

Metody detekce bílkovinných frakcí v mouce

Marek Dvořák

Bakalářská práce
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie a mikrobiologie potravin
akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Marek DVOŘÁK**
Osobní číslo: **T08428**
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Metody detekce bílkovinných frakcí v mouce**

Zásady pro vypracování:

- 1. Mouka jako významná složka výživy**
- 2. Bílkoviny v pšeničné mouce**
- 3. Izolace pšeničných bílkovin**
- 4. Detekce bílkovinných frakcí z pšeničné mouky**

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] POMERANZ, Y., *Advances in Cereal Science and Technology*, vyd. 8., American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota, 1986. 364s.
- [2] PŘÍHODA, J.; HUMPOLÍKOVÁ, P.; NOVOTNÁ, D. *Základy pekárenské technologie*. vyd. 1., Pekař a cukrář s.r.o., Praha, 2003, 363 s., ISBN 80-902922-1-6
- [3] HAJŠLOVÁ, J.; VELÍŠEK, J. *Chemie potravin I.* vyd. 3., OSSIS, Tábor, 2009, 602 s., ISBN 978-80-86659-15-2
- [4] HAMPL, J.; *Cereální chemie a technologie*; Nakladatelství technické literatury ALFA Bratislava, Praha, 1970
- [5] PELIKÁN, M., SÁKOVÁ, L.; *Jakost a zpracování rostlinných produktů*, vyd. 1., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, České Budějovice, 2001, 235 s., ISBN 80-7040-502-3

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Věra Halabalová, Ph.D.

Ústav biochemie a analýzy potravin

Datum zadání bakalářské práce:

11. února 2011

Termín odevzdání bakalářské práce:

30. května 2011

Ve Zlíně dne 12. dubna 2011



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. Ing. Jan Hrabě, 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 24.5.2011

Dvořák Marek

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Bakalářská práce pojednává o významu pšeničných bílkovin v potravinářské technologii, jejich izolaci a frakcionaci různými metodami. Účelem analýzy je stanovení množství a složení bílkovin a také předpověď jejich technologické kvality. Nejpoužívanější metodou pro charakterizaci bílkovin je vysoko-účinná kapalinová chromatografie, která je založena na principu separace látek. Dalšími způsoby studia jsou např. elektroforéza a enzymová imunoanalýza na pevné fázi.

Klíčová slova: bílkoviny, gliadin, glutenin, lepek, pšeničná mouka, kapalinová chromatografie

ABSTRACT

Bachelor thesis discusses the importance of wheat protein in food technology, their isolation and fractionation of various methods. The purpose of the analysis is to determine the quantity and composition of proteins and prediction of their technological quality. The most used method for characterization of protein is high-performance liquid chromatography, which is based on the principle of separation of substances. Other methods of study are e.g. electrophoresis and enzyme immunoanalysis on solid phase.

Keywords: proteins, gliadin, glutenin, gluten, wheat flour, liquid chromatography

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval především své vedoucí bakalářské práce Ing. Věře Halabalové, Ph.D. za odbornou pomoc, připomínky, věnovaný čas a poskytnuté materiály. Nemalé díky naleží také rodičům za finanční podporu a zázemí během celého studia. V neposlední řadě velký dík patří mým blízkým přátelům, kteří mi neváhali v nesnázích poradit.

Motto

Don't be just another brick in the wall!

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

Ve Zlíně dne:

.....

Podpis studenta

OBSAH

ÚVOD	9
1 MOUKA JAKO VÝZNAMNÁ SLOŽKA VÝŽIVY	11
1.1 OBILNÉ ZRNO	11
1.2 DRUHY A ZPŮSOBY ZÍSKÁVÁNÍ MOUKY	13
1.2.1 Pšeničná mouka.....	14
1.2.2 Žitná mouka.....	16
1.2.3 Ostatní významné potravinářské obiloviny	16
2 BÍLKOVINY V PŠENIČNÉ MOUCE	17
2.1 AMINOKYSELINY OBILOVIN	17
2.2 BÍLKOVINY	18
2.2.1 Vlastnosti, funkce a struktura bílkovin	18
2.2.2 Bílkoviny obilovin.....	19
2.2.3 Pšeničné bílkoviny	21
2.2.3.1 Gliadin	23
2.2.3.2 Glutenin	24
2.2.3.3 Leukosin.....	25
3 IZOLACE PŠENIČNÝCH BÍLKOVIN	26
3.1 IZOLACE ALBUMINŮ.....	27
3.2 IZOLACE GLOBULINŮ	27
3.3 IZOLACE PROLAMINŮ (GLIADINŮ)	27
3.4 IZOLACE GLUTELINŮ (GLUTENINŮ)	29
3.5 POUŽITÍ ULTRAZVUKU PŘI IZOLACI	31
4 DETEKCE BÍLKOVINNÝCH FRAKČÍ ZE PŠENICE	32
4.1 ELEKTROFORETICKÉ METODY	32
4.1.1 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE)	33
4.2 ENZYMOVÁ IMUNOANALÝZA NA PEVNÉ FÁZI (ELISA)	34
4.3 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	34
4.4 CHROMATOGRAFICKÉ METODY	35
4.4.1 Kapalinová chromatografie	35
4.4.1.1 RP-HPLC	39
4.4.1.2 SE-HPLC	40
4.4.1.3 IE-HPLC	43
ZÁVĚR	46
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	47
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	52
SEZNAM OBRÁZKŮ	53
SEZNAM TABULEK	54

ÚVOD

Zemědělství a výroba potravin jsou úzce provázaným celkem a zajišťují výživu obyvatelstva. Mezi nejstarší pěstované rostliny, které mají mezi ostatními zemědělskými produkty výsadní postavení, patří obiloviny, které výrazně ovlivňují výživovou bilanci celosvětové populace. Z botanického hlediska je řadíme do čeledi lipnicovité, jejíž zástupci mají značnou podobnost jak ve struktuře a tvorbě zrna, tak v jeho chemickém složení. Obiloviny obsahují důležité živiny v podobě sacharidů a bílkovin, nezbytných pro lidský organismus. Významnou složku obilných výrobků tvoří bílkoviny, které mají zásadní vliv na technologickou jakost a využití. Jejich biologická hodnota je posuzována podle obsahu jednotlivých esenciálních aminokyselin, které jsou pro náš organismus nezbytné, a je zřejmé, že příjem bílkovin v potravě je pro lidský organismus velmi důležitý.

Vlastnosti bílkovin nejsou závislé pouze na chemickém složení, ale i na strukturním uspořádání a aminokyselinovém složení. Výsadní postavení mají zejména pšeničné bílkoviny, které jsou schopny s vodou a za současného hnětení vytvářet trojrozměrnou síť, tzv. lepek, který je příčinou ojedinělých vlastností pšeničného těsta a tvoří klenbu pekařského výrobku. Tradiční ukazatel kvality lepku je pružnost, tažnost a bobtnavost. Kvalita a množství lepkové bílkoviny má vliv na zpracovatelské možnosti pšeničné mouky. S tímto je bezprostředně spjata tzv. pekařská síla mouky. Mouka s vyšším obsahem bílkovin je elastičtější a tužší, dobře zadržuje plyny a proto poskytuje objemnější výrobky. Naopak mouka s nízkým obsahem lepku je vhodná na výrobu sušenek a oplatků. Z těchto a mnoha dalších důvodů je žádoucí stanovovat množství a kvalitu pšeničných bílkovin v různých odrůdách pšenice pěstovaných za rozdílných klimatických a půdních podmínek, za účelem vhodného výběru mouky pro konkrétní použití.

Analýza obilných bílkovin může být značně pracná vzhledem k jejich různorodosti. Rozpouštění je velmi složité, což je způsobeno neobvyklým aminokyselinovým složením, na rozdíl od většiny ostatních rostlinných nebo živočišných bílkovin. I přes tyto potíže je izolace a charakterizace obilných bílkovin umožňována řadou analytických metod. Nejlépe prozkoumány jsou bílkoviny pšenice, které mají také největší technologický význam. Bílkoviny lze určitým způsobem izolovat a dále možno frakcionovat do čtyř skupin podle rozpustnosti na albuminy, globuliny, prolaminy a gluteliny. Slouží k tomu například elektromigrační a chromatografické metody, které poskytují užitečné separace a informace o kvalitě obilných bílkovin.

Charakterizace obilných bílkovin umožňuje nejenom stanovení množství a složení, ale také předpovídat jejich technologickou kvalitu. Některé z metod analýzy prolaminů se využívají k identifikaci odrůd, které tak poskytují užitečné informace pro křížení a genetické zušlechťení všech obilovin.

1 MOUKA JAKO VÝZNAMNÁ SLOŽKA VÝŽIVY

Obiloviny výrazně ovlivňují výživu lidí na celém světě [2]. Nejvíce se uplatňuje pšenice a rýže s největším objemem produkce na světě, z nichž pšenice je světově nejrozšířenější obilovinou pro pekařské využití [1-2]. Kromě významné role v lidské výživě a ke krmným účelům, jsou také průmyslově zpracovávány např. pro výrobu alkoholických nápojů, škrobu, atd. [2]. V našich podmínkách obiloviny obvykle dělíme na:

- chlebové (pšenice, žito)
- ostatní potravinářské (ječmen, oves, kukuřice)
- maloobjemové (např.: proso, čirok, pohanka, amarant) [2]

1.1 Obilné zrno

Pro lidskou výživu se z obilovin využívá výhradně zrno. Obilky jsou semena obilovin, a tudíž jejich přirozená funkce po vyzrání spočívá v roli uchování životaschopnosti zárodku nové rostliny, proto se zrno až do okamžiku svého umrtvení (mechanickým rozrušením, teplem, ozářením apod.) chová jako živý systém [1]. Hlavní anatomické části obilky jsou: obalové vrstvy, klíček a endosperm [1-2].

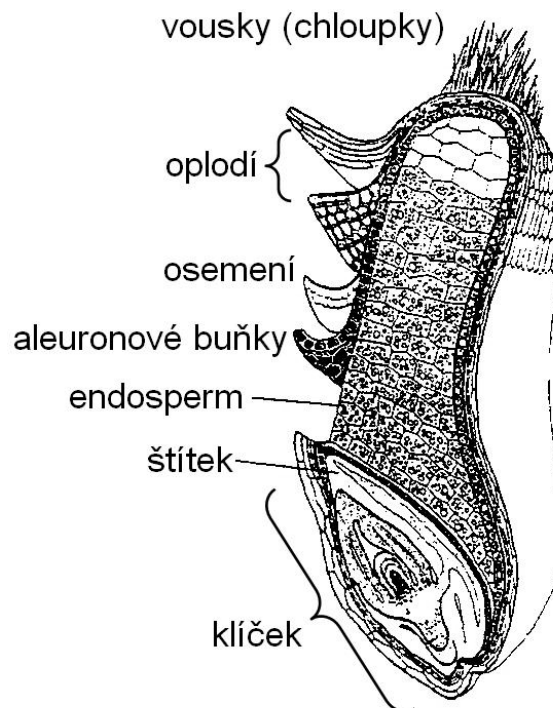
Obalové vrstvy pokrývají zrno několika vrstvami buněk, které chrání klíček a endosperm před mechanickým a mikrobiálním poškozením, popřípadě vyrovnávají bilanci vlhkosti [1-3]. V mlýnské technologii je nazýváme jako otruby [1]. Během zrání se z jejich buněk ztrácí cytoplazma a nakonec zůstávají pouze zdřevnatělé stěny [3]. Vnější vrstvy jsou složeny převážně z nerozpustných polysacharidů typu celulosy s velkou mechanickou pevností a jsou zdrojem nestravitelné vlákniny. Podpovrchové obalové vrstvy jsou složeny také z polysacharidů, které ve vodě bobtnají, nebo se částečně rozpouštějí, a jsou schopny vodu velmi pevně vázat. To může mít významný účinek na zvýšení vaznosti mouky a lepivosti těsta [1].

Klíček (embryo) tvoří nejmenší podíl zrna a je zárodkem nové rostliny a nositelem genetické informace, proto je stále živý [1-2]. Je velmi bohatým zdrojem některých významných látek z hlediska výživy člověka [1]. Součástí klíčku není škrob, pentozany a celuloza, ale obsahuje mnoho účinných látek jako tuky, jednoduché sacharidy, aminokyseliny, bílkoviny, enzymy, minerální látky a vitamíny (především B₁ a E) [2-4].

Při mlýnském zpracování je klíček odstraňován, protože jeho tukové složky rychle žluknou a na vzduchu má velmi krátkou stabilitu (řádově jen několik hodin) [1]. Zvláště významný je štítek, který odděluje klíček od endospermu a obsahuje až 33 % bílkovin [2-4].

Endosperm představuje největší a technologicky nejvýznamnější podíl zrna (80-86 % hmotnosti) [1,3]. Je tvořen velkými hranolovými buňkami s poměrně jemnou buněčnou blanou a obsahuje hlavně škrob (téměř 75 %) a bílkoviny (asi 10 %) [1-2]. Endosperm zajišťuje výživu klíčící rostlině a při zpracování tvoří podstatnou část konečného výrobku (mouka, škrob). V potravinách a krmivu je hlavním zdrojem energie a bílkovin [2,4]. Od obalových vrstev je oddělen aleuronovou vrstvou, která obsahuje bílkoviny, tuky, minerální látky a vitamíny [2-4]. Aleuronová vrstva sice obsahuje výrazně více bílkovin než samotný endosperm, ale tyto bílkoviny nejsou schopny tvořit s vodou lepek [1,3].

Každá anatomická část zrna má svou specifickou funkci (strukturní, mechanickou, fyzikálně – chemickou) a jejich hmotnostní podíl se značně liší u jednotlivých obilovin a je proměnlivý vlivem vnitřního (odrůda, zralost, vlhkost) a vnějšího prostředí (počasí během vegetační doby, kvalita půdy, choroby, škůdci, atd.) [2-3]. Příčný řez pšeničným zrnem je uveden na Obr. 1 a procentuální podíly jednotlivých částí zrna jsou v Tab 1.



Obr. 1: Podélný řez pšeničným zrnem [2]

Tab. 1: Podíly jednotlivých částí zrna u pšenice v % [3]

Část zrna		Hodnoty v %	
		průměrné	mezí
Obalové vrstvy	Oploďí a osemení	6,1	3,5 – 9,5
	Aleuronová vrstva	8,3	4,6 – 10,4
Klíček	Štítek	1,6	1,3 – 2,0
	Klíček	2,8	2,3 – 3,6
Endosperm		82,4	80,1 – 86,5

1.2 Druhy a způsoby získávání mouky

Zpracováním obilovin na produkty (mouky, krupice, vločky, kroupy) a současně na krmné výrobky (krmné mouky, otruby a klíčky) se zabývají mlynářské technologie [2,4]. Jejich hlavním cílem při zpracování obilí je oddělit obalové vrstvy zrna od endospermu, což se provádí postupným drcením zrna a meliva s následným tříděním a čištěním [2].

Ve mlýně má tento proces tři základní etapy: předčištění a příprava obilí na zámel, čištění a mletí obilí. **Předčištění** probíhá hned po dopravení obilné masy do mlýna, kde na vzduchovém třídíči je zbaveno nejhrubších nečistot a prachu [2]. **Příprava obilí na zámel** je základní operace, kterou se vlastnosti jednotlivých partií pšenic vhodně kombinují tak, aby byla zaručena standardní jakost vyrobené mouky [2,4]. Druhou etapou výroby mouky je **čištění obilí**, které probíhá před vlastním mletím a musí zrno dokonale zbavit příměsí, nečistot a dřevnatých vrstev slupky. Nakonec následuje **mletí obilí**, které se dělí: na šrotování, luštění krupic a vymílání [2]. Snažíme se získat co největší podíl endospermu postupným vymíláním středových částí zrna a v konečných fázích mletí pak vydíráme zbylý endosperm ze zbytku otrub [1-2]. V konečných chodech vymílání se zvyšuje podíl částic z vnitřních a vnějších obalových vrstev (minerální látky, vitamíny a vláknina). Naopak čím méně je zrno vymleto, tím je mouka světlejší a výrazně klesá obsah bílkovin, tuku a vlákniny [1]. Takto získaný endosperm se rozmělnuje podle předepsané granulace. Podrobné chemické složení mouky v závislosti na stupni vymletí je uvedeno v Tab. 2 [2].

Tab. 2: Závislost chemického složení pšeničné mouky na vymletí v % [2]

Vymletí mouky	40 %	73 %	80 %	94 %	celé zrno (100 %)
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
Pentozany	2,59	3,15	3,95	7,25	7,90
Nestanovený podíl	1,00	0,93	0,64	0,94	-

1.2.1 Pšeničná mouka

Pšeničná mouka je téměř čistý rozdrcený endosperm, jehož podstatná část je tvořena škrobem a bílkovinami [1]. Mouka se vyznačuje velkým aktivním povrchem a hygroscopicitou (snadno absorbuje plyny a páry z okolí) [2]. Vlastnosti souvisejí se základní stavební strukturou obilného zrna, a tudíž s jeho chemickým složením, strukturním uspořádáním hlavních chemických složek a reakcemi probíhajícími během vymílání, skladování a zrání mouky. Změny chemických vlastností souvisejí s biologickými a biochemickými pochody, při nichž hrají významnou roli enzymy, které působí ještě dlouho ve vymleté mouce a řada z nich dokonce ještě v těstě [1]. Přeměny pekařských vlastností v průběhu skladování nazýváme dozrávání mouky [2]. Dochází při tom k vybělení mouky (oxidace karotenových barviv vzdušným kyslíkem) a ke změnám bílkovinného komplexu, především lepku (snižuje se jeho tažnost a rozplývavost, zvyšuje pružnost). Čerstvě namletá mouka nemá plnou pekařskou hodnotu a získá ji až po 2 – 6 týdnech skladování. Tento proces urychluje teplota nejlépe kolem 18°C, vlhkost a přístup vzduchu [2,4].

Za ukazatele kvality pšeničné mouky jsou uváděny: granulace, obsah popela, plynotvorná schopnost, vaznost, obsah mokrého lepku, pekařská síla, barva, druh pšenice a chemické složení mouky [1-2].

V ČR se nejvíce používá značení mouky slovním popisem podle jejich **použití a granulace** (např. krupice, mouka hrubá, polohrubá, hladká a celozrnná). Vyjadřuje velikost

částic mouky a ovlivňuje její zpracovatelské vlastnosti [1-2]. Čím je intenzivnější vymílání, tím více škrobu je poškozeno, ten snáze podléhá působení amylolytických enzymů, rychleji hydrolyzuje na zkvasitelné cukry a snadněji mazovatí [1].

V technologické a pekárenské praxi je běžné značení mouky podle **obsahu popela** (minerálních látek), což je hlavním rozlišovacím a jakostním kritériem. Typ mouky je označen číslem, které udává zhruba tisícinásobek obsahu popela v mouce (např. hladká mouka T 530 je základním typem pšeničné mouky pro pekárenskou výrobu s obsahem 0,53 % popela v sušině) [1,2,4].

Z pekařského hlediska je také důležitá **plynotvorná schopnost mouky** podmíněná dostatečným množstvím zkvasitelných cukrů (především glukózy, fruktózy a maltózy) a aktivitou amylolytických enzymů [1-2]. Optimální stav mouky je takový, kdy nebude příliš velký podíl škrobových zrn předem narušen (enzymově, mechanicky, tepelně) a současně bude zajištěna dostatečná aktivita amylolytických enzymů [1].

Dále můžeme mouku dělit podle **obsahu mokrého lepku**. Mouka s obsahem mokrého lepku nad 40 % je vhodná na výrobu bezvaječných těstovin a listového těsta (silná mouka). S hodnotou v rozmezí 30 až 40 % se používá hlavně pro pekařské a cukrářské výrobky. Pod hranicí 30 % slouží k výrobě sušenek a oplatků (slabá mouka) [1-2]. Kvalita mokrého lepku se zjišťuje podle tažnosti a pružnosti. V současnosti se stále více prosazuje používání **sedimentačního testu** (Zelenyho test) [1]. Je to číslo udávající v mililitrech objem sedimentu, který vznikne po určité době ze suspenze zkoušené mouky, v roztoku kyseliny mléčné s přídavkem bromfenolové modři [42].

Pekařská síla mouky je bezprostředně spjata s kvalitou a množstvím lepkové bílkoviny v mouce. Kolísání obsahu a kvality bílkoviny má vliv na zpracovatelskou kvalitu pšeničné mouky [1]. Silná mouka se získává z odrůd pšenice s vyšším obsahem bílkovin (12 – 14 % v sušině), proto je elastičtější a tužší, vyžaduje intenzivnější míchání, dobře zadržuje vzduch a oxid uhličitý produkovaný kvasinkami a poskytuje objemnější výrobky. Nezáleží to však jen na obsahu proteinů, ale i na jejich složení. Slabé mouky obsahují obvykle pod 10 % v sušině bílkovin a jsou vhodné pro výrobu sušenek, apod. [5]. Tradiční ukazatel kvality lepku se nazývá bobtnavost lepku a představuje nárůst objemu relativně čistého mokrého lepku v roztoku kyseliny mléčné. V současné době se používá spolehlivější ukazatel pekařské kvality lepku – **gluten index**. Je definován jako podíl

mokrého lepku, který zůstane na speciálně konstruovaném sítu k celkovému množství lepku po odstředění vypraného lepku v odstředivce [1].

Barva mouky může být ovlivněna původní barvou pšenice, vyšším obsahem minerálních látek (popela) nebo svým naředlým odstínem, který poukazuje na tzv. zadní mouku s vyšším podílem poškozeného škrobu [1].

Mouku lze také dělit podle **druhu pšenice**: *Triticum aestivum* (pšenice setá, měkká, s vyšším obsahem škrobu, k mlýnsko-pekárenskému zpracování), *Triticum durum* (pšenice tvrdá, sklovitá s vyšším obsahem lepku, k výrobě těstovin, mletá na tzv. semolinu), *Triticum spelta* (pšenice špalda), *Triticum turgidum* (pšenice naduřelá) [1-2].

Chemické složení v závislosti na stupni vymletí je uvedeno v Tab. 2 [2].

1.2.2 Žitná mouka

Složení žitného zrna se příliš neliší od pšeničného, ale z celkových složek má žito vyšší obsah pentozanů. Žitné zrna a mouka obsahují v průměru méně bílkovin než pšenice. Fyzikální a koloidní vlastnosti žitné bílkoviny se podstatně liší od pšeničné. Po nabobtnání s vodou nejsou schopny vytvořit prostorovou strukturu těsta, jako bílkovina pšeničná. Vymílání žitného zrna je jednodušší a intenzivnější na rozdíl od pšeničného, kvůli pevnějšímu spojení obalových vrstev s endospermem. Proto má žitná mouka vyšší obsah popela a podobalových rozpustných polysacharidů (pentozanů), což způsobuje, že je mouka tmavší [1].

1.2.3 Ostatní významné potravinářské obiloviny

Ječmen je znám hlavně jako sladovnický ječmen pro výrobu piva, ale využívá se i průmyslově k výrobě etanolu (whisky), ječného škrobu, ale především jako krmná obilovina [2].

Oves má hlavní využití jako krmivo. V potravinářství především jako dietní potravina. Kromě ovesných vloček je známo i ovesné mýslí. Z ovesné mouky nelze připravit pečivo (nepřítomnost lepku), ale lze ji přidávat do chleba a různého pečiva [2].

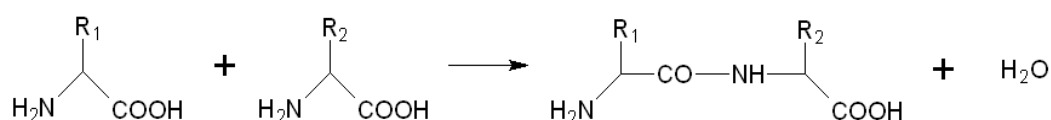
Kukuřice je ve světovém měřítku třetí nejrozšířenější obilovinou. Celé rostliny se využívají jako zelené krmivo (siláž). V potravinářství se zpracovává zrna na extrudované výrobky, krupici, mouku, škrob a líh. Jako zelenina se konzumují nedozrálé palice [2].

2 BÍLKOVINY V PŠENIČNÉ MOUCE

Bílkoviny jsou důležitou složkou pšeničného výrobku a značně ovlivňují jeho technologickou jakost [3-4]. Jsou to biopolymery tvořené aminokyselinami vzájemně spojené peptidovou vazbou, proto jsou řazeny mezi dusíkaté látky [1,3]. Za bílkovinu neboli protein je považován peptidový řetězec o 100 a více aminokyselinách a z hlediska relativní molekulové hmotnosti větší než 10 000 [1].

2.1 Aminokyseliny obilovin

Aminokyseliny jsou jednoduché organické sloučeniny, které v molekule obsahují aminoskupinu a karboxylovou skupinu. Spojením dvou aminokyselin dojde ke vzniku dipeptidu a peptidové vazby podle rovnice [5]:



Jednotlivé aminokyseliny zastoupené v peptidovém řetězci mají svůj význam při tvorbě těsta a jsou určující pro jeho reologické vlastnosti. Z aminokyselin, které se v přírodě vyskytují, pouze dvacet kódovaných tvoří molekuly bílkovin (viz Tab. 3). Ostatní se v bílkovinách zásadně nevyskytují [1]. Obsah aminokyselin v pšeničných bílkovinách uvádí Tab. 3, v závorce jsou uvedeny obvykle používané zkratky [5].

Tab. 3: Obsah aminokyselin v pšenici (v g vztaženo na 16 g dusíku) [5]

aminokyselina	obsah (g)	aminokyselina	obsah (g)
Glycin (Gly)	3,9	Kys. glutamová (Glu)	0
Alanin (Ala)	3,6	Asparagin (Asn)	4,9
Valin (Val)	4,4	Glutamin (Gln)	29,9
Leucin (Leu)	6,7	Lysin (Lys)	2,9
Isoleucin (Ile)	3,3	Arginin (Arg)	4,6
Serin (Ser)	4,6	Histidin (His)	2,3
Threonin (Thr)	2,9	Fenylalanin (Phe)	4,5
Cystein (Cys)	2,5	Tyrosin (Tyr)	3,0
Methionin (Met)	1,5	Tryptofan (Trp)	0,9
Kys. asparagová (Asp)	0	Prolin (Pro)	9,9

Glycin a alanin jsou nejjednodušší typy aminokyselin s aminoskupinou v α -poloze (tj. na prvním uhlíku od $-\text{COOH}$ skupiny). Kyselina glutamová se v obilných bílkovinách vyskytuje převážně ve formě svého aminu – glutaminu. Prolin díky své volně otáčivé vazbě mezi karboxylovou skupinou a zbytkem molekuly umožňuje značnou tvarovou přizpůsobivost peptidových řetězců při vnějších mechanických vlivech (v důsledku toho jsou možné různé strukturní změny při hnětení, kypření, přetuzování těsta a při stavbě jeho struktury). Cystein a methionin obsahují ve své molekule síru, takže mohou vytvořit velmi pevnou disulfidovou vazbu, a tak pevně propojit sousední bílkovinné řetězce, nebo spojovat úseky v jedné molekule [1].

2.2 Bílkoviny

2.2.1 Vlastnosti, funkce a struktura bílkovin

Jednotlivé proteiny v buňkách zastávají často velmi důležité a přesně specializované funkce [1]. Funkci **strukturní** zastávají zejména nerozpustné fibrilární bílkoviny. Tvoří základní kostru mnoha živočišných tkání a rostlinných pletiv [1,5]. **Zásobní** bílkoviny jsou pro organismus zásobárnou stavebního materiálu pro tvorbu nových proteinů a současně zdrojem energie (typickým příkladem jsou bílkoviny obilného lepku) [1]. Jednou z nejvýznamnějších funkcí bílkovin je funkce **katalytická** a patří sem zejména enzymy a hormony [1,5]. Enzymy jsou biokatalyzátory většiny biochemických reakcí a značně jsou využívány v potravinářství (pekárenství, pivovarnictví, vinařství a mlékárenství). Pro vykonání takových funkcí je nutné korektní specifické složení molekuly a její struktura. Aminokyseliny tedy nejsou v peptidových řetězcích seřazeny nahodile, ale jejich pořadí je dáno geneticky [1].

Podle chemické struktury jsou bílkoviny rozděleny na jednoduché a složené. **Jednoduché** obsahují pouze aminokyseliny a jsou rozděleny na globulární (sferoproteiny) a fibrilární (skleroproteiny). Globulární molekuly mají oblý až kulovitý tvar, nepolární funkční skupiny jsou uvnitř molekuly a polární tvoří vnější obal. Tyto proteiny jsou rozpustné ve vodě nebo ve zředěných roztocích solí a tvoří koloidní roztoky. Fibrilární molekula má tvar makroskopických vláken a jsou to prakticky nerozpustné strukturní bílkoviny. **Složené** proteiny v molekule obsahují kovalentně vázaný nebílkovinný podíl (lipoproteiny, fosfoproteiny, glykoproteiny) [5]. Vlastnosti proteinů nezávisí pouze

na chemickém složení, ale hlavně na jejich strukturním uspořádání [1]. Struktura bílkovin je popisována několika úrovněmi (primární, sekundární, terciární a kvartérní) [1,3]. **Primární struktura** (kovalentní struktura) bílkovin určuje počet a pořadí jednotlivých aminokyselin v řetězci (uvádí se vždy od N-konce k C-konci hlavního řetězce). **Sekundární strukturou**, která je ovlivněna strukturou primární, se rozumí prostorové uspořádání (konformace) jednotlivých atomů a skupin v hlavním polypeptidovém řetězci, které vytvářejí trojrozměrné útvary [1,5]. Sekundární struktury můžeme tedy rozdělit do dvou základních skupin: pravidelné (α -helix a β -struktury) a nepravidelné (β -ohyb) [5]. **Terciární struktura** popisuje celkové prostorové uspořádání polypeptidového řetězce a prostorové uspořádání postraních řetězců [1,5]. Prostorový tvar bílkovinné molekuly podmiňuje její biochemickou funkci [1]. **Kvartérní struktura** zahrnuje uspořádání nezávislých globulárních podjednotek (tzv. protomerů), které tvoří pouze některé proteiny [5].

Pokud dojde k porušení struktury na jakékoliv úrovni, zpravidla dochází ke ztrátě biologické funkce proteinu. Tento proces se nazývá **denaturace bílkovin**. Denaturace může být způsobena buď chemicky nebo fyzikálně. Častým příkladem je tepelná denaturace bílkovin, která má uplatnění hlavně v potravinářství, během níž se z pšeničné bílkovinné struktury stává pružná, ale pevná prostorová síť, která následně tvoří nosnou kostru hotového výrobku a činí jej stravitelnějším [1].

2.2.2 Bílkoviny obilovin

V obilovinách jsou zastoupeny dvě základní skupiny bílkovin, složené – proteidy (např. glykoproteidy, fosfoproteidy, nukleoproteidy, atd.) a jednoduché – proteiny, které podle rozpustnosti dělíme do čtyř skupin: albuminy, globuliny, prolaminy a gluteliny [1-3].

Albuminy jsou rozpustné ve vodě [8]. Pšeničné albuminy zahřátím na 52 °C koagulují [3]. Jsou řazeny mezi protoplasmatické bílkoviny, mezi které patří katalytické, stavební a enzymaticky aktivní bílkoviny [1-2]. Nejznámější a nejlépe prostudovaný pšeničný albumin je leukosin [3].

Globuliny jsou jednoduché bílkoviny rozpustné ve vodných roztocích solí [1,3,8]. Jsou zařazeny, stejně jako albuminy, mezi protoplasmatické bílkoviny, proto se albuminy a

globuliny vyskytují vždy společně [2-3]. Globuliny částečně koagulují při teplotě kolem 100 °C [3]. Pšeničný globulin je nazýván edestin [5].

Prolaminy jsou rozpustné ve vodných roztocích alkoholů (např. etanol, propanol) [8]. Patří mezi charakteristické zásobní nebo také lepkové bílkoviny. Prolaminy, též nazývané rostlinné kaseiny, jsou jednou z nejlépe prostudovaných skupin bílkovin, protože je lze poměrně snadno izolovat. Jejich jméno je odvozeno od aminokyseliny prolinu, kterého obsahují velké množství. Koagulují zahřátím na teplotu 60 – 70 °C nebo při rychlém sušení [3]. Prolamin v pšenici je nazýván gliadin a jeho obsah se pohybuje v rozmezí 4 až 5 % [2-3].

Gluteliny jsou zčásti rozpustné ve zředěných roztocích kyselin nebo zásad [1,8]. Stejně jako prolaminy, patří mezi zásobní bílkoviny, ale dosud jsou nejméně prostudovanou skupinou, protože jejich příprava je velmi náročná [2-3]. Jsou tvořeny směsí bílkovinných podjednotek, kde se uplatňují zejména disulfidické a vodíkové vazby, čímž se dosahuje vysokých molekulových hmotností [2]. Pšenice obsahuje 4 až 5 % gluteninu [3]. Gluteliny společně s prolaminou nejsou rozpustné ve vodě, pouze v ní bobtnají a vytvářejí vysoce viskózní koloidní gely nebo roztoky [1].

Elementární analýzou bylo zjištěno, že obsah základních prvků se v pšeničných bílkovinách nijak výrazně neliší (viz Tab. 4) [3].

Tab. 4: Elementární analýza pšeničných bílkovin (% v sušině) [3,5]

Složka Prvek	Albuminy (leukosin)	Globuliny (edestin)	Prolaminy (gliadin)	Gluteliny (glutenin)
Uhlík	53,02	51,03	52,72	52,34
Vodík	6,84	6,85	6,86	6,83
Dusík	16,80	18,39	17,66	17,49
Síra	1,28	0,69	1,03	1,08
Kyslík	22,06	23,08	21,73	22,26

2.2.3 Pšeničné bílkoviny

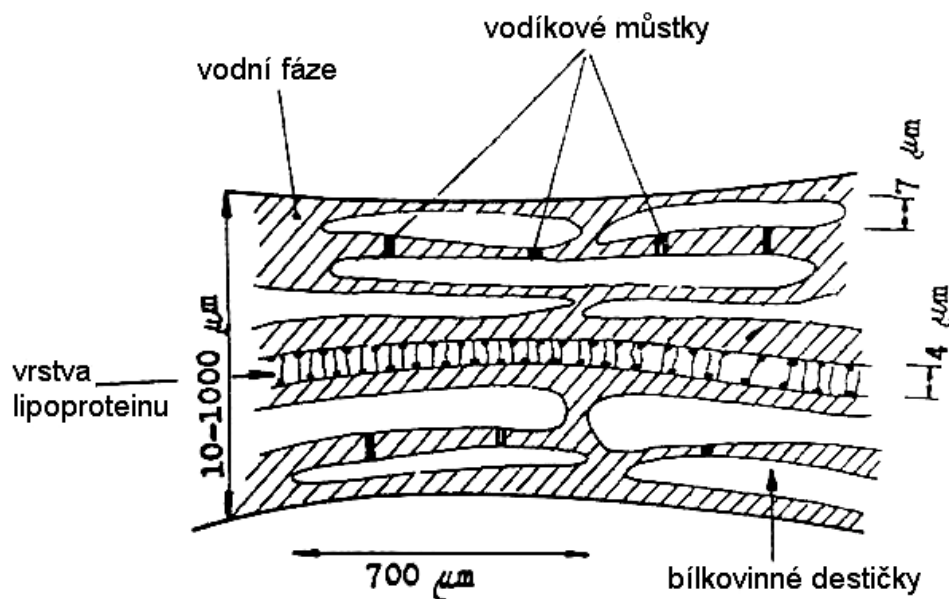
Obsah bílkovin v pšeničném zrně se pohybuje v širokém rozmezí 10 – 17 % [2]. Pšenice má zcela mimořádnou kvalitu bílkovin, které jsou schopny vytvořit nakypnější strukturu a vyšší klenbu pekařského výrobku, než bílkoviny z kterýchkoliv jiných obilovin [1]. Nejdůležitější vlastností zásobních bílkovin pšeničného zrna je schopnost s přidavkem vody a v přítomnosti vzdušného kyslíku za současného působení mechanické energie na hnětení tvořit pružný gel – **lepek (gluten)** [2,5]. V nativním zrně a ani v mouce ještě ve skutečnosti lepek neexistuje a vytváří se až po propojení prostorové sítě pšeničné bílkoviny (toho lze docílit hnětením těsta) [1]. Lepek lze z těsta jednoduše izolovat vypráním prohněteného a odleželého těsta mírným proudem vody, přičemž se postupně vyplavují látky ve vodě rozpustné a škrob [1,3]. Vypráním těsta zbavíme lepek pouze rozpustných nebo mechanicky snadno odstranitelných látek. Proto je nutno zbývající látky považovat za jeho složky, i když nejsou nezbytné k jeho vzniku [3]. Po určité době vypírání zůstává substance, kterou nazýváme **mokrý lepek**, ve formě pružného a vazkého kaučukovitého gelu žlutozelené nebo žlutošedé barvy [1,3]. Obsah mokrého lepku se pohybuje v rozmezí od 15 do 58 % a je charakteristický svou tažností, pružností, plasticitou a schopností bobtnat ve zředěném roztoku kyseliny mléčné [1,3,4]. Vysušením mokrého lepku se získá xerogel (suchý lepek) charakteristický svou rohovitou konzistencí. Jeho obsah je asi 1/3 lepku mokrého (5 až 28 %). Jakost a výtěžek lepku závisí na době vypírání, jak ukazuje Tab. 5 [3].

Tab. 5: Vliv vypírání na jakost a výtěžek lepku [3]

Doba vypírání lepku (min)	Obsah mokrého lepku (%)	Obsah suchého lepku (%)	Bobtnání (ml)	Pružnost (%)	Obsah bílkovin v lepku (%)	Výtěžek bílkovin (%)
10	43,8	15,98	10	20	78,0	12,46
14	37,8	13,45	9	32	82,6	11,10
18	32,2	11,62	13	43	85,9	9,98
22	29,8	11,20	16	45	85,9	9,62
26	29,8	10,68	16	53	93,0	9,93
30	28,1	9,96	14	50	94,7	9,43

Chemické složení lepku a koloidně chemický stav bílkovin ovlivňují jeho fyzikální vlastnosti [4]. Sušina lepku se skládá průměrně z 90 % bílkovin, 8 % lipidů a 2 % sacharidů (škrob), ale také se zde nachází vláknina, kyselina fosforečná a další minerálie [1,4].

Co se týká konstituce lepku, je to složitá trojrozměrná síť peptidických řetězců, které jsou různým způsobem navzájem propojeny disulfidickými a methylenovými můstky mezi jednotlivými aminokyselinami, kde určitý význam má i vrstvička lipidů (viz Obr. 2) [2-4]. Tvorba můstků zesiluje lepek, poněvadž se tím omezuje relativní pohyblivost peptidických řetězců [2]. Působením redukčních činidel dochází k štěpení můstků a tím dochází k borcení struktury lepku, které je způsobeno především rozpadem gluteninových vláken na drobnější fragmenty [1-2]. Lepek se stává tažnější [2]. Oxidační činidla naopak strukturu lepku zpevňují a těsto se stává trhavé (na tomto základě je založena i řada pekařských zlepšujících přípravků) [1,3].



Obr. 2: Model struktury hydratovaného lepkového vlákna [6]

Lepek má rozhodující roli při tvorbě těsta a určuje tzv. pekařskou sílu mouky [2-3]. Jakost lepku závisí hlavně na dědičných vlastnostech odrůdy, velký vliv mají také někteří škůdci, posklizňová úprava (sušení), samozáhřev, příprava obilí k mletí a v menší míře i klimatické a půdní podmínky [3].

Nejdůležitější složky lepku jsou charakteristické zásobní nebo také lepkové bílkoviny gliadin a glutenin, z nichž každá obsahuje různá množství dalších složek [3,5]. V lepku jsou zastoupeny v poměru přibližně 2:3 [1].

2.2.3.1 Gliadin

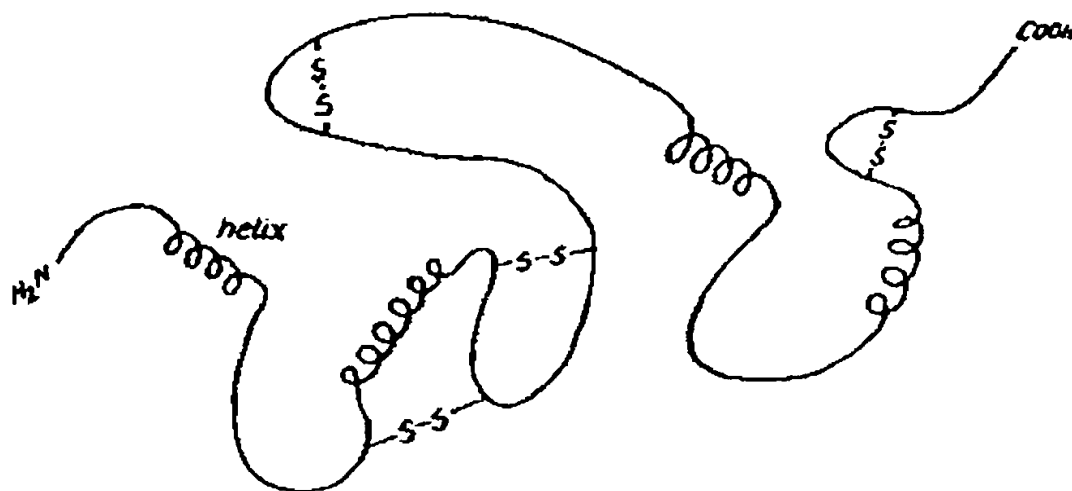
Gliadin je bílkovinná frakce pšeničných prolaminů a poskytuje lepku tažnost [1,3]. Tažnost zajišťuje, aby se těsto působením slabého tlaku kvasných plynů zdvihalo a tak se vytvářela jemná a pravidelná pórovitost [3]. Gliadinové frakce jsou tvořeny zhruba 40 proteiny a dělíme je podle molekulových hmotností na: vysokomolekulové gliadiny (100 kDa a více), ω -gliadin (60 – 80 kDa) a nízkomolekulové gliadiny (30 – 40 kDa). Frakce ω -gliadinu obsahuje tzv. α -, β -, a γ -gliadiny a některé z nich mohou u lidí (zejména u dětí) vyvolávat trávící alergii zvanou celiakie (bezlepková dieta) [2,5].

Gliadinová frakce obsahuje velké množství glutaminu (36 – 45 %), prolinu (14 – 30 %), ale neobvykle málo kyseliny asparagové a glutamové a bazických aminokyselin (argininu, lysinu a histidinu). Nízký obsah kyselých a zásaditých aminokyselin s polárními postranními řetězci souvisí se špatnou rozpustností gliadinu ve vodě [5,8]. Pro izolaci a analýzu gliadinu je významná jeho rozpustnost v 60 až 70% etanolu, protože při tom dochází k nejmenší denaturaci [3].

Velký význam má denaturace teplem (např. při sušení zrna). Urychluje ji vyšší vlhkost, teplota a doba záhřevu; to vysvětluje zrychlení denaturace bílkovin při skladování vlhké pšeničné masy. Nepříznivé změny nastávají při 40 °C. Denaturační reakce začíná poutáním vody. Přitom se snižuje specifická otáčivost gliadinových roztoků a molekulová hmotnost, rozruší se prostorová síť gliadinu a sníží se rozpustnost (až o 15 %). Znamená to podstatné zhoršení jakosti lepku [3].

Gliadin nelze považovat za čistou chemickou látku, to dokazuje podrobné studium fyzikálních vlastností jeho roztoků. Obsah dusíku se pohybuje od 17 do 18 %, obsah popela od 0,05 do 0,8 %, specifická otáčivost (α_D^{20}) od –83,3 do –100,0, izoelektrický bod od pH 6,0 do 7,0. Při stanovení molekulové hmotnosti na ultracentrifuze bylo zjištěno, že gliadin je směsí molekul o molárních hmotnostech 35000 g·mol⁻¹ a 17500 g·mol⁻¹, jejichž poměr se mění vlivem teploty a pH [3]. Strukturu gliadinu tvoří jeden spojitý polypeptidový řetězec, tvořený zčásti úseky helixů a zčásti náhodnými ohyby s vysokým

obsahem kyseliny glutamové a prolinu [1-2]. Helixy jsou udržovány vodíkovými vazbami, kterých musí být početné množství, protože jednotlivě nemají velkou pevnost. Ohyby řetězce jsou drženy pevnými disulfidickými vazbami (viz Obr. 3) [1].



Obr. 3: Představa struktury gliadinu [1]

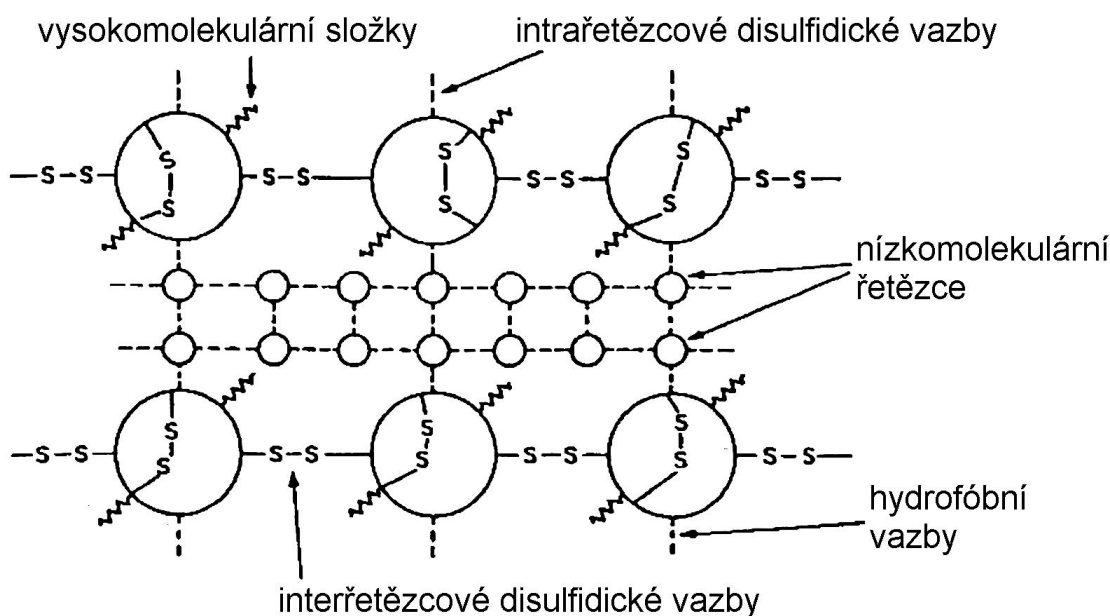
2.2.3.2 Glutenin

Glutenin je pšeničný glutelin a zapříčiňuje pevnost, pružnost a bobtnavost lepku [1-2]. Pouze dostatečně pružný lepek může zadržet větší množství kvasných plynů a tak udržet původní tvar pečiva. Na bobtnavosti závisí chování lepku v slabě kyselém prostředí, které se vytváří během zrání těsta [3]. Glutenin je vysokomolekulární frakce lepku s relativní molekulovou hmotností 40 až 20000 kDa (nejčastěji kolem 2000 kDa), neboť je tvořen polypeptidovými řetězci pojenými disulfidovými vazbami [1,2,5]. Byla zjištěna přímá úměrnost mezi objemem pečiva a množstvím gluteninu nerozpustného v 0,05M kyselině octové [2]. Podle nejnovějších výzkumů je prokázáno, že rozpustnější (lépe bobtnající) složky gluteninu, snižují objem pečiva. Naopak nerozpustné vysokomolekulární složky prokazatelně jeho objem zvyšují [1].

Glutenin také není čistá chemická látka. Obsah dusíku kolísá více než u gliadinu (od 15,5 % do 20 %). Izoelektrický bod je u různých preparátů značně odlišný (pH 4,4 až 8,0). Frakčním srážením $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ byly získány dvě frakce α -glutenin a β -glutenin, lišící se obsahem dusíku (α -glutenin 17,17 % a β -glutenin 16,16 %) a některých aminokyselin. Aminokyselinové složení gluteninu je mnohem méně prostudováno než

u gliadinu. Hydrolýzou bylo zjištěno, že obsahuje značné množství kyseliny glutamové, ale zcela chybí lysin. Argininu, prolinu a amoniaku obsahuje mnohem méně než gliadin, naopak však histidinu více [3].

Ve struktuře lepku vytvářejí gluteniny trojrozměrnou síť (viz Obr. 4), tvořenou mnoha řetězci různé velikosti. Nízkomolekulární řetězce se nachází uvnitř. Kromě peptidických vazeb jsou udržovány také disulfidickými a vodíkovými vazbami, ale navenek jsou s ostatními řetězci spojeny jen vodíkovými vazbami [1,5]. Vysokomolekulární složky mají dva druhy disulfidických vazeb: intrařetězcové (podobně jako gliadin) a interřetězcové (udržují pevnou a pružnou strukturu) [1].



Obr. 4: Schéma modelu propojení složek gluteninu [1]

2.2.3.3 Leukosin

Leukosin je pšeničný albumin, v pšenici se vyskytuje v množství 0,3 až 0,4 % na hmotnost zrna. Je soustředěn v klíčku a ze všech rostlinných bílkovin se nejvíce podobá živočišné bílkovině, hlavně svým vyšším obsahem leucinu a argininu [3].

3 IZOLACE PŠENIČNÝCH BÍLKOVIN

Analýza obilných bílkovin může být velmi obtížná vzhledem k jejich různorodosti. Na rozdíl od většiny ostatních rostlinných nebo živočišných bílkovin je i jejich rozpustnost složitější, což je způsobeno neobvyklým aminokyselinovým složením. Obilné bílkoviny jsou bohaté na glutaminy, proliny a hydrofóbní aminokyseliny, naopak mají nízký obsah kyselých a zásaditých aminokyselin. Proto některé analytické metody pro necereální bílkoviny nemusí být vhodné pro obilné bílkoviny [7]. Mimo jiné má na rozpustnost bílkovin vliv například i obsah minerálních solí, ale je ovlivněna i dalšími složkami endospermu (např. lipidy, sacharidy) [3,7]. Svůj podíl na rozpustnosti hrají i vazby, jakými jsou aminokyseliny spojeny – nekovalentně vodíkovými nebo hydrofobními vazbami, anebo kovalentně disulfidickými můstky a mohou tvořit vysokomolekulární komplexy [7].

Všechny pšeničné bílkoviny lze rozpouštět ve zředěných roztocích hydroxidu sodného, ale vlivem vysokého pH je rozrušeno mnoho kovalentních vazeb (zvláště disulfidových) a struktura proteinu je významně změněna. V dnešní době neexistuje žádný rozpouštěcí systém, který by extrahoval více jak 95 % bílkovin z různých odrůd pšenice bez rozrušení disulfidických vazeb. Nicméně, nejpoužívanějším rozpouštědlem je dodecylsulfát sodný (SDS) v kombinaci s fosforečnanem sodným [9].

Navzdory těmto potížím, izolaci a charakterizaci bílkovin v obilném endospermu umožňuje řada analytických metod [7]. Aby se mohlo zastoupení různých bílkovin a jejich obsah porovnávat, je zapotřebí přesně dodržovat preparační postupy při extrakci a izolaci a následně analytické postupy [3].

Doba extrakce proteinů se pohybuje kolem 30 minut. Většina vzorků gliadinů a gluteninů je stabilní nejméně jeden měsíc, ale albuminové a globulinové extrakty nejsou, protože mohou obsahovat proteázy, které štěpí bílkoviny. Doporučuje se skladování při laboratorní teplotě, pokud jsou vzorky zmrazené, mohou se vyskytnout sraženiny [7].

Před vlastní analýzou je velmi důležité odstranit všechny nerozpuštěné částice ze vzorku i rozpouštědla. Nejčastěji se to provádí filtrací nebo odstředěním (10 až 20 min při $25000 - 400000 \times g$) [7].

Bietz (1984) extrahoval 10 mg jemně mletého vzorku mouky při 60 °C po dobu jedné hodiny v 1 ml 0,1M fosforečnanu sodném, který obsahoval 2 % SDS. Po odstředění aplikoval 0,2 ml extraktu na kolonu chromatografu [32].

Kruger (1984) připravil vzorek jednoho gramu mouky v 10 ml 0,05M fosforečnanu sodném (pH 7), který obsahoval 0,5M roztok chloridu sodného a míchal jej 10 nebo 60 min při laboratorní teplotě. Po filtraci jej nastříkl k analýze na kolonu chromatografu. Každou frakci míchal navíc další 2 hodiny před měřením, aby bylo zabráněno změnám způsobeným proteolytickou aktivitou [33].

3.1 Izolace albuminů

Albuminy jsou rozpustné v destilované vodě, ale také v solných roztocích, kyselinách a zásadách [3,8]. Z roztoků se vysolují jejich nasycenými solemi [3].

Osborne (1907) extrahoval albuminy deionizovanou vodou 30 min a během této doby každých 10 min míchal vzorek 1 min. Směs odstředoval 5 min při 2000 ot./min [35].

3.2 Izolace globulinů

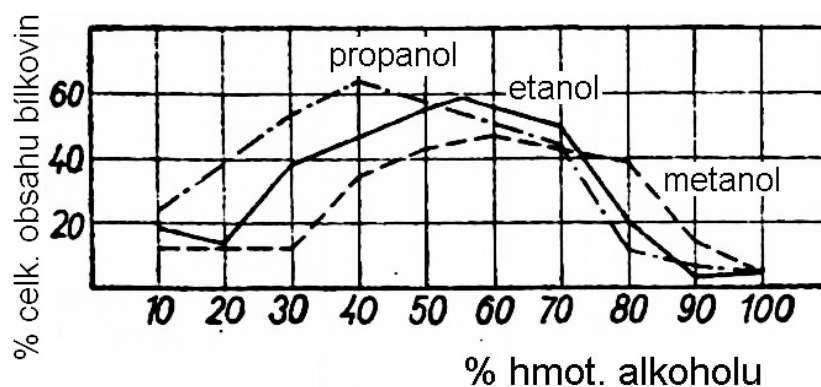
Globuliny jsou rozpustné ve vodných roztocích solí [8]. Pšeničný globulin se vyextrahuje 5% hmot. roztokem chloridu sodného a dialýzou proti destilované vodě se vysráží v množství asi 0,8 %. Vysoluje se nasycením extraktu síranem amonným nebo hořečnatým, nikoli chloridem sodným [3].

Osborne (1907) extrahoval globuliny stejným způsobem jako u albuminů, ale 0,5N roztokem NaCl [35].

3.3 Izolace prolaminů (gliadinů)

Gliadiny lze poměrně snadno izolovat, proto jsou jednou z nejlépe prozkoumaných bílkovinných skupin [3]. Jsou rozpustné ve vodných roztocích alkoholů (např. metanol, etanol, propanol) [3,8]. Čím je vyšší molekulová hmotnost alkoholu, tím je lepší rozpustnost gliadinů (Obr. 5). V absolutním etanolu je gliadin zcela nerozpustný, zředováním etanolu se jeho rozpustnost zvyšuje, při koncentraci 55 % hmot. je maximální, dalším zředováním etanolu rozpustnost klesá. Získané roztoky gliadinu v alkoholu jsou kalné a opaleskující [3]. Jeho vlastnosti ovlivňuje kromě koncentrace etanolu řada

parametrů, jako např. teplota, použití ultrazvuku, případně přidání redukčních činidel k extrakčnímu roztoku [8]. Přidá-li se do vodného výluhu z mouky etanol na koncentraci 55 až 60% hmot., srazí se pouze část rozpuštěných bílkovin, zbylá asi polovina zůstává v roztoku, protože se jedná o podíl prolaminů rozpustných ve vodě [3]. Nicméně, nejpoužívanější rozpouštědla jsou 70% hmot. roztok etanolu a 55% hmot. 2-propanolu [7]. Z alkoholického roztoku se izolují buď zředěním s vodou, nebo zvýšením koncentrace alkoholu [3].



Obr. 5: Rozpustnost gliadinu v alkoholech [3]

Kromě klasické etanolové extrakce můžeme gliadin získat buď vysolením z disperze lepku v 0,07N kyselině octové, nebo z extraktu mouky v roztoku močoviny, který se po vysolení globulinu zředí vodou. Rozpuštěním v močovíně je způsobena slabá reverzibilní denaturace. Pomocí lyofilizačního sušení lze získat nedenaturované preparáty, ale s nižším obsahem dusíku, tedy nečisté [3]. Dalším používaným rozpouštědlem je 0,05M fosforečnan sodný obsahující 0,5 % SDS (pH 6,9) [7,17]. Může být také přidáno 1 % 2-merkptoethanolu (ME) na redukci disulfidových můstků [7]. Nicméně výrobci kolon upozorňují, že používáním SDS se snižuje životnost kolony, pravděpodobně tím, že ovlivňují velikosti pórů a tím dosažené separace [17].

Gliadiny jsou mírně rozpustné v destilované vodě, hydroxidech, NaHCO_3 , glycerinu, glykolu a v kyselinách (HCl , H_2SO_4 , CH_3COOH), kde je rozpustnost závislá na pH. Naopak se špatně rozpouští ve zředěných roztocích solí (např. KI , CaCl_2 , FeCl_3 , MgCl_2 , KSCN). Zcela nerozpustné jsou v nasycených roztocích NH_4Cl a NH_4NO_3 [3].

Bietz (1983) zjistil, že metanol nebo 2-propanol může být nahrazen acetonitrilem (ACN), který ve směsi s vodou (1:1) a přidavkem kyseliny trifluoroctové (TFA) je pravděpodobně nejpoužívanější organická fáze v rozpouštědlech pro kapalinovou

chromatografii pšeničných bílkovin [17,22]. Toto médium je dostatečně hydrofobní a eluuje většinu polypeptidů, proto je velmi vhodné pro počáteční analýzu neznámých vzorků [22]. Acetonitril také vykazuje relativně nízkou viskozitu v porovnání s rozpouštědly, jako je např. etanol a 2-propanol, a to zejména při vyšších teplotách, což nezpůsobí vysoké tlaky na chromatografickou kolonu [17,22]. Kyselina trifluoroctová je nejpoužívanější komponenta modifikující selektivitu, obecně se používá v koncentraci 0,1 %, ale 0,05 % je také dostačující. Vyšší koncentrace TFA (0,2 – 0,5 %) vede k nepatrným rozdílům v selektivitě a hrozí deaminace bílkovin. Nicméně, TFA by měla být co nejkvalitnější, protože má hlavní příspěvek k absorpenci při vlnové délce 210 nm [22].

Jiný způsob extrakce pšeničných gliadinů popisuje například Batey (1984) pomocí 70% etanolu (po předběžné extrakci solí). Po vysušení je pak resuspendoval v 1M močovíně se základním pufrém, zfiltraval a aplikoval na kolonu [23].

Osborne (1907) izoloval gliadiny 70% roztokem etanolu a dále postupoval stejně jako v případě extrakce albuminů a globulinů [35].

3.4 Izolace glutelinů (gluteninů)

Gluteniny jsou rozpustné jen ve zředěných roztocích kyselin a zásad [3,8]. Jejich roztoky se špatně filtrují, takže příprava je velmi obtížná. Vliv obsahu minerálních solí na rozpustnost gluteninů by se dal vysvětlit výměnou iontů na volných polárních skupinách proteinové molekuly. Tato výměna probíhá mezi kladnou skupinou kvartérního amonia nebo negativní karboxylovou skupinou a přidanými anorganickými solemi nebo kyselinami. Tímto může být překonán vliv elektrostatických sil a valenčních vazeb v lepku, které drží peptidické řetězce pohromadě. Podle směru výměny iontu mohou pak části peptidických řetězců buď přecházet do roztoku, nebo být vysráženy. Tato představa také umožňuje vysvětlit snadnou oddělitelnost gliadinu a gluteninu. Gliadin obsahuje více amidového dusíku (ve formě glutaminu), což snižuje počet elektronegativních karboxylových skupin a omezuje elektrostatické síly, které poutají peptidické řetězce. Glutenin, obsahující méně amidového dusíku (glutaminu), je kompaktnější a tedy méně rozpustný [3].

Gluteniny se izolují extrakcí mouky 0,2% hmot. roztokem KOH po předběžném odstranění gliadinu. Sráží se neutralizací, čistí a suší etanolem a eterem. Preparáty jsou

však silně pozměněné proti nativnímu stavu, jsou nečisté a neurčité, což je způsobeno přítomností KOH. Moderní metodou se nejprve extrahuje globulin 70% etanolem a potom glutenin 60% hmot. izopropanolem, který obsahuje 0,2 % hmot. NaHSO₃. Po filtraci se přidá izopropanol do koncentrace 90 % hmot. a tím se glutenin vyextrahuje [3]. Může být také rozpuštěn v 0,1M kyselině octové [9].

Burnouf a Bietz (1985) dosáhli výborné separace gluteninu disociací 8M močoviny nebo 6M guanidinem hydrochloridem, redukováným 5 % ME nebo 0,1 % dithiotreiolem (DTT), alkylovaným 4-vinylpyridinem [24].

Gluteniny mohou být extrahovány metodou podle DuPont, et al (2005). Výhodou této metody je, že gluteniny jsou téměř úplně odděleny od ostatních bílkovin. Vzorek mouky se dvakrát extrahuje 1 ml 0,3M jodidu sodného (NaI), 7,5% 1-propanol (NaI-propanol) na 100 mg mouky. Extrakt byl centrifugován po dobu 10 min při 4500 × g a z něj byly separovány albuminy, globuliny a gliadiny a nerozpustné gluteniny. Gluteniny pak byly extrahovány ze škrobových zrn roztokem 0,4 ml 2% SDS a 25 mM DTT v 25 mM Tris (pH 8) na 100 mg mouky. Gluteniny byly přesráženy z extraktu přidáním čtyřnásobného objemu 0,1M octanu amonného ve 100% metanolu [39].

Jak již bylo uvedeno u izolace gliadinů, i pro glutenin platí, že pro lepší definování skupin látek je možné dále frakcionovat extrahované gluteniny elektroforetickými a chromatografickými metodami [8].

Kruger a Marchylo (1985) extrahovali pšeničné bílkoviny 50% 1-propanolem s přidavkem 1 % kyseliny octové a DTT. Tyto extrakty obsahovaly nízkomolekulární prolaminu a alkohol-rozpustné gluteniny [25].

Osborne (1907) extrahoval gluteniny roztokem 50% 1-propanolu s přidavkem 1 % DTT a další postup byl stejný jako v případě extrakce albuminů, globulinů a prolaminů [35].

Marchylo, et al (1988) použil gluteninový extrakt, z kterého vyloučil gluteniny 100% propanolem s přidavkem 1 % DTT. Tato směs byla míchána a skladována při teplotě 4 °C po dobu 60 minut, aby se vysrážely vysokomolekulární podjednotky gluteninů, což vede k vyšší čistotě frakce. Dále byl vzorek centrifugován a přesrážené gluteniny resuspendovány roztokem obsahujícím 50 % propanolu v 0,082M Tris-HCl (pH 7,5), který dále obsahoval 2M močovinu a 1 % DTT [36].

Mezi gliadinem a gluteninem není přesně vymezená hranice. Změnou izolační metodiky se jejich vzájemný poměr změní. Např. horkým 70% hmot. etanolem se rozpustí tolik bílkoviny, že přechází do roztoku až 26 % hmot. gluteninu. Preparáty získané různým postupem mají rozdílné složení aminokyselin, proto je glutenin v tomto směru mnohem méně prostudován než gliadin. Jedno z možných vysvětlení je, že se různými činidly přerušují různé vazby v původní molekule [3].

3.5 Použití ultrazvuku při izolaci

Mecham, et al (1962, 1965) zjistili, že rozpouštění pšeničných bílkovin ve zředěné kyselině octové se významně zlepší, když se z mouky uhněte těsto. Vysvětlil to tak, že smícháním dojde ke snížení velikosti podjednotek gluteninů, které se seskupují do trojrozměrné sítě [26-27]. Tsen (1967, 1969) a Tanaka a Bushuk (1973) později došli k závěru, že nejpravděpodobnější příčinou snížení velikosti molekul bílkovin je rozštěpení velmi velkých molekul gluteninů rozrušením disulfidových vazeb [28-30]. Tsen (1967) prokázal, že zvýšení rozpustnosti je téměř výhradně způsobeno rozpuštěním dříve nerozpustných gluteninů, a bílkoviny s menší molekulou (gliadiny, albuminy a globuliny) nejsou ovlivněny. Avšak nevýhodou míchání těsta v mixografu a dalších obdobných přístrojích vyžaduje poměrně velké množství mouky (nejméně 10 g). Pro zvýšení rozpustnosti bílkovin je také nutná dlouhá doba míchání, vymražení vody a mletí těsta [28].

Singh, et al (1990) dosáhli podobného rozštěpení velkých molekul bílkovin pomocí ultrazvuku k tomu, aby vyextrahovali celkové bílkoviny z malého vzorku mouky. Extrakce veškerých pšeničných bílkovin je možná za použití ultrazvuku přímo v 2% roztoku SDS (pH 6,9). Úplného vyextrahování je dosaženo bez nutnosti chemické redukce disulfidových vazeb. Další výhodou použití ultrazvuku při izolaci pšeničných bílkovin je zvýšení jejich rozpustnosti a k dosažení úplné extrakce tedy postačí mnohem méně času (cca 30 sekund). V kombinaci s velikostně-vylučovací chromatografií tento postup poskytuje rychlou metodu analýzy relativního a absolutního množství hlavních frakcí pšeničných bílkovin. Kromě toho dostačuje velmi malé množství vzorku mouky na jednu analýzu pšenice (cca 11 mg, což odpovídá asi polovině endospermu) [9].

4 DETEKCE BÍLKOVINNÝCH FRAKCI ZE PŠENICE

Moderní separační techniky, v podstatě chromatografické a elektromigrační metody, umožňují rozdělení směsí na získání jednotlivé frakce o užší distribuci. Na rozdíl od klasických separačních technik, založených většinou na fázových separacích, je frakcionace látek pomocí chromatografie a elektroforézy dána odlišnou pohyblivostí jednotlivých složek směsi za daných podmínek. V současné době moderní separační techniky slouží nejen k preparativním účelům, ale i k účelům analytickým [11]. Proto je chromatografie účinná také pro separaci a charakterizaci obilných proteinů [7].

4.1 Elektroforetické metody

Elektroforéza je jednou z hlavních metod využívaných při analýze pšeničných bílkovin [8]. Patří mezi elektromigrační separační metody, jejichž principem je využití rozdílné pohyblivosti nabitých částic v elektrickém poli k jejich separaci [19]. Rychlost pohybu částic je závislá na velikosti náboje, velikosti a tvaru molekuly, na povaze nosiče, elektrolytu, pH, atd. [20-21]. Elektroforéza spočívá v přenosu elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli, které se vytváří vkládáním konstantního stejnosměrného napětí mezi elektrody [19]. Látky se budou pohybovat ve směru elektrody s opačným nábojem, tedy kationty ke katodě a anionty k anodě [20]. Schéma zařízení na elektroforézu je uvedeno na Obr. 6. [20].



Obr. 6: Základní uspořádání plošné elektroforézy [20]

4.1.1 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE)

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu je řazena mezi tzv. zónovou elektroforézu, která je prováděna na plošném nosiči napuštěným elektrolytem, aby složky byly během separace fixovány [19]. Nosiče používané při elektroforéze musí být nerozpustné ve vodě a měly by mít co nejmenší adsorpční schopnosti. V současné době se jako nosiče používají hlavně gely, pravděpodobně nejčastěji polyakrylamidový. Velmi důležitým faktorem při PAGE je stupeň zesílení gelu. Gel s většími či menšími póry je totiž mechanickou překážkou pro molekuly určité velikosti [20].

Separace založená na velikosti molekul, jejíž použití je určeno výhradně pro bílkoviny se nazývá **elektroforéza v polyakrylovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE)** [20]. Dodecylsulfát sodný vytváří s proteiny komplexy, jejichž náboje se následně vyrovnají, a proto migrují v elektrickém poli stejnou rychlostí. K jejich rozdělení tedy dojde na jednotlivé frakce pouze na základě molekulové hmotnosti [8]. Všechny bílkoviny totiž vážou SDS v konstantním poměru (cca 1,4 g SDS na 1 g bílkoviny), a tím charakteristicky mění svou konformaci [20]. Díky tomu se SDS-PAGE stala relativně levnou možností separace obilných bílkovin [8].

Cleveland (1977) popsal modifikovanou verzi této metody. Bílkoviny jsou nejprve odděleny od kontaminujících látek SDS-PAGE a detekovány specifickým zbarvením. Vyříznuté plátky gelu obsahující bílkoviny jsou umístěny do drážek druhého diskontinuálního polyakrylamidového gelu. Studované bílkoviny jsou elektroeluovány z plátek do zaostřujícího gelu, který obsahuje proteinasy s vysokou specifickou aktivitou. Zde probíhá štěpení. Peptidové fragmenty jsou pak elektroforeticky separovány v polyakrylovém gelu v přítomnosti SDS. Naštěpené a separované produkty jsou detekovány jako v případě klasické SDS-PAGE. Tato metoda může sloužit jako citlivý indikátor stupně homologie bílkovin [31].

Islas-Rubio, et al (2006) extrahovali pšeničné bílkoviny mícháním v TFA-voda nebo HCl-voda (pH 3,0) po dobu 5 min při laboratorní teplotě. Vzorek byl dále ultrazvukován a 15 min odstředován při $17800 \times g$. Zfiltrovaný supernatant byl zahříván 2 min při 80 °C a okamžitě zchlazen v ledové vodní lázni. Po čtyřdenním skladování při pokojové teplotě byl připraven k analýze na SDS-PAGE a velikostně-vylučovací chromatografii [40].

4.2 Enzymová imunoanalýza na pevné fázi (ELISA)

Metoda ke stanovení gliadinů v pšeničné mouce je enzymová imunoanalýza na pevné fázi (ELISA), založená na interakci specifické protilátky s antigenem. Nejčastěji bývá prováděna v tzv. sendvičovém uspořádání, které je založeno na postupném vytvoření zakotvených komplexů protilátka-antigen-enzymově značená protilátka. Používají se polyklonální protilátky a monoklonální protilátky. Polyklonální protilátky pro tento druh imunochemických stanovení mají své opodstatnění z hlediska nižší ceny a jednodušší přípravy. Většina experimentů s nimi proběhla v 80. letech minulého století, než se staly specifičtější monoklonální protilátky lépe dostupné. Příprava monoklonálních protilátek je z principu náročnější, delší a finančně nákladnější. Nicméně, výhody definovaného individua získané imunoglobulinové frakce jsou pro sestavení imunochemické metody stěžejně nahraditelné. V současnosti se už protilátky nepřipravují v laboratoři, ale dodávají se komerčně vyráběné [8].

Prvním opravdu úspěšným pokusem na sestavení ELISA metody byla práce Skerritta a Hillové, která využívala monoklonální protilátky proti tepelně odolným ω -gliadinům. Jako referenčního materiálu pro kvantifikaci bylo použito gliadinového standardu, připraveného extrakcí pšeničné mouky 40% etanolem. Tato metoda byla dlouhou dobu jako jediná přijata Asociací Oficiálních Analytických Chemiků pro stanovení lepku v potravinách a stala se základem prvních komerčních kitů [8].

4.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie se využívá hlavně jako kontrolní srovnávací metoda pro odhalení falešně pozitivních výsledků imunoanalytických měření. Bílkoviny se ionizují dusíkovým laserem ve vhodné nízkomolekulární matrici, která zabraňuje rozpadnutí makromolekul. Vzniklé ionty jsou poté urychleny na krátkém úseku silným stejnosměrným elektrickým polem. Měří se doba letu iontů k detektoru v trubici bez elektrického pole, která je úměrná poměru jejich hmotnosti ku jejich náboji. Metoda slouží v tomto provedení k určení známých peptidů. Její nevýhodou je vysoká přístrojová a finanční náročnost [8].

4.4 Chromatografické metody

Chromatografie je fyzikálně chemická separační metoda selektivního dělení složek směsi založená na rozdílné rychlosti migrace rozpuštěných látek. Konkrétně jde o migraci v systému dvou fází, z nichž obvykle jedna fáze je nepohyblivá (stacionární) a druhá pohyblivá (mobilní). Chromatografické dělení nastává, uvede-li se jedna fáze do pohybu proti druhé, kde je prouděním porušována a difuzí zpětně nastolována rovnováha mezi látkami rozpuštěnými ve stacionární a mobilní fázi chromatografického systému [11,13].

Chromatografické metody tvoří široká skupina metod, založených na různých principech separace. Nejčastěji se rozlišují dvě hlavní skupiny chromatografických metod podle charakteru fází, a to plynová chromatografie (GC) a kapalinová chromatografie (LC). Plynová chromatografie pracuje v systému plyn - pevná látka nebo častěji plyn - kapalina. Kapalinová chromatografie pak v systémech kapalina – kapalina nebo pevná látka – kapalina [11].

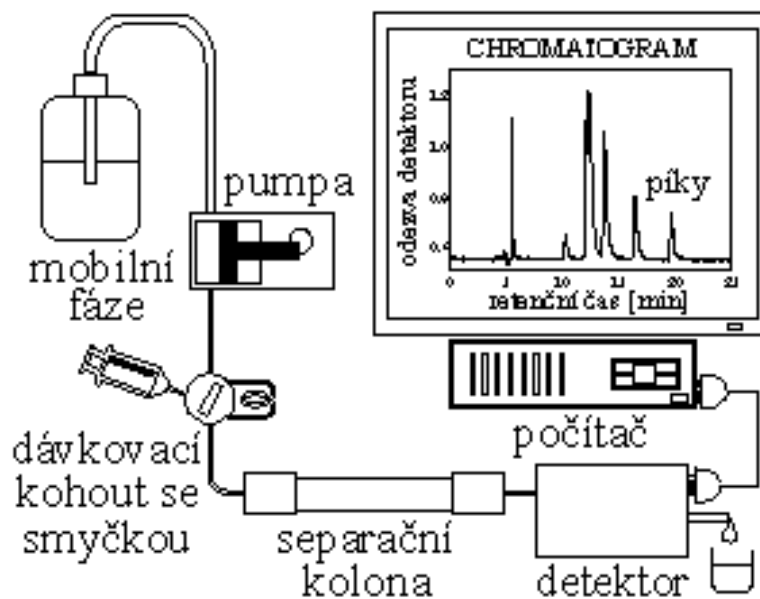
4.4.1 Kapalinová chromatografie

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina [10]. Stacionární fáze může být umístěna v koloně (kolonová chromatografie), upravena do tenké vrstvy (tenkovrstvá chromatografie) nebo tvořena papírem (papírová chromatografie) [10,12,13]. Jsou využitelné všechny možné mechanismy separace: adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, molekulově síťový efekt nebo specifické interakce v afinitní chromatografii [10].

V kolonové chromatografii je skleněná nebo plastová trubice (přednostně z průhledného materiálu) naplněná porézním sorbentem [10-11]. Na horní vrstvu náplně dávkujeme malé množství vzorku a pak přidáváme mobilní kapalnou fázi, která unáší všechny složky mezerami mezi částicemi porézní náplně [10,14]. Při postupu kolonou se složky vzorku od sebe separují a v různých časech opouštějí spodní část kolony [10].

Toto klasické kolonové provedení se stalo základem vysokotlaké neboli vysoceúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) [10]. K účinné separaci je třeba použít dostatečně malých zrníček sorbentu, která kladou prostupující kapalině značný odpor, a to vyžaduje vyšší tlak, aby se dosáhlo požadovaného průtoku $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ [10,14,17]. To znamená, že tlak v koloně exponenciálně roste s klesající velikostí částic. Menší

velikost částic tedy klade vyšší nároky na použité zařízení. Standardně používané HPLC přístroje pracují při 20 – 60 MPa [11,12,14]. Chromatografický systém se skládá ze zásobníku na mobilní fázi, pumpy, dávkovacího kohoutu se smyčkou (aplikátoru vzorku), separační kolony s chromatografickým materiálem, detektoru a počítače (výstup analyzovaných dat), uspořádání je uvedeno na Obr. 7 [7,11,14,18].



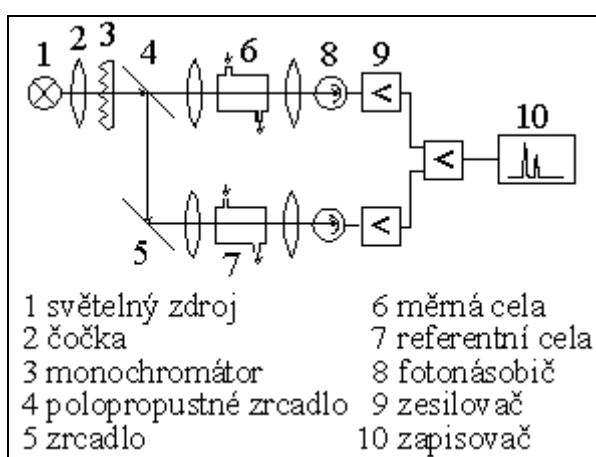
Obr. 7: Schéma uspořádání kapalinového chromatografu [18]

Tyto chromatografické systémy jsou velmi spolehlivé a používají malé kolony, které snesou poměrně vysoké tlaky a rychlosti průtoku, díky jejich malým, jednodolným a stabilním obalům [7]. Kolona s chromatografickým materiálem je ta nejdůležitější část zařízení [11]. Většina jich je naplněna jednotným, porézním a dostatečně jemným silikagelem, což je amorfní forma oxidu křemičitého. Pro analýzu pšeničných proteinů se obecně používá s póry 300 Å, velikost 5 až 10 μm . Úspěch separace a stanovení závisí nejen na náplni kolony a velikosti částic chromatografického materiálu, ale i na rozměrech kolony. Obvykle se používají nerezové, skleněné nebo plastové kolony s vnitřním průměrem 4 až 4,6 mm a délkou 250 mm [7,11]. Separace na těchto kolonách probíhá poměrně rychle s velkou citlivostí, dobrým rozlišením a reprodukovatelností. Nelze opomenout ani snadné použití [7]. Nejmodernější přístroje tohoto typu jsou plně řízeny počítači a zaručují přesnou a rychlou práci [11].

O separaci jednotlivých složek vzorku rozhodují nejen jejich interakce se stacionární fází, ale rovněž velmi důležitá je použitá mobilní fáze [10]. Téměř všechna rozpouštědla vhodná pro extrakci nebo rozpouštění pšeničných bílkovin mohou být použita pro HPLC analýzu, včetně samotných chromatografických rozpouštědel. Rozpouštědla by měla zpravidla mít pH 2 – 8, v kterém je silikagel stabilní. Musí být dostatečně čistá, aby vykazovaly minimální absorbanci ve vlnových délkách používaných pro detekci vzorků (např. rozpouštěcí modifikátory jako je TFA) [7].

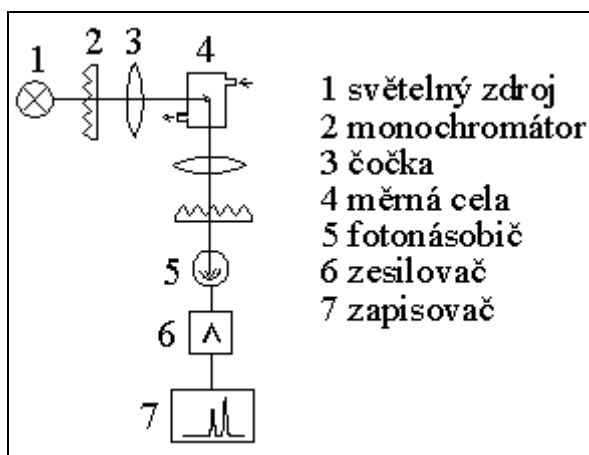
Pro HPLC pšeničných bílkovin se používají různé typy detektorů, nejčastěji spektrofotometrické, fluorimetrické nebo elektrochemické [7,10,15].

Spektrofotometrický ultrafialový (UV) absorpční detektor je založen na principu absorpce mobilní fáze vycházející z kolony. Jednodušší detektory měří při jedné vlnové délce, složitější umožňují její nastavení [7,10]. Pro maximální citlivost a stanovení obsahu látky, jsou nejběžnější vlnové délky 206 až 210 nm. V tomto rozsahu absorbují UV záření peptidicky vázané karbonylové skupiny. Při 220 až 225 nm se při snížené citlivosti detekuje vázaný peptid. A nakonec při detekci proteinu založeného na absorbanci tryptofanu a tyrozinu se používá 280 nm [7]. Pokles absorbance pšeničných bílkovin je přímo úměrný délce skladování obilí [16]. Spektrofotometrický detektor může zachytit až 1 pg složky [10]. Schéma je uvedeno na Obr. 8 [18].



Obr. 8: Spektrofotometrický detektor [18]

Fluorimetrický detektor je založen na principu fluorescence. V podstatě jde o schopnost látek absorbovat UV záření a pak vysílat záření o vyšší vlnové délce, které se měří fotonásobičem kolmo na směr vstupujícího záření [10]. Nejcitlivější ukazatelé denaturačních změn bílkovin jsou rezidua tryptofanu [16]. Detektor zachytí až 10 pg látky a lze jej vhodně kombinovat se spektrofotometrickým detektorem [10]. Schéma je uvedeno na Obr. 9 [18].



Obr. 9: Fluorimetrický detektor [18]

Vodivostní nebo **voltametrické elektrochemické detektory** lze použít tam, kde jsou v roztocích obsaženy ionty respektive složky oxidovatelné nebo redukovatelné na polarizovatelné elektrodě [10].

Přístroje HPLC se poslední dobou používají k analýze prakticky jakýchkoliv látek. Pro separaci a stanovení bílkovin byly vyvinuty metody, jako velikostně-vylučovací HPLC (SE-HPLC), HPLC na reverzní fázi (RP-HPLC) a HPLC na iontoměničích (IE-HPLC). Takto provedené stanovení podává cenné informace o rozdělení bílkovin do jednotlivých podskupin a o vlastnostech těchto frakcí. Dalším využitím chromatografických technik je předčištění a příprava lépe definovatelných skupin bílkovin [8]. Výhodou ve srovnání s většinou metod je HPLC velmi rychlá. Optimální RP-HPLC rozlišení trvá asi jednu až dvě hodiny. Pro některé účely (např. rychlé prověření odrůd tvrdé pšenice pro kvalitní těstoviny) často postačuje 10 až 15 min separace při vyšších teplotách. Podobně, testovací doba u SE-HPLC je mezi 20 až 30 min a pro IE-HPLC asi 15 až 20 min. Další velkou výhodou je citlivost. Díky malým, účinným kolonám a schopnosti monitorovat proteiny při vlnové délce 210 nm, HPLC pšeničných bílkovin vyžaduje velmi málo vzorku (např. pro RP-HPLC stačí jen 0,05 až 5 mg bílkovin) [7].

4.4.1.1 RP-HPLC

Vysoko-účinná kapalinová chromatografie s tzv. obrácenými fázemi funguje na principu rozdělovací chromatografie a umožňuje separovat směsi látek rozpustných v nepolárních rozpouštědlech [11,15]. Probíhá v systému dvou navzájem nemísitelných kapalin a k separaci dochází pohybem mobilní fáze, což je příčinou neustálého porušování a nového ustavování rovnováhy na základě odlišnosti rozdělovacích koeficientů [11-12]. V původním provedení obě kapaliny postupovaly protiproudě, kde byla rozhodující podmínkou vzájemná nemísitelnost mobilní a stacionární fáze, ale to v praxi obvykle nešlo splnit a díky částečné mísitelnosti hrozilo vymývání stacionární fáze z kolony, proto se v současné době již toto uspořádání nepoužívá. Nyní je jedna z kapalných fází chemicky zakotvena na inertní pevný nosič, zatímco mobilní fáze přes ni protéká [10-11]. V RP-HPLC se používá polární mobilní fáze a nepolární stacionární fáze [15]. Pravděpodobně nejpoužívanější organická mobilní fáze je ACN spolu s TFA a vodou. Je to vynikající rozpouštědlo pro většinu polypeptidů a je dostatečně hydrofobní pro eluci většiny bílkovin z jakéhokoliv typu kolon. Gliadiny se vymývají při maximální koncentraci ACN 50 až 60 % [7]. Jako další vhodné mobilní fáze je možné použít alkoholy (methanol) a ethery (tetrahydrofuran, diethylether) [10,15]. Čím je nižší polarita nebo zvětšující se nepolární část v molekulách, tím je vyšší eluční síla mobilní fáze a retence složek [10]. Většinou však tyto mobilní fáze mají příliš velkou eluční sílu a proto se používají ve směsi s vodou [15]. Stacionární fází je kapalina zakotvená na inertním pevném nosiči [10-11]. Nosičem může být běžný silikagel s chemicky vázanou uhlovodíkovou skupinou (fenyl, CH_3^- , $C_8H_{17}^-$, $C_{18}H_{37}^-$, a další) nebo sklo [10,15]. Póry mohou prostupovat celým objemem kuličky nosiče nebo mohou být jen povrchové. Stacionární fáze se zakotvuje různými reakcemi, například silanizací silanolových skupin trialkylchlorsilany, dialkyldichlorsilany nebo alkyltrichlorsilany [10].

Analyzovat lze v podstatě libovolné směsi látek jakékoliv polaritě rozpustné v použité mobilní fází [10,15]. Vzhledem k tomu, že v průběhu rozdělovací chromatografie nedochází k vazbě rozpuštěných látek na některou z fází, odpadá nutnost eluce, a jde tedy o proces jednostupňový [11]. V případě RP-HPLC se obvykle jedná o detailní analýzu směsi látek, tedy o rozdělení na jednotlivé složky a nikoliv skupiny, je nutné vždy vhodně zvolit mobilní fází a mnohdy ještě navíc vhodnou metodou předseparovat vzorek [15].

Pro detekci se nejčastěji používá fluorimetrický nebo spektrofotometrický (UV) detektor při vlnové délce 210 nm [7,15].

RP-HPLC je nepoužívanější na frakcionaci a charakterizaci pšeničných bílkovin. Bietz (1983) ji poprvé použil na pšeničných a kukuřičných bílkovinách [22]. Do té doby byla používána hlavně na analýzu velkých peptidů nebo jednoduchých proteinů, ale ne pro komplikované biologické směsi jako jsou bílkoviny obilovin [7].

RP-HPLC poskytuje vysoké rozlišení gliadinů, které jsou přesnými ukazateli genotypů, a díky tomu může identifikovat většinu odrůd pšenice. Pouze odrůdy, které mají téměř shodné rodokmeny, může být obtížné rozlišit. Jedna z nejzajímavějších aplikací RP-HPLC je její použití k určení kvality bílkovin pro výběr odrůd při křížení [7].

Dále může být použita pro analýzu rozdílů při pěstování v různých lokalitách, přezkoumání genetické čistoty odrůdy, pro identifikaci a registraci nově vydaných a patentovaných odrůd. Nakonec také pro studium proteinových interakcí s dalšími složkami endospermu [7].

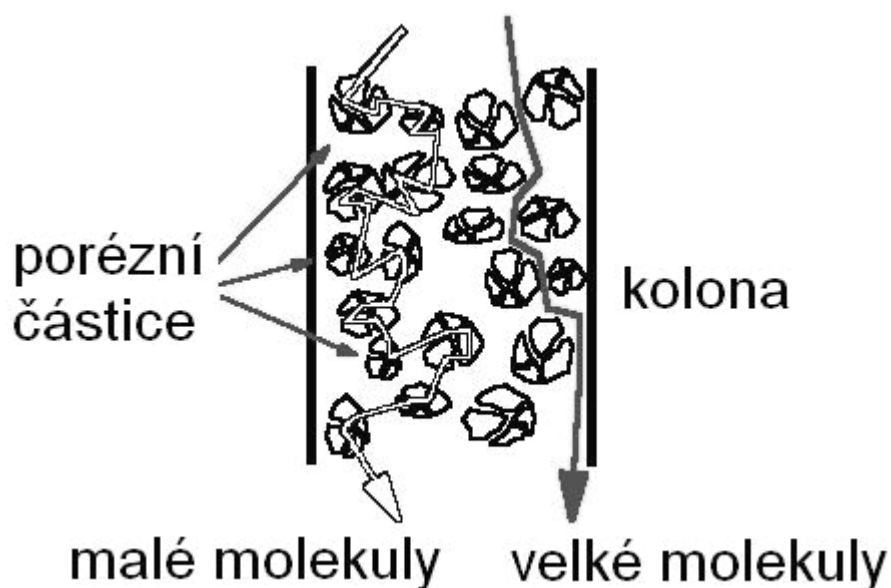
Abugoch, et al (2009) použili RP-HPLC při frakcionaci bílkovin mouky quinoa. Bílkoviny byly oddělené předkolonovou derivatizací diethyl etoxymethylen malonátem, následovala RP-HPLC se spektrofotometrickou detekcí při 280 nm podle Alaiz, et al (1992) [16,45].

Hartmannová a Koehler (2008) extrahovali bílkoviny fosfátovým pufrém (0,067 mol/l KNaHPO₄, 0,4 mol/l NaCl, pH 7,6), 60 % obj. etanolem a redukčním pufrém (0,1 mol/l Tris/HCl pufr, pH 7,5 / 50% obj. 1-propanol / 1% hmot. DTT) podle metody Wieser, et al (1998) [38,46]. Vzorek byl aplikován na RP-HPLC při teplotě kolony 60 °C [38].

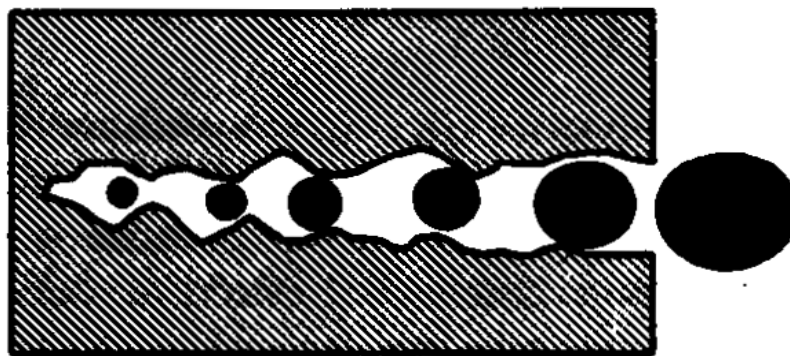
4.4.1.2 SE-HPLC

Velikostně-vylučovací chromatografie (také nazývána gelová permeační nebo gelová filtrace) je považována za zvláštní typ rozdělovací chromatografie [7,12]. Nosičem stacionární fáze je gel a stacionární i mobilní fází je vodné prostředí. Stacionární fáze je však uzavřena v gelu, čímž je zajištěna nemísitelnost s fází mobilní. Díky tomuto speciálnímu uspořádání se zcela mění charakter separace, neboť podle rozdělovacího koeficientu jí podléhají pouze látky, které proniknou póry gelu ke stacionární fázi [11].

V SE-HPLC mají na separaci rozhodující vliv tvar a rozměry molekul látek ve směsi [10-12]. Dochází zde k rozdělování látek mezi pohyblivou částí mobilní fáze, která se nachází mezi jednotlivými zrnny gelu (objem V_0), a nepohyblivou částí mobilní fáze nacházející se uvnitř pórů gelu (V_i) [10]. Látky s velkou molekulou postupují kolonou nejrychleji, protože nejsou schopny projít póry gelu (molekulovým sítem). Nastává u nich jev sterického vyloučení (**exkluze**). Malé molekuly pronikají do nitra pórů naplněných rozpouštědlem (**permeace**) a musí opět difundovat ven, proto se ve svém postupu kolonou zdrží (viz Obr. 10) [10-12]. Čím jsou molekuly menší, tím pronikají hlouběji a mají tudíž vyšší hodnoty retenčních objemů než větší molekuly (viz Obr. 11) [10]. Při průtoku směsi látek nedochází ke vzniku skutečné rovnováhy mezi koncentracemi látek uvnitř a vně gelu [12]. Velké molekuly nemohou pronikat do pórů gelu, proto je jejich koncentrace ve stacionární fázi nulová. Naopak velmi malé molekuly mohou proniknout do libovolné hloubky pórů gelu a jejich koncentrace ve volné mobilní fázi i uvnitř pórů je totožná [10].



Obr. 10: Průchod molekul kolonou SE-HPLC [44]



Obr. 11: Permeace molekul různé velikosti do pórů gelu [10]

Gel se volí podle vlastností separovaných látek. Pro látky ve vodě rozpustné se používají hydrofilní gely, například dextranové gely Sephadex[®]. Vyrábí se z fragmentů dextranu (produkt přeměny sacharosu bakterií *Leuconostoc mesenteroides*), zesíťovaného epichlorhydrinem v alkalickém prostředí. Stupeň zesíťování a tím i velikost pórů lze ovlivnit změnou poměru reaktantů [10,12]. Na dělení nízkomolekulárních látek (peptidy, aminokyseliny, koenzymy) jsou vhodné gely s malými póry Sephadex[®] G-10 a G-15. Na odsolování roztoků proteinů Sephadex[®] G-25 a G-50 a na separaci proteinů do relativní molekulové hmotnosti 600 kDa se používá Sephadex[®] G-75, G-100, G-150 a G-200 [12]. Mobilní fází je voda s případným přídavkem organického rozpouštědla. Pro látky nerozpustné ve vodě se používají hydrofobní gely. Patří mezi ně kopolymery styrenu a divinylbenzenu (Styragel). Mobilními fázemi mohou být aromatické, chlorované a některé heterocyklické uhlovodíky. Univerzální gely na bázi silikagelu a porézních skel se používají pro separaci jak hydrofobních, tak i hydrofilních látek. Kolony mají průměr až 8 mm a délku v desítkách cm. Pracuje se při nižších tlacích než u ostatních HPLC [10].

SE-HPLC je také velmi užitečná metoda na izolaci a charakterizaci obilných proteinů, používá se například na frakcionaci [7,12]. Jedná se o rozdělení směsi látek na základě relativní molekulové hmotnosti jejích složek. Podle typu látek se zvolí gel, který je schopen frakcionovat látky v dané oblasti M_r [12]. Například gliadin může být frakcionován na pórovitém dextranovém gelu Sephadex[®] G-100 až G-200 na vysokomolekulární gliadin, ω -gliadin a nízkomolekulární gliadin. Glutenin může být rozdělen do frakcí lišících se molární hmotností, rozpustností, a asociativní tendencí. Tímto

způsobem může SE-HPLC rychle, spolehlivě a při velké citlivosti charakterizovat a srovnávat pšeničné bílkoviny a stanovovat jejich relativní molekulovou hmotnost [7,12].

Dále se SE-HPLC může použít jako skupinová separace, tj. dělení dvou nebo více látek s velkým rozdílem M_r (např. odsolení proteinů, polysacharidů, odstranění extrakčního činidla, atd.). Odsolovací kolona se používá zvláště při práci s nestálou bílkovinou, která by při časově náročnější dialýze mohla denaturovat [12].

Jedním z častých využití SE-HPLC je zkoumání rozsahu klíčení zrn a rozlišování různých genotypů a odrůd stanovením distribuce molekulové hmotnosti proteinů, což úzce souvisí s pekařskou kvalitou bílkovin. Nakonec můžeme zkoumat vzájemné proteinové kovalentní a nekovalentní vazby a interakce s ostatními složkami endospermu [7].

Gupta, et al (1993) provedli extrakci dvěma kroky. První extrakt obsahoval bílkoviny dobře rozpustné ve zředěném SDS, zatímco druhý byl složen z bílkovin rozpuštěných jen za pomoci ultrazvuku. Pro první extrakci bylo 11 mg mouky suspendováno v 1 ml 0,5% hmot. SDS-fosfátovém pufru (pH 6,9) a 10 sekund mícháno. Vzorek byl následně míchán 5 min při 2000 ot./min a odstředován po dobu 30 minut při $10000 \times g$, zfiltrován a aplikován na SE-HPLC. K separaci byla použita mobilní fáze ACN/voda (1:1) s obsahem 0,1 % obj. TFA při průtoku 0,2 ml/min. Proteiny byly detekovány spektrofotometricky v UV oblasti 210 nm [34].

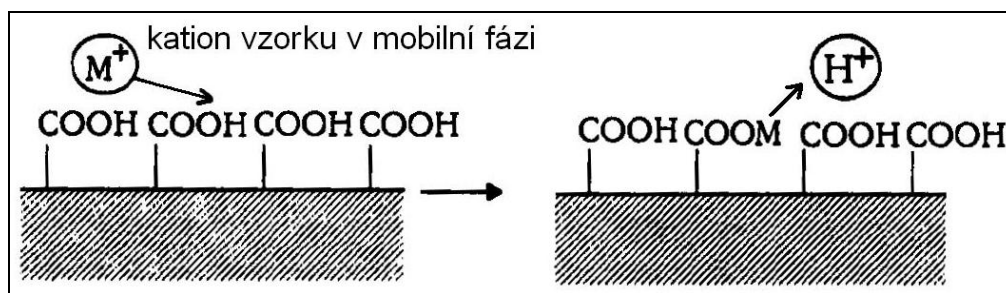
Kindred, et al (2008) izolovali bílkoviny v 0,1M fosforečnanu sodném (pH 6,9), který obsahoval 1 % SDS. Následovalo použití ultrazvuku a extrakce při 60 °C. Izolované bílkoviny aplikoval na SE-HPLC a detekoval při 214 nm [37].

Stevenson, et al (2003) nejprve 0,1 g mouky dvakrát extrahovali v 0,05M kyselině octové (4 a pak 2 ml) k odstranění monomerní bílkovinné frakce. Potom zbytek opět extrahovali stejným roztokem za použití ultrazvuku a centrifugy pro získání polymerní frakce bílkovin. Extrakt byl aplikován na SE-HPLC a detekován při 210 nm [41].

4.4.1.3 IE-HPLC

Stacionární fází je iontoměnič (ionex) [10-11]. Ionexy jsou pevné látky, které jsou schopny vyměňovat ionty s kapalnými fázemi [12]. Jsou to makromolekulární matrice (polystyren, celuloza, dextran, apod.) obsahující kovalentně vázané ionizovatelné skupiny kyselé nebo zásadité povahy [10,12]. Na každou tuto funkční skupinu je iontovou vazbou

připojen protiion s opačným nábojem, který je vyměňován iontem stejného znaménka náboje obsaženým v kapalně fázi (viz Obr. 12). Při tom se uplatňují elektrostatické přitažlivé síly mezi ionty opačného náboje (Coulombovy síly) [10]. Podmínkou pro úspěšnou IE-HPLC je schopnost látek proniknout do nitra částic ionexu [12]. Látky ve směsi se pak separují podle stupně ionizace skupin a jejich afinity k ionexu, tedy podle počtu ionizovaných skupin a velikosti jejich nábojů [11]. Je to dvoustupňový proces, kde se v první fázi látky podle velikosti neseného náboje zachytí na ionexu a ve druhé (eluční) fázi musí být z ionexu vytěsněny sloučeninami s větší afinitou k ionexu (změnou iontové síly) nebo odlišným pH, přičemž dojde ke změně nábojových vlastností [11-12]. K desorpci bílkoviny tak dochází v důsledku změny náboje nebo vytěsněním solemi [12].



Obr. 12: Výměna iontu na povrchu iontoměniče [10]

Iontoměniče mají různou kapacitu, kterou lze vyjádřit v molech vyměněných iontů na 1 g iontoměniče (až $3 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$) a dělí se na **Katexy**, jejichž funkční skupiny jsou kyselé (sulfoskupiny, karboxylové skupiny) a slouží k výměně kationtů a **Anexy**, jejichž funkční skupiny jsou zásadité (aminoskupiny, kvarterní amoniové báze) a slouží k výměně aniontů [10,12].

Mezi různými ionty se váže ten ion, který má největší náboj a objem. Ion s větším objemem je méně hydratován molekulami vody a hydratační obal se snadněji naruší při navázání iontu na ionex. Roli při výměně mohou hrát i jiné faktory. Jako eluční činidlo je nutné použít látku, která je schopna konkurovat iontům navázaným na ionexu. V případě katexů použijeme například kyselinu metylsírovou nebo chlorovodíkovou, pro anexy hydroxid sodný. Kovové ionty je možné separovat i na anexech, když je před tím převedeme do záporně nabitého komplexu vhodným komplexotvorným činidlem. Naopak

anionty schopné tvořit ligandy můžeme separovat na katexech, které před tím nasytíme kationtem kovu (např. Ni^{2+}). Tyto fixované kationty poslouží jako centrální atomy komplexů vznikajících při separaci aniontů (ligandová výměna) [10].

Nejvýznamnější ionexy na bázi syntetických polymerů jsou deriváty zesíťovaného polystyrenu nebo akrylátu s příslušnými funkčními skupinami (triethylaminoethyl-, sulfo-, karboxy-, atd.). Nejsou však vhodné pro chromatografii biopolymerů (velké molekuly, denaturace). U ionexů na bázi celulosy a jiných polysacharidů je charakter interakce se separovanými látkami komplexní, převládají však iontové síly. Celulosové ionexy se připravují reakcí celulosy nabobtnalé v alkalickém prostředí a chlorderivátu žádané funkční skupiny. Katexy používané pro vazbu zásaditých a neutrálních bílkovin jsou karboxymethylcelulosa, fosfocelulosa, sulfoethylcelulosa. Anexy používané pro vazbu kyselých a neutrálních bílkovin jsou di- a tri-ethylaminoethylcelulosa. Celulosové ionexy mají řadu výhod, např. práce v rozsahu pH 2 – 10, opakovatelné použití po regeneraci a hlavně značná schopnost vázat bílkoviny. Dextranové iontoměniče jsou na bázi polysacharidu dextranu (bakteriální produkce) zesíťovaného epichlorhydrinem. Výhodou je velká adsorpční kapacita pro bílkoviny (5x větší než ionexy celulosové). Kromě ionexových vlastností mají i vlastnosti molekulových sít. Nevýhodou jsou objemové změny při mechanickém namáhání (vysoký tlak). Dále se používají agarosové ionexy na bázi polysacharidu agarosy [12].

K detekci se obvykle používají vodivostní detektory. Vzhledem k vysoce vodivému rozpouštědлу by ovšem byla snížena citlivost detektoru na ionty vzorku. Proto se před detektor přidává zařízení, které potlačuje jejich účinek (tzv. supresor) [10].

IE-HPLC je také velmi vhodná pro frakcionaci pšeničných bílkovin. Používají se iontově-výměnné kolony označované jako "FPLC" (rychlá proteinová kapalinová chromatografie). Batey (1984) dosáhl dobré separace gliadinů využitím Mono-Q (silná anion-výměnná kolona) pro odloučení negativně nabitých proteinů a identifikoval odrůdy pšenice [7].

ZÁVĚR

Bílkoviny obilovin značně ovlivňují technologickou jakost pšeničné mouky. Nejdůležitější jsou gliadiny a gluteniny, které jsou schopny společně tvořit lepek, jenž má rozhodující roli při tvorbě těsta. Proto je důležité stanovovat množství a kvalitu bílkovin v různých odrůdách pšenice, za účelem vhodného výběru mouky pro konkrétní použití.

Izolace těchto bílkovin je velmi komplikovaná vzhledem k jejich rozsáhlé různorodosti, ale i přesto je známo několik postupů, kterými je lze frakcionovat podle rozpustnosti na albuminy, globuliny, prolaminy a gluteliny. Tyto metody jsou založeny na principech elektroforézy, specifických imunochemických stanovení a kapalinové chromatografie; a poskytují užitečné separace a informace o kvalitě obilných bílkovin.

Pro analýzu obilných bílkovin jsou nepoužívanější elektromigrační separační metody. Elektroforéza v polyakrylovém gelu s dodecylsulfátem sodným je určena výhradně pro bílkoviny a k jejich rozdělení na jednotlivé frakce dojde pouze na základě molekulové hmotnosti. Díky tomu se stala relativně levnou možností separace obilných bílkovin. Další metodou ke stanovení bílkovin v pšeničné mouce může být enzymová imunoanalýza na pevné fázi, založená na interakci specifické protilátky s antigenem. Chromatografické metody jsou také hojně využívány pro izolaci a charakterizaci obilných bílkovin. Jsou založené na rozdílné rychlosti migrace rozpuštěných látek. Poslední dobou se využívají k analýze prakticky jakýchkoliv látek. Pro separaci a stanovení bílkovin je vhodná gelově permeační chromatografie oddělující bílkoviny především podle velikosti, chromatografie na iontoměničích založená na rozdílných nábojích v důsledku disociace postranních řetězců a nakonec chromatografie na reverzní fázi, která funguje na principu rozdělovací chromatografie a umožňuje separovat směsi látek rozpustných v nepolárních rozpouštědlech. Výhodou chromatografie ve srovnání s většinou ostatních metod je rychlost a citlivost.

Důvodem charakterizace obilných bílkovin je především analýza jejich kvality, množství a složení. Nicméně, výsledky chromatografické separace prolaminů jsou pro jednotlivé odrůdy obilovin natolik specifické, že se využívají k identifikaci odrůd a genotypů, čehož se vhodně využívá pro křížení a genetické zušlechťování všech obilovin nebo při odhalování falšování obilí.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] PŘÍHODA J., HUMPOLÍKOVÁ P., NOVOTNÁ D.; *Základy pekárenské technologie*; 1. vydání; Pekař a cukrář s.r.o.; Praha; 2003; 363 s.; ISBN 80-902922-1-6
- [2] PELIKÁN, M., SÁKOVÁ, L.; *Jakost a zpracování rostlinných produktů*; 1. vydání; 2001; Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích; Zemědělská fakulta; 235 s.; ISBN 80-7040-502-3
- [3] HAMPL, J.; *Cereální chemie a technologie*; Nakladatelství technické literatury ALFA Bratislava; Praha 1970
- [4] HRABĚ, J., ROP, O., HOZA, I.; *Technologie výroby potravin rostlinného původu, bakalářský stupeň*; 1. vydání; 2008; Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 179 s.; ISBN 978-80-7318-372-1
- [5] HAJŠLOVÁ, J.; VELÍŠEK, J.; *Chemie potravin I.*; vyd. 3.; OSSIS; Tábor; 2009; 602 s.; ISBN 978-80-86659-15-2
- [6] HAMPL, J.; *Cereální chemie a technologie I.*; 2. vydání; VŠCHT Praha; 1988; 241 s.
- [7] POMERANZ, Y.; *Advances in Cereal Science and Technology*; vyd. 8.; American Association of Cereal Chemists, Inc.; St. Paul, Minnesota; 1986; 364s.
- [8] HULÍN, P.; DOSTÁLEK, P.; HOCHÉL, I.; *Metody stanovení lepkových bílkovin v potravinách*; Chemické listy; 2008; č. 102; s. 327 – 337.
- [9] SINGH, N. K., et al; *Use of Sonication and Size-Exclusion High-Performance Liquid Chromatography in the Study of Wheat Flour Proteins. I. Dissolution of Total Proteins in the Absence of Reducing Agents*; Cereal Chemistry; 1990; vol. 67; no. 2; s. 150 – 161.
- [10] *Ústav konzervace potravin a technologie masa - VŠCHT* [online]; c2003 [cit. 2011-03-06]; **Metodika HPLC**; Dostupné z WWW: <http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/hplc/HPLC.pdf>.
- [11] *Biochemical web* [online]; 2004-01-29 [cit. 2011-03-06]; **Chromatografie**; Dostupné z WWW: <<http://biochemie.sweb.cz/x/metody/chromatografie.htm>>.

- [12] *Department of biochemistry* [online]; 2006-11-14 [cit. 2011-03-06]; **Chromatografické metody**; Dostupné z WWW: <<http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/BAM/Chromatografie.pdf>>.
- [13] HÁLKOVÁ, J.; RIEGLOVÁ, J.; RUMÍŠKOVÁ, M.; **Fyzikální chemie: laboratorní cvičení díl I.**; první vydání; Újezd u Brna: RNDr. Ivan Straka (vydavatel odborných publikací); 2000; 69 s; ISBN 80-902775-0-0.
- [14] ŠVEC, F.; **Co dnes hýbe kapalinovou chromatografií?**; Chemické listy; 2009; 103; s. 266 – 270.
- [15] *Ústav technologie ropy a alternativních paliv - VŠCHT Praha* [online]; 1999 [cit. 2011-03-06]; **RP-HPLC**; Dostupné z WWW: <<http://cesmina.vscht.cz/trp/index.php/vyzkum/technicke-vybaveni/39-rp-hplc>>.
- [16] ABUGOCH, L., et al; **Stability of quinoa flour proteins (*Chenopodium quinoa Willd.*) during storage**; International Journal of Food Science and Technology; 2009; 44; s. 2013 – 2020.
- [17] BATEY, I. L.; GUPTA, R. B.; MacRITCHIE, F.; **Use of Size-Exclusion High-Performance Liquid Chromatography in the Study of Wheat Flour Proteins: An Improved Chromatographic Procedure**; Cereal Chemistry; 1991; 2; s. 207 – 209.
- [18] COUFAL, P.; *Katedra analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze* [online]; 2004-07-28 [cit. 2011-04-08]; **High Performance Liquid Chromatography, HPLC**; Dostupné z WWW: <<http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>>.
- [19] *Ústav konzervace potravin a technologie masa - VŠCHT* [online]; c2003 [cit. 2011-04-09]; **Metodika CZE, ITP**; Dostupné z WWW: <http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/cze/CZE.pdf>.
- [20] *Biochemical web* [online]; 2004-01-29 [cit. 2011-04-09]; **Elektroforéza**; Dostupné z WWW: <<http://biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm>>.
- [21] VAŇKOVÁ, H.; **Peptidové mapy**; Chemické listy; 1999; 93; s. 120 – 127.
- [22] BIETZ, J. A.; **Separation of cereal proteins by reserved-phase high-performance liquid chromatography**; J. Chromatogr. 255; 1983; s. 219 – 238.

- [23] BATEY, I. L.; *Wheat varietal identification by rapid ion-exchange chromatography of gliadins*; Journal of cereal science; 1984; vol. 2; no. 4; s. 241 – 248.
- [24] BURNOUF, T.; BIETZ, J. A.; *Chromosomal control of glutenin subunits in aneuploid lines of wheat - analysis by reversed-phase high-performance liquid-chromatography*; Theoretical and applied genetics; 1985; vol. 70; no. 6; s. 610 – 619.
- [25] KRUGER J. E.; MARCHYLO B. A.; *Examination of the mobilization of storage proteins of wheat kernels during germination by high-performance reversed-phase and gel permeation chromatography*; Cereal Chem.; 1985; no. 62; s. 1 – 5.
- [26] MECHAM, D. K.; SOKOL, H. A.; PENCE, J.; *Extractable protein and hydration characteristics of flours and doughs in dilute acid*; Cereal Chem.; 1962; no. 39; s. 81 – 93.
- [27] MECHAM, D. K.; COLE, E. G.; PENCE, J.; *Dough mixing properties of crude and purified gluteins*; Cereal Chem.; 1965; no. 42; s. 409 – 420.
- [28] TSEN, C. C.; *Changes in flour proteins during dough mixing*; Cereal Chem.; 1967; no. 44; s. 308 – 317.
- [29] TSEN, C. C.; *Effects of oxidizing and reducing agents on changes of flour proteins during dough mixing*; Cereal Chem.; 1969; no. 46; s. 435 – 442.
- [30] TANAKA, K.; BUSHUK, W.; *Changes in flour proteins during dough mixing. III. Analytical results and mechanisms*; Cereal Chem.; 1973; no. 50; s. 605 – 612.
- [31] CLEVELAND, D. W., et al.; *Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl-sulfate and analysis by gel-electrophoresis*; Journal Of Biological Chemistry; 1977; Vol. 252; no. 3; s. 1102 – 1106.
- [32] BIETZ, J. A.; *Analysis of wheat gluten proteins by high-performance liquid chromatography*; J. Chromat.; 1984; 1:15
- [33] KRUGER, J. E.; *Rapid analysis of changes in the molecular weight distribution of buffer-soluble proteins during germination of wheat*; Cereal Chemistry; 1984; vol. 61; no. 3; s. 205 – 208.

- [34] GUPTA, R. B.; KHAN, K.; MacRITCHIE, F.; *Biochemical basic of flour properties in bread wheats. I. Effects of variation in the quantity and size distribution of polymeric protein*; Journal of Cereal Science; 1993; 18; s. 23 – 41
- [35] OSBORNE, T. B.; *The proteins of the wheat kernel*; Carnegie Inst.: Washington DC
- [36] MARCHYLO, B. A.; HATCHER, D. W.; KRUGER, J. E.; *Identification of wheat cultivars by reversed-phase high-performance liquid chromatography of storage proteins*; Cereal Chemistry; 1988; 65:28
- [37] KINDRED, D. R., et al.; *Effects of variety and fertiliser nitrogen on alcohol yield, grain yield, starch and protein content, and protein composition of winter wheat*; Journal of Cereal Science; 2008; 48; s. 47 – 57.
- [38] HARTMANN, S.; KOEHLER, P.; *Fractionation of cereal flour by sedimentation in non-aqueous systems. I. Development of the method and chemical characterisation of the fractions*; Journal of Cereal Science; 2008; 47; s. 576 – 586.
- [39] DUPONT, F. M.; CHAN, R.; LOPEZ, R.; *Molar fractions of high-molecular-weight glutenin subunits are stable when wheat is grown under various mineral nutrition and temperature regimens*; Journal of Cereal Science; 2007; 45; s. 134 – 139.
- [40] ISLAS-RUBIO, A. R., et al.; *Stability of wheat proteins in solution*; Journal of Cereal Science; 2006; 43; s. 169 – 174.
- [41] STEVENSON, S. G., et al.; *Characterization of polymeric wheat proteins by flow field-flow fractionation/MALLS*; Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies; 2003; vol. 26; no. 17; s. 2771 – 2781.
- [42] ČSN ISO 5529: 2000. Pšenice – Stanovení sedimentačního indexu – Zeleného test. Praha: Český normalizační institut, 2000, 9 s.
- [43] COUFAL, P.; *Katedra analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze* [online]; 2004-07-28 [cit. 2011-05-05]; **Capillary Zone Electrophoresis, CZE**; Dostupné z WWW: <<http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/cze.html>>

- [44] POUSTKA, J.; *Web.vscht.cz* [online]; 2007 [cit. 2011-05-11]; **Gelová permeační chromatografie**; Dostupné z WWW:
<<http://web.vscht.cz/poustkaj/ISM%20GPC%20092007.pdf>>.
- [45] ALAIZ, M., et al.; *Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoximethylenemalonate*; *Journal of Chromatography*; 1992; 591, s. 181 – 186.
- [46] WIESER, H.; ANTES, S.; SEILMEIER, W.; *Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reversed-phase high-performance liquid chromatography*; *Cereal Chemistry*; 1998; 75; s. 644 – 650.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ACN	Acetonitril
DTT	Dithiotreitol
ELISA	Enzymová imunoanalýza na pevné fázi
FPLC	Rychlá proteinová kapalinová chromatografie
GC	Plynová chromatografie
HPLC	Vysoko-účinná kapalinová chromatografie
IE-HPLC	Iontově-výměnná vysoko-účinná kapalinová chromatografie
kDa	kiloDalton
LC	Kapalinová chromatografie
ME	2-merkaptoethanol
M_r	Relativní molární hmotnost
PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
RP-HPLC	Vysoko-účinná kapalinová chromatografie s tzv. obrácenými fázemi
SDS	Dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylovém gelu s dodecylsulfátem sodným
SE-HPLC	Velikostně-vylučovací vysoko-účinná kapalinová chromatografie
TFA	Kyselina trifluoroctová
Tris	2-amino-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
UV	ultrafialový

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1: Podélný řez pšeničným zrnem [2]</i>	12
<i>Obr. 2: Model struktury hydratovaného lepkového vlákna [6]</i>	22
<i>Obr. 3: Představa struktury gliadinu [1]</i>	24
<i>Obr. 4: Schéma modelu propojení složek gluteninu [1]</i>	25
<i>Obr. 5: Rozpustnost gliadinu v alkoholech [3]</i>	28
<i>Obr. 6: Základní uspořádání plošné elektroforézy [20]</i>	32
<i>Obr. 7: Schéma uspořádání kapalinového chromatografu [18]</i>	36
<i>Obr. 8: Spektrofotometrický detektor [18]</i>	37
<i>Obr. 9: Fluorimetrický detektor [18]</i>	38
<i>Obr. 10: Průchod molekul kolonou SE-HPLC [44]</i>	41
<i>Obr. 11: Permeace molekul různé velikosti do pórů gelu [10]</i>	42
<i>Obr. 12: Výměna iontu na povrchu iontoměniče [10]</i>	44

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1: Podíly jednotlivých částí zrna u pšenice v % [3]</i>	13
<i>Tab. 2: Závislost chemického složení pšeničné mouky na vymletí v % [2]</i>	14
<i>Tab. 3: Obsah aminokyselin v pšenici (v g vztaženo na 16 g dusíku) [5]</i>	17
<i>Tab. 4: Elementární analýza pšeničných bílkovin (% v sušině) [3,5]</i>	20
<i>Tab. 5: Vliv vypírání na jakost a výtěžek lepku [3]</i>	21