

Optimalizace chromatografického dělení proteinů z mouky

Miroslava Košťálová

Bakalářská práce
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Miroslava KOŠTÁLOVÁ**
Osobní číslo: **T09316**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie a řízení v gastronomii**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Optimalizace chromatografického dělení proteinů z mouky**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. **Mouky a jejich dělení**
2. **Pšeničné bílkoviny**
3. **Extrakce pšeničných bílkovin**
4. **Některé možnosti detekce proteinových frakcí**

II. Praktická část

1. **Použité materiály a chemikálie**
2. **Metody chromatografického dělení bílkovin**

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. PŘÍHODA, J., P. SKŘIVAN a M. HRUŠKOVÁ. Cereální chemie a technologie I: cereální chemie, mlýnská technologie, technologie výroby těstovin. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2003, 202 s. ISBN 80-708-0530-7.
2. KUČEROVÁ, J. Technologie cereálií. 1. vyd. Brno: MZLU, 2004. 141 s. ISBN 80-7157-811-8.
3. VELÍŠEK, J. Chemie potravin. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999, 328 s. ISBN 80-902-3912-9.
4. CHURÁČEK, J. et al. Analytická separace látek. 1. vyd. Praha: SNTL, 1990, 384 s. ISBN 80-030-0569-8.
5. POMERANZ, Y. Advances in Cereal Science and Technology. 8. vyd. St. Paul, Minesota: American Association of Cereal Chemists, Inc., 1986, 364 s.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Věra Halabalová, Ph.D.

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

11. února 2014

Termín odevzdání bakalářské práce:

16. května 2014

Ve Zlíně dne 11. února 2014


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.

děkan




Ing. Jiří Mlček, Ph.D.

ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 16. května 2014

Miroslava Košťálová

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 vzdělávacího zařízení (školní dílo).

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

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

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo 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 přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Bakalářská práce pojednává o významu, složení a zpracování mouky. Popisuje pšeničné bílkoviny, způsob jejich izolace a stanovení. Cílem praktické části je vyvinout vhodnou metodu, která by izolovala jednotlivé proteiny mouky za účelem jejich dalších výzkumů. Dělení proteinů mouky na jednotlivé frakce bylo prováděno kapalinovou chromatografií při různých podmínkách (extrakce, kolony, pH).

Klíčová slova: proteiny, pšeničná mouka, extrakce, kapalinová chromatografie, elektroforéza

ABSTRACT

Bachelor thesis deals with the importance, composition and processing of flour. It describes wheat proteins, processes for their isolation and determination. Aim of the practical part is to develop a suitable method that would isolate individual proteins of flour for the purpose of further research. Flour proteins division into fractions by liquid chromatography was done under various conditions (extraction, columns, pH).

Keywords: proteins, wheat flour, extraction, liquid chromatography, electrophoresis

Na tomto místě bych ráda poděkovala mé vedoucí práce Ing. Věře Halabalové, Ph.D. a konzultantovi RNDr. Marku Ingrovi, Ph.D. za odborné vedení, rady, připomínky a věnovaný čas, které mi poskytli při zpracování mé bakalářské práce.

Dále bych ráda poděkovala svým rodičům a příteli za finanční a rodinné zázemí a také všem mým blízkým, ať už rodinným členům či přátelům, za psychickou pomoc a podporu při mém studiu.

*„Vzdělání není pouhým nashromážděním jednotlivých vědomostí,
jako není těstem mouka, voda, sůl, kvasnice atd. dohromady naházené.“*

Tomáš Garrigue Masaryk

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 MOUKY A JEJICH DĚLENÍ	12
1.1 CHARAKTERISTIKA OBILOVIN	12
1.2 ANATOMICKÉ SLOŽENÍ OBILNÉHO ZRNA	13
1.2.1 Obalové vrstvy	13
1.2.2 Endosperm.....	14
1.2.3 Klíček	14
1.3 CHEMICKÉ SLOŽENÍ MOUKY	14
1.3.1 Minerální látky	15
1.3.2 Vitaminy.....	15
1.3.3 Lipidy	15
1.3.4 Bílkoviny.....	16
1.3.5 Sacharidy.....	16
1.4 TECHNOLOGIE A ZPŮSOBY ZPRACOVÁNÍ ZRNA NA MOUKU	17
1.4.1 Posklizňové úpravy	17
1.4.2 Příjem, předčištění a uskladnění.....	18
1.4.3 Příprava k mletí	18
1.4.4 Mletí	18
1.4.5 Příprava a skladování mouky	19
2 PŠENIČNÉ BÍLKOVINY	20
2.1 PROTOPLASMATICKÉ BÍLKOVINY	21
2.2 ZÁSOBNÍ BÍLKOVINY	21
3 EXTRAKCE PŠENIČNÝCH BÍLKOVIN	25
3.1 IZOLACE ALBUMINŮ A GLOBULINŮ	27
3.2 IZOLACE PROLAMINŮ.....	27
3.3 IZOLACE GLUTELINŮ.....	28
4 NĚKTERÉ MOŽNOSTI DETEKCE PROTEINOVÝCH FRAKČÍ PŠENICE	30
4.1 ELEKTROFORÉZA	30
4.2 ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY).....	32
4.3 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	32
4.4 CHROMATOGRAFICKÉ METODY	33
II PRAKTICKÁ ČÁST	38
5 POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE	39

5.1	VZORKY	39
5.2	CHEMIKÁLIE PRO ANALÝZU	39
5.3	ZAŘÍZENÍ.....	40
6	METODY CHROMATOGRAFICKÉHO DĚLENÍ BÍLKOVIN.....	41
6.1	EXTRAKCE BÍLKOVIN Z MOUKY	41
6.1.1	Příprava první řady vzorků.....	41
6.1.2	Příprava druhé řady vzorků	41
6.2	CHROMATOGRAFIE PROTEINŮ NA IONTOMĚNÍČÍCH	42
6.2.1	Chromatografie první řady vzorků	42
6.2.2	Chromatografie druhé řady vzorků	51
6.3	PROTEINOVÁ ELEKTROFORÉZA	57
6.3.1	Příprava vzorků	58
6.3.2	Příprava gelu na SDS-PAGE.....	59
6.3.3	Příprava gelu na tricínovou elektroforézu	60
6.3.4	Elektroforéza	60
6.3.5	Barvení gelu stříbrem	61
6.3.6	Barvení gelu Serva Blue G.....	61
6.3.7	Sušení, skenování gelů	61
7	VÝSLEDKY A DISKUSE	62
	ZÁVĚR	72
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	73
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	78
	SEZNAM OBRÁZKŮ	80
	SEZNAM TABULEK.....	81

ÚVOD

Ve výživě člověka jsou obiloviny nepostradatelné, protože jejich proteiny jsou pro nás hlavním zdrojem rostlinných bílkovin. V dnešní době bychom si jen stěží představili náš jídelníček bez pšenice či jiných obilovin. Proteinový komplex pšenice, ječmene, žita a ova nazýváme gluten. Gluten neboli lepek je obsažen i v potravinách, kde by je člověk jen stěží očekával, a to například ve zmrzlině, kečupu, v různých čokoládových tyčinkách, jogurtech a podobně. Gluten je však pro mnoho lidí na celém světě hrozbou. Tito lidé trpí celiakií neboli takzvanou nesnášenlivostí glutenu. Tímto onemocněním trpím také já, a to již od svého útlého dětství. Jedná se o chronické, tedy nevyléčitelné onemocnění, avšak při důsledném dodržování bezglutenové diety mohou vymizet veškeré příznaky nemoci. Díky tak velkému významu, je tedy důležité proteiny obilovin v potravinách kontrolovat, a proto je nezbytné neustále zdokonalovat metody, případně vymýšlet nové, jež by to umožnily.

Má bakalářská práce je rozdělena na teoretickou a praktickou část. Teoretická část je složena ze čtyř kapitol. V první s názvem Mouky a jejich dělení se zabývám základní charakterizací obilovin. Je zde popsáno jejich anatomické i chemické složení a zjednodušený způsob zpracování zrna na mouku. Druhá kapitola s názvem Pšeničné bílkoviny popisuje přesněji význam těchto bílkovin. Zabývá se jejich aminokyselinovým složením, funkcí a obsahem. Ve třetí kapitole s názvem Extrakce pšeničných bílkovin popisují dělicí metodu extrakce a zkoumám způsoby izolace pšeničných proteinů. Poslední kapitola teoretické části s názvem Některé možnosti detekce proteinových frakcí pšenice charakterizuje metody stanovení, respektive dělení pšeničných proteinů. Popisují zde elektroforézu, která patří mezi základní separační metodu zásobních proteinů pšenice, imunochemickou metodu ELISA, pomocí níž se kontrolují bezpečnost potraviny, hmotnostní spektrofotometrii, jež slouží jako kontrolní a srovnávací metoda a chromatografické metody. U chromatografických metod se zabývám kapalinovou chromatografií na iontoměničích, rozdělovací a gelově permeační.

V praktické části bakalářské práce se snažím najít vhodnou metodu, jež by izolovala proteinové frakce pšenice k využití při dalších pokusech. Používám k tomu dva způsoby extrakce pšeničných proteinů z mouky, při chromatografii na ionexech zkoumám chování těchto extraktů v odlišných podmínkách, především různé pH za použití anexových či katectových kolon. Po chromatografii je u odchycených frakcí použita metoda elektroforézy, a to buď tricínové nebo na SDS-PAGE.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MOUKY A JEJICH DĚLENÍ

Pro výživu člověka se z obilovin používá pouze zrno [1], které se zpracovává na mouky a krupice. Podle vyhlášky MZe ČR č. 333/1997 Sb. je mouka mlýnský obilný výrobek získaný mletím obilí a tříděný podle velikosti částic, obsahu minerálních látek a druhu použitého obilí [2]. Mletím a tříděním suroviny se postupně snažíme získat moučné jádro a oddělit od něj obalové vrstvy a klíček se štítkem [1].

Málo vymleté mouky, které se nazývají bílé, jsou energeticky příliš bohaté. Vysoce vymleté mouky, tmavé, jsou bohatší na obsah minerálních látek a vitamin B. Tmavé mouky jsou zdravější, ale mají horší pekárenské vlastnosti, jelikož hrubá buničina a pentosany často ničí strukturu lepku, který tvoří základ těsta [3].

V ČR mouky rozdělujeme z několika hledisek. Hlavním kritériem, podle kterého se také v minulosti mouky nazývaly, je obsah popela. Obsah popela vyjadřuje množství minerálních látek v mouce [4]. Dalším rozlišovacím kritériem je granulace mouky, neboli zrnitost [3,4]. Jedná se o velikost částic, přičemž hranice krupice a mouky je dána hodnotami mezi 100- 1200 μ m [3]. Dle toho můžeme mouky rozdělit na hladké, polohrubé a hrubé [4].

U pšeničné mouky je také důležitý obsah lepku. Mouky s vysokým obsahem lepku jsou označovány jako silné mouky, s nízkým obsahem lepku jako slabé [4].

1.1 Charakteristika obilovin

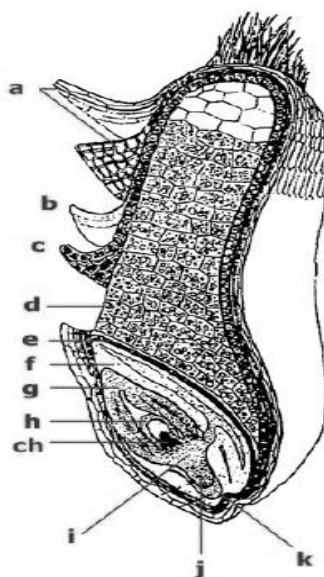
Obilniny jsou skupinou pěstovaných rostlin, zatímco obiloviny označují potravinářskou surovinu určenou ke konzumaci, společně se označují jako cereálie [5]. Obilniny řadíme mezi traviny (*Gramineae*). Většina obilnin patří do čeledi lipnicovité (*Poaceae*), proto také mají velmi podobnou anatomickou stavbu i chemické složení [1]. Hmotnostní podíl částí zrna i chemického složení se liší mezi jednotlivými druhy obilnin vlivem klimatických podmínek, druhem půdy, způsobem hnojení a podobně [2].

Mezi nejrozšířenější obilniny pěstované v České republice patří pšenice, žito, ječmen a oves. Ve světě má velký význam i rýže a kukuřice [6]. Podle statistik FAO OSN řadíme pšenici a rýži mezi obilniny s největším objemem produkce. Jelikož se rýže málokdy zpracovává na mouku, je pšenice hlavní obilovina s využitím pro pekařské účely [1].

Jako pseudocereálie se označuje skupina obilnin, která nepatří do čeledi lipnicovité, přesto mají velmi podobné hospodářské využití i chemické složení. Patří mezi ně například pohanka, amarant nebo merlík [6].

1.2 Anatomické složení obilného zrna

Obilné zrno je složeno z obalových vrstev, škrobnatého jádra neboli endospermu a klíčku (Obr. 1).



Obr. 1: Anatomická stavba obilného zrna [7]

Popis obr. 1: a – oplodí, b – osemení, c – vrstva aleuronových buněk, d – endosperm, e – vrstva palisádových buněk, f – štítek, g – koleoptile, pochva listu, h – základ 1. pravého listu, ch – vzrostný vrchol, i – mezokotyl, j – základ kořínku, k – kořenová pochva (koleorhiza) [7]

1.2.1 Obalové vrstvy

Obaly brání endosperm a klíček před vysycháním a škůdci. Zastávají 8 – 14 % hmotnosti zrna. Obalovou vrstvu tvoří oplodí a osemení. Oplodí je složeno z pokožky, buněk podélných, příčných a hadicových. Osemení tvoří barevnou a skelnou vrstvu [2]. Obalové vrstvy jsou složeny především z nestravitelných polysacharidů, ale obsahují také důležité minerální látky a vitaminy řady B [3].

1.2.2 Endosperm

Endosperm je největší částí obilného zrna, zaujímá 84 – 86 % jeho hmotnosti. Je oddělen od obalových vrstev aleuronovými buňkami. Endosperm neboli také škrobnaté jádro, jak název napovídá, je složen především ze škrobu, v některých případech až 80 % a bílkovin. Tvoří zásobárnu živin pro zárodek. Skládá se z velkých hranolovitých buněk [2,3].

1.2.3 Klíček

Klíček je zárodek budoucí rostliny, díky tomu je bohatý na živiny. Je složen z rozpustných cukrů, bílkovin, aminokyselin, tuků a vitaminů. Toto složení by nepříznivě ovlivnilo trvanlivost výrobku, proto je při mlýnském zpracování odstraňován [2,3].

1.3 Chemické složení mouky

Složení mouky závisí nejen na druhu obilí, ze kterého byla připravena, ale také na způsobu zpracování. V tab. 1 je uvedena závislost chemického složení pšeničné mouky v hmotnostních procentech na stupni vymletí pšenice [8].

Stupeň vymletí udává podíl mouky, který byl získán ze 100 dílů obilí. Vyjadřuje se v procentech. Čím nižší je stupeň vymletí, tím je nižší obsah okrajových vrstev obilného zrna v mouce a také je mouka jemnější. Např.: mouky neobsahující žádné nebo jen málo okrajových vrstev, mají stupeň vymletí od 40 do 75 % [7].

Tab. 1: Závislost chemického složení pšeničných mouk na vymletí (v hmot. %) [8].

Vymletí mouky [%]	40	73	80	94	Celé zrno pšenice
Popel	0,40	0,63	0,90	1,72	1,90
Tuk	1,14	1,55	1,90	2,25	2,30
Bílkoviny	10,10	11,23	12,10	12,50	14,10
Cukry	2,14	3,65	4,85	5,19	5,20
Škrob	82,53	78,65	75,38	68,70	66,20
Vláknina	0,10	0,20	0,28	1,70	2,50
Pentosany	2,59	3,15	3,95	7,25	7,90
Nestanovený podíl	1,00	0,93	0,64	0,94	

1.3.1 Minerální látky

Minerální látky neboli obsah popela mají při technologickém procesu velký význam, jelikož se dle jejich množství připravují mouky. Jak je vidět z tab. 1 obsah popela je přímo úměrný stupni vymletí. V pšeničné mouce se nejvíce vyskytuje draslík a fosfor. V menší míře obsahuje mouka také makroelementy jako jsou hořčík, vápník, sodík, železo, síra a hliník, a mikroelementy například mangan, bór, měď, zinek, bróm, jód a kobalt [8,9].

1.3.2 Vitaminy

Množství vitaminů závisí, jako u minerálních látek, na stupni vymletí. V tab. 1 ovšem nejsou uvedeny, jelikož jejich ztráty jsou podmíněny do značné míry také na sklizni, skladování obilí apod. Při mlýnském zpracování mohou být jejich ztráty až 70 %.

V zrně se nacházejí nepravidelně, nejvíce však v klíčku a v aleuronové vrstvě. Pšeničná mouka obsahuje hlavně vitaminy skupiny B. Nejdůležitějším zástupcem je thiamin (vitamin B₁), který je však nestabilní. Jeho ztráty jsou vysoké při mletí, termickém zpracování a dokonce i při skladování. Přesto jsou obiloviny považovány za hlavní zdroj tohoto vitamínu. Riboflavin (vitamin B₂) se v pšeničné mouce vyskytuje přibližně ve třetinovém množství. Je mnohem stabilnější a tak jsou ztráty menší. Dále se v mouce nachází také kyselina pantotenová (vitamin B₅), niacin (vitamin PP) a pyridoxin (vitamin B₆).

Z vitaminů rozpustných v tucích se v obilovinách vyskytují tokoferoly (vitamin E) pouze v klíčku. Vitamin D jen ve formě provitaminů (ergosterol) a také karotenotidy (provitaminy vitamínu A), které částečně určují zbarvení mouky. Tyto látky se také řadí k lipidům, jako tzv. doprovodné látky lipidů [8,9].

1.3.3 Lipidy

V obilovinách je, vzhledem k ostatním hlavním živinám, jen velmi málo tuků, ale mají vhodné složení mastných kyselin [6]. V mouce jsou pro nás důležité především triacylglyceroly a doprovodné látky lipidů (fosfolipidy, steroly, karotenoidy a tokoferoly).

Nejvyšší podíl mastných kyselin tvoří esenciální nenasycená kyselina linolová (48-57%), také se zde vyskytuje kyselina linolenová (do 5%) [8,9]. Tyto dvě mastné kyseliny podléhají velmi snadno oxidaci, což má za následek žluknutí tuků při delším skladování mouky [7]. Z nasycených mastných kyselin obsahují kyselinu olejovou (16-18%).

Fosfolipidy jsou obsaženy především v klíčku a aleuronové vrstvě. V obilovinách je nejvíce fosfatidylcholinu (lecitin), fosfatidylethanolaminu (kefalin) a fosfatidylových kyselin. Při jejich štěpení pomocí enzymu glycerofosfatáza se nepříznivě zvyšuje kyselost mouky [8,9].

1.3.4 Bílkoviny

Bílkoviny obilovin jsou neplnohodnotné, jejich limitující aminokyselinou, tj. aminokyselina určující výživou hodnotu stravy, je lysin [6,7]. Hlavní postavení má pšeničná bílkovina, která s vodou tvoří lepek, tj. pružný gel [8]. Tato bílkovina, obsahující alergenní gliadiny a nacházející se v pšenici, žitě, ječmeni a ovsu, způsobuje potravinovou nesnášenlivost tzv. celiakie [6]. Více viz kapitola 2 Pšeničné bílkoviny.

1.3.5 Sacharidy

V obilovinách se nachází monosacharidy, oligosacharidy i polysacharidy.

Monosacharidy se v obilovinách nachází pouze v malém množství. Mezi monosacharidy patří pentosy (arabiosa, xylulosa), které jsou základní stavební jednotkou vysokomolekulárních pentosanů, a hexosy (glukosa, fruktosa), jež se zde vyskytují hlavně jako základní stavební jednotka oligosacharidů a polysacharidů [7,8].

Oligosacharidy se v obilovinách nalézají také pouze v malých koncentracích. Jsou zde přítomny disacharidy sacharosa a maltosa a trisacharid rafinosa [7]. Maltosy se využívá ke stanovení maltosového čísla, tj. cukrotvorná schopnost mouky. Větší množství maltosy vzniká až v těstě účinkem amylytických enzymů, které štěpí škrob [8].

Mezi polysacharidy patří škrob, celulóza, hemicelulóza, lignin a pentosany.

Největší podíl hmotnostního zastoupení v obilovinách tvoří škrob. Vyskytuje se v parenchymatických buňkách endospermu. Jeho množství se snižuje s vyšším stupněm vymletí, viz tab.1. Skládá se z nerozvětveného řetězce amylosy (25%) a z rozvětveného amylopektinu (75%) [4,7,8]. Obě složky jsou tvořeny jednotkami glukosy. Amylosa je rozpustná ve vodě, přičemž amylopektin je ve vodě nerozpustný, po záhřevu vytváří viskózní roztoky, ze kterých ochlazením vzniká gel [10].

Škrob je z hlediska výroby chleba a pečiva velmi důležitý, jelikož po nabobtnání, zmazování a zcukření (enzymatický rozklad pomocí amylas) umožňuje činnost kvasin-

kám. Také se podílí na tvorbě střídky, neboť váže vodu uvolněnou denaturací bílkovin při pečení, a chlebové kůrce, protože se společně s aminosloučeninami účastní Maillardovy reakce [2,7,10].

V tab. 1 je uvedeno hmotnostní zastoupení vlákniny, ovšem pro upřesnění je nutno uvést, že se jedná pouze o hrubou vlákninu, která představuje nerozpustnou celulosu a lignin. Ve skutečnosti je z hlediska výživy pojem vláknina mnohem širší- zahrnuje také hemicelulosa a pentosany [11,12].

Celulosa a lignin jsou hlavní součástí obalů a buněčných stěn a při mlýnském zpracování z větší části přechází do otrub [7,8]. Hemicelulosa se skládají s pentos a hexos a nacházejí se v buněčných stěnách, kde zastávají funkci opěrného pletiva a zásobní látky [7,11]. Pentosany, jak název napovídá se skládají především z pentos. Rozdělují se na pentosany rozpustné (slizy) a nerozpustné (často se řadí k hemicelulosám) ve vodě. Nerozpustné doprovází celulosu v buněčných stěnách a mají vyšší stupeň větvení. Slizy jsou součástí buněčných stěn, buněčného obsahu, a také se zúčastňují metabolismu. Jsou schopny zvětšovat svůj objem až osmkrát, ovšem při vyšších teplotách vázanou vodu uvolňují. Obsah pentosanů je v žitné mouce vyšší než v pšeničné [7,8,9].

1.4 Technologie a způsoby zpracování zrna na mouku

Mlýnská technologie u nás zpracovává především chlebové obiloviny, tj. pšenici a žito [8]. Mohli bychom ji shrnout do následujících etap [7]:

- příjem, předčištění a uskladnění
- příprava k mletí
- mletí
- příprava a skladování mouky

1.4.1 Posklizňové úpravy

Zrna po sklizni dále dozrávají a při správném skladování se zvyšuje jejich kvalita. Při špatném skladování může dojít až k jejich znehodnocení, proto se musí provádět neustálá kontrola [7].

Mezi posklizňové úpravy řadíme čištění, třídění a sušení. Při čištění se obvykle využívají síta, kterými proudí vzduch. Lehčí nečistoty jsou odfukovány, těžší a menší propadávají síty dolů. Dále se využívají např. magnetické separátory, odkaménkovače apod. Při třídění dělíme obiloviny podle jejich kvality [3,7].

Vysušení zrn na skladovatelnou vlhkost se musí provádět co nejrychleji, jelikož vlhkost má vliv na klíčivost [3,7]. Nejčastěji je používáno sušení teplým vzduchem, dále je možno použít sušení vakuové, infračerveným zářením, mikrovlnné atd. [7].

1.4.2 Příjem, předčištění a uskladnění

Obilí dopravované do mlýna prochází vstupní kontrolou, která přezkoumává jeho množství a kvalitu. Po předčištění se skladuje v silových buňkách [7].

1.4.3 Příprava k mletí

Při zpracování se ze všeho nejdříve musí sestavit vhodná směs obilí na zámel [8]. Vhodné míchání zrn lepší kvality, tzv. zlepšovadla, se zrny normální a horší kvality je účinnější než míchání konečných mouk [7,8].

Sestavená směs obilí se musí vyčistit odstraněním příměsí a nečistot. Odkaménkovačem jsou odděleny částice s větší hmotností. Obilný aspiratér, tj. skříň se třemi síty a ventilátorem, odstraňuje především prach, písek, slámu, ale i větší částice než jsou zrna [7]. Pro vytřídění zrn o stejném rozměru příčného řezu (kulatá, dlouhá) se užívá souprava strojů zvaných triéry, tj. dutý válec, jenž má na straně kapsovitě důlky, kterými propadávají nestandardní zrna [7,8].

Zrno je dále potřeba zbavit povrchových dřevnatých vrstev slupky. Obilí je nakrápěno vodou, po odležení (2-3 hod.) míří do dvou loupacích a jednoho kartáčovacího stroje. Zde se oddělí oplodí, vousky a prach s rýhy, u žita také klíčky [7]. Následuje kondicionování, též označované jako hydrotermická úprava obilí, při které se zlepšují technologické vlastnosti. Připravené zrno má suchý endosperm a vlhkou slupku, která se lépe odděluje [8].

1.4.4 Mletí

Vlastní mletí je velmi složitý proces, který se skládá z několika mlecích pasáží, přičemž každá zahrnuje drcení a třídění. Drcení lze rozdělit na tři etapy: šrotování (otevření zrna, oddělení endospermu, získání hrubých částic), luštění krupic (drcení krupic obsahují-

cí část obalu tak, aby se dal snadno oddělit) a vymílání (drcení čistého endospermu) [3,7]. Hlavním drtícím zařízením jsou válcové stolice, které mají mlecí válce s hladkým nebo rýhovaným povrchem. Otáčejí se rozdílnou rychlostí, aby se obilí drtilo stříhem a nemačkalo se. Melivo z drtících strojů je tříděno pomocí rovinného vysévače, tj. ve své podstatě několik pohybujících se sít. Produkty postupují další mlecí pasáží, nebo jsou přidány do výsledných mlýnských výrobků [7,8].

V současnosti rozlišujeme [7,8]:

- mletí na krupice (na vysoko)- u pšenice, snažíme se získat maximum krupic
- mletí na mouky (na plocho)- u žita, snažíme se získat maximum mouky

1.4.5 Příprava a skladování mouky

Na každé mlecí pasáži je získáno určité množství mouky. Tyto mouky, označované jako pasážní, mají různé vlastnosti. Podle obsahu popela a granulace se spolu různě kombinují a vznikají hotové mouky [2,7,8].

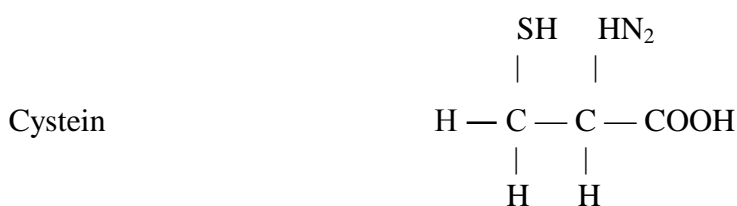
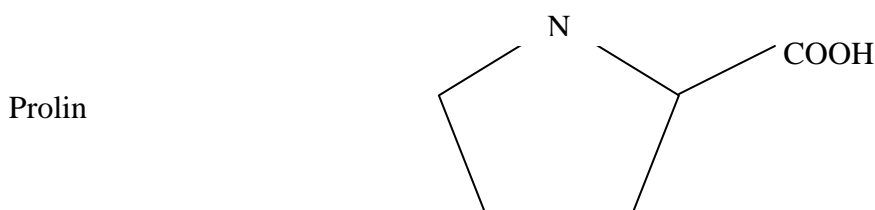
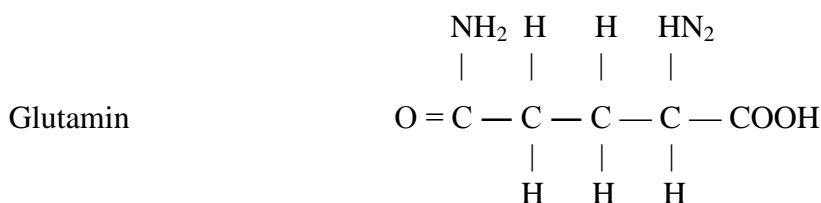
Čerstvě namletá mouka musí dozrát (2-6 týdnů), protože nemá plnou pekařskou hodnotu. Pro dozrání je nejvhodnější teplota do +18°C, přičemž dochází hlavně k vybělení a pozitivním změnám lepkového komplexu, snižuje se jeho tažnost a zvyšuje pružnost, díky oxidaci thiolových skupin a tvorbě disulfidických vazeb mezi sirnými aminokyselinami [2,7,8].

2 PŠENIČNÉ BÍLKOVINY

Bílkoviny jsou ve výživě člověka nepostradatelné, jakožto jeho základní stavební jednotka. Jejich doporučená denní potřeba je 0,8-1 gram na jeden kilogram váhy člověka, z toho by polovinu měly tvořit rostlinné bílkoviny [10]. Rostlinné bílkoviny se aminokyselinovým složením liší od živočišných, obsahují často mnoho kyseliny glutamové a asparagové a jejich amidů, u všech je nedostatková některá z esenciálních aminokyselin. Mezi hlavní zdroje bílkovin patří semena rostlin. V menší míře jsou dále obsaženy v plodech, listech, hlízách a bulvách ovoce a zeleniny [13,14].

Z hlediska lidské výživy jsou bílkoviny obilovin hlavním zdrojem rostlinných bílkovin [13]. Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.3.4, jsou bílkoviny obilovin neplnohodnotné (lysin), proto by se měly kombinovat s jinými např. bílkovinami luštěnin [6,10].

Stavební složkou bílkovin obilovin je dvacet základních aminokyselin. Nejvíce obsahují kyseliny glutamové, která je přítomna převážně ve formě jejího amidu- glutaminu, a prolinu. Dalšími velmi významnými aminokyselinami jsou cystein a methionin, které díky obsahu síry mohou vytvářet velmi pevné disulfidové vazby. Vzorce důležitých aminokyselin glutaminu, prolinu a cysteinu, jsou znázorněny pod následujícím odstavcem. Bílkoviny obilovin obsahují málo lysinu, threoninu a tryptofanu [7,15].



Osborne v roce 1907 publikoval frakcionaci pšeničných proteinů na základě jejich rozpustnosti v různých rozpouštědlech, čímž byly bílkoviny obilovin rozděleny do čtyř základních frakcí: albuminy (rozpuštěné ve vodě), globuliny (rozpuštěné v roztocích solí), prolamininy (rozpuštěné v 70% ethanolu) a gluteliny (z části rozpustné ve zředěných roztocích kyselin a zásad). Tyto bílkoviny se v různém zastoupení objevují u všech obilnin [15]. Dále můžeme bílkoviny dělit z hlediska funkčních vlastností do dvou skupin [7]:

- protoplasmatické bílkoviny- albumin a globulin
- zásobní bílkoviny- prolamin a glutelin

2.1 Protoplasmatické bílkoviny

Protoplasmatické bílkoviny se nalézají především v klíčku a aleuronové vrstvě. Představují bílkoviny enzymaticky aktivní a stavební [7]. Enzymy jsou bílkovinami, které fungují jako katalyzátory většiny biochemických reakcí. Je důležitější jejich aktivita než množství. V obilovinách jsou přítomny např. amylasy (enzymy hydrolyzující škrob), proteasy (hydrolyzující peptidické vazby bílkovin), lipasy (hydrolyzující lipidy) a lipoxygenasy (oxidačně-redukční enzymy oxidující nenasycené mastné kyseliny lipidů) [15].

Mezi protoplasmatické bílkoviny patří albumin a globulin. Pšeničný albumin se nazývá leukosin a v obilném zrně je v zastoupení 14,7 hmot. % celkového množství bílkovin. Pšeničný globulin je edestin a v obilném zrně zastává 7 % bílkovin. Obsah těchto bílkovin v pšeničné mouce není příliš závislý na vnějších podmínkách a činí asi 15 - 20 % ze všech bílkovin [7,13]. V žitném zrně se nachází těchto bílkovin mnohem více, konkrétně albuminu 44,4 % a globulinu 10,2 hmot. % z celkového množství bílkovin [7,13]. Z technologického hlediska nejsou tyto bílkoviny až tak důležité [15].

2.2 Zásobní bílkoviny

Zásobní bílkoviny se nacházejí v endospermu a určují technologickou, biologickou, krmnou a nutriční hodnotu zrna.

Mezi zásobní bílkoviny patří prolamininy a gluteliny [7,13]. Prolamininy pšenice, žita, ječmene a ova způsobují potravinovou nesnášenlivost- celiakii, jak již bylo zmíněno v kapitole 1.3.4 Bílkoviny. Studie odhalily, že toto onemocnění postihuje přibližně 0,4 % populace, což celiakii posouvá na nejběžnější potravinovou alergii vůbec. Mecha-

nismus působení těchto alergenních bílkovin není zcela objasněn. Celiakie je prozatím nevyлéčitelné onemocnění a jedinou léčbou je doživotní dodržování bezlepkové diety, tzn. vyloučení bílkovin podčeledi *Triticeae* [16].

Pšeničný prolamin se nazývá gliadin a jeho obsah v zrně zastává 32,6 hmot. % z celkového množství. Žitný prolamin je sekalín (20,9 %). Pšeničný glutelin se nazývá glutenin (45,7 %) a žitný je sekalínin (24,6 %) [7,13].

Pšeničné zásobní bílkoviny jsou velmi výjimečné, od ostatních se liší především schopností tvořit za přítomnosti vody a vzdušného kyslíku se současným vložením mechanické energie (hnětení) pevný gel- lepek [15]. Lepek, zvaný těž jako gluten, byl poprvé charakterizován Beccarim již v roce 1745 [16]. Je tvořen ze dvou třetin vodou a jedné třetiny hydratovaných gliadinových a gluteninových bílkovin, přičemž gliadin poskytuje lepku tažnost a glutenin pružnost a bobtnatelnost [7,13]. Jeho trojrozměrná síť představuje kostru těsta [14,15].

Lepek je možné z těsta izolovat proudem vody jako tzv. mokrý lepek v množství 20 – 35 %. Je ovšem nutné si uvědomit, že takto vypraný lepek neobsahuje pouze bílkoviny, ale také vlákninu, škrob, cukry, kyselinu fosforečnou, lipidy apod. Mokrý lepek je charakterizovaný tažností, pružností a schopností bobtnat ve zředěném roztoku kyseliny mléčné. Jeho jakost do značné míry určuje vlastnosti těsta [8,15].

Těsto žitné nemá schopnost tvořit tuto bílkovinou trojrozměrnou síť a je tvořeno hlavně na bázi polysacharidů [1,15].

Gliadin

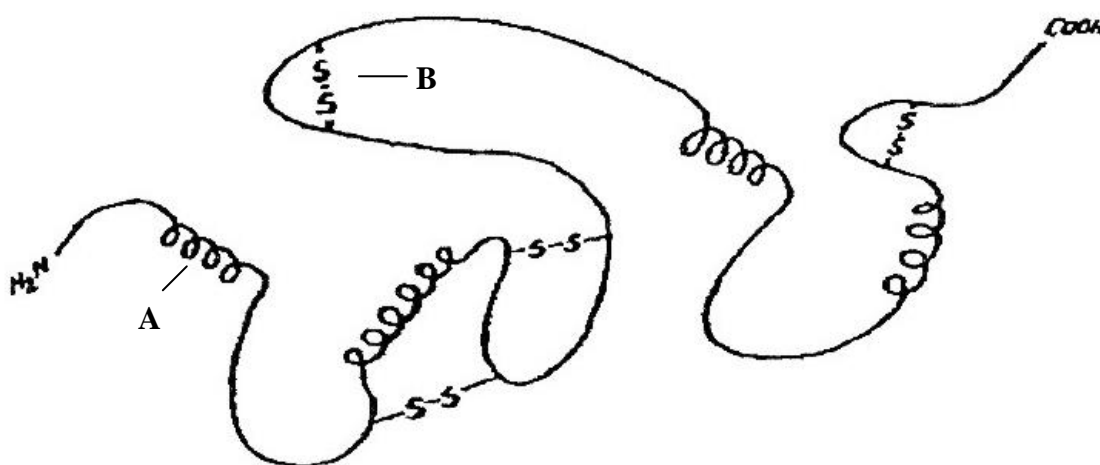
Gliadin je pšeničný monomerní prolamin, nebo se také může označit jako nízkomolekulární zásobní pšeničná bílkovina (zkr. z angl. LMSP) [7,17]. Je nejvíce prozkoumanou skupinou prolaminů z hlediska chemické struktury. Je složen z několika (jejich počet se odhaduje na 50) jednotlivých proteinů s molekulovou hmotností 30 až 75 kDa. Obsahuje mnoho glutaminu (36-45 %) a prolinu (14-30 %), poměrně málo kyseliny asparagové a glutámové a bazických aminokyselin- argininu, lysinu a histidinu. Nízký obsah těchto kyselých a bazických aminokyselin s polárními řetězci způsobuje malou rozpustnost gliadinu ve vodě [13,16].

Gliadiny byly rozděleny podle klesající mobility při gelové elektroforéze nebo katexové chromatografii na α -, β -, γ - a ω -gliadiny. Jejich poměr zastoupení je rozdílný

v závislosti na odrůdě a růstových podmínkách, lze však říci, že z celkových gliadinů se nejvíce vyskytuje α -typ, poté γ -typ a ω -gliadiny se vyskytují pouze v malé míře [16]. α -, β - a γ -gliadiny obsahují intramolekulární disulfidové vazby, zatímco ω -gliadiny neobsahují sirmé aminokyseliny [17].

Frakce získané gelovou elektroforézou jsou charakteristické pro každou odrůdu pšenice a jsou uloženy v databankách. Nejrozsáhlejší databází rostlinných bílkovin je Pfam, databáze sestavená na Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, UK. Díky tomu lze arbitrážně rozpoznat dle jediného zrna jeho odrůda [15,16].

Předpokládá se, že gliadin ve struktuře lepku je tvořen spojitým řetězcem bílkovin (viz obr. 2), který vytváří zčásti úseky helixů a zčásti náhodné ohyby, přičemž helixy (A) jsou udržovány velkým množstvím vodíkových vazeb, zatímco ohyby (B) jsou udržovány velmi pevnými disulfidickými vazbami [15].



Obr. 2: Schéma struktury gliadinu [7]

Popis obr. 2: A- úseky helixů, B- náhodné ohyby udržované disulfidickými vazbami

Glutenin

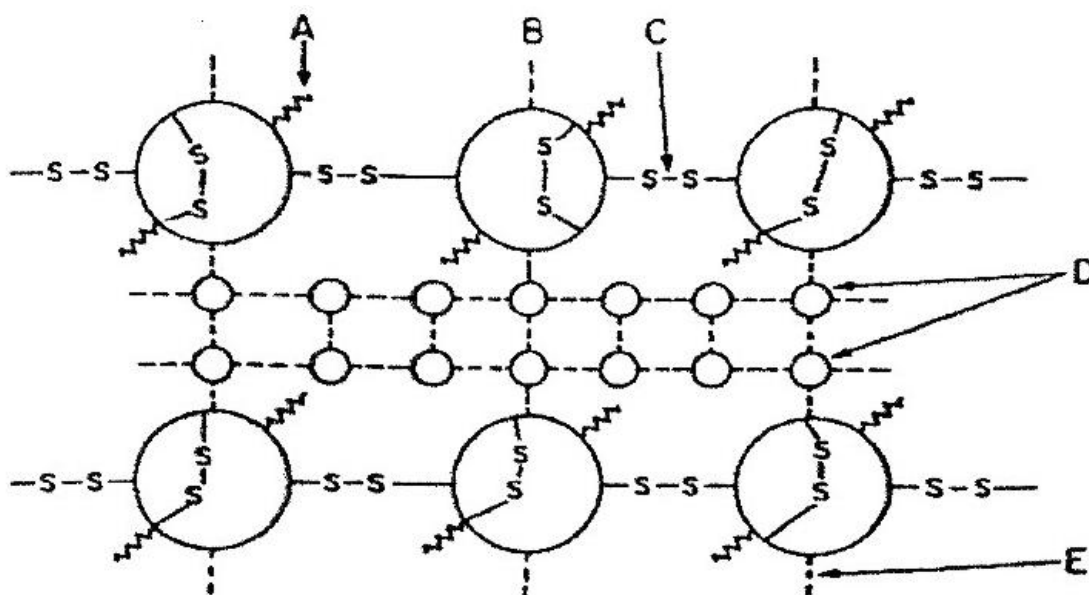
Glutenin je pšeničný polymerní glutelin, též označován jako vysokomolekulární zásobní pšeničná bílkovina (zkr. z angl. HMSP) [7,17]. Díky polymerní bílkovinné struktuře má vyšší molekulovou hmotnost [18]. Obvykle se rozděluje na nízkomolekulární (LMW) a vysokomolekulární (HMW) podjednotky, přičemž nízkomolekulární gluteniny

mají molekulovou hmotnost v rozmezí 30-40 kDa a vysokomolekulární gluteniny 65-90 kDa [17].

Gluteniny nejsou tak dobře prozkoumány. De Vincenzi a spol. prokázali, že nízkomolekulární gluteniny obsahující peptidové sekvence velmi podobné gliadinu, jsou také toxické pro lidi s celiakií [16].

U gluteninů byl prokázán silný vliv na pekařskou jakost. Různé podíly vysokomolekulárních gluteninů vykazují velký vztah mezi pevností těsta a výkonu pečení [18]. Pšeničné linie, které nemají vysokomolekulární gluteniny, nemají dostatečnou tažnost těsta. Dále bylo prokázáno u mouky na výrobu těstovin, která není vhodná pro pekařské účely, že má více nízkomolekulárních gluteninů nad vysokomolekulárními [1].

Glutenin je ve struktuře lepku představován jako komplex tvořen mnoha řetězci bílkovinných podjednotek různých velikostí (viz obr. 3). Nízkomolekulární řetězce jsou uvnitř udržovány disulfidickými a vodíkovými vazbami a vně jsou s ostatními spojeny vodíkovými vazbami a hydrofóbními silami. Vysokomolekulární složky mají interřetězcové a intrařetězcové disulfidické vazby, jež udržují pevnou a pružnou strukturu lepku [7,15].



Obr. 3: Model struktury gluteninu [7]

Popis obr. 3: A- vysokomolekulární podjednotky gluteninu, B- intrařetězcové disulfidické vazby, C- interřetězcové disulfidické vazby, D- nízkomolekulární podjednotky gluteninu, E- sekundární vazby (vodíkové a hydrofóbní interakce)

3 EXTRAKCE PŠENIČNÝCH BÍLKOVIN

Extrakce je dělicí metoda založená na distribuci složky mezi dvě fáze a to buď tuhou a kapalnou, nebo mezi dvě kapalnou. V případě mouky se bude samozřejmě jednat o extrakci tuhé látky kapalinou, jež je nejčastěji používaná extrakce sloužící k izolaci jedné nebo více látek z přírodního materiálu. Přechod částic z tuhé fáze do roztoku je způsoben interakcí molekul rozpouštědla s molekulami rozpouštěné látky. Volba vhodného rozpouštědla je velmi důležitá, a to nejen pro správné extrakční dělení, ale také pro následné stanovení např. chromatografické [19].

Pro většinu rostlinných a živočišných bílkovin je rozpustnost obilných bílkovin značně netypická [20]. Mnoho zásobních proteinů není rozpustných ve vodě, ale jsou rozpustné v alkoholech (prolaminy) nebo v kyselinách, zásadách, denaturačních, čistících či redukčních činidlech (gluteliny) [21]. Tato netypická a velmi složitá rozpustnost je způsobena neobvyklým aminokyselinovým složením (velký obsah glutaminu, prolinu a hydrofóbních aminokyselin a nedostatek kyselých a základních zbytků) a silnou tendencí se nekovalentně vázat přes disulfidické vazby do polymerů o vysoké molekulové hmotnosti (HMW). Z rostlinných bílkovin lze nejhůře izolovat a stanovit obilné bílkoviny rovněž díky obsahu některých složek endospermu, jako jsou sacharidy a lipidy vázané na protein pomocí nekovalentních vodíkových nebo hydrofóbních vazeb či kovalentních disulfidických vazeb [20,21].

Jednou z nejdéle používaných metod, která slouží k charakterizaci obilných bílkovin, je postupná separace proteinů na základě jejich odlišné rozpustnosti navržená Osbornem v roce 1907, již popsána v kapitole 2. Pšeničné bílkoviny [15,22]. Celá řada studií však dokazuje, že tyto přechody v rozpustnosti nejsou ostré, prolínají se a závisí na extrakčním činidle, teplotě a době extrakce. Například bylo prokázáno, že poměrně velká část frakcí bílkovin je při vyšší teplotě extrakce rozpustná ve vodném roztoku chloridu sodného [22].

K extrakci bílkovin se používá mnoho rozpouštědel, jako např. vodný roztok ethanolu, 2-propanol, dimethylformamid (DMF), 2-merkapt ethanol (2-ME), močovina, dodecylsulfát sodný (SDS) apod. Extrakční podmínky by měly být přizpůsobeny bílkovinám [21]. Volba vhodného rozpouštědla závisí také na následném stanovení, například pro SE-HPLC je vhodným rozpouštědlem 0,1% fosforečnan sodný obsahující 0,1% SDS, také je možné přidání 1% 2-ME ke snížení vzniku disulfidických vazeb. Při použití vodného

roztoku ethanolu pro následné stanovení IE-HPLC je nutno provést vysušení (odstranění ethanolu) a následné rozpuštění v rozpouštědle vhodném pro IE-HPLC jako je třeba 1 M močovina [20]. Prozatím bohužel neexistuje jednotná metoda separace obilných proteinů [21].

Dvořáček (2006) popisuje ve své práci vliv navážky, koncentrace použitých rozpouštědel a externích faktorů (teplota, hrubost mletí a čas extrakce) na kvantitativní změny jednotlivých bílkovinných frakcí u pšenice ozimé [22].

Po extrakci vzorku musí následovat filtrace nebo odstředění, aby se odstranily případné nečistoty a sraženiny. Pro filtraci se užívají membrány s póry o velikosti 0,2-0,5 μm . Snadnější a ekonomičtější, je však odstřeďování (25 000 - 400 000 x g na 10 až 15 min), které se díky svým přednostem mnohem více využívá [21]. Vzorky jsou skladovatelné po dobu nejméně jednoho měsíce. Při zamrazení se však mohou vytvořit sraženiny, proto se doporučuje skladovat vzorky, pokud jsou dostatečně stabilní, při pokojové teplotě. Většina vzorků obsahující gliadiny či gluteniny jsou stabilní. Problém by mohl nastat u vzorků obsahující albuminové a globulinové frakce, které nejsou tolik stabilní, jelikož mohou obsahovat proteázy [21].

Homola (2012) extrahoval 200 mg mouky ve 3 ml připraveného extrakčního činidla (H_2O + acetonitril v poměru 3:1). Vzorek byl následně míchán 5 minut na vibrační třepače a odstředěn při 10 000 ot/min po dobu 10 min. Takto připravené vzorky byly do 72 hodin stanoveny metodou HPLC v UV detekci při 214nm [23].

Bietz (1983) extrahoval rozdrčená jádra pšenice 70% vodným roztokem ethanolu nebo 50% rozpouštědlem (obsahující 15% acetonitrilu + 0,1% TFA) + 50% kyselinou octovou po dobu 30 minut za periodického míchání v množství odpovídající 0,04 ml/mg. Po odstředění při 27 000 x g po dobu 10 minut byly vzorky buď hned analyzovány metodou RP-HPLC nebo skladovány zamražením [24].

Huebner a Bietz (1993) před vlastní extrakcí vzorky mouky odtučnili. Navážka 500 mg mouky byla míchána 15 minut ve 3 ml butanolu, následovalo odstředění při 20 000 x g po dobu 10 minut. Dále byly vzorky promyty 2 ml petroletheru a opět odstředěny. Takto odtučněná mouka byla extrahována 3 ml 0,05 M NaCl (odstranění albumino-globulinové frakce) na vibrační třepače 20 minut při 5°C, následovalo odstředění. Extrakt (supernatant) byl uložen k dalšímu stanovení. Sraženina byla extrahována 3 ml 70 %

vodného roztoku ethanolu na vibrační třepače po dobu 30 minut. Po odstředění (15000 x g 12min) byly vzorky uloženy při 4°C do stanovení, které bylo provedeno metodou SE-HPLC a RP-HPLC [25].

3.1 Izolace albuminů a globulinů

Albuminy a globuliny mohou být extrahovány vodou nebo slabými vodnými roztoky solí, nejčastěji chloridem sodným [20, 21, 22]. Dvořáček (2006) uvádí jako nejvhodnější metodu extrakce albumino-globulinové frakce následující postup. Navážka 0,5 g mouky o zrnitosti maximálně 0,8 mm byla extrahována v 5 ml 0,5 M NaCl po dobu 15 minut při teplotě 4°C. Poté 15-ti minutová centrifugace při 6 500 ot./min. Následovalo promytí, dvakrát po sobě stejnými objemy rozpouštědla po dobu 5 minut, a opět centrifugace při stejných otáčkách po dobu 5 minut. Supernatanty byly spojeny a uskladněny v chladničce [22].

3.2 Izolace prolaminů

Z hlediska chemické struktury jsou pšeničné gliadiny nejvíce prozkoumanou skupinou prolaminů [16]. Gliadiny jsou po předchozím odmytí albumino-globulinové frakce získány extrakcí vodným roztokem alkoholu, nejčastěji ethanolu o koncentracích 40 – 70 % (v/v) [16,22]. Jsou takřka nerozpustné v neutrálním prostředí, zatímco v kyselém a alkalickém prostředí jsou téměř zcela rozpustné [26].

Dvořáček (2006) doporučuje při frakcionaci gliadinů extrakci 0,5 g mouky 5 ml 60 % vodným roztoku ethanolu při teplotě 20°C po dobu 4 hodin. Posléze 15-ti minutová centrifugace při 6 500 ot./min, promytí (dvakrát po sobě po dobu 5 minut), a opět centrifugace při stejných otáčkách 5 minut. Supernatanty byly spojeny a uskladněny v chladničce [22].

Bietz et al. (1984) zkoumá ve svém díle podmínky extrakce gliadinu pro následné stanovení metodou HPLC. Vliv doby extrakce, předchozího odmaštění a extrakce NaCl, typ a stáří extraktu. Při použití 70 % ethanolu je vhodný čas extrakce pro reprodukovatelné výsledky 30 minut, ba dokonce i po 5-ti minutové extrakci lze získat kvalitativní výsledky. Dále se práce zabývá extrakcí proteinů dalšími činidly: 70% ethanolem, 55% 2-propanolem, mléčnanem hlinitým, 2 M močovinou a 2 M dimethylformamidem (DMF). Všechna extrakční činidla byla vhodná k extrakci gliadinu i bez předchozího odmaštění a extrakce v NaCl, jelikož obsah albuminů a globulinů je nízký a gliadin se vylučuje

huje mnohem rychleji. U močoviny a DMF byly v malé míře extrahovány také gluteniny [20,21,27].

Homola (2012) při přípravě vzorků pro detailní stanovení gliadinových frakcí extrahoval 200 mg mouky ve 3 ml 50 % n-propanolu. Vzorek byl míchán 5 minut na vibrační třepačce a odstředěn při 10 000 ot/min po dobu 10 min. Takto připravené vzorky byly do 72 hodin stanoveny metodou HPLC v UV detekci při 210 nm [23].

Lookhart, Cox a Chung (1993) extrahovali 250 mg mouky v 0,750 ml 70 % vodném roztoku ethanolu po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Vzorek byl odstředěn při 4000 x g 10 minut při 25°C. Supernatant byl oddělen a skladován do provedení analýzy metodou RP-HPLC [28]. Thewissen et al. (2011) také užívá k extrakci gliadinů z mouky 70% vodný roztok ethanolu (při 20°C, 20 minut) [26]. Pistón et al. (2011) uplatňuje k extrakci 60% vodný roztok ethanolu. Navážka 100 mg mouky byla extrahována třikrát v 670 μ l 60% ethanolu při pokojové teplotě. Byla dvě minuty míchána na vibrační třepačce a nechána 10 minut stát. Poté byl vzorek odstředěn při 6000 x g po dobu 20 min. Všechny tři supernatanty byly spojeny a použity na stanovení metodou RP-HPLC [29].

Cole et al. (1983) připravil vzorek α -gliadinu pro stanovení metodou GPC rozpuštěním 50 mg mouky ve 4 ml 0,01 M kyseliny octové [30].

3.3 Izolace glutelinů

Gluteniny jsou velmi heterogenní skupina bílkovin endospermu pšenice nerozpustná ve vodě, ale rozpustná v roztocích solí a kyselin. Pracovat s nimi v původním stavu je velice obtížné, jelikož jsou nerozpustné v běžně používaných rozpouštědlech a mají silnou tendenci se sdružovat a formovat v agregáty o vysoké molekulové hmotnosti [31]. Dvořáček (2006) zjistil, že extrakce gluteninů při použití 0,02 M a 0,1 M NaCl z pohledu opakování, velikosti částic šrotu a době extrakce je velmi variabilní, tudíž doporučuje při kvantitativní analýze bílkovin množství gluteninů dopočítat [22].

Gluteniny mohou být extrahovány 5% 2-ME v Tris pufru obsahujícím 8 M močovinu, 6 M guanidin hydrochlorid nebo 2% SDS. Močovina a guanidin chlorid poskytují lepší výsledky [21]. Huebner a Bietz (1987) uvádějí, že po použití 2% SDS jsou výsledky nereprodukovatelné, jelikož po analýze bylo zjištěno, že chybí některé vysokomolekulární frakce [32]. 2-ME a dithiothreitol (DTT) jsou vhodná redukční činidla, přičemž DTT je

pomalejší než 2-ME. Po redukci disulfidických vazeb, kterými je spojeno mnoho podjednotek glutelinu, je možno výsledné cysteiny alkylovat 4-vinylpyridinem, kyselinou jodooctovou, či akrylonitrilem, aby se zabránilo reoxidaci do vyšší molekulové hmotnosti [21].

Pistón et al. (2011) extrahovali dvakrát vzorek zbavený frakce gliadinu (zminěno výše) v 500 μ l 50% 1-propanolu + 2 M močoviny + 0,05 M Tris-HCl (pH 7,5) + 2% DTT. Takto připravený extrakt byl 2 minuty míchán na vibrační třepačce při pokojové teplotě, poté inkubován 15 min při 60°C za stálého míchání. Po 20 minutovém odstředění byly supernatanty obsahující frakce gluteninu spojeny a použity pro stanovení RP-HPLC [29].

Dong et al. (2009) připravili vzorek HMW-GS pro analýzu metodou SDS-PAGE a RP-HPLC následovně. Navážka 30 mg mouky byla přidána do 120 μ l 70% vodného roztoku ethanolu a za periodického míchání při pokojové teplotě ponechána 30 minut. Odstředěna 10 minut při 13000 ot/min. Zbytek byl promyt s 500 μ l 55 % iso-propanolu po dobu 30 minut při teplotě 65°C, odstředěn při 13000 ot/min 10min. Supernatant byl uložen. Tyto kroky, které slouží k odstranění gliadinu, byly provedeny dvakrát. Vzorek zbaven gliadinů se posléze extrahoval ve 100 μ l extrakčního pufru (50% iso-propanol, 80 mM Tris-HCl (pH 8), 1% DTT) při teplotě 65°C po dobu 30 min. Po odstředění byla frakce gluteninu alkylována 4-vinylpyridinem 30 min při 65°C. Supernatant po odstředění (13000 ot/min 15 min) byl použit pro analýzu [33].

Bradová et al. (2011) připravili frakci HMW-GS pro stanovení metodou SDS-PAGE dvouhodinovou extrakcí rozdrceného zrna v 0,3 ml roztoku připraveného z 30 ml 0,25 M Tris-HCl (pH 6,8)+24 ml 10% SDS+2 ml glycerolu+6 ml 2-ME+48 ml H₂O [34].

Tahir (2008) ve své práci popisuje izolaci HMW-GS a LMW-GS pro analýzu SDS-PAGE. K extrakci HMW-GS ze vzorku byl použit roztok, který obsahoval 28,5% rozpouštěcího pufru (7% SDS + 0,01 M Tris-HCl (pH 6,8)+ 30% glycerol +0,001 M comassie blue) a 5% 2-ME. Příprava LMW-GS dle Tahiry: 20 mg mouky bylo extrahováno třikrát v 50% propan-2-ol při 60°C 30 min. Gluteniny poté byly rozpuštěny v 50% propan-2-ol + 0,08 M Tris-HCl (pH 8,5) + 20 mM DTT (60°C, 30 min). Supernatant byl zředěn jedním objemem 50% propan-2-ol + 0,08 M Tris-HCl (pH 8,5) + 40 mM 4-vinylpyridin (60°C, 3 hod). Gluteniny byly vysráženy 1 ml acetonu a sraženina byla rozpuštěna v rozpouštěcím pufru (7% SDS + 0,01M Tris-HCl (pH 6,8) + 30% glycerol + 0,001 comassie blue) [35].

4 NĚKTERÉ MOŽNOSTI DETEKCE PROTEINOVÝCH FRAKCIÍ PŠENICE

Analýza obilných bílkovin je velmi složitá, díky jejich velké různorodosti, netypické rozpustnosti, přítomnosti jiných složek endospermu vázaných na protein a značné heterogenitě [20,21]. Přesto bylo vyvinuto mnoho metod zabývajících se analýzou této heterogenní skupiny proteinů [20]. Pro stanovení frakcí cereálních bílkovin se používají elektroforetické, chromatografické i imunochemické metody [16].

4.1 Elektroforéza

Elektroforéza je základní metodou separace zásobních bílkovin pšeničného zrna [34]. Patří mezi elektromigrační separační metody, které využívají rozdílné pohyblivosti elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli [36]. Tyto částice putují v tekutém médiu – elektrolytu podle povahy náboje buď k anodě nebo ke katodě [34]. Rychlost pohybu částic je závislá na velikosti náboje, velikosti molekuly, podmínkách prostředí a síle elektrického pole. Velikost náboje ovlivňuje stupeň ionizace a pH prostředí. Elektroforetické metody lze rozdělit do čtyř základních typů dle experimentálního uspořádání a to na elektroforézu zónovou, elektroforézu s pohyblivým rozhraním, izoelektrickou fokusací a izotakoferézu [36].

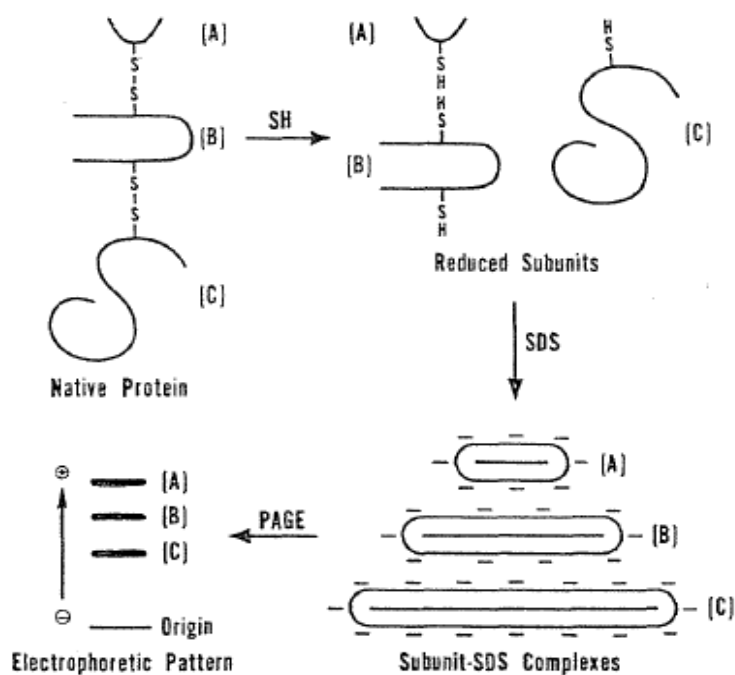
Elektroforéza bílkovinných genetických markerů, tedy sestavy zásobních a enzymatických proteinů zrna, je běžným postupem separace bílkovin v prostředí polyakrylamidového nebo škrobového gelu. Genetická interpretace následně umožňuje identifikovat fenotyp jednotlivých bílkovinných alel. Vytvoření databáze vzorových elektroforetických spekter bílkovin jednotlivých odrůd – etalonů je základem využívání elektroforézy genetických markerů pro identifikaci odrůd pšenice [37].

Základní metodou je elektroforetická analýza gliadinů pšenice ve sloupcích škrobového gelu (SGE). Touto metodou lze stanovit poměrně přesně rozdílnost a šíři genetického vybavení jednotlivých odrůd. Alternativou je elektroforetická analýza gliadinů v polyakrylamidovém gelu v kyselém prostředí (A PAGE – ISTA) a s Al-laktátovým pufrům dle Metakovského (A PAGE – Metakovsky). Tyto metody jsou finančně i pracovně nákladnější [37].

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Jedná se o elektroforetický způsob separace na základě velikosti molekul separovaných látek. Elektroforéza probíhá v polyakrylovém gelu s dodecylsulfátem sodným, což je anionaktivní detergent nesoucí poměrně vysoký náboj. Ve vazbě na bílkovinu tedy vyrovnává nábojové rozdíly jednotlivých bílkovin, které se v gelu pohybují pouze podle rozdílné velikosti jejich molekul.

Tato technika se nejčastěji používá pro analýzu HMW a LMW gluteninů a je znázorněná na obr. 4 [38,39]. V gluteninu jsou disulfidické vazby štěpeny pomocí 2-merkapt ethanol a redukovatelné podjednotky jsou v komplexu s SDS. Podlouhlé částice mohou tedy snadněji migrovat a během elektroforézy proniknou hlouběji do gelu. Můžeme tak charakterizovat HMW-GS a LMW-GS zároveň v jednom gelu, kdy HMW-GS putují gelem pomaleji [34,39].



Obr. 4: Princip analýzy gluteninu v SDS-PAGE [39]

Nevýhodou je neurotoxicita používaných chemikálií (akrylamid a bisakrylamid). Tato metoda je doporučena mezinárodní organizací UPOV (Union for the protection of new varieties of plants) k testování stálosti odrůd, jejich odlišnosti a homogenity [34].

Gliadiny můžeme rozdělit na základě rozdílné mobility při elektroforéze v polyakrylamidovém gelu při nízkém pH na α -, β -, γ - a ω -gliadiny, kdy α -gliadiny mají nejvyšší elektroforetickou pohyblivost [17].

V posledních letech byla vyvinuta moderní analytická technika tzv. automatická čipová elektroforéza Experion (Experion Systém, Bio-Rad Laboratories USA), která má na rozdíl od klasické SDS PAGE řadu výhod, především rychlost, jednoduchost, vysokou opakovatelnost provedení analýz, objektivnost a větší pracovní bezpečnost. Analýza bílkovin je provedena prostřednictvím analytického kitu s názvem „Experion Pro260 Analysis Kit“, který umožní analýzu 10 vzorků během 30 minut [34].

4.2 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Tato metoda je založena na interakci specifické protilátky s antigenem. Je nejpoužívanější metodou ke stanovení prolaminů. Nejčastěji je prováděna postupným vytvářením zakotvených komplexů protilátka – antigen – enzymově značená protilátka v tzv. sendvičovém uspořádání. Kompetitivní imunochemické stanovení dovoluje identifikovat antigeny, které mají pouze jedno vazebné místo pro protilátku a jejich prostorové uspořádání neumožní vytvoření sendvičového komplexu, kdy jsou navázány dvě protilátky. Polyklonální protilátky, jejichž příprava je levnější a jednodušší, mají nižší specifitu vůči potenciálně alergenním peptidům a pro kvantitativní stanovení prolaminů v nízkých koncentracích se již nepoužívají. Monoklonální protilátky, jejichž příprava je náročnější a finančně nákladnější, jsou specifické vůči jednomu danému aminokyselinovému úseku. Protilátky specifické proti toxickým sekvencím α -gliadinů se v dnešní době jeví jako nejvhodnější pro stanovení lepku. Pro tepelnou odolnost ω -gliadinů je protilátka proti těmto gliadinům využívána při stanovení lepku u tepelně upravených potravin. Klíčovým krokem celého stanovení je tedy volba vhodných protilátek. ELISA je dnes hlavní metodou pro stanovení prolaminů v nízkých koncentracích [16].

4.3 Hmotnostní spektrometrie

Jedná se o metodu, při které se bílkoviny ionizují dusíkovým laserem. Vzniklé ionty jsou tímto urychleny na krátkém úseku silným stejnosměrným elektrickým polem. Proces probíhá ve vhodné nízkomolekulární matici, která zabrání rozpadu makromolekul. V trubici bez elektrického pole se měří doba letu iontů k detektoru, která je úměrná poměru jejich hmotnosti ku jejich náboji. Metoda slouží k určení známých peptidů, jako kontrolní a srovnávací metoda k odhalení falešně pozitivních výsledků imunochemických analytických metod. Nevýhodou je vysoká přístrojová a finanční náročnost [16].

4.4 Chromatografické metody

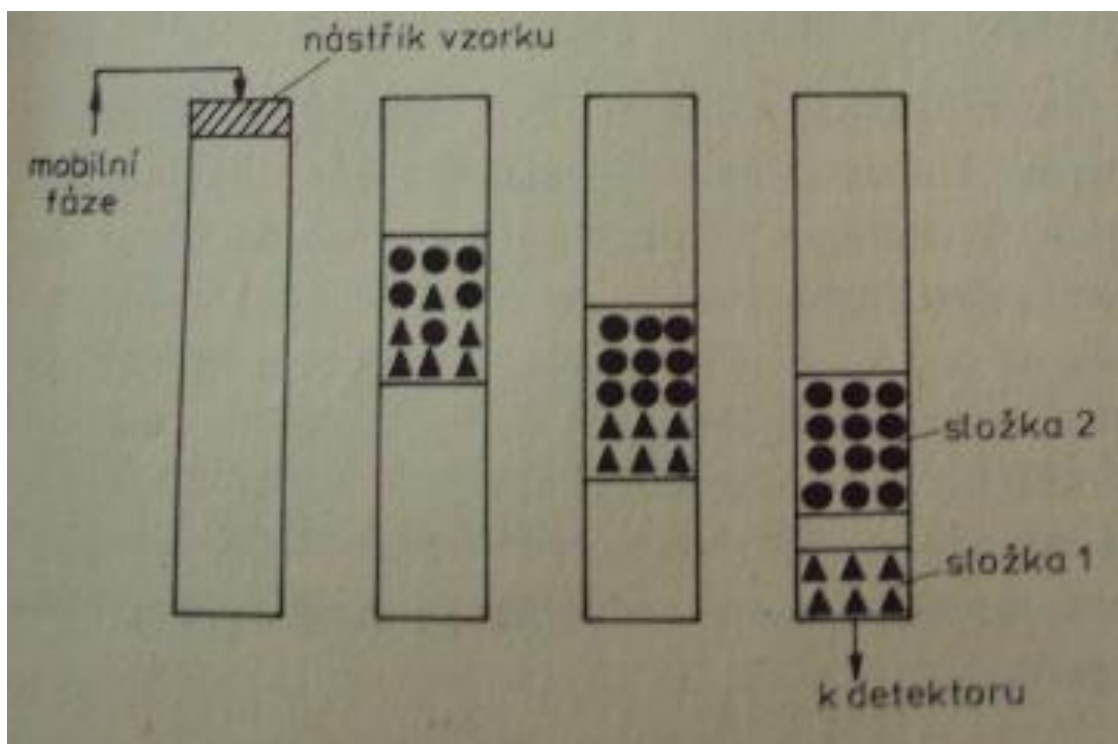
Počátek vzniku chromatografie je v různých dílech odlišný, avšak celosvětovou odbornou veřejností je za objevitele považován M. S. Cvět, který na zasedání biologické sekce varšavské přírodovědné společnosti dne 21. 3. 1903 přednesl referát, jenž jednoznačně popisoval tuto metodu [40].

Chromatografie zahrnuje skupinu navzájem spjatých separačních metod [41]. Jedná se o proces, při kterém dochází k dělení složek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je mobilní (pohyblivá) a druhá stacionární (nepohyblivá) [19]. Mobilní fázi může být kapalina či plyn, stacionární kapalina nebo tuhá látka, což nám umožňuje různé kombinace [41]. Rozdělení chromatografických metod bývá často rozdílné, jelikož záleží na tom, podle čeho dělení provádíme. Nejdůležitější metody jsou uvedeny v tab. 2. Jsou rozříděny podle skupenství mobilní fáze a mechanismu separace [19].

Tab. 2: Přehled nejdůležitějších chromatografických metod [19]

Mobilní fáze	Separační mechanismus	Metoda	Užívaná zkratka
Plyn (plynová chromatografie)	sítový efekt	plynová chromatografie na molekulových sítích	GSC
	adsorpce	plynová adsorpční chromatografie	
	rozdělování	plynová rozdělovací chromatografie	GLC
Kapalina (kapalinová chromatografie)	sítový efekt	gelová permeační chromatografie	GPC
	adsorpce	kapalinová adsorpční chromatografie	LSC
	rozdělování	kapalinová rozdělovací chromatografie	LLC
	chemisorpce	iontově výměnná chromatografie	IEC

Základní princip chromatografie je znázorněn na obr. 5. Kolonou naplněnou stacionární fází putuje mobilní fáze. Pokud na začátek kolony dáme vzorek, jenž bude obsahovat složku 1 a 2, bude jej mobilní fáze unášet ke konci kolony. Jak je znázorněno na obr. 5, složka 2 putuje kolonou pomaleji, tzn. je více retardovaná. Při průchodu kolonou, každá molekula přechází mnohokrát z mobilní fáze na stacionární a naopak. Pořadí složek závisí na velikosti interakce mezi složkou a stacionární fází. Čím větší bude interakce, tím později složka eluuje (vychází) z kolony [19].



Obr. 5: Chromatografické dělení vzorku o dvou složkách [19]

V této práci se budeme věnovat pouze kapalinové chromatografii, která se řadí po elektroforéze k druhé hlavní metodě sloužící k izolaci a charakterizaci pšeničných proteinů [42].

Kapalinová chromatografie

Při kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina a stacionární kapalina nebo pevná látka [43, 44]. O separaci vzorku rozhoduje stacionární fáze a výrazně i volba vhodné mobilní fáze [44]. V posledních desetiletích se tato metoda velmi rozvinula. Především byly vyvinuty velice efektivní chromatografické materiály, jenž nám umožnily provádět chromatografii za zvýšeného a vysokého tlaku. Tímto se chromatografie rozdělila na nízkotlakou (gravitační), středotlakou (provádí se při tlaku asi do 3 MPa) a vysokotlakou (7-20 MPa), běžně označovanou jako HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Poslední jmenovaná zapříčinila zvýšení výkonnosti metody, ale také díky ní vznikl typ chromatografie na kvalitativně vyšší úrovni [43].

Následující text se bude věnovat vybraným metodám kapalinové chromatografie, používaných pro analýzu pšeničných proteinů.

Gelově permeační chromatografie - GPC

Jedná se o kolonovou kapalinovou chromatografii jejíž stacionární fází je kapalina. Tato metoda využívá mechanického dělení molekul vzorku v pórech gelu na základě jejich různé velikosti [45]. Při průchodu kolonou jsou molekuly zpomalovány, protože pronikají do rozpouštědlem napuštěných pórů, přičemž menší molekuly pronikají hlouběji [44].

Gelová permeační chromatografie, též označovaná jako velikostně-vylučovací se zkratkou SE (z anglického size-exclusion), nám podává informace o molekulární velikosti nativních pšeničných proteinů a skladbě podjednotek. Gliadin byl extrahován 70 % ethanolem. Poté byl frakcionován na sloupci Sephadexu, kde mobilní fází byla zředěná kyselina octová na HMW (M 100 000 - 400 000), ω -gliadiny (M 60 000 - 80 000), γ -gliadiny (M cca 40 000), α/β -gliadiny (M 30 000 - 35 000), albuminy a globuliny. Podobně byl i glutenin po štěpení disulfidických vazeb a alkylace výsledných cysteinů, použitím rozpouštědla obsahující 4 M močovinu a 0,03 M kyselinu octovou frakcionován do třech skupin, které se lišily velikostí a tendencí asociovat.

Při použití vysokotlaké chromatografie, označována běžně SE-HPLC (zkr. size-exclusion high-performance liquid chromatography), je tato metoda stejně dobrá, dokonce o něco lepší. SE-HPLC je rychlá, citlivá a reprodukovatelná. Dokonce je možné pomocí této metody rozlišit jednotlivé odrůdy pšenice na základě analýzy nativních gluteninů, či celkových proteinů a tím také předvídat kvalitu mouky pro pečení chleba [42].

Odborných článků, které se zabývají separací pšeničných proteinů pomocí SE-HPLC, je mnoho. Jako první popisuje tuto metodu Bietz roku 1984 [42], dále ji zkoumá v dílech z roku 1985 [46] a 1986 [20]. Dalšími publikacemi popisujícími tuto metodu jsou např. Bietz, 1990 [21], Bietz a Simpson, 1992 [42], Huebner a Bietz, 1993 [25] a Oszvald, 2011 [47].

Kapalinová rozdělovací chromatografie - LLC

Opět se jedná o kolonovou kapalinovou chromatografii s kapalinou jako stacionární fází. Tato metoda ovšem využívá rozdílné rozpustnosti molekul vzorku mezi dvěma nemísitelnými kapalinami [45]. Jedna z kapalných fází se zakotví na inertní pevný nosič - vznikne fáze stacionární. Při normálním uspořádání je tato fáze vodná, respektive s vodou mísitelná a mobilní fáze je nepolární. Můžeme tak separovat látky rozpustné ve

vodě. Pokud stacionární fáze bude nepolární, hovoříme o chromatografii s převrácenou fází, která bude separovat látky rozpustné v nepolárních rozpouštědlech [43].

RP-HPLC (z angl. reversed-phase high-performance liquid chromatography), neboli vysokotlaká kapalinová chromatografie s převrácenou fází je nejpoužívanější metoda, sloužící k frakcionaci a charakterizaci pšeničných proteinů. Rozděluje proteiny na základě povrchové hydrofóbnosti, tedy interakcí mezi proteiny a porézní hydrofóbní maticí kolony. Poprvé ji použil Bietz roku 1983 [24] na proteiny endospermu pšenice a kukuřice. Do té doby sloužila pouze pro peptidy a jednoduché proteiny a nikoliv pro složité biologické směsi, jelikož nebyly ještě vynalezeny vhodné kolony [20]. Je mnoho odborných článků, které se zabývají touto metodou a její optimalizací, např. Bietz 1983 [24], 1985 [46], 1986 [20] a Bietz et. al. 1984 [27], dále pak Bietz 1990 [21], Bietz a Simpson 1992 [42], Dong et. al. 2009 [33].

V RP-HPLC se pšeničné proteiny mohou extrahovat v jakémkoliv rozpouštědle. Frakcionace probíhá použitím gradientu se vzrůstajícím obsahem acetonitrilu (nejčastěji 20% až 60%), který obsahuje 0,05-0,1% kyselinu trifluoroctovou. Detekce pak obvykle probíhá při 210-225 nm. Pro reprodukovatelnost výsledku je vhodná konstantní teplota. Bylo zjištěno, že při 50-70°C se zvyšuje rozlišení, díky narušení vodíkových vazeb [42].

Iontově výměnná chromatografie - IEC

Tato metoda je kolonová kapalinová chromatografie, která má stacionární fázi pevnou látku v podobě iontoměniče [43, 45]. Iontoměnič je makromolekulární matrice (polystyren, celulóza, dextran apod.), která nese vhodné funkční skupiny, tj. pevně vázané ionty, na něž jsou iontově připojeny protionty. Ty jsou vyměňovány ionty stejného znaménka náboje. Při tomto ději se uplatňují elektrostatické přitažlivé síly mezi ionty opačného náboje, tzv. Coulombovy síly [44].

Iontoměniče můžeme dělit podle ionogenních skupin na [48]:

Katexy- Jsou nerozpustné polymerní polyvalentní kyseliny, které vyměňují kationty. Mohou být silně kyselé (obsahují sulfoskupinu $-\text{SO}_3^-$, $-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$), středně kyselé ($-\text{PO}_3^{2-}$), či slabě kyselé ($-\text{COO}^-$).

Anexy- Jsou nerozpustné polymerní polyvalentní báze vyměňující anionty. Také mohou být silně bazické ($-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$), středně bazické ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH}_2)=\text{N}^+\text{H}_2$, $-\text{C}_2\text{H}_5\text{N}^+\text{H}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$), nebo slabě bazické ($-\text{N}^+\text{HR}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}_3$)

IEC tedy využívá rozdílné výměnné adsorpce iontů vzorku na povrchu iontového měniče, díky tomu se vzorky separují podle počtu ionizovaných skupin a velikosti nábojů. Probíhá ve dvou fázích, nejdříve se ionty zachytí podle velikosti neseného náboje na iontovém měniči, a poté jsou vytěsněny roztokem, který obsahuje molekuly s větší afinitou k iontoměniči nebo změnou pH [43, 48].

Před příchodem vysokotlaké chromatografie byla tato metoda, při užití kolon na bázi celulózy, jednou z nejlepších chromatografických metod používaných k separaci obilných proteinů [21]. Poskytla nám mnoho cenných informací o složení lepku. Lepek například můžeme frakcionovat na karboxymethylcelulózové koloně použitím gradientu se zvyšující se koncentrací kyseliny. Také můžeme proteiny vymývat chloridem sodným. Tyto metody jsou sice dodnes použitelné, ale frakce jsou moc heterogenní. Je tedy nutné IEC stále zlepšovat pomocí disociačních činidel, nastavením elučních podmínek, měněním se pH apod. [42].

Pro IE-HPLC (z angl. ion-exchange high-performance liquid chromatography) bylo vyvinuto mnoho katexových i anexových kolon na bázi křemíku. Ty byly ovšem použity především na jiné než cereální proteiny [20]. Vzhledem k tomu, že IEC je metoda vhodná pro separaci obilných proteinů, měla by vysokotlaká být minimálně stejně dobrá. Není ovšem mnoho odborných publikací, které by se touto metodou zabývaly. Mohla by například sloužit k identifikaci odrůd pšenice. Je popsána frakcionace gliadinů na anexové koloně Pharmacia Mono- Q za velmi alkalických podmínek. Dobrá separace probíhá při pH 10,4, kdy je potlačena ionizace argininu. Další velmi nadějná metoda popisuje frakcionaci gliadinu na katexové koloně Pharmacia Mono- S HR. IE-HPLC stále zůstává výzvou pro badatele, aby se dosáhlo vysokého rozlišení při separaci lepkových proteinů [42].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE

5.1 Vzorky

Na chromatografické dělení proteinů z mouky byla použita hladká mouka pšenice seté (*Triticulum aestivum L.*). V první řadě byly vzorky připraveny z mouky T 530 Jihlava, Rakousko, Hermann a Oplatková. Ve druhé řadě byly vzorky připraveny pouze z jedné mouky od firmy Penam a.s.

5.2 Chemikálie pro analýzu

Akrylamid (Roth, Německo)

Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, Německo)

Bis-akrylamid (N,N'-methyl-bis-akrylamid) (Roth, Německo)

Comassie blue G-250 (SERVA Elektrophoresis, Německo)

Dusičnan stříbrný (Roth, Německo)

Ethanol (Penta, Chrudim)

Formaldehyd (Lach-Ner, s. r. o., Neratovice)

Glycerol (Sigma-Aldrich, Německo)

Glycin (Penta, Chrudim)

Chlorid sodný p. a. (Lach-Ner, s. r. o., Neratovice)

Kyselina octová 99% (Penta, Chrudim)

MES (Kyselina 2-morfolin-ethan sulfonová) p. a. (Roth, Německo)

Močovina p. a. (Fluka, Německo)

Octan sodný p.a. (Penta, Chrudim)

Peroxidisíran amonný (Lach-Ner, s. r. o., Neratovice)

SDS (Dodecylsulfát sodný) (Roth, Německo)

Serva Blue G

TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin) (Roth, Německo)

Thiosíran sodný (Lach-Ner, s. r. o., Neratovice)

TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan) 99,9% (Roth, Německo)

Uhličitan sodný bezvodý p. a. (Penta, Chrudim)

2-ME (2-Mercaptoethanol) 99% p. a. (Roth, Německo)

5.3 Zařízení

detektor Waters 486 Tunable Absorbance detector (Waters, Corp USA)

detektor Waters 484 Tunable Absorbance detector (Waters, Corp USA)

Kapalinový chromatograf Waters 600E (Waters, Corp USA)

Kapalinový chromatograf LCP 5020 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika)

Sběrač frakcí Gradi Frac (Pharmacia, Švédsko)

Spektrofotometr Helios Gama (Thermo Electron Corp., USA)

Univerzální stolní centrifuga Rotanta 460R (Hettich, Německo)

UV detektor LCD 2040 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika)

Zdroj napětí pro elektroforézu Consort E844 (Sigma-Aldrich, Německo)

Záznam na notebooku premio v programu CHROMuLAN v 0.79

a ostatní běžné laboratorní pomůcky

6 METODY CHROMATOGRAFICKÉHO DĚLENÍ BÍLKOVIN

6.1 Extrakce bílkovin z mouky

Extrakce bílkovin z mouky byla prováděna dvěma způsoby. V první řadě vzorků byla mouka extrahována fosfátovým pufrem (pH 6,9), jenž obsahoval SDS [49]. Ve druhé řadě vzorků byla mouka extrahována 0,05 M kyselinou octovou (obsahující 2-ME) třikrát po sobě. U těchto třech připravených extraktů byla při pH 4 stanovena koncentrace proteinů podle Bradfordové, jež prokázala velký obsah proteinů ve vzorku.

6.1.1 Příprava první řady vzorků

Navážka 50 mg mouky byla extrahována v 5 ml 0,1 M fosfátového pufru (pH 6,9, obsahující 0,5 hm. % SDS) po dobu 2 hodin při teplotě 60°C (v termostatu) s občasným promícháním. Po extrakci byl vzorek centrifugován po dobu 15 minut 11500 ot/min a teplotě 25°C. Takto připravené vzorky byly uskladněny v chladničce do stanovení [49].

6.1.2 Příprava druhé řady vzorků

Navážka 5 g mouky byla extrahována v 10 ml extrakčního roztoku (obsahující 0,05 M kyseliny octové + 0,1% 2-ME) po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Poté následovalo odstředění při 13750 ot/min po dobu 15 minut. Supernatant byl oddělen od sraženiny a naředěn pufrem A pětinasobně. Složení pufru A je uvedeno v tab. 5, kapitola 6.2.2. Vždy byl použit stejný pufr i na chromatografii. Takto připravený vzorek byl ještě podroben filtraci a úpravě pH na požadovanou hodnotu (dle použitého pufru pH 4, 5, 10 nebo 8).

Sraženina byla rozmíchána v extrakčním roztoku v množství do původní hmotnosti. Postup se opakoval, čímž se připravil extrakt 2. Ke sraženině byl opět přidán stejný extrakční roztok a postup se opakoval při vzniku extraktu 3.

Extrakt byly uchovávány při laboratorní teplotě až do stanovení, jelikož přítomná močovina by při chladnější teplotě vykristalizovala.

6.2 Chromatografie proteinů na iontoměničích

Chromatografie byla prováděna na kapalinovém chromatografu LCP 5020 a Waters 600 E. Byly použity iontoměničové kolony HiTrap Capto S (katex), HiTrap Capto Q (anex) o objemu 1ml, CIM SO3 DISK (katex) a CIM QA DISK (anex). K detekci byly použity detektory Waters 486 a 484 a UV detektor LCD 2040. Měření bylo prováděno při 280 nm. Záznam z detektoru byl vyhodnocován pomocí programu CHROMuLAN v 0.79.

6.2.1 Chromatografie první řady vzorků

U připravených vzorků první řady musela být před stanovením provedena dialýza, jež měla za úkol odstranit SDS. Obsah SDS ve vzorku by totiž mohl narušit měření, jelikož se může vázat na ionexové kolony. Vzorek byl dán do dialyzačního střívka. Střívko bylo vloženo do kádinky s pufrem A (viz. tab.3). Stejný pufr byl vždy také použit na následnou chromatografii. Dialýza probíhala za stálého míchání při laboratorní teplotě (pufr obsahující močovinu) nebo teplotě chladničky (pufr bez močoviny) do následujícího dne. Výměna pufru byla provedena po 2 hodinách a před odchodem z laboratoře. Vzorek po dialýze byl odstředěn (15000 ot/min, 5min), ze sraženiny byl připraven vzorek na elektroforézu, ze supernatantu byl připraven vzorek na chromatografii i na elektroforézu.

Příprava pufrů

V destilované vodě bylo rozpuštěno vypočítané množství daných látek pro pufr A (viz tab.3). Následovalo doplnění destilovanou vodou na počítaný objem. Při rozpouštění byly roztoky obsahující močovinu zahřívány, jelikož by se tak velké množství močoviny při laboratorní teplotě jen stěží rozpustilo. Poté byl roztok vychlazen na laboratorní teplotu, přefiltrován a bylo u něj upraveno pH na požadovanou hodnotu.

Při přípravě pufru B bylo vypočítané množství soli rozpuštěno v pufru A (odpovídajícího složení) a doplněno tímto pufrem do požadovaného objemu (viz. tab. 4). Posléze byla provedena filtrace a úprava pH.

Vzorový výpočet: Pufr A označen 1-7A0 o složení 50 mmol/l MES + 0,1% 2-ME, pH 7

množství MES: $m = M \times V \times c$

$$m = 195,5 \text{ (g/mol)} \times 0,5 \text{ (l)} \times 0,05 \text{ (mol/l)} = \underline{4,88\text{g MES}}$$

množství 2-ME: 0,1% z 500ml = 0,5ml 2-ME

Tab. 3: příprava pufrů A použitých na první řadu vzorků

Označení pufru	pH	složení pufru A	
		množství chemikálií na objem roztoku	
1-7A0	7	50 mmol/l MES + 0,1% 2-ME	
		na 500 ml: 4,88 g MES, 0,5 ml 2-ME	
1-7AM	7	50 mmol/l MES + 0,1% 2-ME + 8 M močovina	
		na 500 ml: 4,88 g MES, 0,5 ml 2-ME, 242,24 g močoviny	
1-5A0	5	50 mmol/l octan sodný + 0,1% 2-ME	
		na 400 ml: 2,72 g octanu sodného, 0,4 ml 2-ME	
1-5AM	5	50 mmol/l octan sodný + 0,1% 2-ME + 8 M močovina	
		na 400 ml: 2,72 g octanu sodného, 0,4 ml 2-ME, 192,19 g močoviny	
1-10A0	10	50 mmol/l uhličitan sodný + 0,1% 2-ME	
		na 400 ml: 2,12 g uhličitanu sodného, 0,4 ml 2-ME	
1-10AM	10	50 mmol/l uhličitan sodný + 0,1% 2-ME + 8 M močovina	
		na 400 ml: 2,12 g uhličitanu sodného, 0,4 ml 2-ME, 192,19 g močoviny	
1-9AM	9	50 mmol/l uhličitan sodný + 0,1% 2-ME + 8 M močovina	
		na 400 ml: 2,12 g uhličitanu sodného, 0,4 ml 2-ME, 192,19 g močoviny	
1-8AM	8	50 mmol/l uhličitan sodný + 0,1% 2-ME + 8 M močovina	
		na 400 ml: 2,12 g uhličitanu sodného, 0,4 ml 2-ME, 192,19 g močoviny	
1-4AM	4	50 mmol/l octan sodný + 0,1% 2-ME + 8 M močovina	
		na 400 ml: 2,72 g octanu sodného, 0,4 ml 2-ME, 192,19 g močoviny	

Tab. 4: příprava pufrů B použitých na první řadu vzorků

Označení pufru	pH	složení pufru B	
		hmotnost soli rozpuštěné v pufru A na objem	
1-7B0	7	50 mmol/l MES + 0,1% 2-ME + 1 M NaCl	
		na objem 80 ml: 4,68 g NaCl	
1-7BM	7	50 mmol/l MES + 0,1% 2-ME + 8 M močovina + 1 M NaCl	
		na objem 80 ml: 4,68 g NaCl	
1-5B0	5	50 mmol/l octan sodný + 0,1% 2-ME + 1 M NaCl	
		na objem 80 ml: 4,68 g NaCl	
1-5BM	5	50 mmol/l octan sodný + 0,1% 2-ME + 8 M močovina + 1 M NaCl	
		na objem 80 ml: 4,68 g NaCl	
1-10B0	10	50 mmol/l uhličitan sodný + 0,1% 2-ME + 1 M NaCl	
		na objem 80 ml: 4,68 g NaCl	
1-10BM	10	50 mmol/l uhličitan sodný + 0,1% 2-ME + 8 M močovina + 1 M NaCl	
		na objem 80 ml: 4,68 g NaCl	
1-10BM1,5	10	50 mmol/l uhličitan sodný + 0,1% 2-ME + 8 M močovina + 1,5M NaCl	
		na objem 50 ml: 4,38 g NaCl	
1-9BM2	9	50 mmol/l uhličitan sodný + 0,1% 2-ME + 8 M močovina + 1 M NaCl	
		na objem 50 ml: 5,84 g NaCl	
1-8BM2	8	50 mmol/l uhličitan sodný + 0,1% 2-ME + 8 M močovina + 2 M NaCl	
		na objem 50 ml: 5,84 g NaCl	
1-4B0	4	50 mmol/l octan sodný + 0,1% 2-ME + 1 M NaCl	
		na objem 80 ml: 4,68 g NaCl	

Chromatografie:

Po zapojení kolony byly dráhy A a B propláchnuty destilovanou vodou. Poté byla destilovaná voda vyměněna za pufr, na dráhu A pufr A, na dráhu B pufr B. Pufr B byl pouze nasán do dráhy B, zatímco dráha A s pufrem A byla puštěna do ustálení detektoru.

Nástřík

Po ustálení detektoru byl přístroj vynulován, spuštěn záznam a nastříknut vzorek. Opět byl přístroj puštěn do ustálení detektoru, přičemž mobilní fáze byla odebrána a označena názvem FT (z angl. flow through) pro následné stanovení.

Gradient

Po nástřiku a ustálení detektoru byl nastaven gradient a stroj opět spuštěn. Jednotlivé frakce byly odebírány nejčastěji po minutě, případně po dvou minutách.

6.2.1.1 Pokus- katex, pH 7, CIM SO3 DISK

Měření bylo prováděno na katexové diskové koloně CIM SO3 DISK při pH 7. Na analýzu byl použit extrakt z mouky T 530 Jihlava.

Na dráze A byl pufr 1-7A0, na dráze B pufr 1-7B0

Nástřík vzorku: Nastříknut byl 1 ml vzorku (po dialýze v pufru 1-7A0), průtok mobilní fáze (1-7A0) byl nastaven na 0,5 ml/min., doba chromatografie trvala 100 min. Z nástřiku odebrán vzorek, označen jako FT.

Gradient: Průtok byl nastaven na 0,5 ml/min. Doba chromatografie trvala 15 minut. V prvních pěti minutách byla puštěna pouze dráha A s pufrem 1-7A0, po pěti minutách byla nastavena gradientová eluce pufrem 1-7B0 (tj. postupné zvyšování koncentrace pufru 1-7B0 z dráhy B a snižování koncentrace pufru 1-7A0). Odchyt frakcí po dvou minutách.

Následovala identifikace FT a jednotlivých frakcí pomocí elektroforézy na SDS-PAGE s 15% koncentrací polyakrylamidu (popsáno v kapitole č 6.3).

6.2.1.2 Pokus- katex, pH 7, CIM SO3 DISK, močovina

Měření bylo prováděno na katexové diskové koloně CIM SO3 DISK při pH 7. Na analýzu byl použit extrakt z mouky T 530 Jihlava.

Na dráze A byl pufr 1-7AM, na dráze B pufr 1-7BM

Nástřík vzorku: Nastříknut byl 1 ml vzorku (po dialýze v pufru 1-7AM), průtok mobilní fáze (1-7AM) byl nastaven na 0,5 ml/min., doba chromatografie trvala 100 min. Z nástříku odebráno FT.

Gradient: Průtok byl nastaven na 0,5 ml/min. Doba chromatografie trvala 15 minut. Prvních 5 minut pouze dráha A s pufr 1-7AM. Od 5. do 15. minuty gradientová eluce. Odchyt frakcí po dvou minutách.

Následovala identifikace FT a jednotlivých frakcí pomocí elektroforézy na SDS-PAGE s 15% koncentrací polyakrylamidu.

6.2.1.3 Pokus- katex, pH 5, CIM SO3 DISK

Měření bylo prováděno na katexové diskové koloně CIM SO3 DISK při pH 5. Na analýzu byl použit extrakt z mouky T 530 Jihlava.

Na dráze A byl pufr 1-5A0, na dráze B pufr 1-5B0

Nástřík vzorku: Nastříknut byl 1 ml vzorku (po dialýze v pufru 1-5A0), průtok mobilní fáze (1-5A0) byl nastaven na 0,5 ml/min. Z nástříku odebráno FT.

Gradient: Průtok byl nastaven na 0,5 ml/min. Doba chromatografie trvala 20 minut. Prvních 10 minut pouze dráha A s pufr 1-5A0, od 10. do 20. minuty gradientová eluce. Odchyt frakcí po dvou minutách.

Následovala identifikace FT a jednotlivých frakcí pomocí elektroforézy na SDS-PAGE s 15% koncentrací polyakrylamidu.

6.2.1.4 Pokus- katex, pH 5, CIM SO3 DISK, močovina

Měření bylo prováděno na katexové diskové koloně CIM SO3 DISK při pH 5. Na analýzu byl použit extrakt z mouky T 530 Jihlava.

Na dráze A byl pufr 1-5AM, na dráze B pufr 1-5BM

Nástřík vzorku: Nastříknut byl 1 ml vzorku (po dialýze v pufru 1-5AM), průtok mobilní fáze (1-5AM) byl nastaven na 0,1 ml/min. Doba chromatografie trvala 20 minut. Nástřík odchycen po frakcích označen jako FT 1 až 9, přičemž FT 1 byly první čtyři minuty chromatografie, zbytek odchycen po dvou minutách.

Gradient: Průtok byl nastaven na 0,5 ml/min. Doba chromatografie byla 10 minut, gradientové promývání bylo zpuštěno od začátku. Odchyt frakcí po minutě.

Následovala identifikace FT 1-9 pomocí elektroforézy na SDS-PAGE s 15% koncentrací polyakrylamidu. Frakce identifikovány nebyly.

6.2.1.5 Pokus- anex, pH 7, CIM QA DISK

Měření bylo prováděno na anexové diskové koloně CIM QA DISK při pH 7. Na analýzu byl použit extrakt z mouky T 530 Jihlava.

Na dráze A byl pufr 1-7A0, na dráze B pufr 1-7B0

Nástřík vzorku: Nastříknut byl 1 ml vzorku (po dialýze v pufru 1-7A0), průtok mobilní fáze (1-7A0) byl 0,1 ml/min. Doba chromatografie 20 minut. FT bylo odchyťováno po 2 minutách.

Gradient: Průtok byl nastaven na 0,5 ml/min. Od začátku do 10. minuty byla spuštěna gradientová eluce, poté dvě minuty promývání pufr 1-7B0. Odchyt frakcí po minutě.

Následovala identifikace FT 1-9 a jednotlivých frakcí pomocí elektroforézy na SDS-PAGE s 15% koncentrací polyakrylamidu.

6.2.1.6 Pokus- anex, pH 10, HiTrap Capto Q 1ml

Měření bylo prováděno na anexové koloně HiTrap Capto Q o objemu 1ml při pH 10. Na analýzu byl použit extrakt z mouky Rakousko.

Na dráze A byl pufr 1-10A0, na dráze B pufr 1-10B0

Nástřík vzorku: Nastříknut byl 1 ml vzorku (po dialýze v pufru 1-10A0), průtok mobilní fáze (1-10A0) byl 0,5 ml/min. Doba chromatografie 22 minut. FT bylo odchyťováno dle záznamu detektoru (0-4,8 min, 4,8-8,7 min, 8,7-15,4 min).

Gradient: Průtok nastaven na 1 ml/min. Doba chromatografie trvala 17 minut. Prvních 5 minut pouze dráha A s pufr 1-10A0, od 5. do 15. minuty gradientová eluce a od 15 minuty pouze dráha B s pufr 1-10B0. Odchyt frakcí po minutě.

Následovala identifikace FT a jednotlivých frakcí pomocí elektroforézy na SDS-PAGE s 12% koncentrací polyakrylamidu (popsáno v kapitole č 6.3).

6.2.1.7 Pokus- anex, pH 10, HiTrap Capto Q 1ml

Měření bylo prováděno na anexové koloně HiTrap Capto Q o objemu 1ml při pH 10. Na analýzu byl použit extrakt z mouky Rakousko.

Na dráze A byl pufr 1-10A0, na dráze B pufr 1-10B0

Nástřík vzorku: Bylo nastříknuto 2 ml vzorku (po dialýze v pufru 1-10A0), průtok mobilní fáze (1-10A0) byl 0,5 ml/min. Doba chromatografie 25 min. FT bylo odchyťováno opět podle záznamu detektoru (0-5 min, 5-7,6 min, 7,6-13,5 min, nad 13,5 min).

Gradient: Průtok nastaven na 0,5 ml/min. Doba chromatografie trvala 34 minut. Prvních 10 minut puštěna dráha A s pufrem 1-10A0, od 10 do 30 minuty gradientová eluce a od 15 minuty pouze pufr 1-10B0. Odchyt frakcí po dvou minutách.

Následovala identifikace FT a jednotlivých frakcí pomocí tricinové elektroforézy (popsáno v kapitole č 6.3).

6.2.1.8 Pokus- anex, pH 10, HiTrap Capto Q 1ml, močovina

Měření bylo prováděno na anexové koloně HiTrap Capto Q o objemu 1ml při pH 10. Na analýzu byl použit extrakt z mouky Rakousko.

Na dráze A byl pufr 1-10AM, na dráze B pufr 1-10BM

Nástřík vzorku: Bylo nastříknuto 3,5 ml vzorku (po dialýze v pufru 1-10AM), průtok mobilní fáze (1-10AM) byl 1 ml/min. Doba chromatografie 23 min. Z nástříku odebráno FT.

Gradient: Průtok nastaven na 1 ml/min. Doba chromatografie 20 minut. Prvních 5 minut puštěna dráha A, od 5 do 15 minuty gradientová eluce a od 15 minuty pouze dráha B s pufrem 1-10BM. Odchyt frakcí po minutě.

Následovala identifikace FT a jednotlivých frakcí pomocí elektroforézy na SDS-PAGE s 15% koncentrací polyakrylamidu.

6.2.1.9 Pokus- anex, pH 10, HiTrap Capto Q 1ml, močovina

Měření bylo prováděno na anexové koloně HiTrap Capto Q o objemu 1ml při pH 10. Na analýzu byl použit extrakt z mouky Hermann.

Na dráze A byl pufr 1-10AM, na dráze B pufr 1-10BM

Nástřík vzorku: Bylo nastříknuto 5 ml vzorku (po dialýze v pufru 1-10AM), průtok mobilní fáze (1-10AM) byl 1 ml/min. Doba chromatografie 23 min. Z nástříku odebráno FT.

Gradient: Průtok nastaven na 1 ml/min. Doba chromatografie 30 minut. Prvních 5 minut puštěna dráha A, od 5 do 15 minuty gradientová eluce, poté pufr 1-10BM. Odchyt frakcí po minutě.

Následovala identifikace FT a jednotlivých frakcí pomocí elektroforézy na SDS-PAGE s 12% koncentrací polyakrylamidu.

6.2.1.10 Pokus- anex, pH 10, HiTrap Capto Q 1ml, močovina

Měření bylo prováděno na anexové koloně HiTrap Capto Q o objemu 1ml při pH 10. Na analýzu byl použit extrakt z mouky Rakousko.

Na dráze A byl pufr 1-10AM, na dráze B pufr 1-10BM

Nástřík vzorku: Bylo nastříknuto 4 ml vzorku (po dialýze v pufru 1-10AM), průtok mobilní fáze (1-10AM) byl 1 ml/min. Doba chromatografie 30 minut. Z nástříku odebráno FT.

Gradient: Průtok nastaven na 1 ml/min. Doba chromatografie 50 minut. V prvních 10 minutách pouze dráha A, od 10. do 30. minuty gradientová eluce, následně jen pufr 1-10BM. Odchyt frakcí po minutě.

Následovala identifikace FT a jednotlivých frakcí pomocí elektroforézy na SDS-PAGE s 12% koncentrací polyakrylamidu.

6.2.1.11 Pokus- anex, pH 10, HiTrap Capto Q 1ml, močovina

Měření bylo prováděno na anexové koloně HiTrap Capto Q o objemu 1ml při pH 10. Na analýzu byl použit extrakt z mouky Rakousko.

Na dráze A byl pufr 1-10AM, na dráze B pufr 1-10BM1,5

Nástřík vzorku: Bylo nastříknuto 2 ml vzorku (po dialýze v pufru 1-10AM), průtok mobilní fáze (1-10AM) byl 1 ml/min. Doba chromatografie 25 minut. Z nástříku odebráno FT.

Gradient: Průtok nastaven na 1 ml/min. Doba chromatografie 60 minut. V prvních 10 minutách pouze dráha A, od 10. do 40. minuty gradientová eluce, následně jen pufr 1-10BM1,5. Odchyt frakcí po minutě.

Identifikace pomocí elektroforézy nebyla prováděna.

6.2.1.12 *Pokus- anex, pH 9, HiTrap Capto Q 1ml, močovina*

Měření bylo prováděno na anexové koloně HiTrap Capto Q o objemu 1ml při pH 9. Na analýzu byl použit extrakt z mouky Oplazková.

Na dráze A byl pufr 1-9AM, na dráze B pufr 1-9BM2

Nástřík vzorku: Bylo nastříknuto 5 ml vzorku (po dialýze v pufru 1-9AM), průtok mobilní fáze (1-9AM) byl 1 ml/min. Doba chromatografie 30 minut. Z nástřiku odebráno FT.

Gradient: Průtok nastaven na 1 ml/min. Doba chromatografie 60 minut. V prvních 10 minutách pouze dráha A, od 10. do 40. minuty gradientová eluce, následně jen pufr 1-9BM2. Odchyt frakcí po minutě.

Identifikace pomocí elektroforézy nebyla prováděna.

6.2.1.13 *Pokus- anex, pH 8, HiTrap Capto Q 1ml, močovina*

Měření bylo prováděno na anexové koloně HiTrap Capto Q o objemu 1ml při pH 8. Na analýzu byl použit extrakt z mouky Hermann.

Na dráze A byl pufr 1-8AM, na dráze B pufr 1-8BM2

Nástřík vzorku: Bylo nastříknuto 5 ml vzorku (po dialýze v pufru 1-8AM), průtok mobilní fáze (1-8AM) byl 1 ml/min. Doba chromatografie 19 minut. Z nástřiku odebráno FT

Gradient: Průtok nastaven na 1 ml/min. Doba chromatografie 60 minut. V prvních 10 minutách pouze dráha A, od 10. do 40. minuty gradientová eluce, následně jen pufr 1-8BM2. Odchyt frakcí po minutě.

Identifikace pomocí elektroforézy nebyla prováděna.

6.2.1.14 *Pokus- anex, pH 8, HiTrap Capto Q 1ml, močovina*

Měření bylo prováděno na anexové koloně HiTrap Capto Q o objemu 1ml při pH 8. Tento pokus byl bez vzorku, tedy spuštění gradientového programu bez nástřiku.

Na dráze A byl pufr 1-8AM, na dráze B pufr 1-8BM2

Gradient: Průtok nastaven na 1 ml/min. Doba chromatografie 60 minut. V prvních 10 minutách pouze dráha A, od 10. do 40. minuty gradientová eluce, následně jen pufr 1-8BM2. Frakce nebyly odebírány.

6.2.1.15 Pokus- katex, pH 4, HiTrap Capto S 1ml, močovina

Měření bylo prováděno na katexové koloně HiTrap Capto S o objemu 1ml při pH 4. Na analýzu byl použit extrakt z mouky Rakousko.

Na dráze A byl pufr 1-4AM, na dráze B pufr 1-4BM

Nástřík vzorku: Bylo nastříknuto 17 ml vzorku (po dialýze v pufru 1-4AM), průtok mobilní fáze (1-4A0) byl 1 ml/min. Doba chromatografie 65 minut. Z nástřiku odebráno 33 ml FT

Gradient: Průtok nastaven na 1 ml/min. Doba chromatografie 60 minut. V prvních 10 minutách pouze dráha A, od 10. do 40. minuty gradientová eluce, následně jen pufr 1-4BM. Odchyt frakcí po minutě.

U vzorku a FT byla stanovena koncentrace proteinů metodou dle Bradfordové. Měření bylo prováděno na spektrofotometru při 595 nm. Kalibrační přímka byla sestavena kolegy z laboratoře již dříve.

Pro vzorky s absorbancí 0,1-0,6 platí:

$$A = 0,0537 c + 0,0005$$

$$c = (A - 0,0005) / 0,0537 \quad [\mu\text{g} / 1\text{ml}]$$

vzorek po dialýze: (200 μ l BČ + 700 μ l H₂O + 100 μ l vzorku) \rightarrow A = **0,239**

$$c = (0,239 - 0,0005) \times 10 \text{ (zředění)} / 0,0537 = \underline{44,1 \mu\text{g} / 1\text{ml}}$$

FT: (200 μ l BČ + 700 μ l H₂O + 100 μ l vzorku) \rightarrow A = **0,119**

$$c = (0,119 - 0,0005) \times 10 \text{ (zředění)} / 0,0537 = \underline{22,1 \mu\text{g} / 1\text{ml}}$$

6.2.1.16 Pokus- katex, pH 4, HiTrap Capto S 1ml, močovina

Měření bylo prováděno na katexové koloně HiTrap Capto S o objemu 1ml při pH 4. Chromatografické stanovení bylo opět provedeno bez nástřiku vzorku.

Na dráze A byl pufr 1-4AM, na dráze B pufr 1-4BM

Gradient: Průtok nastaven na 1 ml/min. Doba chromatografie 60 minut. V prvních 10 minutách pouze dráha A, od 10. do 40. minuty gradientová eluce, následně jen pufr 1-4BM.

6.2.2 Chromatografie druhé řady vzorků

Vzorky druhé řady byly připravovány z mouky Penam a.s., jak je zmíněno v kapitole 5.1. Před vlastní analýzou byla u vorků vždy provedena ještě jednou filtrace a kontrola pH.

Příprava pufrů

Postup byl stejný jako v předešlé kapitole. - V destilované vodě bylo rozpuštěno vypočítané množství daných látek pro pufr A (viz tab. 5), poté doplnění destilovanou vodou na počítaný objem. Při rozpouštění byly roztoky zahřívány, následovalo vychlazení na laboratorní teplotu, filtrace a úprava pH na požadovanou hodnotu.

Tab. 5: příprava pufrů A, B použitých na druhou řadu vzorků

Označení pufru	pH	složení pufru A	
		množství chemikálií na objem roztoku	
2-4AM	4	50 mmol/l octan sodný + 0,1% 2-ME + 8 M močovina	
		na 500 ml: 3,40 g octanu sodného, 0,5 ml 2-ME, 240,24 g močoviny	
2-5AM	5	50 mmol/l octan sodný + 0,1% 2-ME + 8 M močovina	
		na 500 ml: 3,40 g octanu sodného, 0,5 ml 2-ME, 240,24 g močoviny	
2-10AM	10	50 mmol/l uhličitan sodný + 0,1% 2-ME + 8 M močovina	
		na 500 ml: 2,65 g uhličitanu sodného, 0,5 ml 2-ME, 240,24 g močoviny	
2-8AM	8	50 mmol/l Tris + 0,1% 2-ME + 8 M močovina	
		na 500 ml: 3,03 g Tris, 0,5 ml 2-ME, 240,24 g močoviny	
		složení pufru B	
		hmotnost soli rozpuštěné v pufru A na objem	
2-4BM	4	50 mmol/l octan sodný + 0,1% 2-ME + 8 M močovina + 1 M NaCl	
		na 100 ml: 5,84 g NaCl	
2-5BM	5	50 mmol/l octan sodný + 0,1% 2-ME + 8 M močovina + 1 M NaCl	
		na 100 ml: 5,84 g NaCl	
2-10BM	10	50 mmol/l uhličitan sodný + 0,1% 2-ME + 8 M močovina + 1 M NaCl	
		na 100 ml: 5,84 g NaCl	
2-8BM	8	50 mmol/l Tris + 0,1% 2-ME + 8 M močovina + 1 M NaCl	
		na 100 ml: 5,84 g NaCl	

Chromatografie:

Příprava ke frakcionaci byla prováděna stejným postupem jako u první řady vzorků. Průtok byl vždy nastaven na 1 ml/min. Nejčastěji bylo nastříkováno 30 ml vzorku. Z důvodu velkého množství, byl vzorek nastříkovan dráhou A. Po nástřiku a ustálení detektoru byl zpuštěn gradient. Nejčastěji byl program nastaven tak, že prvních 5 minut byl

puštěn pouze pufr A, od 5. do 35. minuty gradientová eluce pufrem B, poté až do 60 minuty byl puštěn pouze pufr B.

6.2.2.1 Pokus- katex, pH 4, po 1. extrakci

Měření bylo prováděno na katexové koloně HiTrap Capto S o objemu 1ml při pH 4. Byl použit vzorek po první extrakci 5 x naředěn pufrem 2-4AM.

Na dráze A byl pufr 2-4AM, na dráze B pufr 2-4BM

Nástřík vzorku: Bylo nastříknuto 30 ml vzorku. Doba chromatografie 100 min. Z nástříku bylo odebráno 90 ml FT.

Gradient: Doba chromatografie v toto případě trvala 100 minut. Prvních 5 minut 100% pufru 2-4AM, od 5. do 60. min 0-1% pufru 2-4AM a od 60. min 100% pufru 2-4AM. Odchyt frakcí po minutě.

Následovala identifikace FT a jednotlivých frakcí pomocí elektroforézy na SDS-PAGE s 12% koncentrací polyakrylamidu.

6.2.2.2 Pokus- katex, pH 4, po 2. extrakci

Měření bylo prováděno na katexové koloně HiTrap Capto S o objemu 1ml při pH 4. Byl použit vzorek po druhé extrakci 5 x naředěn pufrem 2-4AM.

Na dráze A byl pufr 2-4AM, na dráze B pufr 2-4BM

Nástřík vzorku: Bylo nastříknuto 10 ml vzorku. Doba chromatografie 40 min. Z nástříku bylo odebráno 40 ml FT.

Gradient: Doba chromatografie 60 minut. Prvních 5 minut pouze dráha A, od 5. do 35. minuty gradientová eluce pufrem 2-4BM a od 35. minuty pouze pufr 2-4BM. Odchyt frakcí po minutě.

Identifikace FT a jednotlivých frakcí pomocí elektroforézy na SDS-PAGE s 12% koncentrací polyakrylamidu a tricínové elektroforézy.

6.2.2.3 Pokus- katex, pH 4, po 3. extrakci

Měření bylo prováděno na katexové koloně HiTrap Capto S o objemu 1ml při pH 4. Byl použit vzorek po třetí extrakci 5 x naředěn pufrem 2-4AM.

Na dráze A byl pufr 2-4AM, na dráze B pufr 2-4BM

Nástřík vzorku: Bylo nastříknuto 30 ml vzorku Doba chromatografie 82 min. Z nástříku bylo odebráno 82 ml FT.

Gradient: Doba chromatografie 60 minut. Prvních 5 minut pouze dráha A, od 5. do 35. minuty gradientová eluce pufrem 2-4BM, od 35. minuty pouze pufr 2-4BM. Odchyt frakcí po minutě.

Identifikace FT a jednotlivých frakcí pomocí elektroforézy na SDS-PAGE s 12% koncentrací polyakrylamidu a tricínové elektroforézy.

6.2.2.4 Pokus- anex, pH 10, po 1. extrakci

Měření bylo prováděno na anexové koloně HiTrap Capto Q o objemu 1ml při pH 10. Byl použit vzorek po první extrakci 5 x naředěn pufrem 2-10AM.

Na dráze A byl pufr 2-10AM, na dráze B pufr 2-10BM

Nástřík vzorku: Bylo nastříknuto 30 ml vzorku. Doba chromatografie 110 min. Z nástříku bylo odebráno 100 ml FT.

Gradient: Doba chromatografie 60 minut. Prvních 5 minut pouze dráha A, od 5. do 35. minuty gradientová eluce pufrem 2-10BM, od 35. minuty pouze pufr 2-10BM. Odchyt frakcí po dvou minutách.

Identifikace FT a jednotlivých frakcí pomocí tricínové elektroforézy.

6.2.2.5 Pokus- anex, pH 10, po 2. extrakci

Měření bylo prováděno na anexové koloně HiTrap Capto Q o objemu 1ml při pH 10. Byl použit vzorek po druhé extrakci 5 x naředěn pufrem 2-10AM.

Na dráze A byl pufr 2-10AM, na dráze B pufr 2-10BM

Nástřík vzorku: Bylo nastříknuto 30 ml vzorku. Doba chromatografie 110 min. Z nástříku bylo odebráno 90 ml FT.

Gradient: Doba chromatografie 60 minut. Prvních 5 minut pouze dráha A, od 5. do 35. minuty gradientová eluce pufrem 2-10BM, od 35. minuty pouze pufr 2-10BM. Odchyt frakcí po dvou minutách.

Identifikace FT a jednotlivých frakcí pomocí tricínové elektroforézy.

6.2.2.6 Pokus- anex, pH 10, po 3. extrakci

Měření bylo prováděno na anexové koloně HiTrap Capto Q o objemu 1ml při pH 10. Byl použit vzorek po třetí extrakci 5 x naředěn pufrem 2-10AM.

Na dráze A byl pufr 2-10AM, na dráze B pufr 2-10BM

Nástřík vzorku: Bylo nastříknuto 30 ml vzorku. Doba chromatografie 100 min. Z nástříku bylo odebráno 90 ml FT.

Gradient: Doba chromatografie trvala 60 minut. Prvních 5 minut puštěna pouze dráha A s pufrem 2-10AM, od 5 do 37 minuty ručně prováděné postupné zvyšování koncentrace 2-10BM a od 37 minuty pouze pufr 2-10BM. Odchyt frakcí po dvou minutách.

Následovala identifikace FT a jednotlivých frakcí pomocí tricínové elektroforézy.

6.2.2.7 Pokus- anex, pH 8, po 1. extrakci

Měření bylo prováděno na anexové koloně HiTrap Capto Q o objemu 1ml při pH 8. Byl použit vzorek po první extrakci 5 x naředěn pufrem 2-8AM.

Na dráze A byl pufr 2-8AM, na dráze B pufr 2-8BM

Nástřík vzorku: Bylo nastříknuto 30 ml vzorku. Doba chromatografie 70 min. Z nástříku bylo odebráno 60 ml FT.

Gradient: Doba chromatografie 60 minut. Prvních 5 minut pouze dráha A, od 5. do 35. minuty gradientová eluce pufrem 2-8BM, od 35. minuty pouze pufr 2-8BM. Odchyt frakcí po dvou minutách.

Identifikace FT a jednotlivých frakcí pomocí tricínové elektroforézy.

6.2.2.8 Pokus- anex, pH 8, po 2. extrakci

Měření bylo prováděno na anexové koloně HiTrap Capto Q o objemu 1ml při pH 8. Byl použit vzorek po druhé extrakci 5 x naředěn pufrem 2-8AM.

Na dráze A byl pufr 2-8AM, na dráze B pufr 2-8BM

Nástřík vzorku: Bylo nastříknuto 30 ml vzorku. Doba chromatografie 80 min. Z nástříku bylo odebráno 60 ml FT.

Gradient: Doba chromatografie 60 minut. Prvních 5 minut pouze dráha A, od 5. do 35. minuty gradientová eluce pufr 2-8BM, od 35. minuty pouze pufr 2-8BM. Odchyt frakcí po dvou minutách.

Identifikace FT a jednotlivých frakcí pomocí tricínové elektroforézy.

6.2.2.9 Pokus- anex, pH 8, po 3. extrakci

Měření bylo prováděno na anexové koloně HiTrap Capto Q o objemu 1ml při pH 8. Byl použit vzorek po třetí extrakci 5 x naředěn pufr 2-8AM.

Na dráze A byl pufr 2-8AM, na dráze B pufr 2-8BM

Nástřík vzorku: Bylo nastříknuto 30 ml vzorku. Doba chromatografie 78 min. Z nástříku bylo odebráno 60 ml FT.

Gradient: Doba chromatografie 60 minut. Prvních 5 minut pouze dráha A, od 5. do 35. minuty gradientová eluce pufr 2-8BM, od 35. minuty pouze pufr 2-8BM. Odchyt frakcí po dvou minutách.

Identifikace FT a jednotlivých frakcí pomocí tricínové elektroforézy.

6.2.2.10 Pokus- katex, pH 5, po 1. extrakci

Měření bylo prováděno na katexové koloně HiTrap Capto S o objemu 1ml při pH 5. Byl použit vzorek po první extrakci 5 x naředěn pufr 2-5AM.

Na dráze A byl pufr 2-5AM, na dráze B pufr 2-5BM

Nástřík vzorku: Bylo nastříknuto 30 ml vzorku. Doba chromatografie 100 min. Z nástříku bylo odebráno 60 ml FT.

Gradient: Doba chromatografie 60 minut. Prvních 5 minut pouze dráha A, od 5. do 35. minuty gradientová eluce pufr 2-5BM, od 35. minuty pouze pufr 2-5BM. Odchyt frakcí po dvou minutách.

Identifikace FT a jednotlivých frakcí pomocí tricínové elektroforézy, barveno také serva blue.

6.2.2.11 *Pokus- katex, pH 5, po 2. extrakci*

Měření bylo prováděno na katexové koloně HiTrap Capto S o objemu 1ml při pH 5. Byl použit vzorek po první extrakci 5 x naředěn pufr 2-5AM.

Na dráze A byl pufr 2-5AM, na dráze B pufr 2-5BM

Nástřík vzorku: Bylo nastříknuto 30 ml vzorku. Doba chromatografie 90 min. Z nástříku bylo odebráno 60 ml FT.

Gradient: Doba chromatografie 60 minut. Prvních 5 minut pouze dráha A, od 5. do 35. minuty gradientová eluce pufr 2-5BM, od 35. minuty pouze pufr 2-5BM. Odchyt frakcí po dvou minutách.

Identifikace FT a jednotlivých frakcí pomocí tricinové elektroforézy.

6.2.2.12 *Pokus- katex, pH 5, po 3. extrakci*

Měření bylo prováděno na katexové koloně HiTrap Capto S o objemu 1ml při pH 5. Byl použit vzorek po třetí extrakci 5 x naředěn pufr 2-5AM.

Na dráze A byl pufr 2-5AM, na dráze B pufr 2-5BM

Nástřík vzorku: Bylo nastříknuto 30 ml vzorku. Doba chromatografie 80 min. Z nástříku bylo odebráno 60 ml FT.

Gradient: Doba chromatografie 60 minut. Prvních 5 minut pouze dráha A, od 5. do 35. minuty gradientová eluce pufr 2-5BM, od 35. minuty pouze pufr 2-5BM. Odchyt frakcí po dvou minutách.

Identifikace FT a jednotlivých frakcí pomocí tricinové elektroforézy.

6.2.2.13 *Pokus- katex, pH 4, po 1. extrakci, CIM SO3 DISK*

Měření bylo prováděno na katexové diskové koloně CIM SO3 DISK při pH 4. Byl použit vzorek po první extrakci 5 x naředěn pufr 2-4AM.

Na dráze A byl pufr 2-4AM, na dráze B pufr 2-4BM

Nástřík vzorku: Bylo nastříknuto 30 ml vzorku. Doba chromatografie 80 min. Z nástříku bylo odebráno 60 ml FT.

Gradient: Doba chromatografie 60 minut. Prvních 5 minut pouze dráha A, od 5. do 35. minuty gradientová eluce pufr 2-4BM, od 35. minuty pouze pufr 2-4BM. Odchyt frakcí po dvou minutách.

Identifikace FT a jednotlivých frakcí pomocí tricininové elektroforézy.

6.2.2.14 Pokus- katex, pH 4, po 2. extrakci, CIM SO3 DISK

Měření bylo prováděno na katexové diskové koloně CIM SO3 DISK při pH 4. Byl použit vzorek po druhé extrakci 5 x naředěn pufr 2-4AM.

Na dráze A byl pufr 2-4AM, na dráze B pufr 2-4BM

Nástřík vzorku: Bylo nastříknuto 10 ml vzorku. Doba chromatografie 60 min. Z nástříku bylo odebráno 40 ml FT.

Gradient: Doba chromatografie 60 minut. Prvních 5 minut pouze dráha A, od 5. do 35. minuty gradientová eluce pufr 2-4BM, od 35. minuty pouze pufr 2-4BM. Odchyt frakcí po dvou minutách.

Elektroforetická identifikace nebyla provedena.

6.2.2.15 Pokus- katex, pH 4, po 3. extrakci, CIM SO3 DISK

Měření bylo prováděno na katexové diskové koloně CIM SO3 DISK při pH 4. Byl použit vzorek po třetí extrakci 5 x naředěn pufr 2-4AM.

Na dráze A byl pufr 2-4AM, na dráze B pufr 2-4BM

Nástřík vzorku: Bylo nastříknuto 10 ml vzorku. Doba chromatografie 50 min.

Gradient: Doba chromatografie 60 minut. Prvních 5 minut pouze dráha A, od 5. do 35. minuty gradientová eluce pufr 2-4BM, od 35. minuty pouze pufr 2-4BM. Odchyt frakcí po dvou minutách.

Elektroforetická identifikace nebyla provedena.

6.3 Proteinová elektroforéza

Frakce proteinů byly identifikovány pomocí proteinové elektroforézy na SDS-PAGE nebo tricininové elektroforézy, kdy je rozdílnost těchto dvou metod pouze v přípravě a složení gelů a pufrů. Na elektroforézu SDS-PAGE byly použity gely s 12% a 15% kon-

centrací polyakrylamidu. K barvení gelu bylo použito barvení stříbrem, pouze v jednom pokusu bylo vyzkoušeno barvení Serva Blue G.

Složení použitých roztoků:

vzorkovací redukující pufr: na 10 ml- 1 ml 1 M Tris (pH 6,8), 2,4 ml glycerolu, 0,8 g SDS, 2 mg Comassie blue G-250, 0,36 g 2-ME.

akrylamid (30,8 % T, 2,6 % C): na 100ml- 30 g akrylamidu, 0,8 g bisakrylamidu

akrylamid (49,5 % T, 3 % C): na 100ml- 48 g akrylamidu a 1,5 g bisakrylamidu

1,5 M Tris (pH 8,8): na 250 ml- 45,4275 g Tris, pH 8,8

1 M Tris (pH 6,8): na 250 ml- 30,285 g Tris, pH 6,8

Elektrodový pufr: na 1 l- 25 mM Tris (3,0285g), 250 mM glycin (18,77 g), 0,1% SDS (1 g)

Katodový pufr: na 0,5 l- 0,1 M Tris (6,06 g), 0,1% tricin (8,96 g), 0,1% SDS (0,5 g), skladovat při 4°C

Anodový pufr: na 1 l- 0,2 M Tris (24,22 g), skladovat při 4°C

Fixační roztok: na 1 l- 50 % ethanol (500 ml), 12 % kyselina octová (120 ml), 0,05 % formaldehyd (37 % 1,35ml)

Oplachovací roztok: na 1 l- 20 % ethanol (200 ml)

Citlivostní roztok: na 1 l- 0,02 % thiosíran sodný (0,2 g)

Barvicí roztok: na 100 ml- 0,2% dusičnan stříbrný (0,2 g), 0,076 % formaldehyd (37 % 205 µl) – skladovat při 4°C v tmavé lahvi

Vyvolávací roztok: na 1 l- 6 % uhličitan sodný (60 g), 0,004 % thiosíran sodný (4 mg), 0,05 % formaldehyd (37 % 1,35 ml)

Zakončovací roztok: na 1 l- 12 % kyselina octová (120 ml)

Barvicí roztok Serva Blue G: na 500 ml- 10 % kyselina octová (50 ml), 0,1 % Serva Blue G (5 g)

6.3.1 Příprava vzorků

Vzorky, jež byly nastříknuty, frakce odchyceny z nástřiku a jednotlivé frakce proteinů rozdělených chromatografií byly 1x naředěny vzorkovacím redukujícím pufrem a

ponořeny do vroucí vodní lázně na dobu 5 minut. Takto připravené vzorky na elektroforézu byly těsně před dávkováním na gel ještě důkladně promíchány na vortexu.

6.3.2 Příprava gelu na SDS-PAGE

Nejprve bylo provedeno sestavení skel. Podle tab. 6 byl připraven separační gel, který byl nalit mezi skla asi půl centimetru pod okraj a převrstven destilovanou vodou, aby se vytvořil rovný kraj.

Tab. 6: Složení separačního gelu (na 10 ml gelu)

Koncentrace polyakrylamidu:	12%	15%
Složka	Objem složky (ml)	
H ₂ O	3,3	2,3
akrylamid (30,8 % T, 2,6 % C)	4,0	5,0
1,5M Tris (pH 8,8)	2,5	2,5
10% SDS	0,1	0,1
10% peroxidisíran amonný	0,1	0,1
TEMED	0,004	0,004

Po ztuhnutí (minimálně 5 min) separačního gelu byla voda vyměněna za zaostřovací gel, připraven dle tab. 7 a mezi skla byl vložen hřeben, jež vytvořil dráhy pro vzorky.

Tab. 7: Složení zaostřovacího gelu (na 6 ml gelu)

Složka	Objem (ml)
H ₂ O	4,1
akrylamid (30,8 % T, 2,6 % C)	1,0
1,0M Tris (pH 6,8)	0,75
10% SDS	0,06
10% peroxidisíran amonný	0,06
TEMED	0,006

Po zatuhnutí gelu (přibližně 20 min) byla skla obrácena výřezem do vnitřní strany aparatury. Hřeben byl opatrně odstraněn a dráhy byly promyty elektrodovým pufrem.

Do první dráhy byl vždy aplikován standard (PM 10-60 nebo PM 20-60) v množství 2-3 μl a do ostatních byly pipetovány vzorky po 5-20 μl . Skla s gelem byly vloženy do držáku s elektrodami a mezi ně byl nalit elektrodový pufr.

6.3.3 Příprava gelu na tricínovou elektroforézu

Opět bylo nejprve provedeno sestavení skel. Podle tab. 8 byly připraveny oba gely, přičemž poslední dvě složky (TEMED, 10% peroxidisíran amonný) byly přidány až těsně před nalíváním do skel, jelikož po přidání gely hned polymerují. Do zaostřovacího gelu byl dán hřeben.

Tab. 8: Složení separačního a zaostřovacího gelu na tricínovou elektroforézu

Druh a množství gelu	Separáčn $\acute{\text{ı}}$, 10 ml	Zaostřovací, 6,25 ml
Složka	Objem složky (ml)	
H ₂ O	1,9	4,2
akrylamid (49,5 % T, 3 % C)	2,1	0,5
gelový pufr, pH 8,45	3,33	1,55
50 % glycerol	2,67	
TEMED	0,009	0,01
10% peroxidisíran amonný	0,1	0,1

Po zatuhnutí gelu (přibližně 20 min) byla skla obrácena výřezem do vnitřní strany aparatury jako u předchozího, ovšem v tomto případě po odstranění hřebene byly dráhy promyty katodovým pufrem. Aplikace vzorku probíhala stejně. Skla s gelem byla vložena do držáku s elektrodami, mezi skla byl nalit katodový pufr a do držáku anodový.

6.3.4 Elektroforéza

Připravená aparatura byla připojena ke zdroji s nastaveným napětím 140 V. Elektroforéza probíhala, dokud nedosáhla čela spodního okraje gelu (indikováno modrým pruhem), to trvalo přibližně hodinu. Gel byl opatrně vyjmut, označen a dán do fixačního roztoku.

6.3.5 Barvení gelu stříbrem

Inkubace gelu ve fixačním roztoku trvala 2 hodiny na vibrační třepačce, lze ponechat bez míchání i přes noc. Poté byl fixační roztok vyměněn za oplachovací roztok, ve kterém byl gel inkubován dvacet minut třikrát po sobě. Následovala dvouminutová inkubace v citlivostním roztoku. Gel byl dvakrát propláchnut destilovanou vodou (po dobu 1 min) a vložen do barvicího roztoku na dvacet min při stálém třepání. Gel byl promýván v destilované vodě 20-60 sekund. Posléze byl dán do vyvolávacího roztoku do doby, než bylo dosaženo požadované intenzity bandu (cca 2-5 min), následně byl dán do zakončovacího roztoku při mírném míchání do doby, kdy se přestal uvolňovat oxid uhličitý („bublání“ roztoku).

Nakonec byly gely uloženy v destilované vodě do následného sušení či skenování.

6.3.6 Barvení gelu Serva Blue G

Jakmile byla elektroforéza dokončena, byl gel dán do barvicího roztoku Serva Blue G na 15 minut. Poté byl několikrát promyt roztokem 10% kyseliny octové, do doby jasně znatelných všech drah gelu.

6.3.7 Sušení, skenování gelů

Připravené gely byly u první řady vzorků sušeny, poté foceny. Dvě fólie byly dány do sušícího roztoku. Jedna z nich byla umístěna do sušícího rámečku. Na ni byl dán gel a oporně byly odstraněny vzduchové bubliny. Druhá fólie byla dána shora, opět byly odstraněny vzduchové bubliny. Nakonec bylo dokončeno sestavení sušícího rámečku a gel sušen při laboratorní teplotě. Po usušení byl gel uložen v sešitu a focen.

Ve druhé řadě vzorků byl použit méně pracný, časově i finančně výhodnější postup skenování gelů. Po barvení byly gely vloženy do sáčku a jednoduše naskenovány do počítače.

7 VÝSLEDKY A DISKUSE

V první řadě pokusů byla frakcionace pšeničných proteinů prováděna za různých podmínek. Bylo použito rozdílné množství nastříknutého vzorku, pH, doba nástřiku, délka a strmost gradientu, rychlost průtoku. Vzorky byly připravovány ze čtyř druhů mouky extrakcí v 0,1 M fosfátovém pufru (pH 6,9) + 0,5 hm.% SDS. Po chromatografické frakcionaci byla prováděna elektroforéza SDS-PAGE, která ukázala, že záchyt takto extrahovaných proteinů na kolonu probíhá velmi špatně. Jako důkaz, že proteiny nebyly zachyceny na kolonách, ale při nástřiku jimi procházely, bylo provedeno stanovení koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové (tab. 9).

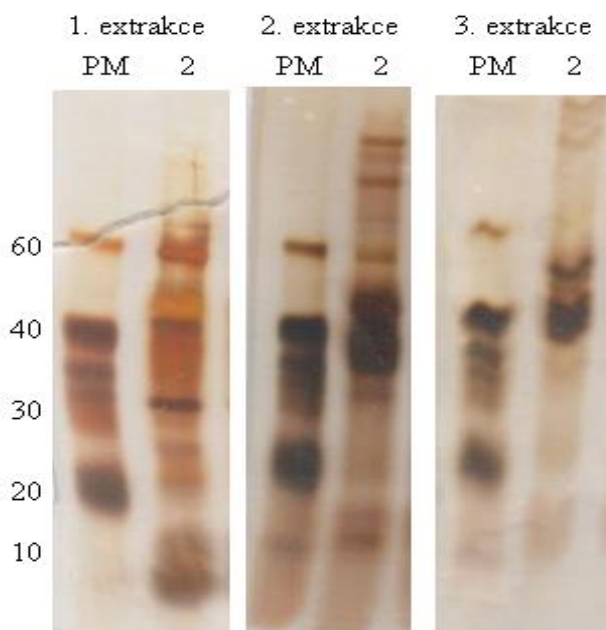
Tab. 9: Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové

Vzorek	V _{analyzovaného vz.} [ml]	A	C _{výsledné} [μg/ml]	V _{celk.} [ml]	m _{proteinů celk.} [μg]
Po dialýze	100	0,239	44,1	17	750
FT	100	0,119	22,1	33	730

Vysvětlení nezdaru dělení proteinů u všech pokusů první řady vzorku by mohlo být následující. Přítomné SDS nebylo zcela odstraněno dialýzou. SDS je velmi silný anion. Při anexové chromatografii se vázalo na kolony místo proteinů. Při katexové chromatografii obalilo proteiny a ty se tedy nemohly vázat na kolonu. Tak bylo prokázáno, že dialýza není dostačující metodou k odstranění SDS. Tento postup nebyl nadále používán.

Ve druhé řadě vzorků byla použita velmi jednoduchá extrakce 0,05 M kyselinou octovou obsahující jako redukční činidlo 2-merkptoethanol. Extrakce probíhala třikrát po sobě, čímž byl připraven 1., 2. a 3. extrakt. Na obr. 6 jsou znázorněny tři gely z tricínové elektroforézy po extrakci a úpravě pH na 10.

Pomocí této metody lze posuzovat rozpustnost proteinů v použitém extrakčním činidle (0,05 M kyselina octová + 0,1% 2-merkptoethanol). Na obr. 6 je vidět, že v prvním extraktu je velmi nízké zastoupení vysokomolekulárních proteinů (nad 60 kDa), které byly rozpuštěny až při druhé a třetí extrakci. Také je zde vidět, že proteiny o molekulové hmotnosti do 30 kDa jsou velmi dobře rozpustné, proto se v extraktu 2. a 3. vyskytují v mnohem menší míře.



Obr. 6: Tricinová elektroforéza 1., 2. a 3. extraktu (pH 10)

Popis: PM: proteinový marker známých molekulových hmotností (60, 40, 30, 20 a 10 kDa), dráha 2: extrakt proteinů 5 x naředěn puřrem 2-10AM, pH 10.

Chromatografické dělení proteinů

Získané extrakty byly dále děleny metodami chromatografie na měničích kationtů a aniontů. Protože nebyla určena totožnost analyzovaných proteinů, byly pro ně zavedeny zkratky vycházející z jejich zdánlivé relativní molekulové hmotnosti stanovené pomocí tricínové elektroforézy.

Katexová chromatografie

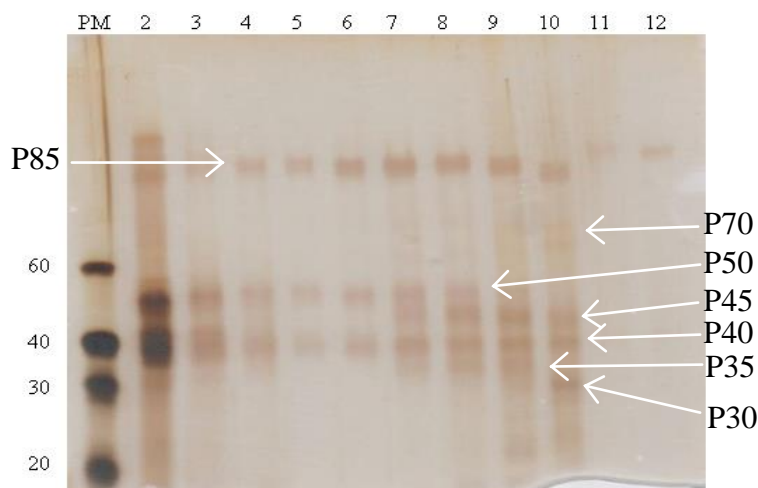
Chromatografie na měničích kationtů byly prováděny v pH 4 a 5. Jak je znázorněno na obr. 8 a 10, byl eluční profil v obou případech podobný, proteiny zachycené na koloně eluovaly v jednom píku. To by ovšem svědčilo o nepříliš dobrém dělení proteinové směsi. Analýza pomocí tricínové elektroforézy však ukázala, že lepkové proteiny touto metodou je možné částečně rozdělit, jak je patrné z obr. 7, 9, 11, 12.

Je zde vidět při porovnání nastříkovaných vzorků a FT, že nebyla velká část proteinů zachycena. Mezi proteiny, které na koloně zachyceny byly, dominují v pH 4 zejména vysokomolekulární protein P85 a skupina proteinů mezi 35 a 50 kDa označených jako P35, P40, P45 a P50. Dále byl v eluovaných frakcích významně zastoupen protein P30 a také protein P70, který byl však výrazně méně koncentrovaný. Také je zde patrná přítomnost

některých proteinů o molekulových hmotnostech nižších než 20 kDa, které však nejspíše proteiny lepkovými nejsou.

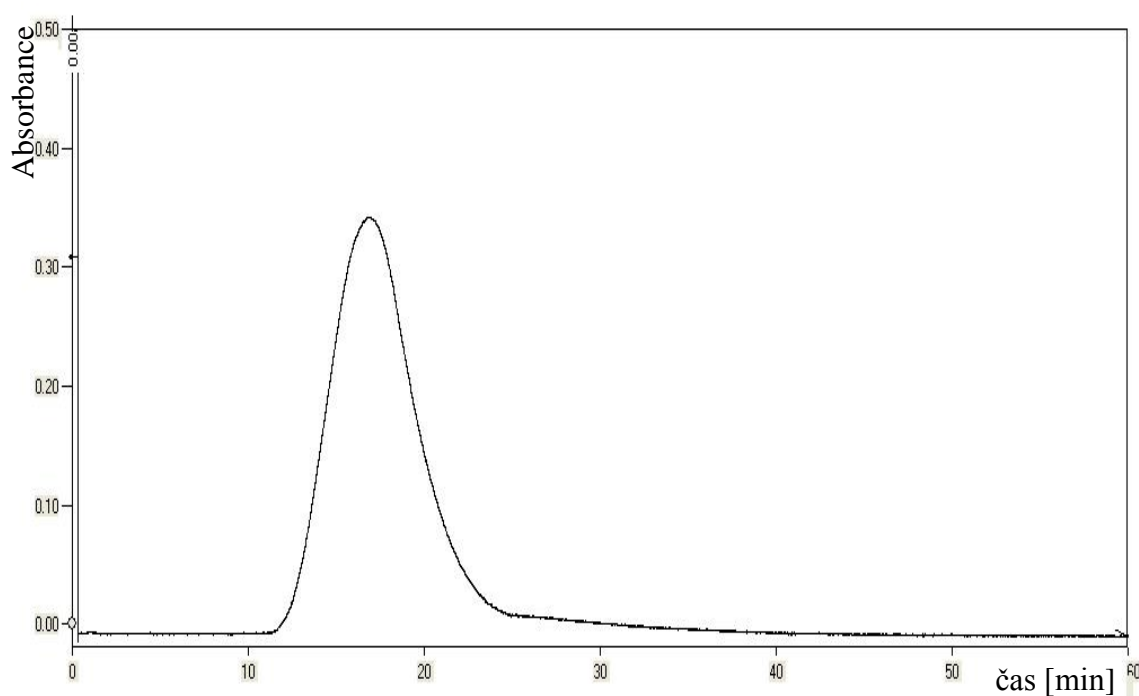
Porovnáním s katexovou chromatografií v pH 5 je vidět posun eluce většiny píků do frakcí s nižšími pořadovými čísly, tedy k části gradientu o nižší iontové síle mobilní fáze. U proteinu P85 dochází v podstatné míře až k posunu mezi nezachycené proteiny (FT), zatímco některé další byly posunuty jen o několik frakcí a jejich eluce byla naopak intenzivnější. Z tohoto pozorování lze usoudit, že P85 má relativně nízký izoelektrický bod, takže v pH 5 je jeho kladný náboj velmi malý a jeho zachycení na kolonu slabé. Proto byla zachycena jen malá část, která poté eluovala v nejnižších frakcích gradientu iontové síly. Naopak v pH 4 byl už nabit dostatečně, takže se na kolonu zachytil pevněji a eluoval ve vyšších frakcích. Proteiny P70, P63, P50, P40, P35 a P30 jsou naopak silnějšími kationty už v pH 5, proto v tomto pH eluovaly ve středních frakcích gradientu, zatímco v pH 4 byla jejich eluce posunuta vysoko a pravděpodobně část z nich zůstala na koloně zachycena i ve 100% mobilní fáze B.

Katexovou chromatografií tedy můžeme použít k oddělení uvedených proteinů od proteinů ostatních a tyto proteiny můžeme navzájem oddělit vhodnou volbou pH a výběrem příslušných frakcí.

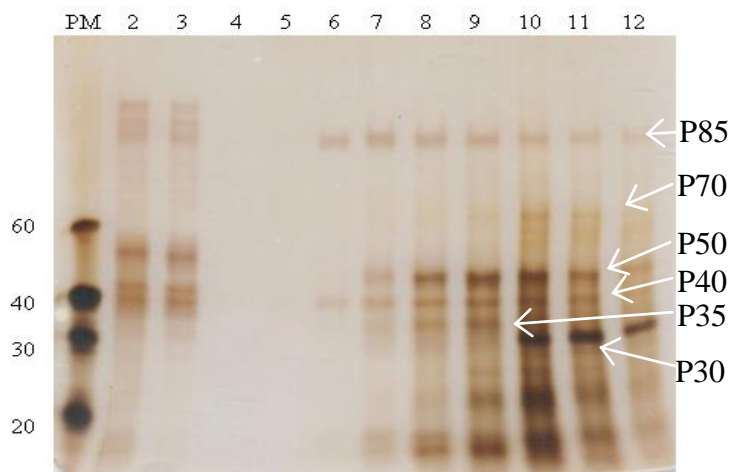


Obr. 7: Tricinová elektroforéza vzorku po 2. extrakci a IEC chromatografii při pH 4

Popis: PM: proteinový marker známých molekulových hmotností (60, 40, 30 a 20 kDa), dráha 2: 2. extrakt proteinů 5 x naředěn puřrem 2-4AM, pH 4, dráha 3: proteiny, které odešly hned při nástřiku (FT), dráha 4 až 12: frakce odebrané při gradientu z časů 3, 12, 14, 15, 16, 17, 19, 28 a 30 min.

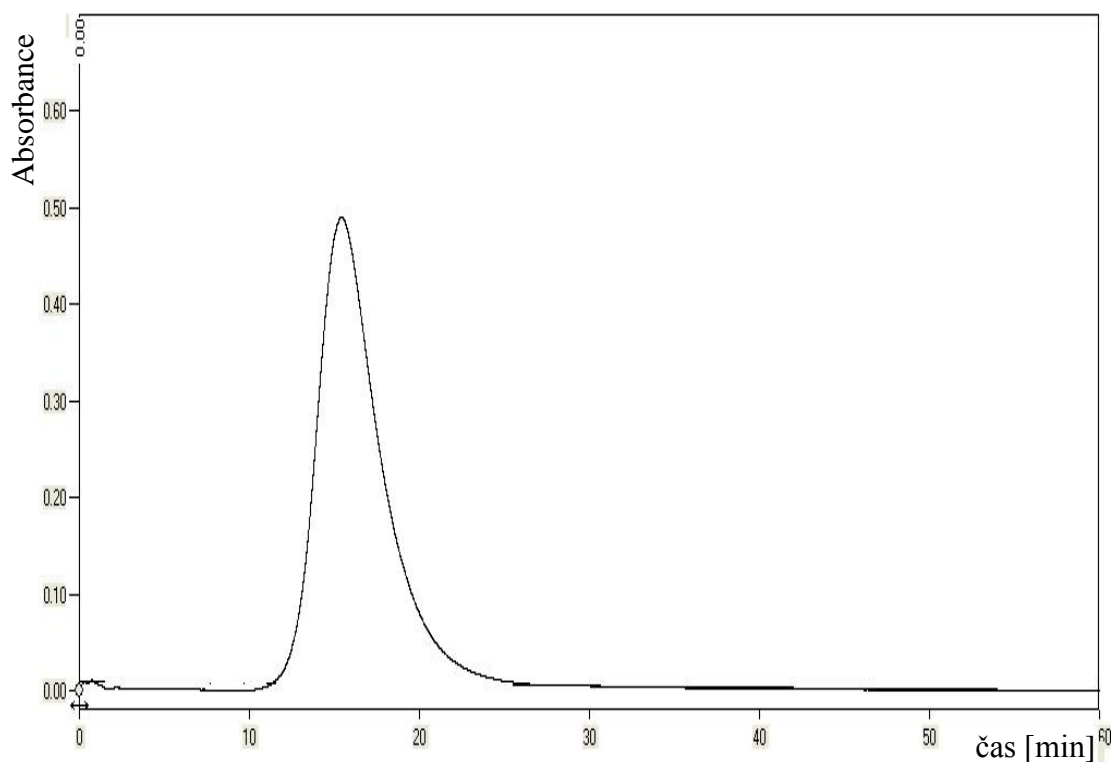


Obr. 8: Chromatografie na měničích kationtů v pH 4 vzorku po 3. extrakci

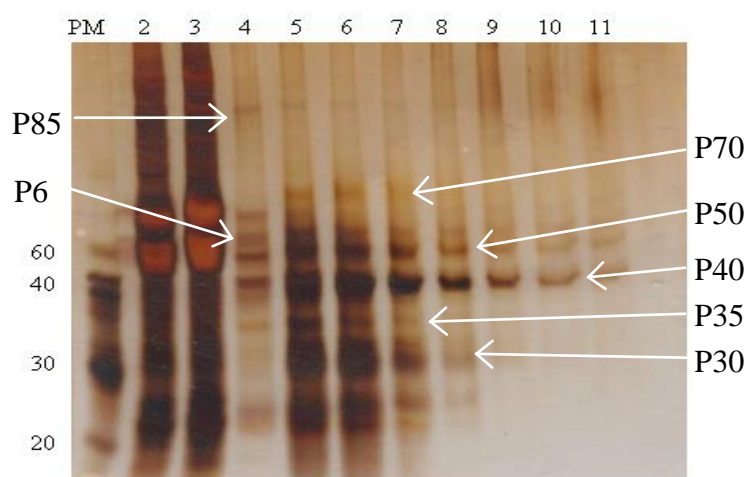


Obr. 9: Tricinová elektroforéza vzorku po 3. extrakci a IEC chromatografii při pH 4

Popis: PM: proteinový marker známých molekulových hmotností (60, 40, 30 a 20 kDa), dráha 2: 3. extrakt proteinů 5 x naředěn pufrům 2-4AM, pH 4, dráha 3: FT, dráha 4 až 12: frakce odebrané při gradientu z časů 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 21 a 23 min.

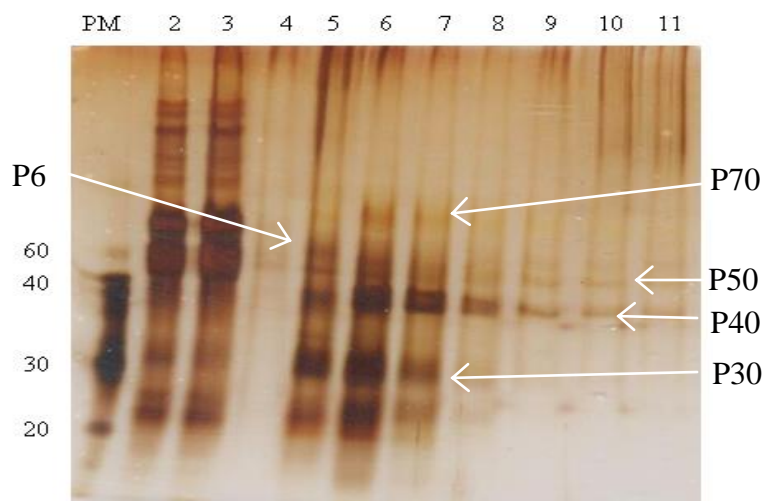


Obr. 10: Chromatografie na měničích kationtů v pH 5 vzorku po 2. extrakci



Obr. 11: Tricinová elektroforéza vzorku po 2. extrakci a IEC chromatografii při pH 5

Popis: PM: proteinový marker známých molekulových hmotností (60, 40, 30 a 20 kDa), dráha 2: 2. extrakt proteinů 5 x naředěn puřrem 2-5AM, pH 4, dráha 3: FT, dráha 4 až 11: frakce odebrané při gradientu z časů 12-13, 14-15, 16-17, 18-19, 20-21, 22-23, 24-25 a 26-27 min.



Obr. 12: Tricinová elektroforéza vzorku po 3. extrakci a IEC chromatografii při pH 5

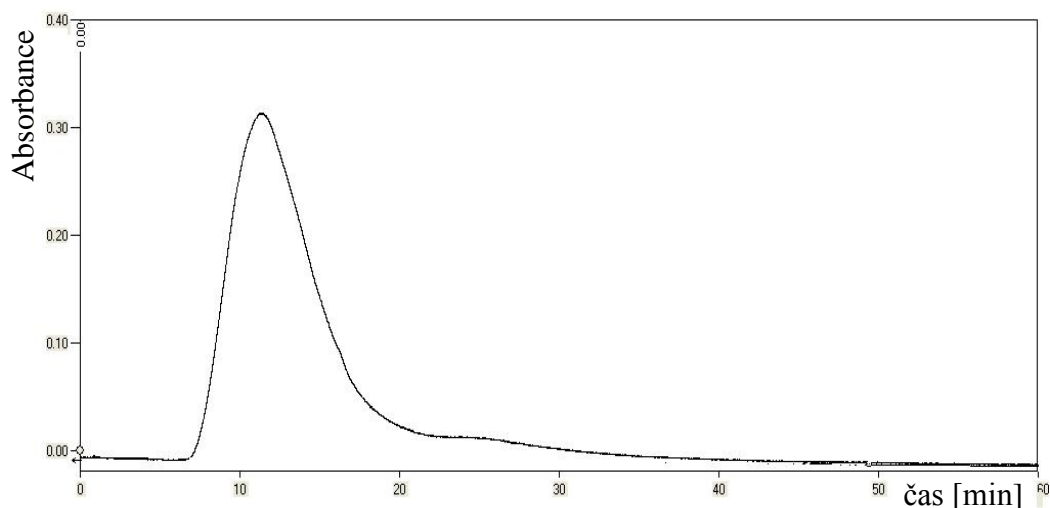
Popis: PM: proteinový marker známých molekulových hmotností (60, 40, 30 a 20 kDa), dráha 2: 3. extrakt proteinů 5 x naředěn pufrům 2-5AM, pH 5, dráha 3: FT, dráha 4 až 11: frakce odebrané při gradientu z časů 12-13, 14-15, 16-17, 18-19, 20-21, 22-23, 24-25 a 26-27 min.

Anexová chromatografie

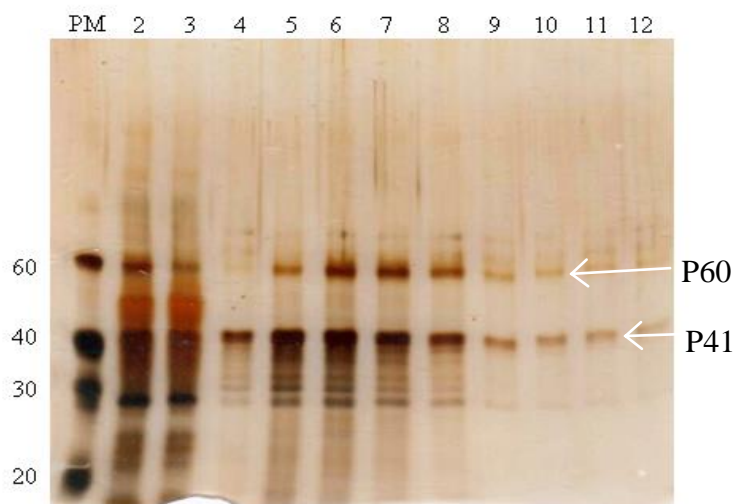
Chromatogram z chromatografie na měničích aniontů je dosti podobný chromatogramu z katexové chromatografie (obr. 13, 15). Ani zde není patrné rozdělení proteinů do jednotlivých píků. Ovšem z gelových elektroforéz na obr. 14 a 16 je vidět, že i zde dochází k záchytu jen některých proteinů, a to zpravidla odlišných od těch, které byly zachyceny v katexové chromatografii.

Anexové chromatografie byly prováděny v pH 10 a 8. V obou případech ve eluovaných frakcích jednoznačně dominují proteiny P60 a P41. Protein P41 by mohl být identický s proteinem P40 zachyceným v katexové chromatografii, ale ze získaných výsledků to nelze jednoznačně potvrdit. Na gelu po chromatografii v pH 10 je patrný ještě velmi intenzivní pík proteinu P10, který bohužel nebyl zachycen na gelu po chromatografii v pH 8, jelikož elektromigrace nebyla včas zastavena. Tento protein ale pravděpodobně nepatří do skupiny lepkových proteinů. Kromě zmiňovaných proteinů P60 a P41 byla na anexu zachycena ještě řada proteinů v rozmezí 25-41 kDa, které jsou jasně patrné zejména v pH 8.

Rozdíl mezi provedením anexové chromatografie v pH 8 a 10 nebyl příliš výrazný, v pH 10 však lze pozorovat větší množství málo zastoupených proteinů, které způsobují méně čisté pozadí („šmouhu“) v dráhách vzorků z jednotlivých frakcí. To může být způsobeno silnější schopností proteinů tvořit záporně nabitý iont ve vyšším pH. Zdá se však, že tento rozdíl v pH použitých mobilních fází nelze využít k oddělení dalších proteinů.

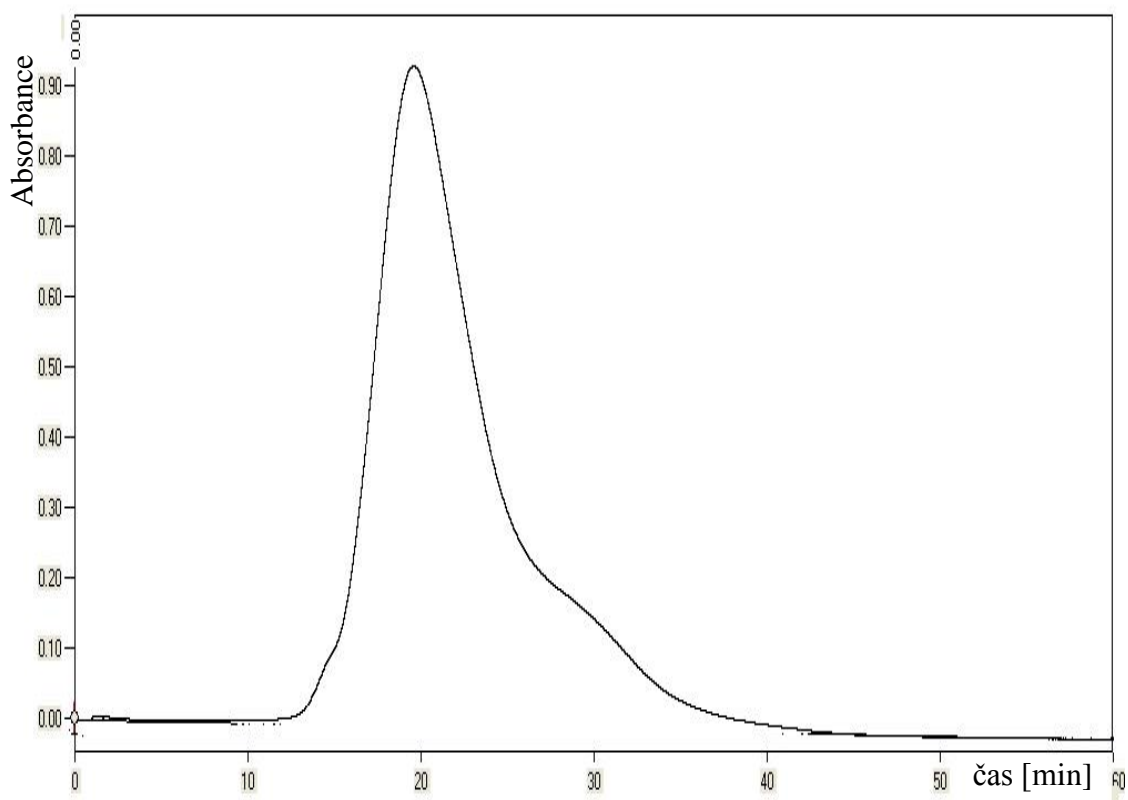


Obr. 13: Chromatografie na měničích aniontů v pH 8 vzorku po 1. extrakci

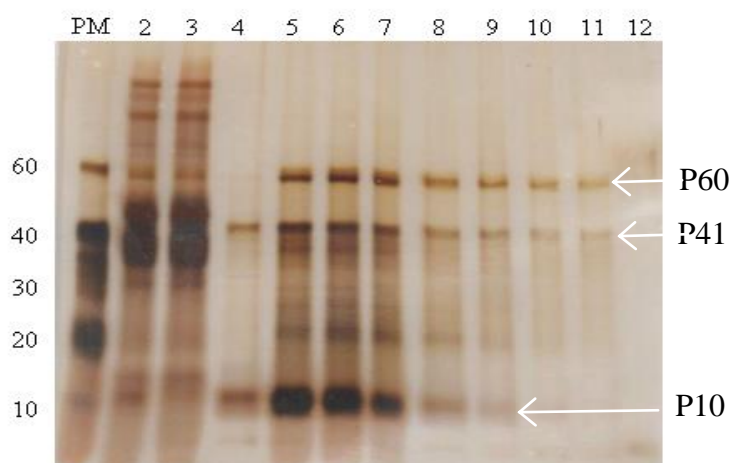


Obr. 14: Tricinová elektroforéza vzorku po 1. extrakci a IEC chromatografii při pH 8

Popis: PM: proteinový marker známých molekulových hmotností (60, 40, 30 a 20 kDa), dráha 2: 1. extrakt proteinů 5 x naředěn pufrům 2-8AM, pH 8, dráha 3: FT, dráha 4 až 12: frakce odebrané při gradientu z časů 8-9, 10-11, 12-13, 14-15, 16-17, 22-23, 24-25, 26-27 a 30-31 min.



Obr. 15: Chromatografie na měničích aniontů v pH 10 vzorku po 2. extrakci



Obr. 16: Tricinová elektroforéza vzorku po 2. extrakci a IEC chromatografii při pH 10

Popis: PM: proteinový marker známých molekulových hmotností (60, 40, 30, 20 a 10 kDa), dráha 2: 2. extrakt proteinů 5 x naředěn puforem 2-10AM, pH 10, dráha 3: FT, dráha 4 až 12: frakce odebrané při gradientu z časů 14-15, 18-19, 20-21, 22-23, 24-25, 26-27, 28-29, 30-31 a 34-35 min.

Vzhledem k omezeným časovým a technickým možnostem byly vyzkoušeny pouze dva postupy extrakce a několik variant iontoměničové chromatografie. Extrakce roztokem obsahujícím SDS, která se využívá k izolaci cereálních proteinů z mouky při dělení pomocí např. gelové chromatografie [20,49,50], není vhodná pro iontoměničovou chromatografii pro nesnadnost oddělení SDS od proteinů dialýzou. Naopak extrakce roztokem kyseliny octové s následnou úpravou pH na požadovanou hodnotu vhodnými pufrů se ukázala jako vhodná metoda izolace proteinů z mouky pro ionexovou chromatografii.

Chromatografickým dělením byly identifikovány některé proteiny, které v kyselém prostředí snadno vytvářejí kation a vážou se proto na katex. U těchto proteinů byla pozorována výrazná závislost síly vazby na pH roztoku v rozmezí hodnot 4-5, z toho lze předpokládat, že jejich izoelektrický bod se nachází blízko nad touto oblastí.

Podobně byly identifikovány proteiny, které se vážou na anex, tedy ty, které jsou ve zvolené oblasti pH 8-10 nabitý záporně. Zde bylo identifikováno několik proteinů, mezi nimi však dominují dva proteiny označené jako P41 a P60. Závislost na volbě pH nebyla příliš výrazná, proto se lze domnívat, že tyto proteiny mají izoelektrický bod výrazně pod tuto oblastí.

U obou typů chromatografie byla pozorována celá řada proteinů, které se na kolonu nenavázaly nebo se navázaly jenom zčásti. Tento jev však již nelze vysvětlit jednoduše pomocí hodnoty izoelektrického bodu a pH mobilních fází. Vzhledem k volbě pH v provedených experimentech totiž nutně musí každý protein mít pH buď vyšší než 5, v tom případě by se měl vázat na katex, nebo nižší než 8, což by mělo vést k jeho vazbě na anex. Dělení však může být ovlivněno ještě dalšími faktory.

Nejprve za to může být odpovědný velmi vysoký obsah proteinů v nastříkovaných vzorcích. V tomto případě by kolona mohla být předávkována a další proteiny by nemohly být vázány. Samozřejmě by se tedy zachytily jenom ty proteiny s nejvyšší afinitou ke koloně. Tento vliv by bylo možno prokázat experimenty s postupně se snižujícím množstvím nastříkovaných proteinů, což bohužel v této práci nebylo provedeno.

Dalším možným vysvětlením by mohla být obecně slabá vazba lepkových proteinů na iontoměničové kolony. Tyto proteiny jsou totiž silně hydrofobní, takže i relativně nízká iontová síla ve vazebných mobilních fázích A může vést k podstatnému oslabení vazby mezi proteinem a iontoměničem.

Experimenty provedené v této práci představují základ pro vytvoření postupu izolace jednotlivých lepkových proteinů pro účely jejich dalších analýz a výzkumného použití. Byla prokázána možnost oddělení některých proteinů od zbytku směsi, jakož i jejich dílčí vzájemné rozdělení.

Pro vylepšení postupu by bylo třeba provést ještě řadu dalších experimentů za odlišných podmínek chromatografie (pH, iontová síla, atd.). Dále by bylo dobré vyzkoušet i různé množství nastříkovaných vzorků. Pozornost si nepochybně zaslouží také extrakční metody. Ty totiž umožňují prvotní částečné dělení směsi lepkových proteinů, a tím také mohou samotné chromatografické stanovení výrazně usnadnit.

V neposlední řadě by bylo vhodné skloubit metody ionexové chromatografie s dalšími chromatografickými technikami, či jinými metodami. Frakce získané iontoměničovou chromatografií by mohly být dále děleny gelovou chromatografií na základě molekulové hmotnosti proteinů nebo hydrofobní chromatografií na základě interakcí s nepolárními skupinami příslušných nosičů. Takováto kombinace by jistě sloužila k získání mnohem lépe definované skupiny proteinů.

Jak je vidět, iontoměničová chromatografie má velký potenciál stát se dobrou dělicí metodou pro pšeničné proteiny. Je však nutno tuto metodu hodně zdokonalit a nejlépe stanovit jednotné podmínky. Je patrné, že tomu bude muset předcházet ještě mnoho a mnoho experimentů.

ZÁVĚR

Pšenice patří mezi obilniny s největším objemem produkce. V této době je pro člověka, téměř nepostradatelná, výjimku tvoří lidé s onemocněním zvaným celiakie. Mnohdy ji výrobci přidávají i tam, kde by být neměla (do jogurtu, sladkostí, masných výrobků apod.). Zásobní proteiny pšenice svou schopností tvořit trojrozměrnou síť – lepek, který je kostrou těsta, jsou jedinečné. Jejich kvalita ovlivňuje technologickou jakost mouky.

Tato bakalářská práce se zabývala optimalizací chromatografického dělení proteinů z mouky. Teoretická část obsahuje informace o složení pšeničné mouky. Je především zaměřena na její bílkoviny a způsoby jejich izolace a stanovení. Praktická část je zaměřena na dělení proteinů chromatografií na iontoměničích. Rozdělené frakce proteinů byly následně identifikovány pomocí gelové elektroforézy.

Byly použity dva způsoby extrakce proteinů z pšeničné mouky. Extrakce fosfátovým pufrům obsahující dodecylsulfát sodný se ukázala, jako nevhodná metoda přípravy vzorků pro iontoměničovou chromatografii pro nesnadnost oddělení zbytků SDS od proteinů dialýzou. To vedlo k nedostatečnému zachytu proteinů na kolonu. Dále tedy tato extrakce používána nebyla. Naopak extrakce roztokem kyseliny octové obsahující 2-merkptoethanol s následnou úpravou pH na požadovanou hodnotu vhodnými pufrů se projevila jako vhodná metoda izolace proteinů z mouky pro chromatografii na iontoměničích.

Metodami chromatografie na iontoměničích byly odděleny některé lepkové proteiny od ostatních proteinů přítomných v extraktu mouky kyselinou octovou. Chromatografickým dělením na měniči kationtů v pH 4 a v pH 5 byly odděleny proteiny P85, P70, P63, P50, P45, P40, P35 a P30 (označení proteinů je podle zdánlivé molekulové hmotnosti stanovené podle tricínové elektroforézy). U těchto proteinů byla pozorována velká závislost síly vazby na použitém pH mobilní fáze. Proteiny by mohly být dále odděleny vhodnou volbou pH a výběrem příslušných frakcí. Chromatografickým dělením na měniči aniontů v pH 8 a v pH 10 bylo také odděleno mnoho proteinů v rozmezí 25 – 40 kDa. Hlavními byly ovšem P41 a P60, které se vyskytovaly dominantně a nezávisle na použitém pH.

Tyto metody chromatografického dělení jsou tedy vhodné pro frakcionaci pšeničných bílkovin za účelem izolace užší skupiny proteinů pro další analýzu. Je ovšem nutno provést mnohem více experimentů, které by především sloužily k optimalizaci podmínek.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] PŘÍHODA, J., P. SKŘIVAN a M. HRUŠKOVÁ. *Cereální chemie a technologie I: cereální chemie, mlýnská technologie, technologie výroby těstovin*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2003, 202 s. ISBN 80-708-0530-7.
- [2] HRABĚ, J. et al. *Základy zbožiznalství potravin*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2011, 167 s. ISBN 978-80-7454-118-6.
- [3] LANGMAIER, F. *Nauka o zboží*. 2. vyd., nezměn. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, Fakulta managementu a ekonomiky, 2002, 144 s. ISBN 80-731-8092-8.
- [4] HRABĚ, J. a A. KOMÁR. *Technologie, zbožiznalství a hygiena potravin*. Vyškov: Vysoká vojenská škola pozemního vojska ve Vyškově, 2003, 163 s. ISBN 80-723-1107-7.
- [5] MIKULOVÁ, E. *Chromatografické stanovení vitaminů skupiny B v cereáliích*. Zlín, 2010. DP. UTB ve Zlíně, FT, Ústav biochemie a analýzy potravin.
- [6] PÁNEK, J. et al. *Základy výživy*. 1. vyd. Praha: Svoboda Servis, 2002, 207 s. ISBN 80-863-2023-5.
- [7] KUČEROVÁ, J. *Technologie cereálií*. 1. vyd. Brno: MZLU, 2004. 141 s. ISBN 80-7157-811-8.
- [8] HRABĚ, J., F. BUŇKA a I. HOZA. *Technologie výroby potravin rostlinného původu pro kombinované studium*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická, 2007, 189 s. ISBN 978-80-7318-520-6.
- [9] DODOK, L. *Chémia a technológia trvanlivého pečiva*. 1. vyd. Bratislava: Západoslóvenské tlačiarne, n.p., závod Svornosť, 1988, 300s. ISBN 063-037-87.
- [10] CHRPOVÁ, D. *S výživou zdravě po celý rok: Zdraví & životní styl*. 1. vyd. Praha: Granda, 2010, 136 s. ISBN 978-80-247-2512-3.
- [11] RUMÍŠKOVÁ, M. *Základy výživy*. 1. vyd. Brno: Copyright, 2002, 142 s. ISBN 80-86494-05-5.
- [12] PŘÍHODA, J. Jak posoudit nutriční hodnotu chleba a pečiva?. *Výživa a potraviny*. 2004, č. 5.

- [13] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin*. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999, 328 s. ISBN 80-902-3912-9.
- [14] ODSTRČIL, J. a M. ODSTRČILOVÁ. *Chemie potravin*. 1. vyd. Brno: MIKADAPRESS, 2006, 164 s. ISBN 80-7013-435-6.
- [15] PŘÍHODA, J., P. HUMPLÍKOVÁ a D. NOVOTNÁ. *Základy pekárenské technologie*. 1. vyd. Praha: Pekař a cukrář s.r.o., 2003, 363 s. ISBN 80-902922-1-6.
- [16] HULÍN, P., P. DOSTÁLEK a I. HOLECH. Metody stanovení lepkových bílkovin v potravinách. *Chemické listy*. 2008, č. 102, s. 327-337. ISSN 1213-7103.
- [17] ALPLACHTA, J., G. ALLMAIER a J. CHMELÍK. Proteomická identifikace glutenových bílkovin. *Chemické listy*. 2005, č. 99, s. 967-971. ISSN 1213-7103.
- [18] STATHOPOULOS, C. E. et al. Effect of addition of protein fractions extracted from flours of different baking quality on gluten rheology. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2009, č. 48, s. 141-147. ISSN 1336-8672.
- [19] CHURÁČEK, J. et al. *Analytická separace látek*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1990, 384 s. ISBN 80-030-0569-8.
- [20] BIETZ, J. A. HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY OF CEREAL PROTEINS. In: POMERANZ, Y. *Advances in Cereal Science and Technology*. 8. vyd. St. Paul, Minesota: American Association of Cereal Chemists, Inc., 1986, s. 105-170. ISBN 0-913250-45-7.
- [21] BIETZ, J. A. HPLC of Cereal Endosperm Storage Proteins. In: GOODING, K. M. a F. E. REGNIER. *HPLC of Biological Macromolecules: Methods and Application*. New York-Basel: M. Dekker, 1990. s. 429-455. ISBN 0-8247-7879-0.
- [22] DVOŘÁČEK, V. *Optimalizace Osbornovy metody kvantifikace bílkovinných frakcí zrna pšenice ozimé (Triticum aestivum L.)*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2006. ISBN 80-86555-81-X.
- [23] HOMOLA, L. Hodnocení kvality bílkovinného komplexu u vybraných odrůd pšenice pro pekárenské a pečivářské využití. *MendelNet*. 2012, s. 770-777.
- [24] BIETZ, J. A. Separation of Cereal proteins by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of chromatography*. 1983, č. 255, s. 219-238.

- [25] HUEBNER, F. R. a J. A. BIETZ. Improved Chromatographic Separation and Characterization of Ethanol-Soluble Wheat Proteins. *Cereal Chem.* 1993, č. 70 (5), s. 506-511. ISSN 0009-0352.
- [26] THEWISSEN B. G. et al. Foaming Properties of Wheat Gliadin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2011, č. 59, s. 1370-1375. ISSN 1520-5118.
- [27] BIETZ, J. A. et al. Gliadin Analysis by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography: Optimization of Extraction Condition. *Cereal Chem.* 1984, č. 61 (2), s. 124-129. ISSN 0009-0352.
- [28] LOOKHART G. L., T. S. COX a O. K. CHUNG. Statistical Analyses of Gliadin Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Patterns of Hard Red Spring and Hard Red Winter Cultivars Grown in a Common Environment: Classification Indices. *Cereal Chem.* 1993, č. 70 (4), s. 430-434. ISSN 0009-0352.
- [29] PISTÓN F. et al. Down-Regulating γ -Gliadins in Bread Wheat Leads to Non-Specific Increases in Other Gluten Proteins and Has No Major Effect on Dough Gluten Strength. *PLOS ONE.* September 2011, č. 6, s. 1-10. ISSN 1932-6203.
- [30] COLE, E. W., J. V. TORRES a D. D. KASARDA. Aggregation of A-Gliadin: Gel Permeation Chromatography. *Cereal Chem.* 1983, č. 60 (4), s. 306-310. ISSN 0009-0352.
- [31] BURNOUF, T. a J. A. BIETZ. Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography of reduced Glutenin, a Disulfide-Bonded Protein of wheat endosperm. *Journal of chromatography.* 1984, č. 299, s. 185-199. ISSN 0021-9673.
- [32] HUEBNER, F. R. a J. A. BIETZ. Improvements in Wheat Protein Analysis and Quality Prediction by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Cereal Chem.* 1987, č. 64 (1), s. 15-20. ISSN 0009-0352.
- [33] DONG, K. et al. Characterization of HMW Glutenin Subunits in Bread and Tetraploid Wheats by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Cereal Research Communications.* 2009, č. 37 (1), s. 65-72. ISSN 1788-9170.
- [34] BRADOVÁ, J., V. DVOŘÁČEK a L. ŠTOČKOVÁ. Využití gelové a čipové elektroforézy k identifikaci podjednotek gluteninů s vysokou a nízkou molekulovou

- hmotností u pšenice*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2011. ISBN 978-80-7427-056-7.
- [35] TAHIR, N. A. Characterization and glutenin diversity in tetraploid wheat varieties in Sulaimanyah by wheat storage proteins. *African Journal of Biotechnology*. 2008, č. 7 (22), s. 4031-4036. ISSN 1684-5315.
- [36] VŠCHT. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. *Ústav konzervace potravin: Metodika CZE, ITP*. Seznámení s metodou [online]. Copyright, Datum aktualizace: 10. 4. 2014 [citováno 12. 4. 2014]. dostupné na [www: http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/cze/CZE.pdf](http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/cze/CZE.pdf)
- [37] BRADOVÁ, J. a A. ŠAŠEK. *Optimalizace metod elektroforézy pro identifikaci odrůd pšenice (Triticum Aestivum L)*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2007, 36 s. ISBN 978-80-87011-10-2.
- [38] ROWAN D. Biochemical web. *Elektroforéza*. [online]. Copyright, Datum aktualizace: 29. 1. 2004 [citováno 10. 4. 2014]. dostupné na [www: http://biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm](http://biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm)
- [39] INGLET G. E. Cereal Proteins. In: Whitaker a Tannenbaum. *FOOD PROTEINS*. Westport, Connecticut: AVI Publishing company, 1977, s. 267-290.
- [40] SMOLKOVÁ-KEULEMANSOVÁ, E. 100. VÝROČÍ OBJEVU CHROMATOGRAFIE Život a dílo M. S. Cvětá. *Chemické listy*. 2003, č. 97, s. 134-139. ISSN 1213-7103.
- [41] DEAN J. A. *Chemické dělicí metody*. Praha: SNTL, 1974, 402 s.
- [42] BIETZ, J. A. a D. G. SIMPSON. Elektroforesis and Chromatography of wheat proteins: available methods, and procedures for statistical evaluation of the data. *Journal of chromatography*. 1992, č. 624, s. 53-80. ISSN 0021-9673.
- [43] ROWAN D. Biochemical web. *Chromatografie*. [online]. Copyright, Datum aktualizace: 29. 1. 2004 [citováno 19. 4. 2014]. dostupné na [www: http://biochemie.sweb.cz/x/metody/chromatografie.htm](http://biochemie.sweb.cz/x/metody/chromatografie.htm)
- [44] VŠCHT. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. *Ústav konzervace potravin*. HPLC metodika [online]. Copyright, Datum aktualizace: 10. 4. 2014

- [citováno 19. 4. 2014]. dostupné na [www: http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/hplc/HPLC.pdf](http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/hplc/HPLC.pdf)
- [45] COUFAL P. High Performance Liquid Chromatography, HPLC [online]. Datum aktualizace: 2. 6. 1996 [citováno 20. 4. 2014]. dostupné na [www: http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html](http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html)
- [46] BIETZ J. A. High Performance Liquid of Chromatography: How Proteins Look in Cereals. *Cereal. Chem.* 1985, č. 62 (3), s. 201-202. ISSN 0009-0352.
- [47] OSZVALD M. et al. Comparative Study of the Effect of Incorporated Individual Wheat Storage Proteins on Mixing Properties of Rice and Wheat Doughs. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2011, č. 59, s. 9664-9672. ISSN 1520-5118.
- [48] COUFAL P. Ion exchange chromatography, IEC [online]. Datum aktualizace: 15. 7. 1996 [citováno 21. 4. 2014]. dostupné na [www: http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/iec.pdf](http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/iec.pdf)
- [49] DACHKEVITCH, T. a J. C. AUTRAN. Prediction of Baking Quality of Bread Wheats in Breeding Programs by Size-Exclusion High-Performance Liquid Chromatography. *Cereal Chem.* 1989, č. 66 (6), s. 448-456. ISSN 0009-0352.
- [50] DVOŘÁK, M. *Studium vztahu mikrostruktury pšeničného lepku a kvantitativního zastoupení lepkových proteinu.* Zlín, 2013. DP. UTB ve Zlíně, FT, Ústav technologie potravin.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

2-ME	2-merkaptoethanol
DMF	Dimethylformamid
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzymová imunoanalýza na pevné fázi (Enzyme - Linked Immunosorbent Assay)
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture Organization)
GLC	Plynová rozdělovací chromatografie
GPC	Gelová permeační chromatografie
GSC	Plynová chromatografie na molekulových sítích
HMW	Vysokomolekulární (High Molecular Weight)
HMW-GS	Podjednotky gluteninů s vysokou molekulovou hmotností (High Molecular Weight Glutenin Subunits)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
IEC	Iontově výměnná chromatografie (Ion-Exchange High Performance Liquid Chromatography)
IE-HPLC	Iontově výměnná vysokoúčinná kapalinová chromatografie (Ion-Exchange High Performance Liquid Chromatography)
LLC	Kapalinová rozdělovací chromatografie

LMW	Nízkomolekulární (Low Molecular Weight)
LMW-GS	Podjednotky gluteninů s nízkou molekulovou hmotností (Low Molecular Weight Glutenin Subunits)
LSC	Kapalinová adsorpční chromatografie
MES	Kyselina 2-morfolin-ethan sulfonová
MZe	Ministerstvo Zemědělství
OSN	Organizace spojených národů
RP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography)
SDS	Dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným
SE-HPLC	Velikostně vylučovací vysokoúčinná kapalinová chromatografie (Size Exclusion High Performance Liquid Chromatography)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFA	Kyselina trifluoroctová
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UPOV	Union for the Protection of New Varieties of Plants (Unie pro ochranu nových odrůd rostlin)
UV	ultrafialový

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1: Anatomická stavba obilného zrna [7]</i>	13
<i>Obr. 2: Schéma struktury gliadinu [7]</i>	23
<i>Obr. 3: Model struktury gluteninu [7]</i>	24
<i>Obr. 4: Princip analýzy gluteninu v SDS-PAGE [39]</i>	31
<i>Obr. 5: Chromatografické dělení vzorku o dvou složkách [19]</i>	34
<i>Obr. 6: Tricinová elektroforéza 1., 2. a 3. extraktu (pH 10).....</i>	63
<i>Obr. 7: Tricinová elektroforéza vzorku po 2. extrakci a IEC chromatografii při pH 4</i>	64
<i>Obr. 8: Chromatografie na měničích kationtů v pH 4 vzorku po 3. extrakci</i>	65
<i>Obr. 9: Tricinová elektroforéza vzorku po 3. extrakci a IEC chromatografii při pH 4</i>	65
<i>Obr. 10: Chromatografie na měničích kationtů v pH 5 vzorku po 2. extrakci</i>	66
<i>Obr. 11: Tricinová elektroforéza vzorku po 2. extrakci a IEC chromatografii při pH 5</i>	66
<i>Obr. 12: Tricinová elektroforéza vzorku po 3. extrakci a IEC chromatografii při pH 5</i>	67
<i>Obr. 13: Chromatografie na měničích aniontů v pH 8 vzorku po 1. extrakci</i>	68
<i>Obr. 14: Tricinová elektroforéza vzorku po 1. extrakci a IEC chromatografii při pH 8</i>	68
<i>Obr. 15: Chromatografie na měničích aniontů v pH 10 vzorku po 2. extrakci</i>	69
<i>Obr. 16: Tricinová elektroforéza vzorku po 2. extrakci a IEC chromatografii při pH 10</i>	69

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1: Závislost chemického složení pšeničných mouk na vymletí (v hmot. %) [8].....</i>	14
<i>Tab. 2: Přehled nejdůležitějších chromatografických metod [19]</i>	33
<i>Tab. 3: příprava pufrů A použitých na první řadu vzorků.....</i>	43
<i>Tab. 4: příprava pufrů B použitých na první řadu vzorků.....</i>	43
<i>Tab. 5: příprava pufrů A, B použitých na druhou řadu vzorků</i>	51
<i>Tab. 6: Složení separačního gelu (na 10 ml gelu)</i>	59
<i>Tab. 7: Složení zaostřovacího gelu (na 6 ml gelu).....</i>	59
<i>Tab. 8: Složení separačního a zaostřovacího gelu na tricínovou elektroforézu.....</i>	60
<i>Tab. 9: Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové</i>	62