

Faktory ovlivňující průběh hydrolýzy proteinů při analýze aminokyselinového složení potravin

Monika Dohnalová

Bakalářská práce
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Monika Dohnalová**

Osobní číslo: **T13208**

Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Faktory ovlivňující průběh hydrolýzy proteinů při analýze aminokyselinového složení potravin**

Zásady pro vypracování:

1. Charakterizujte možnosti hydrolýzy proteinů předcházející vlastnímu stanovení aminokyselinového složení potravin. Blíže se zaměřte na kyselou hydrolýzu.
2. Popište možnosti stanovení aminokyselinového složení potravin s důrazem na iontově výměnnou chromatografii.
3. Charakterizujte faktory, které mohou hydrolýzu proteinů ovlivnit (obsah tuku, sacharidů, aj.).



Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] BUŇKA F., O. KŘÍŽ, A. VELÍČKOVÁ, L. BUŇKOVÁ a S. KRÁČMAR. Effect of acid hydrolysis time on amino acid determination in casein and processed cheeses with different fat content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2009, 22, 224–232. ISSN 0889–1575.

[2] DARRAGH Alison J. a Paul J. MOUGHAN. The effect of hydrolysis time on amino acid analysis. *Journal of AOAC International*, 2005, 88, 888–893. ISSN 1060–3271.

[3] FOUNTOUNLAKIS Michael a Hans-Werner LAHM. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *Journal of Chromatography A*, 1998, 826, 109–134. ISSN 0021–9673.

[4] ALBIN D.M., J.E. WUBBEN a V.M. GABERT. 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. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2000, 48, 1684–1691. ISSN 0021–8561.

[5] RUTHERFURD S.M., P.J. MOUGHAN, D. LOWRY a C.G. PROSSER. Amino acid composition determined using multiple hydrolysis times for three goat milk formulations. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2008, 59, 679–690. ISSN 0963–7486.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Zuzana Bubelová, Ph.D.**
Ústav technologie potravin

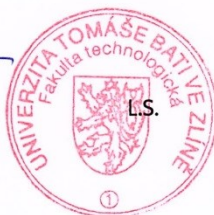
Datum zadání bakalářské práce: **2. února 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. května 2018**

Ve Zlíně dne 2. února 2018



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: DOHNALOVA MONIKA

Obor: CHTP

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 30.4.2019

..... Dohnalová Monika

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 nevydělečně 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 nahlížení 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 vzdělávacímu 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 užít 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

Nedílnou součástí stravy každého jedince v potravinách jsou aminokyseliny. Rešeršní bakalářská práce popisuje aminokyseliny a jejich stanovení po hydrolýze proteinů. Zabývá se stanovením aminokyselin titračními, spektrofotometrickými, elektromigračními a především chromatografickými metodami, kdy se nejvíce využívá metoda iontově výměnné chromatografie. Další část bakalářské práce se zabývá faktory, které ovlivňují hydrolýzu proteinů. Mezi ně patří hydrolyzační činidla, reakční doba, teplota, přísady a pH.

Klíčová slova: aminokyseliny, hydrolýza, chromatografie

ABSTRACT

One of the most important parts of every individual's daily diet are amino acids. This bachelor thesis describes amino acids and their identification after protein hydrolysis. It deals with identification of amino acids through variety of methods including titration, spectrophotometry, electromigration and particularly chromatography, in which the ion exchange chromatography is most frequently used. The next section of the thesis then deals with factors affecting protein hydrolysis. These include hydrolysants, reaction times, temperature, additives and pH.

Keywords: amino acid, hydrolysis, chromatography

Poděkování patří především mé vedoucí bakalářské práce paní Ing. Zuzaně Lazárkové, Ph.D. za ochotu, cenné rady a trpělivost při zpracovávání této práce.

Dále bych chtěla poděkovat rodině za podporu po celou dobu studia.

Prohlašuji, že odevzdávám verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	9
1 HYDROLÝZA PROTEINŮ	10
1.1 AMINOKYSELINY	10
1.2 KYSELÁ HYDROLÝZA	12
1.3 ALKALICKÁ HYDROLÝZA	13
1.4 ENZYMATICKÁ HYDROLÝZA.....	14
2 STANOVENÍ AMINOKYSELINOVÉHO SLOŽENÍ	15
2.1 TITRAČNÍ METODY	15
2.1.1 Formolová titrace podle Sørensen	15
2.2 SPEKTROFOTOMETRICKÉ METODY.....	15
2.2.1 Stanovení aminokyselin reakcí s ninhydrinem	16
2.2.2 Stanovení aminokyselin kyselinou 2,4,6-trinitrobenzensulfonovou.....	17
2.3 ELEKTROMIGRAČNÍ METODY.....	18
2.3.1 Elektroforéza	18
2.3.1.1 Kapilární elektroforéza	19
2.4 CHROMATOGRAFICKÉ METODY	20
2.4.1 Tenkovrstevná a papírová chromatografie.....	21
2.4.1.1 Dělení aminokyselin chromatografií na tenké vrstvě silikagelu.....	21
2.4.1.2 Dělení aminokyselin papírovou chromatografií	22
2.4.2 Plynová chromatografie	23
2.4.3 Kapalinová chromatografie.....	23
2.4.3.1 Iontově výměnná chromatografie	23
3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ HYDROLÝZU PROTEINŮ	26
3.1 HYDROLYZAČNÍ ČINIDLO	26
3.2 REAKČNÍ DOBA	27
3.3 TEPLOTA	28
3.4 DALŠÍ PŘÍSADY.....	29
3.5 FAKTOR PH	29
3.6 STANOVENÍ AMINOKYSELIN V ZÁVISLOSTI NA ČASE.....	30
ZÁVĚR	35
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	36
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	42
SEZNAM OBRÁZKŮ	43

ÚVOD

Aminokyseliny v potravinách je možné nalézt jako volné nebo vázané na bílkoviny, peptidy a nepeptidové látky. Větší množství volných aminokyselin se vyskytuje v potravinách, při jejichž výrobě, popř. skladování, dochází k proteolýze. Např. u sýrů nebo vín. Volné aminokyseliny se vyskytují v sójovém hydrolyzátu, který se používá jako sójová omáčka nebo polévkové koření [1, 2].

Stanovení složení aminokyselin v bílkovinách je poměrně složitý analytický proces, který se skládá ze dvou kroků. Prvním krokem je hydrolýza proteinu pro uvolnění aminokyselinových zbytků a druhým krokem je jejich analýza a kvantifikace [3].

Hydrolýza proteinů je prováděna třemi způsoby a to kysele, alkalicky a enzymaticky. Kyselá hydrolýza je prováděna nejčastěji s 6 mol.l^{-1} HCl při $110 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 18 – 24 hodin ve vakuu. Jelikož je tryptofan velmi citlivý, nelze stanovit kyselou hydrolýzou. Proto je stanovován alkalickou hydrolýzou při $110 \text{ }^\circ\text{C}$ 18 hodin [1, 3, 4].

Aminokyseliny se stanovují celou řadou metod, například titračními metodami, spektrofotometrickými metodami, elektromigračními metodami a chromatografickými metodami. Pro aminokyseliny se nejvíce využívá metoda iontoměničová. Podstatou iontoměničové chromatografie je separace iontů. Stacionární fází je měnič iontů. Mobilní fází je zředěný roztok kyselin a zásad [5].

Faktory, které ovlivňují průběh hydrolýzy, jsou důležitým znakem stanovení všech aminokyselin v potravinách a krmivech. K nejdůležitějším faktorům, které ovlivňují hydrolýzu proteinů, se řadí reakční doba, teplota, koncentrace činidla, pH a přísady [1].

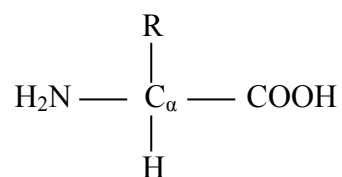
Zaměřením této práce je bližší přiblížení faktorů, které mají za následek zjištění aminokyselin v průběhu hydrolýzy, kdy některé aminokyseliny se projeví po krátké době působení hydrolýzy, zatímco jiné aminokyseliny potřebují pro kvantitativní stanovení delší čas.

1 HYDROLÝZA PROTEINŮ

Cílem každé hydrolýzy je kvantitativní rozštěpení proteinů na jednotlivé aminokyseliny. Přesnost výsledné analýzy aminokyselin závisí na úspěšném provedení hydrolýzy. Na analýzu, která je požadována, je důležitý výběr vhodné metody hydrolýzy, kdy se ve většině případů volí kompromis mezi různými metodami hydrolýzy. Faktory, které mohou mít vliv na proces hydrolýzy, jsou teplota, čas, hydrolyzační činidlo a další přísady (například fenolové kyseliny, thioglykolové kyseliny, indol, tryptamin). Správná kombinace těchto faktorů ovlivňuje stanovení citlivých aminokyselinových zbytků. Avšak doposud nebyla nalezena žádná metoda hydrolýzy, která by úplně a kvantitativně uvolnila všechny aminokyseliny z proteinu. Hydrolýzu proteinů je možné uskutečnit třemi způsoby, a to v kyselém, nebo alkalickém prostředí a enzymaticky [1, 3, 6].

1.1 Aminokyseliny

V přírodě nalezneme více než 700 aminokyselin, ovšem pouhých 20 aminokyselin se vyskytuje ve všech bílkovinách. V potravinách je nalezneme v podobě stavebních látek bílkovin a peptidů v tzv. vázané formě nebo jako volné látky. I když se volné aminokyseliny nacházejí v malém množství (asi 1 %), nalezneme je zejména při výrobě, popřípadě skladování potravin. Například u sýrů, vín a v sójových omáčkách. Vázané aminokyseliny v bílkovinách se nazývají kódované a jsou to substituované karboxylové kyseliny (-COOH) s alespoň jednou primární aminoskupinou (-NH₂), kdy se jedná o α -aminokyseliny (obecný vzorec viz Obr. 1). Jedinou výjimku tvoří prolin, který obsahuje sekundární aminoskupinu, a tak je vlastně α -iminokyselinou, i když se běžně zařazuje mezi aminokyseliny. Univerzálnost genetického kódu je zajištěna u všech forem života na zemi zásluhou bílkovin. Na zemi se mohou vyskytovat ještě tzv. specifické bílkoviny, které mohou obsahovat metylované, formulované, acetylové a jiné deriváty těchto 20 aminokyselin [7, 8].



Obrázek 1 – Obecný vzorec α -aminokyselin. R označuje postranní řetězec aminokyselin [9]

Možností členění aminokyselin je vícero. Například je lze rozdělit na hydrofobní aminokyseliny (valin, leucin, isoleucin, metionin, fenylalanin, tyrozin, prolin); občas se k nim řadí i glycin, alanin, tryptofan, i když jsou to spíše aminokyseliny amfifilní – obojetné, které tvoří přechod mezi hydrofobní a hydrofilní skupinou aminokyselin, a hydrofilní aminokyseliny (serin, threonin, cystein, kyselina asparagová, kyselina glutamová, asparagin, glutamin, lyzin, arginin, histidin). Hydrofilní aminokyseliny členíme dále na neutrální (řadí se sem většina aminokyselin), kyselé (asparagová kyselina a glutamová kyselina) a bazické (arginin, histidin a lyzin). Tím nejrozšířenějším ovšem zůstává členění dle struktury postranního řetězce a v něm přítomných funkčních skupin:

- alifatické aminokyseliny s nesubstituovaným postranním řetězcem – glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin
- alifatické hydroxyaminokyseliny – serin, threonin
- alifatické sírné aminokyseliny – cystein, metionin
- aminokyseliny s karboxylovou skupinou v postranním řetězci – kyselina asparagová, kyselina glutamová
- aminokyseliny, které jsou amidy asparagové kyseliny a glutamové kyseliny – asparagin, glutamin
- aminokyseliny s bazickými funkčními skupinami v postranním řetězci – lyzin, arginin, histidin
- aminokyseliny s aromatickým a heterocyklickým postranním řetězcem – fenylalanin, tyrozin, tryptofan
- aminokyselina, u které se funkční skupina účastní cyklu – prolin

Aminokyseliny jsou pro lidskou výživu nedílnou součástí. Ze základních aminokyselin je esenciální přibližně polovina. Některé si člověk neumí sám syntetizovat a tak je nutné, aby je získával v potravě. Takové aminokyseliny označujeme za esenciální (valin, leucin, isoleucin, threonin, metionin, lyzin, fenylalanin, tryptofan). Některé neesenciální aminokyseliny se mohou stát esenciálními, a to velmi často u malých dětí, když je organismus nedokáže v dostatečném množství syntetizovat. Nazývají se poloesenciální (arginin, histidin). Ve stravě se většinou v dostatečném množství esenciální aminokyseliny vyskytují. Ty aminokyseliny, které se vyskytují relativně nejméně, vzato na denní spotřebu, označujeme

jako limitující. Tyto aminokyseliny nesmí být neesenciální, takové, které si umí organismus syntetizovat, proto se jimi někdy obohacují potraviny a krmiva zvířat. Obecně však platí, že živočišné bílkoviny mají vyšší výživovou hodnotu, než rostlinné bílkoviny [7, 10, 11].

1.2 Kyselá hydrolýza

Kyselá hydrolýza je nejběžnější metoda hydrolýzy. Vhodnost využití této metody je způsobena použitím činidla, které může být použito jak v kapalně fázi, tak ve fázi plynné. Analýza je prováděna s malým množstvím substrátu, kdy nedostatek substrátu je kritickým faktorem, pokud jsou k dispozici pouze omezená množství bílkovinných vzorků [3].

Pro kyselou hydrolýzu se mnohdy využívá koncentrovaná 6 mol.l^{-1} kyselina chlorovodíková (HCl). Použitím koncentrované 6 mol.l^{-1} kyseliny chlorovodíkové je vzorek ve vakuu vystaven teplotě $110 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 18 – 24 hodin, kdy nejběžněji se využívá 24 hodinový interval. Aplikovány byly i jiné kyseliny pro stanovení aminokyselin, a to například koncentrovaná 3 mol.l^{-1} *p*-toluensulfonová kyselina, sulfonová kyselina a metansulfonová kyselina. Výhoda při aplikování jiných kyselin, například kyseliny metansulfonové v porovnání s HCl je, že kromě ostatních zbytků umožňuje stanovit tryptofan a metionin-sulfoxid. Metoda hydrolýzy, která by dokázala stanovit všechny aminokyseliny, včetně tryptofanu a cysteinu zahrnuje způsob alkylace kyselinou jodoctovou a následnou hydrolýzu derivátů 4 mol.l^{-1} metansulfonovou kyselinou při $115 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 22 hodin v přítomnosti 0,02% tryptaminu. Tento způsob však zahrnuje řadu kroků a je nepraktický pro sériové analýzy. Jiná studie uvádí, že získané aminokyseliny po hydrolýze 4 mol.l^{-1} metansulfonovou kyselinou, jsou v porovnání stejné s těmi aminokyselinami, které byly získány po hydrolýze 6 mol.l^{-1} HCl [3, 4].

Variabilita ve snadnosti štěpení peptidové vazby a různorodost stability aminokyselin v kyselém prostředí může významně ovlivnit konečný odhad složení aminokyselin ve vzorku. Peptidové vazby hlavně mezi aminokyselinami isoleucin-isoleucin, valin-valin, isoleucin-valin se obtížně hydrolyzují. V takovém případě, aby se získal maximální výnos těchto aminokyselin, trvá hydrolýza podstatně delší dobu než 24 hodin. Podle [3] se tyto vazby štěpí asi jen z 50 – 70 % při $110 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 24 hodin. Kvantitativní štěpení vyžaduje dobu působení hydrolýzy 92 – 120 hodin, která může mít za následek větší ztráty citlivých aminokyselin uvedených dále [1, 3, 6,].

Delší doba působení dle [12] než využívaných 24 hodin má pozitivní vliv na valin, glycin, isoleucin a leucin. U labilních aminokyselin (serin, threonin) dochází vlivem kyselých hydrolyzů ke ztrátám okolo 5 – 10 %. Při procesu kyselých hydrolyzů jsou částečně zničeny sírné aminokyseliny (cystein a metionin) a histidin. Proto je navázaný cystein a metionin hydrolyzován až po oxidaci (směs 30% peroxidu vodíku a 98% kyseliny mravenčí v poměru 1:9 obj./obj.). Stanovuje se jako kyselina cysteová a metionin sulfon. Určit nelze tryptofan, který je zcela rozložen. Zjištěna je určitá ztráta u tyrozinu, a to kvůli jeho citlivosti na nečistoty. Aminokyseliny asparagin a glutamin jsou působením kyseliny chlorovodíkové změněny na kyselinu asparagovou a kyselinu glutamovou [1, 13].

Pro obtížně stanovitelné aminokyseliny se využívají tzv. ochranná činidla, která se k analyzovanému roztoku vzorku přidávají před hydrolyzou a to například dle [6] fenolové kyseliny (pro tyrozin), redukční činidla, kterými je dodekanthiol nebo thioglykolová kyselina určené pro metionin a tryptofan, dále merkaptoethanol, indol nebo tryptamin. Takto hydrolyzovaný vzorek je připraven k určení obsahu aminokyselin [3, 14].

Během kyselých hydrolyzů probíhají současně procesy výtěžku a rozkladu aminokyselin. Standartní doba hydrolyzů 20 – 24 hodin nevede v některých případech k přesnému odhadu obsahu aminokyselin [1].

1.3 Alkalická hydrolyza

Alkalická hydrolyza slouží převážně ke stanovení tryptofanu, který je stabilní, jelikož při kyselých hydrolyzách je rozložen působící kyselinou chlorovodíkovou. V důsledku alkalické hydrolyzy může být zaznamenána ztráta tryptofanu přítomného v potravinách ještě před zahájením analýzy o 5 – 10 %. V rámci studie byl tryptofan stanoven po hydrolyze 4,2 mol.l⁻¹ NaOH s průměrným výtěžkem 85 %. Alkalickou hydrolyzu je také možné stanovit s anebo bez přídavku 1% thiodiglykolu při teplotě 110 °C po dobu 18 hodin. Zároveň se alkalická hydrolyza využívá i v případech kdy analyzovaný vzorek obsahuje vyšší množství sacharidů. Alkalická hydrolyza se provádí nejčastěji s hydroxidem sodným (NaOH), hydroxidem draselným (KOH), hydroxidem litným (LiOH) a méně často s hydroxidem barnatým (Ba(OH)₂). Hydrolyza s KOH byla aplikována pro kvantifikaci fosforylovaného a sulfátového tyrozinu. Nevýhoda této metody spočívá v úplném nebo částečném rozkladu některých aminokyselin, zejména serinu, threoninu, argininu a cysteinu. U ostatních aminokyselin dochází k racemizaci a může tím být ovlivněn i konečný výsledek hydrolyzy. Při alkalické hydrolyze se peptidové vazby odštěpí v závislosti na použité zásadě, vznikají

peptidy s nízkou molekulovou hmotností a draselné nebo sodné soli volných aminokyselin [3, 15].

1.4 Enzymatická hydrolýza

Stanovení aminokyselin enzymatickou hydrolýzou se využívá jen zřídka. Rozšířenějšímu používání zabraňuje relativní specifčnost proteáz, čímž mohou být ovlivněny konečné výsledky analýzy, zvláště v případě malého množství vzorku. Proto byla enzymatická hydrolýza s proteolytickými enzymy, jako je trypsin, chymotrypsin, karboxypeptidáza, papain, termolysin a pronáza, použita pro analýzu specifických aminokyselinových sekvencí a jednoduchých aminokyselin. Použitím enzymatické hydrolýzy byl obsah tryptofanu analyzován v nutričních produktech na bázi sóji a mléka enzymatickým (pronázovým) štěpením proteinu k uvolnění tryptofanu. Tryptofan byl následně analyzován izokratickou kapalinovou chromatografií s reverzní fází s detekcí fluorescence. Enzymatické štěpení bylo ukončeno za méně než 6 hodin a provedeno za chemicky mírných podmínek a to při pH 8,5 a teplotou 50 °C. Tyto mírné podmínky tryptofan nerozptýlily [3, 16].

Výhodou enzymatické hydrolýzy je kvantifikace asparaginu, glutaminu a dalších citlivých zbytků, které jsou zničeny při chemickém štěpení. Jsou to takové citlivé zbytky, které nesou modifikaci postranního řetězce. Pro kompletní štěpení je nutná inkubace s několika enzymy a reakce obvykle trvá déle. Proto se tato metoda nevyužívá pro sériové analýzy [3].

Vyzkoušen byl systém imobilizovaných proteáz a úplné hydrolýzy bylo dosaženo během 18 – 24 hodin. Spojením dvou metod hydrolýz vyvinul [17] techniku zahrnující částečné chemické štěpení pomocí 6 mol.l⁻¹ HCl při teplotě 80 – 90 °C po dobu 15 minut a následné enzymatické digesce pronázou při teplotě 50 °C po dobu 12 – 16 hodin. Využití tohoto způsobu hydrolýz je velmi složité a zdlouhavé [3].

2 STANOVENÍ AMINOKYSELINOVÉHO SLOŽENÍ

Aminokyseliny ve vzorcích potravin můžeme stanovit mnoha metodami. Nedílnou součástí stanovení aminokyselin je jejich prvotní uvolnění z proteinu, kterého lze docílit pomocí kyselé, alkalické nebo enzymatické hydrolyzy. Následně se ve vzorcích zjišťuje obsah jednotlivých aminokyselin.

2.1 Titrační metody

Titrace je běžnou laboratorní metodou kvantitativní chemické analýzy. Používá se pro stanovení neznámé koncentrace identifikovaného analytu. Správné proběhnutí stechiometrické reakce mezi analytem a přidávaným titračním činidlem je zajištěno měřením objemu titračního činidla o známé koncentraci. Po proběhnutí chemické reakce je dosaženo tzv. bodu ekvivalence. Bod ekvivalence je určován vizuálně, kdy je do roztoku přidán indikátor, například fenolftalein, tashiroy a další, nebo se využívá fyzikálně-chemických metod [5, 18].

2.1.1 Formolová titrace podle Sørenseny

Ke stanovení aminokyselin lze použít formolovou titraci podle Sørenseny. Aminokyseliny reagují s formaldehydem a přitom je uvolňován jeden H^+ iont z aminoskupiny, který je potenciometricky titrován roztokem hydroxidu sodného (NaOH) na indikátor fenolftalein nebo thymolftalein. Počet uvolněných karboxylových skupin je ekvivalentní počtu aminokyselin vázaných na formaldehyd. Titrační výsledek umožňuje stanovit množství aminokyselin ve vzorku. Ne všechny aminokyseliny lze takto stanovit. Sekundární aminoskupina histidinu nereaguje, stejné skupiny prolinu a hydroxyprolinu reagují asi ze 75 %. Žádné reakci nepodléhá terciární dusík a guanidinové skupiny. V laboratorní praxi je tento rychlý a jednoduchý postup využíván jako doplňková technika při enzymatickém trávení bílkovin z masa [19, 20].

2.2 Spektrofotometrické metody

Spektrofotometrické metody jsou kvantitativními metodami analytické chemie. Každá chemická sloučenina absorbuje, přenáší nebo odráží světlo přes určitý rozsah vlnové délky. Pomocí absorpce viditelného světla je stanovována např. koncentrace určité chemické látky, kdy intenzita barvy je přímo úměrná koncentraci přítomné látky. Tato metoda je považována za instrumentální techniku, která využívá měření absorpce elektromagnetického

záření v ultrafialové (UV, 185 – 400 nm), viditelné (VIS, 400 – 700 nm) a infračervené oblasti (IR, 700 – 15000 nm) [21, 22, 23].

Spektrofotometr je přístroj, který se obecně skládá ze dvou zařízení, spektrometru a fotometru. Spektrometr je zařízení, které vytváří, rozptyluje a měří světlo. Fotometr měří intenzitu světla. Spektrofotometr tedy měří množství fotonů (intenzita světla) absorbovaného po průchodu roztokem vzorku. Spektrofotometr měří intenzitu světla dané vlnové délky, která prošla měřeným vzorkem, příp. které bylo měřenou látkou pohlceno. Pomocí spektrofotometru je stanovována koncentrace známého vzorku, která je vypočtena podle vztahu Lambert-Beerova zákona [23].

2.2.1 Stanovení aminokyselin reakcí s ninhydrinem

K analýze a charakterizaci aminokyselin, peptidů a proteinů jsou využívány ninhydrinové reakce. Ninhydrin oxidativně dekarboxyluje α -aminokyseliny na CO_2 , NH_3 a aldehyd, který je o jeden uhlík kratší než původní aminokyselina. Redukovaný ninhydrin, tzv. hydrindantin, potom reaguje s uvolněným amoniakem a vzniká tmavě modrý až fialový komplex, tzv. Ruhemanova violeť (RV), s max. absorpcí při vlnové délce 570 nm. Prolin a 4-hydroxyprolin vytvářejí s ninhydrinem žluté zbarvení při vlnové délce 440 nm. Ninhydrinová reakce probíhá pouze za tepla. Reakci ruší nadbytek amonných iontů [24, 25, 26].

Studie, které byly provedeny, vedly ke zjištění dvou faktorů, které ovlivňují vznik RV:

a) Pomalá reakce

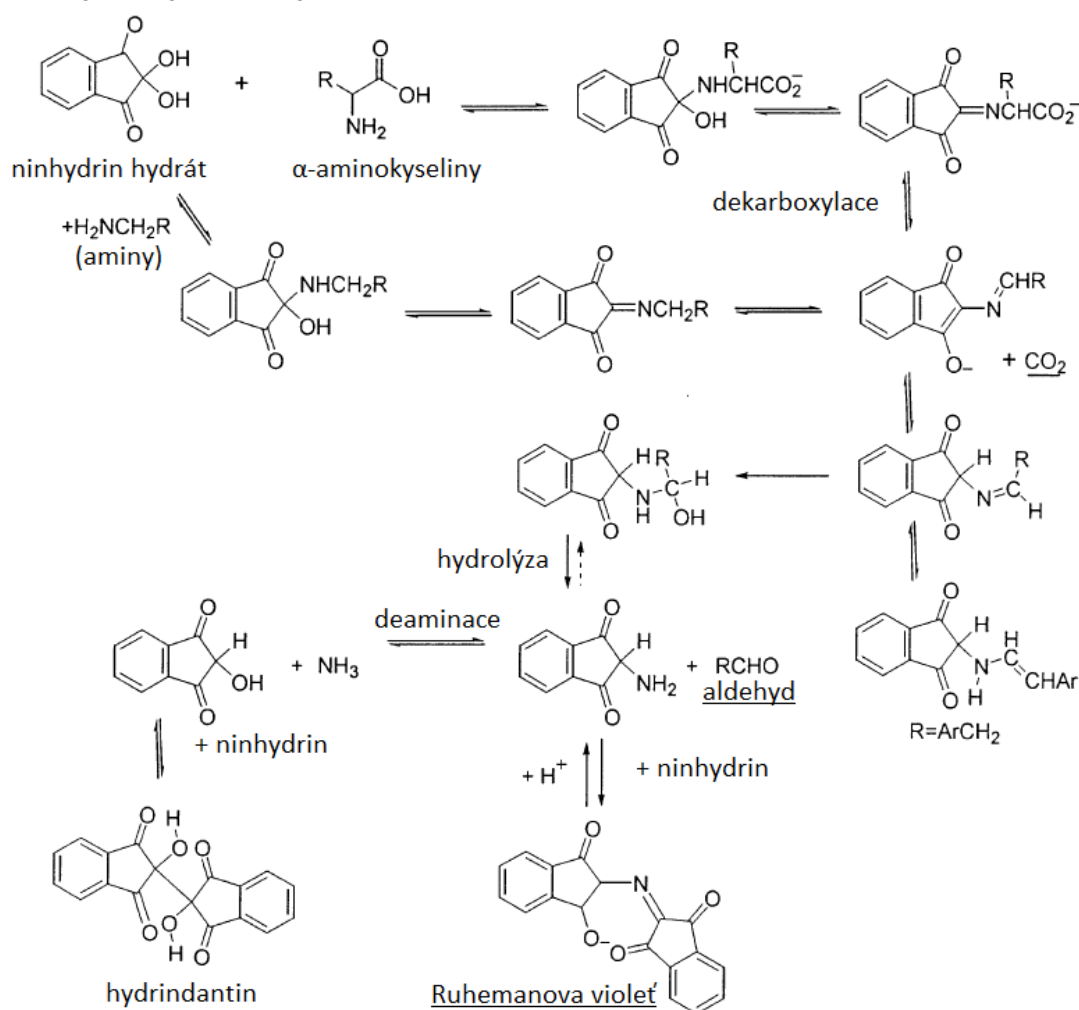
Některé aminokyseliny reagují s ninhydrinem podstatně pomaleji než jiné, takže nízký výtěžek v jednom reakčním čase může být někdy způsoben pouze neúplnou reakcí. Avšak pokud není rychlost reakce příliš malá, změření barevného výnosu ukáže, zda bylo dosaženo maxima.

b) Nepřiměřená rovnováha

Ninhydrinová reakce se skládá z několika kroků, při kterých může být aminokyselina odkloněna od tvorby RV. Dekarboxylace (ztráta CO_2) a současná tvorba aldehydu jsou nevratnými kroky, takže jakákoli rovnováha před posledním nezvratným krokem (tvorba aldehydu) může vést ke zpomalení rychlosti reakce [27].

Ninhydrin je také široce používán ke sledování uvolňování volných aminoskupin během dozrávání sýrů [28].

α -aminokyseliny a aminy:



Obrázek 2 – Mechanismus reakce α -aminokyselin a aminy s ninhydrinem hydrátem za vzniku Ruhemanovy violeti [27]

2.2.2 Stanovení aminokyselin kyselinou 2,4,6-trinitrobenzensulfonovou

Kyselina 2,4,6-trinitrobenzensulfonová (TNBS) reaguje pouze s primárními aminoskupinami aminokyselin, peptidů a proteinů za mírně alkalických podmínek při pH 8 – 9. Tato reakce vede k tvorbě žlutého chromoforu, který maximálně absorbuje světlo při 420 nm. Při reakci vzniká Meisenheimerův komplex, který je meziproductem celkové reakce. Reakce je ukončena snížením pH [20, 25, 29].

Stanovení aminokyselin lze provést následujícím způsobem. Smíchá se 1,0 ml roztoku vzorku, který má být analyzován, o koncentraci 0,01 – 0,87 $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$, dále 1,0 ml 4% hydrogenuhličitanu sodného a 1,0 ml 0,1% TNBS. Připravená směs látek je uchovávána ve

tmě při teplotě 40 °C po dobu 2 hodin. Hustota byla změřena při 340 nm po okyselení de-finovaným množstvím HCl [20].

Bylo zjištěno, že α - a ε -aminoskupiny se podílejí na reakci druhého řádu. Skupina -SH cysteinu reaguje s TNBS a naopak amoniak komplex s TNBS netvoří. Reakce TNBS s volnými aminoskupinami mírně zpomaluje skupina -OH a močovina, na druhou stranu její vysoká koncentrace eliminuje rozdíly v kinetické reaktivitě aminoskupin různých druhů proteinů. Při analytickém postupu je důležité udržovat konstantní teplotu, pH a reakční dobu. Různé modifikace této metody byly zaměřeny na degradaci proteinů v mase a sýrech [20, 28].

V mnoha potravinářských výrobcích bylo zjištěno, že výsledky získané metodou TNBS korelují s výsledky získanými technikou podle Kjeldahla. Hlavní výhodou metody TNBS je její vysoká specifická a nízká citlivost vůči interferujícím látkám [20].

2.3 Elektromigrační metody

Principem separace je migrace iontů v kapalně fázi ve stejnosměrném elektrickém poli. Na iont působí elektrostatická síla a proti ní brzdí síla (odpor prostředí). K separaci dochází na základě různé pohyblivosti iontů, což se využívá dvěma způsoby:

- při konstantní intenzitě elektrického pole ($E = \text{konst.}$) na základě rozdílné rychlosti migrace – elektroforéza,
- při konstantní rychlosti iontů, které se dosáhne různou hodnotou E pro různé ionty – izotachoforéza [5].

Jednotlivé techniky se liší jak principem, tak instrumentálním provedením, použitím pracovního elektrolytu apod. [30].

2.3.1 Elektroforéza

Aminokyseliny jsou podle elektroforetického dělení rozdělovány na základě velikosti náboje příslušné aminokyseliny, který odpovídá jejímu disociačnímu stupni v použitém tlumivém roztoku [31].

Ve velmi kyselém tlumiči je u dělených aminokyselin potlačena disociace karboxylových skupin, proto se všechny aminokyseliny jako kationty pohybují ke katodě. Naopak v alkalickém tlumiči je potlačena disociace aminoskupin, a proto se dělené aminokyseliny pohybují jako anionty k anodě. V neutrálním prostředí bazické aminokyseliny (lyzin, histidin,

arginin) poputují jako kationty ke katodě a naopak kyselé aminokyseliny (kyselina glutamová, kyselina asparagová) kvůli výslednému zápornému náboji (disociace většího počtu karboxylových skupin oproti aminoskupinám) poputují k anodě. Aminokyseliny lze stanovovat elektroforeticky v jejich kationtové formě v kyselém prostředí kolem pH 2 nebo jako anionty kolem pH 9. Aminokyseliny se následně detekují na usušeném elektroforeogramu pomocí ninhydrinu [31, 32].

2.3.1.1 Kapilární elektroforéza

Předností kapilární elektroforézy (CE) je především vysoká separační účinnost, malý objem vzorku potřebný k analýze, nízká spotřeba roztoků pufrů/elektrolytů, velmi nízké provozní a pořizovací náklady, ekologický provoz, široká variabilita použitelnosti a separačních módů (v roztoku, v gelu, ve stacionární fázi, aj.) a především vysoká rychlost analýzy. Zejména vysoká rychlost analýzy s automatizací umožňuje provádět analýzy velkých souborů vzorků a tím splnit požadavky, které si vyžaduje současný výzkum [32, 33].

CE je velmi užitečná metoda při analýze aminokyselin. Používá se pro analýzu vzorků potravin, zejména při korelaci chutí a sledování fermentačních metabolitů [34].

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) nebo elektroforéza volného roztoku je nejčastěji používaným modelem CE pro analýzu aminokyselin, a to především proto, že se provádí v kapiláře naplněné roztokem elektrolytu zvoleného pH a iontové síly. Separace je založena hlavně na rozdílech velikosti rozpouštědla a náboje (poměr náboje k hmotnosti) při daném pH. Aminokyseliny, které mají být detekovány CE, obvykle vyžadují derivatizaci za vzniku detekovatelných chromoforů nebo fluoroforů, kromě aromatických aminokyselin [35].

Pro analýzu CE aminokyselin v potravinářských produktech bylo použito již několik předkolonových derivatizačních činidel. Fluorescein-isothiokyanát (PITC) byl použit k výrobě derivátů fluoresceinu thiokarbomátu biogenních aminů a aminokyselin ve víně. o-ftalaldehyd (OPA) byl použit k derivatizaci aminokyselin v rostlinných matricích. Dansylchloridové deriváty aminokyselin z hydrolyzovaných přírodních a umělých ploutví byly stanoveny a kvantifikovány za použití CE s UV detekcí, kdy tyrozin byl citlivým ukazatelem pravosti. Dalšími činidly jsou naftalen dikarboxaldehyd (NP) a 9-fluorenylmethylchlorformiát (FMOC-Cl). Nicméně tato derivatizační činidla mají určité nevýhody, kdy činidlo OPA nereaguje se sekundárními aminokyselinami, a některé z OPA derivátů aminokyselin jsou nestabilní. NP nereaguje pouze s primárními aminokyselinami v přítomnosti toxických sloučenin, jako je např. kyanid sodný [36, 37, 38].

Ve studii [39] byly oddělovány aminokyseliny ve vzorcích krmiv za použití CE, kdy byly vzorky derivatizovány s 1,2-naftochinon-4-sulfonátem a detekovány při 230 nm. Výsledky pro krmné vzorky se shodně shodovaly s výsledky, které byly získány kationtovou výměnou chromatografií s derivatizací ninhydrinem postkolonově. Dalším reakčním činidlem je naftalen-2-3-dikarboxaldehyd (NDA), který reaguje s primárními aminy v přítomnosti kyanidu [38].

Autor Dong et.al. použil metodu CE s elektrochemickou detekcí NDA derivátů aminokyselin v pivu při pH 9,48. Z 20 derivatizovaných aminokyselin bylo ve standardním roztoku odděleno pouze 10 a možno detekovat a kvantifikovat ve vzorcích piva bylo 7 (arginin, tryptofan, fenylalanin, tyrosin, valin, alanin, glycin) [38].

Ve studii [34] použili rychlou CE metodu (<17 min) s hmotnostní spektrometrií, kdy byla použita kapilára taveného oxidu křemičitého, 1 mol.l⁻¹ elektrolyt kyseliny mravenčí a 5 mmol.l⁻¹ octan amonný v 50% metanolu s vodou (v/v). Cílem bylo stanovit 19 volných přirozeně se vyskytujících aminokyselin v sójové omáčce. Příprava vzorků byla minimální a metoda ukázala použitelnost pro analýzu aminokyselin v potravinách a hydrolyzovaných bílkovinách.

CE s UV-VIS detektorem je obecně velmi využívána. Jelikož většina z aminokyselin nedisponuje chromoforem [13, 38].

Vhodné činidlo pro stanovení primárních a sekundárních aminokyselin před derivatizací je 4-chlor-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl), jehož výhodou jsou nízké náklady, využití pro fluorescenční značení aminokyselin, UV detekci a v neposlední řadě vytváří nízký počet vedlejších produktů. Kapilární elektroforéza s UV-detekcí byla použita pro stanovení šesti aminokyselin, kterými jsou alanin, asparagin, glutamin, prolin, serin a valin [38].

2.4 Chromatografické metody

Chromatografie jsou fyzikálně-chemické separační metody, při kterých jsou oddělovány (separovány) složky obsažené ve vzorku. Vzorek se vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, z nichž jedna se označuje jako stacionární fáze (nepohyblivá) a druhá se nazývá mobilní fáze (pohyblivá). Pro mobilní fázi se využívá plynu nebo kapaliny, načež u stacionár-

ní fáze záleží na typu chromatografie a může mít např. podobu částic, tuhé fáze, tenké vrstvy kapaliny na pevných částicích apod. [40, 41, 42].

Připravený vzorek se vkládá na začátek stacionární fáze, který je pomocí mobilní fáze přes stacionární fázi unášen. Stacionární fáze může některé složky vzorku zachycovat a tím jsou tyto složky zadržovány. Více se zdrží složky, které jsou ke stacionární fázi vázány silněji. Výstupem metody chromatografie je chromatogram [40, 41].

Chromatografických metod je velké množství, a proto jsou rozdělovány do několika skupin. Zde jsou uvedeny jen ty typy chromatografie, kterými se bude bakalářská práce dále zabývat. Vzhledem ke své různorodosti se dělí podle několika hledisek:

- Podle skupenství mobilní fáze
 - Kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography – LC)
 - Plynová chromatografie (Gas Chromatography – GC)
- Podle uspořádání stacionární fáze
 - Tenkovrstevná chromatografie (Thin Layer Chromatography – TLC)
- Podle povahy děje, který převládá při separaci
 - Iontově-výměnná chromatografie (Ion-exchange Chromatography – IEC) [40]

2.4.1 Tenkovrstevná a papírová chromatografie

Papírová chromatografie byla postupně vytlačena chromatografií na tenké vrstvě, protože je rychlejší, má širší možnosti detekce a lepší rozlišovací schopnost. Dnes se papírová chromatografie používá jako jednoduchá a levná metoda ke kontrole nepříliš složitých směsí [43].

2.4.1.1 Dělení aminokyselin chromatografií na tenké vrstvě silikagelu

Chromatografie na tenké vrstvě je metodou adsorpce.

Chromatografie na tenké vrstvě často využívá čtyři nejběžnější stacionární fáze, kterými jsou silikagel, celulóza, impregnované adsorbenty a iontoměniče. Zde se zaměříme pouze na použití silikagelu jako stacionární fáze. Při použití silikagelu se využívá dvou nebo tří složkové směsi rozpouštědel (aceton, metanol, voda, kyselina octová a kyselina mravenčí,

někdy s přidávkem amoniaku nebo pyridinu). Nejvyužívanějším činidlem pro kvalitativní a kvantitativní detekci aminokyselin je ninhydrin [44].

Chromatografie na silikagelu je uskutečňována v provedení na tenké vrstvě na hliníkové fólii zvané Silufol (20 × 20 cm). Na desku se silikagelovou vrstvou se nanese asi 2 cm od dolního okraje standardy aminokyselin a vzorky. Nanášení je prováděno opakovaně jemnou kapilárou. Skvrna by neměla být větší než 3 – 5 mm. Připravená deska se vloží do vyvíjecí nádoby se zvolenou směsí rozpouštědel. Vyvíjení je ukončeno tehdy, až směs rozpouštědel (mobilní fáze) dosáhne od horního okraje asi 2 cm. Folie je vyjmuta, vysušena na vzduchu a následně postříkána aerosolem ninhydrinového činidla. Deska je zahřata v sušárně na 110 °C po dobu 10 minut, a potom vypočítána hodnota R_F (viz. Obr. 2) [31, 43].

$$R_F = V_{SS} / V_{CS}$$

Obrázek 3 – Retardační faktor: poměr vzdálenosti [45]

kde: V_{SS} – vzdálenost středu skvrny od startu, V_{CS} – vzdálenost čela od startu [45]

2.4.1.2 Dělení aminokyselin papírovou chromatografií

Principem papírové chromatografie při rozdělování aminokyselin vzorku je rozdělovací chromatografie [31].

Pro analýzu aminokyselin papírovou chromatografií se používá papír Whatman, na který se vyznačí 3 cm od okraje rovnoběžná čára s kratší stranou papíru. Na tuto čáru se vyznačí značky se zkratkami použitých aminokyselin a následně je na značky nanese každý roztok aminokyseliny, a to vždy novou kapilárou. Roztok je nanášen ve formě skvrn o průměru asi 5 mm. Chromatogram je zavěšen do chromatografické skříně a lehce ponořen do rozpouštědlové směsi. Ukončení vyvíjení je při dosáhnutí mobilní fáze asi 2 cm od okraje papíru. Na chromatogramu je označeno čelo rozpouštědla, potom je vysušen a detekován roztokem ninhydrinu v alkoholu. Zbarvení se projeví při zahřátí v sušárně na 90 °C po dobu 10 minut. Fialové skvrny ukazují na ostatní aminokyseliny, pouze prolin a hydroxyprolin se projeví žlutými skvrnami. Pro každou skvrnu je vyhodnocen R_F , ten je porovnán se standardy a nakonec jsou určeny aminokyseliny ve vzorku [31, 43].

2.4.2 Plynová chromatografie

Principem plynové separace je separace plynů nebo látek v plynném stavu. Mobilní fází je inertní plyn (dusík, helium). Stacionární fáze může být pevná nebo kapalná látka zakotvená na pevném nosiči [46].

Aminokyseliny nelze chromatografovat přímo, protože jsou silně polární a tím i málo těkavé [38]. Proto se nejdříve převádí na vhodný derivát, který je dostatečně těkavý, stabilní a neinteraguje s nosičem. Produkce několika různých esterů aminokyselin byla použita pro profilování a kvantifikaci aminokyselin v potravinářských produktech pomocí GC. Kromě hydrolýzy potravinových proteinů je obvykle nutné před derivatizací (esterifikace) aminokyselin pro analýzu GC vyžadovat poměrně podrobné a časově náročné vyčištění včetně kationtově výměnné chromatografie [47].

Autor Hušek použil ethylchlorformiát s pyridinovým katalyzátorem pro rychlou derivatizaci 17 aminokyselin na jejich N(O,S)-ethoxykarbonylethylestery. S výjimkou argininu byly deriváty aminokyselin odděleny za pouhých 6 minut pomocí GC s plamenovým ionizačním detektorem (GC-FID) [47].

2.4.3 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC) s reverzní fází používá předkolonové derivatizace po hydrolýze pro analýzu aminokyselin. Tyto metody jsou jednodušší, rychlejší, disponují větší citlivostí a jsou použity levnější systémy LC, které pracují při vyšších tlacích ve srovnání s některými analyzátory aminokyselin na bázi iontové výměny [48].

Byly vyvinuty různé analytické metody pro stanovení aminokyselin v potravinách. Avšak nejvíce rozšířenou technikou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). HPLC metody často potřebují post- nebo předkolonovou derivatizaci za účelem zvýšení citlivosti fotometrické detekce nebo chromatografického dělení. Stanovení aminokyselin bylo provedeno pomocí iontoměničové chromatografie s následnou postkolonovou derivatizací s ninhydrinem a UV detektory. Předkolonová derivatizační činidla mají specifické nevýhody a to nízkou citlivost, dlouhou dobu derivatizace, nízkou stabilitu, reakční omezení nebo sekundární aminové skupiny a zásahy do stanovení aminokyselin [48, 49].

2.4.3.1 Iontově výměnná chromatografie

Hlavní podstatou IEC je separace iontů. Stacionární fází v IEC je měnič iontů. Částice tvoří pevnou stacionární fází, které mají na povrchu ionizované funkční skupiny kyselé nebo

zásadité povahy, například SO_3^- , COO^- , NH_3^+ , které elektrostaticky interagují s ionty obsaženými v mobilní fázi a s ionty separovaného vzorku. Separace je založena na iontové výměně mezi ionty mobilní fáze vázanými na ionizované funkční skupiny a stacionární fáze tzv. protiionty a ionty vzorku [5, 40].

Mobilní fází je zředěný roztok kyseliny nebo zásady nebo roztok pufru. Eluční sílu mobilní fáze určují hodnoty iontové síly a pH. Eluce se děje řadou pufrů o rostoucí hodnotě pH (3,3 – 10,5) [50].

Iontoměniče se dělí na:

- **Katexy** – jsou stacionární fází používané pro analýzu kationtů a obsahují sulfonové skupiny $-\text{SO}_3^- \text{H}^+$ (silné katexy) nebo karboxylové skupiny $-\text{COO}^- \text{H}^+$ (slabé katexy).
- **Anexy** – využívají se pro analýzu aniontů a na povrchu mají kvartérní amoniové báze $-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{OH}^-$ (silné anexy) nebo primární nebo sekundární amoniové ionty (slabé anexy) [5, 46].

Iontově výměnná chromatografie je tedy rozdělena na chromatografii s výměnou kationtů, ve které se kladně nabitě ionty vážou negativně na nabitou pryskyřici a na chromatografii s výměnou aniontů, kdy jsou vazebné ionty negativní a imobilizovaná funkční skupina je pozitivní. Jakmile jsou rozpuštěné látky vázány, kolona se promyje, aby se dosáhlo rovnovážného stavu ve výchozím pufru, který by měl mít nízkou iontovou sílu. Navázané molekuly se eluují za použití druhého pufru, který naopak stabilně zvyšuje iontovou sílu elučního roztoku [51].

Ionexová pryskyřice je na bázi derivátů polystyrenu a polyakrylamidu. Snadno ji lze připravit v požadovaném tvaru, velikosti, porositě a chemickém složení. K výhodám pryskyřice patří, že je možné je připravit s různými funkčními skupinami a jsou použitelné v širokém rozsahu pH a do 100 °C [52]

Chromatografie iontoměničů s detekcí ninhydrinem po koloně je jednou z nejvíce využívaných metod používaných pro kvantitativní analýzu aminokyselin. Separace aminokyselin na iontoměničové koloně se uskutečňuje kombinací změn pH a iontové (kationtové) pevnosti. Ke zvýšení oddělitelnosti se používá teplotní gradient. Účinnější je kationtová výměnná chromatografie (CEC) za přítomnosti pufrovacího systému a postkolonové derivatizace s ninhydrinem. Detekce je prováděna UV absorbcí. Takto se dosáhne separace aminokyselin podle barvy. Aminokyseliny, které obsahují primární aminy kromě iminoky-

selin poskytují fialovou barvu a vykazují absorpci při 570 nm. Iminokyseliny, kterými je prolin a hydroxyprolin vykazují žlutou barvu při maximální absorpci 440 nm. Pro zrychlení reakce se využívá teploty mezi 125 – 135 °C [13, 47].

Automatický analyzátor aminokyselin je speciální kompaktní kapalinový chromatograf pro analýzu aminokyselin a biogenních aminů na ionexové koloně s postkolonovou derivatizací ninhydrinem. Automatický analyzátor aminokyselin pracuje současně s použitím dvou kolon. Větší kolona se využívá na oddělení kyselých a neutrálních aminokyselin eluovaných 0,2 mol.l⁻¹ citronanem sodným nejprve při pH 3,25 (kyselé aminokyseliny) a následně při pH 4,24 (neutrální aminokyseliny). Menší kolona slouží k oddělení bazických aminokyselin, eluuje se 0,35 mol.l⁻¹ citronanem sodným při pH 5,28 [20, 53].

Moore a Stein vyvinuli automatizovaný systém pro analýzu aminokyselin založený na klasické IEC. Konstantní objemy proti mírnému protitlaku jsou dodávány dvěma čerpadly. Jedno čerpadlo vytlačí pufrované eluenty přes katexovou kolonu a druhé čerpadlo přidává ninhydrin k toku oddělených aminokyselin vystupující z kolony. Ninhydrin působí jako postkolonové derivatizační činidlo, které dekarboxyluje a deaminuje aminokyseliny [47].

Dalším činidlem, které je používáno jako postkolonové je činidlo fluoreskamin. Fluoreskamin reaguje při alkalickém pH a teplotě místnosti s primárními aminy za vzniku vysoce fluorescenčních derivátů. Obě tato činidla se přidávají kontinuálně do postkolonového odtoku aminokyselin oddělených kationtově výměnou chromatografií. Fluoreskamin vyžaduje dva oddělené roztoky a dvě čerpadla pro reakční pufr a činidlo [47].

Jako již bylo zmíněno u metody CE, jako další postkolonové činidlo je využíváno OPA, které rychle reaguje s aminokyselinami v přítomnosti thiolového redukčního činidla za vzniku isoindolů substituovaných thio-2-alkylem, které jsou vysoce fluoreskující. OPA kombinuje reakční draselný pufr nebo boritan sodný s pH 9 – 11. OPA slabě reaguje s cystinem, lyzinem a hydroxylyzinem. Glycin a deriváty lyzinu jsou uváděny jako nestabilní [47].

Postkolonová derivatizace je využívanější než předkolonová derivatizace s následnou LC separací s reverzními fázemi. Navzdory vysoké specifičnosti ninhydrinu, fluoreskaminu a OPA může být problematický amoniak, který se vyskytuje během chromatografické separace. Doba trvání přibližně 60 minut je delší, ovšem citlivost je nižší, zvláště při použití iontoměničové chromatografie a postkolonové derivatizace ve srovnání s LC a předkolonovou derivatizací [47].

3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ HYDROLÝZU PROTEINŮ

Uvolnit aminokyseliny z proteinů pomocí hydrolyzy je velmi složitý proces, jelikož při hydrolyze dochází u některých aminokyselin k destrukci. Nejvíce využívaná je kyselá hydrolyza, pomocí které je možné určit větší počet aminokyselin, kromě sirných aminokyselin (metionin a cystein) a tryptofanu. Uvolnění aminokyselin je ovlivněno určitými faktory, mezi které patří:

- reakční doba, po kterou jsou aminokyseliny vystaveny hydrolyze,
- teplota, při které jsou aminokyseliny hydrolyzovány,
- pH,
- koncentrace hydrolyzačního činidla,
- složky potravin, například sacharidy a tuky
- přísady, které jsou přidávány z důvodu kvalitativního stanovení [1, 3].

3.1 Hydrolyzační činidlo

Velmi využívaným hydrolyzačním činidlem je HCl, využívána koncentrace 6 mol.l^{-1} . Jeho předností je použití jak v kapalně tak plynné fázi. Po hydrolyze lze HCl odpařit. Stanovení tryptofanu tímto činidlem je prakticky nemožné, jelikož je zcela zničen. Obtížně stanovitelný je i cystein a tyrozin, který je citlivý na stopy nečistot v hydrolyzačním činidle. Serin a threonin jsou částečně hydrolyzovány se ztrátami asi 5 – 10 %. Ostatní aminokyseliny lze stanovit bez větších ztrát při hydrolyze [3, 12].

Výhoda dalšího hydrolyzačního činidla metansulfonové kyseliny (MSA) spočívá ve stanovení nestabilního tryptofanu a metionin sulfoxidu (oxidační produkt metioninu). Ostatní aminokyselinové zbytky lze stanovit. Možná nevýhoda tohoto hydrolyzačního činidla je, že není těkavý, takže nemůže být odpařen po hydrolyze. Pro chromatografickou analýzu je třeba jej zředit (obvykle čtyřikrát) a pH je upraveno na hodnotu okolo 2,3 [3].

Použitím 3 mol.l^{-1} *p*-toluensulfonové kyseliny byl stanoven metionin sulfoxid v proteinu a potravinách. Pomocí tohoto činidla byl metionin a metionin sulfon kvantitativně získán. Metionin sulfoxid byl částečně přeměněn na metionin [3].

K bazickým činidlům pro stanovení aminokyselin je řazen NaOH, KOH a méně využívaný Ba(OH)_2 . Hydrolyza pomocí těchto činidel se využívá především pro stanovení citlivého

tryptofanu, který je za bazických podmínek stabilní a při HCl je zničen. Hlavní nevýhodou této metody je nestanovení určitých aminokyselin, mezi které se řadí arginin, cystein, serin a threonin. U zbytku aminokyselin dochází k racemizaci [3].

Ve studii [54] byl prokázán jednoduchý a zároveň rychlý postup pro stanovení tryptofanu. Tryptofan byl stanovován ve směsi krmiva pro hospodářská zvířata. Hydrolýza zahrnovala stanovení dalších aminokyselin a to tyrozinu, fenylalaninu. Výzkum probíhal v roztoku NaOH při teplotě 100 °C po dobu 4 hodin. Bylo zjištěno, že aminokyseliny tyrozin a fenylalanin byly částečně zničeny během hydrolýzy. Výtěžnost tryptofanu byla velmi vysoká a to 98,6 – 100 %. I přesto, že byla hydrolýza snížena na 4 hodiny [54].

Enzymová hydrolýza pro štěpení aminokyselin z rybích proteinů využívá enzymy z rostlinných zdrojů, jako je papain nebo živočišného původu a to pepsin, chymotrypsin a trypsin. Vnitřnosti jesetera jsou bohaté na proteiny, které mohou být použity jako krmivo pro zvířata. Ve vnitřnostech jesetera bylo zjištěno, že fenylalanin je nejvíce limitující aminokyselinou, zatím co ostatní aminokyseliny (s výjimkou threoninu a histidinu) jsou přítomny v dostatečném množství [55].

3.2 Reakční doba

Účinek doby hydrolýzy pro stanovení aminokyselin v potravinách a krmivech je důležitým faktorem. Jelikož právě doba, po kterou je vzorek vystaven v kombinaci s teplotou, ovlivňuje stanovení aminokyselin. Některé aminokyseliny mohou být stanoveny za méně než 24 hodin. U jiných aminokyselin je nutné prodloužit průběh hydrolýzy i nad 120 hodin. Určité aminokyseliny, které jsou citlivé, nemusí být při hydrolýze stanoveny, jelikož jsou degradovány před dosažením stanovené doby hydrolýzy (serin, threonin, tyrozin) [6, 12].

Buňka a kol. [1] využívali pro stanovení aminokyselin kasein a modelové tavené sýry s různým obsahem tuku (30, 45 a 60 % w/w). Kasein a tavené sýry byly podrobeny době hydrolýzy 1 – 144 hodin s postupným odebráním vzorků po 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 48, 72, 96, 120 a 144 hodinách. Teplota byla stanovena na 110 °C. Ztráty při hydrolýze u všech stupňů tučnosti tavených sýrů byly vyšší než u kaseinu pro aminokyseliny alanin, valin, isoleucin, leucin a fenylalanin. Ztráty při hydrolýze u kaseinu byly vyšší pro glutamovou kyselinu, serin a prolin. Obsah tuku ve stanovovaných vzorcích neměl vliv na ztráty aminokyselin. V závislosti na době hydrolýzy bylo zjištěno, že aminokyseliny se nejvíce uvolňovaly v průměru od 10 – 20 hodin. Citlivé aminokyseliny jako je threonin, serin, tyrozin

byly degradovány za méně než 20 hodin hydrolýzy. Naopak aminokyseliny leucin a isoleucin měly zaznamenán růst i při hydrolýze, která trvala 144 hodin [1].

Ve studii [56] byly stanovovány aminokyseliny v šesti různých sójových výrobcích. Bylo zjištěno ovlivnění koncentrace aminokyselin dobou hydrolýzy. U všech vzorků bylo pozorováno od 0 – 6 hodin velký nárůst koncentrací aminokyselin. Hydrolýza od 6 – 72 hodin se u koncentrací aminokyselin projevila zvýšením, snížením a některá koncentrace byla relativně konstantní. Maximální koncentrace u valinu a isoleucinu byla zaznamenána u času vyšší než 24 hodin, pro všechny vzorky sóji, s výjimkou isoleucinu u jednoho vzorku. V průběhu času byla pozorována zvyšující se koncentrace aminokyselin (kyselina glutamová, glycin, histidin, alanin, arginin, prolin, leucin, fenylalanin a lyzin) u většiny vzorků. Koncentrace serinu byla maximalizována při nižší době hydrolýzy než 24 hodin. U kyseliny asparagové, threoninu a tyrozinu byl zaznamenán růst, následně zůstala koncentrace konstantní od 6 – 16 až do 24 hodin, a potom byly tyto aminokyseliny degradovány. Degradovány po 24 hodinách v jednom z analyzovaných vzorků byly také kyseliny glutamová, histidin, valin, isoleucin, leucin, fenylalanin a lyzin.

V porovnání s ostatními studiemi bylo prokázáno, že valin a isoleucin se uvolňují při kyselé hydrolýze pomalu. Naopak serin a threonin jsou neustále degradovány před dovršením 24 hodinové hydrolýzy [1, 12, 57].

3.3 Teplota

Obvykle je používána teplota při 110 – 120 °C pro většinu uskutečňovaných hydrolýz. Studie [58] se zabývala použitím vysokých teplot (> 110 °C) a zároveň propláchnutím hydrolyzačních lahvíček inertním plynem pro zkrácení doby hydrolýzy, především za účelem zjištění některých labilních aminokyselin a dalších stabilních aminokyselin, kterými jsou isoleucin, leucin a valin. Vyšší výtěžky při zvýšené teplotě a zkrácení času byly zaznamenány u serinu a threoninu. Výtěžky aminokyselin při zvýšené teplotě a kratší době spadají do konstantního rozmezí 98 – 102 % teoretických hodnot každé aminokyseliny s výjimkou valinu, isoleucinu, threoninu, serinu a tyrozinu. Výraznou vlastností hydrofobních aminokyselin jako je isoleucin a valin je, že dochází k jejich zpětné aktivaci z pouze 53 a 81 % při zahřívání na 160 °C po dobu 45 minut. U leucinu, prolinu a fenylalaninu bylo téměř 100%. Jelikož je isoleucin velmi odolný vůči kyselé hydrolýze, byla provedena studie časového průběhu při různých teplotách. Byl získán výtěžek 97 % při teplotě 160 °C po dobu 4 hodin. Obecně platí, že zvýšení teploty a zkrácení doby hydrolýzy poskytuje

výsledky podobné nebo lepší než v porovnání s využívanou teplotou 110 °C po dobu 24 hodin, zejména pokud jde o přesný odhad oxidovatelných a labilních aminokyselin (serin, threonin a tryptofan) a aminokyselin obsahujících síru (metionin a cystein) [58].

3.4 Další přísady

Jsou to tzv. ochranná činidla, která jsou přidávána do roztoku vzorku za účelem snížení ztrát různých aminokyselinových zbytků během hydrolýzy. Využívá se fenol, azid sodný, kyselina thioglykolová, merkaptoetanol, indol, tryptamin. Kyselina thioglykolová byla využita při stanovení tryptofanu [3, 59].

3.5 Faktor pH

Hodnota pH pufru je důležitá pro oddělení aminokyselinových zbytků. Snadno jsou oddělovány sodnými pufrovacími systémy. K dosažení uspokojivé separace jsou vhodné čtyři nebo pět sodných pufrů. Litný pufr je vhodný pro použití, pokud je třeba současně oddělit kyselinu asparagovou, asparagin, kyselinu glutamovou a glutamin. Litný systém je více citlivý na změny než systém sodíku. Někdy se do pufru přidává thiodiglykol, aby se zabránilo oxidaci metioninu. Kyselé pufrы mohou pohlcovat amoniak, proto je vhodné přidávat HCl do pufru co nejpozději [60].

Cystin je velmi citlivý na pH, teplotu a koncentraci iontů s protikladným nábojem pufru. Oddělení mezi threoninem a serinem je možné snížením teploty, zároveň je oddělována i kyselina glutamová. Optimální teplota pro separaci kyseliny asparagové, kyseliny glutamové, asparaginu, glutaminu, hydroxyprolinu, threoninu a serinu je 37 – 38 °C s pufrovacími systémy sodíku nebo litiem. Kyselina glutamová je obzvláště citlivá na malé změny teploty [60].

Pro stanovení aminokyselin v hydrolyzátu proteinu jsou využívány především pufrы citronanu sodného. Potřebnými chemikáliemi pro pufr citronanu sodného jsou: kyselina citrónová, dihydrát citrátu sodného, chlorid sodný, kyselina boritá, azid sodný, hydroxid sodný a thiodiglykol. Pro ředění vzorků a standardů na požadovanou koncentraci se využívá ředící pufr 0,2 mol.l⁻¹ sodíku o pH 2,2. Regeneračním roztokem je 0,2 mol.l⁻¹ hydroxid sodný. První pufr o pH 2,95 eluuje tyto aminokyseliny – kyseliny asparagová, kyselina glutamová, alanin, cystin, glycin, serin, threonin. Tento pufr je také vhodný pro stanovení kyseliny cysteové a metioninsulfonu [1, 60].

Druhý sodný pufr o pH 3,5 eluuje valin

Třetí sodný pufr o pH 4,25 eluuje aminokyseliny, kterými jsou metionin, leucin a isoleucin. Tyto aminokyseliny jsou velmi dobře od sebe oddělovány [60].

3.6 Stanovení aminokyselin v závislosti na čase

Stanovování obsahu aminokyselin v proteinu z potravin nejprve zahrnuje uvolnění aminokyselin z daného proteinu pomocí hydrolýz. Mezi obvykle využívané hydrolýzy se řadí kyselá hydrolýza, kdy je protein vystaven 6M HCl při 110 °C po dobu 24 hodin. Avšak, ne všechny aminokyseliny jsou stabilní za hydrolytických podmínek a peptidové vazby, které zahrnují hydrofobní zbytky, jsou obtížně štěpitelné mnohdy i za extrémních podmínek hydrolýzy [6, 57].

Využívaný čas hydrolýzy (24 hodin) je kompromisem, aby se minimalizovala degradace labilních aminokyselin při kyselé hydrolýze. Ovšem tento jediný interval hydrolýzy vede k nepřesným odhadům aminokyselinového složení proteinu vlivem účinku času hydrolýzy na štěpení peptidové vazby a samotné degradace aminokyselin [57].

Dosáhnout vyšší přesnosti analýzy při stanovování aminokyselinového složení potravin lze tím, že při hydrolýze je sledováno více hydrolyzačních časů. Ve studii [12] byla použita maximální koncentrace aminokyselin získaných z vícenásobných časů hydrolýzy pro výpočet aminokyselinového složení. Tento přístup je však omezen, jelikož labilní aminokyseliny vzhledem ke kyselinám mohou začít degradovat ještě před uvolněním všech aminokyselin, čímž jsou tyto aminokyseliny podhodnoceny. Alternativním přístupem je stanovování aminokyselinového složení proteinu za použití nelineární extrapolace nejmenších čtverců k nulové době dat o složení aminokyselin z řady intervalů hydrolýzy. Tímto může být předpovězen původní obsah aminokyselin v proteinu [12].

V modelu, který byl navržen, je řešena teorie analýzy oddělování se třemi rozdílnými stavy. Stav A představuje množství aminokyseliny v proteinu ve vázané formě. V okamžiku, kdy jsou aminokyseliny odštěpeny od proteinu, jsou přesunuty do stavu B, ve kterém je možná detekce aminokyselin. Aminokyseliny, které jsou převáděny na neidentifikovatelné sloučeniny nebo se degradují během kyselé hydrolýzy, přechází do stavu C, ve kterém již nejsou identifikovatelné. Množství aminokyselin, detekovaných ve stavu B v čase t , jsou stanoveny před začátkem hydrolýzy ($t = 0$). Tento přechod mezi aminokyselinami (stavy),

kdy se jedná o závislost obsahu volných aminokyselin na době hydrolýzy, lze popsat vztahem:

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

kde:

$B(t)$ vyjadřuje obsah volných aminokyselin (g.kg^{-1}) v čase t (h),

A_0 je obsah aminokyselin v proteinu před hydrolýzou (g.kg^{-1}),

h je poměr, ve kterém jsou vázané aminokyseliny hydrolyzovány do volné a měřitelné formy,

l je poměr, ve kterém jsou aminokyseliny degradovány,

ϵ je náhodná složka [14, 61].

Odhady veličin A_0 , h a l pro určitý protein mohou být odvozovány za použití nelineární regrese nejmenších čtverců, řady hodnot $B(t)$ naměřených při rozdílných dobách hydrolýzy s omezující podmínkou $A_0 > 0$, $h > 0$ a $l \geq 0$. Využívá se Marquardt-Levenburg metoda. K vytvoření regresní křivky jsou využívány různé hydrolyzační časy, například ve studii [1] byly využity časy 0, 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 48, 72, 96, 120 a 144 hodin. Regresní křivka je tvořena dvěma veličinami, a to pro hodnotu x – doba hydrolýzy, a pro hodnotu y – obsah aminokyselin ve vzorku v g.kg^{-1} . Správnost navržených modelů je hodnocena pomocí korelačního koeficientu (r) [14, 61].

Metoda je využívána ke stanovování aminokyselinového složení přečištěného proteinu, lidského mléka, sušeného odstředěného mléka nebo syrovátky, což poukazuje na vhodnost pro různé proteiny a směsi proteinů [57].

Variabilita v usnadnění štěpení peptidové vazby a stabilita v kyselém prostředí může významně ovlivnit konečný odhad složení aminokyselin v proteinu. Například aminokyseliny valin, isoleucin a leucin se obtížně hydrolyzují a získání maximálního výtěžku může vyžadovat pro některé proteiny podstatně delší dobu hydrolýzy, než 24 hodin. Údaje o složení těchto aminokyselin mohou být odvozené z několika intervalů hydrolýzy a následně extrapolovány do nekonečného času. Kompenzace degradace aminokyselin může být provedena odhadem extrapolací obsahu aminokyselin v čase nula za předpokladu kinetiky prvního řádu. Extrapolací na časovou nulu nebo použitím maximálního bodu na křivce časové hydrolýzy lze odvodit standardní korekční faktory pro úpravu následných 24 hodinových hyd-

rolýz. Existují dva aspekty před použitím lineárně odvozených korekčních faktorů. Odpověď bílkovin na dobu hydrolýzy je nelineární a liší se mezi typy bílkovin, potravin a jiných látek. Za další, procesy hydrolýzy (výtěžku) a degradace (rozpadu) aminokyselin probíhají současně. Proto žádný bod na křivce získaný měřením obsahu aminokyselin v různých intervalech hydrolýzy není skutečnou mírou výtěžku aminokyselin. Zejména tam, kde dochází k významným ztrátám aminokyselin, jsou extrapolace přímo z bodů na regresní křivce předurčeny k podcenění. Výtěžek labilních aminokyselin je ovlivněn kyselou hydrolýzou, tyto aminokyseliny jsou mnohdy degradovány ještě před začátkem měření [6, 14].

Podhodnocováním a nadhodnocováním obsahu aminokyselin se zabýval Rutherford a kol. [57] ve své studii. Interval hydrolýzy byl stanoven na 24 hodin a druhým sledovaným byly vzorky vystaveny vícenásobné době hydrolýzy (0 až 168 hodin).

Pro kojenecké kozí mléko určené do 6 měsíců věku byly podhodnocovány jediným 24 hodinovým intervalem tyto aminokyseliny: tryptofan, threonin, alanin, kyselina asparagová, serin.

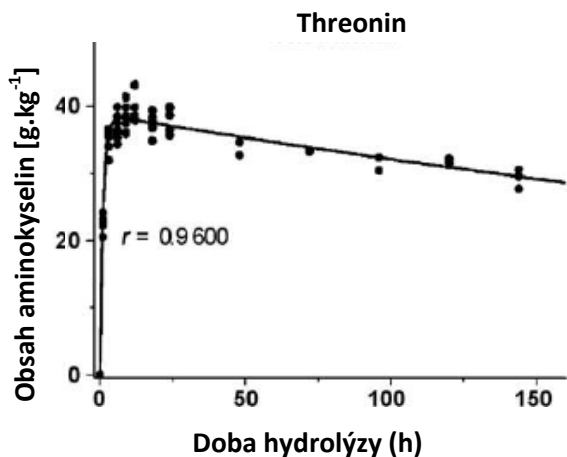
Pro kojenecké kozí mléko určené od 12 měsíců obohacené o minerály a vitaminy byly podhodnocovány tryptofan, tyrozin, threonin a kyselina asparagová.

Pro plnotučné kozí mléko pak tryptofan, prolin, kyselina asparagová a isoleucin.

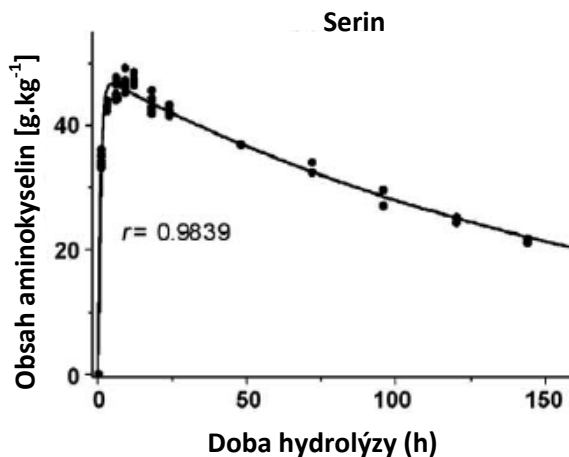
Naopak nadhodnocován byl například metionin, který byl po oxidaci kyselinou peroxidovou a následně kyselou hydrolýzou stanovován jako metioninsulfon, a to u všech vzorků kozího mléka. Nadhodnocen byl také cystein, po oxidaci kyselina cysteová, u kojeneckého kozího mléka pro děti do 6 měsíců [57].

Hydrolyzační časy jsou libovolné, ovšem vysoký nárůst koncentrace aminokyselin je zaznamenáván od 0 do 6 hodin. Po této době se koncentrace aminokyselin sníží, zvýší nebo zůstane relativně konstantní. Vysoký nárůst je zaznamenáván především u labilních aminokyselin, kterými je serin, threonin a tyrozin. Tyto aminokyseliny jsou zároveň většinou velmi rychle degradovány. Koncentrace aminokyselin je zvyšována i u glycinu, alaninu a kyseliny glutamové. Naopak mezi rezistentnější aminokyseliny vůči kyselé hydrolýze patří například isoleucin, lyzin, leucin, valin, tryptofan a oxidovaný metionin sulfon. U těchto aminokyselin je zaznamenáván velmi pomalý nárůst uvolňování z proteinu. Jedná se o dobu mezi 10 – 20 hodinou hydrolýzy. Následně po dobu hydrolýzy zůstávají relativně konstantní nebo se s časem hydrolýzy snižují, některé i zvyšují (například valin). Záleží

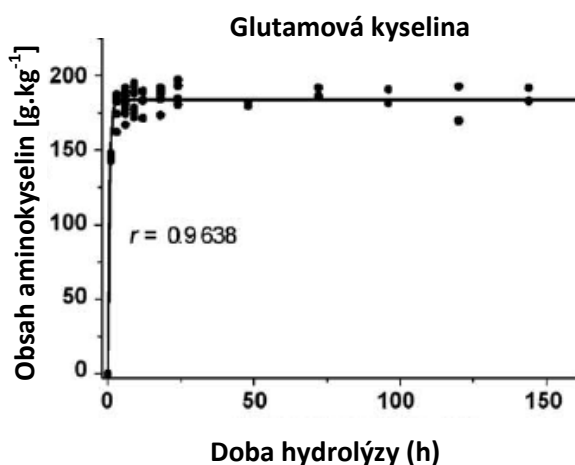
vždy na daném proteinu, ze kterého jsou aminokyseliny uvolňovány (viz. Obr. 4, 5, 6, 7, 8, 9) [1, 14, 56, 57].



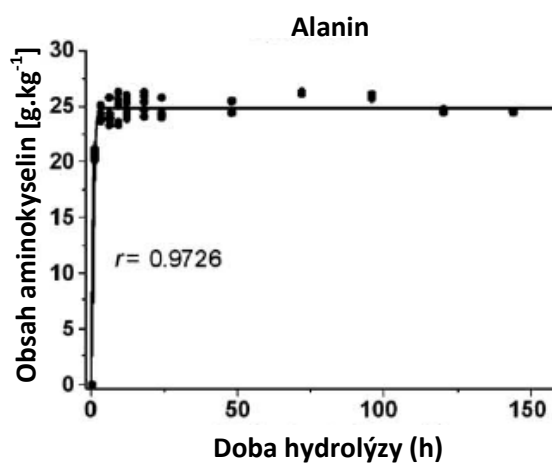
Obrázek 4 – Hydrolyzační křivka threoninu [1]



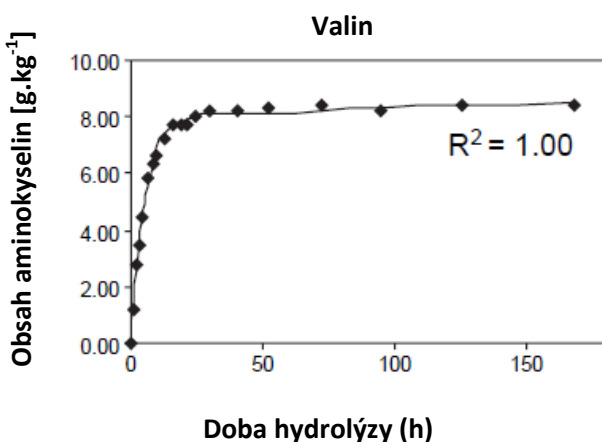
Obrázek 5 – Hydrolyzační křivka serinu [1]



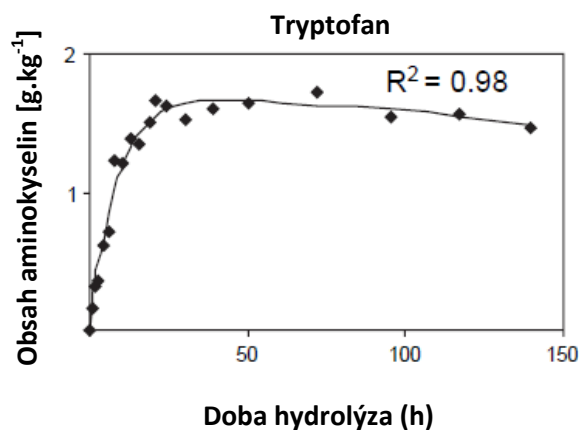
Obrázek 6 – Hydrolyzační křivka glutamové kyseliny [1]



Obrázek 7 – Hydrolyzační křivka alaninu [1]



Obrázek 8 – Hydrolyzační křivka valinu [57]



Obrázek 9 – Hydrolyzační křivka tryptofanu [57]

Ovlivnění hydrolýzy může být způsobeno dalšími složkami potravin, mezi které lze zařadit tuky a sacharidy. Zjištění ve studii [1] o obsahu aminokyselin před hydrolýzou u analyzovaných vzorků kravského kaseinu a tavených sýrů s 30 % w/w TVS, 45 % w/w TVS a 60 % w/w TVS bylo, že hodnoty klesají v závislosti na obsahu hrubých bílkovin. Obsah tuku v tavených sýrech má vliv na hydrolýzu. S rostoucím obsahem tuku se ve vzorcích zvyšovaly hodnoty ztrát pro serin, threonin, tyrozin, arginin, kyselinu asparagovou, kyselinu glutamovou, prolin, fenylalanin. Tavené sýry s 45 % w/w TVS a 60 % w/w TVS vykazovaly vyšší hodnoty ztrát ve vztahu ke vzorkům s 30 % w/w TVS tak i ke kravskému kaseinu. U dalších aminokyselin, kterými jsou glycin, alanin, valin, isoleucin, leucin a lizin nebyly hodnoty ztrát ovlivněny obsahem tuku ve vzorcích. Důvodem vyšších hodnot ztrát u vzorků s vyšším obsahem tuku mohou být reakce sekundárních produktů oxidace lipidů s proteiny, resp. s volnými aminokyselinami [1, 61].

Vliv sacharidů na hydrolýzu byl popsán ve studii [57], kde využili tři různá kozí mléka, a to kojenecké kozí mléko pro děti do 6 měsíců s obsahem sacharidů 56,8 %, kozí mléko obohacené o minerály a vitaminy pro děti od 12 měsíců s obsahem sacharidů 48,4 % a kozí plnotučné mléko s obsahem 35,5 % sacharidů. Nebylo prokázáno, že by sacharidy ve vzorcích měly zásadní vliv na ztráty aminokyselin během hydrolýzy. I přesto byla největší ztráta u všech vzorků opět zaznamenána u serinu, následně threoninu, tryptofanu, cysteinu (který byl po oxidaci kyselinou peroxidovou a následně kyselou hydrolýzou stanoven jako kyselina cysteová) a následně u kyseliny asparagové. Intervaly hydrolýzy byly stanoveny od 2 do 168 hodin [57].

ZÁVĚR

Stanovení aminokyselin v potravinách je důležité z hlediska nutričního. Hydrolýza je zásadním krokem pro uvolnění aminokyselin z proteinu. Jsou popsány tři typy hydrolýzy a to kyselá, alkalická a enzymatická. Pomocí kyselé hydrolýzy jsou stanovovány téměř všechny známé aminokyseliny. Pro stanovení tryptofanu je nejvhodnější alkalická hydrolýza, která jej určí pomocí hydroxidu sodného, případně hydroxidu barnatého a méně hydroxidu lithného. Dále je alkalická hydrolýza vhodná i pro stanovení vzorku, který obsahuje vyšší množství sacharidů.

Po hydrolýze jsou aminokyseliny analyzovány a kvantifikovány pomocí separačních metod. Mezi separačními metodami je hojně využívána i kapalinová chromatografie. Aminokyseliny jsou nejvíce stanovovány pomocí iontoměničové chromatografie, která využívá postkolonové derivatizace, oproti HPLC, která využívá předkolonovou derivatizaci. V poslední době se začíná hojně využívat na stanovení aminokyselin kapilární elektroforéza.

K základním znakům úspěšné hydrolýzy patří stanovovaná aminokyselina. Dalším důležitým faktorem je hydrolyzační činidlo, které ovlivňuje stanovení aminokyselin. Je využíváno více činidel, například kyselina chlorovodíková, metansulfonová kyselina, pro stanovení tryptofanu hydroxid sodný a hydroxid draselný.

Důležitým faktorem, který ovlivňuje hydrolýzu, je reakční doba v kombinaci s teplotou, po kterou je stanovována. Při nižších teplotách se aminokyseliny uvolňují pomaleji, zatímco se stoupající teplotou se aminokyseliny uvolňují rychleji. Příkladem je valin a isoleucin, které se běžně uvolňují až 140 hodin, ale se zvyšující se teplotou mohou být tyto aminokyseliny uvolněny rychleji. Dalšími faktory, které ovlivňují hydrolýzu, jsou i složky potravin, mezi které řadíme obsah tuku a sacharidů. Hydrolýzu je možné ovlivnit přísadami, které zabezpečují stanovení cysteinu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BUŇKA, F., KRÍŽ, O., VELIČKOVÁ, A., BUŇKOVÁ, L., KRÁČMAR, S. Effect of acid hydrolysis time on amino acid determination in casein and processed cheeses with different fat content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2009, 22, 224-232.
- [2] HOZA, I., SUMCZYNSKI, D., LAZÁRKOVÁ, Z., BUDÍNSKÝ, P. *Potravinářská biochemie I*. 2.vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2011, 167s. ISBN 978-80-7318-936-5
- [3] FOUNTOULAKIS, M., LAHM, H-W. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins – Review. *Journal of Chromatography A*, 1998, 826, 109-134.
- [4] WEISS, M., MANNEBERG, M., JURANVILLE, J. F., LAHM, H. W., FOUNTOULAKIS, M. Effect of the hydrolysis method on the determination of the amino acid composition of proteins. *Journal of Chromatography A*, 1998, 795, 263-275.
- [5] ZÁRUBA, K. a kol. *Analytická chemie I. díl*. 1.vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2016, 224s. ISBN 978-80-7080-950-1
- [6] DARRAGH, A. J., MOUGHAN, P. J. The effect of hydrolysis time on amino acid analysis. *Journal of AOAC International*, 2005, 88, 888-893.
- [7] VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [8] MURRAY, R. K. a kol. *Harper's Illustrated Biochemistry*. 26th edition. USA: McGraw-Hill Companies, 2003. ISBN 0-07-138901-6.
- [9] VOET, D., VOET, J. G. *Biochemistry*. 4th edition. Hoboken: John Wiley, 2011. ISBN 9780470917459.
- [10] VELÍŠEK, J., CEJPEK, K. *Biosynthesis of Food Components*. 1.vyd. Tábor: OSSIS, 2008, 512s. ISBN 978-80-86659-12-1.
- [11] DeMAN, J. M. *Principles of Food Chemistry*. 3rd edition. New York: Springer US, 1999, 489s. ISBN 978-1-4616-6390-0.
- [12] ROWAN, A. M., MOUGHAN, P. J., WILSON, M. N. Effect of hydrolysis time on the determination of the amino acid composition of diet, ileal digesta, and feces

- samples and on the determination of dietary amino acid digestibility coefficients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, 40, 981-985.
- [13] NEDA, I., VLAZAN, P., POP, R.O., SFARLOAGA, P., GROZESCU, I., SEGNEANU, A. E. *Peptide and Amino Acids Separation and Identification from Natural Products*. Analytical Chemistry. 1st Edition. USA:InTech, 2012. ISBN 978-953-51-0837-5
- [14] DARRAGH, A. J., GARRICK, D. J., MOUGHAN, P. J., HENDRIKS, W. H. Correction for amino acid loss during acid hydrolysis of a purified protein. *Analytical Biochemistry*, 1996, 236, 199-207.
- [15] ARISTOY, M.,C., TOLDRÁ, F. *Amino acid*. Handbook of Food Analysis. 2nd edition. New York: Marcel Dekker, 2004. ISBN 0-8247-5039-X.
- [16] ARISTOY, M.,C., TOLDRÁ, F. *Essential Amino Acids*. Handbook of Processed Meats and Poultry Analysis. USA: CRC Press, 2009. ISBN 978-1-4200-4531-4
- [17] D'ANIELLO, A., PETRUCCELLI, L., GARDNER, C., FISHER, G. Improved method for hydrolyzing proteins and peptides without inducing racemization and for determining their true D-amino acid content. *Analytical Biochemistry*. 1993, 213, 290-295.
- [18] Analytická chemie [online]. [cit. 2017-05-02]. Dostupné z: <http://www.ft.utb.cz/czech/utzpch/studmat/ach/skript.pdf>
- [19] WROLSTAD, R. E. a kol. *Handbook of analytical chemistry*. New Jersey: Wiley-Interscience, 2005. ISBN 0-471-72187-5.
- [20] KOLAKOWSKI, E. *Analysis of proteins, peptides, and amino acids in foods*. Methods of Analysis of Food Components and Additives, Second Edition. CRC Press, 2011. ISBN 978-1-4398-1553-3.
- [21] MARCZENKO, Z. BALCERZAK, M. *Separation, Preconcentration and Spectrophotometry in Inorganic Analysis*. 1st. edition. Netherlands: Elsevier, 2000. ISBN 0-444-50524-5.
- [22] TURGEON, M. L. *Clinical laboratory science: Concepts, procedures, and clinical applications*. 7th edition. St. Louis: Elsevier Mosby, 2016. ISBN 978-0-323-22545-8.

- [23] Spectrophotometry [online]. [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: https://chem.libretexts.org/Core/Physical_and_Theoretical_Chemistry/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_Determination_of_Kinetics/Spectrophotometry
- [24] MURRAY, R. K. a kol. *Harperova biochemie*. 4 vyd. Jinočany: H+H, 2002. ISBN 80-7319-013-3.
- [25] WALLACE, J. M., FOX, P. F. Rapid spectrophotometric and fluorimetric methods for monitoring nitrogenous (proteinaceous) compounds in cheese and cheese fractions – Review. *Food Chemistry*, 1998, 62, 217-224.
- [26] JUŘÍKOVÁ, J., SEVEROVÁ, M. *Návody pro laboratorní cvičení z potravinářské biochemie*. 1.vyd. Vyškov: Vysoká vojenská škola pozemního vojska Vyškov, 1999, 40s. ISBN 80-7231-048-8.
- [27] FRIEDMAN, M. Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences – Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, 385-406.
- [28] McSWEENEY, P. L. H., FOX, P. F. Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening – Review. *Lait*, 1997, 77, 41-76.
- [29] CAYOT, P., TAINURIER, G. The quantification of protein amino groups by the trinitrobenzenesulfonic acid method: A Reexamination. *Analytical Biochemistry*, 1997, 249, 184-200.
- [30] Elektromigrační metody [online]. [cit. 2017-04-26]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/podzim2012/C5060/um/elfometody_podzim2012_pdf.pdf?lang=cs
- [31] KRÁLOVÁ, B., KÁŠ, J., RAUCH, P. *Laboratoř z biochemie*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1983, 202s.
- [32] TŮMA, P., SAMCOVÁ, E. Stanovení volných aminokyselin v biologických tekutinách kapilární elektroforézou. *Chemické listy*, 2007, 101, 200-207.
- [33] PLAČEK, L. Nezapomeňte na kapilární elektroforézu. *Chemagazín*, sv. 2, p. 11, 2011.
- [34] SOGA, T., HEIGER, D. N. Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2000, 72, 1236-1241.

- [35] RAMIRÉZ, S. C. a kol. Analysis of beer components by capillary electrophoretic method. *Trends in Analytical Chemistry*, 2003, 22, 440-455.
- [36] KANG, X., XIAO, J., HUANG, X., GU, Z. Optimization of dansyl derivatization and chromatographic conditions in the determination of neuroactive amino acids of biological samples. *Clinica Chimica Acta*, 2006, 366, 352-356.
- [37] LORENZO, M. P., NAVARRETE, A., BALDERAS, C., GARCIA, A. Optimization and validation of a CE-LIF method for amino acid determination in biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013, 73, 116-124.
- [38] OMAR, M. M. A., ELBASHIR, A. A., SCHMITZ, O. Capillary electrophoresis method with UV-detection for analysis of free amino acids concentrations in food. *Food Chemistry*, 2017, 214, 300-307.
- [39] LATORRE, R. M., SAURINA, J., HERNÁNDEZ-CASSOU, S. Continuous flow derivatization system to capillary electrophoresis for the determination of amino acids. *Journal of Chromatography A*, 2002, 976, 55-64.
- [40] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. přeprac. vydání. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 8086369072.
- [41] Chromatografie [online]. [cit. 2017-04-28]. Dostupné z: http://ufmi.ft.utb.cz/texty/kzm/KZM_07.pdf
- [42] ŠVEC, F. Co dnes hýbe kapalinovou chromatografií? *Chemické listy*, 2009, 103, 266-270.
- [43] KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: VŠCHT Praha, 2006, 258s. ISBN 80-7880-586-2.
- [44] MOHAMMAD, A., MOHEMAN, A., EL-DESOKY, G. E. Amino acid and vitamin determinations by TLC/HPTLC – Review. *Central European Journal of Chemistry*, 2012, 10, 731-750.
- [45] Analytické metody [online]. [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: [http://vyuka-data.lf3.cuni.cz/CVSE1M0001/analyticke_metody_2013\(524d33bfa686b\).pdf](http://vyuka-data.lf3.cuni.cz/CVSE1M0001/analyticke_metody_2013(524d33bfa686b).pdf)
- [46] Analytická chemie II. [online]. [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: http://katedry.fmfi.vsb.cz/617/Analyticka_chemie_II.pdf

- [47] PEACE, R. W., GILANI, G. S. Chromatographic determination of amino acids in foods. *Journal of AOAC International*, 2005, 88, 877-887.
- [48] GÖKMEN, V., SERPEN, A., MOGOL, B. A. Rapid determination of amino acids in foods by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 403, 3915-2922.
- [49] HPLC [online]. [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
- [50] Stanovení aminokyselinového složení bílkovin [online]. [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: https://web.vscht.cz/~koplikr/%C4%8C%C3%A1stB2_2.pdf
- [51] Iontově výměnná chromatografie [online]. [cit. 2017-05-02]. Dostupné z: <http://www.proteinchemist.com/tutorial/iec.html>
- [52] Iontově výměnná chromatografie [online]. [cit. 2017-05-02]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/iec.pdf>
- [53] Automatický analyzátor aminokyselin [online]. [cit. 2017-05-02]. Dostupné z: http://www.pikron.com/manuals/aaa_um.pdf
- [54] YUST, M. M., PEDROCHE, J., GIRÓN-CALLE, J., VIOQUE, J., MILLÁN, F., ALAIZ, M. Determination of tryptophan by high-performance liquid chromatography of alkaline hydrolysates with spectrophotometric detection. *Food Chemistry*, 2004, 85, 317-320.
- [55] OVISSIPOUR, M. a kol. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, 2009, 115, 238-242.
- [56] 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48, 1684-1691.
- [57] RUTHERFURD, S. M., MOUGHAN, P. J., LOWRY, D., PROSSER, C. G. Amino acid composition determined using multiple hydrolysis times for three goat milk formulations. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2008, 59, 679-690

- [58] CHIOU, S-H. *The evaluation of the temperature effect and hydrolysis conditions for amino acid analysis*. *Biochemistry International*, 1988, 17, 981-987.
- [59] RAVINDRAN, G., BRYDEN, W. L. Tryptophan determination in proteins and feed-stuffs by ion Exchange chromatography. *Food Chemistry*, 2005, 89, 309-314.
- [60] CSAPÓ, J., ALBERT, CS., LÓKI, K., CSAPÓ-KISS, ZS. Separation and determination of the amino acids by ion exchange column chromatography applying postcolumn derivatization. *Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria*, 2008, 1, 5-29.
- [61] VELIČKOVÁ, Alena. *Vliv doby kyselé hydrolyzy na stanovení obsahu aminokyselin v analyzovaných vzorcích kaseinu a modelových tavených sýrech*. Zlín, 2008. Bachelářská práce (Bc.). Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav potravinářského inženýrství. 2008-6-18.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CE	Kapilární elektroforéza.
CEC	Kationtově výměnná chromatografie.
CZE	Kapilární zónová elektroforéza.
GC	Plynová chromatografie.
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie.
IEC	Iontově výměnná chromatografie.
LC	Kapalinová chromatografie.
NP	Naftalen dikarboxaldehyd.
OPA	o-ftalaldehyd.
PITC	Fenylisokyanát.
RV	Ružmanova violet.
TLC	Tenkvrstevná chromatografie.
TNBS	2,4,6-trinitrobenzensulfonová kyselina.
UV-VIS	Ultrafialovo-viditelná spektroskopie

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Obecný vzorec α -aminokyselin. R označuje postranní řetězec aminokyselin [9].....	10
Obrázek 2 – Mechanismus reakce α -aminokyselin a aminy s ninhydrinem hydrátem za vzniku Ruhemanovy violeti [27]	17
Obrázek 3 – Retardační faktor: poměr vzdálenosti [45].....	22
Obrázek 4 – Hydrolyzační křivka threoninu [1] Obrázek 5 – Hydrolyzační křivka serinu [1]	33
Obrázek 6 – Hydrolyzační křivka glutamové kyseliny [1] Obrázek 7 – Hydrolyzační křivka alaninu [1]	33
Obrázek 8 – Hydrolyzační křivka valinu [57] Obrázek 9 – Hydrolyzační křivka tryptofanu [57].....	33