

# Stanovení volných aminokyselin

Barbora Ivičičová

---

Bakalářská práce  
2008

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství

akademický rok: 2007/2008

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Barbora IVIČIČOVÁ**

Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Stanovení volných aminokyselin v potravinách**

Zásady pro vypracování:

1. Stručně charakterizujte úlohu aminokyselin a bílkovin ve výživě člověka.
2. Následně se zabývejte volnými aminokyselinami jako markeru intenzity fermentačních anebo hydrolyzačních procesů. Uvedte přehled analytických metod určených pro stanovení obsahu volných aminokyselin. Zabývejte se také extrakčními procesy.
3. Na závěr doporučte vhodný postup aplikovatelný v podmínkách Ústavu potravinářského inženýrství FT UTB ve Zlíně.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Harperova a kol., Biochemie, z anglického originálu Harper's Biochemistry, 23. vydání  
, přeložilo nakladatelství a vydavatelství H&H jako 3. vydání (v Česku jako 4. vydání), 2002  
Hoza I., Kramářová, D. Potravinářská biochemie I., 1. vydání Zlín UTB 2005  
Vodrážka, Z., Biochemie, VŠCHT Praha v Čs. reakci VN MON, 1990 Šicho V., Vodrážka  
Z., Králová B., Potravinářská biochemie, Praha 1981, 2. vydání, SNTL/ALFA

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. František Buňka, Ph.D.**

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

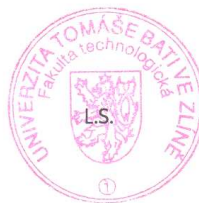
**20. listopadu 2007**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**31. května 2008**

Ve Zlíně dne 12. května 2008

  
doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.  
děkan



  
prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.  
vedoucí katedry

## **ABSTRAKT**

Bakalářská práce se zabývá stanovením volných aminokyselin v rostlinných a živočišných materiálech. V práci je popsána charakteristika aminokyselin a bílkovin, význam stanovení volných aminokyselin v potravinách a metody stanovení volných aminokyselin včetně některých extrakčních procesů. Na závěr této práce je navržena vhodná metoda jejich stanovení na Ústavu potravinářského inženýrství Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně.

Klíčová slova: volné aminokyseliny, chromatografie, potraviny

## **ABSTRACT**

The bachelor thesis deals with determination of free amino acids in plant and animal samples. The present study describes the characteristics of amino acids and proteins, the meaning of determination of free amino acids in food and the methods of their assessment including some extraction processes. In conclusion there is suggested the appropriate method of their determination at Department of Food Engineering at Tomas Bata University in Zlin.

Keywords: free amino acids, chromatography, food

## Poděkování

Chtěla bych poděkovat mému vedoucímu bakalářské práce, panu Ing. Františku Buňkovi, Ph.D., za odborné vedení, velkou trpělivost a věnovaný čas. Dále chci poděkovat svojí rodině a známým za podporu a víru, že tuto práci někdy dopíšu.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvolněno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně dne

.....

podpis

## **OBSAH**

<b>ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>1 CHARAKTERISTIKA AMINOKYSELIN</b> .....	<b>9</b>
1.1 STRUKTURA, NÁZVOSLOVÍ, ROZDĚLENÍ.....	9
1.2 CHARAKTERISTIKA BÍLKOVIN, STRUKTURA A ROZDĚLENÍ.....	11
<b>2 VÝZNAM STANOVENÍ VOLNÝCH AMINOKYSELIN</b> .....	<b>14</b>
<b>3 METODY STANOVENÍ VOLNÝCH AMINOKYSELIN</b> .....	<b>19</b>
<b>4 MOŽNOSTI STANOVENÍ VOLNÝCH AMINOKYSELIN NA ÚSTAVU POTRAVINÁŘSKÉHO INŽENÝRSTVÍ UNIVERZITY TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ</b> .....	<b>23</b>
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>24</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>25</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>27</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>28</b>

## ÚVOD

V dnešní době si stále více uvědomujeme, že příkladná životospráva a správný výběr potravin jsou podepsány na stavu našeho zdraví. Proto se snažíme vyrábět takové výrobky, které budou vyhovovat současné poptávce na trhu, co se týče sensorických vlastností nebo obsahu určitých nutričních složek. Z tohoto důvodu jsou stanovovány volné aminokyseliny u potravin, které jsou jimi z různých hledisek ovlivňovány.

Volné aminokyseliny jsou zkoumány při biochemických, fermentačních a hydrolyzačních procesech a svoji roli mají zastoupenou i v sensorických vlastnostech. Volné aminokyseliny jsou zkoumány i během skladování potravin.

Tato bakalářská práce, zabývající se významem a stanovením volných aminokyselin, je rozdělena do 4 kapitol, v nichž v první je nastíněna stručná charakteristika aminokyselin a bílkovin, ve druhé části se snažíme významově popsat smysl stanovení volných aminokyselin, ve třetí kapitole jsou rozebrány možnosti stanovení volných aminokyselin a některé extrakční procesy a v poslední kapitola je věnována možnostem stanovení, které jsou aplikovatelné v podmínkách Ústavu potravinářského inženýrství Fakulty technologické Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně.

**CÍL PRÁCE:**

Cílem této bakalářské práce bylo charakterizovat úlohu aminokyselin a bílkovin ve výživě člověka se zaměřením na stanovení volných aminokyselin jako markeru intenzity fermentačních nebo hydrolyzačních procesů. V práci je uveden přehled analytických metod určených pro stanovení obsahu volných aminokyselin a popsány extrakční procesy. Na závěr je doporučen vhodný postup aplikovatelný v podmínkách Ústavu potravinářského inženýrství Fakulty technologické Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně.



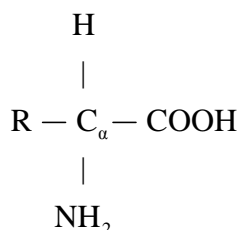
# 1 CHARAKTERISTIKA AMINOKYSELIN

## 1.1 Struktura, názvosloví, rozdělení

Aminokyseliny jsou základními stavebními jednotkami mnoha sloučenin. Tyto stavební jednotky jsou navzájem spojeny tzv. peptidovou vazbou (–CO–NH–), díky níž jsou vytvářeny peptidy a proteiny neboli bílkoviny. Tvorba peptidové vazby, která vzniká mezi  $\alpha$ -aminoskupinou jedné aminokyseliny a  $\alpha$ -karboxylem aminokyseliny druhé, v podstatě znamená odstranění jedné molekuly vody a patří mezi nejdůležitější reakce aminokyselin.

Dosud bylo v přírodě identifikováno kolem 700 aminokyselin, mezi důležité patří skupina 21 L- $\alpha$ -aminokyselin, tzv. kódovaných kyselin (kódované proto, že jejich syntéza je řízena genetickým kódem), které jsou stavebními jednotkami již zmíněných bílkovin.

Struktura L- $\alpha$ -aminokyselin: aminokyseliny obsahují jak aminoskupinu, tak kyselou karboxylovou skupinu, které jsou obě navázány ke stejnému atomu uhlíku, stejně jako H a R-substituent. Díky tomu je uhlík nazván chirálním a tato tetraedrová orientace čtyř různých skupin umožňuje aminokyselinám optickou aktivitu.



Obr. 1. Strukturovaný vzorec aminokyseliny

Dělení aminokyselin podle struktury postranního řetězce (R-substituent):

- 1) alifatické aminokyseliny: glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin
- 2) alifatické hydroxyaminokyseliny: serin, threonin
- 3) alifatické sírné aminokyseliny: cystein, methionin
- 4) aminokyseliny s karboxylovou skupinou v postranním řetězci: kyselina asparagová, kyselina glutamová
- 5) a jejich monoamidy: asparagin, glutamin

6) aminokyseliny s bazickými funkčními skupinami v postranním řetězci: lysin, arginin, histidin

7) aminokyseliny s aromatickým a heterocyklickým postranním řetězcem: fenylalanin, tryptofan, tyrosin

8) cyklická aminokyselina: prolin

Dělení aminokyselin podle esenciality:

1) esenciální: valin, leucin, isoleucin, threonin, methionin, lysin, fenylalanin, tryptofan

2) poloesenciální: arginin, histidin (pro děti esenciální)

3) neesenciální: všechny ostatní aminokyseliny, které jsou dostupné, a člověk si je dokáže syntetizovat.

Pro některé živočichy jsou esenciální i další aminokyseliny, např. histidin pro myš, histidin a arginin pro potkana a prase; histidin, arginin, glycin a kyselina glutamová pro kuře. [3]

ESENCIÁLNÍ aminokyseliny neumí lidský organismus syntetizovat v takovém množství, které by bylo dostačující pro růst dítěte nebo v dospělosti pro udržení dobrého zdravotního stavu a proto je musíme získat potravou (v bílkovinách). Při jejich nedostatku v potravě vznikají vážné poruchy látkové přeměny (porucha růstu, ubývání na hmotnosti) a genetické choroby (fenyلكetonurie a syndrom javorového sirupu). [1]

LIMITUJÍCÍ aminokyseliny jsou obsaženy v bílkovinách v nejmenším množství a určují její biologickou hodnotu ; např. lysin u vegetariánů (v rostlinných bílkovinách je ho málo).

Aminokyseliny se vyskytují v organismech v neionizované formě v podobě vnitřních solí. Všechny aminokyseliny mají nejméně dvě slabé kyselé funkční skupiny,  $R-NH_3^+$  a  $R-COOH$ , které jsou u aminokyselin tvořících proteiny vázány na  $\alpha$ -uhlíkovém atomu. Tyto skupiny spolu s dalšími slabě kyselými funkčními skupinami (OH, SH, guanidinové) jsou mimoto určující pro celkový náboj aminokyseliny, který se mění s pH. [1]

V závislosti na pH je jejich důležitou vlastností bipolární charakter molekuly (mohou se chovat jako kyseliny nebo zásady), a proto jsou aminokyseliny řazeny mezi amfolyty (neboli amfoterní látky), jejichž celkový náboj při daném pH závisí na hodnotách  $pH_a$  jejich funkčních skupin. V isoelektrickém bodě pI je pH, při kterém nemá aminokyseliny

žádný výsledný náboj a tudíž se v elektrickém poli stejnosměrného proudu nepohybuje.[1]  
Pokud je výsledný náboj nulový, je amfolyt ve formě amfiontu.[ 2]

Aminokyseliny kromě své hlavní úlohy, stavebních jednotek bílkovin, mají ještě další významné metabolické funkce v živých objektech. Jsou především výchozími látkami pro syntézu mnohých biologicky aktivních látek nebílkovinného charakteru, např. vznik některých vitaminů, zvláště tzv. B-komplexu, vznik četných rostlinných barviv (např. flavonoidy), vznik alkaloidů apod. [4] Podílejí se spolu se svými deriváty na mnohých rozmanitých intracelulárních procesech, jako jsou nervový přenos, regulace buněčného růstu a biosyntéza porfyrinů, purinů, pyrimidinů a močoviny. V podobě nízkomolekulárních peptidů mají L-aminokyseliny další významnou úlohu jako hormony a jsou součástí polypeptidových antibiotik, produkovaných mikroorganismy. [1]

## 1.2 Charakteristika bílkovin, struktura a rozdělení

### BÍLKOVINY

Bílkoviny neboli proteiny jsou vysokomolekulární látky, tzv. biopolymery, které vznikly procesem proteosyntézy. Jsou zbudovány z více jak 100 až několika tisíc aminokyselin, které jsou pospojovány peptidovou vazbou. Kromě peptidových vazeb se na utváření vyšších struktur proteinů podílejí ještě jiné vazby, zejména disulfidové (-S-S-), esterové a amidové.

Kromě toho, že bílkoviny patří mezi základní chemické složky živých buněk, znamenají také významný zdroj dusíku a energie a zahrnují také přenos vitaminů, kyslíku a oxidu uhličitého a dále strukturní, kinetické, katalytické a signální role.

Existují čtyři úrovně struktury bílkovin:

1) primární struktura polypeptidového řetězce je určena pořadím (tzv. sekvence) aminokyselin a zahrnuje rovněž polohu případných disulfidových vazeb. [1] Zastoupení a pořadí jednotlivých aminokyselin v peptidovém řetězci není náhodné, ale je přesně určeno geneticky pro každou bílkovinu v organismu. Proto má každá bílkovina svou specifickou primární strukturu. [4]

2) sekundární struktura je prostorové uspořádání atomů (konformace) v hlavním polypeptidovém řetězci. Konformace je dána sledem jednotlivých aminokyselin z primární struktury a popisuje skládání polypeptidových řetězců do motivů stabilizovaných mnoha vodíkovými

vazbami jako je  $\alpha$ -šroubovice nebo  $\beta$ -skládaný list. Kombinace těchto motivů může potom vytvářet supersekundární motivy (např.  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ ).

3) terciární struktura určuje celkovou konformaci polypeptidového řetězce a prostorové uspořádání postranních řetězců. Je výsledkem stabilizujících interakcí mezi postranními řetězci úseků s různou sekundární strukturou. Příkladem proteinu, u kterého je zcela známa terciární struktura, je myoglobin. [2]

4) kvartérní struktura je přítomna pouze u bílkovin, které se skládají ze dvou nebo více polypeptidových řetězců (oligomerní bílkoviny). Popisuje místa kontaktu a další vztahy těchto polypeptidů nebo podjednotek. Příkladem tetramerního peptidu je hemoglobin.

Dělení bílkovin podle biologické funkce:

- 1) strukturní- keratiny, kolageny, elastiny
- 2) katalytické- enzymy a hormony
- 3) transportní- hemoglobin
- 4) pohybové- aktin, myosin, aktomyozin
- 5) obranné- imunoglobuliny
- 6) zásobní- ferritin
- 7) senzorické- rhodopsin
- 8) regulační- hormony (insulin, růstový hormon)
- 9) výživové- esenciální aminokyseliny, zdroj dusíku [2]

Podle stavu, v jakém se proteiny nacházejí v potravinách, jsou rozlišovány na nativní (zachovány biologické funkce), denaturované (bez biologické funkce) a upravené (chemicky modifikované, aditiva pro zvýšení biologické hodnoty). [2]

Podle struktury a složení se bílkoviny dělí na:

- 1) jednoduché proteiny- obsahující pouze vázané aminokyseliny a dělí se na globulární a fibrilární
- 2) složené proteiny neboli proteidy, obsahující kromě aminokyselin vázané také jiné složky- fosfoproteiny, chromoproteiny, lipoproteiny, glykoproteiny, nukleoproteiny a metalloproteiny.

Denní spotřeba bílkovin by měla být u člověka 1-1,2 gram na 1 kilogram tělesné hmotnosti. Energetická výtěžnost 1 gramu bílkovin je 17,2 kJ.

## 2 VÝZNAM STANOVENÍ VOLNÝCH AMINOKYSELIN

Stanovení volných aminokyselin má velkou důležitost z hlediska sledování změn, ať už u technologických procesů nebo během skladování řady potravinářských výrobků. Složky chuti, které vznikají v důsledku změn proteinů, jsou důležité pro potraviny jako např. sýr, víno, med nebo fermentované masné výrobky. Na stanovení volných aminokyselin jsou používány různé analytické metody.

Teodor Hodisan a kol.[5] zkoumali ve své studii význam stanovení volných aminokyselin v rostlinných extraktech. V posledním desetiletí kosmetického a farmaceutického průmyslu byly značně používány rostlinné extrakty. K hledání bioaktivních látek z těchto extraktů byly použity základní chromatografické metody, které umožňují lokalizaci některých aktivních složek jako např. taniny, sacharidy, flavony, aminokyseliny atd. Jako rostlinný extrakt byly použity k separaci, identifikaci a stanovení volných aminokyselin listové výtěžky z *Ginkgo biloba* a *Hedera helix*. Touto prací, kde byly použity metody TLC (tenkovrstevná chromatografie), HPLC (vysokoučinná kapalinová chromatografie) a GC-MS (plynová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem), byl dokázán výskyt volných aminokyselin asparagin, glutamin, arginin, kyselina glutamová, glycin, alanin, prolin, tyrosin, isoleucin, leucin a fenylalanin v listovém výtěžku *Ginkgo biloba*. V extraktu *Hedera helix* byly objeveny volné aminokyseliny asparagin, glycin, prolin, tyrosin, valin, isoleucin, leucin, fenylalanin, metionin a isoleucin. Jako nejdůležitější volná aminokyselina byl označen prolin, který má důležitou roli v syntéze a regeneraci pletiva.

Volné aminokyseliny jsou také zkoumány jako ukazatelé proteolýzy během zrání sýrů. Ve studii Izco J. M. a kol.[19] bylo monitorováno zrání francouzského sýru nazývaného Ossau-Iraty. Tento tradiční poloměkký sýr je vyroben z ovčího mléka (syrového nebo pasterovaného). Má smetanovou a mírně ořechovou chuť. Oválný bochník sýru váží 4-5 kg, má minimální obsah tuku v sušině 50% (m/m) a sušiny v sýru 58% (m/m). Je vyráběn ve dvou francouzských sousedních regionech v západních Pyrenejích: Ossau v údolí Bearn a Iraty v Pays Basque. Povrch bochníku pokrývá přírodní kůra žluto-oranžové nebo šedé barvy. Minimální doba zrání je 90 dnů. [6]

Biochemické procesy, probíhající v průběhu zrání (jako jsou např. glykolytické nebo lipolytické reakce) a zejména proteolýza, mohou podstatně přispět k vývoji chuti, vůně a textury sýru. Díky studii sýru Ossau-Iraty bylo zjištěno, že celkový obsah volných amino-

kyselin se pohybuje od 200mg/100g sušiny v první den až do 2200 mg/100g sušiny po 120 dnech zrání. Hlavními volnými aminokyselinami, které byly stanovené metodou RP-HPLC, byly kyselina glutamová, asparagin, glutamin, valin, leucin, fenylalanin a lysin. Procenta volného prolinu, aminokyseliny související se sladkou chutí sýru, byla snížena z 12% z prvního dne na 3,3% po 120 dnech zrání. Serin byl přítomen v koncentracích od 5-33,1 mg/100 g sušiny. Pasterací mléka byla zvýšena úroveň volného serinu v sýru, čímž může být vysvětlen fakt, že pasterování mléka působí na rozsah a charakteristiku kaseinové proteolýzy během zrání sýru.

V poslední době byl zpozorován značný zájem o výrobu sýru s redukováním obsahem tuku (např. nízkotučné sýry), ovšem bez ztrát organoleptických vlastností původních plnotučných výrobků. Redukce tuku v mléku má za následek významný posun v rovnováze různých komponentů v sýru v porovnání s jeho plnotučným protějškem a má za úkol nahrazovat ostatní složky (např. vlhkost a proteiny). Ve studii Michaelidou A. a kol.[18] byl podroben analýze sýr nazývaný Kefalograviera. Tento tvrdý sýr, vyrobený z kravského mléka nebo ze směsi ovčího a kozího mléka, má světle žlutou barvu, pikantní chuť a množství malých ok. Zraje 3 měsíce a obsah tuku činí 30,8% (m/m). [7] Z hlediska účinku na proteolýzu v nízkotučném [9,5% (m/m)] a vysokotučném [49,6% (m/m)] vzorku sýru Kefalograviera byly porovnány 2 komerční startovací kultury (Alp DIP a Alp DIP D) a jogurtová kultura V1 (která je termofilní kulturou skládající se ze *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.) s komerční jogurtovou starterovou kulturou CH-1. Starterová kultura Alp DIP je speciálně definovaná multidruhovná kultura (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* a *Lactobacillus lactis*). Alp DIP D je speciální kultura obsahující kulturu Alp DIP a *Lactococcus lactis* subsp. biovar *diacetylactis*. CH-1 je obvyklá jogurtová kultura použitá jako kontrolní. Je komerčně využita pro produkci plnotučného sýru Kefalograviera.

Použitím starterových kultur by mohlo dojít ke zvýšení koncentrace peptidů a aminokyselin, které přímo přispívají k chuti, resp. mohou působit jako prekurzory složek chuti. Tato studie se zabývá efektem výše zmiňovaných kultur na proteolýzu v nízkotučném sýru Kefalograviera a tím i stanovením volných aminokyselin. Bylo zjištěno, že je možné vyrobit nízkotučný sýr (45 g/1 kg tuku) se sensorickými vlastnostmi plnotučného sýru (308 g/1 kg tuku). Vzorky sýru byly analyzovány na obsah vlhkosti, proteinů, tuku, soli, pH a vol-

ných aminokyselin. Volné aminokyseliny byly stanoveny metodou RP-HPLC. Volné aminokyseliny jsou koncovým produktem proteolýzy uvolněné z peptidů peptidázovou reakcí. Jsou nahromaděny v průběhu zrání a následně jsou metabolizovány v kolísavém rozsahu pomocí enzymů ze sýrové mikroflóry do sloučenin nestálých anebo stálých, které přispívají k vývoji chuti sýru. Taktéž nekaseinové aminokyseliny (kyselina  $\gamma$ -aminomáselná a ornitin) byly nalezeny ve všech sýrech ve znatelném množství. Zatímco všechny sýry sdílely stejné hlavní a minoritní volné aminokyseliny, relativní koncentrace každé aminokyseliny se lišila mezi sýry různého stáří. Navzdory kulturám použitým pro výrobu sýru, obsah  $\gamma$ -aminomáselné kyseliny a asparaginu byl zvýšen s časem zrání, zatímco obsah lysinu, tyrosinu a fenylalaninu byl snížen pravděpodobně z důvodu přeměny těchto 3 aminokyselin na metabolit. V souladu se studiemi o sýru Kefalograviera jako hlavní aminokyseliny byly zastoupeny leucin, glutamin, valin, prolin a lysin, které společně s asparaginem, serinem a fenylalaninem tvoří 60 % celkových volných aminokyselin během zrání.

Ve studii Mustaf A. a kol. [17] byly zkoumány cereální produkty z hlediska významu volných aminokyselin. Při výrobě cereálních produktů jsou totiž volné aminokyseliny považovány za důležitý substrát. Z hlediska sensorického přispívají k vývoji chuti, vůně a velkou měrou se účastní Maillardových reakcí. Obsahy jednotlivých aminokyselin jsou založeny na typu cereálií. Jako nejběžnější volné aminokyseliny byly stanoveny alanin, serin, asparagin a kyselina asparagová. Rozdrcený obsah vnějších obalových vrstev obilky se projevil bohatším na aminokyseliny než proseté částice obilky. V žitných vzorcích byl obsažen vyšší obsah aminokyselin než u pšeničných vzorků. Fermentací je pravděpodobně spotřebováván volný asparagin a kyselina asparagová a jsou uvolňovány ostatní aminokyseliny. Kolísání obsahu aminokyselin by mohlo být vysvětleno metabolismem kvasnic nebo droždí.

Melisopalynologie je věda, která se zabývá rozborem pylů a výtrusů rostlin v neupraveném medu a díky ní lze určit květy, z nichž byl med sesbíráán.[13] Jinými slovy lze určit botanický zdroj medu. Tato metoda má ale z dnešního pohledu hrubé nedostatky a z tohoto důvodu jsou na získání profilu medu navrhovány různé procedury obecně založené užitím chromatografických technik. Původ aminokyselin v medu je připisován živočišným i rostlinným zdrojům, ačkoli hlavním zdrojem je pyl. Nozal M. J. a kol.[9] zkoumali ve své studii 74 vzorků medu, jehož zdroj má původ ve 4 rozdílných botanických skupinách: eukalyptus (15 vzorků), rozmarýn (28 vzorků), pomerančové květy (10 vzorků) a



vřes (21 vzorků). Hlavní aminokyseliny nalezené ve vybraných vzorcích květů (eukalypt, rozmarýn a vřes) byly prolin, fenylalanin, tyrosin, kyselina glutamová a asparagová. V květech pomeranče byly nalezeny aminokyseliny prolin, asparagin, fenylalanin, kyselina glutamová a lysin.

Chovem ryb je poskytována možnost získání sezónně nezávislé nabídky čerstvých ryb pro trh. Jelikož skladovatelnost čerstvých ryb je nižší než u mražených ryb, je potřeba vyvinout metody pro udržování dobré postmortální kvality ryb při jejich cestě na trh. Tento problém se ve své studii snažil nastínit Duun A. S. a Rustad T. [15] za použití ryby lososa atlantického (*Salmo salar*). Poptávka po čerstvém lososovi se totiž rapidně zvyšuje na úkor zmraženého lososa. Porce filetů chovaného lososa atlantického byly zmrazeny při teplotách  $-1,4^{\circ}\text{C}$  a  $-3,6^{\circ}\text{C}$  a v průběhu uskladnění byly filety porovnávány s ledově mraženým vzorkem lososa atlantického a byla zkoumána textura, ztráta vody, katepsinová aktivita a proteinová extrahovatelnost. Nejvýznamnějším faktorem pro zvýšení trvanlivosti je teplota produktu, jelikož ryby rychleji podléhají zkáze než maso. Stálá teplota uskladnění je totiž velmi důležitá na zabezpečení obsahu ledu v optimální a konstantní úrovni. Když část vody vymrzne, koncentrace rozpuštěné látky v nezmraženém roztoku se zvyšuje a to může vést ke zvýšení enzymatické aktivity, denuraci svalových proteinů, strukturálnímu poškození membrán a změně obsahu volných aminokyselin. Cílem této studie bylo vyšetřit efekty superchladičího procesu pro 2 různé teploty ( $-1,4^{\circ}\text{C}$  a  $-3,6^{\circ}\text{C}$ ) na kvalitativní parametry lososa atlantického. Superzchlazení je často používáno na popsání procesu, kde jsou potravinářské produkty uchovány mezi bodem mrazu produktů a  $1$  až  $2^{\circ}\text{C}$  pod ním. Pro mnoho potravinářských produktů má superzchlazení za následek lepší kvalitu, když ji porovnáme s obvyklým chlazením. Teploty  $-1,4^{\circ}\text{C}$  a  $-3,6^{\circ}\text{C}$  byly vybrány, aby byly studovány rozdíly ve vlastnostech svalů zapříčiněné různým obsahem vytvořeného ledu. Bylo zjištěno, že v ledových nebo mražených referenčních filetech a po prvních dvou týdnech superchlazeného uskladnění obsah volných aminokyselin kolísá mezi  $1,2$  a  $1,8$  mg/g vlhké hmotnosti. Mezi dvěma týdny a jedním měsícem byly hodnoty zvýšeny na  $2,4$ - $2,5$  mg/g vlhké hmotnosti pro superchlazené vzorky. Díky růstu obsahu volných aminokyselin je indikována exoproteolytická aktivita během skladování, což může být v důsledku zvýšené enzymatické koncentrace, když je část vody zamražená.

Kapr stříbrný (*Hypophthalmichthys molitrix*) se stal díky nižším nákladům, rychlému růstu, odolnosti vůči stresu a nemocím ekonomicky levnou sladkovodní rybou. V Číně

se sladkovodní ryby prodávají hlavně pro čerstvou konzumaci. Jedinými zpracovanými produkty jsou solené ryby a rybí omáčka. Tyto produkty však mají vysokou koncentraci soli, a proto by neměly být konzumovány ve velkém množství. Slibným přístupem k vývoji nových rybích produktů, které nebudou obsahovat tak velké množství soli, budou bez rybího zápachu, ale zachovávají si všechny nutriční rybí výhody, by bylo použítí fermentace. Fermentace má pro lidskou spotřebu mnoho přínosů: je to dostupná metoda pro nemražené uchování rybí svaloviny, zlepšuje organoleptické vlastnosti a již zmiňované nutriční hodnoty. Yongjin H. a kol.[16] se snažili ve své studii porovnat fyzikálně-chemické, mikrobiologické a sensorické charakteristiky výrobků z kapra stříbrného, které fermentovali rozličnými kombinacemi bakterií mléčného kvašení (LAB, Lactic acid bacteria) a *Staphylococcus xylosum*. Byly připraveny 3 rybí výrobky a naočkovány těmito směsnými starterovými kulturami: S-PXP (*Lactobacillus plantarum*-15, *Staphylococcus xylosum*-12 a *Pediococcus pentosaceus*-ATCC 33316 v poměru 1:1:1), S-PXC (*Lactobacillus plantarum*-15, *Staphylococcus xylosum*-12 a *Lactococcus casei* subsp. *casei*-1.001 v poměru 1:1:1) a S-XCP (*Staphylococcus xylosum*-12 a *Lactococcus casei* subsp. *casei*-1.001 a *Pediococcus pentosaceus*-ATCC33316 v poměru 1:1:1) a jeden kontrolní vzorek bez starterových kultur. Fermentace proběhla po dobu 48 hodin při teplotě 30°C.

Kdybychom porovnali fermentované rybí výrobky s kontrolním vzorkem a vzorkem před fermentací, byl by zjištěn vysoký růst celkových volných aminokyselin ve fermentovaném výrobku. Aminokyseliny jako je např. kyselina glutamová, glycin, alanin, serin, valin, leucin, treonin, kyselina asparagová, methionin, tryptofan a arginin byly zvýšeny v porovnání s aminokyselinami před fermentací. V předchozích pracích bylo zjištěno, že s vyšším výskytem volných aminokyselin byla lepší chuť fermentovaných produktů. V průběhu fermentace svalů kapra stříbrného byly soli a ve vodě rozpustné proteiny významně degradovány a intenzita této degradace byla zvýšena ve vzorcích s přidáním směsnou kulturou. Můžeme se proto domnívat, že přidáním volných aminokyselin nebo zvýšením uvolňování aminokyselin může mít za následek zlepšení celkové kvality fermentovaných rybích produktů. Díky směsným startovacím kulturám bylo rychle sníženo pH, inhibován růst kontaminujících mikroorganismů přítomných v syrových materiálech, potlačena akumulace celkového bazického dusíku a zajištěna lepší vůně a jemnější textura konečného produktu. Tyto výsledky naznačují vysoký potenciál v používání směsných startovacích kultur ve svalovině fermentovaného kapra stříbrného do budoucna.

### 3 METODY STANOVENÍ VOLNÝCH AMINOKYSELIN

Teodor Hodisan a kol.[5] zkoumali stanovení volných aminokyselin z rostlinných extraktů, kde byly použity 3 metody chromatografie: tenkovrstevnou chromatografií (TLC), vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) a plynovou chromatografií ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Nejprve bylo nutné extrahovat 0,5 g suché rostliny v 10 ml 1% (v/v) roztoku HCl. Na odstranění proteinů srážením byl použit roztok  $\text{Na}_3\text{P}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4$ . Po centrifugaci roztoku byla podstoupena iontová výměna. Byl použit Amberlite IR-120 H, což je iontoměníč přidaný do iontového papíru vyrobeného z celulosy. Získaný roztok byl dále odpařen do sucha a zbytek byl znovu rozpuštěn v 1 ml vodného roztoku 30 % isopropanolu (v/v).

TLC je často používaná chromatografická metoda pro separaci a identifikaci aminokyselin z rostlin. Při použití metody TLC byla separace a identifikace volných aminokyselin dosažena dvojitou elucí. Jako mobilní fáze se zavedla směs *n*-butanol-aceton-kyselina octová-voda (35:35:7:23 v/v/v). Stacionární fáze je tvořena tenkou tuhovou vrstvou adsorbentu. Jako adsorbent mohl být použit silika gel, modifikovaný adsorbenty nebo polyamidy. Bylo použito sprejování filtračního papíru vyrobeného z nejčistší celulózy roztokem ninhydrinu v *n*-butanolu-acetonu v poměru 1:1 (v/v). Vysušení trvalo 10-15 minut při teplotě 105-110 °C. Při kvalitativní analýze se vyhodnocují hodnoty retardačních faktorů ( $R_f$ ), jež jsou definovány vztahem  $R_f=a/b$ , kde *b* je vzdálenost středu skvrny separované látky od linie startu a *a* je vzdálenost mezi čelem mobilní fáze (tj. linií kam až dostoupila mobilní fáze během preparace) a linií startu. Identifikace separovaných komponent vzorku se provádí porovnáním hodnot retardačních faktorů analyzovaných látek s hodnotami  $R_f$  standardů. Odhad koncentrace složek ve vzorku je možno provést na základě porovnání intenzit zbarvení skvrn komponent vzorku a standardů nadávkovaných ve známé koncentraci.[12] Při použití metody HPLC byly aminokyseliny, jak ze standardního roztoku tak i rostlinného, přeměněny na fenolové deriváty. Jako mobilní fáze byla použita směs 0,15 M octanu sodného (pH 6,5) s acetonitrilem při teplotě 55°C a UV detekce při vlnové délce 254 nm. Při použití chromatografie GC-MS byly aminokyseliny převedeny do N-trifluoracetyl *n*-butyl esterů ke zvýšení jejich těkavosti. Bylo zjištěno, že asparagin a glutamin byly transformovány do kyseliny asparagové a glutamové. Histidin a arginin bylo těžké analyzovat plynovou chromatografií.

J. M. Izco a kol.[19] zkoumali stanovení volných aminokyselin v sýru značky Ossau-Iraty použitím kapalinové chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC). Stacionární fáze je nepolární a mobilní fáze je polární. V našem případě je to pufr tetraboritan sodný/kyselina boritá. Jako stacionární fáze nám posloužil oktadecyl ( $C_{18}$ ). Na stanovení dusíkatých látek rozpustných v sulfosalicylové kyselině (SSAN) byla použita metoda s použitím trinitrobenzensulfonové kyseliny (TNBS). TNBS je důležité činidlo ve spektrofotometrickém stanovení volných aminokyselin, které reaguje s  $\alpha$ -aminokyselinami, ale může také reagovat s nízkomolekulárními hmotnostními peptidy.

Pro stanovení dusíkatých látek rozpustných v kyselině sulfosalicylové (SSAN) byl navážen 1 g sýru do 50 ml centrifugací zkumavky se 4 ml kyseliny sulfosalicylové a následně byl přidán 1 ml vody. Po 18 hodinách při teplotě  $0^{\circ}\text{C}$  byl vzorek zcentrifugován po dobu 15 minut. K 1  $\mu\text{l}$  supernatantu byl přidán 1 ml 1% dodecylsulfátu sodného (SDS). Směs byla zahřáta na  $75^{\circ}\text{C}$  po dobu 15 minut. Po zchlazení byly 2 ml pufru tetraboritanu sodného/borité kyseliny (pH 8,5) a 2 ml 1% roztoku trinitrobenzensulfonové kyseliny (TNBS) přidány do 250  $\mu\text{l}$  směsi. Výsledná směs byla protřepána a uchována ve tmě při teplotě  $50^{\circ}\text{C}$  po dobu 1 hodiny. Po přidání 4 ml 0,1 N HCl a po 30 minutách byla měřena spektrofotometricky absorbance při vlnové délce 340 nm ve spektrofotometrickém detektoru. Metoda TNBS byla doporučena jako vhodná metoda na odhad aminokyselin v sýru. Výsledky analýzy frakce SSAN následovanou derivatizací TNBS byly vysoce korelovány se stanovením celkových volných aminokyselin provedené metodou RP-HPLC.

Při stanovení volných aminokyselin ve vzorcích medu byla ve studii Nozal M. J. a kol.[9] použita plynová chromatografie (GC) s plamenoionizační detekcí (FID) nebo hmotnostní spektrometrickou detekcí (GC-MS). Specifickým problémem v plynové chromatografii je analýza málo těkavých látek, jež je nutno před nadávkováním do dávkovače převést na těkavé deriváty. Uvedený postup se nazývá derivatizace a činidlo reagující se vzorkem pak derivatizační činidlo. Derivatizační činidlo musí s analytem reagovat rychle, kvantitativně a s definovanou rychlostí, musí být dostatečně stabilní i při zvýšené teplotě a pokud vznikají kromě těkavého derivátu další produkty, je důležité, aby nerušily vlastní stanovení. [12]

GC-FID a GC-MS metody dovolují stanovit 20 volných aminokyselin ve vzorku medu ve velmi krátkém čase: 8 minut GC-FID a 5 minut pro GC-MS. Jako mobilní fáze byl v plynové chromatografii použit dusík.

Cílem studie Mustaf A. a kol.[17] na rozbor volných aminokyselin v cereálních produktech bylo vyvinout extrakční metodu pro obilné produkty, která dává stabilní výtěžky, které mohou být okamžitě použity v kroku SPE (extrakce pevnou fází). Dále porovnat plynovou chromatografií s biochromovou metodou co se týče výše a úspěšnosti analyzovatelnosti volných aminokyselin.

Všechny vzorky byly semleté za užití ultracentrifugového mlýnku. Fermentované těsto a měkký pšeničný chléb byly před mletím vysušeny a vzorky byly zváženy v testovacích tubách. Vzorky byly podstoupeny alkoholovou extrakcí, kdy byl přidán 50% etanol (kvůli předejití rozpouštění polysacharidů a dalších viskózních polymerů a vyhnutí se tak gelovatění škrobu) a norvalin v poměru 14:1 v tomto pořadí. Vzorky byly dále rozmixovány v rotačním mixéru v inkubátoru při teplotě 50<sup>0</sup>C po dobu 20 minut. Po rozmixování byly vzorky podrobeny centrifugaci po dobu 20 minut a 500 µl supernatantu bylo podrobena extrakcí pevnou fází (SPE- Solid Phase Extraction). Byla použita plynová chromatografie s plamenoionizačním detektorem FID. Při GC bylo jako mobilní fáze použito helium.

Byla také provedena biochromová metoda. Je to kation-výměnná chromatografie, která analyzuje volné aminokyseliny. Vzorek byl extrahován použitím kyseliny sulfosalicilové s norleucinem jako interním standardem. Tato metoda obsahuje postkolonovou derivatizaci aminokyselin s ninhydrinem, který produkuje barevné deriváty aminokyselin, které mohou být stanoveny spektrofotometricky při vlnových délkách 570 a 440 nm.

Michaelidou A. a kol.[18] se ve své studii zabývali efektem směsných starterových kultur na proteolýzu v nízkotučném sýru Kefalograviera a stanovení volných aminokyselin ve výsledných produktech. Ve své práci použili kapalinovou chromatografií na reverzní fázi (RP-HPLC).

Ve studii Özcan S. a kol.[8] se pokoušeli vyvinout analytickou metodu pro jednoduché, rychlé a opakovatelné stanovení 21 aminokyselin (glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin, serin, threonin, cystein, methionin, kyselina asparagová, kyselina glutamová, asparagin, glutamin, lysin, arginin, histidin, fenylalanin, tyrosin, tryptofan, prolin a selenocystein) v různých potravinách za použití LC-MS (kapalinová chromatografie/ hmotnostní spektrometrie) a vyvinout jednoduchou extrakci aminokyselin s použitím vodní fáze bez vymývání.

Byl použit obsah volných aminokyselin z 22 položek potravin, jako jsou např. koje-necké jídlo, chleba, sušenky, kreky, oplatky, zelený čaj, zelenina, ovoce atd. [8] V ex-trakční fázi byl vzorek aminokyseliny připraven rozpuštěním 25 mg každé aminokyseliny ve 25 ml destilované vody. Po zhomogenizování byla část vzorku uchována při  $-20^{\circ}\text{C}$  v nízkotlakové ethylenové lahvi. Jemný základ homogenizovaného vzorku byl zvážen a do vzorku bylo přidáno 10 ml 0,2 mM kyseliny octové. Po zmixování byla směs centrifugová-na a čistý supernatant byl kvantitativně převeden do nádoby vyhýbající se vrchní olejové vrstvě, pokud byla přítomná. Následovala MS detekce, která má výhody v poskytování strukturovaných informací o eluovaných složkách. Bylo zjištěno, že metoda je aplikova-telná na širokou paletu potravin. Příprava vzorku a následná chromatografie zabrala méně než 25 minut.

Dunn A. S. a Rustad T. [15] zkoumali ve své studii kvalitu superzchlazených va-kuově balených filet z lososa atlantického uchovaných při teplotě  $-1,4^{\circ}\text{C}$  a  $-3,6^{\circ}\text{C}$  a stano-vení volných aminokyselin při těchto teplotách.

Zhruba 4 g nasekaného rybího svalu bylo homogenizováno v 80 ml zásobníku 1 (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5% triton X-100, pH 7) při teplotě  $4^{\circ}\text{C}$  a pak centrifugováno. Supernatant byl nalit přes skelnou vatu a objem byl doplněn do 100 ml do zásobníku 1. Sediment byl pak nadále homogenizován v 80 ml zásobníku 2 (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5% triton X-100, 0,6 M KCl, pH 7) a znovu centrifugován. Procedura byla provedena jednou pro každý vzorek filety. Množství proteinu v extraktech bylo stanoveno proteinovou zkouškou BioRad, za užití hovězího séra albumin jako standardu. Byly provedeny 3 analýzy. Jako chromatogra-fická metoda byla použita kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC). Celkové množství volných aminokyselin bylo spočteno jako mg/g vlhké hmotnosti.

Yongjin a kol.[16] ve své studii zkoumali stanovení volných aminokyselin ve fer-mentovaných rybích výrobcích z kapra stříbrného (*Hypophthalmichthys molitrix*). Pro toto stanovení použili kapalinovou chromatografii na reverzní fázi (RP-HPLC).

Ve vodě rozpustné proteiny byly izolovány homogenizováním 10 g kousků rybího masa z fermentovaného produktu s 90 ml chlazené destilované vody a centrifugováním při zrychlení 5000 g po dobu 20 minut. Předkolonová derivatizace byla provedena použitím *o*-ftalaldehydu (OPA). Byla provedena fluorimetrická detekce. Identifikace píků a kvantifika-ce byla provedena stanovením retenčních časů a obnovení standardů volných aminokyselin.

#### **4 MOŽNOSTI STANOVENÍ VOLNÝCH AMINOKYSELIN NA ÚSTAVU POTRAVINÁŘSKÉHO INŽENÝRSTVÍ UNIVERZITY TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ**

Prvním bodem stanovení je extrakce vzorku, kterou lze všeobecně provést kyselinou trichloroctovou, kyselinou chloristou, kyselinou chlorovodíkovou nebo např. kyselinou perchlorovou. Když srovnáme účinnost těchto extrakčních činidel: 5% trichloroctová kyselina, 0,4 M kyselina perchlorová, 0,1 M kyselina chlorovodíková, 1M kyselina chloristá a 5% kyselina chloristá; 0,1M kyselinu chlorovodíkovou lze z hlediska nízkých pořizovacích kultur a dobré účinnosti doporučit jako vhodné extrakční činidlo.

V dalším kroku je vzorek centrifugován na odstředivce, kde jsou odděleny nečistoty, usazenina a extrakt. Pracoviště je vybaveno odstředivkou typu HERMLE 300K umožňující až 13500 ot/min. Vzorek je následně zahuštěn kvůli zvýšení koncentrace vzorku na rotační vakuové odparce. Po přidání pufru je vzorek vložen do analyzátoru aminokyselin AAA 400, jenž je dostupný na Ústavu potravinářského inženýrství. Tento přístroj pracuje na principu středotlaké kapalinové chromatografie s ionexovou kolonou, ninhydrinovou derivatizací a spektrofotometrickou detekcí.

Automatický analyzátor aminokyselin je určen pro stanovení aminokyselin v hydrolyzátech bílkovin, peptidů, pro stanovení volných aminokyselin ve fyziologických roztocích a extraktech a pro stanovení biogenních aminů. Díky tomu nachází analyzátor uplatnění v základním biochemickém výzkumu bílkovin, výzkumu výživy lidí a zvířat, v lékařské diagnostice, při kontrole léčiv a potravin. [20]

## ZÁVĚR

V této bakalářské práci byla rozebrána problematika stanovení volných aminokyselin pomocí analytických metod a jejich význam ve vybraných rostlinných a živočišných vzorcích. Práce je doplněna stručnou charakteristikou aminokyselin a bílkovin. Pro Ústav potravinářského inženýrství Fakulty technologické Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně bylo v poslední kapitole práce doporučeno pracovat s přístrojovým vybavením Analyzátor aminokyselin AAA 400.

Na základě odborné literatury, informačních databázových zdrojů a internetových stránek byl zpracován přehled analytických metod a popsán význam stanovení volných aminokyselin.

Aby bylo dosaženo ověření výsledků a závěrů této bakalářské práce, je vhodné se problematikou volných aminokyselin věnovat do budoucna v další práci.



**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] MURRAY, ROBERT K.: *Harperova biochemie*. 4. vydání, Praha: H & H. 2002. 872 s.
- [2] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D.: *Potravinářská biochemie I*. 1. vydání, Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005. 168s.
- [3] VODRÁŽKA, Z.: *Biochemie*, 2. přepracované vydání Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, Fakulta potravinářské a biochemické technologie. 1990. 217 s.
- [4] ŠÍCHO, V., VODRÁŽKA, Z., KRÁLOVÁ, B.: *Potravinářská biochemie*. 2. vydání, Praha: SNTL. 1981. 360 s.
- [5] HODISAN, T., CULEA, M., CIMPOIU, C., COT, A.: *Separation, identification and quantitative determination of free amino acids from plant extracts*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 18. 1998. s. 319-323.
- [6] *Cheese.com*. [online] [cit. 2008-07-27]. Dostupné z: < <http://www.cheese.com> >.
- [7] *Kefalograviera*. [online] [cit. 2008-07-13] Dostupné z: < <http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/468893-kefalgraviera> >.
- [8] ÓZCAN, S., ŞENYUVA, H., Z.: *Improved and simplified liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry method for the analysis of undervatized free amino acids in various foods*. Journal of Chromatography, A, 1135 (2006), p. 179-185.
- [9] NOZAL, M. J., BERNAL, J. L., TORIBIO, M. L., DIEGO, J. C., RUIZ, A., *Rapid and sensitive method for determining free amino acids in honey by gas chromatography with flame ionization or mass spectrometric detection*. Journal of Chromatography A, 1047 (2004), p. 137-146.
- [10] ZÝKA, J. [et al.]: *Analytická příručka, díl první*. 3. vydání, Praha: SNTL. 1979. 678 s.
- [11] CHURÁČEK, J., JANDERA, P.: *Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie*. Praha: SNTL. 1984.
- [12] OPEKAR, F. [et al.]: *Základní analytická příručka*, 1. vydání, Praha: Karolinum. 2002. 201 s.
- [13] *Med*. [online] [cit. 2008-05-17] Dostupné z: <<http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/195247-med>>.

- [14] *Coomassie*. [online] [cit. 2008-08-18] Dostupné z:  
<<http://cs.wikipedia.org/wiki/Coomassie> >
- [15] DUUN, A., S., RUSTAD, T.: *Quality of superchilled vacuum packed Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets stored at -1,4 a -3,6<sup>0</sup>C*. Food Chemistry 106. 2008, s. 122-131.
- [16] YONGJIN, H., WENSHUI, X., CHANGRONG, G.: *Effect of mixed starter cultures fermentation on the characteristics of silver carp sausages*. World J Microbiol Biotechnol 23, 2007, p. 1021-1031.
- [17] MUSTAFA, A., ÅMAN, P., ANDERSON, R., KAMAL-ELDIN, A.: *Analysis of free amino acids in cereal products*, Food chemistry 105, 2007, p. 317-324
- [18] MICHAELIDOU, A., KATSIARIM, C., VOUTSINAS, L., P., POLYCHRONIADOU, A., ALICHANIDIS, E.: *Effect of multiple –species starters on peptide profile and free amino acids in low-fat Kefalograviera-type cheese*. Food chemistry. 104, 2007, p.800-807.
- [19] IZCO, I., J., TORRE, P., BARCINA, Y.: *Ripening of Ossau-Iraty cheese: determination of free amino acids by RP-HPLC and total free amino acids by the TNBS method*. Food Control 11, 2000, p. 7-11
- [20] *Analyzátor aminokyselin AAA 400, Návod k obsluze. Chemická část*, IGNOS, s.r.o., Praha, 2002.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

FID	Ionizační plamenná detekce
GC-MS	Kapalinová chromatografie-hmotnostní spektrometrie
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
LC/MS	Kapalinová chromatografie-hmotnostní spektrometrie
OPA	<i>o</i> -ftalaldehyd
PCA	Hlavní komponentní analýza
RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
SSA	Kyselina sulfosalicylová
SSAN	Dusíkaté látky rozpustné v kyselině sulfosalicylové
SDS	Dodecylsulfát sodný
TFAA	Trifluoroctový anhydrid
TLC	Tenkvrstevná chromatografie
TNBS	Kyselina 2,4,6-trinitrobenzensulfonová

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Strukturovaný vzorec aminokyseliny .....</i>	<i>9</i>
---	----------