivky v porovnání s ostatními aminokyselinami je prokázán pro histidin [33]. Hodnota uvolňování histidinu h je velmi vysoká, sestavení hydrolyzační křivky je proto poměrně problémové. Možné vysvětlení atypického průběhu hydrolýzy pro histidin je vysoká citlivost a sklon k racemizaci [28].

Kontrola správnosti regresního modelu pro HCl byla provedena srovnáním koncentrace aminokyselin z odhadnutých křivek s koncentrací chromatograficky stanovenou. Při srovnání hodnot obsahu aminokyselin vypočtených z odhadnutých hydrolyzačních křivek pro 21. hodinu s koncentrací chromatograficky stanovenou, byla u všech aminokyselin (kromě leucinu) zjištěna akceptovatelná odchylka 90–110% (vyjádřená jako poměr z hydrolyzační křivky odhadnuté a skutečně naměřené hodnoty obsahu aminokyseliny). Pro 48. hodinu nebylo dosaženo požadované přesnosti pro většinu aminokyselin. Pro 144. hodinu byla u všech aminokyselin (kromě leucinu a tyrozinu) zjištěna akceptovatelná odchylka 90–110%. Z vypočítaných hodnot bylo zjištěno, že navržený regresní model značně podhodnocuje.

Tabulka 3 obsahuje přehled korekčních faktorů pro hydrolýzu HCl a 20%, 40%, 80% kyselinu mléčnou. Jak již bylo uvedeno výše, nelze použít korekční faktory pro kyselinu mléč-

nou použít pro objektivní zhodnocení výsledku. Pro HCl byl nejvyšší korekční faktor 1,04 zjištěn pro serin a arginin, nejnižší 0,88 pro alanin a lysin. Při srovnání korekčních faktorů s údaji publikovanými dříve [30][31][33] vyplývá, že námi zjištěné hodnoty jsou pro většinu aminokyselin značně nižší.

Byl stanoven také korekční faktor pro histidin, avšak jeho přesnost je vzhledem k problematickému sestavení hydrolyzačního modelu poměrně sporná.

Vysoká hodnota korekčního faktoru pro použité koncentrace kyseliny mléčné je dána povahou kyseliny, jejíž disociační konstanta je poměrně nízká. Z toho plyne její nízký účinek při uvolňování jednotlivých aminokyselin z proteinů. Při porovnání s kyselinou chlorovodíkovou, která se řadí mezi silné kyseliny, je množství uvolněných aminokyselin kyselinou mléčnou značně nižší a hodnoty po 144. hodině hydrolyzy v některých případech nepřesahují ani 20% hodnoty uvolněné pomocí HCl. Poměrně vysoké shody s množstvím uvolněným pomocí HCl bylo dosaženo při hydrolyze kyselinou mléčnou pro kyselinu asparagovou, alanin, leucin, tyrozin, fenylalanin a histidin. Zdůvodnění vysokého procenta shody lze hledat v nárůstu ztrát při hydrolyze HCl v pozdějších časech hydrolyzy a v pomalém růstu uvolněných aminokyselin využitím kyseliny mléčné.

ZÁVĚR

V této diplomové práci bylo za pomoci HCl a 20%, 40% a 80% kyseliny mléčné provedena hydrolýza pivovarské biomasy.

- pro hydrolýzu HCl bylo ve 13 hydrolyzačních časech vytvořeno 15 hydrolyzačních křivek pro sledované aminokyseliny (asparagová kyselina, threonin, serin, glutamová kyselina, prolin, glycin, alanin, valin, izoleucin, leucin, fenylalanin, tyrozin, histidin, lyzin a arginin).
- byla provedena kontrola správnosti zvoleného regresního modelu pro HCl. Po 21.hodině hydrolýzy, byla akceptovatelná odchylka 90–110% zjištěna pro všechny aminokyseliny. V 48. hodině hydrolýzy nebylo dosaženo požadované přesnosti pro většinu aminokyselin. V 144 hodině hydrolýzy byla akceptovatelná odchylka zjištěna u všech aminokyselin kromě leucinu a tyrozinu.
- na základě sestavených křivek byly vypočteny korekční faktory pro 21. hodinu hydrolýzy a byly sledovány ztráty vzniklé během kyselé hydrolýzy. Korekční faktory pro HCl se pohybovaly v rozmezí 0,88 – 0,99, tuto hodnotu mírně přesáhl serin a arginin 1,04 a tyrozin 1,02.
- byly porovnány hydrolyzační křivky pro jednotlivé aminokyseliny pro hydrolýzu kyselinou mléčnou a HCl. Ze zjištěných údajů plyne, že hydrolýza kyselinou mléčnou vykazuje po 144. hodině hydrolýzy účinnost kolem 20% ve srovnání s HCl, pro kyselinu asparagovou, alanin, leucin, tyrozin, fenylalanin a histidin byla shoda s hydrolýzou HCl vyšší.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Kolektiv autorů, Technologie výroby sladu a piva. 1. vydání. Vydal výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2000, 393s. ISBN 80-902658-6-3
- [2] FERREIRA, O.; PINHO, O.; VIEIRA, E., TAVARELA J.G., Brewer's Saccharomyces yeast biomass: characteristic and potential applications. Trends in food science & technology. 2009, 21, s. 77-84.
- [3] STAREC, Milan. Pivovary.info [online]. 2008 [cit. 2010-02-22]. Pivovarské kvasnice a lidský organismus. Dostupné z WWW: <<http://www.pivovary.info/view.php?cisloclanku=2008030007>>.
- [4] MAREK, Miroslav; VOLDŘICH, Michal. Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí [online]. Vysoká škola chemicko-technologická : 2006 [cit. 2010-03-31]. Odpady z potravinářských výrob v životním prostředí. Dostupné z WWW: <http://www.phytopsanitary.org/projekty/2005/VVF_07_2005.pdf >.
- [5] Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav mikrobiologie [online]. 2007 [cit. 2010-01-30]. Využití kvasinek pro produkci biomasy; produkce vitaminů kvasinkami. Dostupné z WWW: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/kvasbiotech/vyuziti/vyuziti.html>>.
- [6] Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie [online]. 2007 [cit. 2010-04-16]. Fyziologie růstu kvasinek. Dostupné z WWW: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/kvasbiotech/fyziologie/fyziologie.html>>.
- [7] Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie, oddělení mikrobiologie [online]. 2007 [cit. 2010-04-15]. Kvasinkové mikroorganismy. Dostupné z WWW: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/kvasbiotech/kvasmikro/kvasmikro.html>>.
- [8] Gao, M., Hirata, M., Toorisaka, E., Hano, T.(2006). Study on acid-hydrolysis of spent cells for lactic acid fermentation. Biochemical Engineering Journal, 28, 87-91
- [9] Neoficiální dokumentový server MZLU [online]. 2008 [cit. 2010-01-21]. Kvasinky - obecná charakteristika, morfologie, rozmnožování. Dostupné z WWW: www.mendelu.org/upload//mikra%207%20a%208.doc

- [10] VÁŇA, J. Systém a vývoj hub a houbových organismů. Karolinum, Univerzita Karlova Praha. 1998. 164. s. ISBN: 80-7184-603-1.
- [11] HARDWICK, W. A. Handbook of brewing. New York : Marcel Dekker, 1995. 696 s. ISBN 0-8247-8908-3.
- [12] The Brewers Handbook [online]. 2009 [cit. 2010-03-15]. Brewers Yeast.
Dostupné z WWW: <http://www.beer-brewing.com/beer-brewing/beer_chapters/ch04_brewers_yeast.htm>.
- [13] PRIEST, F. G.; CAMPBELL, I. Brewing microbiology. New York : Plenum Publishers, 2003. 382 s. ISBN 0-306-47288-0.
- [14] YEAST: Biotechnology and Biocatalysis. New York : Marcel Dekker, 1990. 523 s. ISBN 0-8247-8142-2.
- [15] HORNSEY, Ian S. A history of beer and brewing. Cambridge, UK : The Royal Society of Chemistry, 2003. 745 s. ISBN 0-85404-630-5
- [16] Žádost o zápis CHZO České pivo u orgánů EU [online]. 2008 [cit. 2010-03-16]. České pivo.
Dostupné z WWW: <http://www.ceskepivo.cz/index.php/Hlavni_strana>.
- [17] PROKEŠ, Josef. Školící a informační středisko "Pivovarská škola" [online]. 2009 [cit. 2010-03-11]. Výroba sladu.
- [18] LEWIS, M. J.; YOUNG, T. W. Brewing. New York : Aspen Publishers, 2001. 268 s. ISBN 0-8342-1851-8
- [19] DUARTE, L.C., et al. Yeast Biomass Production in brewery's Spent Grains Hemicellulosic Hydrolyzate. Appl Biochem Biotechnol. 26 September 2007, 148, s. 119-129.
- [20] Svět piva [online]. 2001 [cit. 2010-03-21]. Vystírání a rmutování. Dostupné z WWW: <<http://www.pivnidenik.cz/clanek/237-Vystirani-a-rmutovani/index.htm>>
- [21] HALÁSZ, A.; LÁSZTITY, R. Use of yeast biomass in food production [online]. 1991. Florida : CRC Press, 2000 [cit. 2010-02-29].

- [22] HOZA, I.; KRAMÁŘOVÁ, D. Potravinařská biochemie. 1.vydání. UTB ve Zlíně, 2005. 168 s.
- [23] Ústav chemie, UTB ve Zlíně, Fakulta technologická [online]. 2005 [cit. 2010-02-20]. Studijní materiály - Kyselost a zásaditost vodných roztoků silných kyselin a zásad. Dostupné z WWW: <<http://chemie.utb.cz/anorg/priklady/07.pdf>>.
- [24] Vondruška, M., Stráněl, O., Analytická chemie. 1.vydání. Brno: Vysoké učení technické v Brně, 1990. 179 s. ISBN 80-214-0138-9
- [25] Gao, M., Hirata, M., Toorisaka, E., Hano, T.(2006). Study on acid-hydrolysis of spent cells for lactic acid fermentation. Biochemical Engineering Journal, 28, 87-91
- [26] Fogl, J., Volka, K., Analytické tabulky. 3. vydání. Praha: Mezinárodní organizace novinářů, 1990. 174s. ISBN 80-708-0073-9
- [27] Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta [online]. 2009 [cit. 2010-01-21]. Tradiční technologie výroby piva. Dostupné z WWW: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/kvasbiotech/pivo/tradpiv.html>>.
- [28] WEISS, M., MANNEBERG, M., JUANVILLE, J.-F., LAHM, H.W., FOUNTOU-LAKIS, M. . Effect of the hydrolysis method on the determination of the amino acid composition of proteins. Journal of Chromatography A. 1997, 1998, 26, s. 263-275
- [29] HOZA, I.; KRAMÁŘOVÁ, D. Potravinařská biochemie. 1.vydání. UTB ve Zlíně, 2005. 168 s.
- [30] BUŇKA, F.; KŘÍŽ, O., VELIČKOVÁ, A., BUŇKOVÁ, L., KRÁČMAR, S. Effect of the hydrolysis time on amino acid determination in casein and processed cheeses with different fat content. Journal of Food Composition and Analysis. 2009, 22, s. 224-232.
- [31] DARRAGH, A.J.; MOUGHAN, P.J. The Effect of Hydrolysis Time on Amino Acid Analysis. Journal of AOAC International . 2005, 88, 888-893.
- [32] PEACE, R.W.; GILANI, G.S. Chromatographic Determination of Amino Acids in Foods. Journal of AOAC International. 2005, 88, s. 877-887.

- [33] DARRAGH, A.J., et al. Correction for Amino Acid Loss during Acid Hydrolysis of a Purified protein. *Analytical biochemistry*. 1996, 236, s. 199-207
- [34] ALBIN, D.M.; WUBBEN, J.E.; GABERT, V.M. Effect of Hydrolysis Time on the Determination of Amino Acids in Samples of Soybean Products with Ion-Exchange Chromatography or Precolumn Derivatization with Phenyl Isothiocyanate. *J. Agric. Food Chem.*. 2000, 48, s. 1684-1691
- [35] RAVINDRAN, G.; BRYDEN, W. L. Tryptophan determination in proteins and feed-stuffs by ion exchange chromatography. *Food Chemistry*. 2005, 89, s. 309-314
- [36] FRIEDMAN, Mendel. Nutritional Value of Proteins from Different Food Sources. A Review. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 1996, 44, s. 6-29.
- [37] SALO-VAANANEN, P. P; KOIVISTOINEN, P.E. Determination of protein in foods: comparison of net protein and crude protein (Nx6.25) values. *Food Chemistry*. 1996, 57, s. 27-31
- [38] KOTRLÝ, S.; ŠŮCHA, L. *Chemické rovnováhy v analytické chemii*. Praha : Nakladatelství technické literatury, 1988. 377 s.

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Použité sodno-citrátové pufrы pro objem 1l	32
Tab. 2. Hodnoty odhadnutých parametrů A_0 (zjištěný obsah aminokyselin v biomase), h (rychlost uvolňování aminokyselin) a l (míra ztráty aminokyselin) získaných nelineární regresi.....	34
Tab. 3. Korekční faktory pro obsah aminokyselin (podíl hodnoty A_0 z nelineární regrese a výtěžku chemické analýzy za 24 h.).....	35
Tab. 4. Obsah uvolněných aminokyselin vypočtený z regresního modelu pro 21., 48. a 144. hodinu hydrolyzy pomocí HCl a srovnání s hodnotami skutečně naměřenými.....	36
Tab. 5. Obsah kyseliny asparagové v 21., 48. a 144. hodině hydrolyzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolyzou HCl).....	37
Tab. 6. Obsah threoninu v 21., 48. a 144. hodině hydrolyzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolyzou HCl).....	39
Tab. 7. Obsah serinu v 21., 48. a 144. hodině hydrolyzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolyzou HCl).....	40
Tab. 8. Obsah kyseliny glutamové v 21., 48. a 144. hodině hydrolyzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolyzou HCl).....	41
Tab. 9. Obsah prolinu v 21., 48. a 144. hodině hydrolyzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolyzou HCl).....	42
Tab. 10. Obsah glycinu v 21., 48. a 144. hodině hydrolyzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolyzou HCl).....	44
Tab. 11. Obsah alaninu v 21., 48. a 144. hodině hydrolyzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolyzou HCl).....	45
Tab. 12. Obsah valinu v 21., 48. a 144. hodině hydrolyzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolyzou HCl).....	46
Tab. 13. Obsah izoleucinu v 21., 48. a 144. hodině hydrolyzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolyzou HCl).....	48

Tab. 14. Obsah leucinu v 21., 48. a 144. hodině hydrolýzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolýzou HCl).....	49
Tab. 15. Obsah tyrozinu v 21., 48. a 144. hodině hydrolýzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolýzou HCl).....	50
Tab. 16. Obsah fenylalaninu v 21., 48. a 144. hodině hydrolýzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolýzou HCl).....	51
Tab. 17. Obsah histidinu v 21., 48. a 144. hodině hydrolýzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolýzou HCl).....	53
Tab. 18. Obsah lysinu v 21., 48. a 144. hodině hydrolýzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolýzou HCl).....	54
Tab. 19. Obsah argininu v 21., 48. a 144. hodině hydrolýzy (podíl hodnot pro různé koncentrace kyseliny mléčné a hodnoty získané hydrolýzou HCl).....	55

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA I. Článek publikovaný ve vědeckém časopise

PŘÍLOHA I. Článek publikovaný ve vědeckém časopise

Journal of Food Composition and Analysis 22 (2009) 224–232



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Food Composition and Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jfca

Original Article

Effect of acid hydrolysis time on amino acid determination in casein and processed cheeses with different fat content

František Buňka*, Oldřich Kříž, Alena Veličková, Leona Buňková, Stanislav Kráčmar

Tomas Bata University in Zlín, Department of Food Engineering, nam. T.G.M. 275, 762 72 Zlín, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 November 2007

Received in revised form 22 October 2008

Accepted 30 October 2008

Keywords:

Amino acid

Casein

Processed cheese

Fat

Acid hydrolysis

Hydrolysis curve

Nonlinear regression

Correction factor

Loss

Food analysis

Food composition

ABSTRACT

This work deals with hydrolysis curves for 15 amino acids (aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid, proline, glycine, alanine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, tyrosine, histidine, lysine and arginine) in bovine casein and in model-processed cheeses with 30, 45 and 60% (w/w) fat in dry matter. The effect of a different fat content on hydrolysis curves of the amino acids was observed. The hydrolysis curves were obtained by means of nonlinear regression using 13 hydrolysis intervals (range, 0–144 h). The amino acid content in hydrolysates was measured using ion exchange chromatography. Correction factors were calculated with the aim of increasing the accuracy of the amino acid determinations. With the rising fat content in samples, the correction factors increased for the majority of amino acids observed. The highest correction factors were determined for threonine, serine and tyrosine.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Amino acids can be found in foods either as free or bound in proteins, peptides and nonpeptide substances. The determination of total amino acid composition in foods consists of two steps: hydrolysis of polymer (especially protein or peptide) to liberate amino acids and their analysis and quantification. Hydrolysis is a critical stage of the whole procedure and its successful realization has a direct impact on the accuracy and precision of the resulting amino acid analysis (Fountoulakis and Lahm, 1998; Peace and Gilani, 2005; Weiss et al., 1998). There are three different ways of carrying out the hydrolysis of bound amino acids: acid, alkaline and enzymatic. Many acids, e.g. hydrochloric acid (HCl), methanesulfonic acid, *p*-toluenesulfonic acid and sulfonic acid have already been tested for the purpose of acid hydrolysis (Chin, 1984; Chiou and Wang, 1988; Malmer and Schroeder, 1990; Ozols, 1990; Weiss et al., 1998). For many decades HCl ($c = 6 \text{ mol/l}$), used for 20–24 h at 110 °C, has been the most common acid for hydrolysis in food and feeding applications (Fountoulakis and Lahm, 1998; Kráčmar et al., 2000; Liška and Kráčmar, 1998; Nair et al., 1976).

However, sulphur amino acids (cysteine and methionine) and tryptophan are partially or completely destroyed during this process. Hence, bound cysteine and methionine are hydrolyzed after previous oxidation (e.g. mixture of 30% hydrogen peroxide and 98% formic acid in the ratio of 1:9, v/v) and determined as cysteic acid and methionine sulphone (Alegría et al., 1999; Salo-Väänänen and Koivistoinen, 1996). Also other amino acids – threonine and serine – can be objects of interactions and their loss can be 5–10% within 24-h hydrolysis of HCl (Fountoulakis and Lahm, 1998). A certain loss of tyrosine has also been found out. Further changes can be observed in glutamine and asparagine, which are converted by HCl into glutamic acid and aspartic acid, respectively (Salo-Väänänen and Koivistoinen, 1996). The fact that some peptide bonds, mainly those between isoleucine-isoleucine, valine-valine and isoleucine-valine, are difficult to hydrolyze has been pointed out by Nair et al. (1976). When HCl is used at 110 °C, more than 24 h is usually needed for their complete cleavage. Also, microwave radiation-induced hydrolysis has been studied as a substitute for the conventional heating. The main advantage of this method is a significant reduction in the hydrolysis time (Weiss et al., 1998).

During acid hydrolysis some yield and decay processes of amino acids take place simultaneously. Thus, in some cases, the standard hydrolysis time 20–24 h leads to inaccurate estimates

* Corresponding author. Tel.: +420 576031528.
E-mail address: bunka@ft.utb.cz (F. Buňka).

of the amino acid content. A possible solution could be modelling the yield and decay of the individual amino acids by nonlinear multiple regression of data (amino acid content) from several intervals of hydrolysis. From the subsequent extrapolation to time zero or by using the maximum point on a hydrolysis time curve, correction factors for the standard hydrolysis time (24 h), can be specified (Albin et al., 2000; Darragh et al., 1996; Darragh and Moughan, 2005). In order to achieve acceptable accuracy, the hydrolysis curve expressing the dependence of the amino acid content on the hydrolysis time should be modelled, according to Darragh et al. (1996): (i) by using at least 10 hydrolysis intervals; (ii) with at least 1 or 2 hydrolysis intervals longer than 100 h; (iii) with the maximum number of hydrolysis intervals prior to the maximum point on the hydrolysis curve (maximum yield).

Apart from acid hydrolysis, alkaline and enzymatic hydrolysis can be used for releasing protein-bound and peptide-bound amino acids and their conversion into a free form. Alkaline hydrolysis with NaOH, LiOH or Ba(OH)₂ is used mainly for the determination of tryptophan (Friedman and Cuq, 1988; Hanko and Rohrer, 2002; Sato et al., 1984). The major drawback of this method could be partial or complete destruction of serine, threonine, arginine and cysteine. By contrast, enzymatic hydrolysis provides much milder conditions than acid and alkaline hydrolysis. Its main drawback, however, is usually incomplete hydrolysis (Baxter et al., 2007; Ravindran and Bryden, 2005). During the analysis of lysine, the amount of so-called "bioavailable" (reactive) lysine is specified because the human body does not utilize its total amount present in food. For the determination of bioavailable lysine, guanidination and fluorodinitrobenzene methods are used (Friedman, 1996a; Torgatinejad et al., 2005).

Amino acids released from proteins and peptides can be determined by many chromatographic and electrophoretic methods. Ion exchange chromatography and high-performance liquid chromatography (especially equipped with UV/vis or fluorescence detectors) with post-column derivatization methods belong to the most commonly used techniques. The most common derivatization reagents are ninhydrin and o-phthalaldehyde. As far as the high-performance liquid chromatography is concerned, pre-column techniques, e.g. using the phenylisothiocyanate method, have also been described. Other methods of separation and detection of released amino acids include gas chromatography and capillary electrophoresis (Alegria et al., 1999; Fiamegos and Stalikas, 2006; Fountoulakis and Lahm, 1998; Peace and Gilani, 2005; Standara et al., 1999; Sun et al., 2006).

Bovine milk contains proteins with a high biological value, which can be degraded by some technological operations (e.g. due to heat treatment). Whole bovine milk proteins can be classified into casein proteins (ca. 80%) and non-casein proteins (whey proteins; ca. 20%). The caseins in milk are arranged in supramolecular colloids – casein micelles, which contain fractions of α_{S1} , α_{S2} , β and κ -casein. During the production of natural cheeses, rennin enzyme in the presence of calcium ions causes aggregation of casein fractions and gel is formed. During this operation, the non-casein proteins and glycomacropptide (fragment of κ -casein formed due to the activity of rennin) go to whey and thus do not form a part of natural cheeses (Ginger and Grigor, 1999; Fox and McSweeney, 1998). Processed cheeses are produced by heating (generally at 75–100 °C) a mixture of ingredients, the basic of which is natural cheeses, with the assistance of emulsifying agents (especially sodium salts of phosphates, polyphosphates and/or citrates). Processed cheeses are products with great variability of chemical composition, especially that of the fat in dry matter content (FDM), which can range 30–70% (w/w) FDM (Guinee et al., 2004). The presence of fat, saccharides or other substances can influence the result of protein hydrolysis or initiate amino acid

losses during acid hydrolysis (Fountoulakis and Lahm, 1998; Nair et al., 1976; Ravindran and Bryden, 2005).

According to Darragh and Moughan (2005), hydrolysis curves and correction factors must be determined separately for the individual proteins in order to achieve acceptable accuracy. Correction factors for casein proteins in bovine milk or in milk products have not been found in the literature available. References to the effect of fat content on casein hydrolysis in milk products have not been published either. In this paper, processed cheese was used as models to estimate the influence of fat content on amino acids determination in dairy products.

The aim of this work was (i) to model the dependence of amino acid content on acid hydrolysis time in bovine casein protein by means of nonlinear multiple regression; (ii) to study the effect of fat content on casein protein hydrolysis in samples of model processed cheeses with 30, 45 and 60% (w/w) FDM; and (iii) to calculate correction factors for the individual amino acids in both bovine casein protein and processed cheeses with 30, 45 and 60% (w/w) FDM on the basis of predicted hydrolysis curves.

2. Materials and methods

2.1. Samples and reagents

Bovine casein was obtained from Sigma Aldrich, Inc., St. Louis, USA (moisture content <10%). Hydrochlorid acid, citric acid monohydrate, sodium citrate dihydrate, sodium chloride, thiodiglycol, boric acid, sodium azide and sodium hydroxide were supplied by Ingos, Prague, Czech Republic. Ninhydrine, methylcellosolve, acetate buffer (pH 5.5) and hydrindantine were also purchased from Ingos, Prague, Czech Republic as a kit for ninhydrine reagent (for post-column derivatization).

2.2. Processed cheese production

Three types of model processed cheeses were prepared – with 30, 45 and 60% (w/w) FDM. The processed cheeses were produced by using a Vorwerk Thermomix TM 21 blender cooker (Vorwerk & Co. Thermomix; GmbH, Wuppertal, Germany). This equipment was of the same type as the cooker used by Buňka et al. (2007). As raw materials were used: (i) Eidamsky Blok – Dutch type cheese with 30% (w/w) fat in dry matter and 50% (w/w) dry matter, 8 weeks of maturity; (ii) butter with 82% (w/w) fat and 84% (w/w) dry matter; (iii) water; (iv) commercial emulsifying agents (sodium salts of phosphates and polyphosphates – JOHA, Benckiser-Knapsack, Ladenburg, Germany). The amount of raw materials for individual types of processed cheeses is shown in Table 1. The temperature of processing was kept between 85 and 86 °C and the total time of preparation was 16–18 min. Hot processed cheese melt was poured into standard 100 g plastic doses with sealable lids and stored at 6 ± 2 °C. The total amount of processed cheese was approximately 700–800 g per batch. The production procedure for each type of processed cheese was

Table 1
Raw materials (g) for the production of model processed cheeses with 30, 45 and 60% (w/w) FDM.

Raw materials	Type of processed cheeses (% w/w) FDM		
	30	45	60
Eidamsky Blok – cheese	520	440	300
Butter	5	90	165
Water	155	230	280
Emulsifying agents	14	14	14
Total amount	694	774	759

performed twice on 2 different days using the same technological protocol (6 batches were produced in total). Processed cheeses were analyzed after 21 days of storage at 6 ± 2 °C. The processing parameters and the raw materials were selected to simulate the industrial conditions (Přiska and Šrětina, 2004).

2.3. Basic chemical analysis of processed cheeses

Basic properties of model processed cheeses were characterized by specifying their pH, dry matter, fat, ash and crude protein content. The dry matter content was determined by gravimetric method according to ISO 5534:2004. The fat content was determined acidobutyrometrically (Berger et al., 2002). The ash content was obtained according to Černá and Mergl (1971) – the sample was incinerated at 550 ± 5 °C and the residue was weighed. The analysis of crude protein content was conducted according to the Kjeldahl method; as the multiplying coefficient the value of 6.38 was used (Lynch et al., 2002). The pH of the samples was measured by using a pH-meter GRYF209S (GryfHB, Havlíckov Brod, Czech Republic) with a combined glass electrode at 22 ± 2 °C. Each sample was measured at least twice. The results were statistically evaluated by means of Wilcoxon test.

2.4. Hydrolysis procedure

The samples of casein (20–25 mg) and processed cheese (100–120 mg) were accurately weighed into screw-capped test tubes (washed in chromosulphuric acid for 24 h) with teflon caps (20 ml, Labicom, Olomouc, Czech Republic). Fifteen millilitres of 6 mol/l HCl were added to the tubes, which were purged by argon for 1 min. Then the tubes were placed in a thermoblock (Labicom, Olomouc, Czech Republic) heated at 110 ± 1 °C and hydrolyzed for 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 48, 72, 96, 120 and 144 h. The temperature of the thermoblock was independently controlled by using a thermometer drowned in a test tube filled with silicone oil (the test tube was placed in the thermoblock). Two other hydrolysis times (21 and 70 h) were used for the evaluation of nonlinear regression model quality (see the part Data analysis). All hydrolysis times for each sample were performed at least twice on different days. After the hydrolysis, the test tubes were cooled down to 20 °C. Hydrochloric acid was evaporated and the rosy residue was diluted in loading buffer (see Table 2) in a 25 ml volumetric flask. The mixture was filtered through a 0.45 µm filter and loaded into an analyser. Also, hydrolysis time 0 was used – samples were weighed in test tubes, embedded by 15 ml of HCl, vigorously mixed and filtered through a roughing filter. Further processes (evaporation, dilution and filtration) were the same as in the case of the other samples.

2.5. Amino acid analysis

Fifteen amino acids (aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid, proline, glycine, alanine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, tyrosine, histidine, lysine and arginine) were determined

by using ion-exchange chromatography. During the acid hydrolysis, asparagine and glutamine were converted into aspartic and glutamic acid, respectively. The amount of a hundred µl of the hydrolysate extract in loading buffer was automatically injected into an Amino Acid Analyser AAA400 (Ingos, Prague, Czech Republic) equipped with a column (370 mm × 3.7 mm filled with an ion exchanger Ostion LG ANG – Ingos, Prague, Czech Republic), post-column ninhydrine derivatization and spectrophotometric detection (440 nm for proline and 570 nm for other amino acids). Amino acids were eluted according to the program (the composition of sodium citrate buffers is presented in Table 2): 0–5 min buffer A, 5–32 min buffer B, 32–44 min buffer C, 44–75 min buffer D. Then the column was regenerated by 0.2 mol/l NaOH for 10 min and stabilized for further 17 min by buffer A. The temperature of column was set at 60 °C (0–60 min and 90–102 min) and at 74 °C (60–90 min), respectively. The buffer system and the process of ninhydrine reagent preparation [consisting of ninhydrine, methylcellosolve, acetate buffer (pH 5.5) and hydriindantine] had been recommended by the manufacturer of the analyser. A flow rate was 0.3 ml/min for buffers and 0.2 ml/min for ninhydrine reagent. Each hydrolysate was analyzed in duplicate. A standard of 15 analyzed amino acids was obtained from Ingos, Prague, Czech Republic.

2.6. Data analysis

The dependence of the content of free amino acids (B) on hydrolysis time (t) in bovine casein and processed cheese samples was described by means of the following function:

$$B(t) = \frac{A_0 h}{h-l} (e^{-lt} - e^{-ht}) + \varepsilon \quad (1)$$

where $B(t)$ stands for the content of free amino acids (g/kg) at time t (h); A_0 is the original level of amino acids in protein prior to the hydrolysis (g/kg); h is the rate at which the protein bound amino acids are hydrolyzed to a free and measurable form; l is the rate at which amino acids are degraded; ε is a random residual error (Darragh et al., 1996). The estimates of A_0 , h and l parameters were determined by nonlinear regression analysis (nonlinear least squares regression) for the following conditions $A_0 > 0$, $h > 0$ and $l \geq 0$. The Marquardt-Levenberg method was applied by means of statistical software Unistat version 5.5 (Unistat Ltd., London, UK). Standard deviations were added to the estimated parameters. In order to construct regression curves, hydrolysis times 0, 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 48, 72, 96, 120 and 144 h were used.

Quality of the models designed was evaluated by means of correlation coefficient (r). Then, on the basis of the estimated parameters (A_0 , h and l), the concentrations of 15 amino acids (for $t = 21$ and 70) were calculated and compared with the real content of amino acids measured at hydrolysis times 21 and 70 h (using a Student's test).

Table 3
The results of basic chemical analysis (pH, dry matter content, fat content, crude protein content, ash content) of processed cheeses with 30, 45 and 60% (w/w) FDM^A.

	Type of processed cheeses (% w/w) FDM		
	30	45	60
Dry matter content (% w/w)	41.87 ± 0.27 ^a	41.86 ± 0.30 ^a	41.85 ± 0.13 ^a
Fat content (% w/w)	13.75 ± 0.65 ^a	19.50 ± 0.41 ^b	26.38 ± 0.48 ^c
Ash (% w/w)	5.38 ± 0.06 ^a	4.35 ± 0.03 ^b	3.50 ± 0.01 ^c
Crude protein (% w/w)	21.37 ± 0.45 ^a	16.23 ± 0.41 ^b	11.54 ± 0.16 ^c
pH	5.87 ± 0.02 ^a	5.85 ± 0.04 ^a	5.90 ± 0.03 ^a

^A Results are presented by mean ± standard deviation. Means within a row followed by no common superscript letter differ ($P < 0.05$). Values were statistically evaluated by means of Wilcoxon test.

Table 2
The composition (g) of used sodium citrate buffers for final volume 1 L.

Reagent	Buffer				Loading buffer
	A	B	C	D	
Citric acid monohydrate	11.11	10.00	7.53	0	14.00
Sodium citrate dihydrate	4.04	5.60	9.06	19.60	0
Sodium chloride	9.29	8.36	18.00	52.60	11.50
Boric acid	0	0	0	2.05	0
Sodium azide	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Sodium hydroxide	0	0	0	0.50	0
Thiodiglycol (ml)	2.50	2.50	2.50	0	5.00

Table 4

Prediction of the amino acid content in bovine casein and processed cheeses with 30, 45 and 60% (w/w) FDM (for time prior to hydrolysis – A_0) determined by nonlinear regression.

Amino acids	Predicted amino acid content (g/kg) ^a			
	Bovine casein	Type of processed cheeses (% w/w) FDM		
		30	45	60
Aspartic acid	61.79 ± 0.34	14.11 ± 0.07	10.89 ± 0.08	7.88 ± 0.06
Threonine	38.75 ± 0.38	8.10 ± 0.06	6.55 ± 0.07	4.88 ± 0.06
Serine	47.79 ± 0.34	11.79 ± 0.11	9.28 ± 0.13	6.06 ± 0.08
Glutamic acid	184.16 ± 1.31	42.75 ± 0.32	34.55 ± 0.32	24.02 ± 0.33
Proline	104.60 ± 0.79	23.87 ± 0.12	19.21 ± 0.18	13.43 ± 0.13
Glycine	15.43 ± 0.07	3.61 ± 0.02	2.73 ± 0.01	1.90 ± 0.01
Alanine	24.84 ± 0.16	5.62 ± 0.05	4.05 ± 0.02	2.79 ± 0.01
Valine	56.29 ± 0.70	12.78 ± 0.22	9.33 ± 0.10	6.67 ± 0.06
Isoleucine	41.93 ± 0.46	9.33 ± 0.10	6.91 ± 0.06	4.89 ± 0.04
Leucine	71.95 ± 0.33	17.28 ± 0.10	12.96 ± 0.06	9.17 ± 0.06
Tyrosine	47.47 ± 0.31	10.78 ± 0.14	8.36 ± 0.08	5.89 ± 0.06
Phenylalanine	40.40 ± 0.22	9.66 ± 0.07	7.36 ± 0.05	5.20 ± 0.03
Histidine	24.60 ± 0.30	6.21 ± 0.09	4.60 ± 0.07	3.21 ± 0.04
Lysine	61.97 ± 0.41	15.26 ± 0.11	11.38 ± 0.06	8.03 ± 0.04
Arginine	34.35 ± 0.21	7.73 ± 0.07	5.93 ± 0.05	4.16 ± 0.03

^a A_0 -values ± standard deviation obtained from nonlinear regression are shown.

3. Results and discussion

3.1. Basic analysis of processed cheese

The results of the basic chemical analyses (see Table 3) show that processed cheeses with the similar pH and dry matter content have been produced ($P \geq 0.05$). In processed cheeses, the amount of crude proteins and ash was decreasing significantly ($P < 0.05$) with the rising fat content ($P < 0.05$). Processed cheeses varying in their fat content but having a constant dry matter content have been produced, which was the precondition of this work.

3.2. Results and quality of the nonlinear regression performed

The estimated values of regression parameters (A_0 , h and l) including their standard deviations for the amino acids determined (aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid, proline, glycine, alanine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, tyrosine, histidine, lysine and arginine) in bovine casein and processed cheeses with 30, 45 and 60% (w/w) FDM are shown in Tables 4–6.

The dependence of amino acid content on hydrolysis time (for bovine casein) is illustrated graphically in Figs. 1 and 2.

Maximum yield of most amino acids was achieved at the hydrolysis interval from 10 to 20 h, which corresponds with the results described by Albin et al. (2000). There were some exceptions illustrated mainly by the amino acids valine and isoleucine, where the maximum was achieved as late as after 20 h of hydrolysis, which is supported by very low values of hydrolysis rates (h) in Table 5 in relation to the other amino acids determined. The fact that the hydrolysis rates for valine and isoleucine are the lowest in comparison with other amino acids was also found out in a study by Darragh et al. (1996), who conducted experiments with egg-white lysozyme. Higher release of valine and isoleucine from casein after 44 and 66 h hydrolysis in comparison with 22 h hydrolysis was observed in the work of Sarwar et al. (1983). Also, the difficulty in hydrolysing valine and isoleucine is often described in other literal sources, which can be supported by Fountoulakis and Lahm (1998).

Table 6 shows that loss rates (l) of many amino acids (especially glycine, alanine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine and lysine) were very low or approaching zero, which can be illustrated by their small losses during the hydrolysis. In contrast, greater losses and thus higher values of l can be observed with the growing hydrolysis time in the amino acids threonine, serine and tyrosine. Higher loss rates for the latter amino acids were also described by Darragh et al. (1996). High sensitivity of threonine, serine and tyrosine and their losses in severe conditions of acid hydrolysis can be supported by many other studies (Fountoulakis and Lahm, 1998; Sarwar et al., 1983).

Fig. 3 clearly shows that both, the course of hydrolysis and hydrolysis curve for histidine are different and atypical in comparison with the other amino acids tested. The values of hydrolysis rate (h) in processed cheeses were thousands and in the samples with the highest fat content as high as 10^{15} (see Table 5). Thus, this amino acid was excluded from the following evaluation. Problems with modelling the hydrolysis curve for histidine can also be observed in the work of Darragh et al. (1996). A possible explanation for the atypical development of histidine content according to hydrolysis time could be its higher sensitivity to racemization (Weiss et al., 1998).

The values of correlation coefficients of hydrolysis curves for the individual amino acids (except for histidine) ranged for bovine casein at the interval 0.9600–0.9867, for processed cheese with 30% FDM 0.9565–0.9904, for processed cheese with 45% FDM 0.9649–0.9912 and for processed cheese with 60% FDM 0.9305–

Table 5

Prediction of hydrolysis rates (h) for amino acids in bovine casein and processed cheeses with 30, 45 and 60% (w/w) FDM determined by nonlinear regression.

Amino acids	Predicted hydrolysis rates ^a			
	Bovine casein	Type of processed cheeses (% w/w) FDM		
		30	45	60
Aspartic acid	1.8218 ± 0.0901	1.8174 ± 0.0573	1.8487 ± 0.0930	1.6811 ± 0.0943
Threonine	0.8515 ± 0.0472	0.7219 ± 0.0248	0.8824 ± 0.0456	0.7752 ± 0.0453
Serine	1.2167 ± 0.0515	1.0256 ± 0.0457	0.8287 ± 0.0511	0.9439 ± 0.0615
Glutamic acid	1.5674 ± 0.0908	1.2810 ± 0.0586	1.2577 ± 0.0628	1.3037 ± 0.1104
Proline	1.4316 ± 0.0825	1.3203 ± 0.0369	1.3094 ± 0.0649	1.1659 ± 0.0597
Glycine	1.9159 ± 0.0800	1.9363 ± 0.0647	1.9642 ± 0.0670	1.7844 ± 0.0745
Alanine	1.7668 ± 0.0982	1.8862 ± 0.1105	2.0710 ± 0.0708	1.9067 ± 0.0764
Valine	0.4107 ± 0.0205	0.4839 ± 0.0253	0.5651 ± 0.0254	0.4635 ± 0.0231
Isoleucine	0.3770 ± 0.0169	0.3896 ± 0.0166	0.4609 ± 0.0192	0.4102 ± 0.0198
Leucine	1.3939 ± 0.0442	1.4268 ± 0.0500	1.5548 ± 0.0453	1.5065 ± 0.0701
Tyrosine	1.0891 ± 0.0421	1.0997 ± 0.0803	0.8505 ± 0.0417	1.2973 ± 0.0825
Phenylalanine	1.0544 ± 0.0349	1.1898 ± 0.0497	1.0613 ± 0.0445	1.5979 ± 0.0658
Histidine ^b	112.5982	4610.1796	4823.6093	9.79 × 10 ¹⁵
Lysine	0.9795 ± 0.0383	0.9466 ± 0.0420	1.0878 ± 0.0281	1.0027 ± 0.0354
Arginine	0.9154 ± 0.0307	0.7571 ± 0.0342	0.8985 ± 0.0311	0.9294 ± 0.0433

^a h -values ± standard deviation obtained from nonlinear regression are shown.

^b Standard deviations for histidine were not calculated by software.

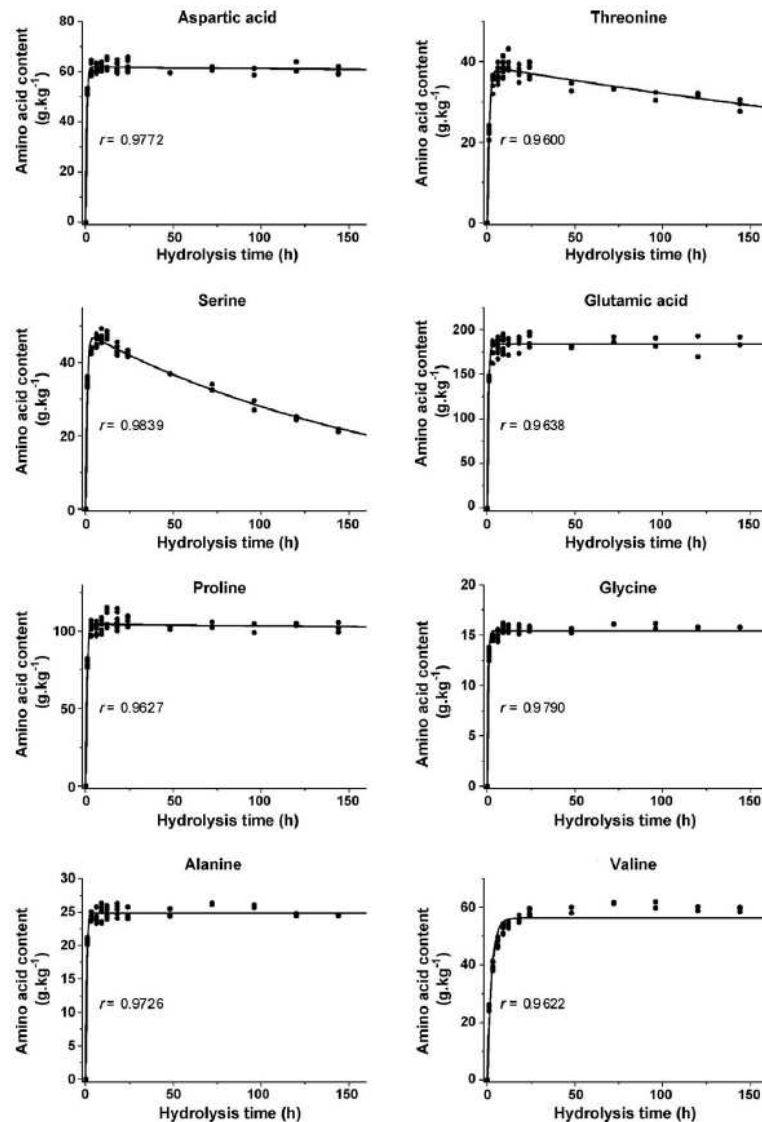


Fig. 1. Effect of hydrolysis time (X-axis) during amino acid analysis on the yield of amino acids (Y-axis, amino acid content in g/kg) in bovine casein (for aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid, proline, glycine, alanine and valine). The amino acid contents and the line of best fit determined using nonlinear regression are plotted.

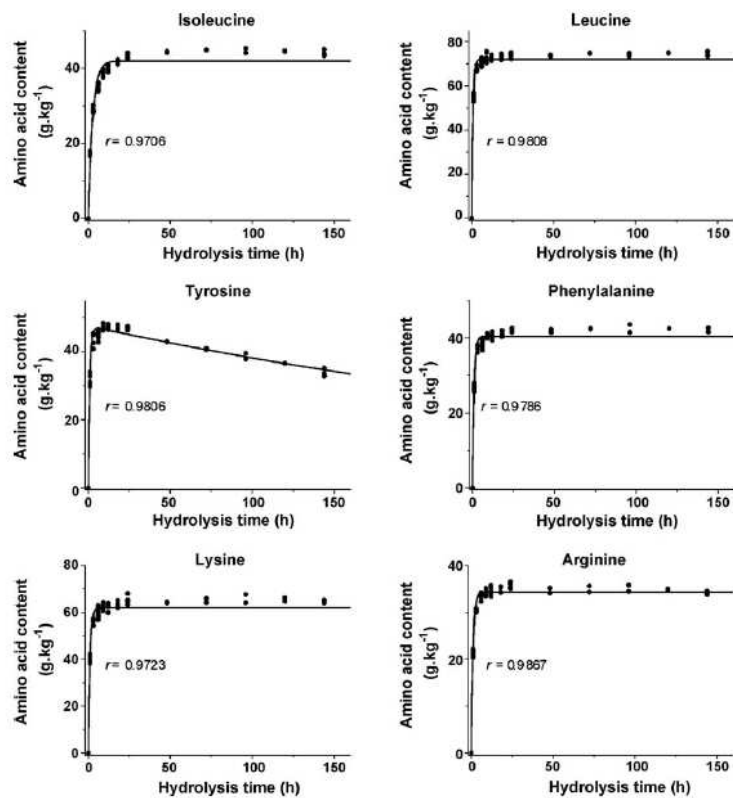
0.9887. The values of the content of the amino acids tested (except for histidine) occur relatively close to the predicated line.

When comparing the values of amino acid content calculated according to the estimated hydrolysis curves for the 21st hour ($t = 21$) with chromatographically determined concentration in bovine casein (after 21-h hydrolysis), in all amino acids tested (except for histidine) there is an insignificant recovery at the interval 96–103% ($P \geq 0.05$). As for processed cheeses, an insignificant

recovery ($P \geq 0.05$) was calculated, in the same conditions, for samples with 30% (w/w) FDM 98–105% (except for threonine – 113%; $P < 0.05$), for samples with 45% (w/w) FDM 94–105% (except for aspartic acid – 89% and proline – 109%; $P < 0.05$) and for samples with 60% (w/w) FDM 95–105%. Also, the same comparison took place for 70 h of hydrolysis with the following results: an insignificant recovery ($P \geq 0.05$) for bovine casein 95–107%, for processed cheeses with 30% (w/w) FDM 94–105%, with 45% (w/w)

Table 6Prediction of loss rates (*l*) for amino acids in bovine casein and processed cheeses with 30, 45 and 60% (w/w) FDM determined by nonlinear regression.

Amino acids	Predicted loss rates ^a			
	Bovine casein	Type of processed cheeses (% w/w) FDM		
		30	45	60
Aspartic acid	0.0001 ± 0.0001	0.0000 ± 0.0001	0.0002 ± 0.0001	0.0007 ± 0.0001
Threonine	0.0019 ± 0.0002	0.0015 ± 0.0002	0.0023 ± 0.0002	0.0058 ± 0.0003
Serine	0.0054 ± 0.0002	0.0054 ± 0.0003	0.0068 ± 0.0004	0.0075 ± 0.0003
Glutamic acid	0.0000 ± 0.0001	0.0001 ± 0.0000	0.0004 ± 0.0002	0.0012 ± 0.0002
Proline	0.0001 ± 0.0001	0.0000 ± 0.0001	0.0009 ± 0.0002	0.0013 ± 0.0002
Glycine	0.0000 ± 0.0002	0.0000 ± 0.0000	0.0001 ± 0.0001	0.0001 ± 0.0001
Alanine	0.0000 ± 0.0000	0.0001 ± 0.0001	0.0001 ± 0.0001	0.0000 ± 0.0000
Valine	0.0000 ± 0.0002	0.0000 ± 0.0002	0.0000 ± 0.0002	0.0000 ± 0.0001
Isoleucine	0.0000 ± 0.0002	0.0000 ± 0.0001	0.0000 ± 0.0001	0.0000 ± 0.0001
Leucine	0.0000 ± 0.0001	0.0000 ± 0.0002	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0002
Tyrosine	0.0022 ± 0.0001	0.0033 ± 0.0004	0.0048 ± 0.0002	0.0063 ± 0.0003
Phenylalanine	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0001	0.0001 ± 0.0001	0.0003 ± 0.0001
Histidine	0.0000 ± 0.0001	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0002	0.0000 ± 0.0000
Lysine	0.0000 ± 0.0002	0.0000 ± 0.0001	0.0000 ± 0.0001	0.0001 ± 0.0001
Arginine	0.0000 ± 0.0000	0.0005 ± 0.0001	0.0010 ± 0.0001	0.0017 ± 0.0002

^a *l*-values ± standard deviation obtained from nonlinear regression are shown.**Fig. 2.** Effect of hydrolysis time (*X*-axis) during amino acid analysis on the yield of amino acids (*Y*-axis, amino acid content in g/kg) in bovine casein (for isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine, lysine and arginine). The amino acid contents and the line of best fit determined using nonlinear regression are plotted.

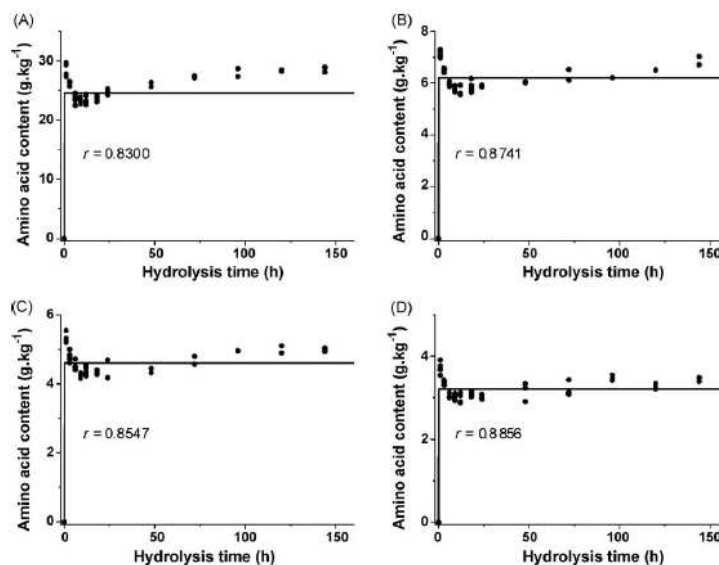


Fig. 3. Effect of hydrolysis time (X-axis) during an analysis on the yield of histidine (Y-axis, histidine content in g/kg) in bovine casein (A) and processed cheeses with 30% (w/w) (B), 45% (w/w) (C) and 60% (w/w) (D) fat in dry matter. The histidine contents and the line of best fit determined using nonlinear regression are plotted.

FDM 97–107% (except for threonine – 92%; $P < 0.05$) and with 60% (w/w) FDM 102–108% (except for aspartic acid – 109%, valine – 109% and threonine – 115%; $P < 0.05$).

As it is clear from the results of correlation coefficients as well as from the comparison of the values predicated (using nonlinear regression) with those chromatographically measured in reality (for $t = 21$ and 70), the models designed (except for histidine) describe the dependence of amino acid content on hydrolysis time in an acceptable way.

3.3. Comparison of models for bovine casein and processed cheeses

When comparing the content of the individual amino acids prior to the hydrolysis (A_0 in Table 4) in specific samples analyzed (bovine casein and processed cheeses with three varying FDM), it was found that the values decreased according to the crude protein content in samples (for processed cheeses see Table 3); for bovine casein it was $\geq 90\%$ (w/w).

In all processed cheeses, the values of hydrolysis rates (h in Table 5) for alanine, valine, isoleucine, leucine and phenylalanine are higher than those in bovine casein. In contrast, the values of hydrolysis rates for serine, glutamic acid and proline are higher in bovine casein than in all processed cheeses. No definite dependence of the hydrolysis rate on the fat content in processed cheeses has been found out.

On the other hand, the fat content has significantly influenced the loss rates (l in Table 6) for some amino acids. With the rising fat content in the samples, the loss rates for aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid, proline, tyrosine, phenylalanine and arginine were increasing. Thus, processed cheeses with 45 and 60% (w/w) FDM showed higher values of l for the above-mentioned amino acids in relation to both the samples with 30% (w/w) FDM and bovine casein. As for glycine, alanine, valine, isoleucine, leucine and lysine, the values of loss rate have not been influenced by the fat content in the samples.

The explanation for higher values of loss rates in the samples with a higher fat content could be the reactions of secondary products of lipid oxidation with amino acids in proteins or free amino acids (Friedman, 1996b). With the rising fat content in products, it is expected that more intensive oxidation, a higher content of secondary products of lipid oxidation and thus more intensive interactions with amino acids will occur. The reactions with secondary products of lipid oxidation take place not only with amino acids which are generally less stable in hydrolysis conditions (especially threonine, serine, tyrosine and partially arginine), but also with others (e.g. aspartic acid, glutamic acid, proline and phenylalanine). According to Juranville et al. (1998) free hydroxyl groups of glycerol can cause interactions with aspartate and glutamate and thus influence the determination of aspartic and glutamic acids [during acid hydrolysis, aspartate and glutamate are converted into the corresponding acids (Salo-Väänänen and Koivistoinen, 1996)]. At higher temperatures in an analyzed system, HCl can enhance the production of glycerol and also mono- and diacylglycerols (containing two or one free hydroxyl groups) by hydrolytic cleavage of fatty acids from triacylglycerols, which form the majority of milk fat (Fox and McSweeney, 1998).

3.4. Correction factors for amino acid content in bovine casein and processed cheeses

Table 7 contains correction factors for the individual amino acids in the samples analyzed (bovine casein and processed cheeses) derived by expressing the proportion of A_0 -value to the chromatographically determined content of the given amino acid (at 24 h). In bovine casein, the correction factor for the majority of amino acids ranges at the interval 1.00–1.03 (except for serine 1.14). In processed cheeses, the correction factors have been calculated as follows: for samples with 30% (w/w) FDM at the interval 1.00–1.04 (except for serine 1.17), for samples with 45%

Table 7
Correction factors for amino acid content (determined by expressing A_0 -values from nonlinear regression as a proportion of the chemical analysis yield at 24 h) in bovine casein and processed cheeses with 30, 45 and 60% (w/w) FDM.

Amino acids	Correction factors			
	Bovine casein	Type of processed cheeses (% w/w) FDM		
		30	45	60
Aspartic acid	1.00	1.00	1.05	1.02
Threonine	1.03	1.04	1.08	1.18
Serine	1.14	1.17	1.17	1.19
Glutamic acid	1.00	1.00	1.00	1.04
Proline	1.00	1.01	1.00	1.09
Glycine	1.00	1.00	1.01	1.02
Alanine	1.03	1.01	1.04	1.02
Valine	1.00	1.00	1.00	1.00
Isoleucine	1.00	1.00	1.00	1.00
Leucine	1.00	1.00	1.00	1.00
Tyrosine	1.03	1.04	1.14	1.14
Phenylalanine	1.00	1.00	1.00	1.02
Histidine	1.01	1.07	1.07	1.08
Lysine	1.00	1.00	1.00	1.02
Arginine	1.00	1.00	1.01	1.05

(w/w) FDM at the interval 1.00–1.05 (except for threonine 1.08, tyrosine 1.14 and serine 1.17) and for samples with 60% (w/w) FDM at the interval 1.00–1.09 (except for tyrosine 1.14, threonine 1.18 and serine 1.19). Also, the correction factors for histidine have been determined (see Table 7) but from the viewpoint of problematic construction of the hydrolysis curve model, their accuracy is questionable. Higher correction factors have been determined mainly for the amino acids sensitive to hydrolysis conditions (especially threonine, serine and tyrosine); this is confirmed by Darragh et al. (1996) and Fountoulakis and Lahm (1998).

As can be seen from the comparison of correction factors with the formerly published data (Albin et al., 2000), our values for the majority of amino acids are slightly lower. This could be explained by the fact that Albin et al. (2000) determined amino acids mainly in materials rich in saccharides, while the processed cheeses tested in this work contain practically no saccharides (see raw materials in Table 1). According to Ravindran and Bryden (2005) the presence of saccharides and fibre can increase the amino acid losses significantly, which is also confirmed by the study of Darragh and Moughan (2005). The absence of polysaccharides in the matrices tested (bovine casein and processed cheeses) can explain the smooth course of hydrolysis and thus relatively low correction factors also for valine and isoleucine, which are by 10–20% higher in other studies (Albin et al., 2000; Darragh and Moughan, 2005).

As shown in Table 7 it is clear that for the majority of amino acids, the correction factors rose with the increasing fat content in the sample. This increase in values of correction factors in threonine, serine, glutamic acid, phenylalanine, tyrosine and arginine is in accordance with the growing loss rates (I) of hydrolysis curves.

The possible solution of problems with amino acid losses due to fat occurrence could be based on the removing fat from sample matrix prior to protein hydrolysis (i.e. by solvent extraction). In further studies, it would be suitable to compare the hydrolysis curves of dairy products not only with a different fat content, but also with a different content of lactose and hydrocolloids (polysaccharides – carrageenans, pectins, modified starches, xanthan gums, etc.), which are widely used in the dairy industry nowadays (Imeson, 2000; Poláková et al., 2002; Spagnuolo et al., 2005; Syrbe et al., 1998) and might influence the hydrolysis of the proteins present. Also, future experiments in this area could be designed as interlaboratory studies with adjustment of amino acid

data to constant nitrogen recovery for the improvement of accuracy (Sarwar et al., 1983).

4. Conclusions

In this work, hydrolysis curves for 15 amino acids (aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid, proline, glycine, alanine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, tyrosine, histidine, lysine and arginine) in bovine casein and processed cheeses with 30, 45 and 60% (w/w) FDM have been constructed by means of 13 hydrolysis times (0–144 h). According to the estimated hydrolysis curves, correction factors were calculated for the standard 24-h hydrolysis with the aim of balancing the losses of some amino acids caused during acid hydrolysis. For the majority of amino acids, the correction factors ranged in an interval of 1.00 to 1.09; only in threonine, serine and tyrosine increased by a further 5–10%. The dependence of the values of hydrolysis rates on the fat content in samples has not been proved. On the other hand, for some amino acids, there exist the dependence of loss rates and the values of correction factors on the fat content in samples. This work confirms the hypothesis that it is essential to have hydrolysis curves constructed for particular samples (taking into account the presence of proteins and other compounds as well) in order to obtain accurate and acceptable determination of the amino acid content in food.

Acknowledgement

This work was kindly supported by a project of Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Grant no. MSM 7088352101).

References

- Albin, D.M., Wubben, J.E., Gabert, V.M., 2000. Effect of hydrolysis time on the determination of amino acids in samples of soybean products with ion-exchange chromatography of precolumn derivatization with phenyl isothiocyanate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48, 1684–1691.
- Algeria, A., Barberá, R., Farré, R., Lagarda, M.J., López, J.C., 1999. Amino acid contents of infant formulas. *Journal of Food Composition and Analysis* 12, 137–146.
- Baxter, J.H., Lai, C.S., Phillips, R.R., Dowlati, L., Chio, J.J., Luebbers, S.T., Dimler, S.R., Johns, P.W., 2007. Direct determination of methionine sulfoxide in milk proteins by enzyme hydrolysis/high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1157, 10–16.
- Berger, W., Klostermeyer, H., Merkenich, K., Uhlmann, G., 2002. Processed Cheese Manufacture. A JOHA Guide. BK Giulini Chemie GmbH & Co. OHG, Ladenburg (Germany).
- Buřka, F., Pavlínek, V., Hrabě, J., Rop, O., Janiš, R., Krejčí, J., 2007. Effect of 1-monoglycerides on viscoelastic properties of processed cheeses. *International Journal of Food Properties* 10, 819–828.
- Chin, C.C.Q., 1984. Ion-exchange chromatography of some amino acid derivatives found in proteins. *Methods in Enzymology* 106, 17–21.
- Chiou, S.H., Wang, K.T., 1988. Simplified protein hydrolysis with methanesulphonic acid at elevated temperature for the complete amino acid analysis of proteins. *Journal of Chromatography* 448, 404–410.
- Černá, E., Mergl, M., 1971. *Control Methods in Dairy Industry*, 1st ed. State Technical Press, Prague (Czech Republic) (in Czech).
- Darragh, A.J., Garrick, D.J., Moughan, P.J., Hendriks, W.H., 1996. Correction for amino acid loss during acid hydrolysis of purified protein. *Analytical Biochemistry* 236, 199–207.
- Darragh, A.J., Moughan, P.J., 2005. The effect of hydrolysis time on amino acid analysis. *Journal of AOAC International* 88, 888–893.
- Fiamigos, Y.C., Stalikas, C.D., 2006. Gas chromatographic determination of amino acids via one-step phase-transfer catalytic pentafluorobenzoylation-preconcentration. *Journal of Chromatography A* 1110, 66–72.
- Fountoulakis, M., Lahm, H.W., 1998. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *Journal of Chromatography A* 826, 109–134.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., 1998. *Dairy Chemistry and Biochemistry*, 1st ed. Blackie Academic & Professional, New York and London.
- Friedman, M., 1996a. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 44, 6–29.
- Friedman, M., 1996b. Food browning and its prevention: an overview. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 44, 631–653.
- Friedman, M., Cui, J.L., 1988. Chemistry, analysis, nutritional value, and toxicology of tryptophan in food. A review. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 36, 1079–1093.

- Ginger, M.R., Grigor, M.R., 1999. Comparative aspects of milk caseins. *Comparative Biochemistry and Physiology B - Biochemistry & Molecular* 124, 133–145.
- Guinee, T.P., Carić, M., Kafab, M., 2004. Pasteurized processed cheese and substitute/imitation cheese products. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Volume 2: Major Cheese Groups. 3rd ed. Elsevier Applied Science, London and New York, pp. 349–394.
- Hanko, V.P., Rohrer, J.S., 2002. Direct determination of tryptophan using high performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. *Analytical Biochemistry* 308, 204–209.
- Imeson, A.P., 2000. Carrageenan. In: Phillips, G.O., Williams, P.A. (Eds.), *Handbook of hydrocolloids*. 1st ed. Woodhead Publishing Limited and CRC Press, Boca Raton, pp. 87–102.
- ISO Standard No. 5534:2004. Cheese and Processed Cheese—Determination of the Total Solids Content (Reference method). International Organization for Standardization, Geneva.
- Juranville, J.F., Pöschl, B., Oesterbelt, G., Schönfeld, H.J., Fountoulakis, M., 1998. Glycerol affects the quantification of aspartate and glutamate in acid hydrolyzed proteins. *Amino Acids* 15, 253–262.
- Krácmar, S., Liška, I., Minárik, B., Zbiral, J., 2000. Amino acids determination in standard solution and feed mixture: an interlaboratory study. *Acta universitatis agriculturae et silviculturae Mendelianae Brunensis* 48, 69–79.
- Liška, I., Krácmar, S., 1998. Protein amino acids in the pollen of *Pinus banksiana*: acid hydrolysate preparation for amino acid analysis. *Acta universitatis agriculturae et silviculturae Mendelianae Brunensis* 46, 27–64.
- Lynch, J.M., Barbano, D.M., Fleming, J.R., 2002. Determination of the total nitrogen content of hard, semihard and processed cheese by the Kjeldahl method: collaborative study. *Journal of AOAC International* 85, 445–455.
- Malmer, M.F., Schroeder, L.A., 1990. Amino acid analysis by high performance liquid chromatography with methanesulfonic acid hydrolysis and 9-fluorenylmethylchloroformate derivatization. *Journal of Chromatography* 514, 227–239.
- Nair, B.M., Öste, R., Asp, N.G., Dahlgvist, A., 1976. Enzymatic hydrolysis of food protein for amino acid analysis. I. Solubilization of the protein. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 24, 386–389.
- Ozols, J., 1990. Amino acid analysis. *Methods in Enzymology* 182, 587–601.
- Peace, R.W., Gilani, G.S., 2005. Chromatographic determination of amino acids in foods. *Journal of AOAC International* 88, 877–887.
- Piška, I., Štětina, J., 2004. Influence of cheese ripening and rate of cooling of the processed cheese mixture on rheological properties of processed cheese. *Journal of Food Engineering* 61, 551–555.
- Poláková, M., Márová, I., Hladíková, R., Valášek, P., Drdák, M., 2002. Protective effect of food components against oxidative stress in human. In: International workshop: Technologies and processes for sustainable development and pollution reduction/prevention - Proceedings of ICS-UNDO Workshop, Brno, Czech Republic, January 14–16, pp. 289–293.
- Ravindran, G., Bryden, W.L., 2005. Tryptophan determination in proteins and feedstuffs by ion exchange chromatography. *Food Chemistry* 89, 309–314.
- Salo-Väänänen, P.P., Koivistoinen, P.E., 1996. Determination of protein in foods: comparison of net protein and crude protein ($N \times 6.25$) values. *Food Chemistry* 57, 27–31.
- Sarwar, G., Christensen, D.A., Finlayson, A.J., Friedman, M., Hackler, L.R., MacKenzie, S.L., Pellett, P.L., Tkachuk, R., 1983. Inter- and intra-laboratory variation in amino acid analysis of food proteins. *Journal of Food Science* 48, 526–531.
- Sato, H., Seino, T., Kobayashi, T., Murai, A., Yugari, Y., 1984. Determination of tryptophan content of feed and feedstuffs by ion-exchange liquid chromatography. *Agricultural and Biological Chemistry* 48, 2961–2969.
- Spagnuolo, P.A., Dalgleish, D.G., Goff, H.D., Morris, E.R., 2005. Kappa-carrageenan interactions in systems containing casein micelles and polysaccharide stabilizers. *Food Hydrocolloids* 19, 371–377.
- Standara, S., Drdák, M., Veselá, M., 1999. Amino acid analysis: reduction of ninhydrin by sodium borohydride. *Food* 43, 410–413.
- Sun, S.W., Lin, Y.C., Weng, Y.M., Chen, M.J., 2006. Efficiency improvements on ninhydrin method for amino acid quantification. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 112–117.
- Syrbe, A., Bauer, W.J., Klostermeyer, H., 1998. Polymer science concepts in dairy systems—an overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. *International Dairy Journal* 8, 179–193.
- Torgatinejad, N.M., Rutherford, S.M., Moughan, P.J., 2005. Total and reactive lysine contents in selected cereal-based food products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53, 4454–4458.
- Weiss, M., Manneberg, M., Juranville, J.F., Lahm, H.W., Fountoulakis, M., 1998. Effect of the hydrolysis method on the determination of the amino acid composition of proteins. *Journal of Chromatography A* 795, 263–275.