

Studium vztahu mikrostruktury pšeničného lepku a kvantitativního zastoupení lepkových proteinů

Bc. Marek Dvořák

Diplomová práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Marek Dvořák**
Osobní číslo: **T11100**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Studium vztahu mikrostruktury pšeničného lepku a kvantitativního zastoupení lepkových proteinů**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Pšeničná mouka a její bílkoviny
2. Metody studia kvality lepku

II. Praktická část:

1. Separace pšeničných bílkovin
2. Mikrostruktura lepku
3. Porovnání získaných dat s pekařskou kvalitou lepku

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] KADLEC, P., MELZOCH, K., VOLDŘICH, M., Co byste měli vědět o výrobě potravin?:
Technologie potravin. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2010, 536 s. ISBN
978-80-7418-051-4.

[2] HAJŠLOVÁ, J.; VELÍŠEK, J.; Chemie potravin I.; vyd. 3.; OSSIS; Tábor; 2009; 602 s.;
ISBN 978-80-86659-15-2.

[3] PŘÍHODA J., HUMPOLÍKOVÁ P., NOVOTNÁ D.; Základy pekárenské technologie; 1.
vydání; Pekař a cukrář s.r.o.; Praha; 2003; 363 s.; ISBN 80 902922 1-6.

[4] POMERANZ, Y.; Advances in Cereal Science and Technology; vyd. 8.; American
Association of Cereal Chemists, Inc.; St. Paul, Minnesota; 1986; 364s.

[5] KLOUDA, P., Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda,
2003, 132 s. ISBN 80-86369-07-2.

[6] HOPPERT, M., Microscopic techniques in biotechnology [online]. Weinheim:
Wiley-VCH, 2003.

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Marek Ingr, Ph.D.

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání diplomové práce:

16. ledna 2013

Termín odevzdání diplomové práce:

2. května 2013

Ve Zlíně dne 4. února 2013


doc. Ing. Román Čermák, Ph.D.
děkan




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

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 2. května 2013

Dvořák Marek

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

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

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

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

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

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

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

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-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

Práce se zabývá studiem vzájemných vztahů mezi kvantitativním zastoupením jednotlivých frakcí lepkových proteinů v pšeničné mouce a mikrostrukturou trojrozměrné sítě pšeničného lepku zobrazenou metodou mikroskopie atomárních sil. Získané výsledky jsou porovnány s ukazateli pekařské kvality pšeničné mouky (obsah dusíkatých látek, obsah mokrého lepku, sedimentační index a Gluten index). Kvantitativní zastoupení jednotlivých pšeničných bílkovin je stanoveno gelovou permeační chromatografií a elektroforézou v polyakrylamidovém gelu s docecylsulfátem sodným. Práce se také zabývá metodou přípravy vzorků vysušeného lepku pro mikroskopii AFM a porovnáním snímků mikrostruktury lepků různých vzorků mouky. Dále je také popsána možnost identifikace jednotlivých proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. Byly pozorovány korelace mezi získanými výsledky a vybranými ukazateli pekařské kvality pšeničné mouky, zejména mezi kvantitativním zastoupením jednotlivých proteinových frakcí a sedimentačním indexem, jakož i mezi mikrostrukturou lepku a Gluten indexem.

Klíčová slova: bílkoviny, gelová permeační chromatografie, gliadin, glutenin, Gluten index, hmotnostní spektrometrie, lepek, mikroskopie atomárních sil, mouka, pšenice, SDS-PAGE, sedimentační test

ABSTRACT

The study examines the relationships between the quantitative representation of individual fractions of gluten proteins in wheat flour and the microstructure of three-dimensional network of wheat gluten visualized by atomic force microscopy. The results obtained are compared with the indicators of baking quality of wheat flour (the crude protein content, wet gluten content, Sedimentation Index and Gluten Index). The quantitative representation of wheat proteins is determined by Gel Permeation Chromatography and by Polyacrylamide Gel Electrophoresis with Sodium Dodecylsulfate. The study also deals with the method of preparation of dried-gluten samples for Atomic Force Microscopy and comparing images of gluten microstructure of different samples of wheat flour. The way of identification of individual proteins using Mass Spectrometry is also described. Correlations were observed between the obtained results and selected indicators of baking quality of wheat flour, especially between the quantitative representation of individual protein fractions and the Sedimentation Index, as well as between the gluten microstructure and the Gluten Index.

[In Czech.]

Keywords: Atomic Force Microscopy, flour, Gel Permeation Chromatography, Gliadin, Glutenin, Gluten, Gluten Index, Mass spectrometry, Proteins, SDS-PAGE, Sedimentation Index, wheat

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval všem, kteří se větší i menší mírou podíleli na vzniku této diplomové práce. Především děkuji svému vedoucímu práce RNDr. Marku Ingrovi, Ph.D. za odbornou pomoc, připomínky a rady nejen k této diplomové práci. Velký dík patří také Mgr. Ivě Burešové Ph.D. za poskytnuté vzorky a čas věnovaný konzultacím. Děkuji také Ing. Antonínu Minaříkovi, Ph.D. za umožnění studia lepku na AFM, a zvláštní poděkování patří Ing. Magdě Rafajové za nedoceněný čas strávený skenováním mikrostruktury lepku. Dále bych rád poděkoval Ing. Michalu Rouchalovi, Ph.D. za analýzu proteinů na ESI-IT-MS. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat pracovníkům laboratoře fyzikální chemie, zvláště Ing. Věře Halabalové, Ph.D. a laborantce Ing. Marcele Havlové, za poskytnuté zázemí a příjemnou společnost při vleklých hodinách strávených v laboratoři. Nakonec chci poděkovat svým skvělým rodičům za finanční a psychickou podporu během celého studia a přítelkyni Michaelle za trpělivost.

Motto

Don't be just another brick in the wall!

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

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST	13
1 PŠENIČNÁ MOUKA A JEJÍ BÍLKOVINY	14
1.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA MOUKY	14
1.1.1 Surovina pro výrobu mouky.....	14
1.1.2 Způsob získávání mouky.....	16
1.2 PŠENIČNÁ MOUKA	17
1.3 OSTATNÍ DRUHY MOUKY	18
1.3.1 Žitná mouka	18
1.3.2 Ječná mouka	18
1.3.3 Ovesná mouka	18
1.3.4 Netradiční suroviny pro výrobu mouky	18
1.4 PROTEINY PŠENICE	19
1.4.1 Albuminy.....	20
1.4.2 Globuliny.....	21
1.4.3 Prolaminy	21
1.4.3.1 Gliadiny	21
1.4.4 Gluteliny.....	22
1.4.4.1 Gluteniny	22
1.5 LEPEK.....	24
1.5.1 Celiakie	26
2 METODY STUDIA KVALITY LEPKU	27
2.1 UKAZATELE KVALITY LEPKU (TECHNOLOGICKÉ METODY)	27
2.1.1 Obsah dusíkatých látek	28
2.1.2 Obsah mokrého lepku	28
2.1.3 Bobtnavost lepku.....	28
2.1.4 Gluten index	29
2.1.5 Sedimentační index	29
2.1.6 Reologické vlastnosti	30
2.1.7 Pokusné pečení.....	30
2.2 ANALYTICKÉ METODY.....	31
2.2.1 Izolace pšeničných bílkovin.....	31
2.2.2 Kapalinová chromatografie.....	33
2.2.2.1 Gelová permeační chromatografie.....	36
2.2.3 Elektroforéza	36
2.2.3.1 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným.....	38
2.2.4 Hmotnostní spektrometrie.....	39
2.3 MIKROSKOPICKÉ METODY.....	42
2.3.1 Mikroskopie atomárních sil.....	42

II	PRAKTICKÁ ČÁST	46
3	CÍL PRÁCE	47
4	MATERIÁL A METODIKA	48
4.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, POMŮCKY A PŘÍSTROJE	48
4.2	STUDOVANÉ VZORKY MOUKY	50
4.3	TECHNOLOGICKÉ UKAZATELE KVALITY LEPKU	50
4.3.1	Obsah mokrého lepku	50
4.4	SEPARACE PŠENIČNÝCH BÍLKOVIN	51
4.4.1	Extrakce bílkovin z pšeničné mouky	51
4.4.2	Gelová permeační chromatografie	52
4.4.3	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným	52
4.4.4	Barvení gelů stříbrem	54
4.5	IDENTIFIKACE PROTEINŮ	55
4.5.1	Hmotnostní spektrometrie	55
4.6	MIKROSKOPIE ATOMÁRNÍCH SIL	57
5	VÝSLEDKY	58
5.1	TECHNOLOGICKÉ UKAZATELE KVALITY LEPKU	58
5.2	SEPARACE PŠENIČNÝCH BÍLKOVIN	59
5.2.1	Identifikace proteinů hmotnostní spektrometrií	79
5.3	MIKROSTRUKTURA LEPKU	82
6	DISKUSE	89
	ZÁVĚR	95
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	97
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	102
	SEZNAM OBRÁZKŮ	104
	SEZNAM TABULEK	106

ÚVOD

Obiloviny jsou historicky nejvýznamnější plodinou. Jejich produkce v celosvětovém měřítku zaujímá významné místo. Uplatňují se jednak jako hlavní surovina na výrobu potravin, slouží i pro výživu hospodářských zvířat a malé množství se zpracovává technicky (na škrob a líh).

Z botanického hlediska obiloviny řadíme do čeledi lipnicovité, jejíž zástupci mají značnou podobnost v uspořádání a chemickém složení jednotlivých anatomických částí obilného zrna. Drobné rozdíly v jejich vlastnostech však mají významný vliv na zpracovatelské vlastnosti obilovin a částečně i na jejich výživové vlastnosti.

Celosvětově nejrozšířenější obilovinou pro pekařské využití je pšenice. Pšeničná mouka je nenahraditelnou surovinou pro výrobu kynutých pekárenských výrobků, z něhož nejvýznamnější složkou z pekařského pohledu jsou bílkoviny, které mají zásadní vliv na technologické využití a pekařskou kvalitu. Pšeničné bílkoviny jsou zcela unikátní, protože jsou schopny při smísení s vodou navzájem reagovat pomocí disulfidických vazeb a tvořit trojrozměrnou síť, tzv. lepek, který je příčinou ojedinělých vlastností pšeničného těsta – schopností tvořit nakypřenější strukturu a vyšší klenbu pečeného výrobku.

Kvalitou a množstvím lepku je tedy dána i kvalita pšeničné mouky a tím i kvalita těsta z ní vytvořeného. Závisí to především na chemickém složení zrna obilovin a poměru jednotlivých složek. Proto je žádoucí stanovovat množství a kvalitu pšeničných bílkovin v různých odrůdách pšenice pěstovaných za rozdílných klimatických a půdních podmínek.

Ke zjištění kvality pšeničné mouky se v technologické praxi využívají relativně jednoduché, ale spolehlivé metody. Technologická jakost je faktor, který zvyšuje užitnou hodnotu pšeničné mouky a předurčuje její konkrétní průmyslové zpracování. Hlavní a nejdůležitější zkouškou technologické jakosti pšeničné mouky pro pekárenské použití je pekařský pokus. Čím je měrný objem pečiva vyšší, tím je mouka vhodnější pro pekárenskou výrobu. Obsah dusíkatých látek (hrubá bílkovina) v zrně je také důležitým technologickým kvalitativním parametrem, s nímž úzce souvisí obsah mokrého lepku, který lze jednoduše získat vypíráním odleželého těsta pod mírným proudem vody. Doplňujícím ukazatelem kvality lepkových bílkovin je sedimentační index a Gluten index.

Analýza pšeničných bílkovin může být velmi nesnadná vzhledem k jejich různorodosti a obtížné rozpustnosti. Přesto bylo s úspěchem popsáno několik extrakčních a

analytických metod, které umožňují charakterizaci těchto bílkovin. Nejčastěji se k tomuto účelu využívají chromatografické a elektromigrační separační metody. Charakterizace obilných bílkovin umožňuje nejenom stanovení množství a složení, ale také předpovídat jejich technologickou kvalitu.

Zajímavým ukazatelem kvality pšeničného lepku může být i struktura jeho proteinové sítě tvořící „kostru“ těsta na molekulární úrovni. Tato struktura podmiňuje technologickou zpracovatelnost těsta a objem pečiva. Mikrostrukturu trojrozměrné sítě lepku lze pozorovat různými typy mikroskopických technik využívajících odlišné fyzikální principy k vytváření obrazu. Neznámější a nejběžnější jsou klasické světelné mikroskopy. Dále se používá konfokální mikroskop, který jako zdroj světla využívá laser, přičemž obraz je vytvářen skenováním preparátu po jednotlivých bodech. V současnosti se ke studiu pšeničného lepku, popřípadě těsta, využívají mikroskopy schopné dosáhnout mnohem většího rozlišení. Jedním z nich je elektronový mikroskop, který místo fotonů využívá elektrony, protože u těchto částic lze dosáhnout podstatně kratších vlnových délek konjugované vlny a tedy výrazně lepšího rozlišení. Zatím méně významného využití při studiu mikrostruktury lepku dosáhla mikroskopie atomárních sil (AFM), založená na mapování atomárních sil na povrchu vzorku pomocí ostrého hrotu, který monitoruje topografii preparátu prostřednictvím interakce s jeho povrchem.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 PŠENIČNÁ MOUKA A JEJÍ BÍLKOVINY

Z rostlinných materiálů jsou nejvýznamnějším zdrojem proteinů pro výživu člověka obiloviny, v ČR primárně pšenice [1]. Z hlediska celkového objemu produkce obilovin je objem vyprodukované pšenice přibližně stejný jako objem vyprodukované rýže, ale ta se jen málo zpracovává na mouku a podíl jejího využití pro pekařské účely je mizivý. Jinde ve světě mimo Evropu dosahují značného významu ještě další obiloviny, zejména kukuřice, proso a čirok [2].

1.1 Obecná charakteristika mouky

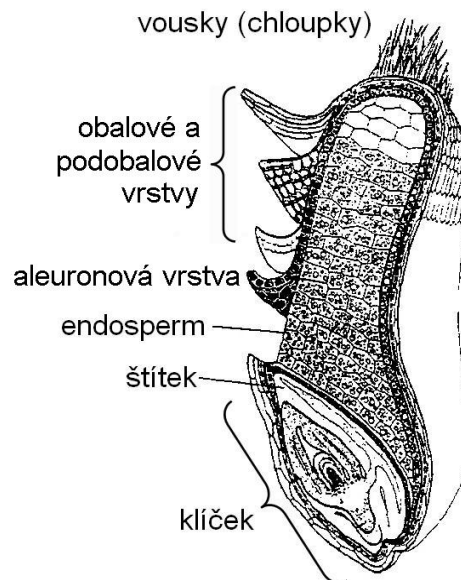
Mouka je téměř čistý rozdrcený endosperm, jehož podstatná část je tvořena škrobem a bílkovinami [2-3]. Je to základní surovina pro pekárenskou a těstářenskou výrobu a rozhodujícím způsobem předurčuje vzhled, kvalitu a sensorické vlastnosti výrobku. Vlastnosti mouky souvisejí se základní stavební strukturou obilného zrna, a tudíž s jeho chemickým složením, strukturním uspořádáním hlavních chemických složek a reakcemi probíhajícími během vymílání, skladování a zrání mouky [3].

Podle komoditní vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 182/2012 Sb., kterou se mění vyhláška č. 333/1997 Sb., se moukou rozumí mlýnský obilný výrobek získaný mletím obilí a tříděný podle velikosti částic, obsahu minerálních látek a druhu použitých obilných zrn, pohanky a rýže [4].

1.1.1 Surovina pro výrobu mouky

Pro lidskou výživu se z obilovin přímo používá výhradně zrno. Obilná zrna jsou semeny obilovin a jejich přirozená funkce po vyzrání spočívá v roli uchování životaschopnosti zárodků nové rostliny. Základními složkami obilných zrn jsou polysacharidy a bílkoviny. V malých množstvích jsou v zrnech přítomny lipidy, minerální látky, vitaminy, barviva a ve velmi malých množstvích velký počet složek, které mají různé růstové, regulační a genetické funkce [2].

Každá anatomická část zrna má různé strukturní, mechanické a fyzikálně-chemické vlastnosti a plní v životě obilky i při následném využití a zpracování své specifické funkce. Jejich hmotnostní podíl je proměnlivý u jednotlivých obilovin a kolísá vlivem vnitřního (odrůda, zralost, vlhkost) a vnějšího prostředí (počasí během vegetační doby, kvalita půdy, choroby, škůdci, atd.) [5-7]. Podélný řez pšeničným zrnem je uveden na obrázku 1.



Obrázek 1: Podélný řez pšeničným zrnem (převzato z [6]).

Obalové vrstvy (ektosperm) tvoří přibližně 3 – 9 % hmotnosti obilky a chrání ji před vnějšími mechanickými a mikrobiologickými vlivy [2]. Jsou složeny převážně z nerozpustných polysacharidů typu celulózy s velkou mechanickou pevností [2,5]. Podobalové vrstvy jsou složeny rovněž z polysacharidů, které ale s vodou bobtnají nebo se částečně rozpouštějí a jsou schopny vodu velmi pevně vázat. Z hlediska pekárenské technologie mají tyto složky zhoršující účinek na kvalitu a zpracovatelnost těsta a často i na vzhled hotového výrobku. V mlýnské technologii jsou označovány jako otruby a v pekárenství mají své využití v celozrnných výrobcích, kde jsou z výživového hlediska zdrojem vlákniny, vitaminů a minerálních látek [2].

Klíček (embryo) představuje asi 3 % hmotnosti zrna, je vlastním zárodkem nové rostliny a nositelem genetických informací. Je bohatým zdrojem lipidů, jednoduchých sacharidů, aminokyselin, proteinů, enzymů, minerálních látek a vitaminů [2,5-6]. Při mlýnském zpracování je oddělován právě kvůli vysokému obsahu tuku a jeho velmi krátké stabilitě na vzduchu [2]. **Štítek** odděluje klíček od endospermu a obsahuje až 33 % proteinů [5-6].

Endosperm (vnitřní obsah zrna) představuje největší podíl zrna (80 – 86 %) a je technologicky nejvýznamnější částí [2,5]. Obsahuje zásobní látky pro klíčící rostlinu. Podstatná část endospermu je tvořena škrobem (téměř 75 %), ale pro pekárenskou technologii jsou velmi významné i proteiny, které tvoří jen asi 10 % obsahu endospermu. Kolísání obsahu proteinů a jejich rozdílná kvalita je významná ve vztahu ke zpracovatelské kvalitě pšeničné mouky [2].

Do celkového endospermu se zahrnuje také jeho nejvrchnější vrstva, tzv. **aleuronová vrstva**, která tvoří přibližně 8 % hmotnosti zrna [2,5]. Ta sice obsahuje podstatně více bílkovin než ostatní endosperm, ale ty nepatří k lepkotvorným bílkovinám a nejsou tedy nositelem pekařské kvality mouky [2].

1.1.2 Způsob získávání mouky

Zpracováním obilovin na produkty (krupici, mouku, atd.) a současně na krmné výrobky se zabývají mlynářské technologie, jejichž hlavním cílem je oddělit klíčky a obalové vrstvy od endospermu s jeho následným drcením, tříděním a čištěním [6].

Významným krokem při výrobě mouky je **sestavení směsi na zámel**. Obilí z různých partií se míchá tak, aby výsledné vlastnosti směsi maximálně odpovídaly požadavkům na jeho určení pro další zpracování. Při tomto kroku je třeba zvolit dominantní ukazatele, podle kterých se bude rozhodovat. Obvykle se jedná o parametry požadované pro kvalitní pekařské mouky jako je obsah a kvalita bílkovin u pšenice [2].

Směs obilí se pak podrobuje třídění a čištění, které slouží k oddělení hrubých příměsí, zrn jiných obilovin, semen plevelů a poškozených zrn základní kultury. Před vlastním mletím se zrno nakrápí a nechá odležet, aby obalové vrstvy nabobtnaly a lépe se oddělovaly od endospermu [2].

Vlastní mletí je poměrně složitý proces sestávající z řady opakujících se základních technologických kroků nazývaných mlecí chody (**pasáže**), které jsou složeny z drcení a následného třídění rozemletého produktu. Proces mletí pšenice dělíme do tří základních etap: **šrotování** (šetrné otevření zrna, oddělení endospermu od obalových vrstev), **luštění krupic** (drcení vytríděných a vyčištěných krupic obsahujících ulpělou část slupky tak, aby se oddělila od endospermu), **vymílání** (vydírání zbytků endospermu ulpělých na částech obalů a drcení částic čistého endospermu na požadovanou granulaci) [2].

V konečných chodech vymílání se zvyšuje podíl částic z vnitřních a vnějších obalových vrstev (minerální látky, vitaminy a vláknina) a mouka získává naředlý odstín [3]. Konečné typové mouky se míchají z jednotlivých pasážních mouk podle požadavků zákazníka [2].

Čerstvě namletá mouka nemá plnou pekařskou hodnotu a získá ji až po 2 – 6 týdnech skladování, při kterém dochází k přeměnám pekařských vlastností, které nazýváme dozrávání mouky [6]. Z těchto změn jsou nejvýznamnější oxidační procesy v proteinech

mouky, které se projevují zlepšením jakosti lepku (snižuje se jeho tažnost a zvyšuje se pevnost, pružnost a bobtnavost) [7]. Proces dozrávání urychluje teplota nejlépe kolem 18°C, vlhkost a přístup vzduchu [6].

1.2 Pšeničná mouka

Základní pekárenskou obilovinou je pšenice vzhledem k mimořádné kvalitě jejích bílkovin, které jsou schopny vytvořit nakypřenější strukturu a vyšší klenbu pečeného výrobku než bílkoviny z kterýchkoliv jiných obilovin. Pšeničná mouka je vlastně rozdrcený endosperm, jehož podstatná část je tvořena škrobem a bílkovinami, a při hnětení s vodou vytváří těsto [2].

Pro běžné pekařské potřeby se používá převážně pšenice obecná (*Triticum aestivum* L.), ze které bylo vyšlechtěno velké množství odrůd. Pro výrobu těstovin se používá pšenice tvrdá (*Triticum durum* L.) s vyšším obsahem lepku, která se semílá na polohrubou mouku tzv. semolinu [2-3,6].

V ČR se pšeničná mouka nejčastěji rozděluje podle **granulace** (hrubá, polohrubá, hladká). Ovšem v technologické a pekárenské praxi je hlavním rozlišovacím a jakostním kritériem **obsah popela**, tj. číslo udávající tisícinásobek procentuálního obsahu minerálních látek v mouce (např. hladká mouka T 530 obsahuje 0,53 % popela). Vyšší obsah popela se projevuje našedlým odstínem mouky a poukazuje na více vymletou mouku. Stupeň vymletí úzce souvisí se zastoupením jednotlivých chemických složek v mouce (viz tabulka 1), což ovlivňuje zpracovatelské vlastnosti mouky [3,6].

Tabulka 1: Závislost chemického složení pšeničné mouky na stupni vymletí v % [6].

Vymletí mouky	40 %	73 %	80 %	94 %	100 % (celé zrno)
Popel	0,40	0,63	0,90	1,72	1,90
Tuk	1,14	1,55	1,90	2,25	2,30
Bílkoviny	10,10	11,23	12,10	12,50	14,10
Cukry	2,14	3,65	4,85	5,19	5,20
Škrob	82,53	78,65	75,38	68,70	66,20
Vláknina	0,10	0,20	0,28	1,70	2,50
Pentozany	2,59	3,15	3,95	7,25	7,90
Nestanovený podíl	1,00	0,93	0,64	0,94	-

V současnosti se výrobci pečiva snaží dosáhnout konkurenceschopnosti rozšiřováním sortimentu svých výrobků, které však vyžadují přesné technologické postupy a konkrétní

jakost surovin a přísad. A tak jsou kladeny značné nároky na dodavatele, aby zachovali standardní vlastnosti mouk pro jednotlivé druhy výrobků. Z tohoto důvodu jsou moderní mlýny vybaveny mnoha speciálními přístroji, podle nichž se upravují pekařské zpracovatelské vlastnosti mouk [2], o nichž bude pojednáno v kapitole 2.1.

1.3 Ostatní druhy mouky

1.3.1 Žitná mouka

Žitné zrna a mouka obsahují v průměru méně bílkovin než pšenice [3]. Žitné bílkoviny mají odlišné fyzikální a koloidní vlastnosti než bílkoviny pšenice. Po nabobtnání s vodou nejsou schopny vytvořit samostatnou souvislou prostorovou strukturní síť, která je nosnou kostrou pšeničného pečiva (úlohu při tom hraje i vyšší obsah podobalových rozpustných polysacharidů, tzv. pentozanů) [3,7]. Proto také nelze žitný lepek samostatně vyprat z mouky tak, jako pšeničný [3]. Výroba žitného, žitnopšeničného pečiva a chleba je tradicí ve střední a východní Evropě. Ovšem ve světovém měřítku zdaleka nedosahuje významu pšenice [2,7].

1.3.2 Ječná mouka

Ječmen se zpracovává hlavně na kroupy, ječnou mouku, vločky, atd. Při mletí ječné mouky jsou problémem pluchy (listeny vyrůstající u travin na bázi květu v klásku), které ucpávají síta a obtížně se z nich odstraňují. Mletí ječmene má postupovat rychle, jinak mouka hnědne a zhoršuje se její jakost. Ječná mouka se používala na výrobu lívanců [7].

1.3.3 Ovesná mouka

Oves se zpracovává na ovesné vločky a ovesnou mouku, která se získává mletím vloček po jejich důkladném tepelném opracování na válcové stolici a proséváním. Používá se k výrobě cereálních kaší a moučných směsí na cereální výrobky [7-8].

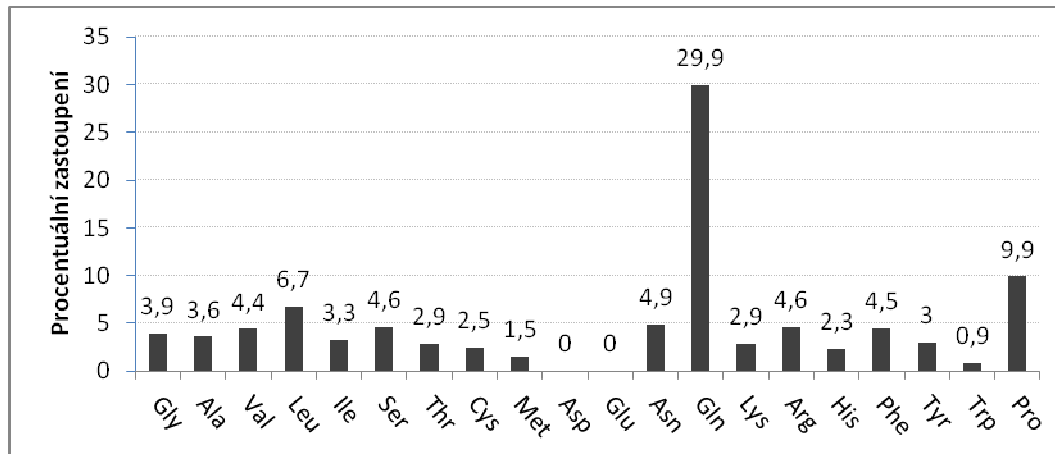
1.3.4 Netradiční suroviny pro výrobu mouky

V jiných částech světa se používají pro výrobu mouky další suroviny, např. rýže, kukuřice, sója, pohanka, brambory, atd. [8]. Pekařské využití těchto surovin na výrobky podle našich zvyklostí je omezené, neboť nejsou schopny vytvořit pevnou strukturu klenutého výrobku. Tradiční pečené výrobky z nich připomínají spíše placky [2,7].

1.4 Proteiny pšenice

Proteiny pšenice mají zásadní technologický význam, protože jsou schopny vytvořit nakypřenější strukturu a vyšší klenbu pekařského výrobku, než proteiny z kterýchkoliv jiných obilovin [2-3]. Obsah proteinů v pšeničné mouce kolísá mezi 7 a 15 %, hlavně v závislosti na stupni vymletí, ale také na druhu a odrůdě rostliny a dalších faktorech [1].

Základními stavebními jednotkami pšeničných proteinů jsou aminokyseliny, které jsou navzájem spojené peptidovou vazbou $-\text{CO}-\text{NH}-$. Jednotlivé polypeptidické řetězce jsou obvykle tvořeny 100 – 5000 aminokyselinami, což odpovídá relativní molekulové hmotnosti $10^4 - 5 \cdot 10^5$. Větší proteiny jsou zpravidla tvořeny několika podjednotkami, tedy několika samostatnými peptidickými řetězci [1,3]. Aminokyselinové složení proteinů v pšenici uvádí graf na obrázku 2 [1]. Zastoupení dané aminokyseliny je dáno hmotnostním zlomkem dusíku této aminokyseliny k celkovému dusíku obsaženému v pšenici. Určité procento tedy připadá i na dusíkaté látky nebílkovinné povahy, proto součet nedává 100 %, ale pouze 96,5 %.



Obrázek 2: Zastoupení aminokyselin v pšenici [1].

Zcela dominantní aminokyselinou v obilovinách je glutamin, jehož obsah představuje bezmála 1/3 z celkového obsahu aminokyselin [2]. Druhou nejvíce zastoupenou aminokyselinou je prolin (přibližně 10 %), který dodává bílkovinné struktuře pšeničného těsta pružnost díky svému specifickému strukturnímu uspořádání. Tato pružnost se uplatňuje při různých strukturních změnách při hnětení, kypření, přetučování těsta a při stavbě jeho struktury [2-3]. Cystein obsahuje ve své molekule skupinu $-\text{SH}$, takže může

vytvořit velmi pevnou disulfidovou vazbu, a tak pevně propojit sousední bílkovinné řetězce nebo spojovat úseky v jedné molekule [3]. Z pohledu výživy je také významný velmi nízký obsah esenciální aminokyseliny lysinu, kvůli němuž není pšeničná bílkovina pro člověka plnohodnotná [2].

Proteiny mohou být tvořeny pouze polypeptidovým řetězcem – **jednoduché proteiny**, nebo mohou v molekule obsahovat ještě jiné látky nebílkovinné povahy – **složené proteiny** (glykoproteiny – obsahují sacharidické složky, lipoproteiny – obsahují lipidické složky) [8].

Jednoduché proteiny pšeničného zrna se dělí podle funkčních vlastností na **protoplasmické proteiny** (albuminy, globuliny), které jsou tvořeny proteiny enzymaticky aktivními a stavebními. Nacházejí se hlavně v klíčku a aleuronové vrstvě. Druhou skupinou jsou **zásobní proteiny** (prolaminy a gluteliny), které jsou z technologického hlediska nejvýznamnější a určují nutriční a biologickou hodnotu zrna. Jsou obsaženy v endospermu [2,7].

Proteiny pšenice jsou historicky klasifikovány na základě tzv. Osbornovy postupné extrakce a jejich rozdílné rozpustnosti v různých rozpouštědlech, což vedlo k jejich rozdělení do čtyř základních skupin: **albuminy** (rozpustné ve vodě), **globuliny** (rozpustné ve vodných roztocích solí), **prolaminy** (rozpustné ve vodných roztocích alkoholů), **gluteliny** (rozpustné až v roztocích kyselin nebo zásad) [2-3,5-6,9].

Jelikož každá z těchto skupin obsahuje velké množství jednotlivých proteinů s částečně rozdílnými vlastnostmi, byla vypracována další hlediska klasifikace těchto látek. Nové možnosti získávání dat o proteinových strukturách a vlastnostech umožňují rozdělovat proteiny na základě poznání vztahu aminokyselinových sekvencí a trojrozměrných struktur, což umožňuje klasifikaci tzv. bílkovinných čeledí, zahrnujících i jinak značně odlišné proteiny [9].

1.4.1 Albuminy

Pšeničné albuminy, jak již bylo uvedeno, jsou rozpustné ve vodě a zahřátím na 52 °C koagulují [5,9]. Jsou řazeny mezi protoplasmatické bílkoviny, mezi které patří stavební a enzymaticky aktivní proteiny, proto jsou soustředěny zejména v klíčku [3,5-6]. Albuminy tvoří přibližně 14,7 % pšeničných proteinů [9]. Nejznámější a nejlépe prostudovaný pšeničný albumin je **leukosin** [5].

1.4.2 Globuliny

Pšeničné globuliny jsou podle Osborna rozpustné ve vodných roztocích solí [9]. Stejně jako albuminy jsou řazeny mezi protoplasmatické bílkoviny, proto se tyto dvě frakce vyskytují vždy společně [5-6]. Globuliny částečně koagulují při teplotě kolem 100 °C [5]. Pšeničné globuliny představují zhruba 7 % proteinů pšenice [9].

1.4.3 Prolaminy

Pšeničné prolaminy jsou rozpustné ve vodných roztocích alkoholů (např. ethanol, propanol) [9]. Poněvadž je lze poměrně snadno izolovat, jsou jednou z nejlépe prostudovaných skupin proteinů [5]. Pojmenovány byly podle aminokyseliny prolinu, kterého obsahují velké množství. Prolaminy z pšenice jsou nazývány **gliadiny** a představují okolo 32,6 % pšeničných proteinů [9].

1.4.3.1 Gliadiny

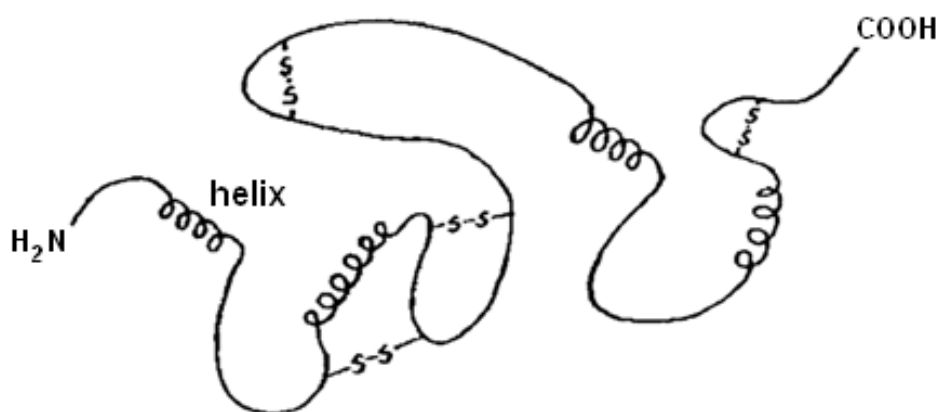
Gliadiny patří mezi charakteristické zásobní nebo také lepkové proteiny pšenice [5]. Jsou tvořeny přibližně 40 proteiny s poměrně nízkou molekulovou hmotností v rozmezí 30 – 75 kDa. Moderními metodami byly gliadiny frakcionovány pomocí elektroforézy na gelu a podle klesající mobility rozděleny na α -, β -, γ - a ω -gliadiny [2,9]. Pozdější studie aminokyselinových sekvencí těchto proteinů ovšem prokázaly, že neexistuje přímá souvislost mezi pohyblivostí proteinů v gelu a jejich základní strukturou, takže se nakonec α - a β -gliadiny sloučily do jedné skupiny jako α -gliadiny, a dále došlo k rozdělení ω -gliadinů na ω -5 a ω -1,2 gliadiny [9]. Získané frakce jsou charakteristické pro každou odrůdu pšenice, proto také tato metoda slouží k identifikaci odrůd [2].

Aminokyselinové složení gliadinů je typické vysokým obsahem glutaminu (36 – 45 %) a prolinu (14 – 30 %). Naopak nízké je zastoupení aminokyseliny tryptofanu a poněkud méně jsou obsaženy kyseliny asparagová a glutamová, arginin, lysin a histidin. Nízký obsah polárních aminokyselin souvisí s malou rozpustností gliadinů ve vodě, ve které pouze bobtnají a vytvářejí vysoce viskózní koloidní gely nebo roztoky [3,9]. Pro izolaci a analýzu gliadinů je významná jeho rozpustnost v 60 – 70% etanolu, protože při tom dochází k nejmenší denaturaci [5].

Obsah dusíku v gliadinech se pohybuje od 17 do 18 % a izoelektrický bod se nejčastěji pohybuje od pH 6,0 do 7,0. Koagulují zahřátím na teplotu 60 až 70 °C, přičemž nepříznivé změny nastávají již při 40 °C, což má velký význam zejména při sušení

zrna, protože dojde k podstatnému zhoršení kvality lepku. Denaturaci urychluje vyšší vlhkost a doba záhřevu [5].

Doposud navrhované modely struktury molekuly gliadinu předpokládají, že jde o jeden spojitý polypeptidový řetězec (viz Obrázek 3), v němž se střídají krátké spirálovité úseky (α -helix), úseky relativně přímé s vysokým obsahem glutaminu a prolinu a náhodné ohyby. Helixy jsou stabilizovány vodíkovými vazbami, kterých je v celém lepku asi 30krát více než kovalentních disulfidických vazeb, což kompenzuje jejich nižší vazebnou energii. Ohyby řetězce jsou naopak zafixovány pevnými disulfidickými vazbami [2-3,7].



Obrázek 3: Předpokládaná struktura gliadinu (převzato z [3]).

1.4.4 Gluteliny

Pšeničné gluteliny jsou podle Osborna rozpustné až ve zředěných roztocích kyselin nebo zásad, ale dosud jsou nejméně prostudovanou skupinou, protože jejich příprava je velmi náročná [5,9]. Gluteliny v pšenici jsou nazývány **gluteniny** a představují přibližně 45,7 % pšeničných proteinů [9].

1.4.4.1 Gluteniny

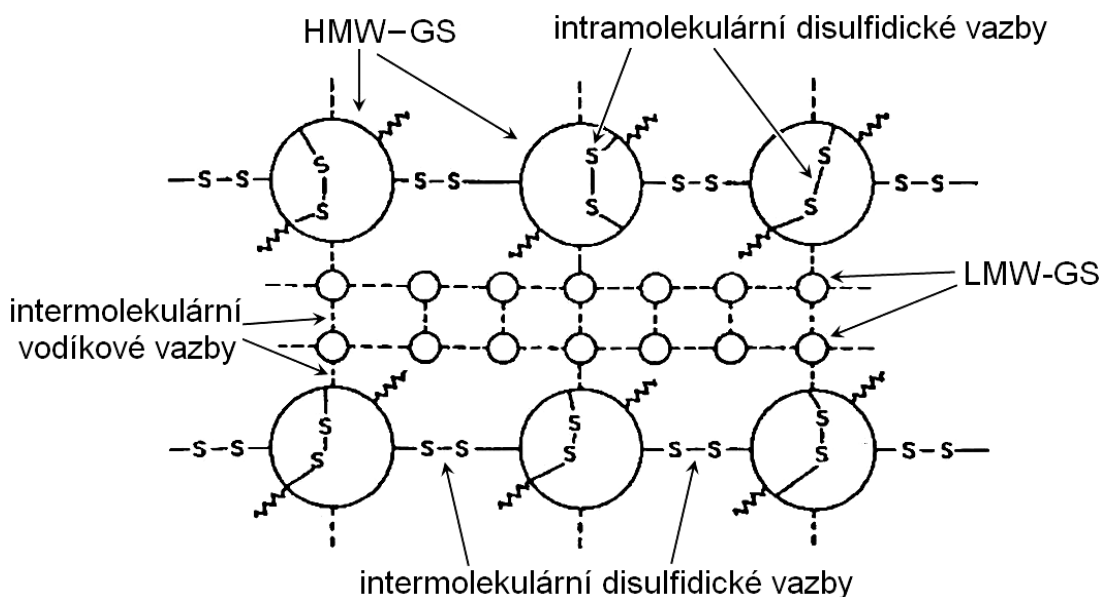
Gluteniny, stejně jako gliadiny, patří mezi charakteristické zásobní nebo také lepkové proteiny pšenice [5]. Tato vysokomolekulární frakce je tvořena směsí polypeptidových řetězců vzájemně propojených hlavně disulfidickými a vodíkovými vazbami, čímž vytvářejí nadmolekulární vláknité struktury o relativní molekulové hmotnosti 10 až 3000 kDa (nejčastěji kolem 2000 kDa) [2,6]. Frakčním srážením $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ byly získány dvě frakce α -glutenin a β -glutenin, které se liší obsahem

některých aminokyselin a množstvím dusíku (α -glutenin 17,17 % a β -glutenin 16,16 %) [5].

Celkový obsah dusíku kolísá od 15,5 % do 20 % a izoelektrický bod je u různých preparátů značně odlišný (pH 4,4 až 8,0). Aminokyselinové složení gluteninu je mnohem méně prostudováno než u gliadinu [5].

Gluteliny nejsou rozpustné ve vodě, pouze v ní bobtnají a vytvářejí vysoce viskózní koloidní gely nebo roztoky. Lépe bobtnající (rozpustnější) složky gluteninu snižují objem pečiva, zatímco nerozpustné složky prokazatelně jeho objem zvyšují [3].

Na obrázku 4 je znázorněna předpokládaná struktura gluteninu, kterou si lze představit jako složitou trojrozměrnou síť skládající se z podjednotek gluteninů s vysokou molekulovou hmotností (High Molecular Weight Glutenin Subunits – HMW-GS) a podjednotek gluteninů s nízkou molekulovou hmotností (Low Molecular Weight Glutenin Subunits – LMW-GS) navzájem vázanými disulfidickými vazbami [2-3].



Obrázek 4: Předpokládaná struktura gluteninu (převzato z [3]).

LMW-GS jsou uvnitř své molekuly vázány intramolekulárními disulfidickými a vodíkovými vazbami, ale navenek s ostatními molekulami jsou spojeny jen intermolekulárními vodíkovými vazbami. Naopak HMW-GS mají dva druhy disulfidických vazeb: **intramolekulární**, kterými jsou propojeny uvnitř své molekuly (obdobně jako gliadin) a **intermolekulární**, které propojují jednotlivé podjednotky

HMW-GS navzájem a udržují tak pevnou a pružnou strukturu. Cysteinové zbytky, které jsou nositeli –SH skupin, a tudíž potenciálními místy vzniku disulfidických vazeb, jsou umístěny jen na koncových doménách proteinové makromolekuly a jen v těchto místech mohou vznikat intra- i intermolekulární –S–S– vazby [2-3].

V poslední době je kritizována klasifikace lepkových proteinů na skupinu gliadinů a gluteninů, neboť vlastnosti prolaminů a glutelinů pšenice nejsou striktně odlišné [2].

1.5 Lepek

Zásobní proteiny pšenice (gliadiny a gluteniny) se svými vlastnostmi liší od podobných proteinů ostatních obilovin a jsou příčinou výjimečného postavení pšenice v cereální technologii. Nejsou rozpustné ve vodě, ale s přidavkem vody omezeně bobtnají a za současného vložení mechanické energie formou hnětení a za přítomnosti vzdušného kyslíku tvoří pevný gel, který nazýváme **lepek** [2]. V zrně ani v mouce lepek neexistuje, vytváří se až po propojení prostorové sítě pšeničných proteinů, čehož se docílí hnětením těsta [3].

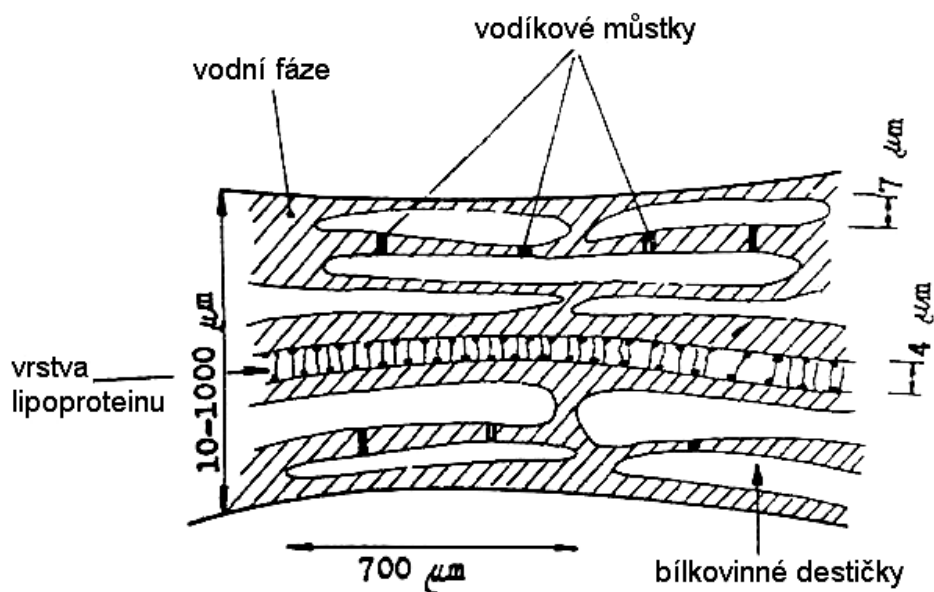
Právě lepek je „kostrou“ pšeničného těsta a příčinou jedinečných vlastností, jako je **tažnost** (schopnost zachovávat soudržnost při namáhání v tahu), **pružnost** (schopnost vrátit se po natažení do původní polohy), **pevnost** (v kombinaci s tažností to je schopnost zadržovat plyn) a **bobtnavost** (schopnost zvětšovat svůj objem) [2-3]. Díky tažnosti, kterou lepku dodávají gliadiny, se těsto působením slabého tlaku kvasných plynů zdvihá a tak se vytváří jemná a pravidelná pórovitost [2,5]. Pružnost, pevnost a bobtnavost lepku poskytují gluteniny [2]. Pouze dostatečně pevný a pružný lepek může zadržet větší množství kvasných plynů a tak udržet původní tvar pečiva. Na bobtnavosti závisí chování lepku v slabě kyselém prostředí, které se vytváří během zrání těsta [5].

Hnětením odleželého pšeničného těsta pod mírným proudem vody je možné jednoduše vyprat tzv. **mokrý lepek** ve formě pružného, tažného a vazkého kaučukovitého gelu žlutozelené nebo žlutošedé barvy. Obsah mokrého lepku se pohybuje v rozmezí od 15 do 58 % původní hmotnosti mouky a jeho vysušením se získá xerogel o obsahu asi 5 až 28 % původní hmotnosti mouky (asi 1/3 mokrého lepku) [3,5].

Kvalita a vlastnosti lepku závisí hlavně na odrůdě, posklizňové úpravě (nebezpečí denaturace proteinů při sušení zrna), sestavení směsi na zámel, dozrávání mouky a v menší míře i klimatických a půdních podmínkách [5].

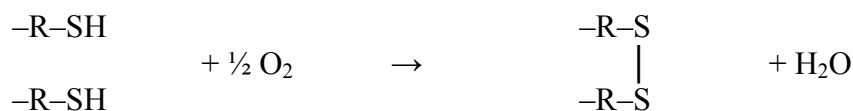
Vypráním těsta pod mírným proudem vody vyplavíme z lepku pouze ve vodě rozpustné nebo mechanicky snadno odstranitelné látky. Zbývající látky je nutné pokládat za jeho složky, i když nejsou nutné k jeho vzniku [5]. Sušina vypraného lepku sestává průměrně z 90 % proteinů (**gliadiny a gluteniny v poměru 2:3**), 8 % lipidů, 2 % sacharidů (převážně škrob), vlákniny, kyseliny fosforečné a minerálních látek [2-3].

Co se týká konstituce lepku, je to složitá trojrozměrná síť peptidických řetězců, různým způsobem zřasených a propojených navzájem disulfidickými a vodíkovými vazbami mezi jednotlivými aminokyselinami. Určitý význam pro strukturu lepku má i vrstvička lipidů (viz obrázek 5) [5].



Obrázek 5: Model struktury hydratovaného lepkového vlákna (převzato z [5]).

Rozdíly v uspořádání této struktury se pak považují za příčiny různých vlastností lepku. Největší pozornost byla věnována oxidačně-redukčnímu systému thiol–disulfid, kdy se při oxidaci tvoří disulfidické můstky:



Čím více je těchto vazeb, tím je lepek silnější, protože se tím snižuje relativní pohyblivost peptidických řetězců [5-7]. Působením redukčních činidel dochází k borcení struktury lepku, které je způsobeno převážně štěpením disulfidických můstků a tím se lepek zeslabuje, stává se tažnějším. Naopak oxidační činidla strukturu lepku zpevňují a těsto se stává trhavým. Na tomto poznatku je založena i řada tzv. pekařských zlepšujících přípravků [2,6]. Zesilující efekt oxidace thiolových skupin na strukturu těsta však není zdaleka jednoznačný. Rozhodující význam má pravděpodobně rovnováha mezi –SH a –S–S– skupinami [7].

1.5.1 Celiakie

U menší části populace vyvolává pšeničný lepek intoleranci zvanou celiakie [7]. Celiakie je chronické vrozené střevní onemocnění charakteristické trvalou nesnášenlivostí k lepku, které může propuknout v každém věku [10].

Výsledkem působení lepku ve střevech geneticky vnímavých osob je zánik střevních klků (vychlípeniny střevní sliznice zvětšující trávicí plochu), což zabrání vstřebávání živin a vede k chudokrevnosti, hypovitaminóze, otokům z nedostatku bílkovin, osteoporóze, váhovým úbytkem, atd. Snížená hladina enzymů trávicích sacharidy vede k poruše vstřebávání cukrů a jejich následné zvýšené fermentaci, což se projeví nadýmáním, bolestmi břicha a průjmem. Klíčovou léčbou tohoto onemocnění je bezlepková dieta, kterou je třeba dodržovat po celý život [10].

Z hlediska celiakie, je za lepek považována frakce proteinů rozpustná v alkoholu, takže v **pšenici** se jedná o gliadiny, v **žitě** sekaliny, v **ječmeni** horteiny a v **ovse** aveniny, z nichž největší nebezpečí představují právě gliadiny. Působení jednotlivých proteinů nelze ovlivnit technologickými procesy (denaturace, částečná hydrolýza), protože je závislá na aminokyselinovém složení. Z tohoto důvodu se při bezlepkové dietě nesmí konzumovat nejen zrna, ale také výrobky z těchto obilovin [10]. Pro bezlepkovou dietu jsou vhodné cereální výrobky zejména z kukuřice, rýže, pohanky, prosa a amarantu [7].

2 METODY STUDIA KVALITY LEPKU

Mouka je základní pekárenskou surovinou předurčující kvalitu výrobku [2]. Snahy o hodnocení pekařské zpracovatelské kvality byly prováděny již v 19. století, ale popisy a definice pšeničného lepku byly známy ještě dříve. Ustalováním technologického postupu výroby chleba a pečiva se začaly používat základní praktické charakteristiky pekařské kvality mouky. Přibližně od 20. let minulého století se vyvíjela řada laboratorních přístrojů pro objektivní měření charakteristik mouky [3].

2.1 Ukazatele kvality lepku (technologické metody)

Současná pekárenská výroba klade značné nároky na standardní vlastnosti mouk pro jednotlivé druhy výrobků. Proto jsou moderní mlýny vybaveny mnoha speciálními přístroji a podle nich upravují pekařské zpracovatelské vlastnosti mouk [2].

Za tradiční ukazatele pekařské kvality pšeničné mouky se uvádí: schopnost tvorby kypřících plynů, pekařská síla a barva mouky [3]. Za hlavní měřítko pekařské kvality mouky se celosvětově považuje objem pečiva získaného za definovaných podmínek [2-3].

Schopnost tvorby kypřících plynů je podmíněná dostatečným množstvím zkvasitelných cukrů a aktivitou amylolytických enzymů [3,6]. Optimální stav je, když není narušen příliš velký podíl škrobových zrn (enzymově, mechanicky, tepelně) a současně je zajištěna dostatečná aktivita amylolytických enzymů [3].

Barva mouky může být ovlivněna původní barvou pšenice, vyšším obsahem minerálních látek (popela) nebo svým naředěným odstínem, který poukazuje na tzv. zadní mouku s vyšším podílem poškozeného škrobu [3].

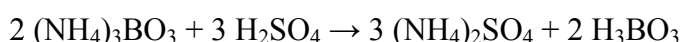
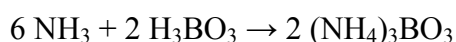
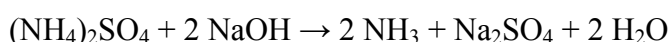
Pekařská síla mouky je bezprostředně spjata s kvalitou a množstvím lepku a je předurčena genetickými vlastnostmi odrůdy pšenice a podmínkami jejího pěstování. Je statisticky spolehlivě prokázáno, že na objem pšeničného pečiva má nejvýznamnější vliv obsah lepkových bílkovin v mouce [3]. Pekařsky silná mouka se obvykle získává z odrůd pšenice s vyšším obsahem bílkovin (12 – 14 % v sušině), proto je elasticitější a tužší, vyžaduje intenzivnější míchání, dobře zadržuje vzduch a oxid uhličitý produkovaný kvasinkami a tím poskytuje objemnější výrobky. Slabé mouky obsahují obvykle pod 10 % bílkovin a jsou spíše vhodné pro výrobu sušenek a oplatků. Nezáleží to však jen na obsahu bílkovin, ale i na jejich složení [1]. Obsah lepku je stanovován ve mlýně a měl by být deklarován při dodávce mouky odběrateli [3].

2.1.1 Obsah dusíkatých látek

Pro hodnocení kvality pšenice se již celosvětově přešlo hlavně na uvádění celkového obsahu dusíkatých látek stanovených Kjeldahlovou metodou [3]. Podle ČSN EN ISO 20483 se obsah hrubých bílkovin stanovuje jako celkový obsah dusíkatých látek stanovených za podmínek metody vynásobený faktorem (pro mlýnské výrobky obecně 5,7 nebo 6,25, pro potravinářskou pšeničnou mouku 5,7), který vyjadřuje průměrný obsah dusíku v pšeničné bílkovině [11].

Principem metody je mineralizace stanovovaného vzorku vroucí kyselinou sírovou za přítomnosti katalyzátoru. Z mineralizátu obsahujícího síran amonný, se uvolňuje přidávkem koncentrovaného roztoku hydroxidu sodného amoniak, který se predestiluje s vodní parou do roztoku kyseliny borité, kde se hromadí za vzniku boritanu amonného. Ten se stanoví titračně odměrným roztokem kyseliny sírové na indikátor Tashiro.

Celý proces lze vystihnout následujícími rovnicemi reakcí:



Z množství spotřebované kyseliny sírové se vypočítá obsah dusíku, který se vynásobením faktorem 5,7 přepočítá na procentuální obsah dusíkatých látek (tzv. hrubé bílkoviny) v pšeničné mouce [11].

2.1.2 Obsah mokrého lepku

Pro bezprostřední posouzení kvality mouky je však obvyklé zjišťovat obsah mokrého lepku, čímž lze odhalit jeho zhoršenou kvalitu [3]. Stanovení obsahu mokrého lepku je založeno na vypírání uhněteného odleželého pšeničného těsta pod mírným proudem studené vody. Zbavením vypraného lepku nadbytečné vody a jeho zvážením se získá množství **mokrého lepku**. Obsah mokrého lepku se pohybuje v rozmezí od 15 do 58 % původního množství mouky, jak již bylo uvedeno v odstavci 1.5 [3,5].

2.1.3 Bobtnavost lepku

Vedle obsahu lepku má význam i jeho kvalita. Tradičním ukazatelem je bobtnavost lepku, který představuje nárůst objemu relativně čistého mokrého lepku v roztoku kyseliny mléčné. Mělo by tím být do jisté míry charakterizováno jeho chování ve zrajícím těstě,

kde fermentací vznikají organické kyseliny. Ve výrobní praxi není žádoucí, aby bobtnavost byla příliš vysoká ani nízká. Ovšem bobtnavost lepku není jednoznačným ukazatelem a její význam pro předvídání objemu pečiva není tak podstatný jako samotný obsah lepku [3].

2.1.4 Gluten index

Gluten index (lepkový index) je metoda zjišťování kvality lepku založená na průchodu lepku jemným sítkem při odstředování. Udává se v procentech zbylého lepku na sítku k celkovému množství lepku. Tento ukazatel je spolehlivějším ukazatelem pekařské kvality vyjadřované objemem pečiva než bobtnavost. V některých zemích je již Gluten index zahrnován do norem kvality pšenice či mouky [3].

Podle normy ICC Standard No. 155 je Gluten index stanoven vypráním mokrého lepku z pšeničné mouky v zařízení Glutomatic a jeho odstředěním prostřednictvím speciálně konstruovaného jemného sítko za standardizovaných podmínek. Gluten index je definován jako procento lepku zbylého na sítku po centrifugaci. Čím vyšší hodnota Gluten indexu, tím lepší kvalita testovaného lepku. Je-li lepek velmi slabý a všechen projde sítkem – Gluten index = 0. Naopak neprojde-li sítkem žádný lepek – Gluten index = 100 [12].

2.1.5 Sedimentační index

Pro hodnocení pekařské kvality lepkové bílkoviny v pšeničné mouce se stále více používá sedimentační test (Zelenyho test) [3]. Tuto metodu stanovuje česká technická norma ČSN ISO 5529. Sedimentační index je číslo udávající objem sedimentu v ml, který vznikne za definovaných podmínek ze suspenze zkoušené pšeničné mouky v roztoku kyseliny mléčné [13]. Zjištěný objem sedimentu v kapalině o přesné hustotě za standardní čas je pak ukazatelem kvality lepkové bílkoviny [3].

Navážka zkoušené mouky se nasype do odměrného válce a přidá se roztok bromfenolové modři. Po protřepání na třepačce při mírných otáčkách se přidá zkušební roztok kyseliny mléčné pro sedimentační test a nechá se opět třepat. Po uplynutí definované doby třepání se válec postaví do vzpřímené polohy a nechá se stát v klidu. Po přesně určené době se odečte objem sedimentu s přesností na 0,5 ml [13].

Zaznamenané číslo udávající objem sedimentu vyjádřený v mililitrech se označuje jako sedimentační index. Podstatou zkoušky je větší rychlost usazování částic mouky s vyšším podílem bílkovin nebo s kvalitnější bílkovinou, tedy mouk pekařsky silnějších, než mouk pekařsky slabších [13].

2.1.6 Reologické vlastnosti

V pekárenské technologii a příbuzných technologiích, kde se pracuje s těsty, hrají významnou roli v utváření kvalitního produktu mechanické vlastnosti surovin a polotovarů. Proto se v metodách hodnocení surovin, polotovarů i produktů rozsáhle využívá metod a přístrojů založených na měření reologických vlastností. Zpracovatelská kvalita a texturní vlastnosti jsou často velmi dobře vystiženy reologickými ukazateli. Na základě reologických měření těsta totiž lze předvídat jeho chování v průběhu technologického procesu, popřípadě získat podklady pro včasné provozní zásahy [2].

Stanovení reologických vlastností těst z pšeničné mouky přesně vymezuje česká norma ČSN ISO 5530-2, která popisuje stanovení deformace v tahu extenzografickou metodou. Pojem deformace v tahu je definován jako odpor těsta proti natahování a rozsah, v němž je těsto natahováno do přetržení, podle pracovních podmínek určených v této normě [14].

Pro toto stanovení jsou nutné dva speciální přístroje, a to farinograf a extenzograf. Na farinografu se připraví podle standardních podmínek těsto z mouky, vody a soli. Zkušební kus těsta se vytvaruje na skulovači a vyvalovači extenzografu do standardního tvaru. Po uplynutí daného času se zkušební kus těsta natáhne a potřebná síla se zaznamená. Okamžitě po prvním natažení se opakují postupně dvě další s tím samym kusem těsta po opětovném tvarování, odležení a natahování. Z rozměru a tvaru získaných křivek se stanoví pekařské vlastnosti mouky [14].

2.1.7 Pokusné pečení

Pokusné pečení se celosvětově považuje za hlavní měřítko pekařské kvality mouky [2]. Musí pro něj být přesně definován postup, receptura a použité zařízení, zejména hnětač. V různých zemích se používá různých hnětačů, které náležitě odpovídají lokálním zvyklostem v přípravě těsta. Rovněž tak se postupy liší v intenzitě hnětení, přímém či nepřímém vedení těst, tvarování výrobku (volně sazené, ve formách) a v závislosti na použitých ingrediencích i v dobách fermentace a pečení [3]. Vzhledem k rozdílnosti technologických postupů v jednotlivých zemích a světadílech je srovnatelnost absolutních hodnot získaných výsledků velmi obtížná [2].

Při vyjadřování výsledků pokusného pečení se především používají ukazatele objemu výrobku. Protože podle různých norem se používá rozdílných navážek na pečení,

je pro zajištění srovnatelnosti nezbytné přepočítat výsledek na stejnou hmotnost. Nejčastěji se uplatňuje vyjádření měrného objemu v cm^3 na 100 g výrobku nebo na 100 g mouky – tzv. objemové vydatnosti nebo objemové výtěžnosti [3].

Objem výrobku není zdaleka jediným ukazatelem pekařské kvality pečeného výrobku, ale je pro objektivní srovnání nejlépe vyčíslitelným ukazatelem. Vedle toho je zvykem provádět smyslová hodnocení pečeného výrobku podle podrobného hodnotitelského schématu [3].

2.2 Analytické metody

Analýza pšeničných bílkovin může být velmi komplikovaná vzhledem k jejich různorodosti a obtížné rozpustnosti [15]. Přesto bylo vyvinuto několik extrakčních postupů a analytických metod, které umožňují jejich stanovení a charakterizaci. Pro analýzu pšeničných proteinů se využívá analytických metod založených na principech elektroforézy, kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie [9].

2.2.1 Izolace pšeničných bílkovin

Složitá rozpustnost pšeničných bílkovin je dána jejich neobvyklým aminokyselinovým složením. Jsou bohaté na glutamin, prolin a hydrofóbní aminokyseliny, naopak mají nízký obsah kyselých a zásaditých aminokyselin. Proto některé obecné postupy izolace bílkovin nemusí být pro pšeničné bílkoviny vhodné. Na rozpustnosti se také podílí vazby, jakými jsou aminokyseliny spojeny – nekovalentně vodíkovými nebo hydrofóbními vazbami nebo kovalentně disulfidickými můstky a mohou tvořit vysokomolekulární komplexy. Svůj podíl na rozpustnosti mají i další složky endospermu, např. lipidy, sacharidy i minerální soli. Navzdory těmto komplikacím byla vyvinuta řada postupů izolace pšeničných bílkovin [15].

Obecně nejčastěji používaným rozpouštědlem je dodecylsulfát sodný (SDS) v roztoku pufovaném fosforečnanem sodným [16]. Je-li vyžadována redukce disulfidových můstků z důvodu oddělení proteinů od jejich podjednotek, přidává se 2-merkptoethanol (2-ME) nebo Dithiothreitol (DTT). Obvyklá doba extrakce proteinů se pohybuje kolem 30 min, přičemž inkubace probíhá za různých teplot (až 60°C) [15].

Veškeré pšeničné bílkoviny lze extrahovat zředěnými roztoky hydroxidu sodného, ale vlivem vysokého pH je rozrušeno mnoho kovalentních vazeb (zvláště disulfidových) a struktura proteinu je významně změněna. Úplného vyextrahování pšeničných bílkovin bez nutnosti chemické redukce disulfidových vazeb je dosaženo rozštěpením velkých molekul bílkovin použitím ultrazvuku přímo v 2% roztoku SDS (pH 6,9). Další výhodou ultrazvuku je nejen zvýšení rozpustnosti bílkovin, ale také k dosažení úplné extrakce postačí mnohem méně času (cca 30 sekund) [16].

Thomas Burr Osborne v roce 1907 klasifikoval proteiny pšenice na základě postupné extrakce a jejich rozdílné rozpustnosti v různých rozpouštědlech, což vedlo k jejich rozdělení do čtyř základních skupin. **Albuminy** byly extrahovány deionizovanou vodou, **globuliny** 0,5N roztokem NaCl, **gliadiny** 70% roztokem etanolu a **gluteniny** roztokem 50% 1-propanolu s přísadkou 1 % DTT. Postup byl vždy stejný, a to 30 min extrakce v příslušném roztoku s pravidelným mícháním vzorku po dobu jedné minuty každých 10 minut. Směs byla nakonec odstředěna při 2000 ot./min po dobu pěti minut [17].

Převážná většina extrakčních postupů se odvíjí právě od Osbornovi postupné extrakce s většími nebo menšími modifikacemi. Kupříkladu Gerrard a spol. (2001) extrahovali albuminy a globuliny 2% roztokem NaCl (w/v), po odstředění odebrali čistý supernatant a nerozpuštěné pelety extrahovali gliadiny 70% (v/v) ethanolem. Po odstředění opět odebrali supernatant a z pelety extrahovali gluteniny fosfátovým pufrům s SDS (0,5 % SDS w/v, 0,05M PO_4^{3-} ; pH 6,9) za použití ultrazvuku [18].

Gliadiny lze poměrně snadno izolovat vodnými roztoky alkoholů (např. metanol, etanol, propanol) [3]. Nejpoužívanější jsou 70% etanol (w/v) a 55% 2-propanol (w/v) [5,9,15]. Metanol nebo 2-propanol může být nahrazen acetonitrilem (ACN), který je velmi často používán v rozpouštědlech pro kapalinovou chromatografii pšeničných bílkovin [19-20].

Gluteniny jsou rozpustné jen ve zředěných roztocích kyselin a zásad [5,9]. Mezi gliadinem a gluteninem není přesně vymezená hranice. Změnou izolační metodiky se jejich vzájemný poměr změní. Např. horkým 70% etanolem (w/v) se rozpustí tolik proteinů, že přechází do roztoku až 26 % gluteninu (w/v). Preparáty získané různým postupem mají rozdílné složení aminokyselin, proto je glutenin v tomto směru mnohem méně prostudován

než gliadin. Jedno z možných vysvětlení je, že se různými činidly přerušují různé vazby v původní molekule [5].

Většina vzorků gliadinů a gluteninů v roztoku denaturačních činidel je stabilní nejméně jeden měsíc, ale vodné albuminové a globulinové extrakty nejsou, protože mohou obsahovat proteázy, které extrakty znehodnotí [15]. Pro lepší definování skupin látek obsažených v extraktech je možná následná separace elektroforetickými a chromatografickými metodami [9]. Před vlastní analýzou je velmi důležité odstředit nebo odfiltrvat všechny nerozpuštěné částice ze vzorku i rozpouštědla [15].

2.2.2 Kapalinová chromatografie

Chromatografie je jedna z nejvýznamnějších analytických separačních metod [21]. Spolu s elektromigračními metodami umožňuje separaci značně složitých směsí a získávání jednotlivých složek směsi ve velice čistém až homogenním stavu. Je možno dosáhnout kvalitativní i kvantitativní analýzy vzorku, tzn. kromě určení složení směsi lze stanovit i koncentraci jednotlivých složek. Pro úplnou identifikaci je však nezbytné propojení s dalšími metodami analytické chemie (např. hmotnostní spektrometrie, UV-VIS spektrometrie, apod.) [22].

Chromatografie je založena na různých fyzikálně chemických principech, ale obecně jde o nestejnoměrné rozdělování složek, při nichž dochází k postupnému a mnohokrát opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi – stacionární a mobilní [21-23]. Výsledkem je rozdílná rychlost migrace rozpuštěných látek [22].

Mobilní (pohyblivá) fáze unáší separované látky přes **stacionární** (fixovanou) fázi, která je umístěna v koloně [21-23]. V případě kapalinové chromatografie je mobilní fází vždy kapalina, zatímco stacionární fázi může tvořit pevná, porézní, povrchově aktivní látka ve formě malých částic nebo tenká vrstva kapaliny na pevném nosiči [24]. Pohyb separovaných částic je ovlivňován vzájemnými interakcemi se stacionární a mobilní fází, které jsou základním předpokladem pro úspěšnou separaci [21,23]. Částice, které mají vyšší afinitu ke stacionární fázi, se při průchodu kolonou více zdrží. Tím se postupně složky od sebe oddělují (separují) a kolonou projdou dříve složky s nižší afinitou ke stacionární fázi. O separaci složek vzorku rozhodují nejen jejich interakce se stacionární fází, ale velmi výrazně i použitá mobilní fáze [25]. Z pohledu složení mobilní fáze se rozlišují dva základní způsoby eluce. **Izokratická** – složení mobilní fáze je konstantní

po celou dobu uvolňování složek z kolony [23]. **Gradientová** – složení mobilní fáze se mění během separace – vzrůstá její eluční síla [26].

Hlavní výhodou kapalinové chromatografie je, že k dělení látek je možno využít všechny vratné dvoufázové separační mechanismy [21]. Na základě vlastností stacionární fáze a typů vzájemných interakcí, které se podílejí na distribučním procesu, lze určit převládající separační mechanismus:

- **adsorpce** – sorpce látek na povrch pevné stacionární fáze, o separaci rozhoduje různá schopnost složek poutat se na povrch stacionární fáze (adsorpční chromatografie),

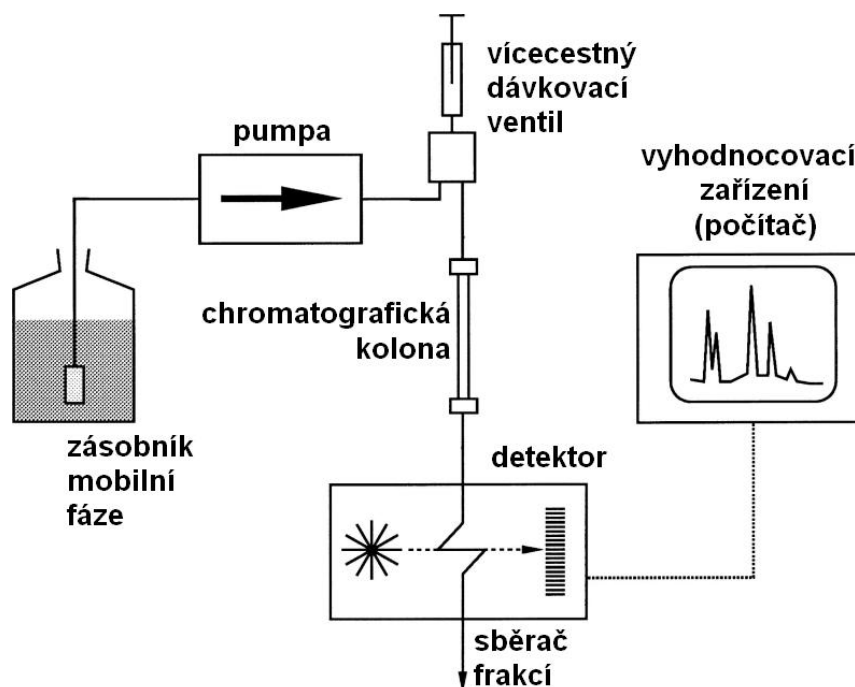
- **rozdělování mezi dvě nemísitelné kapaliny**, o rozdělení směsi rozhoduje rozpustnost látek v mobilní a stacionární fázi (rozdělovací chromatografie),

- **sítový neboli permeační efekt** – molekuly pronikají z volné mobilní fáze do stejné kapalně fáze, která je uzavřena v pórech tuhé stacionární fáze, rozdělují se na základě velikosti (gelová permeační chromatografie),

- **výměna iontů** – o separaci rozhodují různě velké elektrostatické síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze (iontoměniče) a ionty v separované směsi (chromatografie na iontoměničích),

- **biospecifická interakce** – základem je vysoce selektivní vazba stacionární fáze a separované složky (afinitní chromatografie) [21,23,25].

Zařízení pro kolonovou chromatografii, jejíž stacionární fáze je umístěna v trubici (koloně), se skládá z těchto základních částí: vybavení zabezpečující čerpání mobilní fáze (pumpa), zařízení na nanesení vzorku (vícecestný dávkovací ventil) nebo automatický dávkovač vzorku (autosampler), součást na separaci složek (chromatografická kolona), detektor separovaných složek, sběrač frakcí a vyhodnocovací zařízení (počítač) [21,23-25]. V případě využití gradientové eluce se přidává ještě směšovač mobilní fáze. Nejpoužívanějšími detektory v kapalinové chromatografii jsou fotometrický (měří absorbanci eluátu vycházejícího z kolony), refraktometrický (měří rozdíly mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní fáze) a fluorescenční (založen na principu fluorescence – schopnosti látek absorbovat UV záření a pak vysílat záření o vyšší vlnové délce) [25]. Schéma kapalinového chromatografu je znázorněno na obrázku 6 [24].



Obrázek 6: Schéma kapalinového chromatografu (převzato z [24]).

Pro separaci proteinů je možné využít **Afinitní chromatografii**, která je založena na biospecifické interakci stacionární fáze a látky ze separované směsi [19]. Bílkoviny interagují s ligandem nebo iontem kovu imobilizovaným na stacionární fázi [27].

Další metodou může být **Chromatografie na měničích iontů (IEC)**, kde je principem dělení směsí na základě odlišnosti elektrostatických sil, jimiž se látka váže na stacionární fázi (iontoměnič) určitým typem iontů a místo něho uvolňuje do roztoku jiný ion [21-22]. Proteiny je možné, díky jejich amfoternímu charakteru, separovat jako anionty nebo kationty v závislosti na pH [27].

Jednou z univerzálních metod kapalinové chromatografie, která se také používá pro izolaci a separaci proteinů a peptidů, je **Chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC)**, která probíhá v systému dvou vzájemně nemísitelných kapalných fází, v němž stacionární fáze je méně polární než mobilní fáze [22,24]. Látky ze separované směsi se rozpouštějí mezi obě fáze [22]. Nepochárné sloučeniny jsou eluovány později než polární sloučeniny [24]. Významné je použití RP-HPLC k určení kvality bílkovin pšenice pro výběr odrůd při křížení a analýzu rozdílů při pěstování v různých lokalitách, nebo také pro studium proteinových interakcí s dalšími složkami endospermu [15].

2.2.2.1 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie (GPC, nebo také velikostně vylučovací chromatografie (Size Exclusion Chromatography – SEC) je typem kapalinové chromatografie, kde jsou jednotlivé molekuly analyzovaných látek separovány podle jejich velikosti, tvaru či molekulové hmotnosti [21,26].

Stacionární fázi tvoří porézní částice hydrofilního gelu, jejichž póry jsou naplněny mobilní fází. Jako gely jsou využívány materiály typu zesíťovaných dextranů (např. Sephadex®), agarosy, makroporézní silikagel, či syntetické polymery (polyakrylamid a jeho kopolymery) [21-23].

K separaci látek dochází tehdy, když molekuly mají rozdílné velikosti. Malé molekuly jsou ve srovnání s většími více zadržovány ve stacionární fázi v důsledku jejich pronikání – **permeace** – do větší hloubky pórů v gelu. Nejmenší molekuly tedy urazí při průchodu kolonou nejdelší dráhu (mají k dispozici největší volný objem) a eluují v nejdelším elučním čase. Čím jsou molekuly větší, tím je méně pórů, do kterých mohou pronikat a zůstávají tedy mimo částice gelu. Velké molekuly, jejichž průměr je větší než průměr pórů v gelu, nepronikají do pórů vůbec, kolonou se pohybují nejrychleji a eluují jako první [16]. Interakce molekul vzorku se stacionární fází nenastává [25].

Gelová permeační chromatografie nachází široké uplatnění v biotechnologických procesech při izolaci a purifikaci makromolekulárních látek (enzymy, proteiny, nukleové kyseliny, atd.) a jejich odsolování [23]. Při GPC se proteiny dělí na základě své molární hmotnosti [27].

2.2.3 Elektroforéza

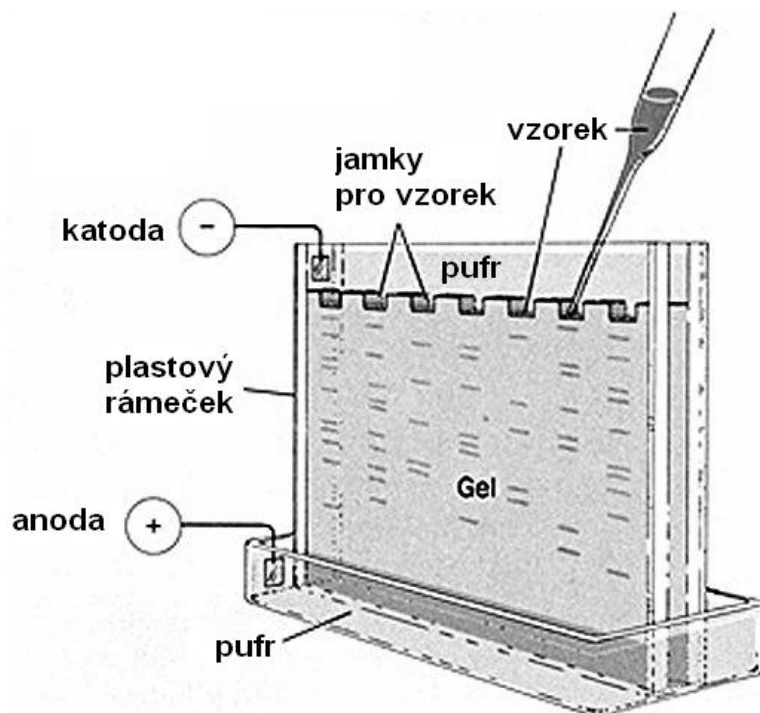
Elektroforéza je dělicí metoda, která se řadí mezi elektromigrační separační techniky. Principem separace složek vzorku je rozdílná rychlost migrace elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Jestliže jsou látky nesoucí náboj rozpuštěny v elektrolytu a umístěny v elektrickém poli, začnou se v elektrickém poli pohybovat konstantní rychlostí úměrnou jejich pohyblivostem k opačně nabitě elektrodě [22,25]. Kationty migrují k záporné elektrodě (katodě), anionty ke kladné elektrodě (anodě) a neutrální molekuly či částice se nepohybují [25]. Rychlost migrace částic závisí na velikosti náboje, velikosti a tvaru molekuly, na povaze nosiče, elektrolytu, atd.

U amfoterních iontů jako jsou proteiny a peptidy velikost náboje závisí na pH, protože proteiny a peptidy mohou existovat ve třech nábojových formách [19].

Pro analytické účely se běžně používá **plošné uspořádání zónové elektroforézy**, kde je prostředí mezi elektrodami tvořeno základním elektrolytem, který zajišťuje dostatečnou elektrickou vodivost v celém systému [22,25]. Separace se provádí v antikonvekčních mediích, aby se zabránilo tepelné difuzi a konvekčním proudům v kapalině. Elektroforetické nosiče musí být hydrofilní, nerozpustné ve vodě a měly by mít co nejmenší adsorpční schopnosti [22]. Používají se zejména gelové materiály, a to polyakrylamidový, agarosový gel, v tenké vrstvě na skleněných deskách (gelová elektroforéza) [22,25]. Plošný nosič je napuštěn základním elektrolytem a je umístěn v elektroforetické komoře. Elektrody jsou umístěny v elektrodových prostorech naplněných elektrodovým pufrem, které jsou umístěny na protilehlých stranách gelu. Po vložení napětí se vlivem odlišné rychlosti migrace složek vzorku v průběhu separace vytvářejí oddělené zóny jednotlivých složek. Zóny se detekují a vyhodnocují až po separaci [25].

Ionty jsou při průchodu médiem vystaveny odporu sil vnitřního tření. Jejich pohyblivost je tedy výsledkem rovnováhy mezi elektrostatickou silou a silou vnitřního tření, která působí v opačném směru. Při použití gelových materiálů se při separaci látek využívá principu molekulárního síta. Molekuly jsou ve svém pohybu gelem omezovány a jejich rychlost tedy závisí na hustotě gelového síta. Velké molekuly jsou zpomalovány více než molekuly malé a proto za daný čas urazí kratší vzdálenost [22].

Pravděpodobně nejvýznamnější metodou je **elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE)** v plošném uspořádání, která se provádí ve speciálních aparaturách, v nichž se nosič se vzorkem k separaci umístí mezi dvě elektrody, mezi nimiž prochází stejnosměrný proud. Plošné uspořádání se provádí buď horizontálně (gelová deska je umístěna v přístroji ve vodorovné poloze), nebo vertikálně (gelová deska je kolmo na podložku, viz obrázek 7). Oba tyto způsoby mají své speciální použití [22].



Obrázek 7: Schéma přístroje pro vertikální elektroforézu (převzato z [22]).

Aby bylo dosaženo uspokojivé separace, je nezbytné nanést velmi malý objem koncentrovaného vzorku na start jako ostrý, úzký pruh, což je velmi náročné. Proto byla zavedena technika diskontinuální elektroforézy v polyakrylamidovém gelu, která používá dva gely s různě velkými póry a několik pufrů s odlišným pH. Jako první přijde do styku s dělenou směsí **zaostřovací gel** s velkými póry, v němž probíhá dělení iontů na principu izotachoforézy. Makromolekuly zde migrují ve velmi úzkých zónách, které jsou seřazeny podle svých pohyblivostí. Takto vstupují do **separačního gelu** (běžný gel používaný při zónové elektroforéze), kde dojde k rozdělení jednotlivých molekul. V separačním gelu se vedle elektroforetické pohyblivosti uplatní i princip molekulárního síta [22].

2.2.3.1 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným

Elektroforéza v polyakrylovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE) je separační technika určená výhradně pro peptidy a proteiny [22,28]. Základem je elektroforéza komplexů denaturovaných proteinů a peptidů s anionaktivním detergentem dodecyl sulfátem sodným (SDS) [28]. SDS nese záporný náboj a proto výsledné komplexy SDS-protein jsou v neutrálním a alkalickém prostředí silně negativně nabitě a putují k anodě, přičemž se vyrovnávají nábojové rozdíly proteinových molekul a ty se pak v gelu dělí pouze podle velikosti (respektive molekulové hmotnosti). Všechny proteiny vážou asi

1,4 g SDS na 1 g proteinu a v důsledku odpuzování adsorbovaných záporných nábojů SDS získají jednotnou tyčinkovitou konformaci. Jejich délka tak přibližně odpovídá relativní molekulové hmotnosti molekuly. Procházejí-li komplexy SDS-protein polyakryamidovým gelem o vhodné porozitě, je jejich pohyblivost přímo úměrná logaritmu molekulové hmotnosti příslušného proteinu [22,28]. Separované proteiny jsou nejčastěji detekovány specifickým barvením (např. ninhydrinem, stříbrem, Commassie Blue), fluorescenčním nebo radioaktivním značením [28].

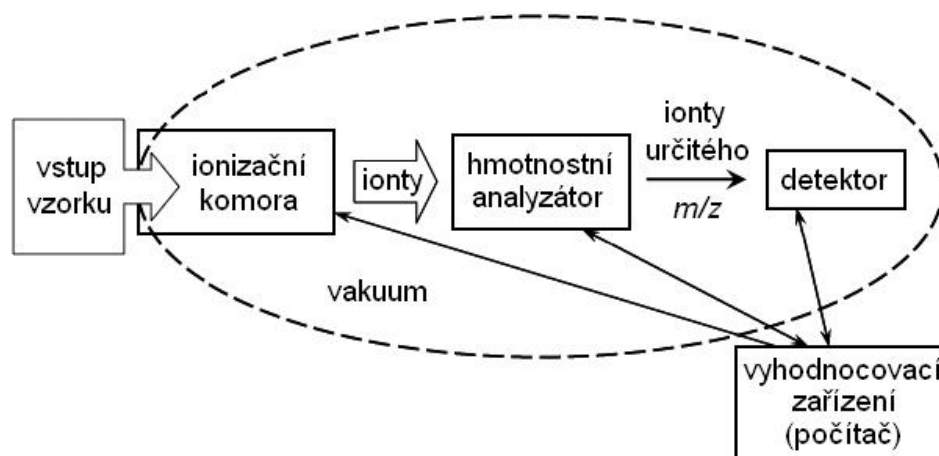
Hodnoty relativní molekulové hmotnosti jednotlivých proteinů získáme porovnáním se směsí standardních proteinů. Nevýhodou je, že vazbou SDS na protein ve většině případů dochází ke ztrátě jeho biologické aktivity, takže např. enzymy již po proběhnutí elektroforézy není možné na základě aktivity prokázat [22].

SDS-PAGE je jednou z hlavních a relativně levných metod využívaných při separaci pšeničných proteinů [28].

2.2.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je mikroanalytická technika, která převádí vzorek na ionizovanou plynnou fázi a vzniklé ionty separuje podle poměru jejich hmotnosti a náboje m/z v elektrickém nebo magnetickém poli [20,24,28]. Vzájemným srážkám částic v plynném stavu brání hluboké vakuum (10^{-4} až 10^{-8} Pa), čímž je zaručeno, že k ionizaci dochází pouze žádoucím způsobem a nedochází k dalším fragmentacím molekul analyzované látky [25].

Základní kroky v hmotnostní spektrometrii jsou uvedeny na obrázku 8 [29]. Analyzovaný vzorek v pevném nebo kapalném stavu je na vstupu nejprve zplyněn. V plynném stavu je přiveden do ionizátoru. Proud molekulových iontů a iontových fragmentů analyzované látky se přes štěrbinu vlivem silného elektrického pole urychlí a vstupuje jako tenký svazek letících částic do hmotnostního analyzátoru. V něm dochází k rozdělení iontů podle individuálních hodnot m/z na základě různých fyzikálních principů. Po průchodu analyzátozem jsou ionty zaznamenány iontovým detektorem. Signály jednotlivých iontů jsou zaznamenány, čímž vznikne **hmotnostní spektrum**, což je závislost relativní intenzity iontového proudu na podílu m/z [21,25,29].



Obrázek 8: Schéma běžného hmotnostního spektrometru (převzato z [29]).

K dispozici je několik různých ionizačních metod. Pro identifikaci proteinů se využívají šetrné ionizační způsoby, aby se ionizací neoddělily nekovalentně vázané částice. Mezi ně patří elektrosprejová ionizace (ESI), ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI), rezonanční multifotonová ionizace (REMPI) [30].

Elektrosprejová ionizace se používá k přenosu vzorku z roztoku nebo aerosolu do plynné fáze. Analyt se rozpustí v těkavém rozpouštědle a tento roztok je rozstříknut jehlou do elektrického pole tak, aby vytvořil nabitě kapičky o průměru v řádu mikrometrů. Pro snazší odpaření rozpouštědla, je jehla vyhřívána proudem okolního tzv. nebulizačního plynu (obvykle N_2). ESI se uplatňuje zejména při analýze velkých, netěkavých, nabitých molekul jako jsou proteiny nebo nukleové kyseliny [30].

V metodě **MALDI** je zkoumaný vzorek součástí pevné matrice, odkud je odpařen laserem a ionizován přenosem protonu z této matrice. Matrice je nedílnou součástí této ionizační techniky, proto by měla být snadno rozpustná ve stejném rozpouštědle jako vzorek, aby byla možná jejich společná krystalizace. Laserový paprsek je aplikován v podobě krátkých pulsů, takže ionty nejsou generovány nepřetržitě [30].

REMPI probíhá za studena a k odpaření vzorku využívá nadzvukové proudové expanze. Expanzí dochází k silnému chladicímu účinku na molekulách analytu v roztoku vzorku. Díky tomu mohou být snadno vytvořeny nekovalentní komplexy v plynné fázi. Jsou však stále neutrální, proto jsou následně fotoionizovány laserovým paprskem prostřednictvím multifotonové absorpce [30].

Hmotnostní analyzátory využívají fyzikální principy separace vytvořených iontů vycházejících z ionizačního zdroje. V kombinaci s uvedenými ionizačními metodami se nejčastěji využívá kvadrupólový analyzátor, iontová past (IT), detektor doby letu (TOF) a iontová cyklotronová resonance (ICR) [30].

Kvadrupólový analyzátor obsahuje čtyři paralelní kovové tyče, do nichž je přiváděno konstantní stejnosměrné napětí (**U**) a současně radiofrekvenční pole (**V**). Nastavení hodnot **U** a **V** předurčuje trajektorii dráhy letu iontů mezi tyčemi, postupnými změnami hodnot **U** a **V** se separují ionty různé hodnoty m/z [25,30].

Iontová past pracuje podobně jako kvadrupól, má však jen tři elektrody, z nichž jedna je kruhová a dvě vyklenuté do prostoru kruhu. V tomto prostoru se shromažďují ionty. Změnou nastavení veličin **U** a **V** jsou ionty odváděny k detektoru [25].

V **detektoru doby letu** je celý vzorek iontů akcelerován najednou. Všem iontům se dodává stejná energie. Ionty vstupují do letové trubice, na jejímž konci je detektor. Doba průletu odpovídá hodnotě m/z , takže na detektor postupně dopadají ionty od nejlehčího po nejtěžší [25,30].

V **iontové cyklotronové resonanci** se měří cyklotronové frekvence iontů obíhajících uvnitř cívky supravodivého elektromagnetu [30].

Poslední součástí hmotnostního spektrometru je iontový detektor, který převádí proud dopadajících iontů na proud elektronů. Pravděpodobně nejpoužívanějším detektorem je elektronový násobič, který je zkonstruován jako zužující se trubice, do jejíž širší části dopadají ionty [25].

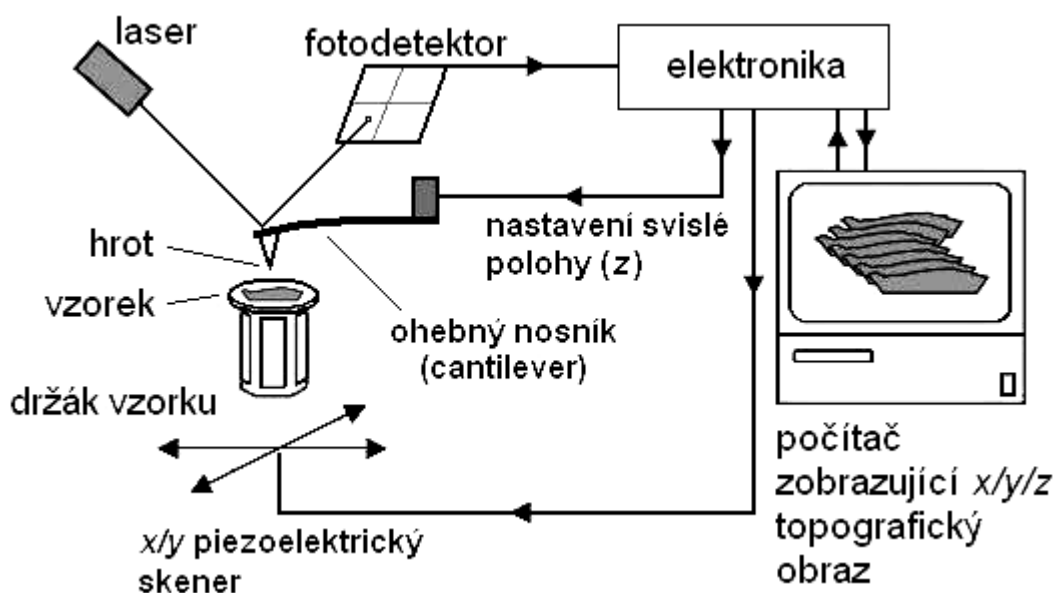
Hmotnostní spektrometrie je všestranná, rychlá a citlivá analytická metoda, která se využívá ke kvalitativní i kvantitativní chemické analýze [25]. Slouží k identifikaci chemických individuů a umožňuje nepřímé stanovení molární hmotnosti analytu podle hodnoty m/z [21,29]. Proto se využívá i jako detektor u různých separačních metod, přičemž je schopná z jednoho vzorku získat více informací o struktuře analytu [25,29].

2.3 Mikroskopické metody

Mikroskopické metody slouží k zobrazení struktur, které nejsou viditelné pouhým okem. Studium pšeničného lepku (popřípadě těsta) pomocí různých mikroskopických technik může být odhalena mikrostruktura jeho trojrozměrné sítě [31]. Pro tyto účely se využívají různé typy mikroskopie, např. světelná mikroskopie (LM) [32-33], transmisní elektronová mikroskopie (TEM) [34], rastrovací elektronová mikroskopie (SEM) [35-37], konfokální laserová skenovací mikroskopie (CLSM) [38-40] a mikroskopie atomárních sil (AFM), kterou se zabývá následující text.

2.3.1 Mikroskopie atomárních sil

Mikroskopie atomárních sil (AFM) se stala nejrozšířenější podskupinou mikroskopických a analytických metod souhrnně nazývaných **mikroskopie rastrovací sondou**, které se používají k trojrozměrnému zobrazování povrchů [41-42]. AFM je založena na mapování atomárních sil na povrchu vzorku prostřednictvím ostrého hrotu (méně než 10 nm v průměru), kterým pomocí interakce s povrchem monitoruje jeho topografii, případně i některé vlastnosti vzorku. Obraz povrchu vzorku se zde sestavuje postupně, bod po bodu [42]. Principem je kontrolovaný pohyb ostrého hrotu po povrchu studovaného vzorku ve směru všech tří os souřadného systému. Souřadnice hrotu jsou zaznamenávány v počítači, z čehož je následně vytvořen topografický obraz povrchu vzorku (viz obrázek 9) [30,43-44].



Obrázek 9: Schéma mikroskopu atomárních sil (převzato z [30] upraveno podle [43]).

Základem AFM je 100 až 200 μm dlouhý ohebný nosník (tzv. **cantilever**), který je na jednom konci fixovaný, zatímco na jeho druhém konci je kolmo upevněn hrot, který se pohybuje nad vzorkem nebo v dotyku s ním a je vzorkem odpuzován či přitahován [42-44]. Interakce mezi hrotem a povrchem vzorku je určována silami, kterými na sebe působí atomy obou těchto složek [44]. Hroty jsou vyráběné technikou iontového odprašování, nebo se používají nanohroty tvořené uhlíkovými vlákny a nanotrubicemi, které se vyznačují nízkými hodnotami vrcholových úhlů [41]. Dalšími součástmi mikroskopu AFM jsou mechanická část zabezpečující stabilitu a nastavení polohy ve všech třech rozměrech a elektronická část (včetně počítače) zajišťující napájení, součinnost všech částí, zpětnou vazbu, ovládání a sběr naměřených dat. Důležitou vnější součástí mikroskopu je vybavení k tlumení mechanických vibrací (např. umístění přístroje na antivibračních stolech) [44].

Vzorek se umístí na držák vzorku s registrovatelným posunem do těsné blízkosti nosníku. Během měření je pohybováno držákem vzorku pomocí piezoelektrických skenerů, čímž se hrot pohybuje vzhledem k povrchu vzorku. Účinkem působení odlišných interaktivních sil se nosník různě ohýbá. Měřením ohybu nosníku jsou získávány informace o velikosti interakce, proto musí mít nosník velmi malou tuhost, aby bylo možné registrovat působení velmi slabých interakčních atomárních sil v průběhu rastrování povrchu. Celkový detekovaný signál je navíc ovlivňován i vlastnostmi nosníku a eventuálními dalšími vlivy (např. kapilárními silami při možné přítomnosti vody na povrchu vzorku) [44]. Detekce ohnutí nosníku se nejčastěji provádí jednoduchou optickou metodou pomocí laserového paprsku odraženého od zadní stěny nosníku. Laserový paprsek z diody se nechá dopadat na nosník, od něho se odráží a dopadá na polohově citlivý fotodetektor. Změní-li se ohnutí nosníku, změní se i úhel dopadu paprsku na nosník a odrazí se do jiného místa fotodetektoru, z čehož se určí ohnutí nosníku [41-42].

Pohybování je docíleno výhradně piezoelektrickými skenery, které jsou schopny realizovat pohyby menší než desetina nanometru definovaně ve směrech x , y a z [42,44]. Piezoelektrický skener se pohybuje vzorkem ve směrech x a y a skenovací hrot se pohybuje ve směru osy z [43]. Pro pohybování hrotu po povrchu vzorku se využívá dvou metod – prostého tažení hrotu po povrchu (tzv. **kontaktní**) – je možné provádět ve dvou možných režimech: s kontinuální výškou nebo s kontinuální silou; nebo frekvenční s rozkmitáním nosníku (tzv. **bezkontaktní**) [44].

Při režimu s konstantní výškou se udržuje konstantní výška sondy (základní poloha nosníku) a měří se ohnutí nosníku. Hrot je mírně vtlačěn do vzorku a je-li povrch vzorku nerovný, má nosník v různých místech vzorku různou velikost ohnutí a zaznamenáváním změn je možné sestavit zvětšený obraz vzorku [42,44].

Při režimu s konstantní silou (popř. konstantním ohnutím) se udržuje stejné ohnutí nosníku a měří se výška sondy [44]. V každém bodě se porovná současná hodnota ohnutí s přednastavenou hodnotou, a pokud se liší, nosník s hrotem se přiblíží nebo oddálí od vzorku o takovou vzdálenost z , aby se hodnota ohnutí opět shodovala s přednastavenou hodnotou [42].

Měření frekvenční s rozkmitaným nosníkem se využívá při bezkontaktní metodě, v nichž není mezi hrotem a vzorkem přímý mechanický kontakt [42-44]. Hrot a vzorek na sebe působí především skrze Van der Waalovu, elektrostatickou nebo magnetickou sílu [41,44]. Protože tyto síly jsou velmi malé, provádí se bezkontaktní režim tak, že je nosník rozkmitáván a místo jeho ohnutí se měří změny v rezonanční frekvenci nebo vibrační amplitudě vlivem přiblížení hrotu k povrchu vzorku. Na základě těchto změn je možné sestavit obraz povrchu vzorku [42-44].

Další možností pohybu hrotu po povrchu vzorku je AFM s přerušovaným kontaktem (tzv. **semikontaktní**), kde se vibrující hrot přiblíží k povrchu vzorku takovým způsobem, že je vzorek přerušovaně kontaktován („poklepávání“). Stejně jako v bezkontaktní AFM se amplituda kmitání hrotu mění vlivem přiblížení hrotu k povrchu vzorku [43].

Každý z těchto způsobů má své přednosti a svá negativa, proto se jejich použití volí podle charakteru studovaného vzorku. V případě bezkontaktní metody se snižují artefakty způsobené tuhostí nosníku a režim s konstantní silou pomáhá eliminovat působící kapilární síly [44].

Souřadnice pozice piezoelektrických skenerů a rastrovacího hrotu se zaznamenává počítačem a výsledná topografie povrchu se rekonstruuje jako obraz s možností různé prezentace. Nejnázornější zobrazení s pomocí počítače je vyobrazení reliéfu povrchu v trojrozměrném zobrazení (3D) s možností otáčení nebo náklonu obrazu. Nicméně, získané údaje je možné prezentovat také v dvourozměrném zobrazení (2D). Reliéf se zobrazí ve stupnici optických hustot, prohlubně se zobrazí v tmavších odstínech, vyvýšeniny pak jako odstíny světlé. Připojená škála sytosti odstínů pak dovoluje posoudit

reliéf. Pomocí počítače je také možné z obrazů získat další informace (např. vzdálenost, výškové rozdíly, průměrný sklon, apod.). Frekvenční měření s rozkmitaným nosníkem může poskytnout také fázový obraz, který zaznamenává údaje o fázovém zpoždění kmitů mezi budicí frekvencí a výslednou frekvencí nosníku, což vypovídá o lokálních mechanických vlastnostech (viskoelasticitě, tlumení) [44].

AFM dosahuje velmi vysokého rozlišení – může zobrazovat i atomy [42]. Velikost rozlišení obrazu závisí pouze na parametrech sondy, především na ostrosti hrotu [44]. Přesnost AFM je podmíněna přesností udržování polohy hrotu, přesností jeho pohybu a schopností detekce ohnutí [42].

Nevýhodou AFM je velmi omezený rozsah velikosti obrázku (řádově stovky mikrometrů) a pomalost snímání (až minuty na jeden obraz), třebaže nejmodernější přístroje umožňují snímání až několika snímků za sekundu, avšak při omezeně velkém zorném poli a rozlišení. Dále je omezena i maximální výška vzorku (vertikální rozsah), který bývá nejčastěji desítky mikrometrů. Problémy způsobuje také blízkost hrotu a vzorku (silná interakce, možnost zachycení hrotu, znečištění hrotu) [42].

Ovšem mezi výhody této metody patří použitelnost u elektricky vodivých i nevodivých materiálů, a to jak na vzduchu, tak v kapalině, či ve vakuu, za běžných experimentálních podmínek, aniž by to nějak nepříznivě ovlivnilo jejich funkci [41,44]. AFM může dokonce pracovat v kapalném prostředí, což je výhodné především pro studium biologických vzorků, které mohou být při zobrazování ve svém fyziologickém prostředí a lze v některých případech sledovat jejich funkci nebo reakci na změnu prostředí (změna pH, teploty, chemického složení) [42]. Techniku AFM lze použít nejen k zobrazování, ale také k tvorbě struktur či manipulaci s povrchem vzorku v nanometrové oblasti ve spojení s aplikací v biologii [42-43]. U biologických vzorků je AFM zvláště užitečná pro kvantifikaci vazebných sil mezi receptory a ligandy, proteiny a buňkami s pomocí chemicky modifikovaných hrotů. Používá se také pro studium materiálových vlastností biologických vzorků (např. tuhost, plasticita a viskozita) [43].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo najít odlišnosti v poměru jednotlivých frakcí pšeničných bílkovin stanovených gelovou permeační chromatografií v závislosti na pekařské kvalitě mouky, především lepku, která je dána technologickými ukazateli pekařské kvality mouky. Dalším cílem je také vývoj metodiky pozorování mikrostruktury pšeničného lepku metodou AFM a porovnání této mikrostruktury pro různé vzorky mouky. Nakonec bylo cílem rovněž nalezení korelací mezi získanými výsledky a jednotlivými technologickými ukazateli kvality pšeničné mouky.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Použité chemikálie, pomůcky a přístroje

Chemikálie:

- 1,4-Dithiothreitol (Carl Roth, Německo)
- 2-mercaptoethanol (Carl Roth, Německo)
- Acetonitril (J.T. Baker, Nizozemsko)
- Akrylamid (Carl Roth, Německo)
- Coomassie blue G-250 (SERVA Electrophoresis, Německo)
- Deionizovaná voda připravena na přístroji AquaOsmotic (Tišnov)
- Dihydrogenfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich, Německo)
- Dodecylsulfát sodný (Carl Roth, Německo) (dále jen SDS)
- Dusičnan stříbrný (Carl Roth, Německo)
- Ethanol (PENTA, Chrudim)
- Formaldehyd (Lach-Ner s.r.o., Neratovice)
- Glycerol (Sigma-Aldrich, Německo)
- Glycin (PENTA, Chrudim)
- Hydrogenuhlíčan amonný (PENTA, Chrudim)
- Chlorid sodný (Lach-Ner s.r.o., Neratovice)
- Jodacetamid (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina chlorovodíková (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)
- Kyselina mravenčí (Carl Roth, Německo)
- Kyselina octová (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)
- Lyofilizovaný trypsin (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
- N,N'-Methyl-bis-akrylamid (Carl Roth, Německo) (dále jen bis-akrylamid)
- Peroxodisíran amonný (Lach-Ner s.r.o., Neratovice)
- Proteinový standard molárních hmotností (Ascoprot Biotech s.r.o., Zlín)
- Tetramethylethylendiamin (Carl Roth, Německo) (dále jen TEMED)
- Thiosíran sodný (Lach-Ner s.r.o., Neratovice)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Carl Roth, Německo) (dále jen Tris)
- Uhlíčan sodný (PENTA, Chrudim)

Pomůcky a přístroje:

- Analytické váhy (Denver Instrument SI-234 A)
- Atomárně rovný křemíkový ingot (křemíkový „wafer“ s orientací krystalu 111 (Si 111), ON SEMICONDUCTOR s.r.o., Česká republika)
- Automatické mikropipety (Nichipet EX, Nichiryo, Japonsko)
- Běžné laboratorní sklo a vybavení
- Centrifuga (Marathon 21000R, Fisher Scientific, USA)
- Centrifugační koncentrátor SpeedVac (Savant)
- Elektrická sušárna (UFB 500, Memmert, Německo)
- Elektrická vývěva (KNF Lab, Laboport)
- Elektroforetická aparatura s vertikálním umístěním gelu (SV10-CDC, Sigma-Aldrich, Německo)
- Filtrační nitrocelulózová membrána (průměr 50 mm, velikost pórů 4 μm , Pragoport, Pragochema s.r.o.)
- Hmotnostní spektrometr s iontovou pastí amaZon X (Bruker Daltonics, Brémy, Německo)
- Chromatografická kolona BioSep-SEC-S 4000, 300 \times 7,80 mm (Phenomenex)
- Chromatografická pumpa LCP 5020 (INGOS s.r.o., Česká republika)
- Laboratorní třepačka (TPM-2, Desaga Sarstedt-Gruppe, Německo)
- Magnetická míchačka (120S, Fisher Scientific, USA)
- Mikroskop atomárních sil NTEGRA-Prima (NT-MDT, Rusko)
- Mikrozkuhavky (Sarstedt-Gruppe, Německo)
- pH metr (CPH 51, Ellecd)
- Počítač s programem pro vyhodnocení CHROMuLAN v0.79.
- Průtokový UV-Detektor LCD 5000 (INGOS s.r.o., Česká republika)
- Předvážky (ACB 600H, Schoeller Instrument s.r.o., Praha)
- Sběrač frakcí (Frac-920, GE Healthshare Bio-Sciences AB, Švédsko)
- Špičky pro mikropipety (Sarstedt-Gruppe, Německo)
- Termostat s vanou (EC-PA/KÚ, Julabo Labortechnik, Německo)
- Ultrazvuková čistička (PS 03000A Notus-Powersonic s.r.o., Slovensko)
- Vortex-Genie 2 (G560, Scientific Industries Inc, USA)
- Zdroj konstantního napětí pro elektroforézu (FB 135, Fisher Scientific, USA)

4.2 Studované vzorky mouky

Pro studium vztahu mikrostruktury pšeničného lepku a kvantitativního zastoupení lepkových bílkovin v pšeničné mouce byly zvoleny tři vzorky hladké mouky z pšenice seté (*Triticum aestivum* L.), od firmy PENAM a.s., vymleté ve mlýně NOBRS s.r.o. Brněnec, u kterých byla stanovena pekařská kvalita lepku pomocí níže uvedených technologických ukazatelů. Vzorky jsou označeny **VZ1**, **VZ2** a **VZ3** s tím, že pořadí je dáno vzrůstajícím obsahem dusíkatých látek, resp. mokrého lepku.

4.3 Technologické ukazatele kvality lepku

Technologických ukazatelů kvality pšeničného lepku je celá řada, ovšem za nejdůležitější a nejpřesnější se považuje objem pečiva získaného za definovaných podmínek, tzv. pokusné pečení. Bohužel tato metoda nemohla být v práci použita z důvodu nedostatečného množství mouky. Namísto toho byly použity jiné metody, které také charakterizují kvalitu pšeničného lepku. Těmi jsou obsah dusíkatých látek, obsah mokrého lepku, sedimentační index a Gluten index.

4.3.1 Obsah mokrého lepku

Bylo naváženo cca 10 g mouky s přesností na 0,01 g. Mouka byla zadělána v misce se zhruba 5 ml **2% roztoku chloridu sodného** v tuhé těsto (přesné množství roztoku NaCl bylo předurčeno vazností mouky, což je množství vody, které mouka přijme při zpracování na těsto). Příprava těsta trvala přibližně 10 min. Uhnětená kulička těsta byla ponechána 30 min odležet přikrytá hodinovým sklem. Po odležení byl vypírán lepek pod mírným proudem studené vody tak dlouho, dokud odtékající voda již nebyla zakalena škrobem (přibližně 10 minut). Vypraný lepek byl zbaven přebytečné vody důkladným hnětením a mačkáním, až se lepil na prsty. Poté byl zvážen s přesností na 0,01 g.

Vyjádření výsledků:

Obsah mokrého lepku (w_L) se vypočte jako poměr hmotnosti mokrého lepku k hmotnosti suché mouky:

$$w_L = \frac{m_2}{m_1} \cdot \frac{100\%}{100\% - w_H} \cdot 100\%$$

kde

m_1 – navážka stanovovaného vzorku mouky v [g];

m_2 – hmotnost mokrého lepku [g];

w_H – obsah vlhkosti vzorku mouky, který byl stanoven rozhodčí metodou sušením 10 g mouky v elektrické sušárně při teplotě 130 °C po dobu 1 hodiny, vyjádřený v hmotnostních procentech.

4.4 Separace pšeničných bílkovin

Pro stanovení a charakterizaci pšeničných bílkovin analytickými metodami je nejprve nutné bílkoviny z mouky extrahovat, k čemuž byla vyvinuta řada postupů většinou založených na Osbornově postupné extrakci s menšími či většími modifikacemi (viz kapitola 2.2.1.).

4.4.1 Extrakce bílkovin z pšeničné mouky

Do centrifugační kyvety bylo naváženo 0,5 g vzorku mouky a rozmícháno v 5 ml destilované vody. Suspenze byla následně inkubována po dobu 30 min při laboratorní teplotě (22 °C) na třepačce za občasného vortexování. Poté byla odstředěna při 13750 ot./min. po dobu 5 min. Supernatant (5 ml) byl oddělen do čisté plastové zkumavky se šroubovacím víčkem a nerozpuštěná peleta rozmíchána v **extrakčním pufru** (0,5 % SDS w/v v 0,05 M Na₂PO₄, pH 6,9) [45]. Opět následovala 30min inkubace za laboratorní teploty na třepačce za občasného vortexování. Směs byla odstředěna při 13750 ot./min. po dobu 5 min, supernatant oddělen.

Oba supernatanty byly uchovávány v ledničce při 4°C až do doby, kdy byly aplikovány na GPC nebo SDS-PAGE.

Extrakty proteinů z nerozpuštěné pelety v extrakčním pufru s SDS jsou nejméně měsíc poměrně stabilní, ale extrakty v destilované vodě stabilní nejsou, protože z mouky do extraktu přecházejí také proteolytické enzymy, které extrakt znehodnocují. Proto byla separace bílkovin na GPC provedena co nejdříve po extrakci, aby nedošlo k ovlivnění výsledků degradací bílkovin [15].

4.4.2 Gelová permeační chromatografie

Jednotlivé extrakty bílkovin byly separovány pomocí GPC při laboratorní teplotě. Separace byla prováděna pumpou LCP 5020 na chromatografické gelové koloně BioSep-SEC-S 4000. Jako **mobilní fáze** byl používán fosfátový pufr s SDS (0,05 M PO_4^{3-} , 0,1 % SDS w/v, pH 6,9). Po úpravě pH byla mobilní fáze přefiltrována, aby nedocházelo k zanášení kolony nečistotami. Zásobník na mobilní fázi byl během separace termostátován na 40 °C, aby nedocházelo ke krystalizaci SDS a následnému ucpání kolony. Průtok při separaci byl 0,5 ml/min, tlak 2,4 MPa, detekce separovaných bílkovin probíhala v průtokovém UV detektoru při vlnové délce 214 nm [46].

Na kolonu bylo aplikováno 0,2 ml extraktu bílkovin, do kterého byla před nástřikem přidána mobilní fáze v poměru 1:1, aby se předešlo výchytkám od základny [15]. Doba jedné separace byla vždy 60 min. Frakce separovaných bílkovin byly sbírány sběračem frakcí po 2 minutách (objem frakce 1 ml). Průběh separace byl řízen a zaznamenávám programem CHROMuLAN v0.79. s následným vyhodnocením chromatogramů. Protože oddělení píků jednotlivých proteinů není příliš výrazné, byl chromatogram rozdělen na oblasti, které přibližně odpovídají eluci jednotlivých typů proteinů, pevně zvolenými hodnotami retenčních časů. Tyto časy jsou zaznačeny v chromatogramech ve výsledkové části. Jednotlivé oblasti byly označeny písmeny A-J v případě extraktů v destilované vodě a písmeny A-E v případě extraktů ve fosfátovém pufru s SDS. Dále byly programem CHROMuLAN v0.79 a spočítány plochy těchto jednotlivých zaznačených oblastí a vypočten jejich podíl na celkové ploše chromatogramu.

4.4.3 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným

Použité roztoky a chemikálie:

- **Neredukující 2x vzorkový pufr:** 4 % SDS (w/v); 20 % glycerol (w/v), 0,05 % Coomassie blue G250 (w/v); 150 mM Tris-HCl (pH 6,8).
- **Redukující 2x vzorkový pufr:** 4 % SDS (w/v); 20 % glycerol (w/v); 0,02 % Coomassie blue G250 (w/v); 150 mM Tris-HCl (pH 6,8); 1 % 2-mercaptoethanol (w/v).
- **Elektrodový pufr** (25 mM Tris; 250 mM glycin; 0,1 % SDS w/v)

Vzorky na SDS-PAGE byly připraveny tak, že k jednotlivým frakcím (nebo přímo extraktům) v mikrozkuvkách byl přidán **2x vzorkový pufr** (redukující nebo neredukující) v poměru 1:1. Před aplikací na gel byly vzorky krátce vortexovány a 5 min povařeny ve vodní lázni z důvodu zvýšení účinnosti denaturace bílkovin.

K separaci byla použita elektroforetická aparatura s vertikálním umístěním gelu, která se skládá ze zdroje konstantního napětí, elektroforetické vany, víka, dvou skel v párovém uspořádání, držáku na uchycení dvou párů skel, plastových těsnění (tzv. spacerů) a hřebenu s 10 drahami. Gel o tloušťce 1 mm se skládal ze zaostřovacího gelu v horní části a separačního gelu o 12% koncentraci polyakrylamidu v dolní části. Složení obou gelů je uvedeno v tabulce 2.

Tabulka 2: Složení zaostřovacího a separačního gelu.

Složka	Zaostřovací gel (6 ml) [ml]	Separací gel (10 ml) [ml]
H ₂ O	4,1	3,3
Roztok polyakrylamidu (30% akrylamid, 0,8% bis-akrylamid)	1,0	4,0
1,5 M Tris (pH 8,8)	–	2,5
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,75	–
10 % SDS	0,06	0,1
10 % peroxidisíran amonný	0,06	0,1
TEMED	0,006	0,004

Nejprve byl připraven separační gel. Po přidání peroxidisíranu amonného a TEMEDu začíná gel polymerovat, proto byl jeho roztok ihned důkladně promíchán a nalit mezi sestavená skla. Poněvadž separační gel na vzduchu netuhne, byl opatrně převrstven asi 1 ml destilované vody. Po ztuhnutí (přibližně 15 min) byla voda převrstvující gel odlita, popř. vysušena filtračním papírem. Připravený zaostřovací gel byl nalit na ztuhlý separační gel až těsně pod horní okraj skla a poté byl do něj zasunut hřeben. Po ztuhnutí (cca 10 minut) byla skla s gelem uchycena v držáku a vložena do elektroforetické vany. Do obou elektrodových prostorů byl nalit elektrodový pufr tak, aby byl z obou stran v kontaktu s gelem.

Po opatrném vyjmutí hřebenu byl vždy do první dráhy gelu aplikován proteinový standard známých molárních hmotností (60, 40, 30 a 20 kDa), aby bylo možné porovnáním zjistit relativní molekulovou hmotnost separovaných proteinů. Do zbývajících jamek byl aplikován vzorek v objemu 5 až 40 μl podle předpokládané koncentrace proteinů. Elektroodová komora byla přikryta víkem a připojena ke zdroji konstantního napětí, a to 90 V při průchodu vzorku zaostřovacím gelem a 120 V od okamžiku doputování vzorku na rozhraní zaostřovacího a separačního gelu.

4.4.4 Barvení gelů stříbrem

Po doputování čela elektroforézy ke spodní hranici separačního gelu byla separace ukončena (přibližně 2 hodiny). Gely byly vyjmuty ze skel, vloženy do plastové misky a následovalo barvení stříbrem.

Použité roztoky:

- **Fixační roztok** (50% ethanol; 12% kyselina octová; 0,05% formaldehyd)
- **Oplachovací roztok** (20% ethanol)
- **Citlivostní roztok** (0,02% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)
- **Barvicí roztok** (0,2% AgNO_3 ; 0,076% formaldehyd)
- **Vyvolávací roztok** (6% Na_2CO_3 ; 0,0004% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; 0,05% formaldehyd)
- **Zakončovací roztok** (12% kyselina octová)

Gel byl inkubován 2 hodiny (nebo přes noc) ve **fixačním roztoku** a poté 3krát 20 min v **oplachovacím roztoku**, potom 2 minuty v **citlivostním roztoku**. Posléze byl gel 2krát propláchnut destilovanou vodou, vždy po dobu jedné minuty. Následovalo 20 min v **barvicím roztoku**. Gel byl důkladně promyt destilovanou vodou po dobu 40 sekund. Nakonec byl gel vyvíjen 2 – 5 minut ve **vyvolávacím roztoku**. Jakmile bylo dosaženo požadované intenzity proužků, bylo barvení zastaveno přilitím **zakončovacího roztoku** přímo na gel ve vyvolávacím roztoku. Výsledný gel byl opláchnut destilovanou vodou a naskenován.

4.5 Identifikace proteinů

4.5.1 Hmotnostní spektrometrie

Proteiny obsažené v jednotlivých prouzcích rozdělených pomocí SDS-PAGE je možné identifikovat metodou hmotnostní spektrometrie.

Gel je v tomto případě barven inkubací v roztoku **0,5 % Coomassie blue G-250 v 10% kyselině octové**. Po 15 min se roztok barvy odlije a následuje odbarvování gelu **10 % kyselinou octovou** s několika násobnou výměnou roztoku, do té doby než jsou zřetelné proužky jednotlivých proteinů (3 až 4 hodiny). Po odbarvení je gel skladován v deionizované vodě při 4°C.

Použité roztoky:

- **Acetonitril (ACN)**
- **Odbarvovací pufr:** 2 mg / ml hydrogenuhličitanu amonného v 50% ACN
- **Štěpící pufr:** 2 mg / ml hydrogenuhličitanu amonného v 9% ACN
- **Překrývací pufr:** 2 mg / ml hydrogenuhličitanu amonného
- **Redukční činidlo:** 15 mg / ml dithiothreitolu (DTT)
- **Alkylační činidlo:** 18 mg / ml jodacetamid (IAA) v odbarvovacím pufru (2 mg / ml hydrogenuhličitanu amonného)
- **Zásobní trypsinový roztok:** 20 µg lyofilizovaného trypsinu v 100 µl 1 mM HCl
- **Pracovní trypsinový roztok:** kyselý trypsinový zásobní roztok zředěn 1:10 s ledovým štěpícím pufrům (2 mg / ml hydrogenuhličitanu amonného v 9% ACN)
- **Peptidový extrakční roztok:** 5% kyselina mravenčí v 50% ACN

Pufry hydrogenuhličitanu amonného mohou být skladovány až jeden měsíc při 4 °C. Redukující a alkylační roztoky připraveny vždy čerstvé [47].

Vybrané intenzivně obarvené proužky jednotlivých proteinů byly přímo z gelu vyříznuty skalpelem. Pro zvýšení účinnosti postupu byly gelové výřezy rozkrájeny na menší kousky (přibližně 1×1×1 mm). Kostičky gelu byly přesunuty do mikrozkuvek a omyty v 200 µl **odbarvovacího pufru** po dobu 30 min za občasného vortexování. Odbarvovací pufr byl odsán mikropipetou a omývání odbarvovacím pufrům stejným způsobem opakováno. Po odsátí odbarvovacího pufru byl přidán dostatek **redukčního činidla**, aby úplně překrývalo gelové výřezy a směs byla inkubována při 70 °C 10 min v termostatované vodní lázni. Redukční činidlo odsáto mikropipetou a nahrazeno

dostatkem **alkylačního činidla**, aby úplně překrývalo gelové výřezy, vortexováno, odstředěno, a inkubováno 30 – 45 min při laboratorní teplotě v temnu. Alkylační činidlo bylo odsáto a gelové výřezy omyty v **odbarvovacím pufru** po dobu 15 min za občasného vortexování. Odbarvovací pufr byl odsán a omývání opakováno. Po odsátí odbarvovacího pufru byly gelové výřezy vysušeny inkubací v **ACN** (2x – 3x), dokud nebyl gel zcela bílý a tuhý. ACN byl odsán a gelové výřezy byly sušeny v otevřených mikrozkušavkách při teplotě 37 °C ve vodní lázni po dobu 10 – 15 minut. V tomto stavu mohou být sušené gelové výřezy skladovány při –18 °C [47].

Suché zmrzlé gelové výřezy byly převrstveny **pracovním roztokem trypsinu** a nechány rehydratovat na ledě tak dlouho, dokud gel nebyl zcela průhledný. Zbylý trypsinový roztok neabsorbovaný v gelu byl odsán a gelové výřezy převrstveny **překrývacím pufrem**, aby bylo zabráněno vysychání během štěpení. Následovala inkubace při 37 – 39 °C po dobu nejméně 3 hodin (nebo přes noc). Překrývací pufr byl přenesen mikropipetou do čisté mikrozkušavky a gelové výřezy převrstveny **peptidovým extrakčním roztokem**, 15 min vortexováno, 15 min ultrazvukováno, odstředěno při 10000 ot./min po dobu 2 min, výsledný peptidový extrakční roztok odsán a přidán do mikrozkušavky s překrývacím pufrem. Extrakce s peptidovým extrakčním roztokem se opakovala a roztok byl opět spojen s roztoky v nové mikrozkušavce. Nakonec byly roztoky vysušeny na centrifugačním koncentrátoru SpeedVac (Savant) a vysušené peptidy uskladněny při –18 °C až do doby jejich aplikace na hmotnostní spektrometrii [47].

Vysušené peptidy byly bezprostředně před analýzou na ESI-IT-MS rozpuštěny v **3% ACN s 0,1 % kyseliny mravenčí**, 5 min ultrazvukovány, 5 min vortexovány a 15 min odstředovány při 10000 ot./min. Supernatant byl pečlivě odpipetován, aniž by byly rozvířeny dolní 2 – 3 μl kapaliny a aplikován na ESI-IT-MS [47].

ESI-IT-MS analýzy se uskutečňovaly na hmotnostním spektrometru s iontovou pastí amaZon X vybaveném elektrosprejovým ionizačním zdrojem. Veškerá měření byla provedena v pozitivním ionizačním módu. Jednotlivé vzorky byly přiváděny do iontového zdroje ve formě roztoku ($\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}:\text{HCOOH}$; 100:3:0,1; v:v:v) kovovou kapilárou při konstantním průtoku $4 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Ostatní parametry byly následující: napětí na kapiláře: –4,0 kV; napětí na konci kapiláry: 140 V; teplota sušícího plynu (300 °C); průtok sušícího plynu ($6 \text{ dm}^3\cdot\text{min}^{-1}$); tlak rozprašovacího plynu (206,84 kPa). Jako sušící a rozprašovací plyn byl použit dusík. Případné další parametry byly optimalizovány během jednotlivých experimentů.

4.6 Mikroskopie atomárních sil

Pro zobrazení mikroskopické struktury trojrozměrné sítě pšeničného lepku byla použita metoda skenování rastrovací sondou pomocí Mikroskopie atomárních sil (AFM), která je založena na mapování povrchu vzorku prostřednictvím ostrého hrotu.

Skenování bylo prováděno na xerogelu lepku, který byl připraven vysušením mokrého lepku. Mokrý lepek byl připraven stejným způsobem, jako pro stanovení obsahu mokrého lepku, tudíž vypíráním uhněteného odleželého těsta pod mírným proudem vody. Vypraný lepek byl zbaven nadbytečné vody a přitisknut na atomárně rovný křemíkový ingot a zatížen vhodným těžátkem. Atomárně rovný ingot eliminuje hrubé nerovnosti na lepku a nechává vyniknout pouze samotné mikrostrukturu trojrozměrné sítě. Sušení probíhalo v elektrické sušárně za různých teplot. Po počátečním přischnutí bylo odstraněno těžátko a přilnutý lepek byl dosušen při nezměněné teplotě. Časy a teploty jednotlivých kroků byly během experimentálních prací optimalizovány. Vysušené lepky na ingotu byly přesunuty a ponechány v exsikátoru až do doby, kdy byly skenovány AFM.

Skenování mikrostruktury vypraného a vysušeného lepku bylo uskutečněno na mikroskopu atomárních sil přístroji NTEGRA-Prima v semikontaktním měřicím módu („pokleповý“ způsob) se sondou NSG10 pro nekontaktní módy (výrobce NT-MDT) s poloměrem zakřivení hrotu 10 nm. Měření probíhalo v okolní atmosféře (vzduch) při laboratorní teplotě (25 °C). Rychlost skenování byla přibližně 0,5 Hz, velikost skenované plochy 0,8×0,8 μm, 1×1 μm, 3×3 μm a 30×30 μm o rozlišení obrázků 256×256 dpi.

5 VÝSLEDKY

5.1 Technologické ukazatele kvality lepku

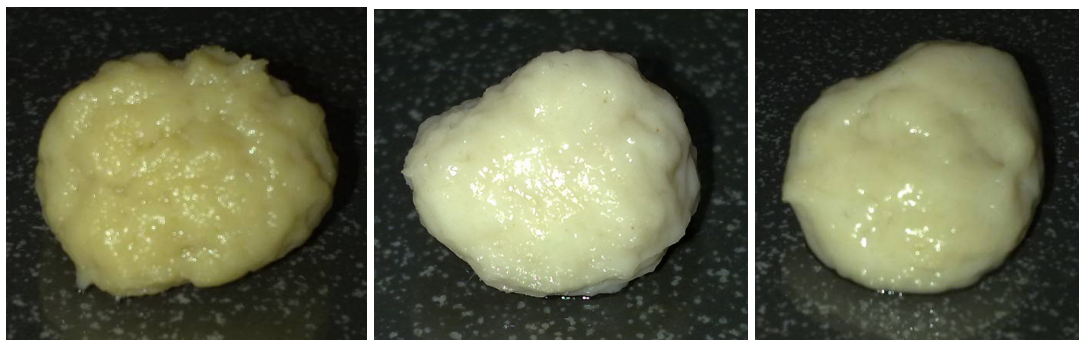
Obsah dusíkatých látek, sedimentační index, Gluten index a obsah vlhkosti byly stanoveny na spolupracujícím pracovišti Ústavu technologie potravin Agronomické fakulty Mendelovy univerzity v Brně. Obsah mokrého lepku byl stanoven vypíráním odleželého těsta pod mírným proudem vody. Výsledná hodnota byla získána aritmetickým průměrem z pěti stanovení. Všechny hodnoty ukazatelů pekařské kvality lepku a směrodatnou odchylku obsahu mokrého lepku σ uvádí tabulka 3.

Tabulka 3: Hodnoty ukazatelů pekařské kvality mouky (popř. lepku).

Vzorek	Obsah dusíkatých látek [%]	Obsah mokrého lepku [%]	σ obsahu mokrého lepku	Sedimentační index [ml]	Gluten index [%]	Obsah vlhkosti W_H [%]
VZ1	12,3	30,5	1,18	32	72	16,1
VZ2	13,7	36,9	1,85	54	74	14,0
VZ3	14,2	44,5	1,62	45	54	15,6

Vypráním pšeničného lepku z odleželého těsta byl získán mokrý lepek, jehož fotografie jsou uvedeny na obrázku 10. Při pohledu na makrostrukturu lepku pouhým okem je patrné, že lepek získaný z mouky s nejnižším obsahem dusíkatých látek (vlevo – **VZ1**) má poměrně hrubou zvrásněnou strukturu. Se vzrůstajícím obsahem dusíkatých látek se struktura zjemňuje. Lepek z mouky s nejvyšším obsahem dusíkatých látek (vpravo – **VZ3**) má už velmi jemnou hladkou strukturu.

Zároveň bylo subjektivně opticky pozorováno, že při delším stání vypraného lepku za laboratorní teploty na vzduchu se lepek ze vzorku mouky **VZ3** poměrně brzy „roztéká“, tedy nedrží stálý tvar. Naopak lepky z mouky **VZ1** a **VZ2** jsou tvarově stabilnější. Toto pozorování je v dobrém souladu s hodnotou Gluten indexu a nasvědčuje, že vzájemné interakce mezi lepkovými proteiny vzorku **VZ3** jsou slabší než u vzorků **VZ1** a **VZ2**.



Obrázek 10: Fotografie mokrých lepků (zleva VZ1, VZ2, VZ3).

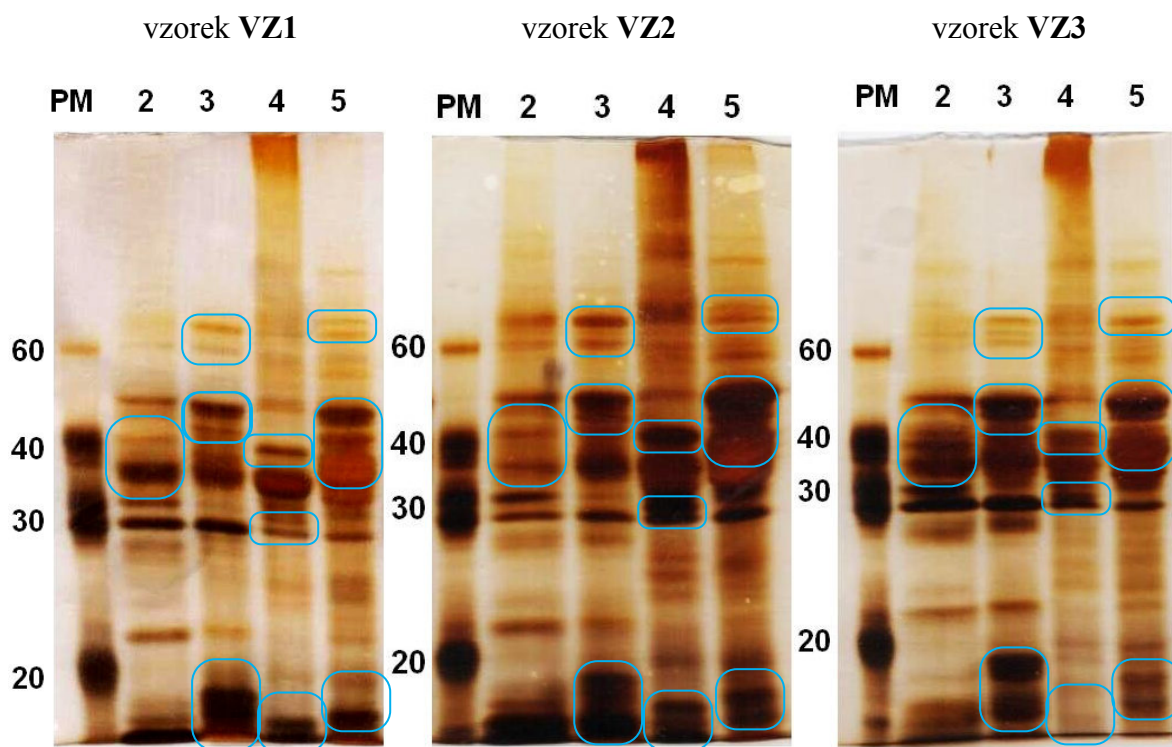
5.2 Separace pšeničných bílkovin

Poněvadž cílem diplomové práce bylo studovat rozdíly zastoupení jednotlivých bílkovin v mouce o různé kvalitě lepku, byly postup extrakce bílkovin a parametry analytických metod zvoleny tak, aby korespondovaly se zastoupením lepkových proteinů ve vypraném mokřém lepku, mikrostrukturou skenovaného vysušeného lepku a současně s technologickými metodami studie kvality lepku.

Postup extrakce proteinů vycházel z předpokladu, že vypíráním odleželého těsta pod mírným proudem vody se odstraní ve vodě rozpustné složky mouky, a tedy i ve vodě rozpustné bílkoviny (albuminy a globuliny), které nemají principiální vliv na kvalitu lepku. Proto byly extrahovány nejprve ve vodě rozpustné bílkoviny. Následně byly z nerozpuštěného zbytku suspenze mouky (pelety) extrahovány zbylé ve vodě nerozpustné bílkoviny pomocí roztoku SDS ve fosfátovém pufru. Při extrakci nebyla použita žádná redukční činidla (např. DTT, 2-ME), která by redukovala disulfidické můstky běžně přítomné v pšeničných bílkovinách, protože účelem extrakce bylo získat proteiny v podobě, v jaké se mohou vyskytovat v nativním nebo vysušeném lepku.

Pro separaci pšeničných bílkovin extrahovaných destilovanou vodou nebo fosfátovým pufrům s SDS byla zvolena gelová permeační chromatografie s UV detekcí, která dělí bílkoviny podle molekulové hmotnosti. Postupně eluované frakce separovaných bílkovin z chromatografické kolony byly sbírány ve dvouminutových intervalech a dále analyzovány pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným.

Na obrázku 11 jsou uvedeny naskenované gely SDS-PAGE proteinových extraktů studovaných vzorků mouk extrahovaných destilovanou vodou nebo fosfátovým pufrům s SDS v neredukujícím i redukujícím vzorkovém pufru.



Obrázek 11: SDS-PAGE všech extraktů v neredukovaném i redukovaném stavu.

PM: proteinový marker známých molekulových hmotností (60, 40, 30 a 20 kDa),
 dráha **2:** extrakt proteinů v destilované vodě v **neredukovaném** stavu,
 dráha **3:** extrakt proteinů v destilované vodě v **redukovaném** stavu,
 dráha **4:** extrakt proteinů ve fosfátovém pufru s SDS v **neredukovaném** stavu,
 dráha **5:** extrakt proteinů ve fosfátovém pufru s SDS v **redukovaném** stavu.

Rámečky označují ty proteiny, v kterých se jednotlivé vzorky vzájemně liší.

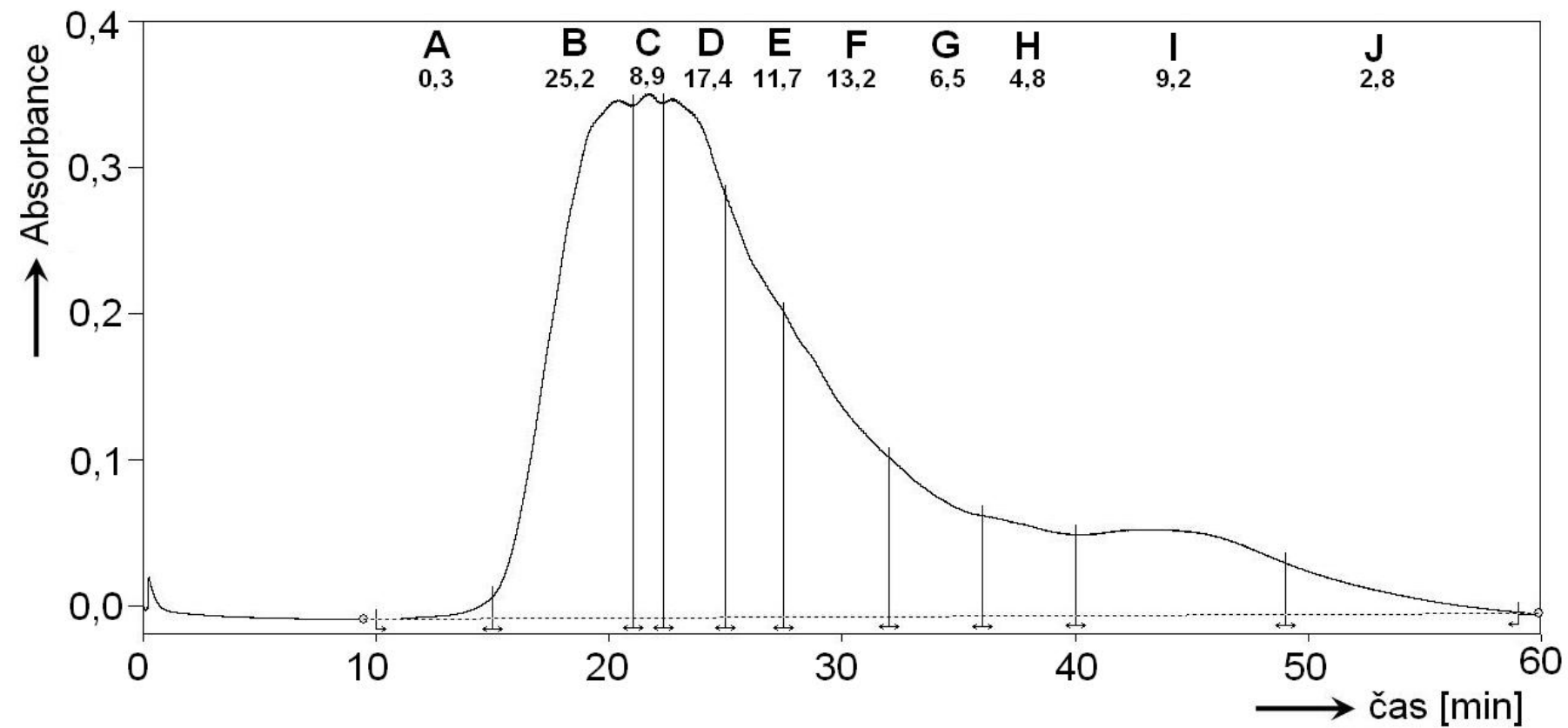
Na obrázku 11 lze pozorovat relativně malé rozdíly v přítomnosti a množství některých proteinů v různých vzorcích mouky. Například ve vzorku **VZ1** v dráze 4 je na úrovni standardu 30 kDa označený jeden samostatný proužek, zatímco u vzorků **VZ2** a **VZ3** jsou ve stejném místě proužky dva. Obdobně je tomu i u ostatních označených částí gelu. Z drah 4 a 5 je také vidět, že nadmolekulární komplexy lepkových proteinů navzájem vázaných disulfidickými vazbami se po redukci 2-ME rozpadnou na jednotlivé proteiny spadající relativní molekulovou hmotností převážně do oblasti 30 až 50 kDa.

Na obrázcích 12 (str. 62), 16 (str. 66) a 20 (str. 70) jsou uvedeny vzorové chromatogramy jednotlivých extraktů v destilované vodě s vyznačenými oblastmi (tyto tři obrázky jsou zcela analogické, liší se pouze analyzovaným vzorkem mouky). Pod písmeny označujícími jednotlivé oblasti je uvedeno relativní procentuální zastoupení každé oblasti z celkové plochy chromatogramu.

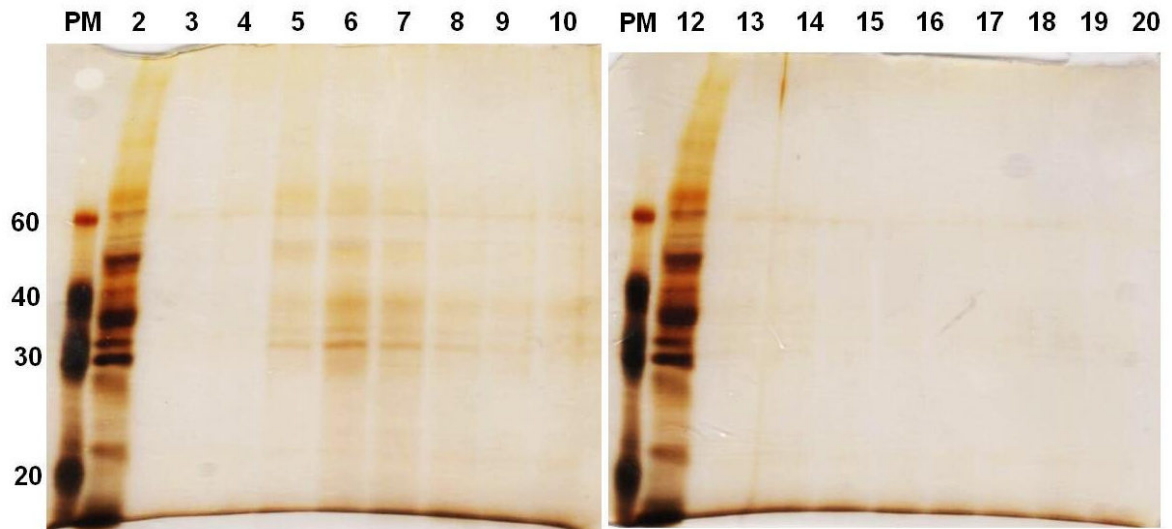
Na obrázcích 14 (str. 64), 18 (str. 68) a 22 (str. 72) jsou uvedeny vzorové chromatogramy jednotlivých extraktů ve fosfátovém pufru s SDS s vyznačenými oblastmi (opět jde o analogické gely tří různých vzorků mouky). Pod písmeny označujícími jednotlivé oblasti je opět uvedeno jejich relativní procentuální zastoupení z celkové plochy chromatogramu.

Na obrázcích 13 (str. 63), 17 (str. 67) a 21 (str. 71) jsou gely frakcí z jednotlivých chromatografií vzorků extrahovaných v destilované vodě. Ve většině drah nejsou zřetelné proužky proteinů, poněvadž ve vodě rozpustných bílkovin je v mouce malé množství, navíc separaci na GPC se jednotlivé frakce ještě několikanásobně zředí mobilní fází, tudíž dosáhnout požadované intenzity proužků je obtížné. Přesto lze konstatovat, že dělení ve vodě rozpustných proteinů na GPC není dostatečně dobré. To může být způsobeno přítomností SDS v mobilní fázi, protože v tomto denaturujícím prostředí nemají molekuly daného proteinu identickou nativní konformaci, což vede k rozšíření chromatografického píku.

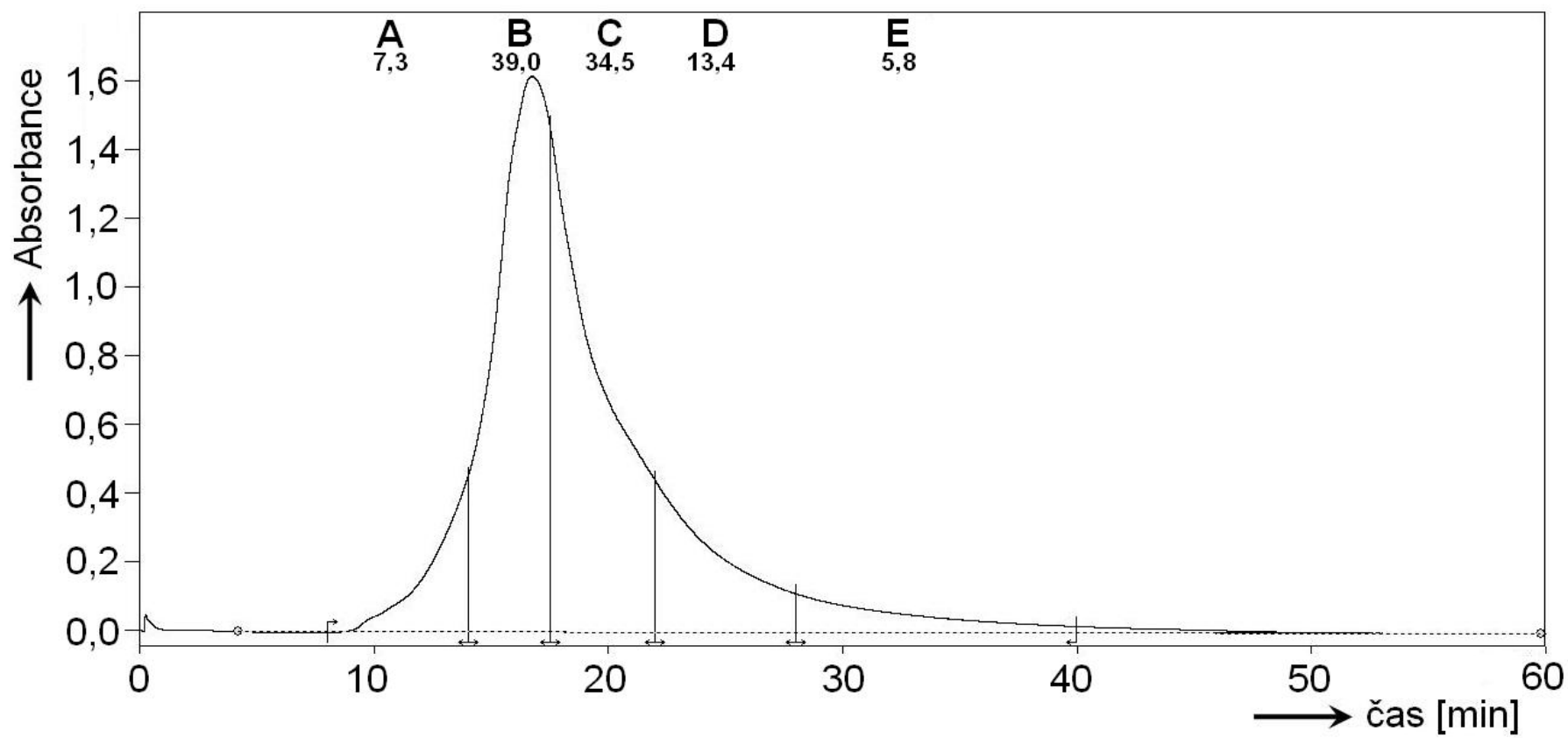
Na obrázcích 15 (str. 65), 19 (str. 69) a 23 (str. 73) jsou gely frakcí z jednotlivých chromatografií vzorků extrahovaných fosfátovým pufrům s SDS. V drahách 4 až 9 těchto obrázků je ukázáno, jak dochází k dělení proteinů na GPC podle velikosti. Konkrétně v drahách 4 až 6 jsou zjevné nadmolekulární komplexy tvořené pravděpodobně zejména gluteniny propojenými disulfidickými můstky (v chromatogramech označená oblast A). Z obrázku 11, kde v drahách 4 jsou extrakty proteinů v neredukovaném stavu, je patrné, že po přidání redukčního činidla (v drahách 5) dojde k rozpadu na jednotlivé proteiny gluteninů. V dráze 7 (obrázků 15, 19 a 23) je izolován nejintenzivnější protein, který je podstatnou součástí proteinů obsažených v zaznačené oblasti B. Zastoupení proteinů o nižších relativních molekulových hmotnostech, které eluují ve vyšších retenčních časech, je podle gelů i chromatogramu podstatně slabší.



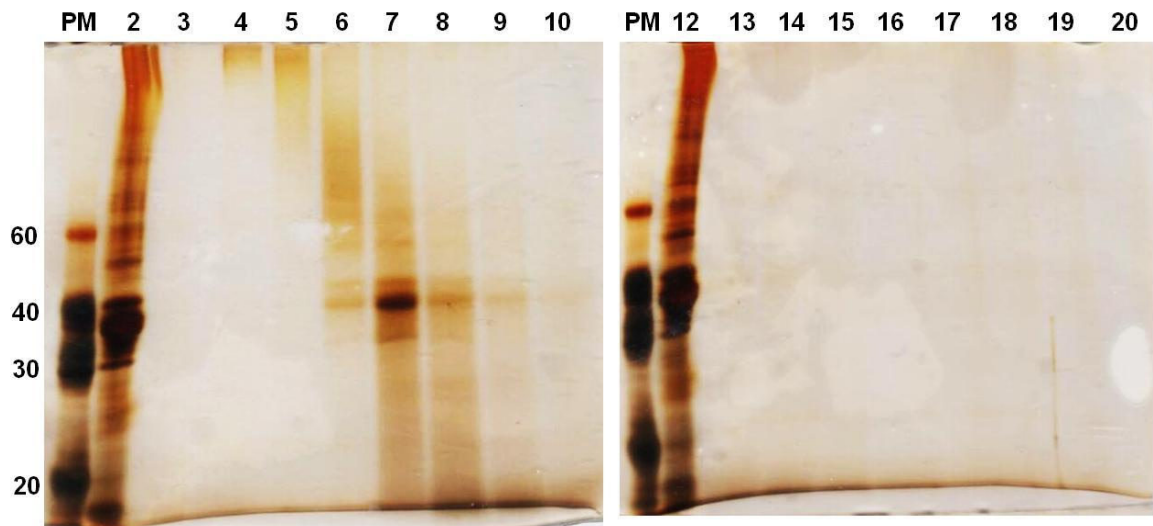
Obrázek 12: Chromatogram extraktu vzorku *VZ1* v destilované vodě.



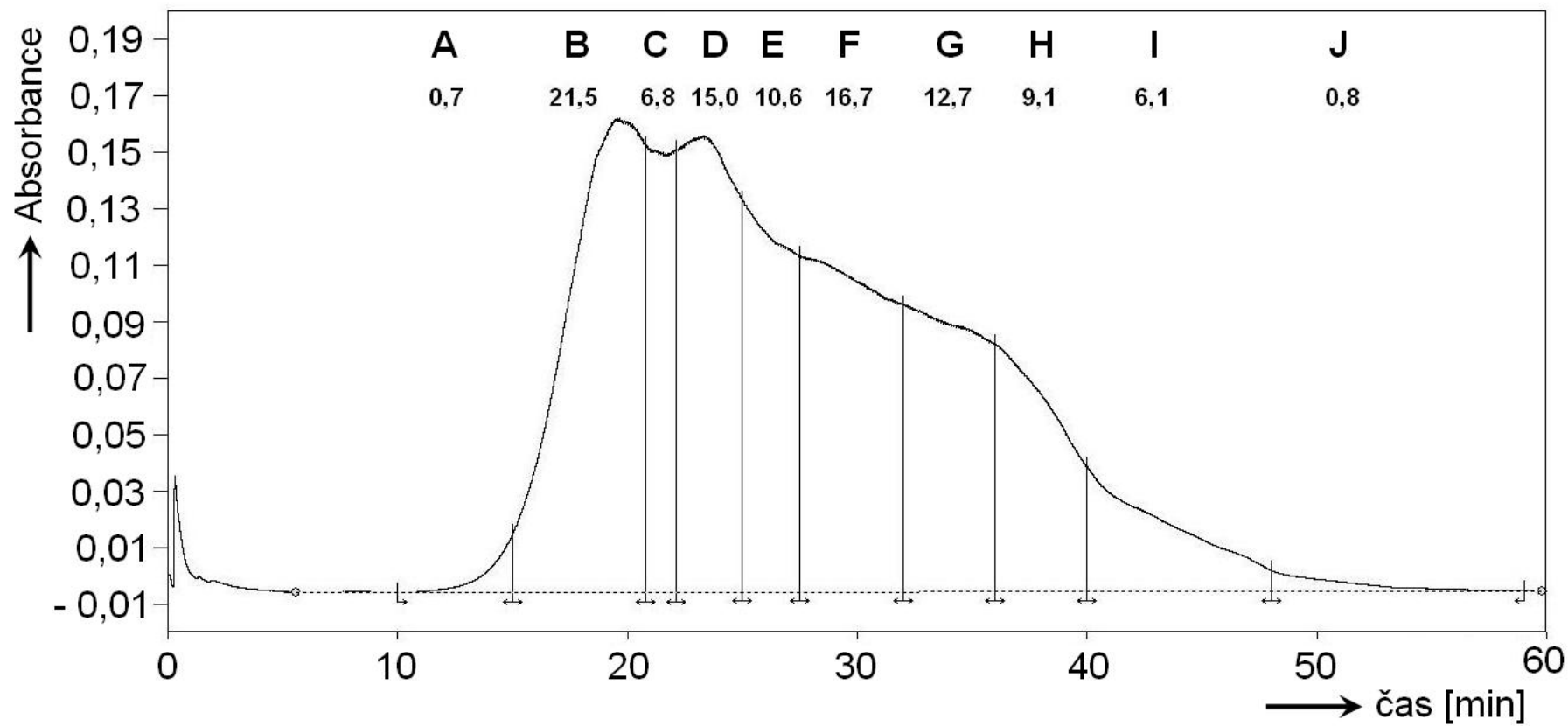
Obrázek 13: SDS-PAGE frakcí z GPC vzorku VZ1 extrahovaného v destilované vodě. Levý gel: PM: proteinový marker známých molekulových hmotností (60, 40, 30 a 20 kDa), dráha 2: proteinový extrakt před nástřikem na GPC, dráhy 3 až 10: frakce z GPC z časů: 12-14, 14-16, 16-18, 18-20, 20-22, 22-24, 24-26, 26-28 min. Pravý gel: PM: proteinový marker známých molekulových hmotností (60, 40, 30 a 20 kDa), dráha 12: proteinový extrakt před nástřikem na GPC, dráhy 13 až 20: frakce z GPC z časů: 28-30, 30-32, 32-34, 34-36, 36-38, 38-40, 40-42, 42-44 min.



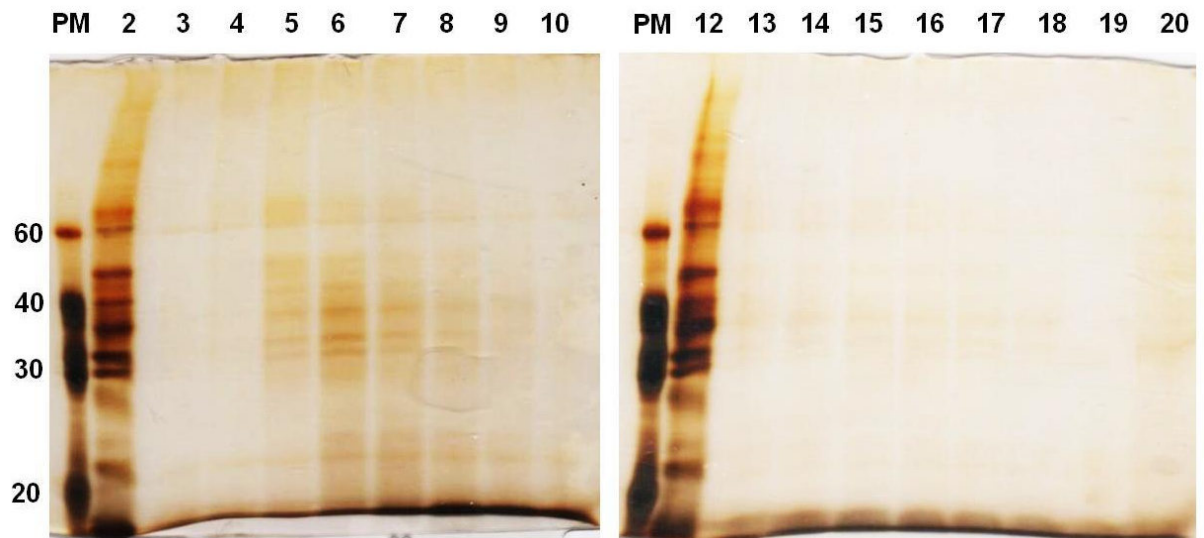
Obrázek 14: Chromatogram extraktu vzorku *VZ1* ve fosfátovém pufru s SDS.



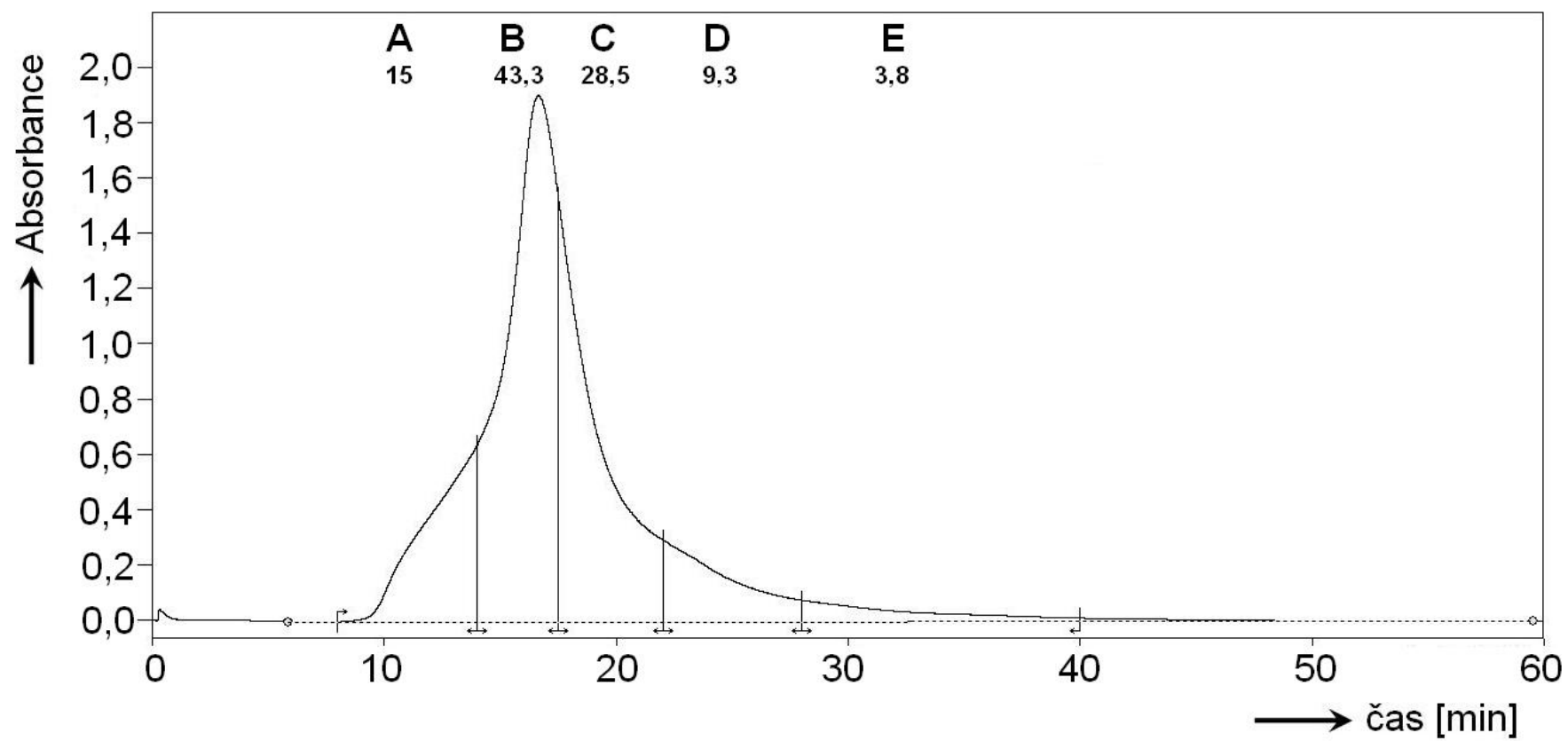
Obrázek 15: SDS-PAGE frakcí z GPC vzorku *VZI* extrahovaného ve fosfát. pufru s SDS. Levý gel: PM: proteinový marker známých molekulových hmotností (60, 40, 30 a 20 kDa), dráha 2: proteinový extrakt před nástřikem na GPC, dráhy 3 až 10: frakce z GPC z časů: 8-10, 10-12, 12-14, 14-16, 16-18, 18-20, 20-22, 22-24 min. Pravý gel: PM: proteinový marker známých molekulových hmotností (60, 40, 30 a 20 kDa), dráha 12: proteinový extrakt před nástřikem na GPC, dráhy 13 až 20: frakce z GPC z časů: 24-26, 26-28, 28-30, 30-32, 32-34, 34-36, 36-38, 38-40 min.



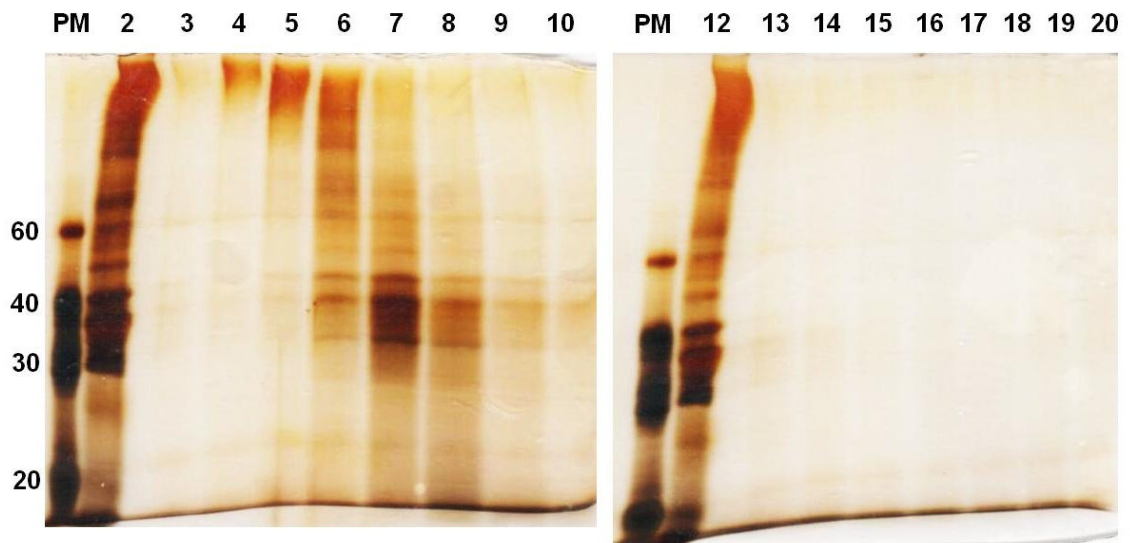
Obrázek 16: Chromatogram extraktu vzorku VZ2 v destilované vodě.



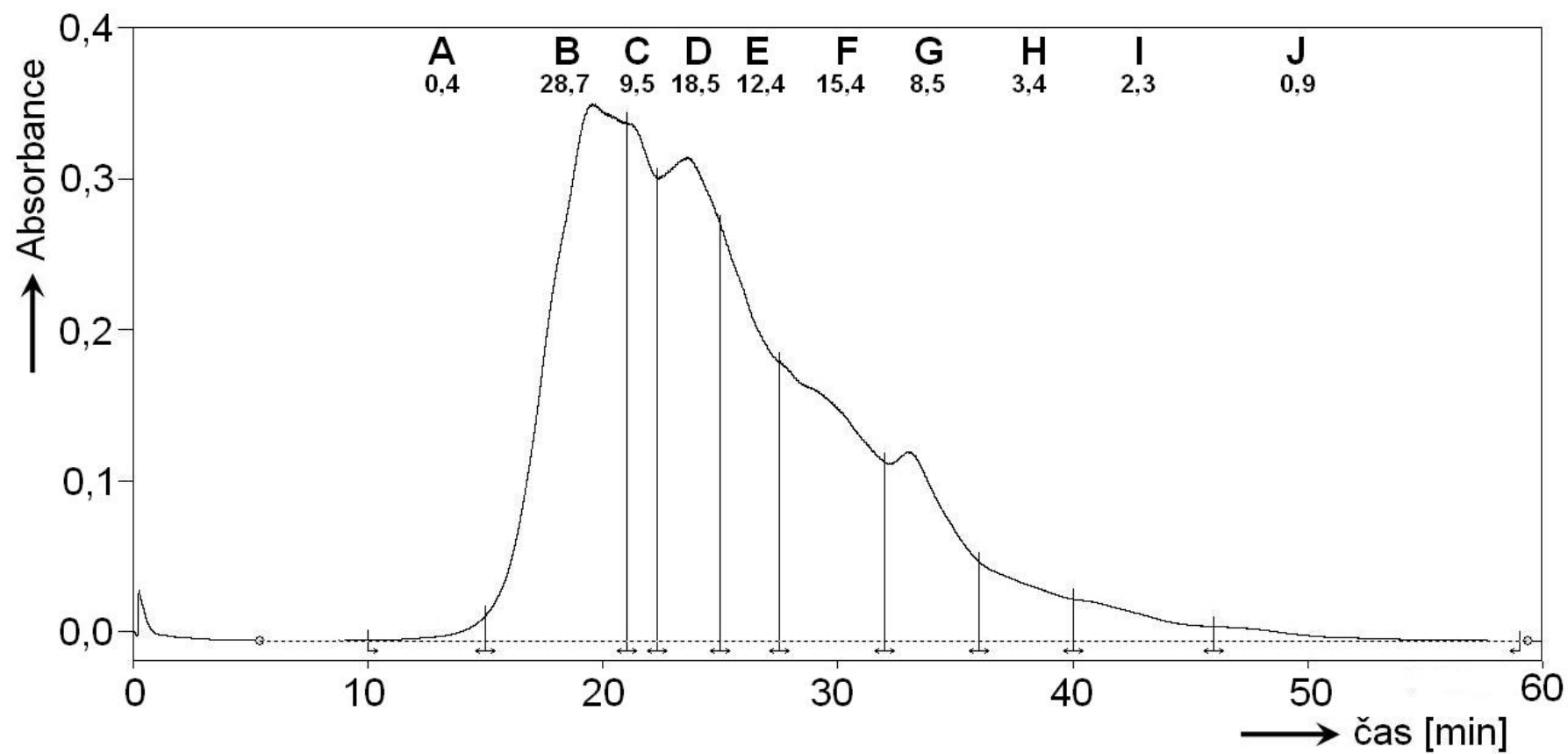
Obrázek 17: SDS-PAGE frakcí z GPC vzorku **VZ2** extrahovaného v destilované vodě. Levý gel: PM: proteinový marker známých molekulových hmotností (60, 40, 30 a 20 kDa), dráha 2: proteinový extrakt před nástřikem na GPC, dráhy 3 až 10: frakce z GPC z časů: 12-14, 14-16, 16-18, 18-20, 20-22, 22-24, 24-26, 26-28 min. Pravý gel: PM: proteinový marker známých molekulových hmotností (60, 40, 30 a 20 kDa), dráha 12: proteinový extrakt před nástřikem na GPC, dráhy 13 až 20: frakce z GPC z časů: 28-30, 30-32, 32-34, 34-36, 36-38, 38-40, 40-42, 42-44 min.



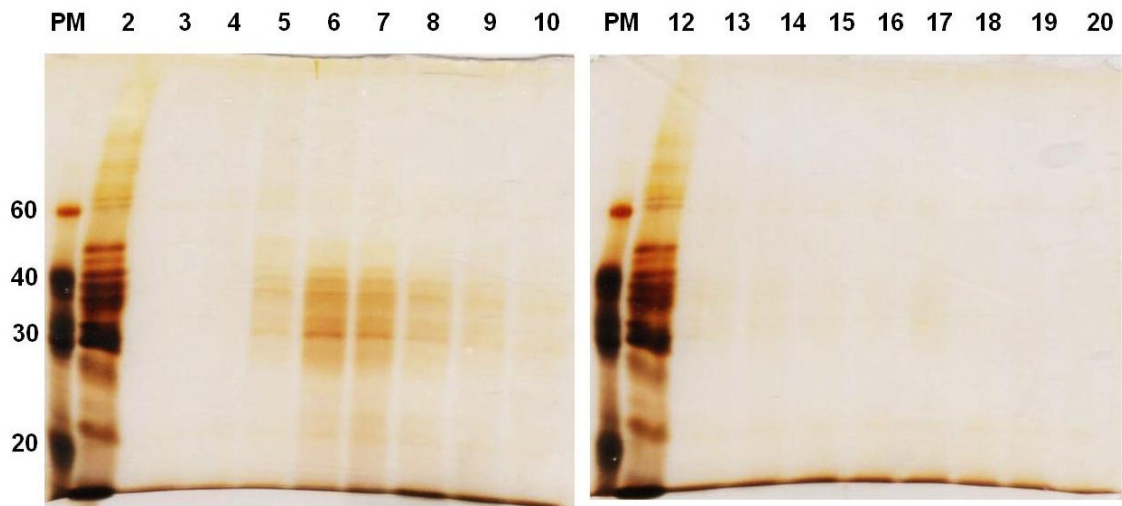
Obrázek 18: Chromatogram extraktu vzorku *VZ2* ve fosfátovém pufru s SDS.



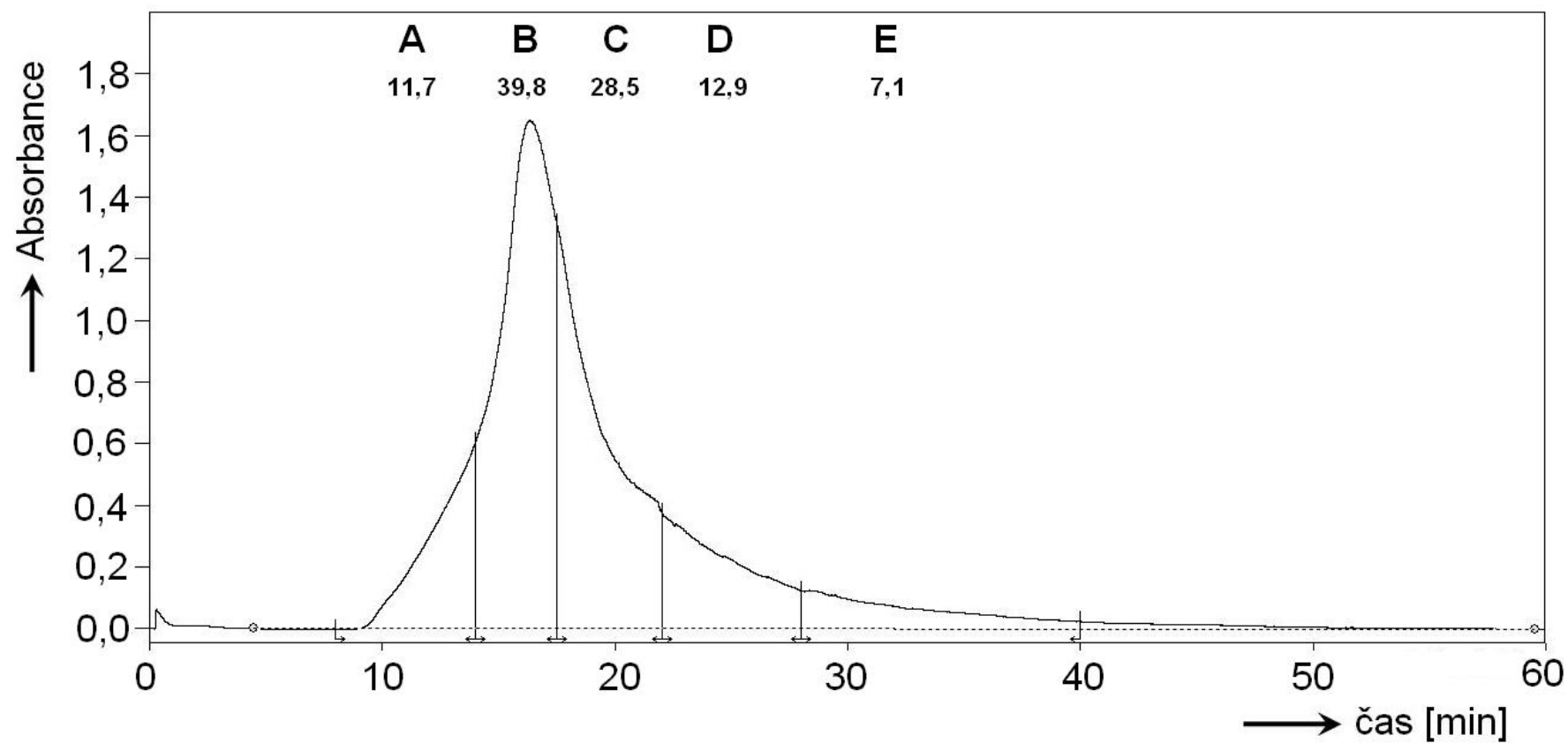
Obrázek 19: SDS-PAGE frakcí z GPC vzorku VZ2 extrahovaného ve fosfát. pufru s SDS. Levý gel: PM: proteinový marker známých molekulových hmotností (60, 40, 30 a 20 kDa), dráha 2: proteinový extrakt před nástřikem na GPC, dráhy 3 až 10: frakce z GPC z časů: 8-10, 10-12, 12-14, 14-16, 16-18, 18-20, 20-22, 22-24 min. Pravý gel: PM: proteinový marker známých molekulových hmotností (60, 40, 30 a 20 kDa), dráha 12: proteinový extrakt před nástřikem na GPC, dráhy 13 až 20: frakce z GPC z časů: 24-26, 26-28, 28-30, 30-32, 32-34, 34-36, 36-38, 38-40 min.



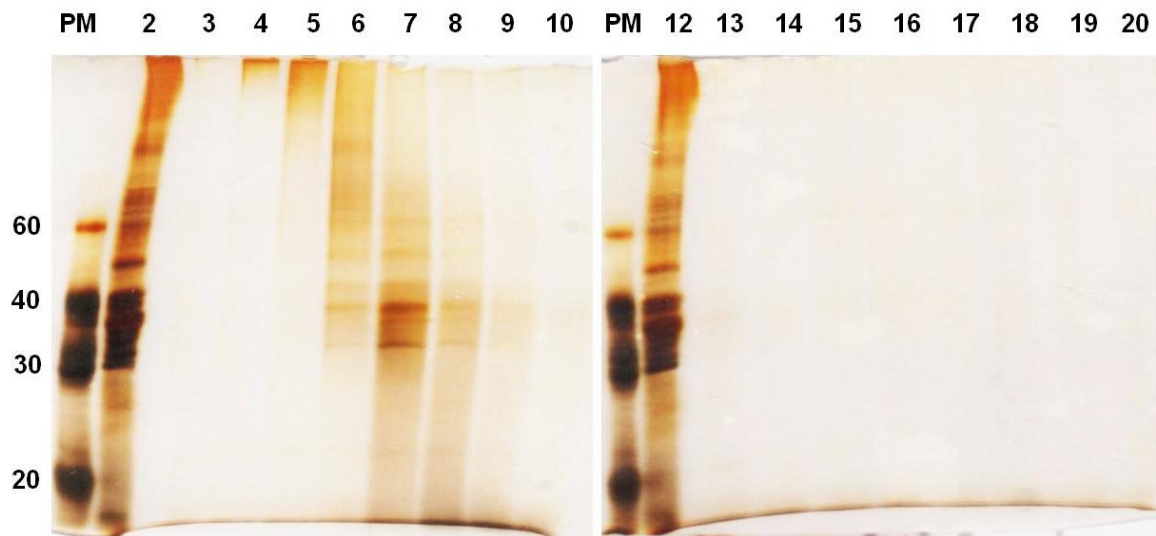
Obrázek 20: Chromatogram extraktu vzorku VZ3 v destilované vodě.



Obrázek 21: SDS-PAGE frakcí z GPC vzorku VZ3 extrahovaného v destilované vodě. Levý gel: PM: proteinový marker známých molekulových hmotností (60, 40, 30 a 20 kDa), dráha 2: proteinový extrakt před nástřikem na GPC, dráhy 3 až 10: frakce z GPC z časů: 12-14, 14-16, 16-18, 18-20, 20-22, 22-24, 24-26, 26-28 min. Pravý gel: PM: proteinový marker známých molekulových hmotností (60, 40, 30 a 20 kDa), dráha 12: proteinový extrakt před nástřikem na GPC, dráhy 13 až 20: frakce z GPC z časů: 28-30, 30-32, 32-34, 34-36, 36-38, 38-40, 40-42, 42-44 min.



Obrázek 22: Chromatogram extraktu vzorku VZ3 ve fosfátovém pufru s SDS.

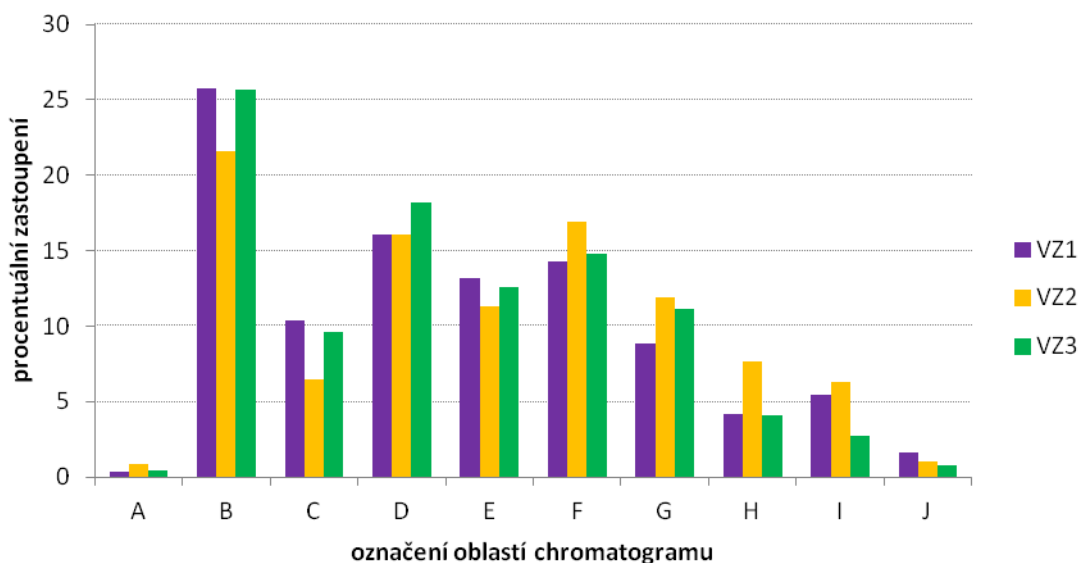


Obrázek 23: SDS-PAGE frakcí z GPC vzorku VZ3 extrahovaného ve fosfát. pufru s SDS. Levý gel: PM: proteinový marker známých molekulových hmotností (60, 40, 30 a 20 kDa), dráha 2: proteinový extrakt před nástřikem na GPC, dráhy 3 až 10: frakce z GPC z časů: 8-10, 10-12, 12-14, 14-16, 16-18, 18-20, 20-22, 22-24 min. Pravý gel: PM: proteinový marker známých molekulových hmotností (60, 40, 30 a 20 kDa), dráha 12: proteinový extrakt před nástřikem na GPC, dráhy 13 až 20: frakce z GPC z časů: 24-26, 26-28, 28-30, 30-32, 32-34, 34-36, 36-38, 38-40 min.

V tabulce 4 je uvedeno procentuální zastoupení (**PZ**) ploch jednotlivých zaznačených oblastí v celkové ploše chromatogramů, které byly získány separací bílkovin rozpustných v destilované vodě, jejich směrodatná odchylka σ a relativní odchylka $\delta = \sigma/\text{PZ}$. Na obrázku 24 je uveden graf, který znázorňuje procentuální zastoupení jednotlivých zaznačených oblastí.

Tabulka 4: Procentuální zastoupení plochy zaznačených oblastí a směrodatná odchylka z chromatografie extraktů v destilované vodě.

označení oblasti	VZ1			VZ2			VZ3		
	PZ [%]	σ	δ	PZ [%]	σ	δ	PZ [%]	σ	δ
A	0,32	0,07	0,22	0,83	0,18	0,22	0,45	0,22	0,49
B	25,72	3,58	0,14	21,58	1,23	0,06	25,65	2,24	0,09
C	10,35	1,53	0,15	6,46	1,13	0,17	9,59	1,41	0,15
D	16,04	3,24	0,20	16,04	1,47	0,09	18,22	4,62	0,25
E	13,19	1,33	0,10	11,34	1,56	0,14	12,60	0,93	0,07
F	14,30	2,37	0,17	16,92	1,72	0,10	14,82	2,62	0,18
G	8,85	2,01	0,23	11,87	2,15	0,18	11,12	2,15	0,19
H	4,15	0,79	0,19	7,64	1,49	0,20	4,05	0,83	0,20
I	5,48	2,73	0,50	6,28	2,04	0,32	2,75	0,47	0,17
J	1,60	1,23	0,77	1,04	0,27	0,26	0,75	0,44	0,59

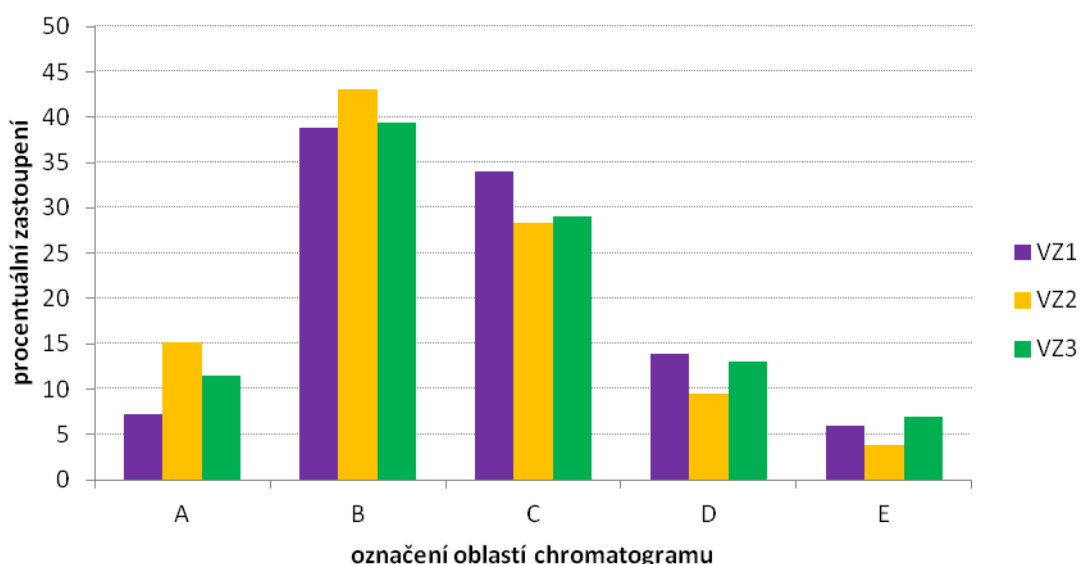


Obrázek 24: Graf procentuálních zastoupení jednotlivých zaznačených oblastí extraktů v destilované vodě.

V tabulce 5 je uvedeno procentuální zastoupení (**PZ**) ploch jednotlivých zaznačených oblastí v celkové ploše chromatogramů, které byly získány separací proteinů extrahovaných ve fosfátovém pufru s SDS, jejich směrodatná odchylka σ a relativní odchylka $\delta = \sigma/PZ$. Na obrázku 25 je uveden graf znázorňující procentuální zastoupení jednotlivých oblastí, ze kterého jsou patrné rozdíly mezi jednotlivými vzorky. Pro zvýraznění těchto rozdílů jsou uvedené chromatogramy navíc znázorněny v jednom grafu na obrázku 26 (str.78) s nejvýznamnějšími rozdíly označenými červeným rámečkem.

Tabulka 5: Procentuální zastoupení plochy zaznačených oblastí a směrodatná odchylka z chromatografie extraktů ve fosfátovém pufru s SDS.

označení oblasti	VZ1			VZ2			VZ3		
	PZ [%]	σ	δ	PZ [%]	σ	δ	PZ [%]	σ	δ
A	7,24	0,58	0,08	15,14	0,6	0,04	11,48	0,28	0,02
B	38,89	2,16	0,06	43,14	0,97	0,02	39,41	1,27	0,03
C	34,02	0,86	0,03	28,32	0,59	0,02	29,04	0,62	0,02
D	13,87	1,33	0,10	9,56	0,43	0,04	13,06	0,73	0,06
E	5,98	0,61	0,10	3,84	0,35	0,09	7,01	0,45	0,06



Obrázek 25: Graf procentuálních zastoupení jednotlivých zaznačených oblastí extraktů ve fosfátovém pufru s SDS.

V tabulkách 6 a 7 jsou uvedeny hodnoty korelačních koeficientů mezi relativním zastoupením označených oblastí chromatogramu a technologickými ukazateli. U extraktů ve fosfátovém pufru s SDS (tabulka 6) je patrná výrazná korelace mezi sedimentačním indexem a relativním zastoupením oblastí odpovídající eluci největších nadmolekulárních komplexů lepkových proteinů. Naopak u oblastí kde eluují proteiny v komplexech nevázané je zjevná významná negativní korelace, tedy taková, kdy korelační koeficient je v absolutní hodnotě vysoký, ale má záporné znaménko. To je v souladu s předpokladem, že vyšší hodnota sedimentačního indexu souvisí s vyšším zastoupením velkých agregátů lepkových proteinů.

U extraktů v destilované vodě (tabulka 7) je korelace zastoupení jednotlivých oblastí chromatogramu se sedimentačním indexem velmi různá. V případě oblasti A se pravděpodobně jedná o malé množství proteinových komplexů obdobných těm, které pozorujeme ve stejné oblasti u extraktu ve fosfátovém pufru s SDS. U ostatních oblastí není vysvětlení korelací snadné, tyto korelace mohou být i náhodné vzhledem k nízkému počtu studovaných vzorků.

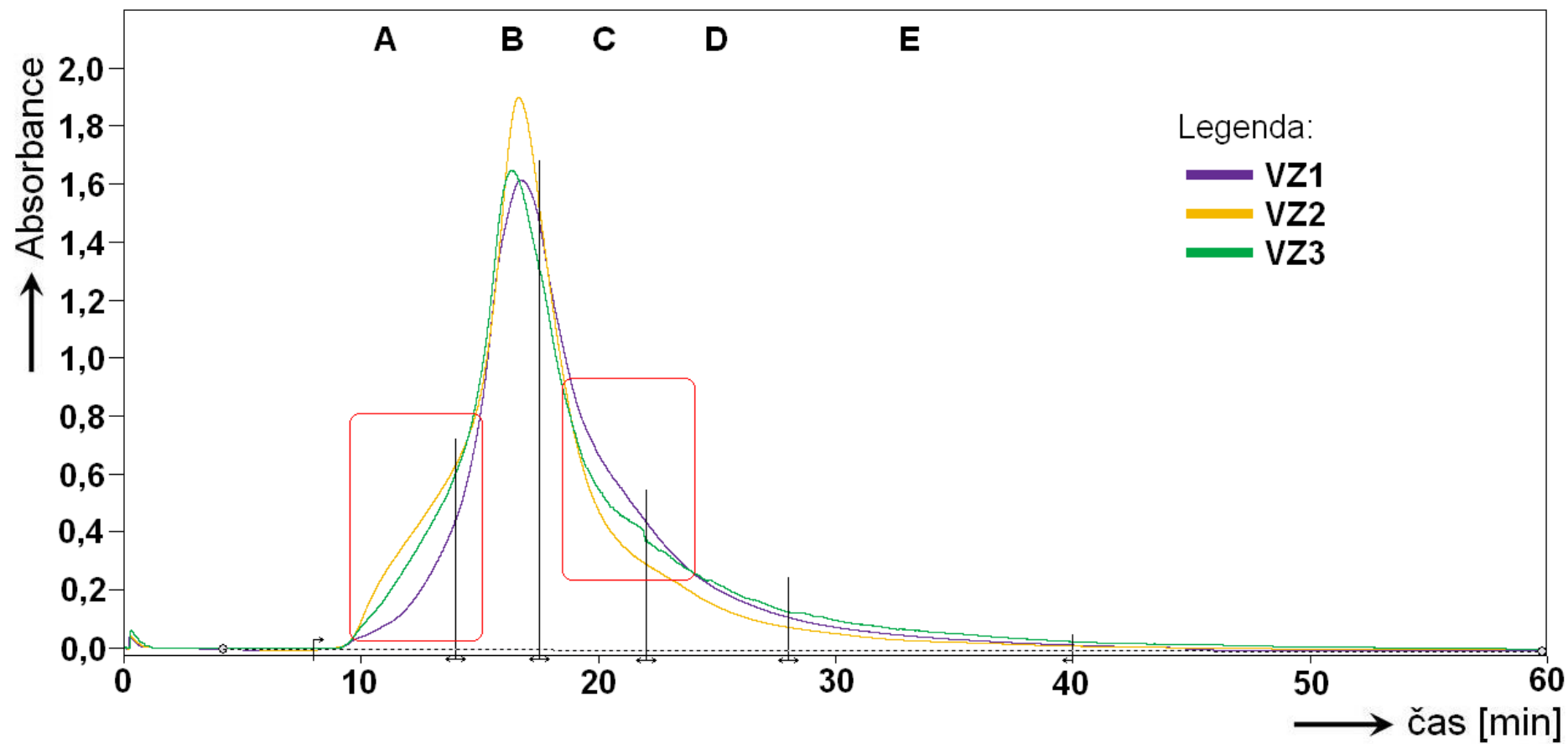
Ostatní technologické ukazatele významně nekorelují s relativním zastoupením označených oblastí chromatogramu. Některé vyšší absolutní hodnoty korelačních koeficientů budou opět spíše náhodné, jelikož jim odpovídající označené oblasti se nacházejí v různých částech chromatogramu, mezi nimiž není zjevná souvislost. Tato nahodilá korelace může být rovněž způsobena nízkým počtem studovaných vzorků.

Tabulka 6: Hodnoty korelačních koeficientů mezi relativním zastoupením označených oblastí chromatogramu extraktů ve fosfátovém pufru s SDS a technologickými ukazateli.

vzorek		VZ1	VZ2	VZ3	Korelační koeficienty			
sedimentační index		32	54	45				
Gluten index		72	74	54				
dusíkaté látky		12,3	13,7	14,2	sedimentační index	Gluten index	dusíkaté látky	mokrý lepek
mokrý lepek		30,5	36,9	44,5				
Zaznačené oblasti chromatogramu	A	7,24	15,14	11,48	1,00	0,05	0,74	0,49
	B	38,89	43,14	39,41	0,87	0,48	0,37	0,06
	C	34,02	28,32	29,04	-0,95	0,31	-0,93	-0,77
	D	13,87	9,56	13,06	-0,90	-0,42	-0,43	-0,13
	E	5,98	3,84	7,01	-0,58	-0,81	0,06	0,36

Tabulka 7: Hodnoty korelačních koeficientů mezi relativním zastoupením označených oblastí chromatogramu extraktů v destilované vodě a technologickými ukazateli.

Vzorek		VZ1	VZ2	VZ3	Korelační koeficient			
sedimentační index		32	54	45				
Gluten index		72	74	54				
dusíkaté látky		12,3	13,7	14,2	sedimentační index	Gluten index	dusíkaté látky	mokrý lepek
mokrý lepek		30,5	36,9	44,5				
Zaznačené oblasti chromatogramu	A	0,32	0,83	0,45	0,93	0,36	0,49	0,20
	B	25,72	21,58	25,65	-0,82	-0,56	-0,28	0,03
	C	10,35	6,46	9,59	-0,90	-0,42	-0,44	-0,14
	D	16,04	16,04	18,21	0,10	-1,00	0,70	0,89
	E	13,19	11,34	12,60	-0,95	-0,29	-0,55	-0,26
	F	14,30	16,92	14,82	0,90	0,41	0,44	0,14
	G	8,85	11,87	11,12	0,98	-0,19	0,88	0,69
	H	4,15	7,64	4,05	0,79	0,60	0,24	-0,07
	I	5,48	6,28	2,75	0,11	0,99	-0,53	-0,77
	J	1,60	1,04	0,75	-0,72	0,70	-1,00	-0,97



Obrázek 26: Chromatogramy všech tří vzorků extrahovaných ve fosfátovém pufru s SDS v jednom grafu s vyznačenými rozdíly.

5.2.1 Identifikace proteinů hmotnostní spektrometrií

Jak již bylo popsáno v kapitole 4.5, jednotlivé separované proteiny je možné identifikovat hmotnostní spektrometrií po předchozím štěpení trypsinem přímo v gelu. Z časových důvodů bohužel nebylo možné dosáhnout požadované kvality hmotnostního spektra u neznámých proteinů z pšeničné mouky. Dobrých výsledků bylo touto metodou prozatím dosaženo pouze pro vzorek vysoce čištěné proteasy z viru HIV-1, která byla použita jako standard.

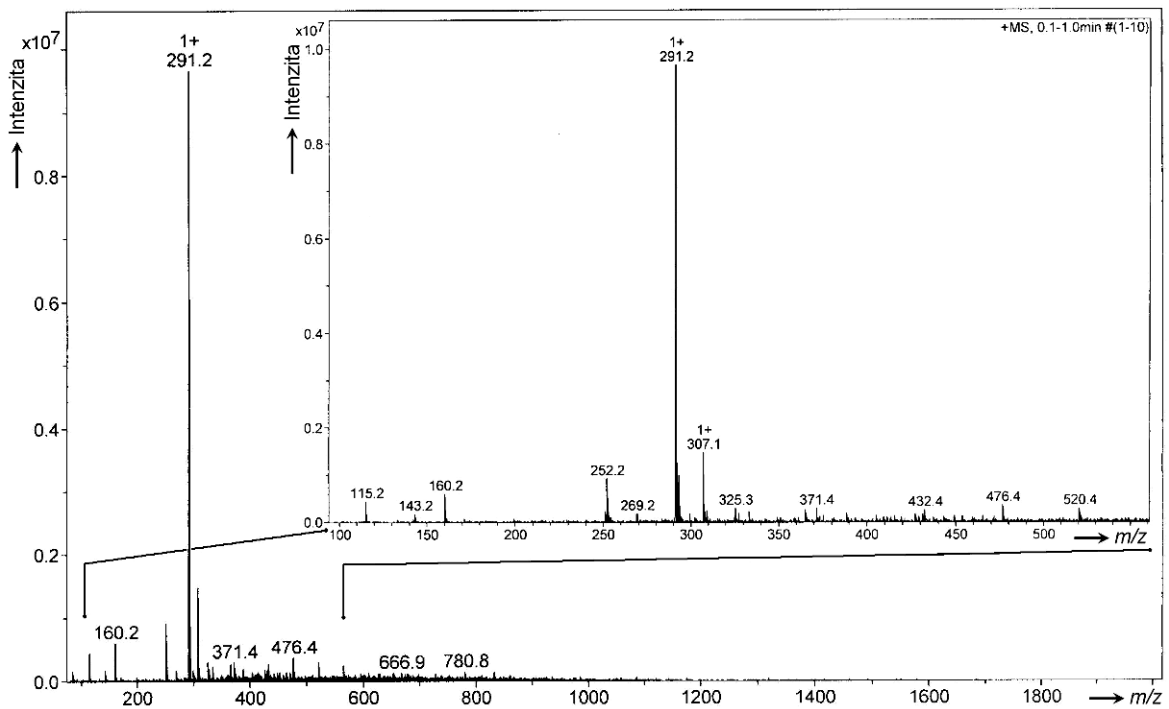
Trypsin štěpí proteiny vždy za bazickou aminokyselinou (Lys a Arg). Identifikace jednotlivých peptidů HIV proteasy se provádí přepočty nejintenzivnějších píků z hmotnostního spektra. Sekvence jednotlivých peptidových štěpů s příslušnou relativní molekulovou hmotností (M_r) a isoelektrickým bodem (pI) jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8: Aminokyselinové sekvence peptidů HIV proteasy.

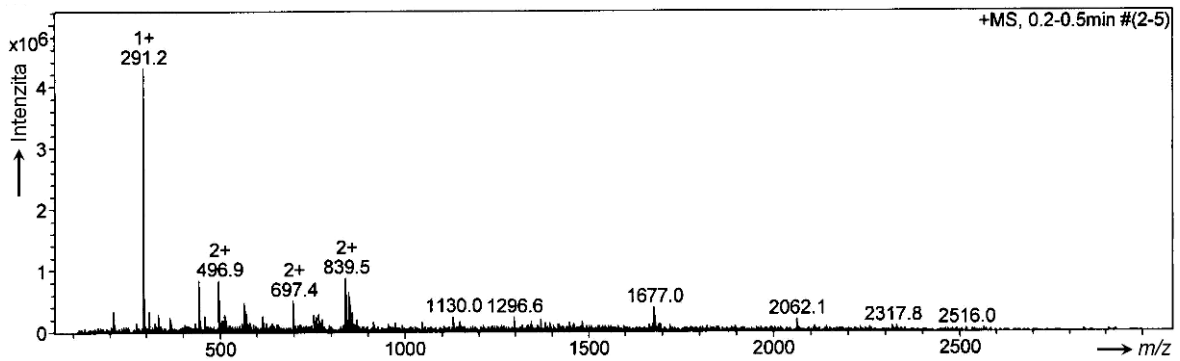
Pozice	M_r	pI	Aminokyselinová sekvence
1	1693,07	11,01	PQITLWQRPLVTIK
2	614,74	8,75	IGGQLK
3	2259,47	3,71	EALLDTGADDTVLEEMNLPGR
4	557,69	10,00	WKPK
5	992,24	8,50	MIGGIGGFIK
6	273,34	9,72	VR
7	1559,80	5,32	QYDQILIEICGHK
8	1677,02	9,79	AIGTVLVGPTPVNIIGR
9	1336,57	5,52	NLLTQIGCTLNF

Analýza štěpených peptidů byla provedena pomocí hmotnostního spektrometru s elektrosprejovou ionizací a iontovou pastí (ESI-IT-MS). Na obrázku 27 je uvedeno celé hmotnostní spektrum slepého pokusu a se zvětšením oblasti od 100 do 560 m/z , kde jsou vidět píky, které pocházejí z roztoků a chemikálií použitých během postupu štěpení a extrakce proteinů z gelu. Hmotnostní spektrum analyzovaných trypsinových štěpů HIV proteasy je uvedeno na obrázku 28. Vybrané zvětšené úseky hmotnostního spektra HIV proteasy jsou pak uvedeny na obrázcích 29 až 32. Číslo uvedené nad píkem je přesná hodnota m/z příslušné detekované látky. Číslo uvedené nad touto hodnotou m/z značí kolikrát je látka nabitá. Pro získání relativní molekulové hmotnosti M_r dané látky se

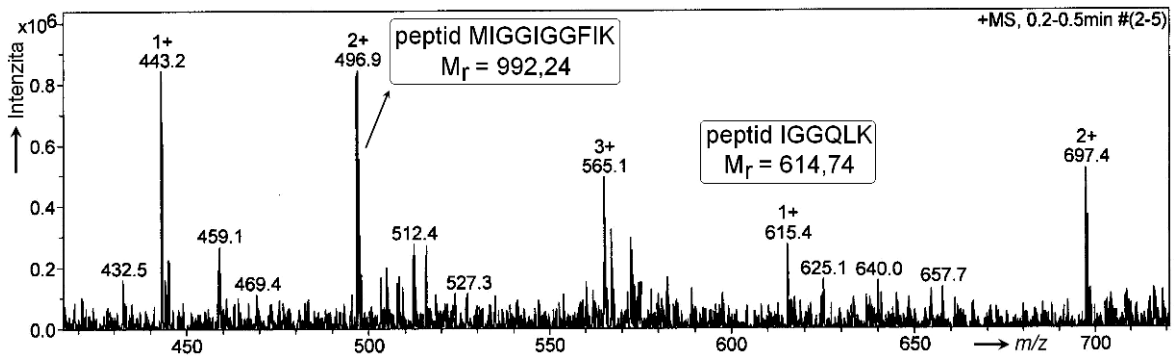
vynásobí počtem nabití a odečte se relativní atomová hmotnost odpovídajícího počtu kationtů, kterými je látka nabitá (většinou H^+ , Na^+ , K^+).



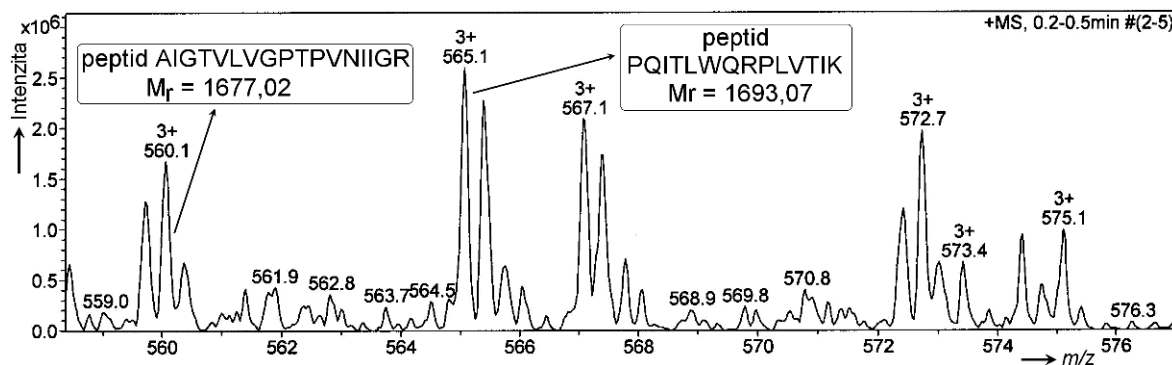
Obrázek 27: Hmotnostní spektrum slepého pokusu.



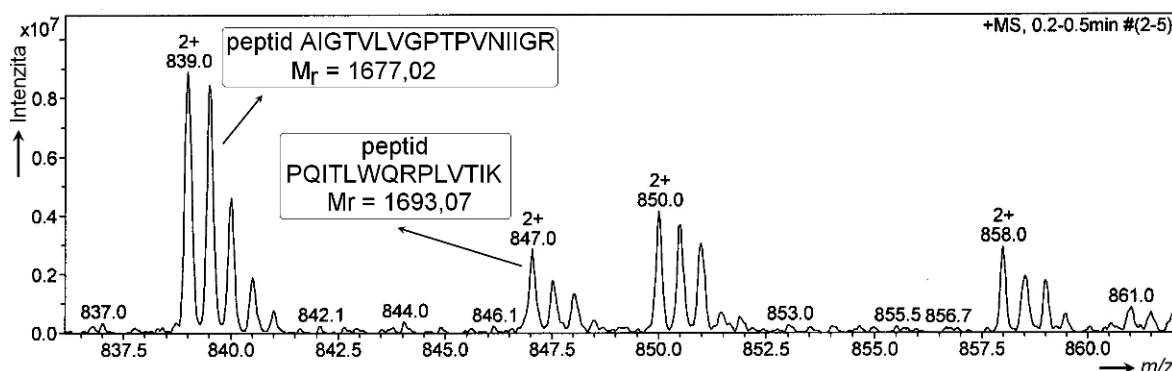
Obrázek 28: Hmotnostní spektrum HIV proteasy.



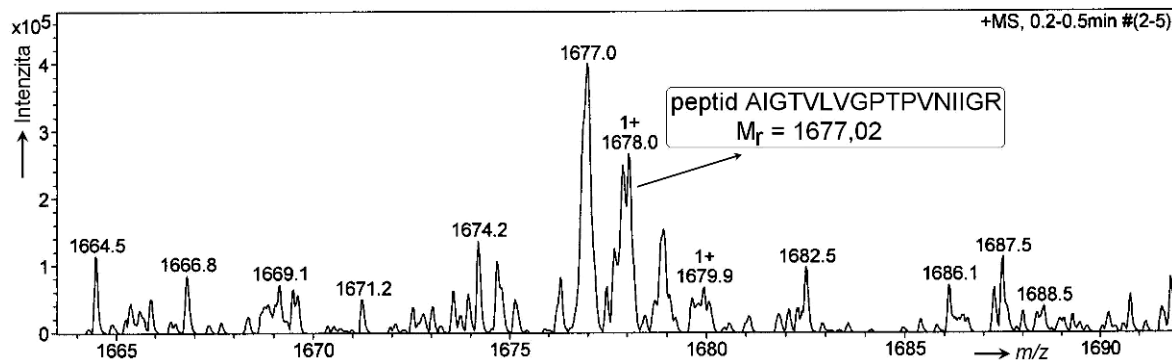
Obrázek 29: Zvětšené hmotnostní spektrum HIV proteasy (420 – 720 m/z).



Obrázek 30: Zvětšené hmotnostní spektrum HIV proteasy (558 – 579 m/z).



Obrázek 31: Zvětšené hmotnostní spektrum HIV proteasy (836 – 862 m/z).



Obrázek 32: Zvětšené hmotnostní spektrum HIV proteasy (1664 – 1691 m/z).

Pík na obrázku 29 s hodnotou 496,9 m/z je dvakrát nabitý, tudíž po vynásobení dvěma a odečtení relativní atomové hmotnosti dvou iontů H^+ získáme molekulovou hmotnost látky M_r , která tomuto píku přísluší. V tomto případě se jedná o peptid č. 5 z tabulky 8 o předpokládané M_r 992,24. Dále v tomto spektru pozorujeme jedenkrát iontem H^+ nabitý píky o hodnotě m/z 615,4, čemuž odpovídá fragment č. 2 o M_r 614,74. Obdobným způsobem jsou identifikovány i další peptidy, jak uvádí tabulka 9.

Tabulka 9: Identifikace peptidů z hmotnostního spektra.

m/z	počet nabití	M_r peptidu	číslo fragmentu (tabulka 8)
615,4	1+	614,74	č. 2
496,9	2+	992,24	č. 5
1678,0	1+	1677,02	č. 8
839,0	2+	1677,02	č. 8
560,1	3+	1677,02	č. 8
847,0	2+	1693,07	č. 1
565,1	3+	1693,07	č. 1

Detekovány nebyly peptidy č. 3, 7 a 9 (tabulce 8), které mají izoelektrický bod v kyselé oblasti pH, protože analýza probíhala v pozitivním ionizačním módu. Dále nebyly identifikovány peptidy č. 4 a 6. Přestože mají izoelektrický bod v zásadité oblasti pH, nebyl jejich signál dostatečně intenzivní.

5.3 Mikrostruktura lepku

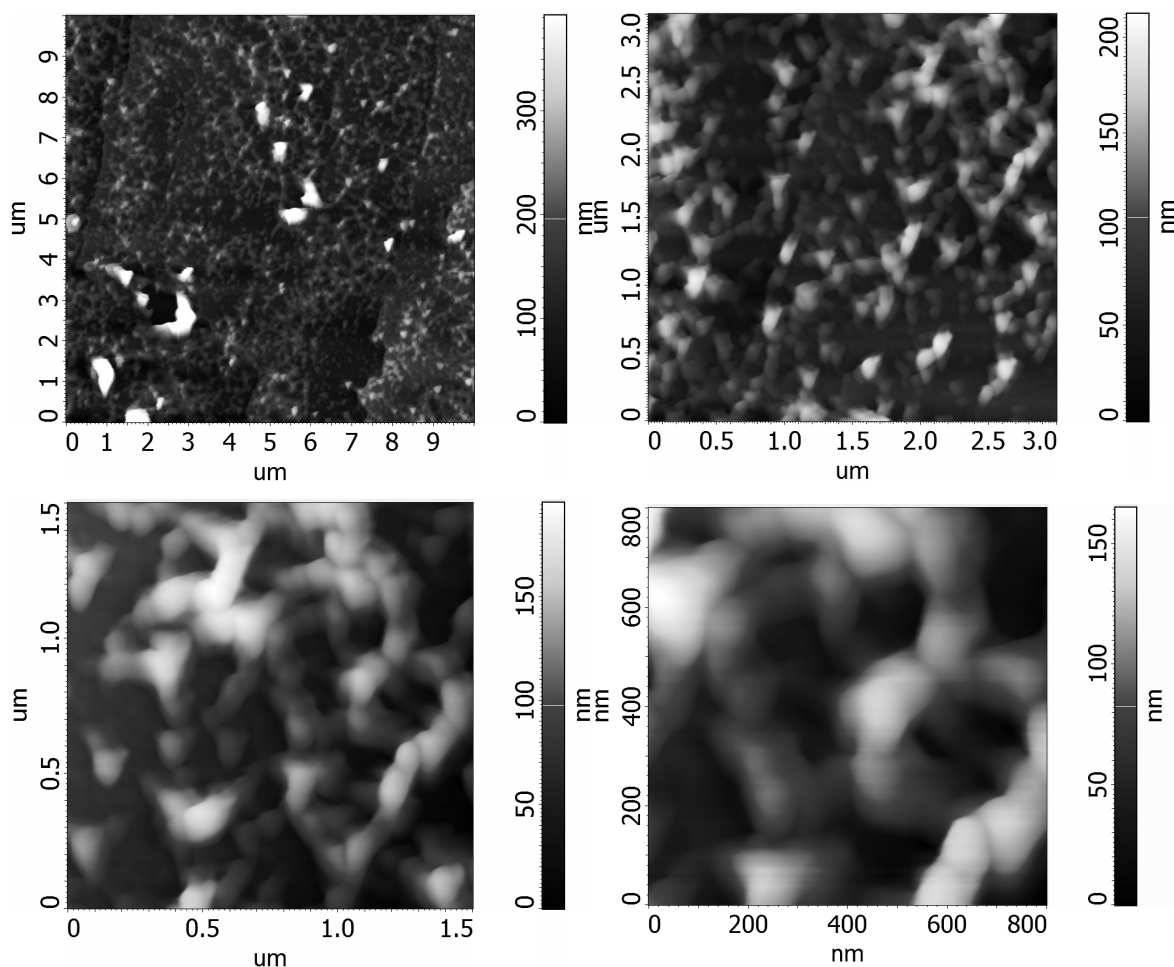
Mikroskopická struktura trojrozměrné sítě pšeničného lepku byla pozorována pomocí Mikroskopie atomárních sil (AFM), která prostřednictvím ostrého hrotu mapuje povrch vzorku.

Nejdříve bylo třeba připravit vzorek vysušeného lepku pro skenování. Vypraný mokry lepek byl před sušením přitisknut na atomárně rovný křemíkový ingot a zatížen vhodným nepřilnavým plastovým těžítkem tak, aby zůstal během procesu sušení v těsném kontaktu s povrchem ingotu. Postup sušení, který vedl k nejlepším dosaženým výsledkům, probíhal ve dvou fázích. Nejprve byl lepek předsušen přitisknutý pod těžítkem, aby došlo k jeho správnému přilnutí na ingot. Předsoušení probíhalo většinou při 50 °C přes noc. Poté bylo těžítko odstraněno, aby ve druhé fázi došlo k úplnému vysušení lepku. Dosoušení probíhalo dalších nejméně 24 hodin při nezměněné teplotě. Teploty a časy jednotlivých fází sušení, jakož i typ a materiál těžítka, byly v průběhu experimentů měněny za účelem jejich optimalizace.

Na obrázku 33 jsou zobrazeny snímky z AFM vysušeného lepku pšeničné mouky při rozlišení 256×256 dpi v postupně se zvyšujícím zvětšení (nejedná se o žádný

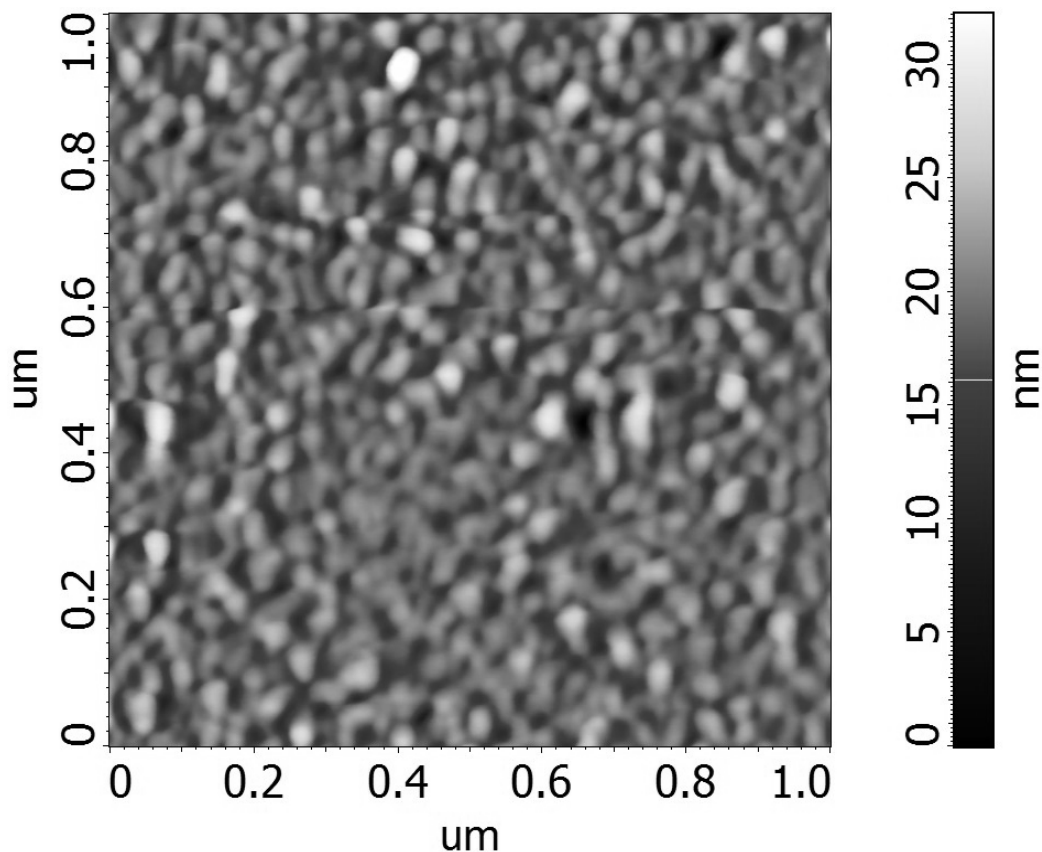
ze studovaných vzorků **VZ1**, **VZ2**, **VZ3**, v následujícím textu bude označován **VZX**). Na snímcích je vidět, že lepek tvoří hustou trojrozměrnou síť tvořenou vlákny stočenými do přibližně kruhových a spirálních útvarů. Tloušťka těchto vláken je přibližně 100 nm a velikost „ok“ této sítě je zhruba 200 až 300 nm. Vlákna jsou složena z menších přibližně kulovitých útvarů o průměru zhruba 100 nm. Detailnější strukturu těchto útvarů není možné z uvedených snímků určit, lze ale předpokládat, že jsou tvořeny komplexy několika molekul lepkových proteinů. Na snímku s největší skenovanou plochou jsou patrné trhliny, které pravděpodobně vznikly při přípravě vzorku.

U vzorku mouky **VZ2** (obrázek 34) byla pozorována struktura typově podobná, ale tvořená podstatně tenčími a hustěji uspořádanými vlákny. Jednotlivé útvary, z nichž se vlákna skládala, dosahovaly v průměru asi 20 až 40 nm a ve stejném řádu se také pohybovala velikost „ok“ sítě.



Obrázek 33: Snímky lepku z AFM vzorku **VZX** v postupně se zvyšujícím zvětšení. Napravo od obrázku je vždy znázorněna stupnice optických hustot, která umožňuje posoudit reliéf.

Prohlubně jsou zobrazeny v tmavších odstínech, vyvýšeniny pak jako odstíny světlé.

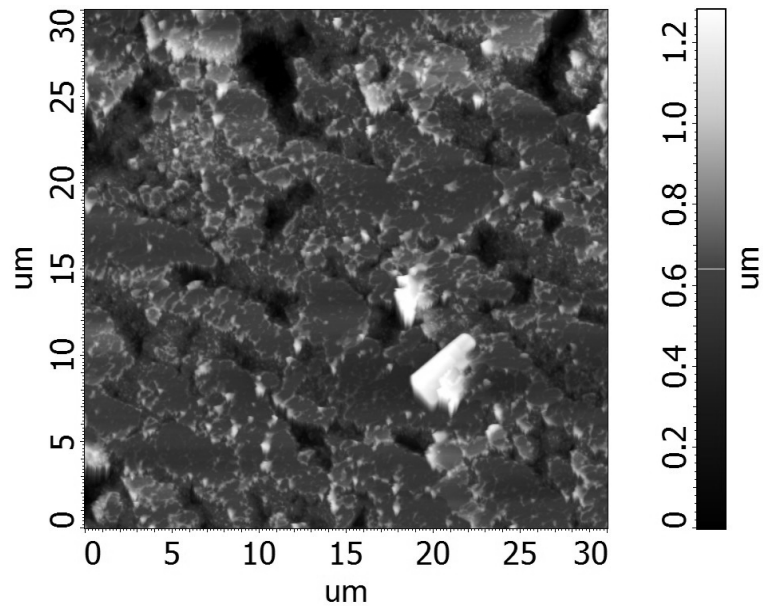


Obrázek 34: Mikrostruktura lepku s velmi hustou sítí (VZ2).

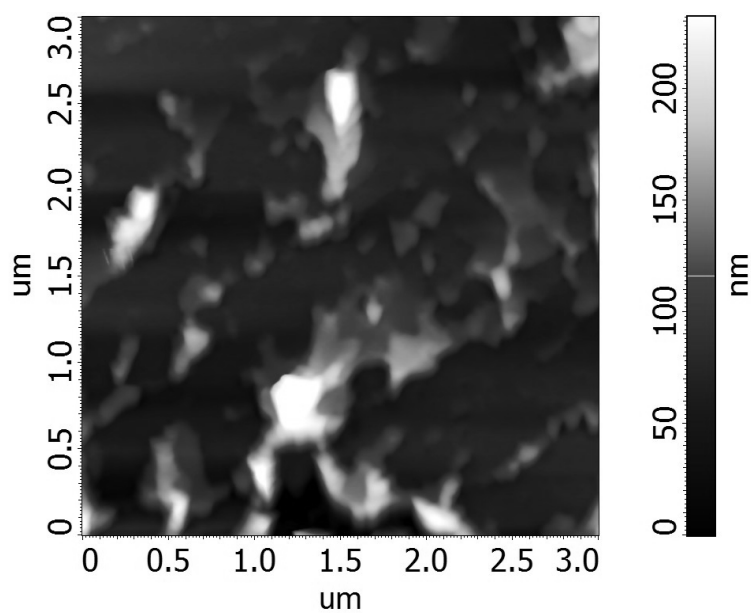
V experimentech s dalšími vzorky mouky se bohužel nepodařilo dosáhnout takto kvalitních snímků, proto je lepková struktura na nich zobrazená méně zřetelná. Z časových důvodů nebylo možné vypracovat zcela spolehlivý postup, který by vedl dosažení obrázků požadované kvality. Kvalita preparátu totiž může rovněž záviset na vzorku, z něhož je vysušený lepek připravován.

I přesto byly nasnímány lepkové xerogely studovaných vzorků mouk (VZ1, VZ2, VZ3) za účelem jejich srovnání. Tyto snímky byly skenovány vždy při rozlišení 256×256 dpi a velikosti zobrazované plochy 30×30 μm , 3×3 μm . Uvedeny jsou na obrázcích 35 až 40 (str. 85 – 87).

Mikrostruktura lepku vzorku **VZ1** o velikosti snímané plochy $30 \times 30 \mu\text{m}$ je vyobrazena na obrázku 35, a velikost $3 \times 3 \mu\text{m}$ na obrázku 36. Na snímku s větším zvětšením lze pozorovat podobné vláknité struktury jako na snímcích na obrázku 33, ale v podstatně nižší kvalitě, protože se nepodařilo připravit vzorek, který by kvalitnější snímky poskytl.

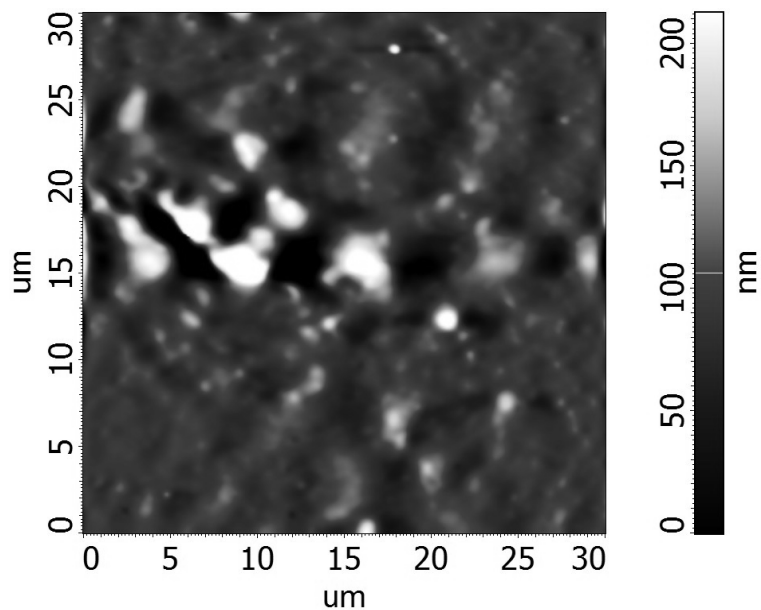


Obrázek 35: Mikrostruktura lepku vzorku **VZ1** ($30 \times 30 \mu\text{m}$).

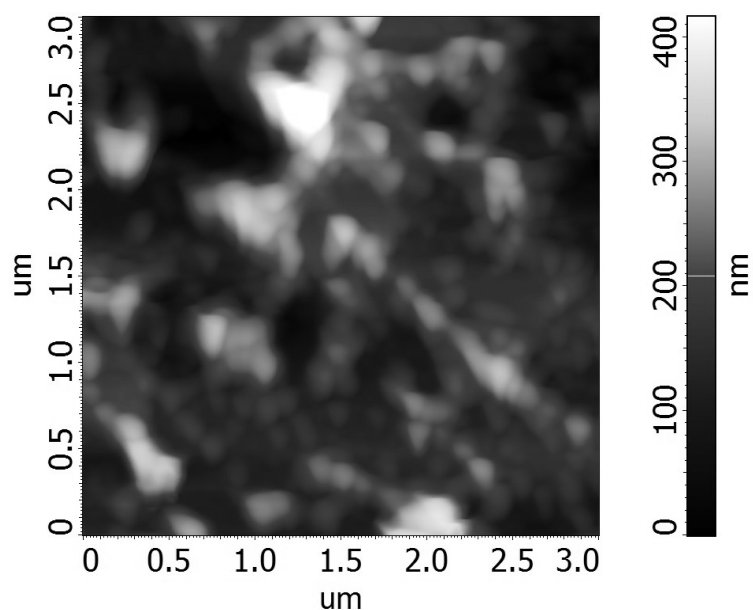


Obrázek 36: Mikrostruktura lepku vzorku **VZ1** ($3 \times 3 \mu\text{m}$).

Mikrostruktura lepku vzorku **VZ2** o velikosti snímané plochy $30 \times 30 \mu\text{m}$ je vyobrazena na obrázku 37, a velikost $3 \times 3 \mu\text{m}$ na obrázku 38. I přes nižší kvalitu je zde patrná podobnost se snímky na obrázku 33, ale struktura vzorku **VZ2** se jeví být hustší a méně organizovaná. Jiný preparát z téhož vzorku je zachycen na obrázku 34 (str. 84). Jeho struktura je obdobná té, která je znázorněna na obrázku 38, ale jednotlivé útvary, které ji tvoří, jsou podstatně jemnější.

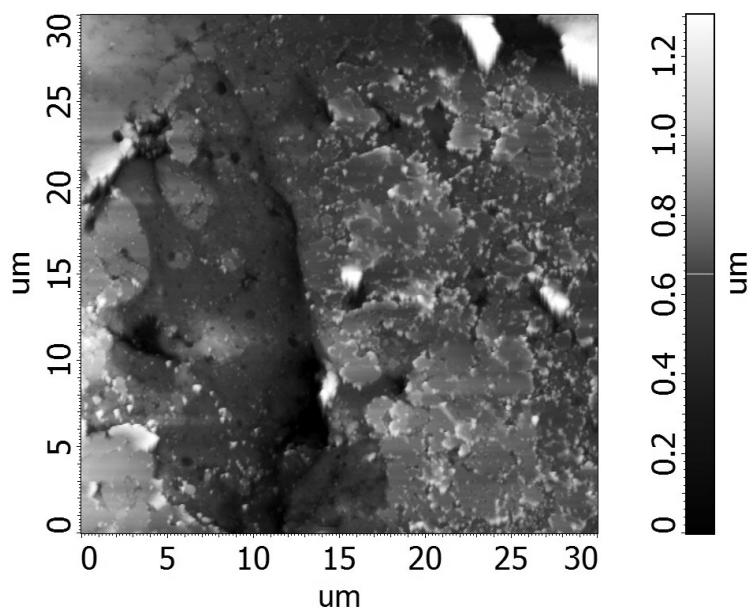


Obrázek 37: Mikrostruktura lepku vzorku **VZ2** ($30 \times 30 \mu\text{m}$).

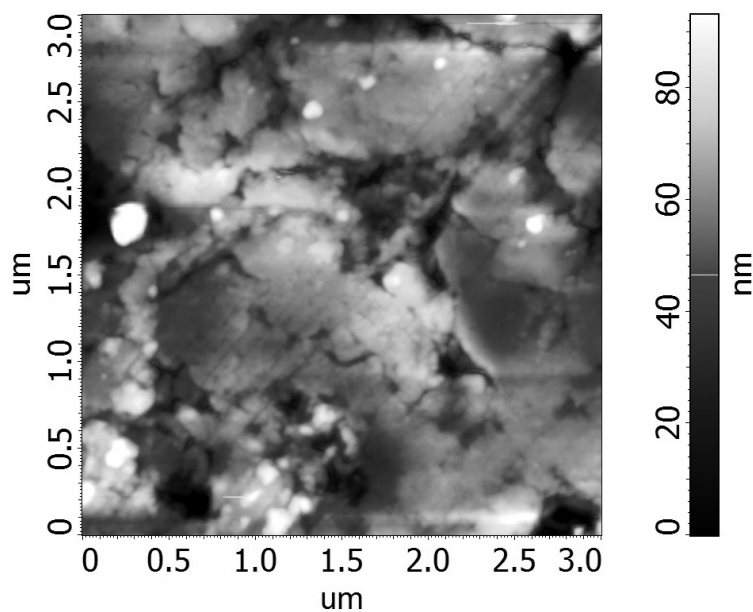


Obrázek 38: Mikrostruktura lepku vzorku **VZ2** ($3 \times 3 \mu\text{m}$).

Mikrostruktura lepku vzorku **VZ3** o velikosti snímané plochy $30 \times 30 \mu\text{m}$ je vyobrazena na obrázku 39, velikost $3 \times 3 \mu\text{m}$ na obrázku 40. U tohoto vzorku není možné ani na snímku o velikosti snímané plochy $3 \times 3 \mu\text{m}$ pozorovat patrnější strukturu sítě, pozorovaný preparát se naopak jeví jako neorganizované „chuchvalce vaty“. Je tedy pravděpodobné, že interakce mezi lepkovými proteiny, které řídí vznik trojrozměrné sítě, jsou u tohoto vzorku podstatně odlišné od vzorků předchozích.



Obrázek 39: Mikrostruktura lepku vzorku **VZ3** ($30 \times 30 \mu\text{m}$).



Obrázek 40: Mikrostruktura lepku vzorku **VZ3** ($3 \times 3 \mu\text{m}$).

Z porovnání snímků trojrozměrné struktury lepků z různých vzorků mouky s hodnotami technologických ukazatelů vyplývá, že neexistuje významná korelace mezi obsahem dusíkatých látek (popř. obsahem mokrého lepku) a vzhledem a organizací proteinové sítě. Stejně tak nebyla pozorována souvislost struktury se sedimentačním indexem. Naopak bylo pozorováno, že struktura proteinové sítě uspokojivě koreluje s hodnotami Gluten indexu. Tato korelace je patrná zejména u vzorku **VZX**, který má daleko nejvyšší hodnotu Gluten indexu (94) a zároveň zjevně nejvýraznější a nejlépe organizovanou strukturu. Nižší, ale stále patrnou míru organizace vykazují struktury lepků vzorků **VZ1** a **VZ2** o hodnotách Gluten indexu 72, resp. 74. U vzorku **VZ3** o Gluten indexu rovném 54 se mikrostruktura lepku jeví jako zcela neorganizovaná. Z toho lze soudit, že makroskopická pevnost a soudržnost lepku, které jsou Gluten indexem charakterizovány, jsou pravděpodobně dány mikroskopickým uspořádáním lepkových proteinů.

6 DISKUSE

Pekařská kvalita pšeničné mouky bývá hodnocena celou řadou technologických ukazatelů, které se odvíjejí od různých vlastností lepkových bílkovin. Z hodnot zvolených ukazatelů u studovaných vzorků **VZ1**, **VZ2** a **VZ3** (tabulka 3, str. 58) je zřejmé, že obsah dusíkatých látek (hrubé bílkoviny) úzce souvisí s obsahem mokrého lepku, zatímco spolehlivější ukazatele pekařské kvality mouky (sedimentační index a Gluten index) už tak úzkou vzájemnou souvislost s obsahem dusíkatých látek a mokrého lepku nevykazují. Tento poznatek ukazuje na skutečnost, že mouka s vysokým obsahem bílkovin (respektive mokrého lepku) nemusí být vždy pekařsky kvalitní a naopak. Na druhou stranu z toho rovněž vyplývá, že pekařská kvalita mouky nezávisí pouze na celkovém množství lepkových proteinů v ní přítomných, ale je dána také detailnější strukturou těchto bílkovin a jejich vzájemnými interakcemi na molekulární úrovni.

Proto se v pekařské praxi významně využívají tyto spolehlivější ukazatele, které blíže charakterizují chování mouky v průběhu technologického procesu. Technologické ukazatele kvality pšeničného lepku jsou však charakteristikami nepřímými, protože neberou v potaz jen samotné bílkoviny, ale také ostatní složky mouky (škrob, fosfolipidy, atd.), které mohou jejich hodnoty rovněž ovlivnit. Proto nemusí být vždy ve shodě s analytickými metodami, které pracují přímo s bílkovinami.

Z makrostruktury vypraného lepku na obrázku 10 (str. 59) je patrné, že se vzrůstajícím obsahem dusíkatých látek se struktura lepku mění z poměrně hrubé zvrásněné na jemnější a hladší. Makroskopický vzhled vypraného lepku vykazuje rovněž určitou míru souladu s hodnotou Gluten indexu, ale vzhledem nízkému počtu vzorků ji není možno prokázat jednoznačně. Jako prokazatelnější se však jeví souvislost Gluten indexu s mechanickou stálostí vypraného mokrého lepku při ponechání na vzduchu za laboratorní teploty.

Lepek ze vzorku mouky **VZ3** poměrně brzy ztrácí svůj původní tvar, zatímco lepky z mouk **VZ1** a **VZ2** svůj tvar zachovávají podstatně déle. Toto subjektivní pozorování je v dobré souvislosti s hodnotou Gluten indexu, a méně již však s obsahem dusíkatých látek. Protože Gluten index charakterizuje pevnost a soudržnost lepkové struktury, lze z tohoto pozorování usuzovat, že stabilita lepkové struktury nemá příčinu pouze v množství lepkových proteinů, ale je významně ovlivněna jejich vzájemnými poměry a interakcemi na molekulární úrovni. Navíc se jeví, že vzájemné interakce mezi lepkovými proteiny vzorku **VZ3** jsou slabší než u vzorků **VZ1** a **VZ2**.

Proto bylo cílem této práce pokusit se najít souvislost technologických vlastností lepku se zastoupením jednotlivých lepkových proteinů v mouce a mikrostrukturou lepkové sítě.

Nejprve byly studovány rozdíly v přítomnosti a množství jednotlivých pšeničných proteinů, které by mohly být příčinou rozdílné kvality vzorků mouky. SDS-PAGE gely extraktů studovaných vzorků mouk v destilované vodě i fosfátovém pufru s SDS v neredukujícím a redukujícím vzorkovém pufru jsou uvedeny na obrázku 11 (str. 60). Vyznačené rozdíly v prouzcích proteinů na jednotlivých gelech souvisí s charakteristickou distribucí proteinů pro konkrétní odrůdu pšenice, proto také tato metoda slouží k identifikaci odrůd (viz kapitola 1.4.3.1.). Tyto odlišnosti mohou být jednou z příčin rozdílných technologických vlastností lepku, avšak příčinná souvislost by musela být prokázána dalšími experimenty.

V dráze 4 (obrázek 11) je patrné, že v neredukovaném stavu se vyskytují nadmolekulární komplexy tvořené pravděpodobně zejména gluteniny, které se po přidání redukčního činidla (dráha 5) rozpadnou na jednotlivé proteiny. Naopak u vzorků proteinů extrahovaných destilovanou vodou tento jev pozorovatelný není, protože v těchto extraktech se nadmolekulární komplexy gluteninů a gliadinů nevyskytují nebo jsou přítomny pouze ve stopovém množství.

Jednotlivé extrakty byly dále děleny GPC za účelem stanovení vzájemných poměrů v nich obsažených proteinů. Protože separace jednotlivých typů proteinů není příliš výrazná, byl chromatogram rozdělen na několik oblastí pevně zvolenými body na ose retenčních časů. Tyto oblasti přibližně odpovídají eluci jednotlivých typů proteinů, jak je patrné z analýz SDS-PAGE.

U extraktů ve fosfátovém pufru s SDS (graf na obrázku 25, str. 75) je jasně patrná korelace mezi procentuálním zastoupením jednotlivých označených oblastí a hodnotami sedimentačního indexu.

Procentuální zastoupení oblastí s označením A, které obsahují největší nadmolekulární komplexy tvořené zejména gluteniny o M_r nejčastěji kolem 2000 kDa [2] propojenými disulfidickými vazbami, velmi dobře koreluje se sedimentačním indexem, protože sedimentace větších částic je rychlejší než u částic menších. Tato rychlost roste s druhou mocninou poloměru sedimentujících částic.

Podobnou, ale méně průkaznou korelaci se sedimentačním indexem vykazuje oblast s označením B. Tato oblast obsahuje pravděpodobně zejména LMW-GS a gliadiny

v rozmezí M_r 30 až 75 kDa [2]. Protože její velikost koreluje se sedimentačním indexem, lze předpokládat, že i tyto proteiny jsou součástí nadmolekulárních komplexů lepkových proteinů, ale jsou k nim vázány pouze nekovalentně, tedy především vodíkovými můstky. V průběhu extrakce a GPC, kde je SDS přítomno pouze v nižší koncentraci 0,5 %, resp. 0,1 %, pravděpodobně nedochází k zásadní disociaci takto vázaných komplexů, které se ovšem rozpadnou ve vzorkovém pufru pro SDS-PAGE, kde je koncentrace SDS podstatně vyšší. Nižší míra korelace však může být způsobena tím, že část nekovalentně vázaných lepkových proteinů disociuje již během extrakce, a proto není přítomna v nadmolekulárních komplexech eluujících v oblasti s označením B.

Naopak je tomu v případě oblastí s označením C a D, kde je korelace negativní, tedy čím vyšší je procentuální zastoupení těchto oblastí, tím je nižší sedimentační index. U oblastí s označením E je už korelace neprůkazná. Na základě relativních molekulových hmotností zjištěných pomocí SDS-PAGE lze soudit, že i zaznačené oblasti C a D obsahují gluteniny a gliadiny. Z chromatogramů na obrázku 26 (str. 78) je patrné, že u vzorků s nižším zastoupením oblastí A a B je výrazně vyšší proteinový obsah v oblasti C a D. To naznačuje, že u těchto vzorků je podstatně více gluteninů a gliadinů, které nejsou vázány v nadmolekulárních komplexech nebo se tyto komplexy snáze rozpadají. Je tedy možné se domnívat, že gluteniny a gliadiny těchto vzorků mají nižší schopnost nadmolekulární komplexy tvořit. To může být dáno buď jejich nepříznivým poměrem, nebo strukturálními odlišnostmi na úrovni aminokyselinové sekvence, které se mohou projevit například nižší schopností tvořit disulfidické vazby.

Ačkoliv mezi relativním zastoupením zaznačených oblastí v chromatogramu vzorku extrahovaného destilovanou vodou a hodnotami sedimentačního indexu jsou částečné korelace, jejich interpretace je podstatně problematičtější než u extraktů ve fosfátovém pufru s SDS. Jedním z důvodů je podstatně vyšší relativní odchylka stanovení relativního zastoupení jednotlivých oblastí chromatogramu. Další z příčin může být i poměrně špatné dělení proteinů těchto extraktů v GPC, jak je vidět z analýz SDS-PAGE. GPC není totiž ideální metodou pro separaci denaturovaných proteinů, protože na rozdíl od dělení v nativním stavu nezaujímají molekuly téhož proteinu identické konformace, což vede k zhoršení separace. U extraktů ve fosfátovém pufru s SDS není tento vliv tak výrazný, protože rozdíly ve velikostech dělených proteinů a proteinových agregátů jsou podstatně větší. Proto není možné souvislosti mezi zaznačenými oblastmi v chromatogramu jednoznačně posoudit, přestože některé korelace je třeba považovat

za potenciálně možné. Například v případě oblasti A se pravděpodobně jedná o stopové množství proteinových komplexů obdobných těm, které pozorujeme ve stejné oblasti u extraktu ve fosfátovém pufru s SDS.

Podobnou analýzu vztahů mezi pekařskými vlastnosti mouky a proteinovými frakcemi provedli také Preston a spol. [48]. Pro svůj výzkum ovšem použili jiné ukazatele pekařské kvality mouky, a to SDS-sedimentační test (používající pšeničný šrot a jako činidlo roztok dodecylsulfátu sodného v kyselině octové), tvrdost pšeničného zrna, amylograf (vyjadřuje viskozitu suspenzí mouky), farinograf (popisuje změny konzistence těsta během hnětení) a pekařský pokus. Extrakce proteinů z pšeničné mouky provedli podle Osborna s částečnou modifikací, i GPC probíhala za jiných podmínek. Proto publikované výsledky a závěry se liší od našich výsledků.

Cubadda a spol. [49] se zabývali vztahy mezi vlivem obsahu a vlastností bílkovin na pevnost lepku pšenice tvrdé (*Triticum durum* L.). Ke studiu použili různé metody, např. SDS-sedimentační test, Gluten index, farinograf, mixograf, atd. Ovšem publikované výsledky se opět liší od našich, poněvadž studovali mouku z pšenice tvrdé, která má odlišné vlastnosti od pšenice seté, především vyšší obsah bílkovin.

Identifikaci vzájemného propojení lepkových proteinů není možné provést na základě GPC, popř. SDS-PAGE, ale vyžadovala by použití pokročilejších metod analýzy proteinů na molekulární úrovni. Jednou z možností je analýza fragmentů lepkových proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. Tato metoda byla použita k identifikaci jednotlivých proteinů na gelech z SDS-PAGE, ale z časových důvodů nebylo možné vývoj metodiky dokončit. Nicméně se podařilo identifikovat trypsinové štěpy standardního preparátu proteasy z viru HIV-1, což prokazuje možnost realizace těchto experimentů na přístrojích dostupných na našem pracovišti.

Metoda AFM je vedle elektronové mikroskopie další metodou použitelnou pro pozorování struktury látek ve větším rozlišení, než jaké umožňuje světelná mikroskopie. K pozorování struktury lepku byla zvolena metoda AFM z toho důvodu, že umožňuje pracovat i se vzorky v nativním stavu, tedy ve vodném prostředí. Tím by bylo zaručeno přirozené pokračování aktuálních experimentů prováděných s lepem ve vysušeném stavu.

Před samotným pozorováním bylo třeba vypracovat postup přípravy vzorku vysušeného lepku pro skenování. Ten vycházel z pozorování, že lepek svým vysušením

nemění významně objem ani tvar, a proto lze předpokládat, že i jeho vnitřní struktura zůstává bez podstatných změn. Aby na povrchu lepkového xerogelu nebyly nerovnosti větších rozměrů, než jaké jsou pozorovatelné AFM, byl v průběhu vysušení vypraný lepek přitisknut na atomárně rovný křemíkový ingot, který nechal vyniknout samotné mikrostrukturu lepkové sítě na molekulární úrovni.

Poněvadž ingot není k lepku příliš přilnavý, bylo nutné přitisknutý lepek zatížit vhodným předmětem. Jako příhodnější se jevily hydrofobní předměty (v našem případě byla ideální plastová nožka od nábytku), naopak přilnavá skleněná kádinka byla méně vhodná, protože se od ní lepek těžko odlepoval. Snadné odlepení je důležité proto, že po počátečním částečném vysušení a zafixování tvaru lepku na ingotu je třeba těžítka odstranit, aby bylo další dosoušení účinnější. Pokud bylo těžítka přilnavé, docházelo při jeho odstraňování k odlepení lepku od ingotu, což mělo negativní dopad na kvalitu skenování povrchu vzorku.

Vlastní sušení probíhalo ve dvou fázích. Nejdříve byl vzorek předsušen pod těžítkem, které bylo následně odstraněno a lepek dosušen. Testovány byly různé teploty a různé doby sušení, a to zejména ve fázi počátečního předsušení s těžítkem. Teploty první fáze byly měněny v rozmezí od 50 do 120 °C. Doby předsušení byly voleny v závislosti na použité teplotě v rozmezí od 10 min po 24 hodin. Varianta, kdy toto předsušení probíhalo za vysoké teploty 120 °C po dobu cca 10 min, se neosvědčila, protože při takto rychlém vysušení vznikly v lepku praskliny, které jeho hladkou plochu poškodily a pozorování pomocí AFM tak zcela znemožnily. Naopak jako vhodnější se ukázala varianta s pomalým předsušením za teploty 50 °C přes noc. Druhá fáze byla volena jednotně. Po odstranění těžítka probíhalo dosoušení při 50 °C přes noc nebo déle. Tato teplota byla nakonec zvolena pro obě fáze sušení, protože při vyšších teplotách dochází k denuraci bílkovin a hrozí nebezpečí výrazných změn v mikrostrukturu lepku oproti nativnímu stavu. Po úplném vysušení byl ingot s lepkem přesunut do exsikátoru až do doby, kdy byl skenován AFM. Ani tento postup ale zatím nelze považovat za definitivní, protože pozorování různých preparátů připravených ze stejných vzorků mouky neposkytovala vždy stejné výsledky.

I přes popisované obtíže s přípravou vzorků naznačují získané výsledky určitou souvislost mezi strukturou xerogelu lepku a hodnotou Gluten indexu. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u vzorku mouky **VZX** zachyceného na obrázku 33, kde je vidět výrazná vláknitá struktura. Zároveň hodnota Gluten indexu tohoto vzorku rovná 94 výrazně převyšuje hodnoty vzorků ostatních (protože k tomuto vzorku nebyly s výjimkou Gluten

indexu k dispozici hodnoty ostatních technologických ukazatelů kvality, nebyl nakonec zařazen mezi vzorky porovnávané i dalšími metodami, zejména GPC). Gluten index je relativně vysoký i u vzorků mouk **VZ1** a **VZ2** (72, resp. 74), kde také můžeme pozorovat vláknitou strukturu. Její organizovanost se však jeví nižší než u vzorku **VZX**, navíc u vzorku **VZ2** poskytují dva různé pozorované preparáty různou velikost částic, z nichž je struktura složena. Naopak vzorek **VZ3**, jehož Gluten index je mnohem nižší (54), takto výraznou strukturu nemá, což nasvědčuje nižší míře organizace molekul proteinů tvořících lepek. Tato korelace tedy ukazuje, že lepek, který je tvořen pevnou sítí vzájemně propletených silných vláken, je i makroskopicky pevnější a soudržnější. Na druhou stranu nebyla nalezena žádná korelace mezi mikrostrukturou lepku a sedimentačním indexem dané mouky, resp. relativním zastoupením označených oblastí v chromatogramech GPC. Z toho je možné usuzovat, že mezi schopností tvořit výchozí agregáty, které jsou přítomny přímo v mouce, a schopností tvořit pevnou trojrozměrnou strukturu lepkové sítě, neexistuje přímá souvislost a že vznik každé z těchto struktur se řídí jinými interakcemi.

Znovu je ale třeba zdůraznit, že pozorování metodou AFM nebylo z časových důvodů dotaženo k stoprocentní kvalitě a reprodukovatelnosti, proto je třeba uvedená konstatování považovat pouze za hypotézu, kterou bude třeba ještě ověřit dalšími experimenty s větším počtem vzorků. I přes určité obtíže se však metoda AFM aplikovaná na lepkový xerogel ukázala jako zajímavá možnost studia mikrostruktury lepku, neboť nevyžaduje žádné speciální podmínky skenování (např. vakuum nebo velmi nízkou teplotu). Tuto mikroskopickou techniku je principiálně možno rozšířit i na vzorky v nativním stavu, čímž by bylo dosaženo plynulého pokračování popisovaných experimentů směrem k přirozeným technologickým podmínkám pšeničného lepku.

Metodu AFM ke studiu mikrostruktury lepku použili také Matuura a spol. [50], ovšem vypraný pšeničný lepek nesusili přitisknutý k atomárně rovnému křemíkovému ingotu. Strukturu lepku zafixovali ve vakuu „nabubláním“ lepku do tuhé pěny, kterou následně dosušili a naskenovali pomocí AFM. Ovšem prezentované obrázky napovídají, že ani tato metoda neposkytuje kvalitní výsledky.

ZÁVĚR

Tato práce se zabývá vztahem mezi technologickými ukazateli kvality pšeničné mouky na jedné straně a zastoupením lepkových proteinů a mikrostrukturou lepkové sítě na straně druhé. Výsledky provedených experimentů ukazují na korelace mezi některými z technologických ukazatelů a námi zkoumanými vlastnostmi.

Byla provedena GPC lepkových proteinů extrahovaných destilovanou vodou a roztokem ve fosfátovém pufru s SDS. Zatímco u proteinů extrahovaných destilovanou vodou nebyla pozorována průkazná korelace mezi relativním zastoupením jednotlivých oblastí v chromatogramu a technologickými ukazateli, byla u extraktů ve fosfátovém pufru s SDS nalezena významná korelace mezi sedimentačním indexem a relativním zastoupením oblasti chromatogramu, která odpovídá komplexům proteinů navzájem vázaných disulfidickými vazbami. Naopak korelace mezi sedimentačním indexem a zastoupením oblasti proteinů o nižší molekulové hmotnosti má záporný korelační koeficient. To poukazuje na skutečnost, že vyšší hodnota sedimentačního indexu souvisí s vyšší schopností agregace lepkových proteinů do větších komplexů.

Analýza proteinových extraktů pomocí SDS-PAGE skutečně potvrzuje rozdíly v zastoupení některých lepkových proteinů, byť spíše menšího rozsahu. Tyto rozdíly jsou charakteristické pro konkrétní odrůdu pšenice, a mohou být jednou z příčin různých technologických vlastností lepku. Prokázání přímých souvislostí by však vyžadovalo další experimenty.

Na úrovni mikrostruktury, která byla studována metodou AFM, jsou zjevně patrné rozdíly mezi lepky o různých hodnotách Gluten indexu. Zatímco u lepku s velmi vysokou hodnotou Gluten indexu je zřetelná vysoce organizovaná vláknitá struktura, u lepků s nižšími hodnotami Gluten indexu se organizovanost postupně snižuje, až nakonec u lepku s hodnotou velmi nízkou není pozorovatelná prakticky vůbec. To naznačuje, že organizovanost mikrostruktury lepkové sítě je určujícím faktorem jeho makroskopických vlastností.

Přestože postup přípravy vzorků pro AFM ani samotné skenování preparátů nebyly dosud optimalizovány do té míry, aby experimenty byly zcela reprodukovatelné, ukazují získané výsledky na pravděpodobnou existenci významných souvislostí mezi mikrostrukturou proteinové sítě lepku a jeho makroskopickými vlastnostmi. To otevírá

možnosti dalšího studia struktury lepku na mikroskopické úrovni a vzájemných interakcí mezi lepkovými proteiny.

Získané výsledky ukazují, že obsah dusíkatých látek (resp. mokrého lepku) v pšeničné mouce není vždy zcela spolehlivým ukazatelem pekařské kvality mouky, protože záleží také na struktuře bílkovin, jejich vzájemných poměrech a interakcích na molekulární úrovni. Stejně tak žádný z ostatních nepřímých ukazatelů pekařské kvality pšeničné mouky neposkytuje o její kvalitě jednoznačnou výpověď, naopak jejich vzájemná korelace je často nízká. Každý z nich však může vypovídat o určitých vlastnostech lepkových proteinů a lepku na molekulární úrovni, jak bylo ukázáno na příkladu sedimentačního indexu a Gluten indexu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 2 sv. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [2] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2010, 536 s. ISBN 978-80-7418-051-4.
- [3] PŘÍHODA, Josef, Pavla HUMPOLÍKOVÁ a Dana NOVOTNÁ. *Základy pekárenské technologie*. Vyd. 1. Praha: Pekař a cukrář, 2003, 363 s. ISBN 80-902-9221-6.
- [4] ČESKO. Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 182/2012 Sb. ze dne 23. května 2012, kterou se mění vyhláška č. 333/1997 Sb., kterou se provádí § 18 písm. a), d), h), i), j) a k) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro mlýnské obilné výrobky, těstoviny, pekařské výrobky a cukrářské výrobky a těsta. In: *Sbírka zákonů České republiky*. 2012, částka 64, s. 2658-2663.
- [5] HAMPL, Jan. *Cereální chemie a technologie*. 1. vyd. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1970, 396 stran
- [6] PELIKÁN, Miloš a Lenka SÁKOVÁ. *Jakost a zpracování rostlinných produktů*. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, 2001, 363 s. ISBN 80-704-0502-3.
- [7] KUČEROVÁ, Jindřiška. *Technologie cereálií*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2004, 141 s. ISBN 978-80-7157-811-62008.
- [8] PŘÍHODA, Josef, Marie HRUŠKOVÁ a Pavel SKŘIVAN. *Cereální chemie a technologie*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2003, 202 s. ISBN 80-708-0530-7.
- [9] HULÍN, Petr, Pavel DOSTÁLEK a Igor HOCHÉL. Metody stanovení lepkových bílkovin v potravinách. *Chemické listy*. 2008, č. 102, 327 - 337.
- [10] RUJNER, Jolanta a Barbara A. CICHAŇSKA. *Bezlepková a bezmléčná dieta*. Vyd. 1. Brno: Computer Press, 2006, 108 s. Zdraví pro každého (Computer Press). ISBN 80-251-0775-2.

- [11] ČSN EN ISO 20483 (46 1401). *Obiloviny a luštěniny - Stanovení obsahu dusíku a výpočet obsahu dusíkatých látek - Kjeldahlova metoda*. Praha: Český normalizační institut, 2007.
- [12] MIŠ, A. Some Methodological Aspects of Determining Wet Gluten Quality by the Glutomatic Method (a laboratory note). *Int. Agrophysics*. 2000, issue 14, 263 - 267.
- [13] ČSN ISO 5529 (46 1022) *Pšenice - Stanovení sedimentačního indexu - Zeleného testu*. Praha: Český normalizační institut, 2000.
- [14] ČSN ISO 5530-2 (56 0114) *Pšeničná mouka - Fyzikální charakteristiky těst - část 2: Stanovení reologických vlastností na extenzografu*. Praha: Český normalizační institut, 1995.
- [15] POMERANZ, Y. *Advances in cereal science and technology*. St. Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemists, Inc, 1986, 364s. ISBN 09-132-5045-7.
- [16] SINGH, N. K., G. R. DONOVAN, I. L. BATEY, a F. MacRITCHIE. Use of Sonication and Size-Exclusion High-Performance Liquid Chromatography in the Study of Wheat Flour Proteins.: I. Dissolution of Total Proteins in the Absence of Reducing Agents. *Cereal Chemistry*. 1990, vol. 67, no. 2, 150 - 161.
- [17] OSBORNE, Thomas Burr. *The proteins of the wheat kernel*. Washington DC: Carnegie Institute Publ., 1907.
- [18] GERRARD, J. A., S. E. FAYLE, P. A. BROWN, K. H. SUTTON, L. SIMMONS a I. RASIAH. Effects of Microbial Transglutaminase on the Wheat Proteins of Bread and Croissant Dough. *Journal of Food Science*. 2001, volume 66, issue 6, 782 - 786. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2001.tb15172.x.
- [19] BATEY, I. L., R. B. GUPTA a F. MacRITCHIE. Use of Size-Exclusion High-Performance Liquid Chromatography in the Study of Wheat Flour Proteins: An Improved Chromatographic Procedure. *Cereal Chemistry*. 1991, volume 68, issue 2, 207 - 209.
- [20] BIETZ, Jerold A. Separation of cereal proteins by reserved-phase high-performance liquid chromatography. *Journal Chromatography*. 1983, volume 255, 219 - 238.
- [21] HOLZBECHER, Závaš a Jaroslav CHURÁČEK. *Analytická chemie*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1987, 663 s.

- [22] KRÁLOVÁ, Blanka. *Bioanalytické metody*. Vyd. 3., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, c1993, 254 s. ISBN 80-708-0449-1.
- [23] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Procesy a zařízení potravinářských a biotechnologických výroby*. Vyd. 1. Ostrava: KEY Publishing, 2012, 494 s. ISBN 978-80-7418-086-6.
- [24] MEYER, Veronika. *Practical high-performance liquid chromatography*. 5th ed. Chichester, West Sussex, UK: Wiley, 2010, xiii, 412 s. ISBN 978-0-470-68842-7.
- [25] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [26] SNYDER, Lloyd R., Joseph L. GLAJCH a J KIRKLAND. *Practical HPLC method development*. New York: John Wiley, c1988, viii, 260 s. ISBN 0-471-62782-8.
- [27] KUBÁŇ, Vlastimil a Petr KUBÁŇ. *Analýza potravin*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007, 202 s. ISBN 978-80-7375-036-7.
- [28] VAŇKOVÁ, Hana. Peptidové mapy. *Chemické listy*. 1999, č. 93, 120 - 127.
- [29] WATSON, J. a O. SPARKMAN. *Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications and strategies for data interpretation*. 4th ed. Chichester: John Wiley & Sons, c2007, xxiv, 834 s. ISBN 978-0-470-51689-8.
- [30] SCHALLEY, Christoph A. *Analytical methods in supramolecular chemistry* [online]. Weinheim: Wiley-VCH, 2007.
- [31] KONTOGIORGOS, Vassilis. Microstructure of hydrated gluten network. *Food research international*. 2011, volume 44, issue 9, 2582 - 2586. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.06.021.
- [32] KUKTAITE, R., H. LARSSON, S. MARTTILA a E. JOHANSSON. Effect of mixing time on gluten recovered by ultracentrifugation studied by microscopy and rheological measurements. *Cereal chemistry*. 2005, volume 82, issue 4, 375 - 384.
- [33] ROBERTSON, George H., Ann E. BLECHL, William J. HURKMAN, Olin D. ANDERSON a Thung K. CAO. Physical Characteristics of Genetically Altered Wheat Related to Technological Protein Separation. *Cereal chemistry*. 2013, volume 90, issue 1, 1 - 12.

- [34] AMEND, Thomas a Hans-Dieter BELITZ. Gluten formation studied by the transmission electron-microscope. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. 1990, volume 191, issue 3, 184 - 193. DOI: 10.1007/BF01197618.
- [35] LI, Yin, Qiong WANG, Xiaoyan LI, Xin XIAO, Fusheng SUN, Cheng WANG, Wei HU, Zhijuan FENG, Junli CHANG, Mingjie CHEN, Yuesheng WANG, Kexiu LI, Guangxiao YANG a Guangyuan HE. Coexpression of the High Molecular Weight Glutenin Subunit 1Ax1 and Puroindoline Improves Dough Mixing Properties in Durum Wheat (*Triticum turgidum* L. ssp durum). *PLoS ONE*. 2012, volume 7, issue 11. DOI: e50057.
- [36] GOMEZ, Analia. V., Evelina G. FERRER, Maria C. AÑÓN a Maria C. PUPPO, Changes in secondary structure of gluten proteins due to emulsifiers. *Journal of molecular structure*. 2013, volume 1033, 51 - 58.
- [37] KHATKAR, B. S., Sheweta BARAK a Deepak MUDGIL. Effects of gliadin addition on the rheological, microscopic and thermal characteristics of wheat gluten. *International journal of biological macromolecules*. 2013, volume 53, 38 - 41.
- [38] HAN Lihong, Yongqiang CHENG, Shuang QIU, Eizo TATSUMI, Qun SHEN, Zhanhui LU a Lite LI. The Effects of Vital Wheat Gluten and Transglutaminase on the Thermomechanical and Dynamic Rheological Properties of Buckwheat Dough. *Food and Bioprocess Technology*. 2013, volume 6, issue 2, 561 - 569. DOI: 10.1007/s11947-011-0738-9.
- [39] BAIER-SCHENK, A., S. HANDSCHIN, M. von SCHÖNAU, A. G. BITTERMANN, T. BÄCHI a B. CONDE-PETIT. In situ observation of the freezing process in wheat dough by confocal laser scanning microscopy (CLSM): Formation of ice and changes in the gluten network. *Journal of cereal science*. 2005, volume 42, issue 2, 255 - 260. DOI: 10.1016/j.jcs.2005.04.006.
- [40] LI, W., B. J. DOBRASZCZYK a P. J. WILDE. Surface properties and locations of gluten proteins and lipids revealed using confocal scanning laser microscopy in bread dough. *Journal of cereal science*. 2004, volume 39, issue 3, 403 - 411. DOI: 10.1016/j.jcs.2004.02.004.
- [41] FRANK, Luděk a Jaroslav KRÁL. *Metody analýzy povrchů*. Praha: Academia, 2002, 489 s. ISBN 80-200-0594-3.

- [42] SCHAUER, Pavel. AFM mikroskopie (atomic force microscopy). *Ústav fyziky FAST VUT* [online]. © 2001-2013 [cit. 2013-04-17]. Dostupné z: http://fyzika.fce.vutbr.cz/file/kusak/AFM_mikroskopie.pdf
- [43] HOPPERT, Michael. *Microscopic techniques in biotechnology* [online]. Weinheim: Wiley-VCH, 2003, 330 s., ISBN 978-3-527-30198-0
- [44] LEDNICKÝ, František. *Mikroskopie a morfologie polymerů*. Vyd. 1. V Liberci: Technická univerzita, 2009, 71 s. ISBN 978-80-7372-486-3.
- [45] DALLA RIZZA, M., P. DÍAZ DELLAVALLE, D. VÁZQUEZ a M. CASTRO. Improved Resolution of Nonsilica-Based Size-Exclusion HPLC Column for Wheat Flour Protein Analyses. 2005, volume 82, issue 3, 287 - 289. ISSN 00090352
- [46] TSILO, Toi J., Jae-Bom OHM, Gary A. HARELAND a James A. ANDERSON. Association of Size-Exclusion HPLC of Endosperm Proteins with Dough Mixing and Breadmaking Characteristics in a Recombinant Inbred Population of Hard Red Spring Wheat. 2010, volume 87, issue 2, 104 - 111. DOI: 10.1094/CCHEM-87-2-0104.
- [47] In-gel protein digestion with trypsin: In-gel tryptic digestion of Coomassie-stained or SYPRO-stained protein bands and sample preparation for LC-MS analysis. *Huck Institutes of the Life Sciences* [online]. Copyright © 2013 [cit. 2013-04-03]. Dostupné z: <http://www.huck.psu.edu/facilities/proteomics-mass-spectrometry-up/protocols/how-to-digest-in-gel-samples-with-trypsin>
- [48] PRESTON, K. R., O. M. LUKOW a B. MORGAN. Analysis of Relationships Between Flour Quality Properties and Protein Fractions in a World Wheat Collection. *Cereal Chemistry*. 1992, volume 69, issue 5, 560 - 567.
- [49] CUBADDA, E. Raimondo, Marina CARCEA, Emanuele MARCONI a Maria C. TRIVISONNO. Influence of protein content on durum wheat gluten strength determined by the SDS sedimentation test and by other methods. *Cereal foods world*. 2007, volume 52, issue 5, 273 - 277. ISSN 0146-6283.
- [50] MATUURA Tania, Fabio de Lima LEITE a Rubens BERNARDES FILHO. Wheat Gluten Analysis by Atomic Force Microscopy. *Acta Microscopica*, 2003, volume 12, Supplement A, 100 - 102.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

2D	dvojměrné zobrazení
2-ME	2-merkaptóethanol (2-mercaptoethanol)
3D	trojměrné zobrazení
ACN	acetonitril
AFM	Mikroskopie atomárních sil (Atomic Force Microscopy)
CLSM	Konfokální laserová skenovací mikroskopie (Confocal Laser Scanning Microscopy)
ČSN EN ISO	Česká technická norma, která zavádí do soustavy českých norem evropskou normu identickou s mezinárodní normou mezinárodní organizace pro normalizaci ISO (International Organization for Standardization)
DTT	Dithiothreitol
ESI	Elektrosprayová ionizace (Electrospray Ionisation)
ESI-IT-MS	hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací a iontovou pastí
GPC	Gelová permeační chromatografie (Gel Permeation Chromatography)
HMW-GS	podjednotky gluteninů s vysokou molekulovou hmotností (High Molecular Weight Glutenin Subunits)
IAA	jodoacetamid
ICR	iontová cyklotronová rezonance (Ion Cyclotron Resonance)
IEC	iontově výměnná chromatografie (Ion-Exchange Chromatography)
IT	iontová past (Ion trap)
LM	světelná mikroskopie (Light Microscopy)
LMW-GS	podjednotky gluteninů s nízkou molekulovou hmotností (Low Molecular Weight Glutenin Subunits)
<i>m/z</i>	hmotnost/náboj
MALDI	Ionizace laserem za přítomnosti matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)

MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
REMPI	Rezonanční multifotonová ionizace (Resonance-Enhanced Multiphoton Ionization)
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography)
SDS	dodecylsulfát sodný (Sodium Dodecylsulfate)
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylovém gelu s dodecylsulfátem sodným
SEC	velikostně vylučovací chromatografie (Size Exclusion Chromatography)
SEM	Rastrovací elektronová mikroskopie (Scanning Electron Microscopy)
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie (Transmission Electron Microscopy)
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TOF	detektor doby letu (Time Of Flight)
UV	ultrafialový (ultraviolet)
v/v	objem/objem (volume/volume)
VIS	viditelný (visible)
w/v	hmotnost/objem (weight/volume)
ρ_{20}	hustota při 20°C

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1: Podélný řez pšeničným zrnem (převzato z [6]).</i>	15
<i>Obrázek 2: Zastoupení aminokyselin v pšenici [1].</i>	19
<i>Obrázek 3: Předpokládaná struktura gliadinu (převzato z [3]).</i>	22
<i>Obrázek 4: Předpokládaná struktura gluteninu (převzato z [3]).</i>	23
<i>Obrázek 5: Model struktury hydratovaného lepkového vlákna (převzato z [5]).</i>	25
<i>Obrázek 6: Schéma kapalinového chromatografu (převzato z [24]).</i>	35
<i>Obrázek 7: Schéma přístroje pro vertikální elektroforézu (převzato z [22]).</i>	38
<i>Obrázek 8: Schéma běžného hmotnostního spektrometru (převzato z [29]).</i>	40
<i>Obrázek 9: Schéma mikroskopu atomárních sil (převzato z [30] upraveno podle [43]).</i>	42
<i>Obrázek 10: Fotografie mokrých lepků (zleva VZ1, VZ2, VZ3).</i>	59
<i>Obrázek 11: SDS-PAGE všech extraktů v neredukovaném i redukovaném stavu.</i>	60
<i>Obrázek 12: Chromatogram extraktu vzorku VZ1 v destilované vodě.</i>	62
<i>Obrázek 13: SDS-PAGE frakcí z GPC vzorku VZ1 extrahovaného v destilované vodě.</i>	63
<i>Obrázek 14: Chromatogram extraktu vzorku VZ1 ve fosfátovém pufru s SDS.</i>	64
<i>Obrázek 15: SDS-PAGE frakcí z GPC vzorku VZ1 extrahovaného ve fosfát. pufru s SDS.</i>	65
<i>Obrázek 16: Chromatogram extraktu vzorku VZ2 v destilované vodě.</i>	66
<i>Obrázek 17: SDS-PAGE frakcí z GPC vzorku VZ2 extrahovaného v destilované vodě.</i>	67
<i>Obrázek 18: Chromatogram extraktu vzorku VZ2 ve fosfátovém pufru s SDS.</i>	68
<i>Obrázek 19: SDS-PAGE frakcí z GPC vzorku VZ2 extrahovaného ve fosfát. pufru s SDS.</i>	69
<i>Obrázek 20: Chromatogram extraktu vzorku VZ3 v destilované vodě.</i>	70
<i>Obrázek 21: SDS-PAGE frakcí z GPC vzorku VZ3 extrahovaného v destilované vodě.</i>	71
<i>Obrázek 22: Chromatogram extraktu vzorku VZ3 ve fosfátovém pufru s SDS.</i>	72
<i>Obrázek 23: SDS-PAGE frakcí z GPC vzorku VZ3 extrahovaného ve fosfát. pufru s SDS.</i>	73
<i>Obrázek 24: Graf procentuálních zastoupení jednotlivých označených oblastí extraktů v destilované vodě.</i>	74

<i>Obrázek 25: Graf procentuálních zastoupení jednotlivých zaznačených oblastí extraktů ve fosfátovém pufru s SDS.</i>	75
<i>Obrázek 26: Chromatogramy všech tří vzorků extrahovaných ve fosfátovém pufru s SDS v jednom grafu s vyznačenými rozdíly.</i>	78
<i>Obrázek 27: Hmotnostní spektrum slepého pokusu.</i>	80
<i>Obrázek 28: Hmotnostní spektrum HIV proteasy.</i>	80
<i>Obrázek 29: Zvětšené hmotnostní spektrum HIV proteasy (420 – 720 m/z).</i>	80
<i>Obrázek 30: Zvětšené hmotnostní spektrum HIV proteasy (558 – 579 m/z).</i>	81
<i>Obrázek 31: Zvětšené hmotnostní spektrum HIV proteasy (836 – 862 m/z).</i>	81
<i>Obrázek 32: Zvětšené hmotnostní spektrum HIV proteasy (1664 – 1691 m/z).</i>	81
<i>Obrázek 33: Snímky lepku z AFM vzorku VZX v postupně se zvyšujícím zvětšení.</i>	83
<i>Obrázek 34: Mikrostruktura lepku s velmi hustou sítí (VZ2).</i>	84
<i>Obrázek 35: Mikrostruktura lepku vzorku VZ1 (30×30 μm).</i>	85
<i>Obrázek 36: Mikrostruktura lepku vzorku VZ1 (3×3 μm).</i>	85
<i>Obrázek 37: Mikrostruktura lepku vzorku VZ2 (30×30 μm).</i>	86
<i>Obrázek 38: Mikrostruktura lepku vzorku VZ2 (3×3 μm).</i>	86
<i>Obrázek 39: Mikrostruktura lepku vzorku VZ3 (30×30 μm).</i>	87
<i>Obrázek 40: Mikrostruktura lepku vzorku VZ3 (3×3 μm).</i>	87

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1: Závislost chemického složení pšeničné mouky na stupni vymletí v % [6].....</i>	<i>17</i>
<i>Tabulka 2: Složení zaostřovacího a separačního gelu.</i>	<i>53</i>
<i>Tabulka 3: Hodnoty ukazatelů pekařské kvality mouky (popř. lepku).</i>	<i>58</i>
<i>Tabulka 4: Procentuální zastoupení plochy označených oblastí a směrodatná odchylna z chromatografie extraktů v destilované vodě.</i>	<i>74</i>
<i>Tabulka 5: Procentuální zastoupení plochy označených oblastí a směrodatná odchylna z chromatografie extraktů ve fosfátovém pufru s SDS.</i>	<i>75</i>
<i>Tabulka 6: Hodnoty korelačních koeficientů mezi relativním zastoupením označených oblastí chromatogramu extraktů ve fosfátovém pufru s SDS a technologickými ukazateli.</i>	<i>77</i>
<i>Tabulka 7: Hodnoty korelačních koeficientů mezi relativním zastoupením označených oblastí chromatogramu extraktů v destilované vodě a technologickými ukazateli.</i>	<i>77</i>
<i>Tabulka 8: Aminokyselinové sekvence peptidů HIV proteasy.</i>	<i>79</i>
<i>Tabulka 9: Identifikace peptidů z hmotnostního spektra.</i>	<i>82</i>