

# Stanovení pšeničných bílkovin metodou UPLC

Lucie Ovsíková

---

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: Lucie OVSÍKOVÁ  
Osobní číslo: T08930  
Studijní program: B 2901 Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Chemie a technologie potravin

Téma práce: Stanovení pšeničných bílkovin metodou UPLC

Zásady pro vypracování:

1. Charakteristika pšeničných bílkovin.
2. Princip UPLC.
3. Metody stanovení gluteinů, gliadinů, albuminů a globulinů metodou UPLC.
4. Možnosti extrakce jednotlivých frakcí pšeničných bílkovin.
5. Metody stanovení z mouky, těsta a pečiva.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] SHEWRY, R. P. Wheat gluten protein analysis, American Association of Cereal Chemists, Minesota 2003.

Vedoucí bakalářské práce:

**Mgr. Monika Černá, Ph.D.**

Ústav technologie a mikrobiologie 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 <sup>1)</sup>;
- 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 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> 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 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 16. května 2011

*Lucie Ovsíková*  
.....

<sup>1)</sup> 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 nevdělečně 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 nahlázení 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.

<sup>2)</sup> 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).

<sup>3)</sup> 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 se zabývá stanovením bílkovin pomocí ultra účinné kapalinové chromatografie (UPLC). Popisuje charakteristiku a stanovení pšeničných bílkovin, které jsou významné tím, že tvoří pružný gel–lepek. UPLC metoda patří mezi novou separační techniku v kapalinové chromatografii. Práce se také zabývá extrakcí jednotlivých frakcí pšeničných bílkovin a následným stanovení bílkovin pomocí různých metod z mouky, těsta a pečiva.

Klíčová slova: pšeničné bílkoviny, lepek, extrakce, UPLC, stanovení bílkovin

## **ABSTRACT**

This bachelor thesis deals with the determination of protein by ultra performance liquid chromatography (UPLC). It describes characteristics and determination of wheat proteins that are important for a flexible gel - gluten. UPLC method belongs to a new separation technique in liquid chromatography. The thesis deals with the extraction of wheat protein fractions and subsequent determination by different methods of flour, dough and bread.

Keywords: wheat protein, gluten, extractions, UPLC, determination of protein

## Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala mé vedoucí Mgr. Monice Černé Ph.D., za odborné vedení při zpracování této bakalářské práce, za cenné rady a připomínky a také bych chtěla poděkovat panu Ing. Pavlu Hanuštiakovi za poskytnutí materiálů a věnovaný čas.

Dále bych chtěla poděkovat své rodině a známým za trpělivost a podporu po celou dobu svého studia.

*Všichni lidé, s nimiž se setkáváme, mají své osudy, které ovlivňují jejich chování, ale na to příliš málo myslíme. Očekáváme, že budou reagovat tak, jak bychom zareagovali na jejich místě my, a proto jim v naprosté většině případů nemůžeme rozumět, nemůžeme je pochopit.*

*Johannes Mario Simmel*

## Prohlášení

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>1 CHARAKTERISTIKA PŠENIČNÝCH BÍLKOVIN</b> .....	<b>13</b>
1.1 ROZDĚLENÍ PROTEINŮ NA ZÁKLADĚ JEJICH ROZPUSTNOSTI.....	13
1.2 ROZDĚLENÍ BÍLKOVIN DLE FUNKČNÍCH VLASTNOSTÍ .....	14
1.2.1 Protoplasmatické bílkoviny.....	14
1.2.2 Zásobní bílkoviny .....	14
1.3 PŠENIČNÝ LEPEK .....	17
<b>2 PRINCIP ULTRA ÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE</b> .....	<b>19</b>
2.1 CHROMATOGRAFICKÝ SYSTÉM .....	19
2.1.1 Čerpadlo .....	20
2.1.2 Směšovací zařízení .....	20
2.1.3 Dávkovací zařízení .....	20
2.1.4 Kolony .....	21
2.1.5 Sorbenty.....	22
2.1.6 Detektory.....	25
2.1.6.1 Fotometrický detektor.....	26
2.1.6.2 Refraktometrický detektor .....	27
2.1.6.3 Fluorescenční detektor.....	27
2.1.6.4 Hmotnostní spektrometr .....	27
2.1.6.5 Elektrochemické detektory .....	28
<b>3 STANOVENÍ PROTEINŮ POMOCÍ UPLC</b> .....	<b>29</b>
3.1 AQUITY UPLC BEH200 SEC .....	29
3.2 SEPARAČNÍ TECHNOLOGIE PEPTIDŮ POMOCÍ .....	29
<b>4 MOŽNOSTI EXTRAKCE JEDNOTLIVÝCH FRAKČÍ PŠENIČNÝCH BÍLKOVIN</b> .....	<b>31</b>
4.1 EXTRAKCE .....	31
4.1.1 Extrakce z kapaliny do kapaliny .....	32
4.1.2 Nadkritická fluidní extrakce.....	32
4.1.3 Extrakce pevnou fází .....	33
4.2 EXTRAKCE ROSTLINNÝCH PROTEINŮ .....	33
4.3 EXTRAKCE PŠENIČNÝCH PROTEINŮ PRO SE-HPLC ANALÝZU .....	35
4.4 EXTRAKCE PŠENIČNÝCH PROTEINŮ PRO FFF .....	37
4.5 EXTRAKCE PŠENIČNÝCH PROTEINŮ PRO FZCE ANALÝZU .....	37
4.6 EXTRAKCE PŠENIČNÝCH PROTEINŮ PRO SDS-CE ANALÝZU .....	39
4.7 EXTRAKCE PŠENIČNÝCH PROTEINŮ PRO RP-HPLC ANALÝZU.....	40
4.8 EXTRAKCE PŠENIČNÝCH PROTEINŮ PRO IE-HPLC ANALÝZU.....	41
4.9 OPTIMALIZACE OSBORNOVY METODY KVANTIFIKACE BÍLKOVINNÝCH FRAKČÍ ZRNA PŠENICE OZIMÉ ( <i>TRITICUM AESTIVUM L.</i> ).....	41
4.9.1 Vliv velikosti navážky a koncentrace extrakčních činidel.....	41
4.9.2 Vliv podmínek extrakce a velikosti částic šrotu.....	44
4.9.3 Vliv vícestupňové extrakce na obsah bílkovinných frakcí .....	44
4.9.4 Optimalizovaná metodika .....	45

<b>5</b>	<b>METODIKY STANOVENÍ Z MOUKY, TĚSTA A PEČIVA .....</b>	<b>47</b>
5.1	VYSOKO ÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE .....	47
5.2	IONTOVĚ VÝMĚNNÁ CHROMATOGRFIE .....	48
5.3	VYSOKO ÚČINNÁ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA .....	49
5.4	KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA DODECHL SULFÁTEM SODNÝM .....	50
5.5	FRAKČIONACE TOKEM V POLI .....	53
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>55</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>56</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>61</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ.....</b>	<b>64</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>65</b>

## ÚVOD

Pšenice je celosvětově nejvýznamnější obilovinou a je zdrojem proteinů pro výživu člověka. Pšeničné bílkoviny jsou schopny vytvářet lepek, který je tvořen zásobními bílkovinami (gluteliny a gliadiny). Pekařské výrobky souvisejí nejen s obsahem proteinů, ale také s jejich složením. Lepek je velmi důležitý z pekárenského hlediska a má vliv na vlastnosti těsta. Sledování obsahu lepku v potravinách je také důležité, protože někteří lidé trpí alergií na lepek neboli onemocněním nazývané celiakie.

Ultra účinná kapalinová chromatografie (UPLC) je poměrně nová technologie v oblasti kapalinové chromatografie. ACQUITY UPLC systém využil výhod technologických kroků, které učinil v rámci plnění částic, optimalizace systému, detektoru, designu a zpracování a řízení dat. Tyto kroky vytvořily úspěšné zlepšení chromatografického výkonu. Oproti vysoko účinné kapalinové chromatografii (HPLC) je UPLC konstrukčně upravena pro práci s vysokými tlaky, je citlivější a doba analýzy je kratší.

Před samotnou analýzou se provádí extrakce jednotlivých frakcí pšeničných bílkovin. Cílem extrakce je vyextrahovat co největší množství žádané složky, s co nejmenší spotřebou rozpouštědla. Jednotlivé frakce pšeničných bílkovin nejčastěji extrahujeme dle jejich rozpustnosti, která je popsána Osbornem. Frakce jsou rozděleny do čtyř skupin na albuminy, globuliny, prolaminy a gluteliny. U pšenice jsou prolaminy nazývány jako gliadiny a gluteliny jsou nazývány jako gluteniny. Ke stanovení pšeničných bílkovin z mouky, těsta a pečiva jsou používány elektroforetické a chromatografické metody, hmotnostní spektrometrie, NIR spektrometrie.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 CHARAKTERISTIKA PŠENIČNÝCH BÍLKOVIN

Nejvýznamnějším zdrojem proteinů pro výživu člověka jsou z rostlinných materiálů obiloviny, v první řadě pšenice [1]. Obsah pšeničných bílkovin v zrna, v závislosti podle druhů a odrůd pšenice je obvykle 8–13%. Bílkoviny pšenice jsou nejvíce prozkoumány a jsou technologicky nejvýznamnější. Pšeničné bílkoviny se od ostatních rostlinných bílkovin liší tím, že jsou schopny vytvářet pružný gel–lepek. Lepek je převážně tvořen gliadinem a gluteninem (v poměru 2:3), což jsou zásobní bílkoviny nerozpustné ve vodě. Albuminy a globuliny lepek nevytvářejí [2].

### 1.1 Rozdělení proteinů na základě jejich rozpustnosti

Klasifikace proteinů obilovin je historicky založena na Osbornově postupné extrakci a rozdílné rozpustnosti bílkovin.

- Albuminy – rozpustné ve vodě
- Globuliny – rozpustné ve vodných roztocích solí
- Prolaminy – rozpustné ve vodných roztocích alkoholů
- Gluteliny – rozpustné v roztocích kyselin nebo zásad [3]

Tyto čtyři základní frakce se vyskytují ve všech obilných zrnech a podle druhů obilovin jim byly přisouzeny různé názvy nejčastěji odvozené z latinských názvů jednotlivých obilovin. Pro pšeničné prolaminy a gluteliny jsou používány názvy gliadiny a gluteniny. Mezi albuminy a globuliny patří všechny obilné enzymy a řada dalších bílkovin [4].

Každá z těchto skupin obsahuje velké množství jednotlivých proteinů s částečně odlišnými vlastnostmi, proto byly vypracovány další klasifikace těchto látek [3].

Proteiny pšenice a jejich složení:

- Albuminy - 14,7 % leukosinu
- Globuliny - 7,0 % edesinu
- Prolaminy – 32,6 % gliadinu
- Gluteliny – 45,7 % gluteninu [3]

## 1.2 Rozdělení bílkovin dle funkčních vlastností

### 1.2.1 Protoplasmatické bílkoviny

Protoplasmatické bílkoviny se nacházejí především v klíčku a aleuronové vrstvě. Jsou tvořeny bílkoviny katalytickými, enzymaticky aktivními a stavebními. Patří sem albuminy a globuliny. V pšenici tvoří kolem 20 % veškerých bílkovin [5].

**Albuminy** zahrnují všechny bílkoviny, které lze vysolit vysokými koncentracemi síranu amonného při 70–100% nasycení [6].

**Globuliny** se srážejí při polovičním rozpuštění síranem amonným [5].

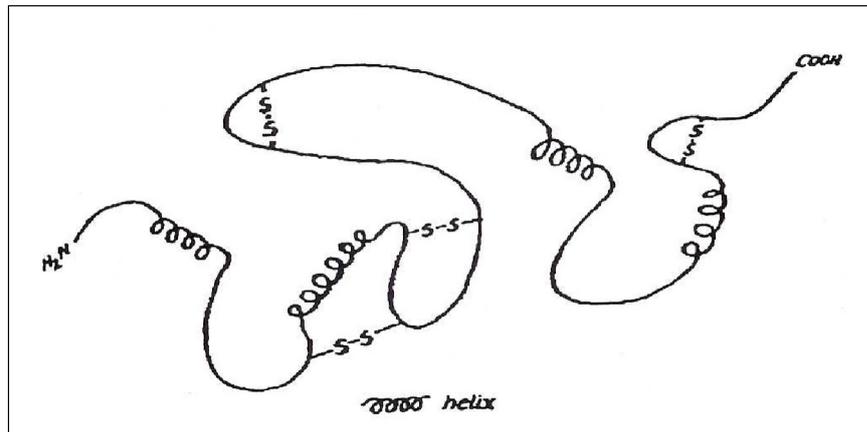
### 1.2.2 Zásobní bílkoviny

Zásobní bílkoviny určují technologickou, krmnou a biologickou hodnotu zrna. Tvoří podstatnou část zrna, jsou obsaženy v endospermu obilovin. Patří sem prolaminy a gluteliny [4].

**Prolaminy** jsou jednořetězcové makromolekuly, v nichž se střídají krátké spirálové úseky  $\alpha$ -helixů s hydrofobními zbytky. Helixy jsou spojeny vodíkovými vazbami, ohyby řetězce pevnými disulfidickými řetězci [7].

Z hlediska chemické struktury jsou nejvíce prozkoumanou skupinou **gliadiny** pšenice. Aminokyselinové složení gliadinu je typické vysokým obsahem glutaminu (36–45 %) a prolinu (14–30 %). Naopak nízké zastoupení tryptofanu, kyseliny asparagové a glutamové. Ještě menší je zastoupení bazických aminokyselin argininu, lyzinu a histidinu [1].

Nízký obsah kyselých a bazických aminokyselin s postraními polárními řetězci souvisí s malou rozpustností gliadinů ve vodě. Relativní molekulová hmotnost gliadinových proteinů je 30–100 kDa, obvykle mezi 60–80 kDa. Obsah aminokyselin v cereáliích a pseudocereáliích je uveden v tabulce 1 [3].

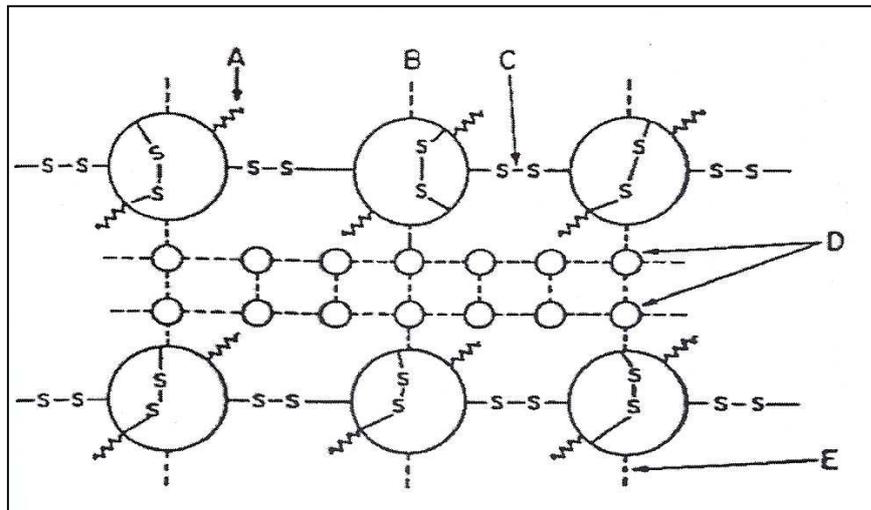


**Obr. 1** Schéma struktury gliadinu [8]

Gliadin je složen z celé řady bílkovinných komponent, jejichž počet se odhaduje na 50 jednotlivých proteinů s molekulovou hmotností v rozmezí 30–75 kDa. První pokusy jejich rozdělení provedené gelovou elektroforézou nebo katexovou chromatografií vyústily v jejich rozdělení na  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  a  $\omega$ -gliadiny podle klesající mobility [3]. Na obrázku 1 lze vidět schéma struktury gliadinu.

$\omega$ -gliadiny se skládají výhradně z opakovaných aminokyselinových sekvencí. Kyselina glutamová, prolin a fenylalanin reprezentují téměř 80 % aminokyselin, naopak cystein se vůbec nevyskytuje.  $\gamma$ -gliadin se liší aminokyselinovým složením od  $\alpha$  a  $\beta$  gliadinů, a to přítomností asparagové kyseliny, prolinu, metioninu, tyrozinu, fenylalaninu a tryptofanu. Podle odlišné N-koncové dusíkaté sekvence vznikly tři podskupiny  $\omega$ -gliadinů, které byly dále vztaženy k C-hordeinu a  $\omega$ -sekalinu.  $\alpha$  a  $\beta$ -gliadiny obsahují ve svých řetězcích šest molekul cysteinu, které tvoří tři intramolekulární disulfidové můstky. Neopakující se úsek obsahuje velké množství  $\alpha$ -helixů, opakující se část je ve srovnání s  $\gamma$ -gliadiny značně nepravidelná [3].

Gliadiny obsahují ve svém C-koncovém úseku osm molekul cysteinu tvořících intramolekulární disulfidové vazby. Jednotlivé skupiny se rozlišují hlavně podle N-koncového aminokyselinového složení. Jejich zastoupení v rámci celkových gliadinů je variabilní podle odrůdy a růstových podmínek rostlin. I přesto, lze konstatovat, že mezi nejvíce zastoupený typ patří  $\alpha$ -typ, za ním následuje  $\gamma$ -typ,  $\omega$ -typ se vyskytuje v mnohem menší míře [3].



**Obr. 2** Schéma struktury gluteninu [8]

Gluteliny jsou makromolekuly složené z více řetězců. Směs bílkovinných podjednotek je pojena vodíkovými a disulfidickými vazbami, čímž je dosahováno vysokých molekulových hmotností[1]. Na obrázku 2 lze vidět schéma struktury gluteninu.

Gluteninová frakce je tvořena ze směsi polymerů, HMW-GS (High molecular weight glutenin subunits) vysokomolekulárních a nízkomolekulárních gluteninových podjednotek LMW-GS (Low molecular weight glutenin subunits). Relativní molekulová hmotnost vysokomolekulární gluteninových podjednotek se obvykle pohybuje od 80–160 kDa a hmotnost nízkomolekulárních gluteninových podjednotek se pohybuje v rozmezí 30–51 kDa. HMW-GS tvoří 5–10 % celkového proteinu, LMW-GS se sekvencí nejvíce podobají  $\gamma$ -gliadinům a tvoří asi 20–30 % celkového proteinu [9]. Tabulka 1 uvádí obsah aminokyselin v cereáliích a pseudocereáliích[1].

Tab. 1 Obsah aminokyselin v cereáliích a pseudocereáliích (v g vztaženo na 16g N) [1]

Aminokyselina	Pšenice	Žito	Rýže	Pohanka	Laskavec
Ala	3,6	4,3	6,0	4,7	3,4
Arg	4,6	4,6	8,3	9,8	7,4
Asx	4,9	7,2	10,3	8,9	8,3
Cys	2,5	1,9	1,1	2,4	1,4
Glx	29,9	24,2	20,6	17,3	15,4
Gly	3,9	4,3	5,0	5,0	8,7
His	2,3	2,2	2,5	2,1	2,3
Ile	3,3	3,5	3,8	3,4	3,6
Leu	6,7	6,2	8,2	5,9	5,3
Lys	2,9	3,4	3,8	3,8	5,0
Met	1,5	1,5	2,3	1,5	1,8
Phe	4,5	4,4	5,2	3,8	3,6
Pro	9,9	9,4	4,7	4,3	3,6
Ser	4,6	4,3	5,4	5,0	7,1
Thr	2,9	3,3	3,9	3,6	3,5
Trp	0,9	1,0	0,8	1,4	1,5
Tyr	3,0	1,9	3,5	2,4	3,4
Val	4,4	4,8	5,5	6,7	4,3
Celkem EAA	32,8	31,6	38,5	34,8	28,4
Celkem AA	96,5	92,0	101,2	93,3	89,4
EAAI (%)	68	75	76	76	76
AAS (%)	44	46	57	51	54
Limitující AA	Lys	Trp, Ile	Ile, Lys	Lys, Ile	Lys, Ile

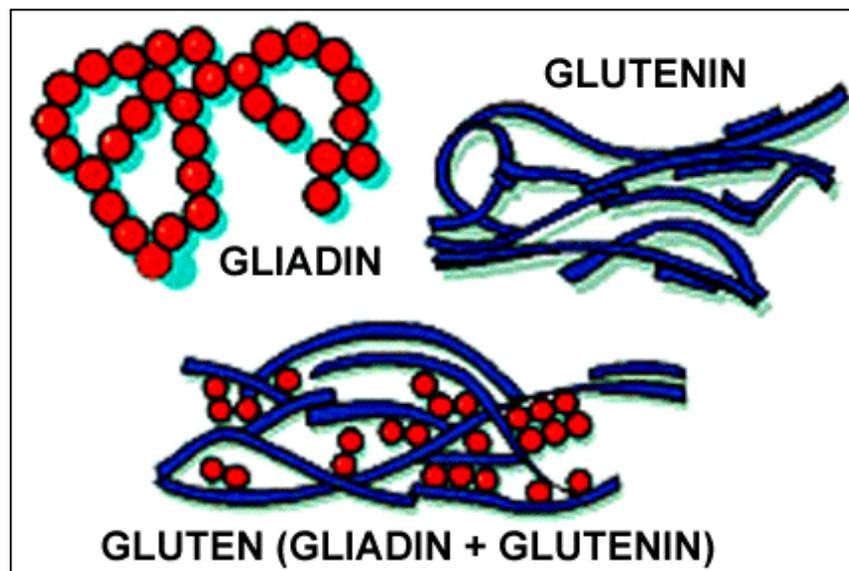
Poznámka: EAA – esenciální aminokyseliny, AA aminokyseliny, EAAI – index esenciální aminokyseliny, AAS aminokyselinové skóre

### 1.3 Pšeničný lepek

Pšeničný lepek (gluten) byl poprvé popsán Beccarim v roce 1745 [3]. Při hnětení pšeničné mouky s vodou vzniká těsto, jehož základem je kromě škrobu viskoelastická lepivá hmota, která je složena ze dvou třetin z vody a z jedné třetiny z hydratovaných gliadinových a gluteninových proteinů [10]. Mokrý lepek je viskoelastická hmota, která zbude z pšeničného těsta po vymytí ostatních složek vodou [11]. Tato hmota se vyznačuje vysokou elasticitou, kterou propůjčují lepku gluteniny, jejichž molekuly jsou schopny tvořit trojrozměrnou síť peptidických řetězců, různým způsobem zřasených a propojených navzájem můstky a vazbami [4].

Lepek vyznačuje tažností a schopností bobtnat. Tyhle jedinečné vlastnosti mají zásadní vliv na využití pšenice v potravinářském průmyslu [3]. Složení lepku lze vidět na obrázku 3.

Gliadiny jsou nositelem tažnosti a poskytují lepku pružnost a bobtnavost. Hlavní faktor, který určuje kvalitu mouky je vzájemný poměr obou proteinů[3]. Pšeničný lepek lze z těsta jednoduše izolovat vypíráním proudem vody, kdy se postupně vyplavují látky rozpustné ve vodě a škrob. Po určité době zůstane substance, která je nazývána mokrý lepek [5], [12].



Obr. 3 Pšeničný (lepek, gluten) [13]

Mokrý lepek je homogenní, žlutozelený až žlutošedý zbytek kaučukovité konzistence. Jeho hlavními složkami jsou nerozpustné, zbobtnalé, lepkové bílkoviny gliadin a glutenin (80 %). Z ostatních obilovin podobný gel získat nelze [4].

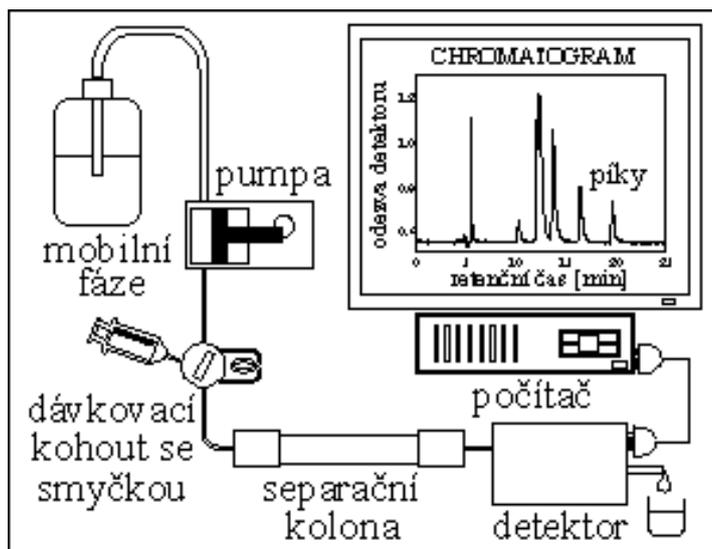
## 2 PRINCIP ULTRA ÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE

Ultra Performance Liquid chromatografy (UPLC) patří mezi novou separační techniku v oblasti kapalinové chromatografie. Tato technika byla vyvinuta v roce 1997 Jorgensonem a jeho týmem [14]. Metoda využívá speciální sorbenty připravené patentovanou technologií „-bridged hybrid particle“, které jsou velmi účinné a mechanicky odolné díky etylenovým můstkům v silikagelové matici [15]. Při stanovení látek metodou UPLC se používají vysoké tlaky (15000 PSI, 1000 bar, 100 MPa). Vysokotlaké pumpy umožňují provozovat kolony s konvenčními rozměry a velmi malými částicemi stacionární fáze ( $< 2 \mu\text{m}$ ) [16].

Metoda je vhodná k separaci analytů rozpouštěných ve vhodné kapalině tvořící mobilní fázi. V separační koloně probíhá dělení látek ze vzorku, která obsahuje stacionární (nepohyblivou) „sorbent“ a mobilní (pohyblivou) fázi „eluent“. Látky, které se dělí mají rozdílnou afinitu ke stacionární fázi, podléhají tak různé distribuci neboli rozdělování mezi mobilní a stacionární fázi a jsou rozdílně zadržovány a zpoždovány. Analyty doputují v různých časech (jedná se o kvalitativní hledisko) do detektoru, kde způsobí příslušnou odezvu, která je mírou jejich obsahu (kvantity) ve vzorku. S použitím vysokotlakých čerpadel lze dosáhnout průtoku mobilní fáze a eluce jednotlivých složek separovaných směsí v reálných časech i pro stacionární fáze s větším interakčním působením (polymery). Metoda UPLC využívá kapalinových chromatografů, speciálně konstrukčně upravených pro práci s těmito extrémně vysokými tlaky. Výhodou je výrazné zkrácení retenčních časů a úspora rozpouštědel. Nevyužívá se jen isokratické (složení mobilní fáze je konstantní) eluce, ale využívá se i gradientové eluce (složení mobilní fáze se v průběhu analýzy mění) [16], [17].

### 2.1 Chromatografický systém

Kapalinový chromatogram se skládá ze zásobníku mobilní fáze, degasteru, řídicí jednotky, vysokotlakých pump, dávkovacího zařízení, chromatografické kolony, detektoru a počítačové jednotky s vyhodnocovacím softwarem. Schéma kapalinového chromatogramu je na obrázku 4 [16], [18].



Obr. 4 Schéma kapalinového chromatografu [19]

### 2.1.1 Čerpadlo

Aby byla separace účinná, musí se prostupující kapalině klást značný odpor. Proto je potřeba použít dostatek malých zrníček sorbentu při vysokém tlaku. K tomuto účelu slouží čerpadla. Mohou být použita membránová, pístová nebo pístově membránová čerpadla. Princip pístového čerpadla lze popsat následovně. Vzniklým podtlakem dojde k nasátí určitého objemu kapaliny do uzavřeného prostoru čerpadla, pohybem pístu dochází k natlakování objemu kapaliny a následně dojde k vytlačení natlakované kapaliny mimo čerpadlo [20], [21].

### 2.1.2 Směšovací zařízení

Naprogramované směšovací zařízení může s využitím zásobníků různých kapalin připravovat směs kapalin stálého složení nebo řídit změny ve složení výsledné mobilní fáze v průběhu separace [21].

### 2.1.3 Dávkovácí zařízení

Slouží k zavedení vzorku do toku mobilní fáze. Vzorky se dávkuje pomocí injekčních stříkaček přes septum nebo za použití autosempleru [20].

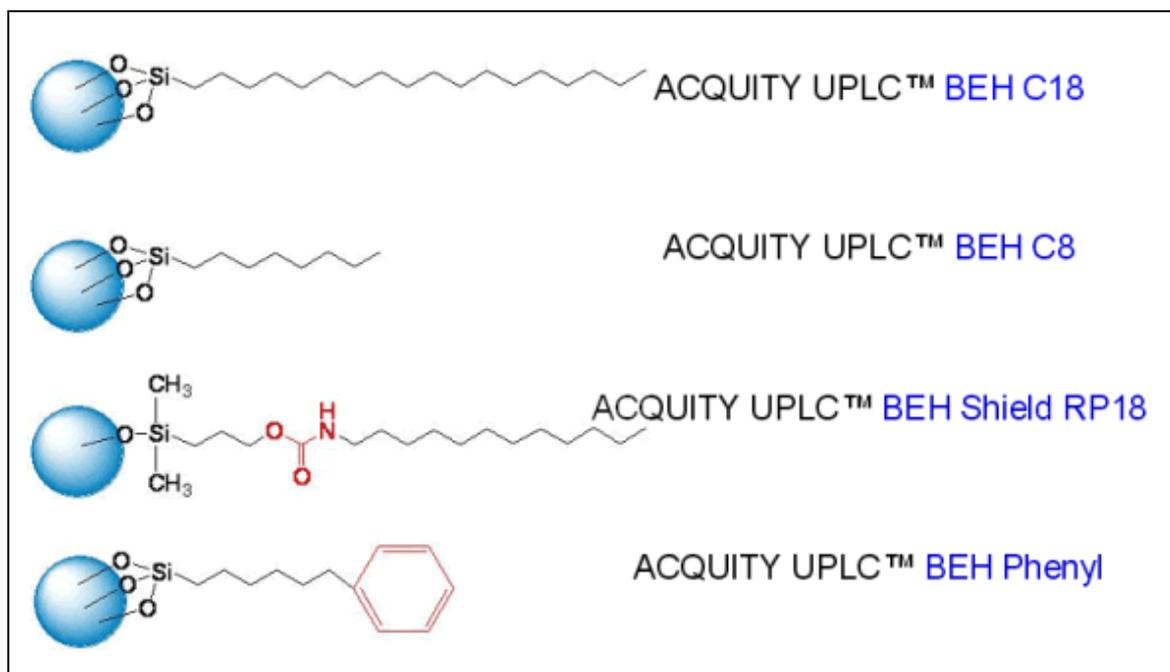
### 2.1.4 Kolony

Chromatografická kolona je naplněna stacionární fází nepolárního charakteru. Probíhá zde separace složek. U UPLC kolon se oproti klasickým HPLC kolonám mění podstatným způsobem hardware. Dochází zde k plnění kolony za vysokého tlaku (20000 PSI tj. 1379 bar). Jedná se o patentovanou technologii, která zaručuje optimální uchování částic sorbentu v těle kolony a jejich stabilitu. Koncové spoje kolony jsou přizpůsobeny dosahujícímu vysokému tlaku. Zpětný tlak vyvolaný naplněnou UPLC kolonou je přímo úměrný délce této kolony a nepřímo úměrný velikosti sorbentu a vnitřnímu průměru kolony. V případě, že dojde ke snížení velikosti sorbentu, pak dojde k několikanásobnému vzrůstu zpětného tlaku na koloně [21]. Na 5 obrázku je zobrazena kolona pro UPLC.



**Obr. 5** Kolona UPLC [21]

Velikost částic 1,7  $\mu\text{m}$  poskytuje vyšší rozlišení z důvodu vyšší účinnosti kolony. Pro UPLC kolony (ACQUITY UPLC BEH C18) jsou v současné době k dispozici 4 druhy stacionárních fází: C18, a C8, Shield RP1 ( C18 se zabudovanou polární skupinou karbamát) a fenylovou kolonou, které lze vidět na obrázku 6. Každá stacionární fáze poskytuje různé kombinace hydrofobicity, silanové aktivity, hydrolytické stability a chemické interakce s analytem [22].



Obr. 6 Stacionární fáze UPLC [22]

Pro snazší sledování životního cyklu kolon jsou kolony standardně vybaveny neodnímatelnými mikročipem, který zaznamenává kompletní historii kolony, například celkový počet nástřiků, provedené nástřiky, tlaková historie [15].

První generace metylenových hybridních částic X Terra kolon neměla k dispozici mechanickou pevnost nebo účinnost nezbytnou plně využít rychlost, citlivost a rozlišení schopnosti UPLC technologie. Proto byla vyvinuta druhá generace hybridních materiálů, které využívají struktury etylenových hybridních můstků (BEH). Ve srovnání první generace metylenových hybridních částic X Terra kolon, BEH částice ACQUITY UPLC BEH kolony vykazují vyšší účinnost, sílu a pH. BEH technologie je klíčová pro rychlost, citlivost a rozlišení obou rozmezí malých i velkých molekul v UPLC separaci [23].

### 2.1.5 Sorbenty

Používají se klasické HPLC sorbenty, které jsou dvojího typu. Anorganický nosič – silikagel nebo organický nosič – polymer nebo uhlík. Oba dva typy mají své výhody i nevýhody. Sorbenty založené na silikagelu jsou mechanicky odolné, vykazují vysokou účinnost a na těchto sorbentech se dají dobře predikovat retence solutů [16].

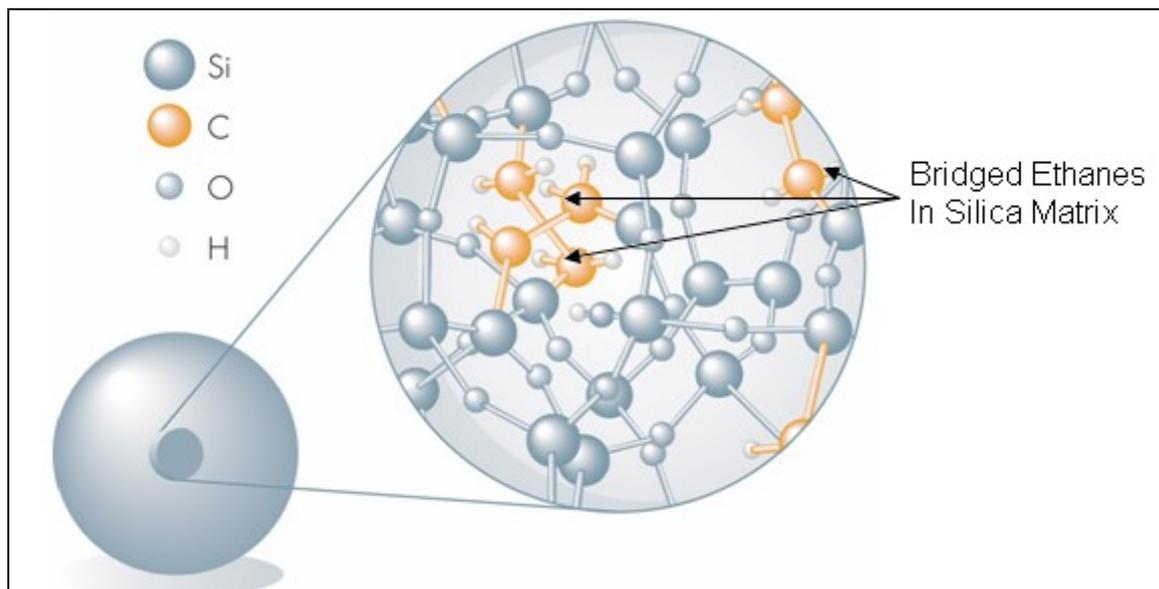
Aktivní centra na povrchu **silikagelu** jsou hydroxylové skupiny neboli silanolové skupiny Si-OH. Hydroxylové skupiny silikagelu jsou izolované, jednoduché, dvojité nebo jsou při vhodné poloze sousedními skupinami vzájemně vázány vodíkovými vazbami.

Rozmístění silanolových skupin na povrchu silikagelu závisí na způsobu zpracování silikagelu. Při vysoké teplotě dochází k odstranění silanolových skupin dvojitých a vázaných vodíkovým můstkem, dále dochází k ustálení jednoduchých a izolovaných silanolových skupin. Na silanolovou skupinu se adsorbuje vodíkovou vazbou také voda, kterou lze odstranit zahřátím na 150 °C a tím se silikagel aktivuje, při teplotě nad 200 °C dochází k ireverzibilním změnám a za teploty 300–500 °C kondenzují sousední hydroxylové skupiny na siloxanové skupiny, které nelze při normální teplotě hydratovat. Při ještě vyšších teplotách dochází k odštěpení volných hydroxylových skupin a silikagel nabývá hydrofobních vlastností [15].

Nevýhodou je jejich limitující rozsah pH mobilní fáze a chemická nestabilita. Povrch silikagelu je slabě kyselý, takže více zadržuje bazické látky než látky kyselé a neutrální a může tak působit jejich chvostování. Tomu lze zabránit přidávkem slabé organické báze (většinou aminového typu – triethylamin) do mobilní fáze, ale je nutné dbát, aby pH mobilní fáze nepřesáhlo pH 8, kdy dochází k rozpouštění silikagelu. Protože povrch silikagelu je kyselý, může vystupovat jako iontoměnič [15], [17].

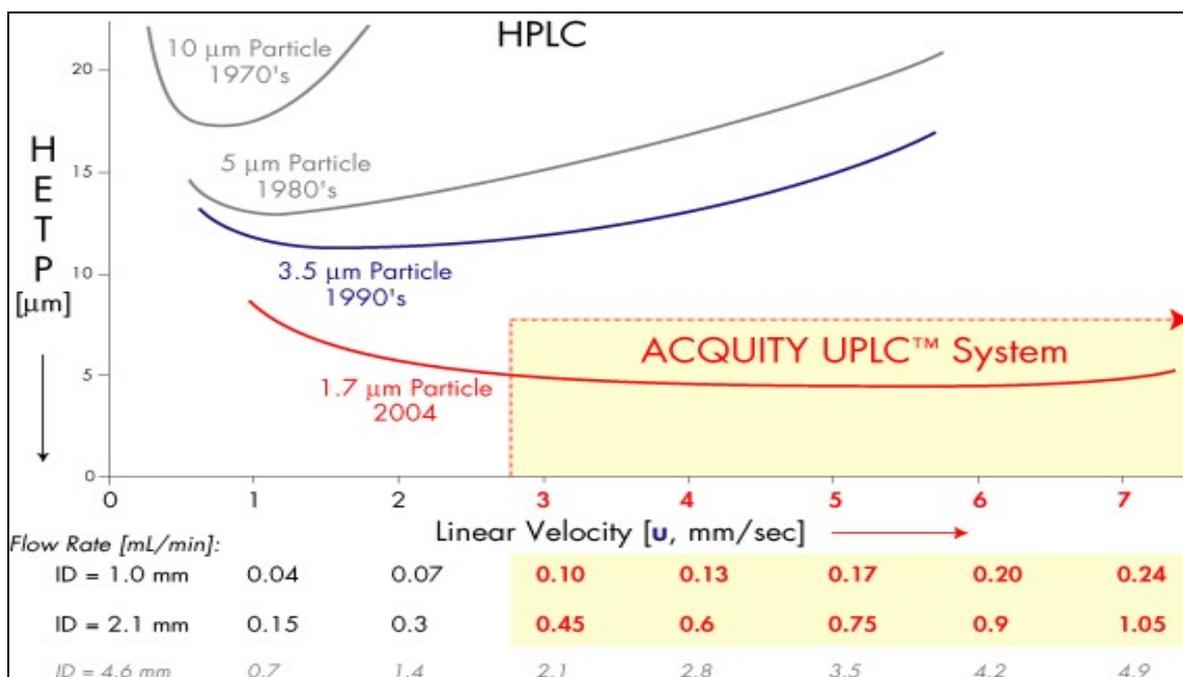
Sorbenty založené na **polymerní fázi** mohou pracovat v široké oblasti pH, jsou chemicky stabilní a nedochází na nich k iontovým interakcím. Nevýhodou je nižší mechanická odolnost, nižší účinnost a špatně předvídatelná retence solutů [17].

Existuje i technologie Hybrid (Silicon-Carbon) Particle Technology, která spojuje výhodné vlastnosti obou typů sorbentů. K zamezení vlivu volných hydroxylových skupin silikagelu a ke zvýšení mechanické odolnosti se používají etylenové můstky [15].



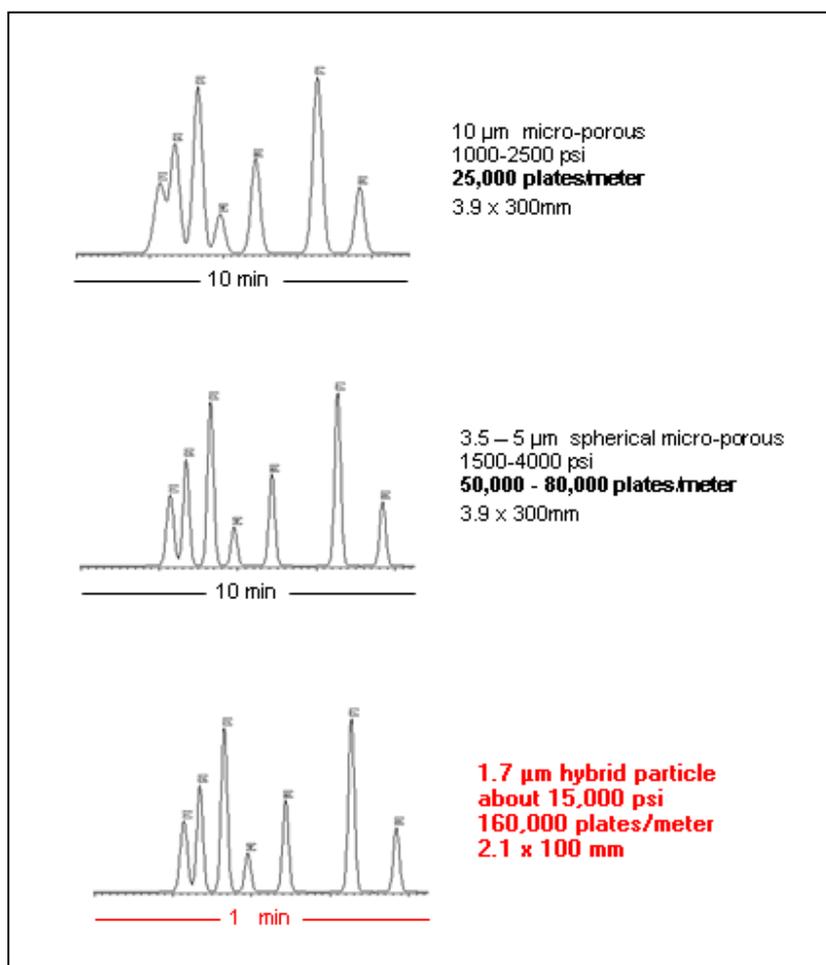
**Obr. 7** Umístění etylenových můstků v matici silikagelového nosiče [15]

Velikost UPLC částic se pohybuje okolo 1,7  $\mu\text{m}$ , což je optimální velikost pro metodu UPLC. Další snižování částic vede pouze ke zvyšování zpětného tlaku a zvýšení účinnosti je zanedbatelné. Porovnání velikosti částíček je na obrázku 7. Velikost částic sorbentu má vliv na účinnost separačního procesu, obrázek 8. Účinnost separace je nepřímo úměrná sorbentu, a když se velikost částíček sorbentu sníží třikrát, pak také asi třikrát vzroste účinnost separace [15].



**Obr. 8** Vliv lineární rychlosti mobilní fáze na výškový ekvivalent teoretického patra v závislosti na velikosti sorbentu [15]

Velikost částic sorbentu má vliv na účinnost separačního procesu. Se snižující se velikostí částic dochází ke zvýšení účinnosti separace (rozlišení). Vliv velikosti částí demonstruje následující obrázek:



**Obr. 9** Vliv velikost částic na účinnost separačního procesu [15]

### 2.1.6 Detektory

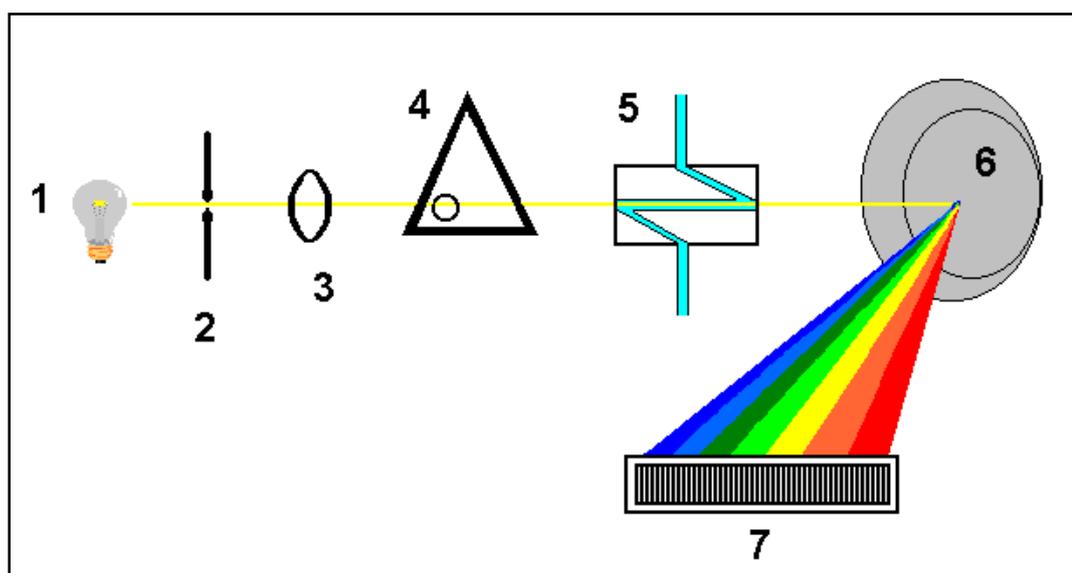
Zařízení, které indikuje přítomnost separovaných složek na základě změny fyzikálně chemické veličiny nebo na základě změny kvantitativního sledování její koncentrace. Detektory by měly být selektivní, citlivé a reprodukovatelné. Jako detektory lze použít UV/VIS absorpční spektrometrický detektor pro měření při více vlnových délkách s diodovým polem, spektrofluorometrický, refraktometrický (využívá lom světla), vodivostní, amperometrický detektor a hmotnostní spektrometr. Přehled detektorů je obsažen v tabulce 2. Výsledkem chromatografické analýzy je chromatogram, který obsahuje píky reprezentující jednotlivé oddělené složky z analyzovaného vzorku [17].

Tab. 2 Přehled detektorů [18]

Typ detektoru	Měřená veličina	Citlivost	Dynamický rozsah
Spektrofotometrický	Absorbance	$10^{-10}$	$10^4$
Refraktometrický	Index lomu	$10^{-7}$	$10^4$
Vodivostní	Vodivost	$10^{-8}$	$10^6$
MS	Počet iontů	$10^{-13}$	$10^5$
Fluorescenční	Fluorescence	$10^{-9}$	$10^3$

### 2.1.6.1 Fotometrický detektor

Fotometrický detektor, obrázek 10, patří k nejčastěji používaným detektorům. Měří absorbanci eluátu vycházejícího z kolony. Jednodušší detektory měří při jedné vlnové délce v oblasti ultrafialové (například 254 nm – rtuťová výbojka). Složitější detektory umožňují nastavení vlnové délky pomocí monochromátoru. Nejdokonalejší detektory jsou schopné pomocí diodového pole proměnit absorpční spektrum v určité oblasti vlnových délek a uložit ho do paměti [17].



Obr. 10 Detektor s diodovým polem [17]

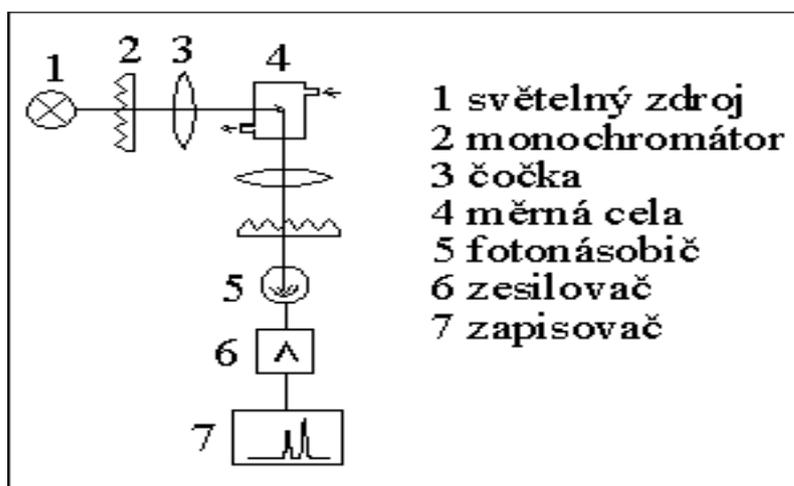
Popis částí detektoru: 1 – zdroj, 2 – štěrbin, 3 – čočka, 4 – clona, 5 – měrná clona detektoru, 6 – holografická mřížka, 7 – zářivý tok o určité vlnové délce.

### 2.1.6.2 Refraktometrický detektor

Refraktometrický detektor měří rozdíly mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní fáze. Obsahuje-li eluát složku, dojde k výchylce. Detektor není příliš citlivý, ale je velmi univerzální. Při jeho používání je nutné udržovat konstantní teplotu [17].

### 2.1.6.3 Fluorescenční detektor

Fluorescenční detektor, zobrazen na obrázku 11, je založen na principu fluorescence, neboli schopnosti látek absorbovat ultrafialové záření a poté vysílat záření o vyšší vlnové délce. Fluorescenční intenzita závisí na excitační a emisní vlnové délce, což umožňuje selektivně detekovat některé složky [17].

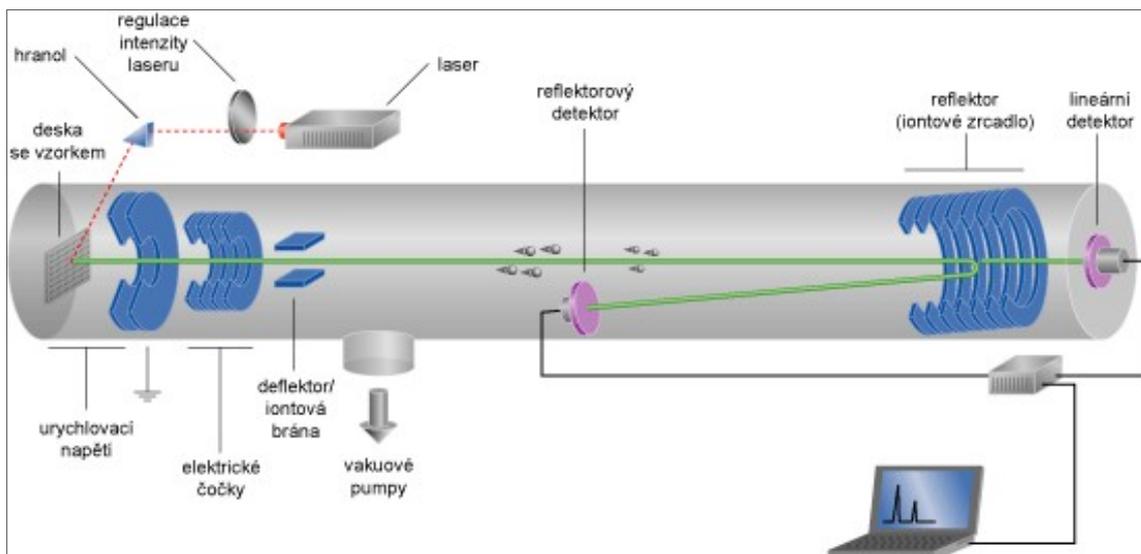


Obr. 11 Fluorescenční (fluorometrický) detektor [24]

### 2.1.6.4 Hmotnostní spektrometr

Princip je založen na ionizujících chemických sloučeninách a měření jejich hmotnosti vzhledem k náboji. Používá se pro určení hmotnosti částic, nebo stanovení elementárního složení vzorku, molekuly, a také pro objasnění chemické struktury molekul.

Snímání hmotnostního spektra během eluce látek je velmi výhodné pro strukturní analýzu a identifikaci látek ve složitých směsích. Technicky výhodné pro přímé napojení je používání mikro kolon a kapilárních kolon [25]. Schéma hmotnostního spektrometru lze vidět na obrázku 12.



**Obř. 12** Schéma hmotnostního spektrometru na principu MALDI-TOF [26]

Elektrická čočka a deflektor umožňují zaostřit ionty stejného poměru  $m/z$  a odklonit ty ionty, které nás v daném pokusu "nezajímají". Reflektor má stejnou elektrickou polaritu jako deska se vzorkem a obrací let iontů směrem k druhému detektoru; umožňuje zvýšit přesnost měření tím, že prodlouží dráhu letu, a také soustředěním stejných iontů v duté části prstencovitých elektrod. [30]

### 2.1.6.5 Elektrochemické detektory

Vodivostní nebo voltametrické detektory lze použít, pokud jsou v roztocích obsaženy ionty, respektive složky oxidovatelné nebo redukovatelné na polarizovatelné elektrodě [17].

### 3 STANOVENÍ PROTEINŮ POMOCÍ UPLC

Detailní analýzu proteinů lze stanovit pomocí výkonných analytických metod, které zahrnují mapování peptidů a hmotnostní spektrometrii (MS) za použití HPLC a UPLC kolon různého chemického složení, které obsahují SE, IE, hydrofobní interakci a reverzní fázi. Například technologie Waters separací proteinů reverzní fázi, BioSuite, SEC, IEX, HIC a RP-HPLC kolonami nabízí vynikající výkon při separaci makromolekul. Přímá aplikace na jednotlivé frakce pšeničných bílkovin nebyla dosud publikována [23].

#### 3.1 ACQUITY UPLC BEH200 SEC

ACQUITY UPLC technologie umožňuje analytickým chemikům přesáhnout běžnou kapalinovou chromatografii. Tato technologie se také osvědčila jako hlavní přínos při zvyšování produktivity laboratoří. Nejnovější je ACQUITY UPLC SEC systém roztoků, který umožňuje, díky etylenovému hybridnímu můstku (BEH) potaženého Diolem, velikost částic 1,7  $\mu\text{m}$ . Plně optimalizované kolony chemicky významně snižují požadavek na vysoké koncentrace soli mobilní fáze [27]. UPLC prokázala značné výhody ve srovnání s HPLC pro stanovení proteinů. UPLC poskytuje větší rozlišení, vyšší citlivost, vynikající tvary píků a potenciál ke zvýšení propustnosti [28].

#### 3.2 Separační technologie peptidů pomocí

Identifikaci bílkovin je založena na vymývání vzorků fragmentů peptidů, stanovení post-translačních modifikací, potvrzení genetické stability a analýze sekvence proteinů s propojeným hmotnostním spektrometrem. V mapě peptidů, je nezbytné vyřešit každý fragment peptidu v jednom vrcholu. Proto mapování peptidů představuje významnou výzvu, vzhledem k vlastní složitosti vyluhování bílkovin. Kromě velkého počtu fragmentů peptidů, které jsou generovány z enzymatických vyluhovaných bílkovin, může být významný i počet alternativních struktur (oxidace, post-translační modifikace). Schopnost UPLC technologie umožňuje vyšší rozlišení mapování peptidů. Tato aplikace ukazuje výhody pro mapování peptidů [29].

Studie se velmi často zabývají biofarmaceutickými bílkovinami, u nichž mapování peptidů pomocí nové techniky UPLC slouží k prokázání genetické stability a potvrzení celistvosti bílkovin. Změna retenčního času často v kombinaci s MS/MS detekcí, odhalila změnu primární struktury bílkovin. Změny jako jsou oxidace, deaminace, sekvence klipů a glykosylace ovlivňují chromatografické chování [29].

Přítomnost modifikovaného peptidu v mapě vzorku odráží přítomnost modifikovaných bílkovin v původním vzorku. Z tohoto důvodu je nutné, aby byly modifikované peptidy odděleny od původních peptidů. Kvantifikace je vyjádřena jako plocha nebo výška v procentech z původního peptidu. Tímto způsobem mapy peptidů poskytují informace o směsi bílkovinných forem, tak aby se zajistila bezpečnost a účinnost přípravy. Metody proto musí vykazovat vynikající citlivost a lineární kvantitativní práci, což technologie UPLC splňuje [29].

Mazzeo a jeho kolektiv [29] potvrdily, že UPLC má výrazné zlepšení v mapování peptidů v porovnání s HPLC. Lepšího rozlišení bylo dosaženo v kombinaci se zvýšenou citlivostí. Dobu průběhu lze zkrátit snížením délky kolony a zvýšením rychlosti průtoku. Selektivita byla srovnatelná s běžnou reverzní fází HPLC kolon mapování peptidů a lze snadno převést na jiné modifikátory, které dávají lepší citlivost v ESI/MS. ACQUITY UPLC systém jasně ukázal, že je další generací nástrojů při mapování peptidů [29].

Velká pozornost z hlediska nové techniky UPLC, je věnována biofarmaceutickým bílkovinám, u nichž mapování peptidů pomocí této techniky slouží k prokázání genetické stability a potvrzení celistvosti bílkovin. Změna retenčního času často v kombinaci s MS/MS detekcí, odhalila změnu primární struktury bílkovin. Změny jako jsou oxidace, deaminace, sekvence klipů a glykosylace ovlivňují chromatografické chování. Modifikované peptidy musí být odděleny od původních. Přítomnost modifikovaného peptidu v mapě vzorku odráží přítomnost modifikovaných bílkovin v původním vzorku. Ve výchozí charakterizaci bílkovin je důležité vytvořit mapování peptidů metodou, která umožňuje odstranit modifikované peptidy z původních peptidů, tak že všechny možné modifikace mohou být zjištěny. Kvantifikace je vyjádřena jako plocha nebo výška v procentech z původního peptidu. Tímto způsobem mapy peptidů poskytují informace o směsi bílkovinných forem, tak aby se zajistila bezpečnost a účinnost přípravy. Metody proto musí vykazovat vynikající citlivost a lineární kvantitativní práci [29].

## 4 MOŽNOSTI EXTRAKCE JEDNOTLIVÝCH FRAKCI PŠENIČNÝCH BÍLKOVIN

### 4.1 Extrakce

Z hlediska fyzikální chemie lze chápat extrakci jako přechod složky fázovým rozhraním mezi dvěma vzájemně nemísitelnými kapalinami. Z širšího analytického pohledu jsou extrakcí pojmenovány další metody, při nichž je převáděna složka směsi s fázovým rozhraním z jedné fáze (plynné, kapalné, pevné) do druhé fáze (kapalné, pevné) i když principiálně jde například o absorpci. Extrakci je nutné provádět tak jednoduše, jak je to jen možné. Při každém kroku extrakce totiž dochází k nevratné ztrátě nedefinovatelného množství proteinů. Problémem je i zdánlivě neškodné uložení nestabilizovaných proteinů přes noc do mrazáku nebo lednice. Vývoj extrakčních metod je řízen snahou nahradit zdoluhavé postupy s velkými spotřebami rozpouštědel novými technikami, mezi které řadíme extrakci a mikroextrakci pevnou fází nad kritickou fluidní extrakci [17].

Rozdělení extrakčních soustav dle skupenství fází, mezi kterými přechází složka:

- z pevné fáze do kapaliny – z pevného materiálu se rozpouští ve vhodném rozpouštědle požadovaná složka, ostatní složky se nerozpouštějí. Použití Soxhletova extraktoru.
- z kapaliny do kapaliny – založená na rozdělovací rovnováze v soustavě dvou nemísitelných kapalin. Složka z větší části přechází do rozpouštědla, ve kterém je lépe rozpustná.
- z kapaliny na pevnou fází – extrakce pevnou fází z roztoku selektivně zachycuje požadované složky.
- z kapaliny nebo plynu na pevnou fází – mikroextrakce pevnou fází je modifikací extrakce pevnou fází, ve které dochází ke zkoncentrování analytu adsorpcí na polymer pokrývající křemenné vlákno [17].

#### 4.1.1 Extrakce z kapaliny do kapaliny

Podmínkou je ustanovení fázové rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými kapalinami, neboli výchozím vzorkem s analytem a rozpouštědlem.

Podle druhu extrahované látky lze extrakci provádět následujícími způsoby:

- organické látky lze většinou extrahovat přímo do vhodného rozpouštědla,
- anorganické látky jsou ve vodných roztocích ve formě iontů, extrakce v této podobě není možná. Nejprve se musí převést do vhodné, nejlépe neutrální komplexní sloučeniny.

Podle způsobu provedení lze dělit extrakce na následující typy:

- Jednostupňová extrakce – založena na ustavení jediné rovnováhy mezi fázemi.
- Mnohostupňová extrakce – jedná se o opakovanou jednostupňovou extrakci v několika oddělených krocích.
- Kontinuální extrakce – založena na ustavení mnoha rovnováh. Při extrakci jsou nemísitelné fáze stále ve styku a v protiproudém pohybu.

Cílem extrakce je vyextrahovat co nejvíce žádané složky s co nejmenším počtem kroků a co nejmenší spotřebou rozpouštědla. Volí se proto takové rozpouštědlo, ve kterém je extrahovaná složka o mnoho rozpustnější, než v rozpouštědle, ze kterého se extrahuje. V úvahu musíme brát čistotu rozpouštědla, bezpečnost práce, cenu a ekologické hledisko. Roztok s extrahovatelnou formou je uváděn do styku s extrahovadlem a zajistí se ustavení rovnováhy. Přechod složky lze urychlit zvýšením jeho plochy, nejjednodušeji třepáním. Oddělený extrakt je čištěn protřepáváním s různými rozpouštědly. Stanovení je prováděno přímo, nebo extrahovaná složka je převáděna zpátky do vodného roztoku [17].

#### 4.1.2 Nadkritická fluidní extrakce

V SFE ( Supercritical Fluid Extraction) lze používat k extrakci pevného vzorku nadkritickou tekutinu. Běžně se používá oxid uhličitý, který má teplotu 31 °C a kritický tlak 7149 kPa. Pracuje se s tlaky 40–70 MPa a teplotami 60–150°C. Nadkritický oxid uhličitý je ideální rozpouštědlo pro analyty dále analyzované instrumentálními metodami. Jedná se o nepolární rozpouštědlo, proto rozpouští nepolární a málo polární sloučeniny. Jeho použití je velmi výhodné, jeho kritický bod je snadno dosažitelný, je netoxický, bezpečný a levný.

Rozpuštěný analyt lze snadno jímat, protože oxid uhličitý jde lehce odpařit. Další výhodou je rychlost, která se zkracuje oproti ostatním metodám z mnohohodinové až vícedenní extrakce na minuty až desítky minut. Zařízení lze přímo spojit s analyzátozem a kombinovat například s HPLC, GC nebo FTIR [17].

#### 4.1.3 Extrakce pevnou fází

SPE (Solid Phase Extraction) patří v současné době mezi nejvýkonnější techniku dostupnou pro rychlou a selektivní přípravu vzorku. Podstatou je zachycení látky na tuhém sorbentu, přes který protéká vzorek. Při extrakci se využívá chemických vlastností molekul, které v důsledku mezimolekulových interakcí ulpívají na sorbentu. Proto je SPE nazývána chemickou filtrací. Lze ji používat pro různé účely, například pro čištění látek, zkoncentrování stopových množství látek, výměnu rozpouštědla. SPE má velmi jednoduchou konstrukci, jejímž základem je upotřebení nepříliš drahých extrakčních kolonek, na jedno použití a nejrůznějších velikostí a náplních sorbentů. Kolonky obsahují sorbenty nejčastěji založené na bázi chemicky modifikovaných částic silikagelu. SPE pracuje tak, že kapalný vzorek je veden přes kolonku a sloučeniny jsou ze vzorku zachyceny materiálem sorbentu v koloně. Nežádoucí příměsi jsou z kolonky selektivně odstraněny promytím správně zvolenými rozpouštědly. Nakonec jsou z kolonky žádoucí analyty znovu získány elučním rozpouštědlem v podobě vysoce čistého extraktu [17].

## 4.2 Extrakce rostlinných proteinů

Při extrakci rostlinných proteinů je důležité co nejlépe oddělit žádané proteiny od balastních látek (polyfenoly, lipidy, pigmenty). Jsou uváděny dvě základní strategie extrakce. Přímá extrakce proteinů z homogenizovaného materiálu – TCA/acetonová extrakce. Druhá extrakce je založená na rozpouštění homogenátu v lyzančním pufru, po kterém následuje fenolová extrakce. Někdy se používá kombinovaná extrakce. Novým přístupem pro extrakci proteinů je metoda, při které je lyzát, po homogenizaci a lyzi buněk ve vzorku, převeden na ultrafiltrační membránový filtr, kde je dále zpracován. Výhoda spočívá v tom, že proteiny zůstanou po extrakci v roztoku a jsou eliminovány neidentifikovatelné ztráty vzniklé při precipitaci a následném rozpouštění peletu [30], [31].

**TCA/acetonovou extrakci** vyvinul Damerval a jeho kolektiv pro izolaci proteinů z pšenice. Proteiny jsou díky kyselému a hydrofobnímu prostředí denaturovány, balastní látky jsou odstraněny a dochází k inhibici nežádoucích enzymů. Nedochozí k proteolýze a ztrátě vysokomolekulárních proteinů. Metoda je jednoduchá, časově nenáročná, ale není vhodná pro práci se staršími rostlinami [31], [33].

**Fenolová extrakce** byla metoda původně navržena pro izolaci membránových proteinů. Rozdrcený vzorek se rozpustí v lyzančním pufru, který obsahuje sacharosu ve vysoké koncentraci (až 0,9 M), inhibitor protéza, redukční činidlo a chlorid draselný. Poté je lyzanční roztok smíchán se saturovaným fenolem při pH = 8 nebo fenolem s 2% SDS. Dojde k vytvoření fázového rozhraní s fenolovou fází nahoře, která obsahuje proteiny, lipidy, polyfenoly, nukleové kyseliny a pigmenty. Proteiny z fenolové fáze se vysráží roztokem octanu amonného v metanolu při -20 °C nebo pouze metanolem či etanolem [33], [34], [35].

Jedna z nejdéle používaných metod charakterizace bílkovin je frakcionace z pohledu odlišné rozpustnosti albuminů, globulinů, prolaminů a glutelinů. Metoda je založena na postupné separaci bílkovin podle jejich odlišné rozpustnosti navržené Osbornem [36] na začátku minulého století. Albuminy a globuliny jsou extrahovány převážně slabými vodnými roztoky chloridu sodného. Prolaminy u pšenice nazývané gliadiny, jsou po odmytí předchozí frakce získány extrakcí ve vodných roztocích alkoholů, nejčastěji se používá etanol. Gluteliny (u pšenice nazývané gluteniny) jsou velmi často extrahovány slabými zásadami nebo kyselinami. Nejčastěji publikované vzájemné procentuální poměry mezi albuminy a globuliny, gliadiny a gluteniny u pšenice seté se pohybují v rozmezí 20–25 % (albuminy-globuliny) : 40–50 % (gliadiny) : 35–40 % (gluteniny). Znalost poměru složek a jejich specifického složení má velký význam pro nutriční, ale i pro technologickou kvalitu [36].

Odlišné rozpustnosti bílkovin využívá řada dalších technik, například elektroforetická technika. Řada studií na základě elektroforetické vizualizace těchto frakcí dokazuje, že přechody v rozpustnosti mezi jednotlivými frakcemi bílkovin nejsou ostré, prolínají se a jsou závislé na době extrakce, extrakčním činidle a jeho teplotě [34].

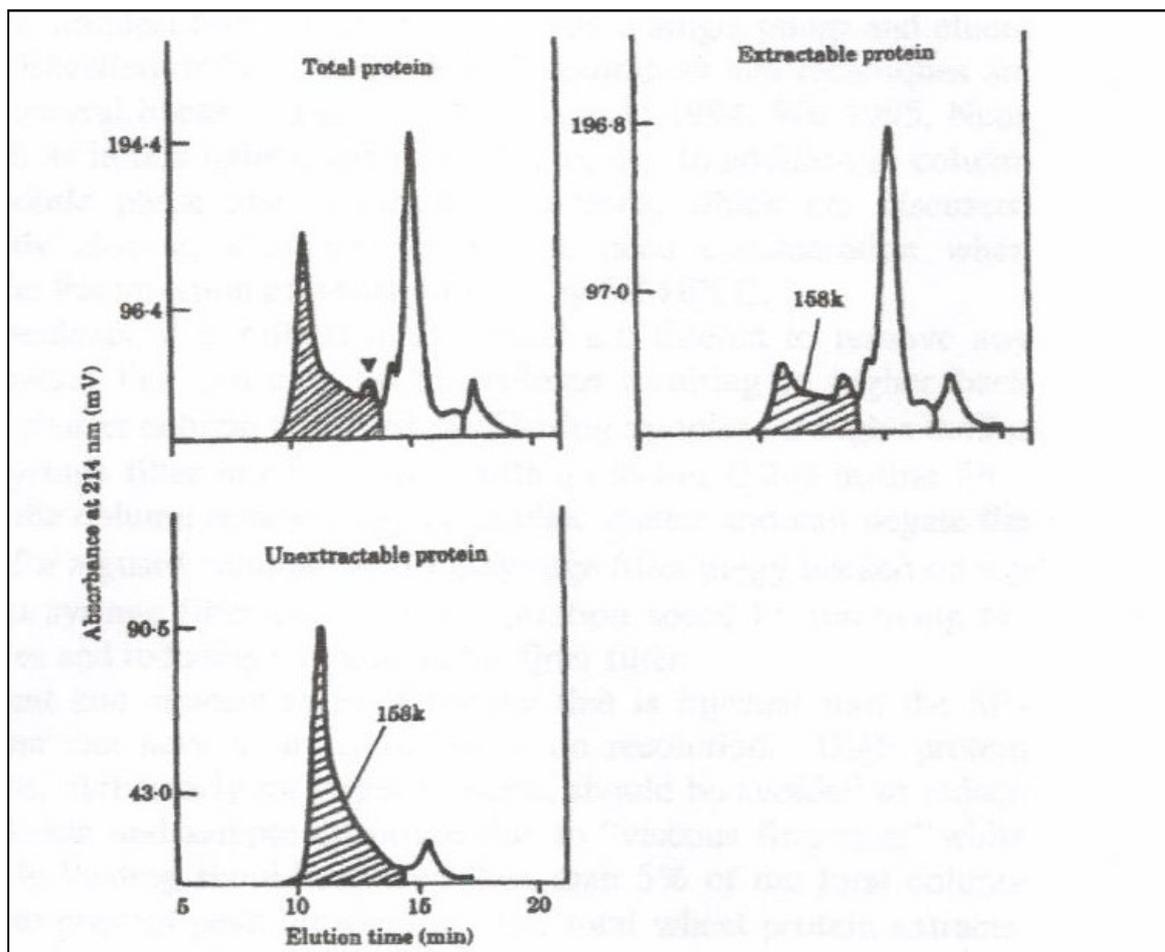
Velmi často bývá prokazován přechod vysokomolekulární frakce gluteninů do spektra gliadinů a také překrývání lehčího nízkomolekulárního gluteninového spektra s  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  gliadiny v prostředí SDS-PAGE. Mosse a Baudet [37] v roce 1963 dokázali, že při teplotě 22 °C přešlo do první frakce až 50 % proteinů zrna. Z toho vyplývá, že značná část dalších frakcí bílkovin je za podmínek vyšší teploty rozpustná i ve vodném roztoku chloridů sodného. V řadě studií se o kvantifikacích bílkovinných frakcí nachází určité metodické odchylky, které mohou mít zásadní význam pro konečné stanovení a jejich vzájemný poměr [37].

### 4.3 Extrakce pšeničných proteinů pro SE-HPLC analýzu

Na SE-HPLC (Size exclusion–high performance liquid chromatography) analýzu celkových proteinů Shewry a Lookhart [35] ve své studii kladou větší důraz, i přestože se charakteristika rozdělení velikosti pšeničných proteinů rozpustných frakcí ukázala jako výhodná. U této metody lze použít extrakci pomocí ultrazvuku s SDS (Dodecyl sulfát sodný), který je schopný vyextrahovat více než 95 % bílkovin z celkového obsahu bez přidavku redukčních činidel. Na základě dřívějších studií Bietze a Hubnera [38] v roce 1985, kteří ukázali, že pomocí 0,1M roztoku fosfátovým pufrům s pH 6,9 obsahující 2% SDS, bylo možné získat 55–95 % bílkovin z celkového množství mouky. Extrakce byla prováděna při 60 °C. Toto tepelné ošetření vedlo ke shodným výsledkům SE-HPLC, které běžely v různé době po ukončení extrakce. Později Laroque a Békés [39] zdůraznili význam tepelného zpracování extraktů u 60 °C. Výsledky podle všeho odpovídaly SE-HPLC denuraci proteázy bez dopadu na vymývání hlavních frakcí bílkovin. Brzy po této práci, Singh a jeho spolupracovníci [40] zjistili, že téměř úplné extrakce z pšeničné mouky může být dosaženo s 0,005M fosfátovým pufrům s pH 6,9 obsahující 2% SDS, pomocí ultrazvuku v jediném kroku bez přítomnosti redukčního činidla. SE-HPLC na koloně Waters Protein-Pack 300 ukázala přítomnost tří píků se snižující se velikostí přidělených příslušným bílkovinám gluteninu, gliadinu a albuminu nebo globulinu [35].

Ve studii, z roku 1993, představil Gupta a jeho kolektiv [41] dvoufázový mikro a makro extrakční postup, který zahrnuje původní extrakty 0,05M fosfátového pufru s pH 6,9 s obsahem 0,5% SDS a následným ultrazvukem rezidua v přítomnosti stejného pufru. Srovnáním SE-HPLC profilů na obrázku 14 těchto extraktů jednostupňového postupu extrakce se Singhem a jeho spolupracovníky v 214 nm, bylo ukázáno obohacení menších frakcí (gliadinu a albuminu nebo globulinu) a relativně malé množství gluteninu bez

ultrazvukové extrakce. V porovnání s druhou, ultrazvukovou extrakcí, byla ukázána mnohem větší velikost píků obsahující největší eluční velikost výšky objemu neextrahovatelné gluteninové frakce a jediný mnohem menší eluční pík velikostí odpovídající gliadinu. Tyto postupy extrakce a jejich úpravy jsou užitečné zejména při studiu vztahů mezi velikostí rozdělených pšeničných proteinů a kvalitou zpracování pšeničných proteinů [35].



**Obr. 13** SE-HPLC totální separace, extrahovatelných a neextrahovatelných proteinů z mouky pomocí Waters Protein Pak -300 SEC kolony [41]

Ueno a jeho kolektiv [42] v roce 2002 představil dvoustupňovou extrakci pomocí zředěné kyseliny octové, bez a poté s použitím ultrazvuku a to s výsledkem nad 95% pšeničných bílkovin. SE-HPLC a průtoková FFF analýza, v české literatuře lze použít termín „frakcionace tokem v poli“, ukázaly, že extrakcí původní zředěnou kyselinou octovou se odstranili především monomerní bílkoviny a extrakcí druhou kyselinou octovou došlo k odstranění především polymerních bílkovin [42].

#### 4.4 Extrakce pšeničných proteinů pro FFF

Průtok FFF (Field-flow fractionation), neboli frakcionace tokem v poli, byl první aplikován na velikost frakce pšeničných bílkovin Stevensonem a jeho kolektivem [43] v roce 1996, použitím symetrické nebo asymetrické průtokové techniky navzájem.

V obou studiích, neredukované gluteninové složky získané ultrazvukem za použití zředěné kyseliny chlorovodíkové, poté odstraněné zředěnou solí, 70% etanolem a zředěnou kyselinou octovou extrahovatelných proteinů, nebo sekvenční extrakcí se vrůstajícími koncentracemi kyseliny chlorovodíkové, ukázali široký rozsah. Stokesův poloměr ( $d_s$ ) z těchto složek je v rozmezí od 10 do více než 40 nm. Osbornem v soli rozpustné albuminy a globuliny ukazují píky s hodnotami 4,5, 7,2 a 10,9 nm, zatímco v alkoholu rozpustné gliadiny ukazovaly hlavní pík 7,4 nm a vedlejší pík 9,3 nm. Po odstranění těchto frakcí, zředěnou kyselinou octovou, která rozpouští gluteninové frakce, ukazuje pík hodnoty 7,4 a 9,9 nm odpovídající monomerním bílkovinám a zřetelný polymerní gluteninový pík s hodnotou 16,9 nm. Sekvenční extrakce z mouky se zvyšující se koncentrací HCl ukázala progresivní nárůst velikosti složek, v pozdější frakci ukazuje pík s hodnotou kolem 30 nm. Obě studie čistě demonstrují extrémně velké velikosti (pravděpodobně v 10,000,000 rozsahu) největších gluteninových polymerů a slibný potenciál průtoků FFF pro charakterizaci polymerních gluteninových bílkovin z pšeničné mouky. V další studii Larroque [44] používal průtok FFF k posouzení vlivu velikosti rozdělení gluteninových polymerů během extrakce.

#### 4.5 Extrakce pšeničných proteinů pro FZCE analýzu

##### Albuminy a globuliny

1. Jako rozpouštědlo pro extrakci albuminů a globulinů je použit 50 mM Tris HCl pufr pH 7,8 obsahující 100 mM KCl a 5 mM EDTA.
2. Rozpustí se 3,7 g KCl, 2,7g Tris HCl, 1,0 g Tris a 0,7 g EDTA v 250 ml redestilované vody.
3. Po rozpuštění chemikálie, se upraví objem na 500 ml. Neupravuje se pH.
4. Činidlo se uloží do ledničky. Pro nejlepší výsledky se dá část 50–100 ml do láhve.

**Gliadiny** mohou být připraveny několika způsoby a s několika rozpouštědly s použitím FZCE ( Free Zone Capillary Electrophoresis).

Následující postup je doporučen pro nejlepší reprodukovatelnost. Pracuje se v poměru rozpouštědla k mouce 10:1, většinou se používají následující navážky: 100 mg mouky a 1 ml rozpouštědla.

1. 100 mg extraktu mouky s 1 ml albuminového a globulinového rozpouštědla (50 mM Tris HCl, pufr pH 7.8 zahrnující 100mM KCl a 5mM EDTA) po pěti minutách kontinuálního míchání na vortexu vyjmeme albuminové a globulinové bílkovin. K usnadnění kontinuálního míchání lze vzorky umístit na VortexGenine2, který je vybaven pěnovým držákem pro 30 lahvíček.
2. Na centrifuze dojde k odstranění vody.
3. První a druhý bod je zopakován.
4. Extrakt je 5 minut (s kontinuálním mícháním na vortexu) promýván deionizovanou vodou, aby došlo k odstranění zbytků soli.
5. Po odstředění a odstranění vody, je přidán 1 ml 50% propan-1-olu do pelet (tablet) a mechanicky se rozbijí pelety pomocí stěrky. Extrahuje se 5 minut pomocí kontinuálního míchání na vortexu.
6. Po odstředění, je 0,5 ml kapaliny bezpečně vyjmuto a přesunuto do nové mikrocentrifugační lahvičky.
7. Zbývající kapalina je odstraněna a extrakce s 50% propan-1-olem je zopakována.
8. Po odstředění druhého (50% propan-1-olu) extraktu, je 0,5 ml kapaliny znovu odstraněno a přidáno do lahvičky obsahující první propan-1-ol extrakt.
9. Kapalina je odstředěna do vyčiření. Po vyčiření lze tuto kapalinu přímo použít k analýze. Filtrace vzorku není nezbytně nutná.

K přípravě vzorků pro FZCE analýzu glyadinu lze použít mouku i celé jídlo. Nicméně extrakt připravený z mouky produkuje lepší výsledky, které jsou více reprodukovatelné. Vzorky připravené z celozrnného jídla ukazují menší stabilitu. Životnost kapiláry je snížena při použití vzorků připravených z celého jídla. Podobně lze analyzovat gliadiny bez předchozího extrahování frakcí albuminů a globulinů. Bohužel přítomnost těchto frakcí může mít za následek zkrácení životnosti kapiláry [35].

### Gluteniny

Postup k úspěšné přípravě gluteninů pro FZCE analýzu.

1. Vzorek 100 mg mouky s 1 ml 50% propan-1-olu je po dobu pěti minut kontinuálně míchán na vortexu, aby došlo k odstranění frakcí albuminů, globulinů a gliadinů. Na centrifuze dojde k odstranění vody a poté odstraníme supernatant.
2. První krok extrakce je zopakován. Během této extrakce jsou některé polymerní gluteniny odstraněny.
3. Je přidán 1 ml 50% propan-1-olu obsahující 1% DTT nebo 5% BME a mechanicky se rozbijí pelety pomocí stěrky. Extrakt je třicet minut kontinuálně míchán na vortexu.
4. Extrakt je odstředěn a kapalina je bezpečně vyjmuta do nové mikrocentrifugační trubice pro analýzu. Kapalina může být před analýzou odstředěna do vyčiření. Filtrace vzorku není nezbytně nutná [35]

## 4.6 Extrakce pšeničných proteinů pro SDS-CE analýzu

### Gliadiny

1. Vzorek 100 mg mouky se extrahuje s 1 ml 1% SDS po dobu pěti minut kontinuálním mícháním na vortexu.
2. Směs je odstředěna a kapalina převedena do nové mikro odstředovací trubice a zahřívána při 100 °C na vytápěném bloku po dobu pěti minut a poté je znovu odstředěna.
3. Po odstředění může být kapalina použita pro SDS analýzu. Kapalina se nemusí filtrovat.

### Gluteniny

1. Vzorek (100 mg) je nejprve extrahován s 1 ml 50% propan-1-olu, aby došlo k odstranění frakcí gliadinů, albuminů a globulinů.
2. Odstředění a odstranění vody.
5. První a druhý krok je zopakován dvakrát. Během této extrakce jsou některé polymerní bílkoviny odstraněny.
3. Je přidán 1 ml 1% SDS s 5% BME do pelety a mechanicky se rozbijí pelety pomocí stěrky. Extrakt se 30 minut kontinuálně míchá na vortexu.

4. Extrakt se odstředí a kapalina je opatrně vyjmuta a přesunuta do nové mikro odstředivé trubice.
5. Vzorek je zahříván pět minut na 100 °C. Kapalina je znovu odstředěna a může být použita pro analýzu. Kapalinu není potřeba filtrovat před analýzou.

Vysrážené HMW-GS se mohou znovu rozpouštět v 1% SDS 5% BME a zahřívají se obdobně jako gliadiny a gluteniny [35].

## 4.7 Extrakce pšeničných proteinů pro RP-HPLC analýzu

### Gliadiny

1. Vzorek 100 mg s 1 ml 50% propanol-1-olu ve 2 ml mikrocentrifugační trubice je po dobu pěti minut kontinuálně míchán na přístroji VortexGenine 2.
2. Odstředění po dobu dvou minut při otáčkách 14,000xG. (Lze použít malé vzorky. Malé vzorky jako 10 mg můžeme extrahovat se 100 µl jako rozpouštědlo může být použita ½ kernelu nebo méně).
3. Opatrně kapalina je převedena do HPLC autosemplerní lahvičky.
4. Při oddělování může nastat problém z důvodu extrakčního rozpouštědla, v tomto případě lze vzorek vysušit ve vakuové odparce a znovu rozpustit v HPLC startovacím pufu [35].

### Gluteniny

Doporučený gliadinový postup je velmi podobný gluteninovému. Jediným rozdílem jsou extrakční podmínky, kdy gliadiny jsou extrahovány první a vyřadí se (za účelem získání čistých gluteninových vzorků).

Gluteniny jsou extrahovány 50% propan-1-olem obsahující 1% DDT (dithiothreitol), po dobu pěti minut je kontinuálně míchán na vortexu, poté dojde k odstředění. Kapalina je pipetována do autosamplerní lahvičky [35].

## 4.8 Extrakce pšeničných proteinů pro IE-HPLC analýzu

### Gliadiny

1. Vzorek 100 mg je smíchán s 1ml 70% etanolu nebo 50% propan-1-olu v 2 ml micro centrifugací zkumavky
2. Po dobu pěti minut je kontinuálně míchán na vortexu. Centrifugace probíhá po dobu dvou minut při otáčkách 14,000xG (Můžeme použít malé vzorky. Malé vzorky jako 10 mg můžeme extrahovat se 100  $\mu$ l jako rozpouštědlo může být použita  $\frac{1}{2}$  kernelu nebo méně).
3. Pokud je problém při oddělování z důvodu alkoholového extrakčního rozpouštědla můžeme vzorek vysušit ve vakuové odparce a znovu rozpustit v HPLC startovacím pufu.

### Gluteniny

Můžeme použít stejný postup a podmínky jako u extrakce gliadinů. Gluteniny jsou extrahovány 70% etanolem nebo 50% propan-1-olem obsahující 1% DTT [35].

## 4.9 Optimalizace Osbornovy metody kvantifikace bílkovinných frakcí zrna pšenice ozimé (*Triticum Aestivum L.*)

Dvořáček ve své studii [34] optimalizoval metodiku Osbornovy frakcionace proteinů pšeničného zrna pro rutinní hodnocení širšího sortimentu pšenice seté v Genové bance. Metodický přístup byl rozdělen do tří částí tak, aby bylo možné posoudit vliv navážky, koncentrace použitých rozpouštědel a externí faktory (teplota, hrubost mletí a čas extrakce) na kvantitativní změny jednotlivých bílkovinných frakcí u pšenice ozimé [34].

### 4.9.1 Vliv velikosti navážky a koncentrace extrakčních činidel

Pro extrakci byly použity dvě navážky vzorku (0,5 a 1 g). Dále byly zvoleny dvě nejčastěji používané koncentrace roztoků (60%, resp. 70% etanol) pro gliadiny a (0,02M NaOH a 0,1M NaOH) pro gluteniny. Vzorky byly semlety na mlýnku Cyklotec- hrubost 0,8 mm a byly převedeny ve třech opakováních do 15 ml centrifugačních zkumavek.

Albumino-globulinová část byla extrahována po dobu 8 hodin při teplotě 4 °C přidáním 5 ml 0,5M NaCl a poté byla frakce 15 minut při 6500 otáčkách centrifugována. Dále byla frakce promyta stejnými objemy téhož extrakčního činidla a 5 minut centrifugována při stejných otáčkách. Spojené supernatanty (čirá kapalina nad sedimentem) byly převedeny do nové zkumavky a na krátkou dobu byly uloženy v lednici.

Gliadiny byly získány stejným postupem extrakce jako v případě albumino-globulinové frakce po dobu 4 hodin extrakcí 60% resp. 70% etanolem za laboratorní teploty.

Gluteniny byly extrahovány 0,02M NaOH resp. 0,1M NaOH po dobu 4 hodin při teplotě 4 °C. Postup extrakce, promytí a centrifugace byl obdobný jako u gliadinů. Spojené supernatanty byly převedeny do nové zkumavky a na krátkou dobu byly uloženy v lednici.

Stanovení obsahu dusíku v získaných frakcích bylo provedeno uzanční Kjeldahlovou metodou na přístroji Kjeltec 2300 a následným přepočtem pomocí faktoru 5,7 na procento celkové bílkoviny v sušině vzorku. Výsledky jsou zaznamenány v tabulkách 3 a 4.

**Tab. 3** Frakcionace bílkovin u dvou odlišných navážek u pšenice seté [34]

Opakování	Navážka 1			Navážka 2		
	Albuminy + globuliny %	Gliadiny %*	Gluteniny %**	Albuminy + globuliny %	Gliadiny %*	Gluteniny %**
1	2,30	2,93	2,00	2,24	2,78	2,97
2	2,03	3,20	2,48	2,21	3,10	2,60
3	2,17	3,14	2,24	2,21	2,85	2,60
<b>Průměr ± sm. odchylka</b>	2,17±0,14	3,09±0,14	2,24±0,24	2,22±0,02	2,91±0,17	2,72±0,21

\*Použití 70% etanolu, \*\*použití 0,02M NaOH

Velikost obou navážek neměla statisticky významný vliv na obsah prvních dvou hodnocených frakcí (albuminy-globuliny, gliadiny). Rozdíly se pohybovaly na úrovni chyby měření přístroje Kjeltec 2300.

V případě obsahu frakce gluteninů již byly zaznamenány výraznější odlišnosti, kdy při nižší navážce byla zjištěna její vyšší extrahovatelnost. Lze to vysvětlit tak, že v případě vyšší navážky a při použití uvedených centrifugací zkumavek pravděpodobně dochází v daném sloupci k většímu utužení vzorku. Toto utužení se nejvíce projeví právě u třetí separované frakce a je umocněno dvěma předcházejícími cykly trojnásobné centrifugace nezbytnými pro separace předchozích frakcí. U vzorku s nižší navážkou tak při aplikaci extrakčního roztoku dojde k lepšímu styku mezi vzorkem a rozpouštědlem a tedy i k jeho vyšší extrahovatelnosti. Z toho vyplývá **významný vliv navážky** vzorku na obsah gluteninové frakce. Lze konstatovat, že velikost navážky podstatným způsobem ovlivňuje vzájemné poměry mezi oběma zásobními frakcemi bílkovin (gliadinů a gluteninů). [38]

**Tab. 4** Separace gliadinů (etanolová frakce) a gluteninů (frakce NaOH) při odlišných koncentracích rozpouštědel [34]

Navážka 0,5 g				
Opakování	Etanol (60%)	Etanol (70%)	NaOH 0,02M	NaOH 0,1M
	%	%	%	%
1	2,78	2,93	3,09	2,99
2	3,10	3,20	3,22	2,97
3	2,85	3,01	2,73	3,51
<b>Průměr ± sm. odchylka</b>	2,91±0,17	3,05±0,14	3,01±0,25	3,16±0,31

Při použití 70% etanolu byl zjištěn v průměru o něco vyšší obsah extrahovaných gliadinů, ale z pohledu dílčích měření a deklarované chyby měření nebyl tento rozdíl významný. Stejná situace byla i v případě gluteninů, kdy zjištěné rozdíly v obsahu gluteninů při použití odlišných koncentrací NaOH nebyly statisticky průkazné. Lze konstatovat, že rozdílné koncentrace rozpouštědel vlastní extraktivnost bílkovinných frakcí významně neovlivnily.

#### 4.9.2 Vliv podmínek extrakce a velikosti částic šrotu

Metodické uspořádání vycházelo z poznatků získaných v části 4.9.1, především použití nižší navážky vzorku. Měření bylo zaměřeno na zjištění vlivu doby extrakce, extrakční teploty a velikosti částic (hrubosti) šrotu na výsledný obsah sledovaných frakcí.

Byly připraveny tři typy šrotů ve třech opakováních pšenice seté odrůdy Samanta o velikosti částic 1 mm, 0,8 mm a 0,15 mm. Z těchto velikostních skupin šrotů byly ve třech časových (15 min, 4 h, 8h) a dvou teplotních režimech (4 °C a laboratorní teplota) extrahovány tři bílkovinnou frakce stejným postupem jako v kapitole 4.9.1 (albuminy-globuliny 0,5 NaCl, gliadiny 60% etanolem, gluteniny 0,02M NaCl). Stanovení obsahu dusíku v získaných frakcích bylo provedeno uzančnickou Kjeldahlovou metodou na přístroji Kjeltec 2300 a následným přepočtem pomocí faktoru 5,7 na procento celkové bílkoviny v sušině vzorku.

Bylo zjištěno, že **doba extrakce** měla statisticky průkazný vliv na extraktivnost všech frakcí bílkovin. Hrubost částic vzorku měla průkazný vliv na obsah albuminů-globulinů a gliadinů. Průkaznost vlivu hrubosti vzorku byla způsobena odlišnějšími hodnotami třetí frakce šrotu. Teplota extrakce hrála významnou roli v případě extrahovatelnosti obou frakcí zásobních bílkovin, gliadinů a gluteninů. Časový průběh extrakce byl v obou teplotních režimech podobný s tím, že skupina nejmenšího šrotu vykazovala největší variabilitu v obsahu gluteninů za jednotlivé extrakční časy. Platí zde stejně jako u gliadinů, že jemnější částice šrotu je nutné extrahovat po delší dobu [34].

#### 4.9.3 Vliv víceetapové extrakce na obsah bílkovinných frakcí

Pšenice setá, odrůda Samanta, byla použita jako testovací materiál. Změny obsahu bílkovinných frakcí byly sledovány i v závislosti na jednotlivých fázích separace. Byly stanoveny obsahy frakcí získané v průběhu prvního, druhého a třetího promytí vzorku. Byla použita stejná metoda extrakce jako v části 4.9.1 a 4.9.2, navážka 0,5 g a 3 kategorie hrubosti vzorku jako v kapitole 4.9.2. V případě frakce částic 0,8 mm před vlastním stanovením dusíku byla rozšířena o její filtraci. K filtraci byl použit nástavec s póry 0,45 µm. Stanovení obsahu dusíku v získaných frakcích bylo provedeno uzančnickou Kjeldahlovou metodou na přístroji Kjeltec 2300 a následným přepočtem pomocí faktoru 5,7 na procento celkové bílkoviny v sušině vzorku. Výsledky jsou zaznamenány v tabulce 5.

**Tab. 5** Celkový součet bílkovinných frakcí u 3. Stupně promývání a celková suma vyextrahované bílkoviny u jednotlivých kategorií šrotu [34]

Hrubost	Albuminy+globuliny	Gliadiny	Gluteniny	Suma
	%	%*	%**	%
1 mm	3,18	3,97	3,45	10,60
0,8 mm	3,27	4,20	3,33	10,80
0,8 mm + filtrace	3,06	4,32	2,73	10,11
0,15 mm	2,57	4,13	2,39	9,09

Bylo zjištěno, že u albuminů-globulinů a gliadinů se postupným promýváním hodnoty jejich promýváním snižovaly, u gluteninů naopak významně rostly. Gluteniny se tak extrahovaly mnohem pozvolněji a vícestupňová extrakce je v jejich případě klíčová. Filtrace extraktu před vlastním stanovením dusíku Kjeldahlovou metodou, neovlivnila obsah albumino-globulinové a gliadinové frakce. Obsah drobných nerozpuštěných částic supernatantu pronikajících v průběhu každého přepipetování roztoku po centrifugaci do nové zkumavky byl u těchto dvou frakcí nevýznamný. Naopak v případě gluteninů bylo zaznamenáno výrazné snížení jejich obsahu ve filtrátu oproti nefiltrované kontrole. Při následných filtracích gluteninové frakce docházelo k silnému zanášení a ucpávání nástavcového filtru, proto filtrace u gluteninů proběhla pouze v prvním stupni extrakce [34].

#### 4.9.4 Optimalizovaná metodika

- Extraktivnost **albuminů** a **globulinů** byla metoda z pohledu vnějších faktorů nejvíce konzervativní a v případě obou velikostních tříd šrotů byl na celkovou extraktivnost vliv teploty a extrakčního času zanedbatelný. V porovnání s Osbornovou metodou lze při teplotě 4 °C zkrátit dobu extrakce vzorků o 15 minut.
- Extraktivnost **gliadinů** byla ze všech bílkovinných frakcí nejvíce podmíněna dobou extrakce. Byl zjištěn zvyšující se významný trend extraktivnosti u jemnějších šrotů v průběhu času. Striktní dodržování extrakčního času navrženého Osbornem po dobu 4 hodin se jeví jako nezbytné.
- **Gluteniny** byly nejvariabilnější frakcí, a to jak z pohledu opakování, tak vlivu velikosti částic šrotu, především v závislosti na délce trvání extrakce. S rostoucí dobou extrakce lze pozorovat stejně jako u gliadinů zvyšující se trend extraktivnosti frakce u jemnějších šrotů.

Problémem při stanovení obsahu gluteninů je jejich postupná pomalá extrakce. Důvodem může být i rozrušení zbytkového bílkovinného komplexu několikerým působením předešlých extrakčních roztoků, včetně působení NaOH. V něm se pak v průběhu druhého a třetího promytí koncentruje nejen rozpuštěný protein, ale i velký podíl velmi jemných nerozpuštěných a obtížně sedimentujících částic s významným podílem proteinu. Z tohoto důvodu by pro přesné získání třetí frakce byla vhodnější vyšší centrifugační rychlost a několikastupňová filtrace, která by vyřešila ucpávání jednostupňového filtru a přechod nerozpuštěných částic do roztoku [34].

- Pro rychlý plošný screening obsahu bílkovinných frakcí v kolekcích Genové banky, lze především doporučit stanovení obsahu frakcí albuminů-globulinů a gliadinů, jejichž rozdíly nepřekračovaly u stejných vzorků deklarovanou chybu analytického přístroje. Pro stanovení celkového obsahu gluteninů lze doporučit numerický dopočet z rozdílu hrubých bílkovin a prvních dvou bílkovinných frakcí. Souhrnné schéma metodické optimalizace frakcionace bílkovin je uvedeno v tabulce č. 6.

**Tab. 6** Optimalizovaná Osbornova metoda frakcionace bílkovin [34]

Následné extrakce	Navážka a velikost	Extrakční roztok	Teplota extrakce	Doba extrakce	Centrifugace
Albuminy-globuliny	0,05 g / max 0,8 mm	5 ml 0,5M NaCl	4 °C	15 min. + 2 promytí – 5	6500 ot.min <sup>-1</sup>
Gliadiny		5 ml 60% etanol	20 °C	4 h. + 2 promytí – 5	6500 ot.min <sup>-1</sup>
Celk. gluteniny		Stanovit dopočtem			

## 5 METODIKY STANOVENÍ Z MOUKY, TĚSTA A PEČIVA

Ke stanovení pšeničných bílkovin z mouky, těsta a pečiva jsou používány elektroforetické metody, chromatografické metody, hmotnostní spektrofotometrii, NIR spektrometrii [3].

Elektroforetické metody jsou jednou z hlavních metod používaných pro analýzu cereálních bílkovin. Lze sem zařadit elektroforézu v polyakrylamidovém gelu s dodecyl sulfátem sodným (SDS-PAGE), elektroforézu v kyselém prostředí (acid-PAGE), izoelektrickou fokusaci (IEF), kapilární zónovou elektroforézu (CZE) a vysoko účinnou dvourozměrnou HPLC-HPCE. Chromatografické metody pro separaci a stanovení proteinů byly vyvinuty metody jako HPLC, SE-HPLC, RP-HPLC založené na reverzní fázi, a HPLC na iontoměničích. Provedení těmito metodami je značně nespecifické, ale podává cenné informace o rozdělení prolaminů do jednotlivých podskupin a informace o vlastnostech těchto frakcí. Dále se využívají tyto techniky k přípravě lépe definovatelných skupin proteinů a k jejich přečištění. Hmotnostní spektrometrie, při níž se bílkoviny ionizují dusíkovým laserem ve vhodné nízkomolekulární matici, která zabraňuje rozpadnutí makromolekul. Měří se doba letů iontů k detektoru v trubici bez elektrického pole, která je úměrná poměru jejich hmotnosti ku jejich náboji. Metoda v tomto provedení slouží k určení známých peptidů, její nevýhoda je vysoká přístrojová a finanční náročnost. Infračervená spektroskopie v cereálním oboru přinesla úspěšné výsledky při sledování kvalitativních ukazatelů. Její použití je výhodné pro velké série měření, protože se jedná o rychlou techniku se schopností odhadnout velký počet parametrů z jednoho měření konkrétního vzorku. Další výhodou je, že pro analýzu stačí menší množství vzorku. Jediná zkouška může stanovit nejvýznamnější složky mouky. Hodnocení vzorků mouk klasickými přímými metodami neposkytuje výsledky v dostatečně krátké době [35].

### 5.1 Vysoko účinná kapalinová chromatografie

HPLC (High performance liquid chromatography) je jednou z chromatografických separačních metod. HPLC používá kapalinový čerpací systém, který přesně dodá rozpouštědlo do kolony plné 1,5 až 10  $\mu\text{m}$  částic se specificky vázanou chemickou fází. Konečným výsledkem je schopnost oddělit složité směsi během několika minut. Patří mezi často používané metody pro charakterizaci bílkovin. Pro separaci lepkových monomerních bílkovin se používají dva módy HPLC. RP-HPLC neboli vysoko účinná kapalinová chromatografie s reverzní fází. Metoda byla takto pojmenována protože, pracuje s obrácenými fázemi. Velmi často se používá pro lepkovou proteinovou analýzu.

Výsledky jsou rovny nebo jsou vyšší než u většiny dalších metod. Metoda je rychlá, reprodukovatelná, citlivá, kvantifikovatelná a má dobré využití.

Při analýze gliadinů se používají kolony C4, C8, nebo C18. Připraví se vzorek, který se extrahuje dle postupu uvedeného v předchozí kapitole. Extrahovaný vzorek 5–50  $\mu\text{l}$  se dávkuje do HPLC systému. Propírání probíhá při 70 °C a 1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  s více kroky přechodu začínající na 25 % B, do 35 % B po 3 minuty, do 53 % B 25 minut do 75 % B 26 minut a zůstane na 75 % B 3 minuty a znovu se opakuje počáteční podmínka, 25 % B. Uvede se do rovnováhy počátečními podmínkami po dobu 10 minut. Rozpouštědlo A 0,1% TFA ve vodě, B 0,1% TFA v acetonitrilu. Detektor zaznamenává absorbanci 200, 210, 220, 254 a 280 nm (preferováno je 210 nm). Frakce gliadinů jsou eluovány v následující pořadí omega, alpha-beta a nakonec gama. Postup při analýze je stejný, pouze se liší podmínkami extrakce [35]

## 5.2 Iontově výměnná chromatografie

Před HPLC, iontově výměnná chromatografie (IEC) s celulózovou kolonou nabízela nejlepší chromatografickou separaci obilných proteinů. Dnes již zaostává za SE-HPLC a RP-HPLC. Mezi problémy IE-HPLC (Ion exchange-HPLC) patří reprodukovatelnost, a také bylo zaznamenáno, že se kolony stejného typu mohou lišit, předejít tomuto problému můžeme nákupem více kolon se stejnou šarží. Pro používaná činidla je nanejvýše důležitá jejich čistota. Jako stacionární fáze v iontově výměnné chromatografii je měnič iontů. Tím je makromolekulární matice (celulóza, polystyren, dextran) s vhodnými funkčními skupinami kyselé nebo zásadité povahy. Iontoměniče se dělí na anexy a katexy. Anexy slouží k výměně aniontů, jejich funkční skupiny jsou zásadité (aminoskupiny). Katexy slouží k výměně kationtů, jejich funkční skupiny jsou kyselé (sulfoskupiny, karboxylové skupiny). Standardní postup analýzy bílkovin pomocí IE-HPLC je následující. Používá se latexová kolona, Vydac PROT-SCX kolona (0,75x5cm), její použití je obzvlášť dobré. Vzorky se připraví extrakcí, která je popsána v kapitole 3.8. Po extrakci se dávkuje 5–10  $\mu\text{l}$  do HPLC systému. Propírání probíhá při teplotě 44 °C a 1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  s přechodem z 0 % NaCl (A) do 0,25M roztoku soli (B) přes 50 minut. Rozpouštědlo A 0,5 % TFA ve vodním pufru pH 2,5, zahrnuje 30% acetonitril. Rozpouštědlo B 0,5% TFA ve vodním pufru pH 2,5 zahrnuje 0,25M NaCl a 30% acetonitril [17], [35].

### 5.3 Vysoko účinná kapilární elektroforéza

HPCE (High Performance Capillary Electrophoresis) je především vhodná pro stanovení lepkových proteinů, protože jsou schopny tvořit viskózní elastické těsto. Díky jejich jedinečné schopnosti byly lepkové bílkoviny intenzivně studovány řadou analytických technik. HPCE se skládá ze dvou nádobek s elektrolytem (katolyt a anolyt), které jsou spojeny úzkou křemennou trubičkou (kapilárou), v níž je elektrolyt. Kapilára má obvykle vnější průměr 360  $\mu\text{m}$  a vnitřní průměr (dutinka) 50-100  $\mu\text{m}$ . V každé nádobce je elektroda (katoda a anoda) a mezi elektrody je vkládáno vysoké napětí, které dosahuje řádu desítek tisíc voltů. Kapilární elektroforéza je výhodná zejména pro malé objemy elektrolytů a vzorků, rychlejší analýzy, snadnější udržování teploty a možnost sledovat jak anionty, tak kationty.

Deska gelové elektroforézy může pracovat s několika metodami. Pro separaci pšeničných proteinů byly vyvinuty dva režimy. První režim je volná oblast kapilární elektroforézy (FZCE), a dodecyl sulfát sodný kapilární elektroforézy (SDS-CE) [35].

**Free zone capillary electrophoresis (FZCE)** je jednoduchý ale často používaný režim HPCE. Kapiláry jsou jednoduše plněné s odděleným pufrem a proteiny jsou odděleny podle jejich odlišné hustoty náboje. Mnoho úspěšných separací pšeničných proteinů pomocí FZCE bylo provedeno s kyselým pH. Tato technika je analogická k separaci pšeničných bílkovin pomocí A-PAGE (Acid Polyacrylamide gel electrophoresis) kyselé polyakrylamidové gelové elektroforézy. V FZCE se kapiláry promývají jednou nebo vícekrát plněným pufrem. Po správném opláchnutí kapiláry se vzorek zavede do kapiláry, typicky tlakovou injekcí, ale může být použit i jiný způsob. Na konci kapiláry se vloží lahvičky s pufrem a zapne se napětí. Dojde k vytvoření elektrického pole uvnitř kapiláry. Proteiny se stěhují k příslušné elektrodě. Jak již bylo zmíněno mnoho separací lepkových proteinů pomocí FZCE, může být provedeno v kyselém pH, kde si proteiny nesou výsledný pozitivní náboj. Takto během FZCE separované proteiny migrují směrem ke katodě. Při FZCE jsou proteiny typicky detekovány pomocí UV světla. Toho je dosaženo tím, že světlo svítí přes malou část kapiláry a odebírá ochranný povlak polyamidu. Detektivní okno je umístěno blízko jednoho konce kapiláry. Za účelem detekování proteinů, musí skutečně projít částí obsahující detekční okno. Kromě UV detektoru, může být použito mnoho jiných typů detekce, například hmotnostní spektrometrie, laserem indukovaná fluorescence [35].

V reakci na tlak trhu a spotřebitelské preference se neustále vyvíjí kritéria na kvalitu pšenice. Charakteristika pšeničných odrůd a agronomické vlastnosti obecně poukazují na význam obsahu bílkovin k zajištění dobré kvality výrobků. Cílem práce Bonettiho a jeho kolektivu bylo porovnání RP-HPLC a FZCE v identifikaci italských odrůd pšenice a odhalování falšování tvrdé pšeničné mouky. V alkoholu rozpustné gliadiny a ve vodě rozpustné albuminy byly získány od 14 odrůd pšenice a 9 odrůd pšenice tvrdé. V RP-HPLC chromatogramu byly pšeničné albuminy a gliadiny vymývány mezi 3 a 9 minutami a mezi 10–42 minutami. I když zvolené chromatografické podmínky obrácenou fází neumožňovaly úplné řešení hydrofilních bílkovin, jako jsou albuminy, byla pozorována velmi dobrá reprodukovatelnost u obou frakcí albuminů a gliadinů. V FZCE chromatogramu, pšeničné albuminy a gliadiny migrovaly mezi 8 a 14 minutami a 16–25 minutami. Velmi dobrá reprodukovatelnost byla zjištěna u pšeničných albuminů, zatímco u frakce gliadinu byla reprodukovatelnost špatná v důsledku vybraných podmínek, jejichž cílem bylo zároveň oddělit albuminy i gliadiny. Z obou analýz vyplynulo, že techniky umožňují jednoznačnou identifikaci z velké části pšeničných odrůd. Tři píky byly zjištěny v RP-HPLC chromatogramu pšeničných odrůd, zatímco tři unikátní píky byly nalezeny v FZCE chromatogramu pšeničných odrůd. Tyto vrcholy byly zkoumány jako základ pro detekci a odhad falšování mouky a mouky z pšenice tvrdé. Přímý vztah mezi plochou píků a úrovní falšování umožnil zkonstruovat standardní křivky. Standardní křivky ukázaly, že falšování lze kvantifikovat buď v RP-HPLC nebo FZCE [45].

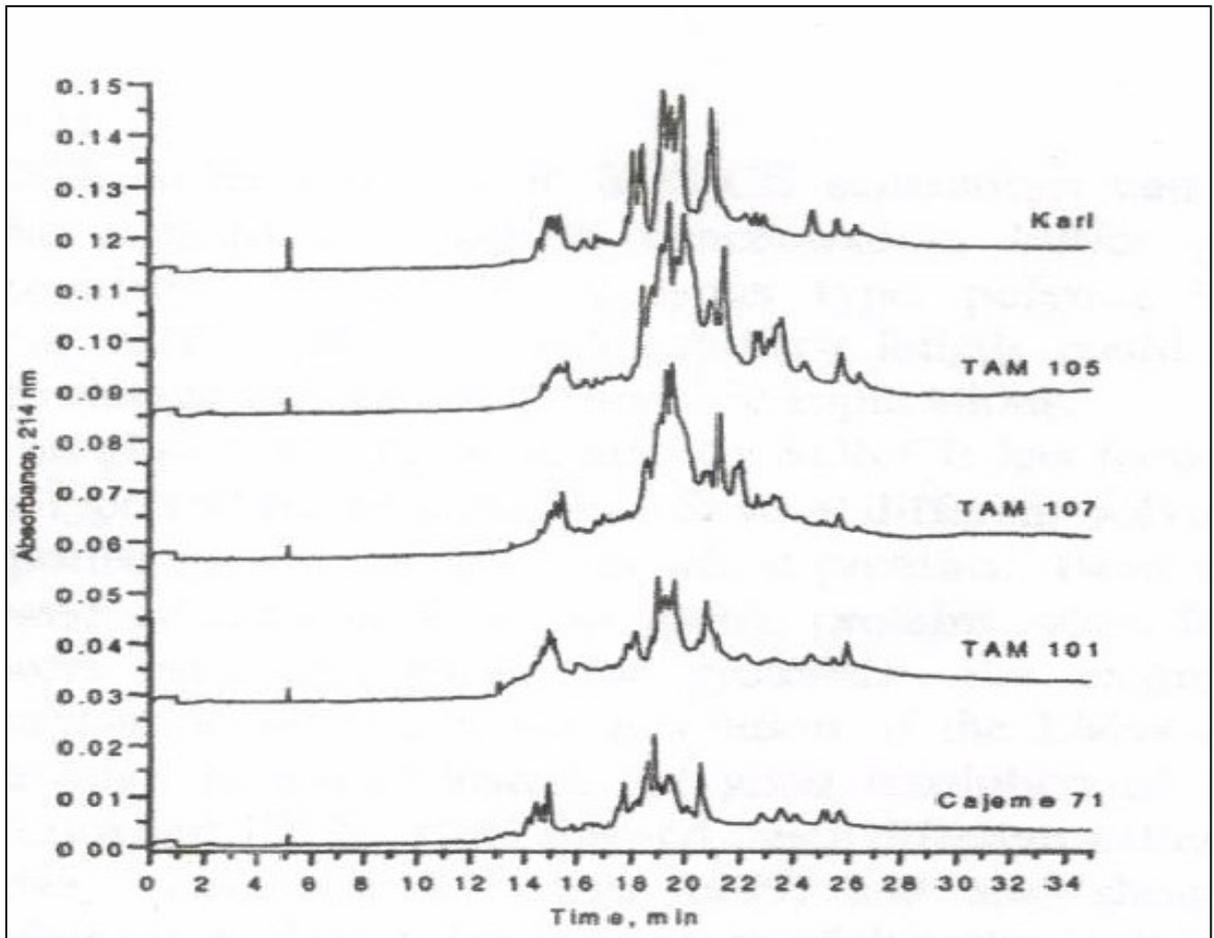
#### **5.4 Kapilární elektroforéza dodechl sulfátem sodným**

Zatímco FZCE produkuje separace, které mohou být obdobné A-PAGE, SDS-kapilární elektroforéza (SDS-CE) produkuje separace obdobné SDS-polyakrylamidové gelové elektroforézi (SDS-PAGE), separaci založené na velikosti. Ve skutečnosti první SDS-CE separace jednoduše využila kapiláry s polyakrylamidovým gelem polymerovaným uvnitř kapiláry. Problémy s touto metodou vedly k novým metodám používající vyměnitelné roztoky polymerů. Na rozdíl od pevných gelů, tyto polymerní roztoky mohou být čerpány přes kapiláru po každé separaci. Proteinové-SDS komplexy jsou separovány podle velikosti nebo podle „prosetí“ toho jak se pohybují přes polymerní matrice v kapiláře. Polymerní matrice lze pak vyprázdnit z kapiláry a čerstvé matrice lze zavést pro další separaci [46], [47].

SDS-CE separace jsou typicky prováděny v neutrálním nebo zásaditém pH, kde jsou stěny kapiláry záporně nabitě. To představuje některé problémy jako zvyšující se tok elektroendoosmózy (EOF) a zvyšující pH. EOF je velikost průtoku kapaliny uvnitř kapiláry, který je způsoben nábojem na vnitřním povrchu kapiláry. EOF je obecně považováno za škodlivé pro HPCE separaci, protože je obtížné reprodukovat velikost toku mezi separacemi. Aby se předešlo problémům EOF v SDS-CE separaci, používají se trvale potažené kapiláry. V SDS-CE systému separace lepkových proteinů byly použity stejné polymery, které se váží na kapilární stěny a snižují EOF. Všechny činidla používané v SDS-CE separaci musí být v nejvyšší možné čistotě [48], [49].

Vzorky byly získány extrakcí, která je popsána v kapitole 4.6, jsou separovány při 8 kV a 30 °C. Napětí by mělo být zvyšováno pozvolna, z důvodu zlepšení účinnosti separace. Vzorky jsou injekčně dávkovány pomocí tlaku 15–45 sekund v závislosti na koncentraci vzorku. Čas musí být optimalizován a vyvážen s koncentrací vzorků pro optimální reprodukovatelnost. Pokud je to možné, je třeba se vyhnout napětí injekce, aby se zabránilo ovlivnění množství vzorku injekčně [50].

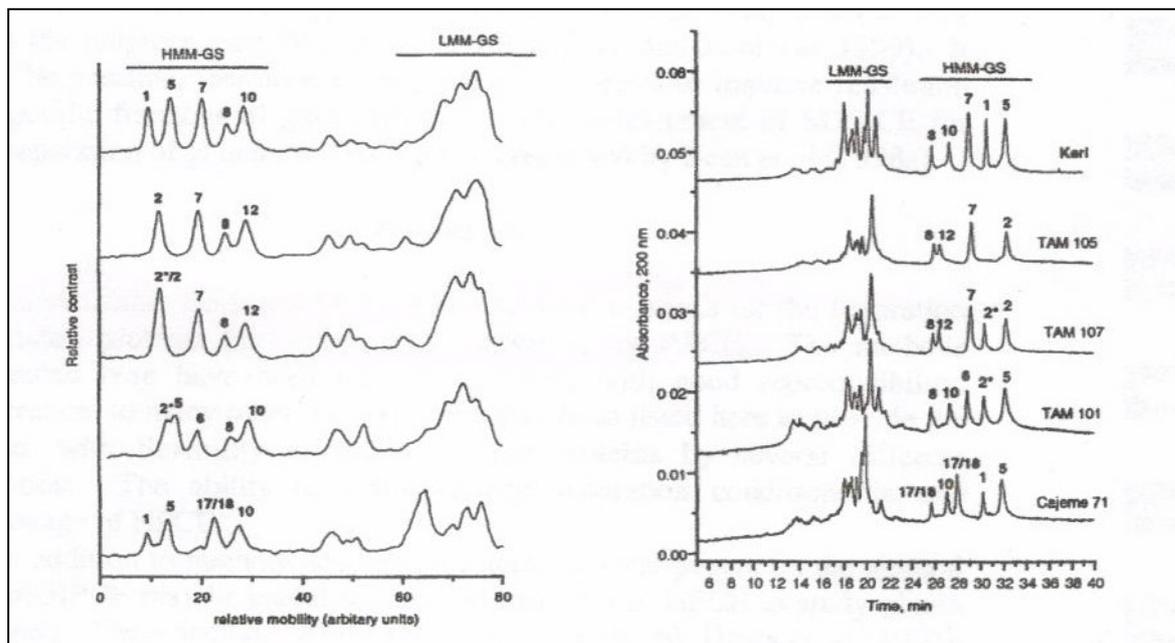
SDS-CE může být použita k odlišení odrůdy na základě gliadinové separace. Obrázek 14 ukazuje separaci gliadinů z pěti různých pšeničných odrůd. Lze si všimnout, že každá odrůda ukazuje zřetelný profil, i když rozlišení je mnohem nižší než získané FZCE pro gliadiny [49].



**Obr. 14** Separace gliadinů z pěti odlišných pšeničných odrůd  
v BioRad/ED SDS-CE systému [49]

Většina prací separací lepkových bílkovin pomocí SDS-CE je zaměřena na HMW-GS, buď jako součást gluteninové frakce nebo připravené selektivním srážením. Separace HMW-GS používající BioRad/EG SDS-CE systém je zobrazena na obrázku 14. Pro srovnání jsou uvedeny profily stejných vzorků separovaných SDS-PAGE analýzou. Jak lze vidět na obrázku 15, pořadí migrace HMW-GS v SDS-CE se liší od toho v SDS-PAGE [51].

Obrázek 15 ukazuje, že SDS-CE rozloží všechny alelické formy HMW-GS od sebe navzájem v každé odrůdě [52].



**Obr. 15** Separace gluteninů z odlišných pšeničných odrůd analýzou SDS-CE (vlevo) a pomocí SDS-PAGE (vpravo) [52]

## 5.5 Frakcionace tokem v poli

Field-flow frakcionace (FFF) je relativně nová skupina flexibilních elučních technik schopných současné separace a charakterizace analytů. Rozsah velikostí látek, které jsou analyzovány pomocí FFF, je od jednotek nanometrů do stovek mikrometrů a zahrnuje látky biologického, syntetického a anorganického původu, které mají velký význam v průmyslu, ekologii a biomedicíně. FFF lze použít k frakcionaci proteinů a proteinových komplexů k zjištění jejich velikostních vlastností. Tato technika je speciálně vhodná pro větší proteiny nebo komplexy na rozdíl od SEC metody, velikost vyloučení je skutečně neomezená. Struktura makromolekul citlivá na smyku může být zachována, protože frakcionace FFF nastává v nepřítomnosti pevného nosiče. Průtokové FFF kanály a související zařízení stejně jako techniky se liší. Pro frakcionaci pšeničných proteinů byly vyvinuty automatizované symetrické průtokové FFF techniky. Symetrické kanály zahrnují dvě plexisklové desky s vloženými porézními frity oddělených 100-500 $\mu$  obdélníkovými vložkami, zakončené tenkými kanálky [53].

FFF je založena na současném působení laminárního toku nosné kapaliny uvnitř separačního kanálu a externího fyzikálního pole (působícího kolmo na směr toku) na analyzované látky. Z toho vyplývá že FFF kombinuje prvky elučních metod a metod založených na působení externích silových polí.

Působení fyzikálních polí ve FFF, které ji odlišuje od chromatografie, je nekonvenční, jelikož použitá pole nezpůsobují separaci přímo, ale svým působením vyvolávají pohyb složek vzorku do různých proudnic laminárního toku nosné kapaliny. Nestejné rychlosti proudnic způsobují rozdílnou migraci složek analyzovaného vzorku a tím jejich separaci, která probíhá v podélném směru kanálu, tedy kolmo na směr působení polí. Tato vzájemná kolmá orientace směru působení pole a směru separace odlišuje FFF od klasických metod založených na působení polí. Protože geometrie separačního kanálu a rychlostní profil toku nosné kapaliny jsou ve FFF dobře definovány, mohou být vlastnosti analyzovaných látek poměrně přesně vypočteny z teoretických vztahů pro retenční poměr na základě experimentálně změřených elučních časů. Změnami silového pole lze rychle dosáhnout změn elučních časů a tak lze flexibilně ovlivňovat retenci různých analytů a využívat programování pole pro optimalizaci separace. Výhodou FFF ve srovnání s chromatografií (obě metody využívají skoro stejné experimentální zařízení, pouze chromatografická kolona je nahrazena separačním kanálem a jeho příslušenstvím) je mnohem menší mezifázový povrch mezi stacionární a mobilní fází. To je významné zejména pro analýzu makromolekul a částic, neboť tyto druhy analytů jsou zpravidla povrchově aktivní a velmi často se adsorbují na různé povrchy nebo s nimi reagují [53].

Významnou výhodou FFF je flexibilita jejich technik, kterou užívané chromatografické metody nemají. Na druhou stranu většina polí není tak selektivní jako chromatografické fáze a ani není dostatečně silná, aby byla schopna účinně zadržet nízkomolekulární látky. Z toho vyplývá že FFF je vhodnější pro separaci a charakterizaci vysokomolekulárních látek a částic, zatímco chromatografie je dominantní pro analýzu nízkomolekulárních látek (ale existuje celá řada velmi důležitých aplikací chromatografií pro separaci makromolekul) [53].

Stevenson a jeho kolektiv [54] oznámili první automatickou symetrickou průtokovou FFF metodu a použili ji ve studii pšeničných a dalších proteinů. Kromě automatiky, byla značně zvýšena citlivost díky fritovému vývodu koncentrace vzorku a výchozí šum byl snížen, tím že nahradil zastavení toku uvolněním vstupní frity hydrodynamického uvolnění od recirkulační frity a příčného toku [54].

Tato metoda má za následek zlepšení rozlišení pšeničných bílkovinných frakcí, přesnější odhady elučních časů pro stanovení velikosti složek a mnohem přesnější integrace ploch píků pro kvantifikaci.

## ZÁVĚR

Pšeničné bílkoviny hrají významnou roli ve výživě člověka. Množství a složení bílkovin rozhoduje o vlastnostech mouky. Mouka, která obsahuje pod 11,5 % bílkovin je spíše vhodná pro výrobu cukrářského pečiva a sušenek. Tuto mouku nazýváme jako slabou. Mouka, která obsahuje více jak 11,5 % bílkovin, neboli silná mouka, je využívána pro výrobu kynutého pečiva. Silné mouky vytvoří tuhé těsto, které dobře zadržuje vzduch a oxid uhličitý, který je vytvářen kvasinkami. Tímto poskytuje objemnější výrobky. U pšeničných bílkovin jsou nejvíce sledovány gluteliny a gliadiny, které tvoří pružný gel-lepek. Lepek má zásadní vliv na využití pšenice v potravinářství a do značné míry předurčuje vlastnosti těsta. Gliadiny jsou nositelem tažnosti a glutininy poskytují lepku pružnost a bobtnavost. Kvalitu mouky určuje vzájemný poměr těchto frakcí.

Při stanovování pšeničných bílkovin, musíme nejprve jednotlivé frakce extrahovat. Extrakci je nutné provádět co nejjednodušeji, protože při každém kroku dochází ke ztrátě proteinů. Extrakci pšeničných bílkovin lze provádět dvěma způsoby a to buď TCA/acetanovou extrakcí nebo fenolovou extrakcí. Jedna z nejdéle používaných metod charakterizace bílkovin je frakcionace z pohledu odlišné rozpustnosti albuminů, globulinů, prolaminů a glutelinů. Tato metoda byla navržena Osbornem na začátku minulého století a je založena na postupné separaci bílkovin podle jejich odlišné rozpustnosti. K nejčastěji používaným metodám pro analýzu cereálních bílkovin jsou elektroforetické, chromatografické metody, hmotnostní a NIR spektrometrií.

V roce 1997 byla vyvinuta nová separační technika UPLC v oblasti kapalinové chromatografie. Extrémně účinná kapalinová chromatografie oproti HPLC používá vysokotlaké pumpy, které umožňují provozovat kolony s velmi malými částicemi stacionární fáze. UPLC poskytuje rychlejší analýzu a lepší rozlišení. Používá menší množství rozpouštědel, které jsou méně cenná jako acetonitril a tím snižuje náklady a šetří životní prostředí. Bohužel má také svou nevýhodu a tou je pořizovací cena, která je vyšší.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin I*, 2.vyd. Tábor: Osis, 2002. 344 s. ISBN 80-86659-00-3.
- [2] KVASNIČKOVÁ, A. *Alergie z potravin*, Praha: ÚZPI, 1998. 60 s. ISBN 80-85120-93-3.
- [3] HULÍN, P., DOSTÁLEK, P., HOCHÉL, I. Metody stanovení lepkových bílkovin v potravinách. *Chemické listy* 102, 2008, s. 327–337.
- [4] PEČVOVÁ, P. Vliv definovaných přídatných látek na pekárenské vlastnosti pšeničného těsta. *Diplomová práce*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 2009, Zlín, 120 s.
- [5] PŘÍHODA, J., SKŘIVAN, P., HRUŠKOVÁ, M. *Cereální chemie a technologie I*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2003. 202 s, ISBN 80-7080-530-7.
- [6] STRAUB, F. B., *Biochemie*, 1. vyd., Praha: Československá akademie věd, 1962. 636 s.
- [7] KARLSON, P., *Základy biochemie*, 3. vyd., Praha: Československá akademie věd, 1981. 504 s, ISBN 104-21-852.
- [8] KUČEROVÁ, J. *Technologie cereálií*, 1. vyd., Brno: MZLU, 141 s, ISBN 978 -80-7157-811- 6.
- [9] KUKTAITE, R. Protein quality in wheat:Changes in Protein Polymer Composition during Grain Development and Dough Processing. *Doktorská disertační práce*, Swedish University of Agricultural Sciences in Alnarp, 2004, 44 s, ISSN 1401-6249, ISBN 91-576-6778-0.
- [10] STERM, M., CICLITIRA, P. J., FEIGHERY, C., et all. Analysis and clinical effects of gluten in coeliac disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2001, 13, s. 741–747.
- [11] YADA, R. Y. *Proteins in Food Processing*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge 2004, 686 s, ISBN: 185573723X.
- [12] PRUGAR, J., *Nutriční hodnota obilovin a jejich význam v lidské výživě. Výživa a potravin*. 1999. 54, s. 22–23.
- [13] *Pšeničný lepek* [online]. [cit. 8. 3. 2011]. Obrázek dostupný z <http://www.landfood.ubc.ca/courses/fnh/301/protein/protq4.htm>.

- [14] MACNAIR, J. E., LEWIS, K. C., JORGENSON, J. W. Ultra high pressure reverse-phase liquid chromatography in packed capillary columns. *Analytical chemistry*. 1997, 69, s. 983–989.
- [15] UPLC [online]. [cit. 8. 3. 2011]. Dostupné z <http://www.hplc.cz/>
- [16] *Chromatografie* [online]. [cit. 14. 3. 2011]. Dostupné z [http://chemie.ocikvideni.cz/ZS/11\\_chromatografie.pdf](http://chemie.ocikvideni.cz/ZS/11_chromatografie.pdf).
- [17] KLOUDA, P., *Moderní analytické metody*. Klouda, Ostrava, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [18] HAVLIŠ, J. *Separční metody A, studijní materiály k přednáškám*. Masarykova Univerzita, Brno.
- [19] *Schéma kapalinového chromatografu*. [online]. [cit. 12. 3. 2011].  
Obrázek dostupný z <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>.
- [20] *Pístové čerpadlo*. detektor [online]. [cit. 12. 3. 2011]. Dostupné z [http://cs.wikipedia.org/wiki/Pístové\\_čerpadlo](http://cs.wikipedia.org/wiki/Pístové_čerpadlo).
- [21] *Kolona UPLC* detektor [online]. [cit. 14. 3. 2011]. Dostupné z <http://chromservis.cz/item/uplc-columns-grace-visionht>.
- [22] *Stacionární fáze UPLC*. detektor [online]. [cit. 14. 3. 2011]. Dostupné z <http://www.separationsnow.com/coi/cda/detail.cda?id=13400&type=Feature&chId=4&page=1>.
- [23] Innovative Technologies From the Leaders in Separation Science and Analytical Biochemistry detektor [online]. [cit. 29. 4. 2011]. Dostupné [www.waters.com](http://www.waters.com).
- [24] Fluorescenční (fotometrický) detektor [online]. [cit. 14. 3. 2011]. Obrázek dostupný z <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>.
- [25] *Hmotnostní spektrofotometrie*. [online]. [cit. 14. 3. 2011]. Dostupné z <http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/java/massspectra/index.html>.
- [26] Schéma hmotnostního spektrometru na principu MALDI-TOF [online].  
[cit. 14. 3. 2011]. Obrázek dostupný z <http://biomikro.vscht.cz/maldiman/cz/theory/basics.php> html.
- [27] Protein Isolation and Characterization. Protein Isolations and Analysis. [online]. [cit. 29. 4. 2011]. Dostupné z [www.waters.com](http://www.waters.com) html.
- [28] Peptide Separation Technology: Quantitative Aspects of UPLC Peptide mapping. [online]. [cit. 29. 4. 2011]. Dostupné z [www.waters.com](http://www.waters.com)

- [29] Peptide separation technology. [online]. [cit. 29. 4. 2011]. Dostupné z [www.waters.com/biosept](http://www.waters.com/biosept).
- [30] DAMERVAL, C., DEVINNE, D., ZIVY, M., THIELLEMENT, H. Technical improvements in two dimensional electrophoresis increase the level of genetic-variation detected in wheat seedling proteins. *Electrophoresis*, 1986, 7, s. 52–54.
- [31] WANG, W., SCALI, M., VIGNANI, R., SPADAFORA, A., SENSI, E., MAZZUCA, S., CRESTI, M. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis*, 2003, 24, s. 2369–2375.
- [32] HURKMAN, W. J., TANAKA, C. K. Solubilization of plant membrane-proteins for analysis by two dimensional gel-electrophoresis. *Plant Physiol*, 1986, 81, s. 802–806.
- [33] WANG, W., TAI, F. J., CHEN, S. N. Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. *Journal of Separation Science*, 2008, 31, s. 2032–2039.
- [34] DVOŘÁČEK, V. *Optimalizace Osbornovy metody kvantifikace bílkovinných frakcí zrna pšenice ozimé*. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha, 2006, 8 s, ISBN: 80-86555-81-X.
- [35] SHEWRY, R. P., LOOKHART, L., G. *Wheat gluten protein analysis*, American Association of Cereal Chemists, Minnesota, 2003. 198 s, ISBN: 1-891127-32-2.
- [36] Osborne T. B.: Carnegie Ins. 1907
- [37] MOSSE, J., BAUDET, J. Conditions of aqueous extraction of water-soluble flour proteins. *Wheat chemistry and technology I*. AACC, Minnesota, 1963, s. 167–168.
- [38] HUEBNER, F. R., BIETZ, J. A. Detection of quality differences among wheats by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 1985, 327, s. 333–342.
- [39] LARROQUE, O. R., BÉKÉS, F. Rapid size-exclusion chromatography analysis of molecular size distribution for wheat endosperm protein. *Cereal chemistry*. 2000, 77, s. 451–453.
- [40] SINGH, N. K., et al. Use of sonification 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 Science*. 1990, 67, s. 150–161

- [41] GUPTA, R. B. et al. Biochemical basis 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.
- [42] UENO, T. et al. Simplified dilute acetic acid based extraction procedure for fractionation and analysis of wheat flour protein by size exclusion HPLC and flow-field-flow fractionation. *Cereal Chemistry*. 2002, 79, s. 155–161.
- [43] STEVENSON, S. G., PRESTON, K. R. Flow field-flow fractionation of wheat proteins. *Journal of Cereal Science*. 1996, 23, s. 121–131.
- [44] LARROQUE, O. R. et al. Assessing the unaltered molecular size distribution of wheat polymeric protein. *Cereal chemistry Division*. 1999, 99, s. 182–186.
- [45] BONETTI, A et al. Compared use of HPLC and FZCE for cluster analysis of triticum spp and for the identification of T. durum adulteration. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2004, 52, s. 4080–4089.
- [46] COHEN, A. S. KARGER, B.L. High-performance sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel capillary electrophoresis of peptides and proteins. *Journal of Chromatography*. 1987, 26, s. 409–417.
- [47] WEHR, T., et al. Capillary Electrophoresis of Proteins. Marcel Dekkar, New York. 1999.
- [48] WERNER, W. E et al. Wheat varietal identification by capillary electrophoresis of gliadins and high molecular weight glutenin subunits. *Cereal Chemistry*. 1994, 71, s. 397–402
- [49] BEEN, S. R., LOOKHART, G. L. SDS-CE separation of wheat protein. I. Uncoated capillaries. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1999, 47, s. 4246–4255.
- [50] BEEN, S. R., LOOKHART, G. L. Optimizing quantitative reproducibility in HPCE separation of cereal proteins. *Cereal chemistry*. 2001, 78, s. 530–537.
- [51] BEEN, S. R. et al. High performance capillary electrophoresis of cereal proteins. *Journal of Chromatography*. 1998, 812, s. 25–41.
- [52] ZHU, J., KHAN, K. Separation and quantification of HMW glutenin subunits by capillary electrophoresis. *Cereal Chemistry*. 2001, 78, s. 737–742.
- [53] CHMELÍK, J. Využití Field-Flow frakcionace pro měření vlastností makromolekul a částic. *Chemické listy*. 1999, 93, s. 670–677.

- [54] STEVENSON, S. G., UENO, T., PRESTON, K., R. Automated frit inlet/frit outlet flow field-flow fractionation for protein characterization with emphasis on polymeric beat proteins. *Analytical of Chemistry*. 1999, 71, s. 8–14.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

UPLC	Ultra účinná kapalinová chromatografie
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie
kDa	kilo Dalton ( Jednotka atomové hmotností)
HMW-GS	Vysoce molární gluteninové podjednotky
LMW-GS	Vysoce molární gluteninové podjednotky
PSI	Jednotka tlaku (libra síly na čtverečný palec)
Bar	Jednotka tlaku
BEH	Etylenový hybridní můstek
EAA	Esenciální aminokyseliny
AA	Aminokyseliny
EAAI	Index esenciální aminokyseliny
AAS	Aminokyselinové skóre
MPa	Jednotka tlaku
UV/VIS	Ultra fialová viditelná spektroskopie
m/z	Poměr rozdělení iontů
MS	Hmotnostní spektrometr
IE	Iontová výměna
SE-HPLC	Molekulárně vylučovací HPLC
RP	Reverzní fáze
mABs	Monoklonární protilátky
LC/MS	Kapalinová chromatografie/Hmotnostní spektrometrie
TFA	Trifluoroctová kyselina
FA	Kyselina felurová
SFE	Nadkritická fluidní extrakce

ESI/MS	Ionizace elektrosprejem hmotnostní spektrometrie
FTIR	Mobilní analyzátor s příslušenstvím
SPE	Extrakce pevnou fází
SDS	Dodecyl sulfát sodný
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecyl sulfátem sodným
HPCE	Vysoko účinná kapilární elektroforéza
FFF	Frakcionace tokem v poli
$d_s$	Stokesův poloměr
HCl	Kyselina chlorovodíková
FZCE	Volná zónová kapilární elektroforéza
KCl	Chlorid draselný
EDTA	Kyselina etylendiamintetraoctová
DTT	Dithiotreitol
BME	Merkaptoetanol
SDS-CE	Kapilární elektroforéza dodechl sulfátem sodným
SE-HPLC	Velikost vyloučení vysoko účinné kapalinové chromatografie
RP-HPLC	Reverzní fáze vysoko účinné kapalinové chromatografie
IE-HPLC	Iontově výměnná vysoko účinná kapalinová chromatografie
NaOH	Hydroxid sodný
NaCl	Chlorid sodný
A-PAGE	Kyselá polyakrylamidová gelová elektroforéza
IEF	Izoelektrická fokusace
CZE	Kapilární elektroforéza
SDS-CE	Kapilární elektroforéza dodechl sulfátem sodným
HPLC-HPCE	Vysoko účinná kapalinová dvourozměrná chromatografie
RP-HPLC	Reverzní fáze vysoko účinné kapalinové chromatografie

B	Přídavné rozpouštědlo
A	Extrahovaná složka
EOF	Tok elektroendoosmózy
EG	Etylen glykol
ACN	Acetonitril

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

<b>Obr. 1</b> Schéma struktury gliadinu [8].....	15
<b>Obr. 2</b> Schéma struktury gluteninu [8].....	16
<b>Obr. 3</b> Pšeničný (lepek, gluten) [13] .....	18
<b>Obr. 4</b> Schéma kapalinového chromatografu [19] .....	20
<b>Obr. 5</b> Kolona UPLC [21].....	21
<b>Obr. 6</b> Stacionární fáze UPLC [22] .....	22
<b>Obr. 7</b> Umístění etylenových můstků v matrici silikagelového nosiče [15].....	24
<b>Obr. 8</b> Vliv lineární rychlosti mobilní fáze na výškový ekvivalent teoretického patra v závislosti na velikosti sorbentu [15].....	24
<b>Obr. 9</b> Vliv velikost částic na účinnost separačního procesu [15] .....	25
<b>Obr. 10</b> Detektor s diodovým polem [17].....	26
<b>Obr. 11</b> Fluorescenční (fluorometrický) detektor [24].....	27
<b>Obr. 12</b> Schéma hmotnostního spektrometru na principu MALDI-TOF [26].....	28
<b>Obr. 13</b> SE-HPLC totální separace, extrahovatelných a neextrahovatelných proteinů z mouky pomocí Waters Protein Pak -300 SEC kolony [41] .....	36
<b>Obr. 14</b> Separace gliadinů z pěti odlišných pšeničných odrůd .....	52
<b>Obr. 15</b> Separace gluteninů z odlišných pšeničných odrůd analýzou SDS-CE (vlevo) a pomocí SDS-PAGE (vpravo) [52].....	53

**SEZNAM TABULEK**

<b>Tab. 1</b> Obsah aminokyselin v cereáliích a pseudocereáliích (v g vztaženo na 16g N) [1].....	17
<b>Tab. 2</b> Přehled detektorů [18].....	26
<b>Tab. 3</b> Frakcionace bílkovin u dvou odlišných navážek u pšenice seté [34].....	42
<b>Tab. 4</b> Separace gliadinů (etanolová frakce) a gluteninů (frakce NaOH) při odlišných koncentracích rozpouštědel [34].....	43
<b>Tab. 5</b> Celkový součet bílkovinných frakcí u 3. Stupně promývání a celková suma vyextrahované bílkoviny u jednotlivých kategorií šrotu [34].....	45
<b>Tab. 6</b> Optimalizovaná Osbornova metoda frakcionace bílkovin [34].....	46