

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

# 18764

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:  
**A23J 1/16** (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2008 - 19622**

(22) Přihlášeno: **25.01.2008**

(47) Zapsáno: **04.08.2008**

(73) Majitel:

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, České Budějovice,  
CZ  
LYCKEBY AMYLEX, a.s., Horažďovice, CZ

(72) Původce:

Bárta Jan Ing. Ph.D., Dubné, CZ  
Bártová Veronika Ing., Rudolfov, CZ  
Čurn Vladislav Doc. Ing. Ph.D., Dobrá Voda u Českých Budějovic, CZ  
Diviš Jiří Doc. Ing. CSc., České Budějovice, CZ  
Slavíková Eva Ing., Horažďovice, CZ  
Kotlářová Lenka Ing., Horažďovice, CZ

(74) Zástupce:

KUDRLIČKA a SEDLÁK, advokátní, patentová a známková kancelář, Ing. Jiří  
Sedlák, Husova 5, České Budějovice, 37001

(54) Název užitého vzoru:

**Koncentrát hlízových bílkovin brambor s vysokou mírou rozpustnosti**

**CZ 18764 U1**

## Koncentrát hlízových bílkovin brambor s vysokou mírou rozpustnosti

### Oblast techniky

Technické řešení se týká bílkovinného koncentrátu, který se připravuje z hlízové vody brambor, a ve kterém je zachována rozpustnost izolovaných bílkovin pro použití tohoto bílkovinného koncentrátu v potravinářském průmyslu a v biotechnologických aplikacích.

### Dosavadní stav techniky

Hlízové bílkoviny brambor zaujímají specifické postavení mezi rostlinnými bílkovinami pro svou vysokou nutriční hodnotu, složení aminokyselin, specifické biologické aktivity jednotlivých složek a v neposlední řadě i pro možnost využití jejich pěnivých a emulgačních vlastností. Hlízová bílkovina brambor je heterogenní, přičemž nejvýznamnější jsou dvě složky - patatin a inhibitory proteas. Zastoupení těchto dvou složek v bílkovinném koncentrátu se podílí na kvalitě a případném využití bílkovinného koncentrátu. Důležitou složkou jsou především patatinové bílkoviny s molekulovou hmotností 39 až 43 kDa, které představují hlavní zásobní bílkovinu hlíz brambor, mají vysokou nutriční hodnotu s optimálním zastoupením aminokyselin, vykazují řadu zajímavých enzymových aktivit a taktéž disponují emulgačními a pěnivými vlastnostmi s možností uplatnění v potravinářství a biotechnologiích. Inhibitory proteas představují skupinu hlízových bílkovin s velikostí 4,3 až 25 kDa. Jedná se o velmi heterogenní skupinu bílkovin, které se vyznačují inhibiční aktivitou vůči řadě proteas, s možností uplatnění v biotechnologiích.

Dosud známý způsob izolace hlízových bílkovin z hlízové vody brambor, která vzniká jako vedlejší produkt při zpracování brambor na škrob, využívá k izolaci injektací páry. Získaný usušený bílkovinný koncentrát je nabízen jako krmivo pro hospodářská i domácí zvířata. Základní problém širší využitelnosti takto vzniklého koncentrátu je téměř nulová rozpustnost izolovaných bílkovin. Denuraci hlízových bílkovin také dochází ke ztrátě vlastností, které jsou důležité pro následné využití bílkovinného koncentrátu. Kromě ztráty rozpustnosti se jedná především o ztrátu pěnivých a emulgačních vlastností, o ztrátu enzymové aktivity a ostatních zajímavých biologických vlastností.

Zpětně rozpustná složka tohoto koncentrátu je max 8 % hmotn. z množství bílkovin přítomných v sušině koncentrátu, a obsah balastních látek je vysoký, např. obsah glykoalkaloidů je vyšší než 1800 mg kg<sup>-1</sup> sušiny koncentrátu, obsah draslíku je 1,6 % hmotn. sušiny, obsah cukru je 1,1 % hmotn. sušiny. Z koncentrátu nelze dále izolovat jednotlivé bílkovinné komponenty, neboť nelze tyto komponenty převést do roztoku pro uplatnění separačních technik a navíc jejich aktivita by byla nulová či velmi nízká.

Úkolem technického řešení je vytvoření takového bílkovinného koncentrátu, který by zajistil maximální výtěžnost izolovaných bílkovin, jejich maximální rozpustnost a zachování specifických biologických vlastností tak, aby byl nutriční a biochemický potenciál hlízových bílkovin rozpuštěných v hlízové vodě plně využitelný při dalším zpracování.

### Podstata technického řešení

Tento úkol je vyřešen koncentrátem hlízových bílkovin brambor.

Koncentrát hlízových bílkovin brambor s vysokou mírou rozpustnosti je tvořený převážně albuminovou a globulinovou bílkovinnou frakcí, s obsahem bílkovin v sušině alespoň 70 % hmotn. Jeho podstata spočívá v tom, že obsahuje regulátor kyselosti v množství potřebném pro dosažení hodnoty pH v rozmezí od 6,8 do 7,5 u koncentrátu v rozpuštěném stavu, obsah glykoalkaloidů je nejvýše 1200 ppm v sušině koncentrátu, obsah draslíku je nejvýše 1,3 % hmotn. sušiny koncentrátu, obsah cukru je nejvýše 0,8 % hmotn. sušiny koncentrátu, bílkoviny patatinového komplexu tvoří 20 až 30 % hmotn. a inhibitory proteas tvoří 50 až 55 % hmotn. celkových bílkovin v koncentrátu, převážná část bílkovin v koncentrátu je v nativním stavu a vykazuje znaky biologické

aktivity a zpětně rozpustná složka koncentráту hlízových bílkovin tvoří alespoň 75 % hmotn. bílkovin přítomných v bílkovinném koncentráту.

Převažující část hlízových bílkovin (patatin a větší část inhibitorů proteas) má hodnotu izoelektrického bodu (pI) v oblasti kyselého pH. Při přípravě koncentráту podle technického řešení je nutné před vlastní reakcí se srážecím činidlem (etanolem) okyselit hlízovou vodu na hodnotu přibližně pH = 5,0, čímž je dosaženo izoelektrického bodu hlavní hlízové bílkoviny, patatinu, jehož nábojové izoformy mají hodnotu pI v rozsahu 4,5 až 5,2. Nejnižší míra rozpustnosti bílkovin je v prostředí s hodnotou pH odpovídající jejich izoelektrickému bodu. Tímto způsobem je prostředí hlízové vody připraveno pro následnou izolaci hlízových bílkovin s maximální výtěžností, vysrážením hlízových bílkovin z hlízové vody pomocí vychlazeného etanolu, za současného zachování jejich biologické aktivity.

Maximální rozpustnost dosahují hlízové bílkoviny brambor v prostředí pH, které je vyšší než jejich hodnota pI. Z tohoto důvodu je nutné před finální konzervací přidat k bílkovinnému koncentráту regulátor kyselosti. Regulátor kyselosti musí být schválen pro potravinářské využití, a jeho obsah je závislý na jeho druhu, jeho puřovací síle, a na konečné koncentraci vytvořeného roztoku (koncentrátu v rozpuštěném stavu). Regulátor kyselosti může tvořit např. fosfát nebo acetát sodný, ale s výhodou je jako regulátor kyselosti použit hydroxid sodný (NaOH). Působením tohoto aditiva dochází v průběhu rozpouštění koncentrátu ke zvýšení úrovně pH na hodnotu 7,0 a k vytvoření podmínek, ve kterých jsou nativní bílkoviny rozpustné.

Je výhodné, když obsah hydroxidu sodného v sušině koncentrátu je 2 % hmotn., za předpokladu, že je bílkovinný koncentrát rozpouštěn do úrovně maximálně 5 % hmotn./obj. roztoku, kde hmotnost sušiny bílkovinného koncentrátu je vztažena na objem rozpouštědla. V případě jiného ředění je nutné ekvivalentně změnit i zastoupení aditiva v sušině koncentrátu.

Ve výhodném provedení koncentrátu podle technického řešení vykazují patatinové bílkoviny zachovanou aktivitu lipid acyl hydrolasy (LAH), inhibitory proteas vykazují zachovanou schopnost inhibovat proteasy, s výhodou je specifická aktivita LAH koncentrátu alespoň dvakrát vyšší než specifická aktivita LAH hlízové vody brambor, a specifická aktivita inhibitorů proteas (inhibice trypsinu, substrát DL BAPA) je alespoň 1,2 krát vyšší než specifická aktivita inhibitorů proteas přítomných v hlízové vodě brambor.

V dalším výhodném provedení koncentrátu je obsah aminokyseliny lysinu větší než  $8,5 \text{ g} \cdot 16 \text{ g N}^{-1}$  (hodnota uvedena v gramech aminokyseliny vztažených na 16 g dusíku). Limitujícími aminokyselinami u tohoto bílkovinného koncentrátu jsou surné aminokyseliny methionin a cystein.

Obsah glykoalkaloidů v koncentrátu je snížen a dosahuje hodnoty maximálně  $1200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  sušiny. Tato hodnota je 1,6 krát nižší než obsah glykoalkaloidů v sušině hlízové vody a 1,5 krát nižší než u tepelného koagulátu. Zastoupení draslíku v sušině koncentrátu bylo výrazně sníženo a dosahovalo hodnoty do 1,3 % hmotn. sušiny; pro srovnání v sušině koncentrátu vzniklého tepelnou koagulací bylo zjištěno zastoupení 1,6 % hmotn., v sušině hlízové vody 12,1 % hmotn. Zastoupení cukru v sušině koncentrátu bylo zjištěno zastoupení 0,8 % hmotn., v sušině hlízové vody 12 % hmotn.

Vzhledem k vysoké rozpustnosti a zachování nativních vlastností bílkovinného koncentrátu je možné jednotlivé bílkovinné komponenty (patatinové bílkoviny či inhibitory proteas) z koncentrátu izolovat pro další využití těchto komponent pro specifické účely. Specifická LAH aktivita patatinu izolovaného z koncentrátu je 6,5 až 7 krát vyšší než při použití bílkovinného koncentrátu jako celku.

Výhody koncentrátu hlízových bílkovin brambor s vysokou mírou rozpustnosti podle technického řešení spočívají zejména v tom, že převážná část bílkovin v koncentrátu zůstává v nativním stavu a vykazuje znaky biologické aktivity, a zpětně rozpustná složka je velmi vysoká. Nutriční a biochemický potenciál hlízových bílkovin rozpuštěných v hlízové vodě brambor lze tak plně využít i při dalším zpracování. Koncentrát lze připravit jednoduchým precipitačním postupem, který je snadno realizovatelný i v podmínkách průmyslové výroby.

Příklady provedení technického řešení

Předpokládá se, že dále popsané příklady uskutečnění technického řešení jsou představovány pro ilustraci, nikoli jako omezení možných provedení technického řešení na uvedené příklady. Odborníci znalí stavu techniky, najdou nebo budou schopni zjistit za použití rutinního experimentování větší či menší počet ekvivalentů ke specifickým uskutečněním technického řešení, která jsou zde speciálně popsána. I tyto ekvivalenty budou zahrnuty do rozsahu nároků na ochranu.

Koncentrát hlízových bílkovin brambor se připraví následujícím způsobem:

Hlízová voda uvolněná z hlíz brambor po jejich desintegraci se odstředí (3600 rpm, 5 min., 4 °C) pro odstranění zbytkového škrobu, vlákniny a jiných případných nerozpustných částí. Dále je ekonomicky výhodné pokud se hlízová voda zakoncentruje pomocí reversní osmózy či jiné membránové techniky. Dle dosavadních zkušeností z laboratorních testů se jako optimální jeví maximálně trojnásobné zakoncentrování sušiny hlízové vody; vyšší míra zakoncentrování způsobuje přílišné navýšení množství nevysrážené bílkoviny a u vysrážené části dochází k navýšení nerozpustného podílu bílkovinného koncentráту.

Hlízová voda se dále zchladí na teplotu 4 až 8 °C a její pH je upraveno na hodnotu 5,0 přidáním 0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Za stálého míchání je k hlízové vodě přidán vychlazený etanol o teplotě 0 °C až 2 °C. Pro dosažení dostatečné výtěžnosti hlízové bílkoviny a její zpětné rozpustnosti se jako optimální jeví 25% (objem etanolu vztahený k objemu hlízové vody) nasycení hlízové vody etanolem.

Reakční směs se přenese po 30 ml do centrifugačních tub, ve kterých probíhá následné srážení hlízových bílkovin po dobu 30 až 75 minut za stálého chlazení (teplota reakční směsi nesmí překročit 10 °C). Po vysrážení hlízových bílkovin je směs odstředěna; supernatant reakčního roztoku se slije a usazený bílkovinný izolát je následně 2× promyt 30 ml 50 až 100 mM Na-acetátového roztoku o pH 5,0 s ekvivalentním podílem etanolu pro udržení vysráženého stavu hlízových bílkovin. Promývací krok je významný z hlediska snížení koncentrace glykoalkaloidů a ostatních balastních látek ve vysráženém koncentráту. Po ukončení promývání je k bílkovinnému peletu v centrifugační tubě přidáno 5 ml dH<sub>2</sub>O; bílkovinné roztoky jsou z centrifugačních tub slity a za stálého míchání je pomocí 1M roztoku NaOH upraveno pH bílkovinné směsi na hodnotu pH ležící v rozmezí od 6,8 do 7,5, s výhodou 7,0. Konzervace izolovaných hlízových bílkovin je zajištěna pomocí lyofilizace či šetrného sprejového sušení.

Zpětná rozpustnost koncentráту je testována roztřepáním vysušeného bílkovinného koncentráту ve 20 ml 100 mM fosfátového pufru, pH 7,0. Obsah bílkovinného dusíku v rozpustné části je stanoven odečtem bílkovinného dusíku v nerozpustné části od celkového bílkovinného dusíku původně přítomného v bílkovinném koncentráту.

Koncentrát hlízových bílkovin má práškovitou strukturu, zbarvení koncentráту je světle hnědé. Součástí koncentráту je aditivum s funkcí regulátoru kyselosti, kterým je hydroxid sodný v množství 2 % hmotn. v sušině koncentráту, za předpokladu, že po rozpuštění bude finální koncentrace hlízových bílkovin v roztoku 5 % (hmotnost sušiny bílkovinného koncentráту vztahená na objem rozpouštědla). Obsah bílkovin v sušině koncentráту je v rozsahu 75 až 83 % hmotn. Zpětně rozpustná složka koncentráту hlízových bílkovin dosahuje minimálně 75 % z množství bílkovin přítomných v sušině koncentráту. Specifická aktivita lipid acyl hydrolasy (LAH) v koncentráту je 0,0703  $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  (hodnota vyjadřuje množství substrátu, jenž je přeměněn na produkt za jednotku času, vztaheno k množství bílkovin přítomných v roztoku), zatímco aktivita LAH původní hlízové vody byla 0,0334  $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ . Specifická aktivita inhibitorů proteas (inhibice trypsinu, substrát DL BAPA) je 97,61  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  sušiny bílkovinného koncentráту.

Obsah aminokyseliny lysinu je v optimálním případě 9,41 g · 16 g N<sup>-1</sup> (tj. 9,41 g aminokyseliny lysinu vztaheno na 16 g dusíku), obsahy balastních látek jsou velmi nízké, např. obsah glykoalkaloidů v koncentráту dosahuje max. 1200 mg kg<sup>-1</sup> sušiny, obsah draslíku je nejvýše 1,3 % hmotn. sušiny, obsah cukru v sušině je max. 0,8 % hmotn.

Převážná část hlízových bílkovin tvořících koncentrát je v nativním stavu a zachovává znaky biologické aktivity, přičemž tyto bílkoviny vykazují vysokou míru zpětné rozpustnosti.

### Průmyslová využitelnost

Koncentrát hlízových bílkovin brambor podle technického řešení má dvě významné oblasti průmyslové využitelnosti. Bílkovinný koncentrát lze připravit z hlízové vody, která vzniká např. jako odpad v průběhu zpracování brambor na škrob. V takovém případě tento postup řeší transformaci problémového vedlejšího produktu na obchodovatelný výrobek, který obohacuje sortiment škrobárenského průmyslu. Zpracováním hlízové vody by zároveň škrobárenský průmysl řešil problém s výrobními odpady jež zatěžují ekonomiku podniku i životní prostředí. Bílkovinný koncentrát lze využít jako polotovar v potravinářském průmyslu, nebo jako meziprodukt pro následnou separaci zájmových bílkovin, především bílkovin patatinového komplexu a inhibitorů proteas, pro využití jejich vlastností v potravinářském průmyslu, farmaceutice a biotechnologiích. Vzhledem k pěním a emulgačním vlastnostem patatinových bílkovin lze koncentrát či separované patatinové bílkoviny uplatnit i při výrobě potravinářských pěn a emulzí.

15

## NÁROKY NA OCHRANU

1. Koncentrát hlízových bílkovin brambor s vysokou mírou rozpustnosti, tvořený převážně albuminovou a globulinovou bílkovinnou frakcí, s obsahem bílkovin v sušině alespoň 70 % hmotn., **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje regulátor kyselosti v množství potřebném pro dosažení hodnoty pH v rozmezí od 6,8 do 7,5 u koncentráту v rozpuštěném stavu, obsah glykoalkaloidů je nejvýše 1200 mg.kg<sup>-1</sup> sušiny, obsah draslíku v sušině je nejvýše 1,3 % hmotn., obsah cukru v sušině je nejvýše 0,8 % hmotn., bílkoviny patatinového komplexu tvoří 20 až 30 % hmotn. a inhibitory proteas tvoří 50 až 55 % hmotn. z celkových bílkovin v koncentráту, převážná část bílkovin v koncentráту je v nativním stavu a vykazuje znaky biologické aktivity, a zpětně rozpustná složka koncentráту hlízových bílkovin tvoří alespoň 75 % hmotn. z množství bílkovin přítomných v bílkovinném koncentráту.
2. Koncentrát podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že regulátor kyselosti je hydroxid sodný.
3. Koncentrát podle nároku 2, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsah hydroxidu sodného v sušině koncentráту je 2 % hmotn.
4. Koncentrát podle alespoň jednoho z nároků 1 až 3, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že patatinové bílkoviny vykazují zachovanou aktivitu lipid acyl hydrolasy (LAH), inhibitory proteas vykazují zachovanou schopnost inhibovat proteasy.
5. Koncentrát podle nároku 4, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že jeho specifická aktivita LAH je alespoň dvakrát vyšší než specifická aktivita LAH sušiny hlízové vody brambor.
6. Koncentrát podle nároku 4, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že specifická aktivita inhibitorů proteas je alespoň 1,2 krát vyšší než specifická aktivita inhibitorů proteas přítomných v hlízové vodě brambor.
7. Koncentrát podle alespoň jednoho z nároků 1 až 6, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsah aminokyseliny lysinu je větší než 8,5 g, vztaženo na 16 g dusíku.

40

---

Konec dokumentu

---