

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Izolace a charakterizace vybraných proteinů révy
vinné (*Vitis vinifera*)**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Simona Rakotonaina
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Zdeněk Perutka
Rok:	2020

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Simona Rakotonaina
Název práce	Izolace a charakterizace vybraných proteinů révy vinné (<i>Vitis vinifera</i>)
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum
Vedoucí práce	Mgr. Zdeněk Perutka
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	<p>Réva vinná je rostlina jejíž plody bobule (hroznové víno) se používají pro výrobu mnoha produktů. Nejzastoupenější složkou ve hroznovém víně jsou sacharidy, organické sloučeniny a fenolické sloučeniny. Množství a rozmanitost přítomných proteinů je malá. Nejvíce zastoupenými proteiny v hroznovém víně jsou takzvané PR-proteiny (pathogenesis related), představující chitinasy a proteiny podobné thaumatinu. Další bílkoviny nalézající se ve vinných produktech jsou invertasy a proteiny přenášející lipidy. V této práci byly extrahovány a izolovány proteinové frakce hroznového vína a porovnáno proteinové zastoupení s dalšími produkty z hrozna. Hlavním objektem zájmu byla cysteinová proteasa révy vinné (CYSP), jejíž přítomnost výskyt byl dokázán přímo v hroznové šťávě, ale i ve vinném octu.</p>
Klíčová slova	Proteiny z vína, cysteinová proteasa, SDS-PAGE, kapalinová chromatografie
Počet stran	59
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Simona Rakotonaina
Title	Isolation and characterisation of grapevine (<i>Vitis vinifera</i>) proteins
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Protein Biochemistry and Proteomics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research
Supervisor	Mgr. Zdeněk Perukta
The year of presentation	2020

Abstract

Grapevine is a plant whose berries are used to make many food products. The most abundant constituents in grapevine are carbohydrates, organic acids and phenolic compounds. The amount and variety of proteins present is limited. The major proteins in grapevine are the PR-proteins (pathogenesis related), representing chitinases and thaumatin-like proteins. Other proteins being present in wine products are invertases and lipid transfer proteins. In this work, protein fractions from grapes were extracted and isolated and the protein content was compared with other grape products. The main object of interest is a cysteine protease whose incidence has been demonstrated directly in grape juice but also in vinegar.

Keywords	Grape proteins, cysteine protease, SDS-PAGE, liquid chromatography
Number of pages	59
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	8
2.1	Produkty vyráběné z hroznového vína	8
2.1.1	Bílé víno	8
2.1.2	Vinný ocet	8
2.2	Proteiny obsažené v plodech révy vinné	8
2.2.1	PR-proteiny	9
2.2.2	Invertasy	12
2.2.3	Proteiny přenášející lipidy	12
2.2.4	Proteasy	13
2.3	Proteiny vína	15
2.3.1	Glykosylované proteiny	15
2.3.2	Metody odstranění zákalu vína	16
2.4	Metody izolace proteinů z rostlinného materiálu	17
2.4.1	Dialýza	17
2.4.2	Ultrafiltrace	18
2.4.3	Kapalinová chromatografie	18
2.4.4	Elektroforéza	19
2.4.5	Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinů	20
2.4.6	Hmotnostní spektrometrie	21
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
3.1	Materiál a metody	23
3.1.1	Chemikálie	23
3.1.2	Přístroje a pomůcky	23
3.2	Zpracování rostlinného materiálu	24
3.3	Dialýza a ultrafiltrace hroznové šťávy	24
3.3.1	Zpracování burčáku	25
3.3.2	Zpracování vinného octa	25
3.4	Měření koncentrace celkových proteinů ve vzorcích	25
3.5	SDS-PAGE elektroforéza	26
3.5.1	Příprava gelu	26
3.5.2	Příprava vzorku	27
3.5.3	Elektroforéza	27
3.6	Důkaz proteolytické aktivity octa	27
3.7	Kapalinová chromatografie	28
3.8	Měření koncentrace proteinů ve frakcích	29
3.9	SDS-PAGE frakcí proteinů	29
3.9.1	Nativní elektroforéza frakcí	30
3.10	Rozvolnění oligomerní struktury proteinů chaotropními činidly	30
3.11	SDS-PAGE v kombinaci s barvením alciánovou modří	31
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	33
4.1	Proteinové zastoupení v produktech z hrozna	33
4.2	Důkaz proteolytické aktivity octa	38
4.3	Gelová chromatografie proteinů z hrozna	40
4.4	Stanovení molekulové hmotnosti monomeru cysteinové proteasy	47
4.5	Barvení proteinů alciánovou modří	48
5	ZÁVĚR	51
6	LITERATURA	52
7	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	58

CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo izolovat a charakterizovat vybrané proteiny z hroznového vína, případně z dalších produktů vyrobených z hroznů.

Teoretická část práce je zaměřena na získání informací o problematice izolace a vlastnostech hlavních složek proteomu hrozna révy vinné. Součástí této části práce je také přehled vinných proteinů včetně jejich analogů a kapitola věnovaná metodám izolace a charakterizace těchto proteinů. Teoretické poznatky byly následně využity v praktické části práce.

1 ÚVOD

Réva vinná (*Vitis vinifera*) je krytosemenná dvouděložná rostlina patřící do čeledi Vitaceae. Je to liánovitá dřevina pěstovaná především v mírném a subtropickém podnebném pásu. Struktura listu révy vinné může být dlanitá, střídavá a laločnatá (Novák, 1961). V pěstitelství je tato rostlina rozmnožována převážně vegetativně. Naopak pro šlechtitelské účely je upřednostňováno generativní typ rozmnožování (Pavloušek, 2011).

Plodem je bobule, avšak jeho hovorový název je hrozen, hrozno nebo hroznové víno, i když se spíše jedná o květenství lata, než hrozen (Novák, 1961). Bobule je složena ze skupiny pletiv perikarpu (oplodí), které se dále dělí na endokarp (pletivo ohraničující semena), mezokarp (dužnina) a exokarp (slupka). Hlavní stavební složkou slupky je kutikula, dále epidermis a hypodermis a také je zde typický výskyt vysokého obsahu sekundárních metabolitů (taniny, fenolické látky). Dužnina tvoří převážnou část struktury bobulí, kdy se zde vyskytuje velké množství sacharidů, minerálních látek, organických kyselin a dalších látek. Hodnota pH je často nižší ve slupce než v jiných částech bobulí, protože obsahuje velké množství kyseliny citronové (Pavloušek, 2011). Bobule révy vinné je hlavní surovinou pro výrobu jednoho z nejstarších nápojů na Zemi, vína.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Produkty vyráběné z hroznového vína

2.1.1 Bílé víno

Víno je jeden z nejstarších a nejužívanějších nápojů po celém světě. Jeho první výroba je datována až k roku 7000-6000 př. n. l. v oblasti Černého a Kaspického moře (Chambers a Pretorious, 2010). Podle americké organizace Wine Institute byla pro rok 2017 celosvětová spotřeba vína 25 279 162 litrů, z toho v České republice 190 000 litrů (Wine Statistics, c1934-2020). Výrobě vína předchází sběr bobulí, po kterém nejprve dochází k lisování hroznů k získání šťávy. Při této části se přidává plynný oxid siřičitý pro potlačení aktivity mikroorganismů, a také má antioxidační účinky. Dále se šťáva přemísť do chlazené nádoby a zde je ponechána po dobu několika hodin, aby klesly ke dnu přebytečné zbytky slupky a semen. Poté se ke šťávě mohou přidat kvasinky a dochází k procesu zvaném fermentace, kdy jsou sacharidy přeměňovány na ethanol a oxid uhličitý. Často jsou ke kvasinkám přidávány bakterie mléčného kvašení, bakterie *Oenococcus oeni* nebo některé druhy rodu *Lactobacillus* a *Pediococcus*, které podporují jablečno-mléčné kvašení, při kterém dochází k přeměně malátu na laktát. Tím dochází ke zmírnění trpké chuti vína (Pavloušek, 2010). Dalším krokem je čiření vína, kdy se do vína přidává adsorpční materiál pro odstranění přebytečných látek, následuje stabilizace a filtrace. Nakonec se víno skladuje v lahvích (Pavloušek, 2011).

2.1.2 Vinný ocet

Ocet je obecně potravina, která se vyrábí oxidací ethanolu na kyselinu octovou. Vinný ocet je vyráběn z bílého či červeného vína a je nejpoužívanější v oblasti Středozevního moře v Evropě. Obecně se výroba octa sestává ze dvou fermentačních procesů. První je přeměna sacharidů na ethanol pomocí kvasinek a druhý je oxidace alkoholů na kyselinu pomocí bakterií. Bílý vinný ocet se vyrábí z bílého vína, kdy se přítomný ethanol oxiduje na kyselinu octovou působením bakterií rodu *Acetobacter*, popřípadě *Gluconobacter* (Teskaye *et al.*, 2002).

2.2 Proteiny obsažené v plodech révy vinné

Nejvíce zastoupenou složkou v plodech révy vinné jsou sacharidy společně s některými vitamíny. Na rozdíl od sacharidů a vitamínů obsahují plody révy vinné malé množství proteinů. Šťáva z hroznů obsahuje zhruba 10-500 mg·l⁻¹ proteinů (Marangon *et al.*, 2014). Tyto proteiny jsou zodpovědné za mnoho životně důležitých funkcí jako je ochrana a obrana buňky nebo přenos signálů v buňkách (Giribaldi a Giuffrida, 2010).

Proteiny, které se podílejí na těchto procesech, jsou například ATPasa, enolasa či alkoholdehydrogenasa. Dalšími důležitými a hojně zastoupenými proteiny jsou takzvané PR-proteiny (pathogenesis-related) bohaté na prolin, proteiny bohaté na kyseliny glutamovou či proteiny, které se syntetizují jako odpověď na stres (metallothionein, cytochrom P450), invertasa nebo proteiny přenášející lipidy (LTP) (Ferreira *et al.*, 2001).

2.2.1 PR-proteiny

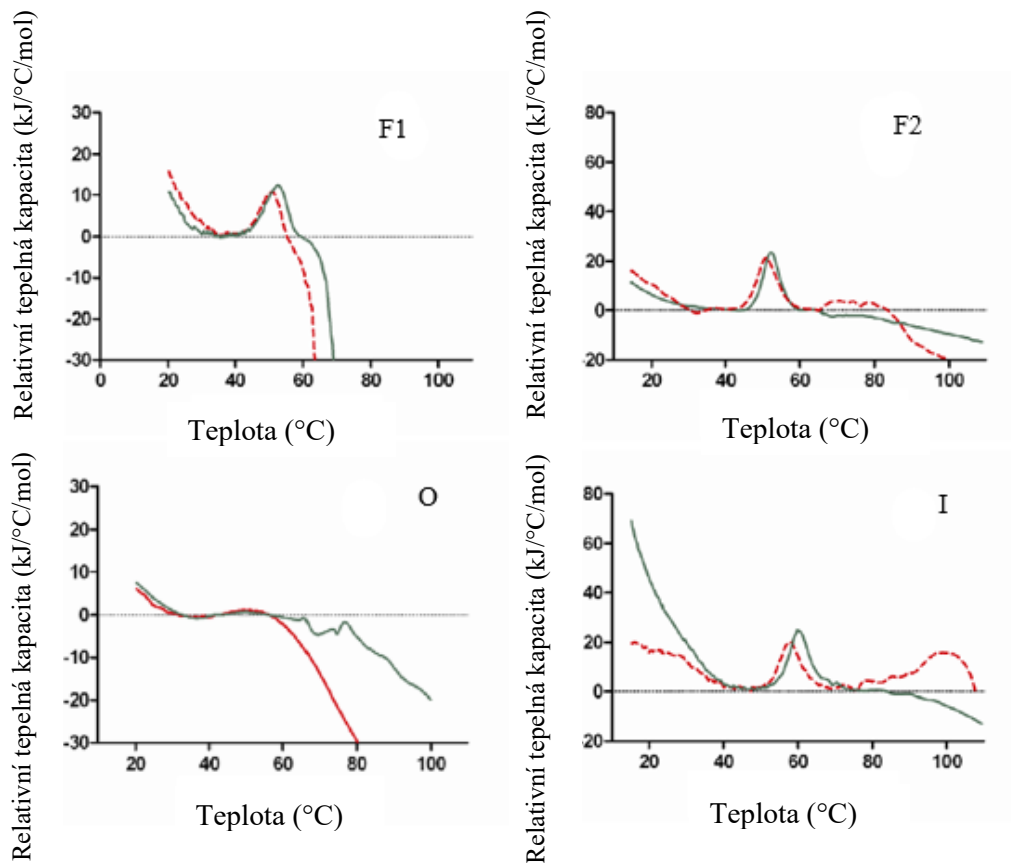
Stresové PR-proteiny jsou bílkoviny syntetizované jako odpověď na přítomnost patogenních mikroorganismů či na útok jiných škůdců. Vinné PR-proteiny jsou vysoce stabilní v kyselém prostředí a také odolné vůči proteolytickému štěpení (Waters *et al.*, 1996). Celkem je klasifikováno 17 rodin PR-proteinů (tab. 1) (Van Loon a Pieterse, 2006). V bobulích révy vinné se nejhojněji vyskytují chitinasy a proteiny podobné thaumatinu (TLPs). Tyto stresové proteiny mají značný vliv na tvorbu zákalu, a v důsledku toho i na kvalitu vína (Waters *et al.*, 1996).

Tabulka 1: Přehled rodin rostlinných PR-proteinů. U rodin PR-6, PR-7, PR-9, PR-10, PR-15, PR-16 a PR-17 nebyla zaznamenána antimikrobiální aktivita *in vitro*. Převzato a upraveno ze Sels *et al.*, 2008.

Rodina	Zástupce	Velikost (kDa)	Vlastnosti	Navržený mikrobiální cíl
PR-1	Tabákový PR-1a	15	Antifungální	Neznámý
PR-2	Tabákový PR-2	30	β -1,3-glukanasa	β -1,3-glukan
PR-3	Tabákový P, Q	25-30	Chitinasa (třída I, II, IV, V, VI)	Chitin
PR-4	Tabákový "R"	15-20	Chitinasa (třída I, II)	Chitin
PR-5	Tabákový S	25	Podobné thaumatinu	Membrána
PR-6	Rajčatový inhibitor 1	8	Inhibitor proteas	-
PR-7	Rajčatový P ₆₉	75	Endoproteasa	-
PR-8	Okurková chitinasa	28	Chitinasa třídy III	Chitin
PR-9	Tabáková "lignin-tvořící" peroxidasa	35	Peroxidasa	-
PR-10	Petrželový "PR1"	17	Podobný ribonuklelase	-
PR-11	Tabáková chitinasa "třídy V"	40	Chitinasa třídy I	Chitin
PR-12	Ředkvičkový Rs-AFP3	5	Defensin	Membrána
PR-13	Huseníček THI2.1	5	Thionin	Membrána
PR-14	Ječmenový LTP4	9	Proteiny přenášející lipidy	Membrána
PR-15	Ječmenový OxOa (zárodek)	20	Oxalát oxidasa	-
PR-16	Ječmenový OxOLP	20	Podobný oxalát oxidase	-
PR-17	Tabákový PRp27	27	Neznámé	-

2.2.1.1 Chitinasy

Chitinasy patří do rodiny PR-3 a jejich molekulová hmotnost je přibližně 31-34 kDa (Derckel *et al.*, 1996). Syntéza chitinasy je zvýšená během stresu (Dadakova *et al.*, 2015), avšak jejich koncentrace stoupá i během dozrávání plodu. Díky své endochotinasové aktivitě jsou chitinasy schopny rozštěpit chitin obsažený v buněčné stěně hub (Sela-Buurlage *et al.*, 1993). Konkrétně u hroznů PR-3 proteiny působí na buněčnou stěnu houbových plísní jako je *Botrytis cinerea* (Derckel *et al.*, 1998). Na rozdíl od TLPs jsou tyto enzymy méně odolné vyšším teplotám a snadno podléhají tepelné denaturaci, po které se jejich prostorová struktura těžko navrácí do původního stavu. Kvůli tomuto jsou chitinasy náchylnější ke shlukování a agregaci s dalšími složkami vína, což ve výsledku přispívá ke tvorbě zákalu ve vínu (Falconer *et al.*, 2010).



Obrázek 1: Ilustrace strukturální stability dvou proteinů ze skupiny chitinas třídy IV (F1, O) a dvou proteinů ze skupiny TLPs (F2, I). Měřeno diferenční skenovací kalorimetrií. Křivky znázorňují změny v chování proteinů v průběhu zvyšování teploty. Zelené křivky znázorňují chování proteinů v modelovém víně připraveném v laboratoři a červené křivky znázorňují chování proteinů v ultrafiltrovaném víně Sauvignon Blanc. Převzato a upraveno z Marangon *et al.*, 2011.

2.2.1.2 Proteiny podobné thaumatinu

Proteiny podobné thaumatinu patří do rodiny PR-5 (Tattersall *et al.*, 1997). Velikost těchto proteinů se pohybuje okolo 24 kDa. Jak už napovídá jejich název, jde o bílkoviny podobné thaumatinu (sladidlo na proteinové bázi) (Edens *et al.*, 1982). Jejich struktura je tvořena třemi doménami. Doménu I tvoří β -vlákna a je centrální částí proteinu. Doména II je tvořena α -helixy a doménu III tvoří β -vlákna společně se smyčkami. Díky disulfidovým můstkům, které stabilizují každou doménu, vykazují TLPs zvýšenou stabilitu proti účinku proteas, výkyvům teplot a změnám pH, a na rozdíl od chitinas se struktury po zahřátí a opětovném snížení teploty mohou částečně složit zpět do své původní konformace (Ogata *et al.*, 1982; Min *et al.*, 2004). Porovnání tepelné stability chitinas a TLPs je na obrázku 2. Mezi doménou I a II je štěrбина, do které se váží ligandy nebo receptory a může mít kyselé, bazické či neutrální vlastnosti (Marangon, 2014). Jejich hlavní ochranný účinek pro rostlinu spočívá zřejmě ve zvýšení permeability buněčných membrán parazitických hub. Mechanismus tohoto účinku TLPs však dosud nebyl popsán (Tattersall *et al.*, 1997).

Celkem byla popsána struktura devíti rostlinných TLPs, a to těchto: thaumatin, zeamatin, tabákový PR-5d, osmotin, banánový TLP, rajčatový NP24-I, třešňový alergen Pru Av2, jablečný alergen Mal d 2 a kiwi alergen act d 2. Vědci vyizolovali z hroznů Sauvignon blanc tři proteiny z této rodiny a všechny jsou podobné banánovým TLPs. Prostorové struktury těchto proteinů lze dohledat pod těmito zkratkami: F2/4JRU, I/4L5H a H2/4MBT (Marangon *et al.*, 2014).

2.2.1.3 β -glukanasy

Kromě dvou výše zmíněných rodin dochází u rostlin při jejich napadení patogenem také k syntéze proteinů ze skupiny PR-2. Nicméně ve zdravém plodu vína se nevyskytují (Robinson *et al.*, 1997). Hlavním zástupcem tohoto typu proteinu je β -1,3-glukanasa (EC 3.2.1.6). Ta svým účinkem hydrolyzuje β -O-glykosidové vazby β -1,3-glukanů obsažených v buněčné stěně hub (Theis a Stahl, 2004).

2.2.2 Invertasy

Invertasa (β -D-fruktofuranosidasa, E.C. 3.2.1.26) je enzym vyskytující se nejvíce ve slupkách plodů. Existují 3 typy invertas podle jejich umístění v buňce: cytoplasmatická, vakuolární a vázaná na buněčnou stěnu. Hlavní úlohou enzymu je štěpení sacharosy na fruktosu a glukosu, čímž přispívá ke hromadění monosacharidů v bobulích a tím k jejich sladší chuti (Robinson a Davies, 2000; Kulshrestha *et al.*, 2013).

2.2.3 Proteiny přenášející lipidy

Proteiny přenášející lipidy (LTPs), jsou malé bazické proteiny o molekulové hmotnosti 9-12 kDa bohaté na cystein (Jaeckels *et al.*, 2013). Jejich sekrece se zvyšuje při somatické embryogenezi nejen buněčné stěny hroznů, ale například i mrkve. Podle pokusů *in vitro* se předpokládá, že úlohou těchto proteinů je transport fosfolipidů v buňkách (Gomès *et al.*, 2003). Bylo také zjištěno, že hrají významnou úlohu při obraně rostliny před patogeny ve spojení s jasmonátovou signální dráhou, kdy se po napadení patogeny začnou uvolňovat membránové lipidy, které jsou přeneseny LTPs do chloroplastů a hydrolyzovány na mastné kyseliny. Kyselina jasmonová je syntetizována především z kyseliny linolenové, která je nejprve oxidována za pomoci enzymu lipoxygenasy, kdy se vytvoří hydroperoxyderivát. Dále dochází k dehydrataci předchozího produktu za katalýzy allenoxidsynthasou, následuje cyklizace vzniklého allenoxidu za přítomnosti allenoxidcyklasy. Nakonec dochází ke transportu meziprojektu do peroxisomů, kde je redukován a v procesu β -oxidace přeměněn za vzniku kyseliny jasmonové, ze které vzniká methyljasmonát za katalýzy S-adenosyl-L-methionin:jasmonát

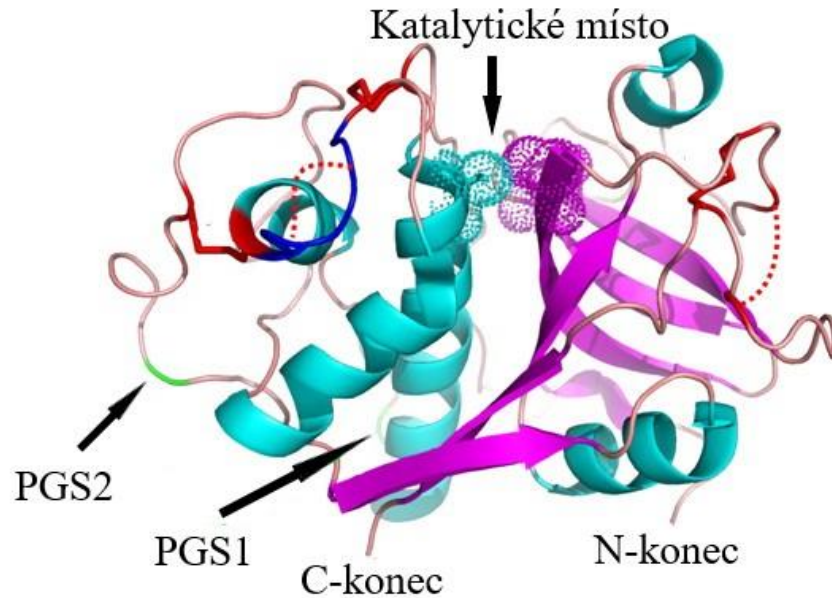
karboxymethyltransferasou (Turner *et al.*, 2002). Methyljasmonát je poté schopen vyvolat syntézu některých inhibitorů proteas, které poškozují trávicí ústrojí patogenů (Farmer a Ryan, 1990).

2.2.4 Proteasy

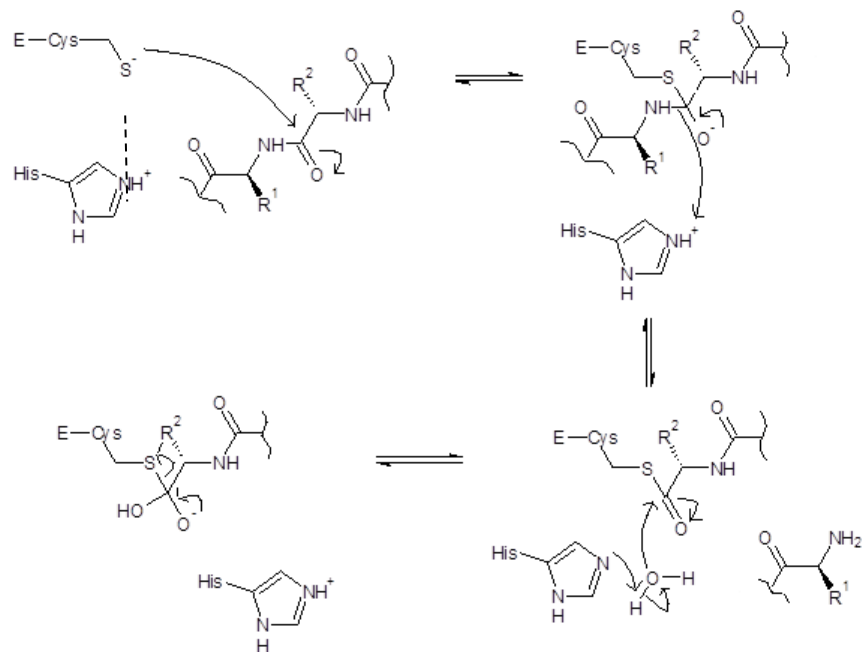
Proteasy (peptidasy) je skupina hydrolytických enzymů štěpící peptidovou vazbu mezi aminokyselinami v peptidech či proteinech. Podle místa štěpení polypeptidového řetězce se dělí na endopeptidasy, které štěpí peptidové vazby uvnitř řetězce, a na exopeptidasy štěpící polypeptidový řetězec od terminálních konců (Otto a Schirmeister, 1997). Proteasy mohou ve svém aktivním místě obsahovat různý typ katalytického residua aminokyseliny a podle tohoto se dělí na 7 skupin: aspartátové, cysteinové, serinové, threoninové, glutamové, asparaginové proteasy a metalloproteasy (Oda, 2011).

Cysteinové proteasy (E.C. 3.4.22) jsou enzymy obsahující v katalytickém aktivním místě aminokyselinu cystein. Cysteinové proteasy lze podle databáze MEROPS rozdělit do 14 nadrodin, a ty lze dále rozlišit na rodiny podle podobnosti aminokyselinové sekvence a mají přiřazené písmeno a číslo podle svého katalytického druhu (Pei a Grishin, 2003). Aby byly tyto proteiny aktivní, potřebují ve svém aktivním místě kromě cysteinu i histidin. Ten pomocí svého imidazolového kruhu deprotonuje thiolovou skupinu na postranním řetězci cysteinu za tvorby thiolát/imidazolinového páru. Thiolátový anion poté atakuje uhlík karbonylové skupiny v polypeptidovém řetězci za vzniku tetraedrického tranzitního stavu. V následné fázi dochází k odštěpení aminoskupiny i řetězce, který po ní následuje a nahrazení tohoto řetězce molekulou vody za vzniku sekundárního tetraedrického tranzitního stavu. Ve finální fázi je po disociaci thioesteru obnovena karboxylová skupina na substrátu (obr. 3). (Grzonka *et al.*, 2001).

Jedna z cysteinových proteas (CYSP), která je aktivní v kyselé oblasti pH, byla vyizolována z hrozna révy vinné. Strukturně je podobná dalším cysteinovým proteasám nalezeným v jiných rostlinách, jako je například RD21 (*Arabidopsis thaliana*), dále je pak podobná například rýžovému oryzainu (Expósito *et al.*, 1991; Perutka a Šebela, 2019). Struktura papainu jakožto hlavního zástupce thiolových proteas je popsána na obrázku 2. Tento protein obsahuje ve svém katalytickém místě kromě Cys a His i Asn/Asp. Ten je důležitý pro tvorbu thiolát/imidazolinového páru, protože se podílí na správné orientaci postranního řetězce His (Sanchez-Pulido a Ponting, 2016).



Obrázek 2: Struktura papainu. Katalytické místo představuje trojice aminokyselin Cys-His-Asn. PGS1 a PGS2 představují pozici předpokládaných glykosylačních míst ve struktuře proteinu. Jednotlivé strukturální prvky jsou označeny barvami: modrozelená představuje α -helix, fialová představuje β -skládaný list, červená představuje disulfidické vazby, růžová představuje loops (otočky) a modrá představuje extendable loop (rozšiřitelné otočky). Převzato a upraveno z Richau *et al.*, 2012.



Obrázek 3: Navrhovaný mechanismus účinku cysteinové proteasy. V prvním kroku je vyobrazen thiolát/imidazolinový pár, přičemž thiolátový anion atakuje uhlík karbonylové skupiny na peptidovém řetězci. V druhém kroku dochází k odštěpení aminoskupiny s peptidovým řetězcem, který následuje po ní. Ve třetím kroku je navázána molekula vody na karbonylový uhlík, na který je i navázána cysteinová proteasa. V posledním kroku je

odpojena cysteinová proteasa a vzniká karboxylová skupina na zbytku peptidového řetězce.
Převzato a upraveno z Chibale, 2002

2.3 Proteiny vína

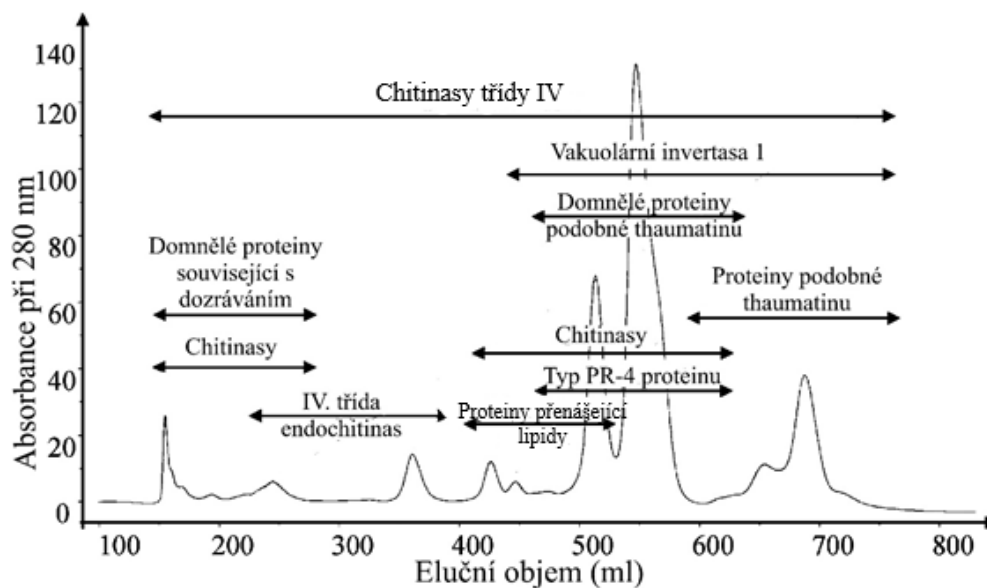
Vinné proteiny jsou polypeptidy o molekulové hmotnosti 9-120 kDa s isoelektrickým bodem mezi hodnotami od 3 po 9. Větší část zastupují proteiny o molekulové hmotnosti 20-30 kDa o nízkých isoelektrických bodech (Ferreira *et al.*, 2001). Proteiny ve víně mají nízkou nutriční hodnotu a snadno precipitují, což může vést ke tvorbě zákalu a vzniku nestabilního nápoje (Monteiro *et al.*, 2001).

Pomocí denaturační elektroforézy bylo zjištěno, že se ve víně vyskytuje několik desítek polypeptidů, které mají podobnou molekulovou hmotnost a isoelektrický bod. Další výzkumy vedly k poznání, že tyto podobné polypeptidy jsou deriváty stejných nebo málo odlišných prekurzorů (Monteiro *et al.*, 2001). V minulosti byly pomocí imunologických metod identifikovány některé proteiny, které jsou homologní hlavně k chitinasám, TLPs a osmotinu, tedy k PR-proteinům (Waters *et al.*, 1996). Jak již bylo výše zmíněno, tyto proteiny jsou vysoce odolné prostředí o nízkém pH a proteolýze, takže dokáží přežít procesy prováděné za těchto podmínek při výrobě vína (Monteiro *et al.*, 2001). Rozložení proteinů ve víně při separaci chromatografií s hydrofobní interakcí (HIC) je zobrazeno na obrázku 4, podle něhož patří mezi nejzastoupenější skupiny proteinů ve víně chitinasy a TLPs. Dnes se analýza proteomu vína provádí za použití technik hmotnostní spektrometrie (Cilindre *et al.*, 2008; Kambiranda *et al.* 2013; Perutka *et al.*, 2019).

2.3.1 Glykosylované proteiny

Glykosylace je nejčastějším případem posttranslační modifikace (Hart, 1992). Je to proces probíhající za pomoci integrálních membránových proteinů, při kterém se sacharidová jednotka váže na aminokyselinu v molekule proteinu nebo na lipidové molekuly v endoplazmatickém retikulu a následně v Golgiho aparátu (Stanley, 2011). Podle toho, na jaký atom proteinu se sacharid váže, se proces dělí na N-glykosylaci a O-glykosylaci. Vzniklé glykoproteiny se poté označují jako N-glykoproteiny a O-glykoproteiny (Lis a Sharon, 1993).

Vazba glykanů na proteiny ovlivňuje některé vlastnosti, například stabilitu a aktivitu (Ohtsubo a Marth, 2006). Při N-glykosylaci se sacharidová jednotka váže



Obrázek 4: Chromatogram rozdělení vinných proteinů vysokotlakou kapalinovou chromatografií na koloně s pryskyřicí Phenyl Sepharose High Performance (rozdělení podle hydrofobních interakcí HIC) při průtoku 3 ml/min. Převzato a upraveno z Marangon *et al.*, 2009.

na aminokyselinu asparagin amidovou vazbou, přitom tato aminokyselina musí být součástí sekvence Asn-X-Thr/Ser/Cys, kde X je jakákoliv aminokyselina kromě prolinu (Kornfeld a Kornfeld, 1985). V případě O-glykosylace dochází k vazbě mezi sacharidem a hydroxylovou skupinou serinu nebo threoninu za vzniku etherové vazby (Hart, 1992).

Bylo dokázáno, že přítomnost sacharidové složky ochraňuje proteiny ve víně před jejich agregací a následným srážením, čímž se snižuje množství vzniklého zákalu v porovnání s vínem s nižším obsahem glykoproteinů (Waters *et al.*, 1993).

2.3.2 Metody odstranění zákalu vína

Tvorba zákalu je jedním z nejvýznamnějších problémů ve vinařském průmyslu. Na základě empirických zkušeností vinařů je třeba víno ošetřit proti zákalu dříve, než se uzavře do lahví, protože zákal se může objevit až po dlouhé době například jako důsledek nevyhovujících podmínek při přepravě zboží.

Tři nejčastější faktory, které přispívají tomuto fenoménu jsou mikrobiální nestabilita, nestabilita vnanů a tepelná nestabilita proteinů (Van Sluyter *et al.*, 2015). Mikrobiální nestabilita je způsobena mikroorganismy, které se do vína dostávají přímo z hroznů, při výrobě nebo po výrobě vína. Pro odstranění tohoto problému se přidává do vína oxid siřičitý (Du Toit a Pretorius, 2000). Jako nestabilita vnanů se označuje tvorba krystalického vnanu draselného, popřípadě i vápenatého, které se tvoří jako produkt reakce kyseliny vinné a draslíku/vápníku při určité hodnotě pH a teploty. Jako prevence

před tvorbou těchto krystalů se používá ošetření chladem, elektrodialýza či úprava na iontoměničích (Lasanta a Gómez, 2012).

Jak již bylo uvedeno výše, takzvané PR-proteiny jsou hlavními proteiny způsobující nestabilitu vína díky tomu, že dokáží odolat procesu vinifikace, a tak mohou po zvýšení teploty precipitovat ve výsledném produktu za vzniku zákalu. Avšak vědci zjistili, že celková koncentrace proteinů pravděpodobně nekoreluje s mírou vzniku zákalu (Ferreira *et al.*, 2001).

Pro odstranění nejen těchto nežádoucích proteinů, ale i dalších nepotřebných a škodlivých látek, se ve vinařském průmyslu používá bentonit. Bentonit je typ rozpínavé jílovité horniny obsahující negativně nabitou část skládající se z montmorillonitu, patřící do skupiny smektitu. Jeho účinek spočívá ve výměně kationtů obsažených ve struktuře bentonitu za pozitivně nabité proteiny či další kationty ve víně (Catarino *et al.*, 2008). Tento proces je bohužel nákladný a také má vliv na kvalitu produktu a ztrátu objemu (Marangon *et al.*, 2014).

Dalším způsobem, jak zabránit vzniku zákalu ve víně by mohlo být degradací proteinů způsobující zákal pomocí enzymů, které redukují disulfidovou vazbu a štěpí polypeptidovou vazbu. Jedním problémem je, že enzymy redukující disulfidovou vazbu (proteindisulfidreduktasy) nejsou aktivní v kyselém prostředí vína. Dalším problémem je, jak již bylo dříve zmíněno, že TLPs a chitinasy jsou vysoce rezistentní vůči působení těchto degradačních enzymů. Proto se vědci snaží najít proteasy, proti kterým by vinné PR-proteiny odolné nebyly (Van Sluyter *et al.*, 2015).

Jiným způsobem, jak snížit zákal ve víně, je přidáním mannoproteinů (vysoce glykosylované proteiny) z kvasinek, které fungují jako faktor potlačující zákal (Waters *et al.*, 1993).

2.4 Metody izolace proteinů z rostlinného materiálu

2.4.1 Dialýza

Dialýza je purifikační metoda založená na volné difúzi nízkomolekulárních látek po směru koncentračního gradientu skrz semipermeabilní membránu, zatímco velikost pórů v membráně neumožňuje průchod látkám vysokomolekulárním. Po vyrovnání koncentrací na obou stranách membrány se proces zastaví. Velikostí pórů v membráně se tedy dá ovlivnit druh a typ procházejících molekul, hlavně proteinů.

Jedna z prvních dialyzačních membrán byla Cuprophan vyrobená z nesubstituované regenerované celulosy (RC membrány). Později byly vytvořeny membrány,

ve kterých byly hydroxylové skupiny v molekule celulosy nahrazeny acetátovými. Tyto membrány jsou acetátcelulosové (CA), diacetátcelulosové (CDA) a triacetátcelulosové (CTA). Dnes se nejvíce užívají takzvaná dialyzační celulosová střeva, která se po naplnění roztokem uzavrou a vloží se do pufru. Jelikož dochází k volné difúzi, je tato metoda časově náročnější (několik hodin až dnů). Během difúze je nutné obměňovat pufr, protože dochází k vyrovnání koncentrací vně a uvnitř dialyzačního střeva nebo cely (Yamashita a Sakurai, 2015).

2.4.2 Ultrafiltrace

Ultrafiltrace je separační metoda, při které, stejně jako v případě dialýzy, procházejí nízkomolekulární látky a voda přes polopropustnou membránu. Na rozdíl od dialýzy se zde neuplatňuje volná difúze, ale průchod molekul je urychlen tlakem vyšším, než je osmotický, nebo tlakem nižším. Nejčastěji se ultrafiltrace využívá pro zakoncentrování směsí proteinů nebo vysokomolekulárních látek.

Stejně jako u dialyzačních membrán existují ultrafiltrační membrány s různými rozměry pórů podle molekulových hmotností propouštěných látek. Nejužívanější materiály pro výrobu membrán jsou polysulfony, polyethylensulfony, celuloza a akrylonitril (Mehta a Zydney, 2005).

2.4.3 Kapalinová chromatografie

Chromatografie je fyzikálně-chemická metoda založená na separaci a distribuci látek mezi stacionární a mobilní fází. Separované látky při tomto procesu putují společně s mobilní fází kolem stacionární fáze a rozdělují se podle svých distribučních konstant (Poole a Poole, 1991).

Chromatografie se dělí do kategorií podle mnoha kritérií, nejjednodušší je dělení podle skupenství mobilní fáze na kapalinovou a plynovou chromatografii. Plynová chromatografie má jako mobilní fází nosný plyn, nejčastěji je to helium, vodík, dusík a argon, a stacionární fází je pevná látka nebo kapalná látka adsorbovaná na pevném inertním nosiči. Podle toho ji lze dále rozlišit na plynovou adsorpční chromatografii (GSC) a plynovou rozdělovací chromatografii (GLC) (Miller, 2009). V případě kapalinové chromatografie je mobilní fází kapalina a stacionární fází je pevná látka nebo kapalná látka nanosená jako tenká vrstva adsorbovaná na pevný inertní nosič. Pro dělení proteinů z roztoků se používá sloupcová kapalinová chromatografie, která se podle tlaku, který působí na protékající směs, dělí na nízkotlakou, střednětlakou a vysokotlakou chromatografii.

Nejčastěji používanou metodou pro separaci biomakromolekul je HPLC (High-performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie) v kombinaci s gelovou permeační chromatografií (Boyer, 2012). Ta používá jako stacionární fázi různě zesíťované gely, např. Sephadex (zesíťovaný dextran) či Sepharose (zesíťovaná agarosa) (Andrews, 1964). Po styku s tekutinou tyto gely bobtnají a tvoří tzv. molekulové síto, ve kterém jsou vytvořeny póry. Podle vhodně zvolené velikosti pórů lze dosáhnout vyššího stupně separace. V pórech se totiž zachycují pouze molekuly, které jsou dostatečně malé. Větší molekuly, které se nezadrží, protečou kolonou mnohem rychleji. Čím větší póry jsou, tím více molekul se zadrží a separace probíhá pomaleji a účinněji. Aparatura pro tuto metodu se sestává ze zásobníku rozpouštědla, vysokotlaké pumpy, filtru pro rozpouštědlo, dávkovače, kolony, detektoru a sběrače frakcí (Boyer, 2012).

Další často používaným typem chromatografie pro separaci proteinů je ionexová neboli iontoměničová chromatografie. Stacionární fázi (iontoměnič) jsou polymerní látky. Tyto polymerní pryskyřice se mohou vyrábět z mnoha látek, například z agarosy, dextranů, polystyrenu či celulosy. Jejich součástí jsou kladně či záporně nabitě molekuly umístěné na povrchu. Na nich se ve vhodném prostředí zachytávají příslušné ionty opačného náboje (Boyer, 2012; Yamamoto *et al.*, 1988). Existují dva typy iontoměničů. Katex, kationtoměnič má záporně nabitě skupiny na povrchu a vážou se na ně kationty. Anex, aniontoměnič má na povrchu molekul sorbentu kladně nabitě molekuly a slouží k zachytávání aniontů (Boyer, 2012).

2.4.4 Elektroforéza

Elektroforéza je elektromigrační metoda založená na rozdílné mobilitě molekul v elektrickém poli, což vede k jejich separaci. Existují tři typy elektromigračních (elektroforetických) metod, zonální elektroforéza, isotachoforéza a isoelektrická fokusace. Nejjednodušším typem elektroforézy je gelová zónová elektroforéza.

Gelová elektroforéza je metoda užívaná pro separaci makromolekulárních látek, jako jsou proteiny či nukleové kyseliny. Pro tuto techniku se používají nejčastěji dva typy gelů, polyakrylamidový a agarosový (Boyer, 2012). Agarosový gel se používá pro analýzu a separaci nukleových kyselin v horizontálním uspořádání, kdy molekuly DNA/RNA migrují ke kladně nabitě anodě, jelikož mají díky fosfátovým skupinám záporný náboj. Polyakrylamidový gel se používá pro analýzu a separaci hlavně proteinů a peptidů. Vzniká polymerací akrylamidu a *N,N'*-metylenbisakrylamidu, kdy se jako

iniciační činidlo přidává *N,N,N',N'*-tetramethylethylendiamin (TEMED) a persíran amonný (APS). PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) se běžně provádí v kapilárách nebo mezi dvěma skly ve vertikální poloze.

Pro elektroforézu je nutné použití pufrů a podle užívaných pufrů se elektroforéza dělí na kontinuální a diskontinuální. U kontinuální elektroforézy je gelový a elektroodový pufr homogenního složení a jednotného pH. Oproti tomu diskontinuální elektroforéza užívá pufrů o odlišném složení tedy i pH. Navíc je na diskontinuální elektroforézu potřeba dvou gelů, které se liší velikostí pórů (Maurer, 1971). Ve vrchním zaostřovacím gelu, který má větší velikost pórů, probíhá jev zvaný isotachoforéza, kdy se složky rozdělují podle svých mobilit do samostatných zón mezi vedoucí (leading) chloridový a koncový (trailing) glycinový ion. Vedoucí chloridový ion je obsažen v zaostřovacím gelu, zatímco koncový glycinový ion je obsažen v elektroodovém pufru. Při průchodu konstantního proudu se vzniklé zóny pohybují konstantní rychlostí (Křivánková *et al.*, 1999). Ve spodním dělicím gelu dochází díky menší velikosti pórů a zvýšení mobility glycinového iontu kvůli zvýšení pH prostředí k separaci molekul (Hames, 1998).

Nejužívanějším typem gelové elektroforézy používaným pro separaci proteinů je diskontinuální SDS-PAGE, při které se oddělují molekuly podle svých molekulových hmotností. Je toho dosaženo tak, že dochází k denaturaci proteinů přidávkem dodecylsírany sodného (SDS), který rozruší kvartérní, terciární i sekundární strukturu proteinů a vytváří micely, které mají záporný náboj, takže se všechny molekuly pohybují stejným směrem (Boyer, 2012). Po detekci proteinových pásů se výsledné gely barví například barvivem Coomassie Brilliant Blue nebo stříbrem a pozadí se následně odbarvuje odbarvovacím roztokem.

2.4.5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinů

Spektrofotometrie je analytická metoda založená na absorpci elektromagnetického záření látkou, která je ve většině případů rozpuštěná ve vhodném pufru. Měření probíhá přímo, kdy jsou měřeny spektrální vlastnosti proteinů, a nepřímo, kdy se měří změny ve spektrálních vlastnostech při interakci s dalšími činidly. Míra pohlcení elektromagnetického záření o určité vlnové délce je experimentálně měřena na spektrofotometru, který se skládá ze zdroje záření, monochromátoru, prostoru pro vzorek s kyvetou, detektoru a vyhodnocovacího zařízení. Množství pohlceného záření udává veličina absorbance *A*, jejíž vztah s měřeným vzorkem udává Lambert-Beerův zákon (obr. 5) (Marczenko, 2000). Pomocí přímo úměrné závislosti

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

Obrázek 5: Lambert-Beerův zákon. A představuje veličinu absorbance, ε představuje molární absorpční koeficient individuální pro každý materiál, l je délka dráhy paprsku světla procházející roztokem, c představuje koncentraci měřené látky.

absorbance na látkové koncentraci lze spektrofotometricky zjistit koncentraci určitých látek pomocí metody kalibrační křivky (Boyer, 2012).

Metoda stanovení koncentrace proteinů pomocí kyseliny bicinchoninové je metoda, při které se stanovuje koncentrace proteinů, za přítomnosti kyseliny bicinchoninové (BCA) a měďnatých iontů v zásaditém prostředí. Po přidání reakčního činidla k proteinu dochází ke tvorbě komplexu mezi proteinem a Cu^{2+} a následné redukci Cu^{2+} na Cu^+ v bazickém prostředí. Vzniklý měďný ion tvoří barevný komplex s BCA, jehož maximální absorbance je při 562 nm (Smith *et al.*, 1985).

Další metodou často užívanou pro určování koncentrace proteinů je metoda podle Bradforda. Při ní dochází ke tvorbě komplexu mezi barvivem Coomassie Brilliant Blue G-250 a proteiny, kdy dochází k posunu absorpčního maxima barviva ze 465 nm na 565 nm (Bradford, 1976).

2.4.6 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda založená na ionizaci nenabitých molekul a jejich detekci. V první fázi je vzorek odpařen a ionizován na nabitě částice pomocí iontového zdroje. Podle typu ionizace se ionizační techniky dělí na tvrdé a měkké.

Tvrdé ionizační techniky se používají pro ionizaci malých molekul nárazem elektronů. Měkké ionizační techniky jsou šetrnější a nedochází k tak rozsáhle fragmentaci molekul, jako u technik tvrdých, a používají se pro analýzu proteinů a nukleových kyselin. Často je používaná ionizace elektrosprejem (ESI), kdy je vzorek v podobě roztoku nanesen do analyzátoru pomocí kovové jehly či kapiláry, na které je napětí v řádech tisíců voltů. To vede ke vzniku protonů či elektronů obsažených v malých kapénkách a po vypaření rozpouštědla jsou ionty dále analyzovány. Dále se k analýze proteinů využívá MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) ionizace, kdy je vzorek s matricí umístěn na terčík. Matrice následně absorbuje energii z laserového pulsu a dochází k excitaci a ionizaci molekul vzorků (Boyer, 2012).

V další části dochází ve hmotnostním analyzátoru ve vakuu k dělení iontů podle poměru hmotnosti a náboje m/z . Často používanými analyzátory jsou analyzátor doby letu (time-of-flight, TOF), iontová past (ion trap, IT) či kvadrupólový analyzátor (De Hoffmann, 2005).

V poslední fázi probíhá detekce iontů, kdy detektor zaznamenává proud nebo náboj, který vzniká při dopadu iontu na něj. Poté je vytvořeno hmotnostní spektrum, kde jsou signály jednotlivých iontů zaznamenány jako funkce m/z (Boyer, 2012).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Chemikálie

0,5% (w/v) bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, Německo), 1,4-dithiotreitol (DTT; Sigma-Aldrich, Německo), 2-jodacetamid (IAA; Sigma-Aldrich, Německo), 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát (CHAPS; Sigma-Aldrich, Německo), aceton (Sigma-Aldrich, Německo), akrylamid/bisakrylamid (Bio-Rad, USA), alcian blue 8 GX (Sigma-Aldrich, Německo), Bicinchinonic Acid Protein Assay Kit (Sigma-Aldrich, Německo), BLUeye Prestained Protein Ladder (Sigma-Aldrich, Německo), butanol (Sigma-Aldrich, Německo), Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, Německo), disiřičitan draselný (Sigma-Aldrich, Německo), dodecylsírán sodný (SDS; Sigma-Aldrich, Německo), Dual Color Standard (Bio-Rad, USA), glycerol (Thermo Fisher Scientific, USA), glycin (Sigma-Aldrich, Německo), guanidin hydrochlorid (Sigma Aldrich, Německo), hovězí sérový albumin (BSA; Sigma-Aldrich, Německo), chlorid sodný (Sigma-Aldrich, Německo), cholát sodný (Sigma-Aldrich, Německo), kyselina jodistá (Sigma-Aldrich, Německo), kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich, Německo), kyselina octová (Lach-ner, ČR), kyselina trichloroctová (TCA; Sigma Aldrich, Německo), Laemmliho vzorkový pufr, 2x koncentrovaný (Thermo Fisher Scientific, USA), methanol (Sigma-Aldrich, Německo), mravenčan amonný (Sigma Aldrich, Německo), N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED; PlusOne, USA), octan amonný (Sigma-Aldrich, Německo), peroxidisírán amonný (APS; Sigma Aldrich, Německo), Tris hydrochlorid (Sigma-Aldrich, Německo), Triton X-100 (Merck, Německo), uhličitan amonný (Sigma-Aldrich, Německo).

3.1.2 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy (Radwag, Polsko), centrifuga 5804R (Eppendorf, Německo), centrifuga CVP-2 (bioSan, Lotyšsko), centrifuga Thermo X1R (Thermo Fisher Scientific, USA), dialyzační celulosová membrána (Sigma-Aldrich, Německo), digitální pH metr (Multical WTW, Německo), elektromagnetická míchačka (IKA LAB, Německo), kapalinový chromatograf, BioLogic DuoFlow (Bio-Rad, USA), kolona Superdex 200, rozměry 300x10 mm (Pharmacia Biotech, Švédsko), membránová vývěva (KNF Laboport, Německo), skener Umax PowerLook 1100 (UMAX, Taiwan), spektrofotometr Microtitration Reader Synergy MX (BioTech, USA), termostat (Major Science, USA),

termostat Thermomixer Comfort (Eppendorf, Německo), ultrafiltrační cela Amicon (Merck, Německo), ultrafiltrační mikrokolonky, vakuová odstředivka Concentrator Plus (Eppendorf, Německo), zařízení pro elektroforézu Mini Protean II (Bio-Rad, USA), zdroj pro elektroforézu PowerPac HC (Bio-Rad, USA).

Běžné laboratorní vybavení: kádinky, odměrné válce (skleněné i plastové), automatické pipety a špičky (Eppendorf), Petriho misky, lžička, zkumavky, stojan na zkumavky, mikrotitrační destička, mikrozkušavky, Erlenmayerova baňka, stříčka s destilovanou vodou.

3.2 Zpracování rostlinného materiálu

Pro získání proteinů z hroznové šťávy, byla z hrozna extrahována kapalná složka, která obsahovala dané proteiny v rozpuštěné formě. Bobule byly nejprve otrhány z větviček a zváženy. Zhruba 550 g bílých hroznů bylo následně omyto vodou a poté byly bobule postupně rozmačkávány a lisovány přes nylonovou textilní síťku, abychom získali pouze šťávu bez slupek a jader, tedy bez pevných látek. Práce byla prováděna v chladicí místnosti, aby se předešlo denaturaci proteinů. Izolace byla provedena dvakrát, podruhé bylo zpracováno 4,5 kg bílých hroznů.

300 ml hroznové šťávy bylo centrifugováno v litrových nádobkách při teplotě 8 °C, po dobu 30 minut při 6000 x g pro odstranění zákalu. Z důvodu velkého množství peletu, který byl následně rozmělněn a proteiny extrahovány do 100 ml dialyzačního pufru, se dále pracovalo jak se supernatantem, tak i s precipitátem.

3.3 Dialýza a ultrafiltrace hroznové šťávy

Supernatant i pelet z hroznového extraktu byly nality do dialyzačních střev (Sigma G-9402, 76 mm), která byla na jedné straně uzavřena plastovou sponou. Po dolití byly uzavřeny i druhé strany a střeva byla vložena do plastových kádinek s dialyzačním pufrem (25 mM octan amonný, pH 6). Ten byl připraven jako 20krát koncentrovaný roztok o koncentraci 500 mM. Z tohoto zásobního pufru byly odebírány alikvóty, které byly před použitím ředěny vychlazenou destilovanou vodou (4 °C) pro získání požadované koncentrace. Vzorky byly dialyzovány 4 dny, pufr byl měněn po 1 dni.

Po dialýze byly vzorky ultrafiltrovány v cele Amicon (filtr s 10 kDa cut-off) pro zakoncentrování proteinů a odstranění nízkomolekulárních látek. Ultrafiltrační aparatura byla umístěna v ledové lázni a tlačným plynem byl dusík. Vzorek obsahující supernatant z centrifugace hroznové šťávy byl z důvodu přítomnosti zákalu

před ultrafiltrací dvakrát centrifugován (30 minut, 6000 x g, 8 °C). Před ultrafiltrací byly odebrány ze vzorků alikvoty o objemu 4 ml.

3.3.1 Zpracování burčáku

Prvním meziproduktem při výrobě vína je tzv. burčák, částečně zkvašený hroznový extrakt. Pro srovnání proteinového zastoupení bylo zpracováno 350 ml burčáku stejným způsobem, jako v kap. 3.3.

3.3.2 Zpracování vinného octa

Pro porovnání proteinového zastoupení bylo provedeno proteinové nabohacení u komerčního vzorku vinného octa. Bylo použito 250 ml octa a vzorek byl zpracován analogicky, jak je uvedeno výše, v kap. 3.3.

3.4 Měření koncentrace celkových proteinů ve vzorcích

Koncentrace proteinů získaných po ultrafiltraci byla měřena spektrofotometricky metodou využívající kyseliny bicinchoninové na mikrotitrační destičce. Jako kalibrační standard byl použit hovězí sérový albumin (bovine serum albumine, BSA) o koncentraci 1 mg/ml. Aby bylo dosaženo koncentrací BSA 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40 a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a aby bylo stanovení provedeno při malých objemech, byl vzorek BSA pro koncentraci 1, 2, 5 a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ naředěn 5x pufrem, který byl použit při předchozích krocích (200 μl 1 mg $\cdot\text{ml}^{-1}$ BSA + 800 μl 25mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$). Do jamek mikrotitrační destičky bylo postupně napipetováno 1, 2, 5, a 10 μl zředěného roztoku BSA a dále bylo z původně koncentrovaného BSA napipetováno 4, 6, 8 a 10 μl pro dosažení zmíněných koncentrací.

Do jamek byly posléze napipetovány vzorky z alikvotů, které byly získány po dialýze, vždy 10 a 20 μl ze vzorku obsahujícího šťávu z hroznů po dialýze, dialyzovaného octa a dialyzovaného peletu. Dále byly napipetovány vzorky získané po ultrafiltraci. Ultrafiltrát octa a hroznové šťávy byl zředěn 10x v pufru, připraveném pro dialýzu. Do jamek bylo odpipetováno 2, 5 a 10 μl 10x ředěného ultrafiltrátu octa, 10x ředěného ultrafiltrátu hroznové šťávy a ultrafiltrátu peletu. Pro srovnání byly měřeny i koncentrace proteinů v burčáku, který byl podroben dialýze a ultrafiltraci, a peletu z burčáku, získaného centrifugací burčáku a následnou dialýzou a ultrafiltrací peletu. Oba vzorky burčáku byly 10x zředěny a do jamek bylo napipetováno 2, 5 a 10 μl z každého vzorku. Ředění některých vzorků probíhalo proto, že i po centrifugaci byly stále zbarvené.

Nakonec bylo použito činidlo Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit obsahující činidla A a B. Činidla byla smíchána v poměru 50:1. Do každé jamky se vzorky bylo

napipetováno 200 µl činidla, jako blank bylo použito samotné činidlo BCA. Po půl hodině byla měřena absorbance pomocí přístroje Microtitration Reader Synergy MX při 562 nm.

3.5 SDS-PAGE elektroforéza

3.5.1 Příprava gelu

Nejdříve byla připravena aparatura pro provedení elektroforézy. Obě skla byla očištěna ubrouskem navlhčeným isopropanolem, přiložena k sobě, připevněna držákem na skla a vložena do stojanu pro skla.

Pro přípravu dělicího gelu bylo smícháno akrylamid/biaskrylamid, Tris-HCl pufr a voda do Erlenmayerovy baňky, která byla zakryta gumovou zátkou, umístěna na elektromagnetickou míchačku a připojena na membránovou vývěvu pro odvodu vzduchu roztoku na 20-30 minut. Poté byl do směsi přidán dodecylsírany sodný (SDS), TEMED a nakonec APS (persíran amonný), které způsobuje ztuhnutí gelu. 10% APS byl připraven rozpuštěním pevného APS v destilované vodě. Po promíchání byla směs okamžitě nanášena mezi skla (zhruba $\frac{3}{4}$ prostoru mezi skly). Gel byl překryt 50% butanolem a zhruba 30 minut ponechán tuhnout.

Zaostřovací gel byl připraven stejným způsobem, jako dělicí gel. Po odstranění butanolu ze skel byl zaostřovací gel nalit až po horní okraj vnitřního skla nad dělicí gel a mezi skla byl vložen hřebínek. Gel byl nechán tuhnout 30 minut. Objemy činidel použitých pro přípravu gelů jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Příprava gelu pro elektroforézu

	AA/BIS [30%/0,8%]	Tris-HCl [1,5M-pH 8,8]	H ₂ O	SDS [10%]	APS [10%]	TEMED
Dělicí gel 10%	3,4 ml	2,5 ml	3,8 ml	0,100 ml	0,050 ml	0,015 ml
	AA/BIS [30%/0,8%]	Tris-HCl [0,5M-pH 6,8]	H ₂ O	SDS [10%]	APS [10%]	TEMED
Zaostřovací gel 4%	0,65 ml	1,25 ml	2,95 ml	0,100 ml	0,030 ml	0,015 ml

3.5.2 Příprava vzorku

Vzorky na gel byly připraveny následně. Do první mikrozkušavky (0,5 ml) bylo napipetováno 10 μ l ze vzorku obsahujícího pelet po ultrafiltraci (PUF), do druhé bylo napipetováno 7 μ l ze vzorku obsahujícího hroznovou šťávu (HUF) a do třetí bylo napipetováno 10 μ l ze vzorku obsahujícího ocet po ultrafiltraci (OUF). Vzorky byly ředěny 2x koncentrovaným Laemmliho pufrem v poměru 1:1. Mikrozkušavky byly poté inkubovány na termobloku po dobu 5 minut při teplotě 100 °C.

Vzorky pro SDS-PAGE vzorků burčáku byly připraveny tak, že bylo 5 μ l burčáku po ultrafiltraci a 5 μ l peletu burčáku po ultrafiltraci smícháno s 10 μ l 2x koncentrovaného Laemmliho pufru. Zkušavky se vzorky byly inkubovány na termobloku při teplotě 100 °C po dobu 5 minut.

3.5.3 Elektroforéza

Jako elektrodový pufr byl použit Tris-glycinový (100 mM, pH 8,3) elektrodový pufr 1x koncentrovaný. Nejdříve byl připraven 5x koncentrovaný pufr rozpuštěním 45 g Tris-HCl, 216 g glycinu a 15 g SDS ve 3 litrech destilované vody. Pro elektroforézu byl pufr 5x zředěn. Připravená skla s gelem byla vyjmuta z držáku a z vnějšku opláchnuta vodou. Poté byla skla s gelem vložena do elektroforetické cely kratším sklem směrem do vnitřního prostoru, a aparatura byla vložena do elektroforetické nádoby. Pufr byl nalit do elektroforetické cely a byl vyjmut hřebínek z gelů. Jamky byly promyty pufrem pomocí Pasteurovy pipety a vzorky byly napipetovány do jamek. Jako standard molekulových hmotností byl použit Dual Color Standard. Elektroforetická nádobka i cela byla doplněna pufrem podle potřeby a aparatura byla uzavřena. Po připojení ke zdroji elektrického napětí bylo nastaveno konstantní napětí 110 V. Elektroforetická separace trvala 90-100 minut. Zdroj proudu byl odpojen, když vzorky doputovaly zhruba 0,5 cm od spodní hrany gelu. Zaostrovací gel byl odstraněn a dále se pracovalo pouze se separačním gelem. Gel byl vložen do barvicího roztoku obsahujícího barvivo Coomassie Brilliant Blue G-250 v kyselém prostředí a barven přes noc. Následně byl gel odbarven standardním odbarvovacím roztokem (40% methanol v 10% kyselině octové) a uchován v destilované vodě pro oskenování gelu skenerem.

3.6 Důkaz proteolytické aktivity octa

Na základě informací o proteinovém složení hroznové šťávy a octa bylo provedeno štěpení proteinového substrátu vzorkem octa po ultrafiltraci. K tomuto účelu bylo připraveno 2 mg redukováného a alkylovaného BSA. Protein byl rozpuštěn ve 200 μ l 10 mM roztoku dithiotreitolu (DTT) ve 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Směs byla inkubována

na termomixeru po dobu 45 minut při teplotě 60 °C a 700 rpm. Poté bylo do zkumavek přidáno 40 µl 240 mM roztoku 2-jodacetamidu (IAA) ve stejném pufru. Zkumavky byly vloženy na třepačku, přikryty polystyrenovým víkem z důvodu citlivosti činidla na světlo a inkubovány při teplotě 25 °C po dobu 30 minut a 850 rpm. Nakonec bylo ke vzorkům přidáno 40 µl 280 mM roztoku DTT ve 100 mM (NH₄)₂CO₃. Vzorky byly naposledy inkubovány na termomixeru po dobu 30 minut při teplotě 25 °C a 850 rpm.

Pro stanovení proteolytické aktivity v octu byla připravena řada koncentrací OUF ředěním octanem amonným (50 mM, pH 6) tak, aby byly výsledné poměry OUF:BSA 1:100, 1:500, 1:1000 a 1:5000. Pro koncentrace 1:500, 1:1000 a 1:5000 se používal 50x ředěný OUF. Do pěti mikrozkušavek bylo odpipetováno po 14 µl (100 µg) připraveného vzorku BSA a byl přidán pufr mravenčan amonný (50 mM, pH 3). Pro snížení pH bylo do vzorků přidáno 0,5 µl 50% kyseliny mravenčí. Nakonec byly do každé zkumavky přidány 2 µl naředěného OUF (do každé zkumavky jiné ředění). Zkumavka bez přidaného OUF sloužila jako kontrola. Štěpení probíhalo 18 hodin při teplotě 37 °C.

Po noční inkubaci bylo z každé mikrozkušavky odpipetováno do nových mikrozkušavek 25 µl (50 µg BSA) vzorku a k tomu bylo přidáno 25 µl 2x koncentrovaného Laemmliho pufru a směs byla inkubována po dobu 5 minut při 100 °C na termobloku. Následně byla provedena elektroforéza vzorků stejně, jak je uvedeno v kap. 3.5.

3.7 Kapalinová chromatografie

Separace proteinů metodou střednětlaké kapalinové chromatografie probíhala na přístroji BioLogic DuoFlow. Jako mobilní fáze byl použit octan amonný (20 mM, pH 5,9) s přísadkou 0,1 M NaCl. Jako stacionární fáze byl použit gel Sephadex 200, kterým byla naplněna skleněná kolona (300x10 mm). Proteiny byly detekovány DAD (detektor s diodovým polem) detektorem. Před použitím byly vzorky centrifugovány při 5000 x g po dobu 30 minut při 8 °C. Poté byly dávkovány do dávkovače chromatografu po 200 až 250 µl pomocí mikrostříkačky. Vzorky protékaly rychlostí 0,7 ml/min a celková doba průběhu jedné separace byla 52 minut. Detekce probíhala při dvou vlnových délkách, 214 nm (maximální absorpce pro peptidovou vazbu) a 280 nm (maximální absorpce pro tryptofan). Po zjištění, že větší část proteinů zůstala v peletu hroznové šťávy se pracovalo pouze se vzorkem z peletu.

3.8 Měření koncentrace proteinů ve frakcích

Pro zjištění procentuálního rozložení proteinového obsahu byla změřena koncentrace proteinů v jednotlivých pěti frakcích, získaných separací na kapalinovém chromatografu. Kalibrační řada byla připravena stejným způsobem, jako v kap. 3.4. Z každé frakce bylo napipetováno do jamek mikrotitrační destičky vždy 5, 10 a 15 μl . Vzorek peletu pro měření koncentrace byl 10x ředěn vodou a do jamek destičky bylo napipetováno 2, 5 a 10 μl . Ke vzorkům v jamkách bylo napipetováno 200 μl BCA činidla, které bylo připraveno stejným způsobem, jako v kap. 3.3 a jako blank byla opět použita BCA. Po půl hodině byla měřena absorbance pomocí přístroje Microtitration Reader Synergy MX při 562 nm.

3.9 SDS-PAGE frakcí proteinů

Vzorky pro elektroforézu byly připraveny následovně. Z předchozího měření koncentrace (kap. 3.6) byly získány koncentrace proteinů v jednotlivých frakcích. Do mikrozkušavek byl napipetován pro frakce 1-5 objem představující 5 μg proteinů ve vzorku. Zjištěné koncentrace proteinů ve vzorcích jsou uvedeny v tabulce 3. Vzorky byly vloženy otevřené do vakuové odparky na 45 minut při teplotě 60 °C a byly odpařeny do sucha. Poté k nim bylo přidáno 15 μl Laemmliho pufru. Společně s elektroforézou frakcí byla provedena i analýza burčáku a peletu burčáku. Ke vzorkům burčáku bylo přidáno pouze 10 μl Laemmliho pufru. Mikrozkušavky byly dále inkubovány na termobloku po dobu 5 minut při 100 °C, a nakonec byly vzorky napipetovány na gel. Jako standard pro oba gely byl použit Dual Color Standard. Gel pro elektroforézu byl připraven stejně jako v bodě 3.5.1 podle tabulky 2.

Tabulka 3: Koncentrace frakcí potřebné pro přípravu vzorků na elektroforézu. F1-F5 představují jednotlivé odseparované frakce.

Vzorek	c [$\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]
F1	0,0973
F2	0,1653
F3	0,3422
F4	0,9059
F5	0,1631

3.9.1 Nativní elektroforéza frakcí

Gel pro nativní elektroforézu byl připraven podle postupu v kap. 3.5.1 a místo SDS byla přidána destilovaná voda. Bylo připraveno 5 mikrozkušavek, do kterých byly samostatně napipetovány frakce 2, 3, 4 a 5 tak, aby objem odpovídal 5 µg proteinů. Do poslední mikrozkušavky byl napipetován vzorek peletu hroznů po ultrafiltraci tak, aby hmotnost proteinů v objemu byla 25 µg. Vzorky s nízkým obsahem proteinu byly zahuštěny pomocí částečného odpaření za sníženého tlaku. Po odpaření vzorků bylo do zkumavek přidáno 15 µl vzorkového pufru. Vzorkový pufr byl připraven smícháním destilované vody (3 ml), 0,5M Tris-HCl (3 ml, pH 6,8), glycerolu (1,6 ml) a 0,5% bromfenolové modře (0,4 ml). 0,5M Tris-HCl pufr byl připraven rozpuštěním 6,06 g Tris-HCl ve 100 ml destilované vody.

Jako standard pro sledování postupu elektroforetické separace byla použita bromfenolová modř (0,5%) ředěná vzorkovým pufrem v poměru 1:1. Následně proběhla elektroforéza a barvení gelu podle kap. 3.5.3 a jako elektrodový pufr byl použit Tris-glycinový pufr bez SDS (100 mM, pH 8,3).

3.10 Rozvolnění oligomerní struktury proteinů chaotropními činidly

Pro rozvolnění oligomerní struktury izolované frakce obsahující cysteinovou proteasu o vysoké molekulové hmotnosti byly vyzkoušeny 2% roztok cholátu, 2% roztok Triton X-100, 10% roztok CHAPS nebo 16M roztok guanidinu. Pro vytvoření roztoků byl použit 100 mM Tris-HCl pufr (pH 6,8). Roztok cholátu byl vytvořen rozpuštěním 10 mg pevného cholátu ve 500 µl pufru, roztok Triton X-100 byl připraven smícháním 10 µl zásobního roztoku Triton X-100 v 500 µl pufru, roztok CHAPS byl připraven rozpuštěním 50 mg pevného CHAPS v 500 µl pufru a roztok guanidinu byl připraven rozpuštěním 0,764 g pevného guanidinu v 500 µl pufru.

Byly připraveny mikrozkušavky, do kterých byly v poměru 1:1 napipetovány vzorky a připravená činidla (32 µl vzorku frakce 2 z peletu hroznů + 32 µl činidla). Konečné koncentrace činidel ve vzorcích tak byly 1% roztok cholátu, 1% roztok Triton X-100, 5% roztok CHAPS a 8M roztok guanidinu. Vzorek frakce 2, který byl odseparován ze vzorku PUF při chromatografii, byl použit jako kontrola. Mikrozkušavky byly inkubovány na termomixeru po dobu 1 hodiny při teplotě 30 °C a 1200 rpm. Poté byly obsahy mikrozkušavek převedeny na ultrafiltrační mikrokolonky o objemu 2 ml s 10 kDa filtrem pro odstranění zbytků činidel a kolonky byly centrifugovány při teplotě 15 °C po dobu 5 minut při 10000 x g. Do kolonek poté bylo přidáno 150 µl Tris-HCl pufru a kolonky byly dále centrifugovány 15 minut při teplotě 15 °C při 10000 x g.

Pro detekci produktů působení činidel byla použita metoda SDS-PAGE s následným barvením podle postupu v kap. 3.5.

3.11 SDS-PAGE v kombinaci s barvením alciánovou modří

Barvení gelů alciánovou modří je typ barvení, které je specifické na neutrální glykoproteiny. Alciánová modř je měďnaté ftalocyanové barvivo a pomocí isothiuroniových skupin se váže na některé polyaniony. Pokus byl proveden podle metody použité v diplomové práci *Identifikace glykoproteinů v kultivarech hrachu setého* (Veveřková, 2018).

Jako vzorky byly použity vzorky šťávy z hroznů po ultrafiltraci z první izolace, peletu burčáku po ultrafiltraci, octa po ultrafiltraci a peletu z hroznů po ultrafiltraci z druhé izolace. Jedna sada vzorků byla připravena precipitací druhá bez ní. Precipitované vzorky byly připraveny smícháním s vychlazeným acetonem (-20 °C) obsahující 10% kyselinu trichloroctovou (TCA) v poměru 4:1 (aceton:vzorek). Pro namíchání směsi bylo použito 46 µl z octa po ultrafiltraci, 40 µl z peletu burčáku, 65 µl z peletu hroznů po ultrafiltraci a 26 µl z hroznové šťávy po ultrafiltraci. Z každé směsi bylo odpipetováno takové množství, aby odpovídalo 200 µg vzorku, obsah byl centrifugován (5 minut, 6 °C, 20000 x g). Supernatant obsahující aceton a TCA byl slit a do zkumavek byl přidán nový aceton pro promytí TCA. Po opětovné centrifugaci byly vzorky vloženy na vakuovou odparku po dobu 10 minut a při teplotě 60 °C pro odstranění zbytku acetonu. Odpařené vzorky byly rozpuštěny ve 45 µl 2x koncentrovaného Laemmliho pufru a po inkubaci na termobloku (5 minut, 100 °C) byly napipetovány na gel (15 µl). Neprecipitované vzorky byly připraveny tak, že do mikrozkušavek bylo napipetováno 18 µl z peletu burčáku, 24 µl z octa po ultrafiltraci, 33 µl z peletu hroznů po ultrafiltraci a 13 µl ze šťávy hroznů po ultrafiltraci, a poté byly vloženy na vakuovou odparku po dobu 30 minut při teplotě 60 °C. Po půl hodině byly vzorky rozpuštěny ve 33 µl Laemmliho pufru a po inkubaci na termobloku (5 minut, 100 °C) byly napipetovány na gel (15 µl).

Gel byl připraven stejným způsobem jako v kap. 3.5.1. Jako standard byl použit BLUeye Prestained Protein Ladder. Po elektroforóze byl gel umístěn do 10% TCA po dobu 30 minut pro precipitaci proteinů. Dále byl gel promyt destilovanou vodou 2krát v intervalu deseti minut. Následovala inkubace gelu v 1% kyselině jodisté pro zoxidování vicinálních diolů na sacharidech po dobu 50 minut. Poté byl gel opět omyt destilovanou vodou 2x v intervalu 10 minut. Gel byl následně vložen do 0,5% roztoku disiřičitanu draselného pro neutralizaci po dobu 30 minut. Po opětovném promytí gelu destilovanou

vodou (2x během 10 minut) došlo k barvení gelu v 0,5% roztoku alciánové modře rozpuštěné ve 3% kyselině octové přes noc. Poté byl gel odbarven opakovaně v 7,5% kyselině octové a poté byl gel uchován v destilované vodě a oskenován na skeneru (Gel Doc EZ Imager).

Pro srovnání byl připraven totožný gel barvený barvivem Coomassie Brilliant Blue G-250 a odbarvený standardním odbarvovacím roztokem.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Proteinové zastoupení v produktech z hrozna

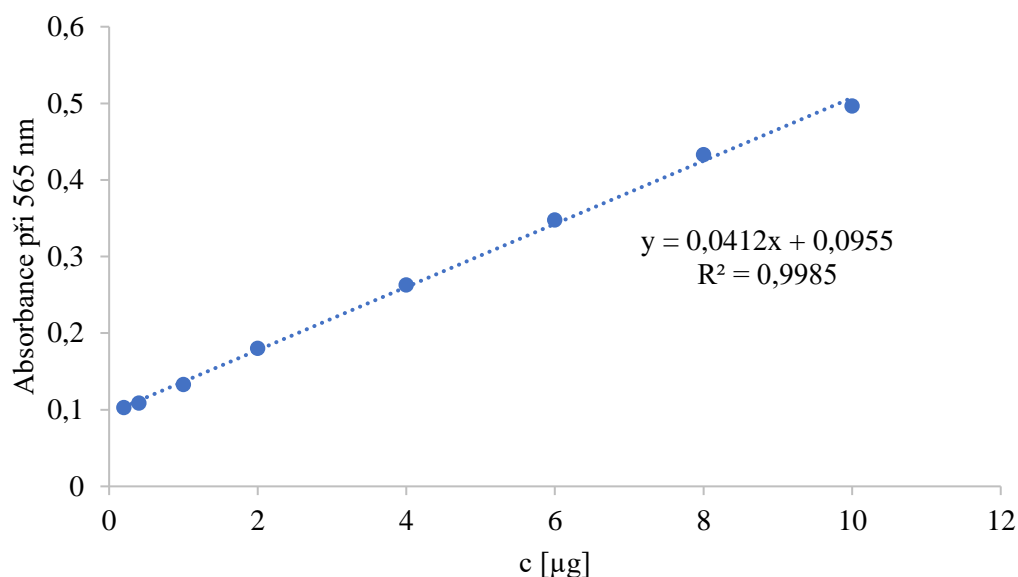
Během přípravy vzorků pro experimenty byly měřeny objemy a pH produktů hroznového vína, které jsou uvedeny v tabulce 4.

Koncentrace celkových proteinů byla měřena spektrofotometricky pomocí metody využívající kyseliny bicinchoninové. Ze změřených absorbancí standardů byla vytvořena kalibrační křivka (obr. 6), pomocí níž byly vypočteny koncentrace celkových proteinů ve vzorcích (hroznová šťáva po dialýze, ocet po dialýze, pelet po dialýze, hroznová šťáva po ultrafiltraci, ocet po ultrafiltraci, pelet po ultrafiltraci, burčák po ultrafiltraci a pelet burčáku po ultrafiltraci).

Rovnice kalibrační křivky byla $y = 0,0412x + 0,0955$. Do ní byly dosazeny za y změřené absorbance z první části tabulky 5 a byly vypočteny koncentrace, jejichž průměr je uveden v druhé části tabulky 5.

Tabulka 4: Změna objemů vzorků po dialýze a ultrafiltraci a jejich počáteční pH

	Hroznová šťáva	Ocet	Pelet z hroznové šťávy	Burčák
Původní objem	300 ml	250 ml	90 ml	350 ml
pH	3,87	2,87	/	3,89
Objem po dialýze	500 ml	294 ml	104 ml	487 ml
Objem po ultrafiltraci	6 ml	1,5 ml	4,5 ml	20 ml



Obrázek 6: Kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentraci BSA pro výpočet celkových proteinů ve vzorcích.

Dosazení do rovnice kalibrační křivky pro vzorek hroznové šťávy po dialýze pro $A=0,248$:

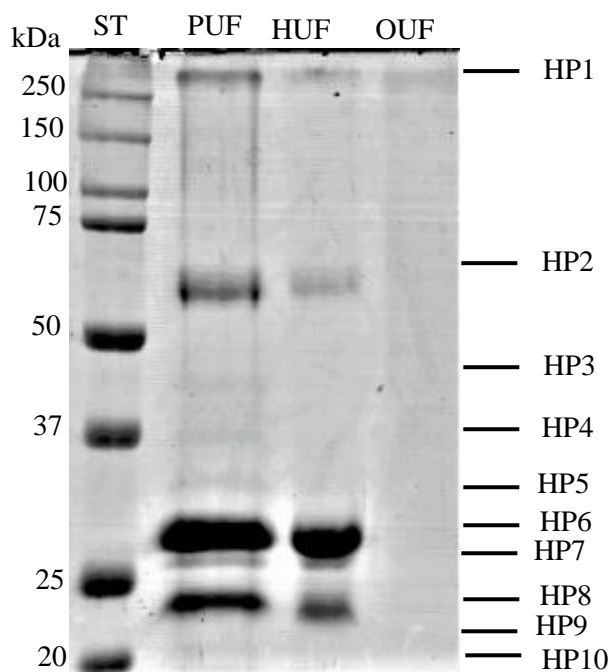
$$x = \frac{y-0,0955}{0,0412} = \frac{0,248-0,0955}{0,0412} = 3,7015 \mu\text{g}$$

$$c = \frac{x}{5 \mu\text{l}} = \frac{3,7015 \mu\text{g}}{5 \mu\text{l}} = 0,7403 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$$

Následně byla provedena elektroforéza vzorků PUF, HUF a OUF (obr.7). Pomocí spočtených koncentrací bylo na gel napipetováno takové množství OUF a HUF, aby výsledná hmotnost proteinů na gelu byla 50 μg . Ze vzorku PUF bylo na gel napipetováno pouze 23 μg .

Tabulka 5: Změřené absorbance jednotlivých proteinů v objemech vzorků napipetovaných na mikrotitrační destičku. HPD je hroznová šťáva po dialýze, OPD je ocet po dialýze, PPD je pelet po dialýze, OUF je ocet po ultrafiltraci, HUF je hroznová šťáva po ultrafiltraci, PUF je pelet po ultrafiltraci, BUF je burčák po ultrafiltraci a BPUF je pelet burčáku po ultrafiltraci. OUF a HUF bylo 10x zředěné. V druhé části jsou uvedeny průměry vypočtených koncentrací jednotlivých vzorků. Koncentrace OUF, HUF, BUF a BPUF již jsou uvedeny bez ředění.

V [μl]	A_{HPD}	A_{OPD}	A_{PPD}	A_{OUF}	A_{HUF}	A_{PUF}	A_{BUF}	A_{BPUF}
2	/	/	/	0,170	0,216	0,300	0,166	0,166
5	0,248	0,195	0,162	0,321	0,408	0,555	0,325	0,308
10	0,373	0,298	0,231	0,497	0,719	0,959	0,584	0,328
20	0,721	0,519	0,377	/	/	/	/	/
c [$\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$]	0,724	0,496	0,331	9,927	14,973	2,268	10,518	9,789



Obrázek 7: SDS-PAGE vzorků PUF (23 µg), HUF a OUF (50 µg z obou vzorků). Jako standard (ST) byly použity 3 µl proteinového standardu Dual Color Standard od firmy Bio-Rad.

Na obrázku 7 je vidět v linii gelu PUF a HUF několik páسů proteinů. Ve vzorku OUF jsou páсы hůře pozorovatelné pravděpodobně z toho důvodu, protože už je to průmyslově zpracovaný ocet, který neobsahuje tolik proteinů. Po identifikaci hlavních proteinových složek z linie PUF ve vyznačených pásech HP1-HP10 pomocí hmotnostní spektrometrie (analýza byla provedena vedoucím bakalářské práce) byla vytvořena tabulka 6, která obsahuje hlavní proteinové zástupce z každého vyznačeného pásu.

Tabulka 6: Přehled proteinů identifikovaných hmotnostní spektrometrií ve vzorku peletu z hrozna po ultrafiltraci. Proteiny z vyznačených pásu byly naštěpeny v gelu pomocí rafinosou modifikovaného trypsinu (Šebela *et al.*, 2006). Postup zahrnoval odbarvení, alkylaci a redukci proteinů v nařezaných částech gelu (Shevchenko *et al.*, 2006). Extrahované peptidy byly po odpaření rozpuštěny v 5% kys. mravenčí (FA) a odsoleny za použití připravených C18 mikrokolonek (Rappsilber *et al.*, 2003). Analýza byla provedena na hmotnostním spektrometru typu Amazonspeed ETD (Bruker, Německo) online spojeným s nanoprůtokovým kapalinovým chromatografem Dionex UltiMate 3000 (ThermoScientific, USA) vybaveným analytickou kolonou a předkolonou s reverzní fází (C18). Analýza peptidového zastoupení byla provedena za stálého průtoku 300 nl, v 50minutovém lineárním gradientu acetonitrilu a FA MS/MS módou analyzátoru. Data byla vyhodnocena pomocí programu PEAKS Studio X (Bioinformatics Solutions Inc., Kanada) za použití proteinové databáze z NCBI (3/2019) pro *Vitis vinifera* a databáze obsahující běžné kontaminanty.

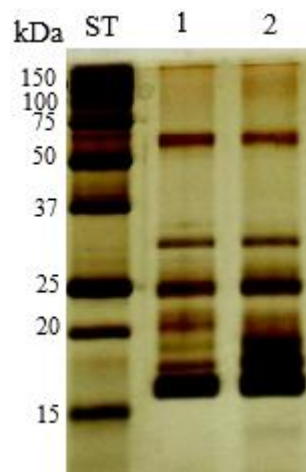
Proteinový pás	NCBI gi	Protein	-10lgP	Pokrytí sekvence (%)	Peptidy	Unikátní peptidy
HP-1	gi 297740510	"CYSP"	201.14	40	31	31
HP-2	gi 225466093	β-fruktofuranosidasa	247.43	34	47	2
HP-2	gi 1552171564	Endochitinasa EP3	167.22	40	11	8
HP-3	gi 1552171564	Endochitinasa EP3	127.13	34	6	4
HP-3	gi 297740510	α řetězec oryzainu	124.20	16	6	6
HP-3	gi 1839578	Vakuolární invertasa	118.60	7	7	7

Tabulka 6: Přehled proteinů identifikovaných hmotnostní spektrometrií ve vzorku peletu z hrozna po ultrafiltraci (pokračování)

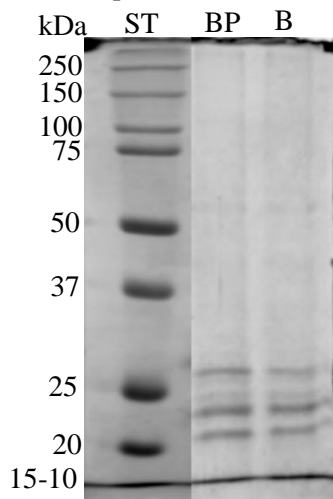
HP-4	gi 1552171564	Endochitinasa EP3	145.02	35	7	4
HP-4	gi 225466093	β -fruktofuranosidasa	115.37	10	6	6
HP-5	gi 225441373	β -glukosidasa	190.73	53	25	22
HP-5	gi 1116693195	Endochitinasa třídy IV	186.50	46	17	9
HP-5	gi 1552179293	RD21B	162.46	21	11	8
HP-5	gi 1839578	Vakuolární invertasa	155.36	18	13	13
HP-5	gi 296090463	RD21A	126.66	14	5	2
HP-5	gi 1552186050	Asp proteasa	102.11	12	7	7
HP-6	gi 1552171564	Endochitinasa EP3	241.36	66	41	1
HP-6	gi 33329390	TLP	102.28	18	3	3
HP-7	gi 1552171564	Endochitinasa EP3	234.68	65	41	1
HP-7	gi 33329392	Chitinasa třídy IV	228.26	56	37	3
HP-8	gi 1104663235	β -fruktofuranosidasa	163.53	18	18	2
HP-8	gi 1552265342	TLP	150.92	47	14	14
HP-9	gi 1116693195	Chitinasa třídy IV	154.14	32	8	4
HP-9	gi 1552222316	Ser carboxypeptidasa	95.42	7	3	3
HP-9	gi 1552144753	Expansin-B2	83.87	7	2	2
HP-10	gi 1552171564	Endochitinasa EP3	174.60	30	11	8
HP-10	gi 1552260595	Kalmodulin	136.83	14	7	4
HP-10	gi 147790682	"RD21B"	132.96	16	6	6
HP-10	gi 296083924	"Inhibitor CYSP"	124.84	53	7	7
HP-10	gi 1104663235	β -fruktofuranosidasa	108.54	10	5	1
HP-10	gi 3511147	PR-4	107.91	34	4	4

Podobných výsledků jako na obrázku 7 bylo dosaženo v experimentu popsáném ve článku Le Bourse *et al.* (2011), kdy byla provedena SDS-PAGE šťávy z hroznů Chardonnay a Pinot Meunier (obr. 8). Když porovnáme obrázky 7 a 8, tak lze vidět přítomnost pásů proteinů, které se vyskytují ve stejných oblastech molekulových hmotností, zejména v oblasti 75-50 kDa a 37-25 kDa. To značí přítomnost stejných či podobných proteinů ve hroznech.

Dále byla provedena SDS-PAGE burčáku (B) a jeho peletu (BP) (obr. 9) po zpracování dialýzou a ultrafiltrací. Na první pohled jde vidět, že chybí silné pásy v oblasti molekulové hmotnosti 75-50 kDa a 37-25 kDa, tedy převážně chitinasy a invertasy (viz tabulka 6). To pravděpodobně svědčí o jejich sníženém množství v důsledku výrobního procesu, kdy je šťáva z hroznů podrobena podobným procedurám jako při výrobě vína (fermentace). Chitinasy jsou jako PR-proteiny stabilní v kyselém prostředí a jsou odolné proteolytickému štěpení, avšak snadno podléhají tepelné denaturaci (Waters *et al.*, 1996; Falconer *et al.*, 2010).



Obrázek 8: SDS-PAGE proteinů obsažených ve šťávě z hroznů Chardonnay (1) a Pinot Meunier (2). Převzato a upraveno z Le Bourse *et al.*, 2011.



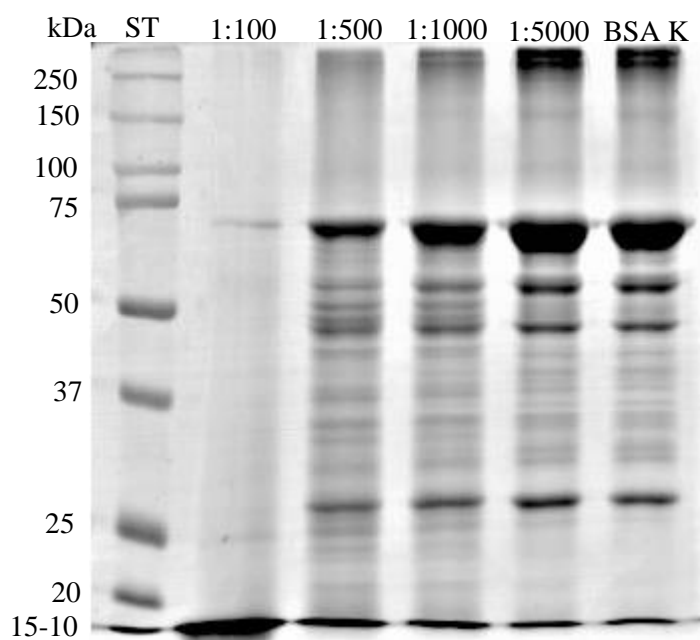
Obrázek 9: SDS-PAGE peletu burčáku (BP) a burčáku (B) po ultrafiltraci. Jako standard byly použity 3 μ l proteinového standardu Dual Color Standard od firmy Bio-Rad. Do každé jamky bylo napipetováno 50 μ g vzorku.

4.2 Důkaz proteolytické aktivity octa

Na obrázku 10 je gel obsahující vzorky BSA štěpené koncentrátem z octa. Původní koncentrace při přípravě štěpených vzorků BSA byla 100 µg v 50 µl roztoku. Poté bylo z každé zkumavky odebráno 25 µl a k tomu bylo přidáno 25 µl Laemmliho pufru, takže koncentrace byla snížena na 50 µg v 50 µl roztoku. Na gel bylo nakonec napipetováno pouze 20 µl, což znamená, že na gel bylo nanášeno množství BSA odpovídající 20 µg původního BSA.

Tento experiment sloužil jako důkaz proteolytické aktivity ve vinném octu. Při působení nejméně zředěným OUF (1:100) na vzorek BSA došlo k nejvyššímu účinku, kdy je BSA kompletně poštípáno enzymem a většina fragmentů rozštěpeného BSA je přítomna na dně gelu v oblasti molekulové hmotnosti 15-10 kDa, nebo menších oblastech mimo gel. Proteolytická aktivita octa je nejspíše způsobena přítomností CYSP, protože při SDS-PAGE je vidět značný pás ve vzorku OUF v oblasti molekulové hmotnosti nad 250 kDa. Tento pás představuje právě CYSP (tab. 6). Aktivita tohoto proteinu byla dokázána v experimentu Perutka a Šebela (2019), kde byly vybrané peptidové substráty (angiotensin II, ACTH fragment, insulin, somatostatin) a směs 9 proteinů inkubovány s CYSP (izolována z bílého vína Irsai Oliver). Po SDS-PAGE vzorků a analýze hmotnostní spektrometrií jednotlivých pásů bylo zjištěno, že došlo k rozštěpení substrátů na fragmenty peptidových řetězců. Jako převažující protein v octu byla brána CYSP. Ostatní proteiny byly zanedbány a to proto, že při SDS-PAGE vzorku OUF byl vidět pouze horní pás v oblasti nad 250 kDa (CYSP) (obr. 7). V tomto experimentu byla měřena i aktivita CYSP, která činila 0,2 nkat·mg⁻¹. Tato aktivita je poměrně vysoká na to, že byl protein izolován z produktu, který již byl podroben procesům vinifikace (Perutka a Šebela, 2019). Působení CYSP v octu klesá s jeho zvyšujícím se naředěním. I při 1000násobném přebytku substrátu je možné pozorovat aktivitu enzymu.

Ve článku Di Girolamo *et al.* (2011) byla provedena analýza proteomu vinného octa. Důvodem, proč se o to pokoušeli, jsou léčebné účinky octa (popsáno ve článku) a to, že se jeho proteinovým složením málo vědců zabývalo. V tomto experimentu byly identifikovány 2 proteiny (NCBI gi110687163 a gi110685718), u kterých je předpokládána podobnost cysteinovým proteasám (Di Girolamo *et al.*, 2011).



Obrázek 10: SDS-PAGE BSA štěpeného koncentráty octa. Jako standard (ST) byly použity 3 μ l proteinového standardu Dual Color Standard od formy Bio-Rad. Do BSA K bylo napipetováno rozpuštěné a upravené BSA bez OUF. V bandech 1:100, 1:500, 1:1000 a 1:5000 jsou obsaženy jednotlivé rozštěpené BSA, poměry označují množství proteinu v octu ku BSA. Do každé jamky (kromě ST) bylo napipetováno 20 μ g vzorku.

Aktivita CYSP ve vinném octu byla vypočtena denzitometrickou analýzou pomocí programu Gel Analyzer verze 19.1 (staženo z gelanalyzer.com) při štěpení BSA vzorků z bandu v oblasti okolo 70 kDa. Nejdříve byly odečteny plochy odpovídající štěpenému BSA. Z poměru poštěpených a nepoštěpených (BSA kontrola) pásů bylo vypočteno množství enzymaticky hydrolyzovaného BSA v každém vzorku z původního množství (100 μ g), které bylo ve zkumavce. Množství v μ g bylo převedeno na látkové množství a pro to byla použita molekulová hmotnost BSA (70 kDa). Následně bylo možné vypočítat aktivitu a specifickou aktivitu CYSP v nkat a $\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$. V tabulce 7 jsou uvedeny vypočtené hodnoty aktivit. Vypočtená průměrná specifická aktivity CYSP z vinného octa byla $0,242 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$. Tento výsledek je velmi podobný s hodnotou, která byla vypočítaná při výše zmíněném experimentu (Perutka a Šebela, 2019). Jelikož došlo k získání podobných výsledků za použití stejné metody je patrné, že je enzym stabilní.

Tabulka 7: Vypočtené aktivity CYSP ve vinném octu po štěpení substrátu (S) BSA

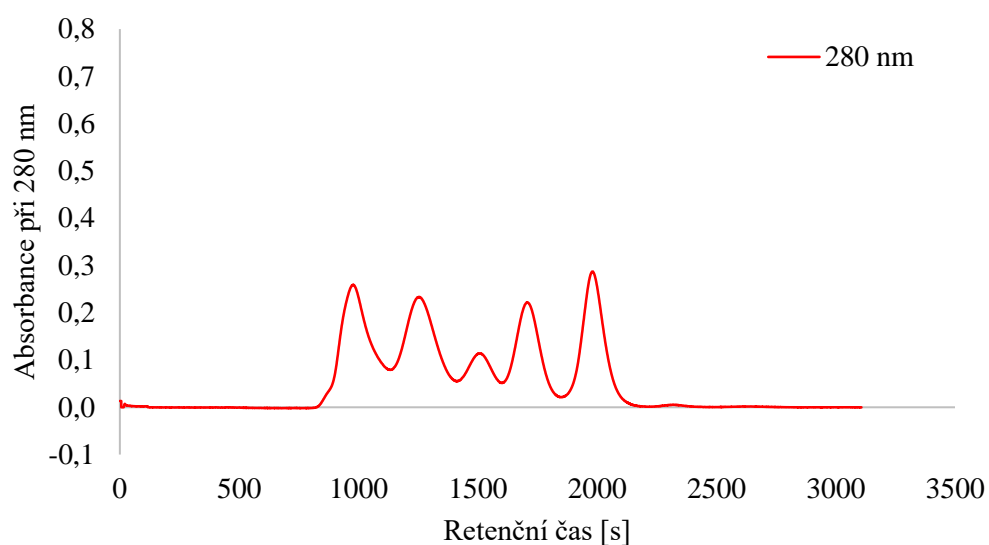
Ředění	Intenzita plochy poštěpeného S	Naštěpený S [μ g]	Štěpený S za čas [$\text{nmol}\cdot\text{h}^{-1}$]	Aktivita [nkat]	Specifická aktivita [$\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$]
1:100	3435	89,80	0,0711	$1,98\cdot 10^{-5}$	0,100
1:500	1969	51,48	0,0408	$1,13\cdot 10^{-5}$	0,289
1:1000	762	19,88	0,0158	$4,38\cdot 10^{-6}$	0,224
1:5000	242	6,33	0,0050	$1,40\cdot 10^{-6}$	0,355

4.3 Gelová chromatografie proteinů z hrozna

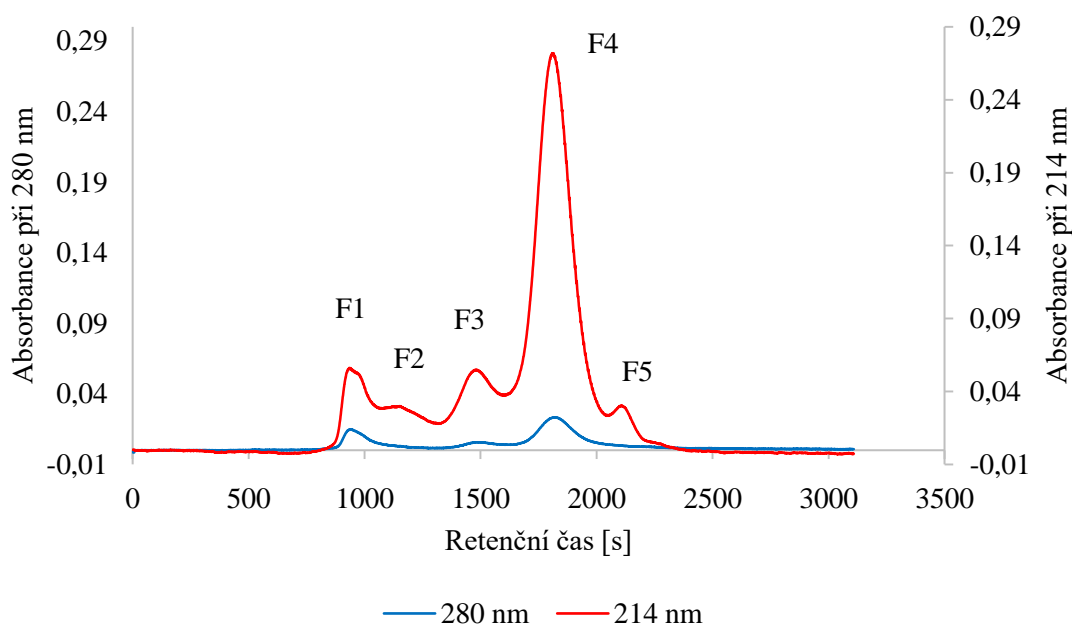
Pomocí střednětlakého kapalinového chromatografu bylo odseparováno celkem 5 frakcí (obr. 12) proteinů ze vzorku peletu z hroznů na koloně Sephadex 200. Ze získaných retenčních časů byly vypočteny molekulové hmotnosti jednotlivých frakcí. Chromatografií standardů (obr. 11) byly získány retenční časy, pomocí kterých byla vytvořena kalibrační křivka metodou lineární regrese po zlogaritmování dat (tab. 8). Z rovnice křivky byly vypočteny dané molekulové hmotnosti frakcí. Rovnice pro výpočet molekulové hmotnosti byla $y = -0,1539x + 8,3942$. Retenční časy a molekulové hmotnosti jednotlivých frakcí se nachází v tabulce 9.

Tabulka 8: Data potřebná k vytvoření kalibrační křivky

Protein	M [Da]	Retenční čas [min]
Thyroglobulin	670000	16,15
γ -globulin	158000	20,63
Ovalbumin	44000	25,07
Myoglobin	17000	28,15
Vitamin B12	1350	33,12



Obrázek 11: Chromatogram standardů pro vytvoření kalibrační křivky. Pořadí standardů zleva: thyroglobulin, γ -globulin, ovalbumin, myoglobin a vitamin B12.



Obrázek 12: Chromatogram separace proteinů ze vzorku peletu hroznů na frakce

Tabulka 9: Vypočtené molekulové hmotnosti jednotlivých separovaných frakcí

	Retenční čas [min]	M [Da]
Frakce 1	15,6	984827
Frakce 2	19,2	274992
Frakce 3	25,0	35213
Frakce 4	31,08	4083
Frakce 5	37,2	467

Dosazení do rovnice získané lineární regresi po zlogaritmování dat (tab. 8) pro frakci 1, kdy x představuje retenční čas a y molekulovou hmotnost:

$$y = -0,1539x + 8,3942 = -0,1539 \cdot 15,6 + 8,3942 = 5,9934$$

$$M = 10^y = 10^{5,9934} = 984827 \text{ Da}$$

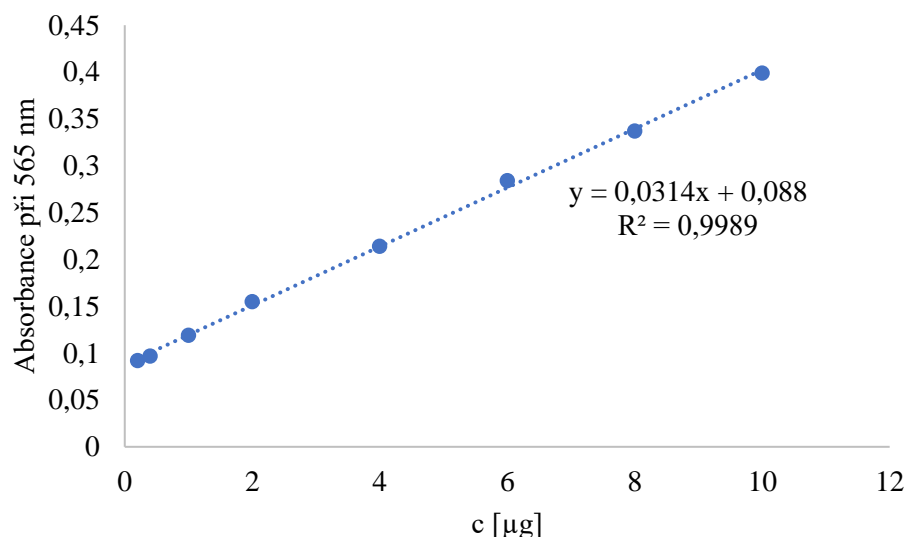
Následně byla změřena koncentrace proteinů (tab. 10) a vypočteno procentuální zastoupení proteinů v jednotlivých frakcích (tab. 11). Účinnost chromatografické separace byla ověřena pomocí SDS-PAGE (obr. 14).

Koncentrace proteinů v jednotlivých frakcích byla stanovena spektrofotometricky v mikrotitrační destičce pomocí BCA. Ze standardů byla vytvořena kalibrační křivka a z ní byla získaná rovnice $y = 0,0314x + 0,088$ pro výpočet koncentrace (obr. 13).

Dosazení hodnot do rovnice pro výpočet koncentrace proteinů ve frakci 1 a v 5 μl , y představuje absorbanci a x koncentraci v μg :

$$x = \frac{y-0,088}{0,0314} = \frac{0,105-0,088}{0,0314} = 0,5414 \mu\text{g}$$

$$c_m = \frac{x}{5 \mu\text{l}} = \frac{0,5414 \mu\text{l}}{5 \mu\text{l}} = 0,1083 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$$



Obrázek 13: Kalibrační křivka pro výpočet koncentrace proteinů v odseparovaných frakcích 1-5 z peletu hroznů

Tabulka 10: Změřené absorbance frakcí F1-F5 a jejich vypočtené koncentrace

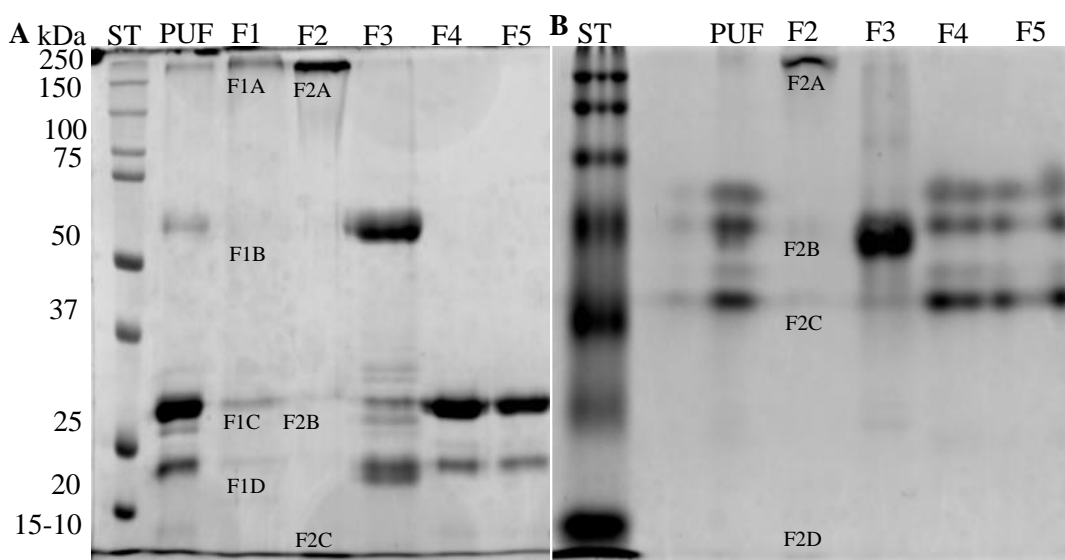
V [μ l]	A _{F1}	A _{F2}	A _{F3}	A _{F4}	A _{F5}
5	0,105	0,114	0,15	0,232	0,119
10	0,121	0,143	0,193	0,374	0,133
15	0,125	0,161	0,228	0,507	0,158
c [μ g· μ l ⁻¹]	0,0973	0,1653	0,3422	0,9059	0,1631

Podle tabulky 11, která uvádí procentuální zastoupení proteinů v jednotlivých frakcích jde vidět, že převážná většina proteinů je obsažena ve frakci 4 (chitinasy), dále pak ve frakci 3 (invertasy, chitinasy), 2 (CYSP a inhibitor CYSP), 5 (TLPs a chitinasy) a nejméně je ve frakci 1 (CYSP). Toto rozdělení přibližně odpovídá intenzitám bandů ve vzorku PUF. Viz tabulka 6.

Z gelu A (F1 a F2) a B (F2) byly vyřezány viditelné pásy a vedoucím bakalářské práce byla provedena identifikace proteinů hmotnostní spektrometrií. Z těchto dat byla vytvořena tabulka 12 a 13 obsahující informace o proteinovém zastoupení ve významných pásech. Ve frakci 1 je zřetelně vidět jeden pás F1A nacházející se v oblasti kolem 250 kDa představující cysteinovou proteasu (CYSP), dále poté pásy nacházející se v oblastech 75-50 kDa, 37-25 kDa a 25-20 kDa. Přítomnost více proteinů s velmi odlišnou molekulovou hmotností v této frakci může poukazovat na přítomnost agregátu různých složek vína. Jedná se o invertasu (F1B), chitinasu (F1C) a thaumatin (F1D). Ve frakci 2 lze vidět pás nad oblastí molekulové hmotnosti 250 kDa (CYSP), který je viděn i ve frakci 1, ovšem zde je intenzivnější. Jedním z důvodů může být propojení frakcí, které jde vidět na chromatogramu (obr. 12). Dále je ve frakci 2 slabě viditelný pás v oblasti 37-25 kDa a také lze pozorovat pás v oblasti 15-10 kDa (oddíl A).

Tabulka 11: Procentuální zastoupení proteinů v jednotlivých frakcích na mikrotitrační destičce a objemy frakcí po chromatografické separaci.

	c [μ g· μ l ⁻¹]	Celkové objemy frakcí [ml]	Procentuální zastoupení [%]
F1	0,0973	15	5,02
F2	0,1653	20	9,86
F3	0,3422	29	18,96
F4	0,9059	38	56,68
F5	0,1631	11	9,48
Celkem	1,6738	113	100



Obrázek 14: Separace proteinů ve frakcích 1-5 z peletu hroznů pomocí SDS-PAGE (A) a nativní elektroforéza (B). Jako standard byly použity 3 μ l proteinového standardu Dual Color Standard (Bio-Rad) (Oddíl A). Pro nativní elektroforézu byla jako standard použita bromfenolová modř ve vzorkovém pufru v poměru 1:1. F1, F2, F3, F4 a F5 představují jednotlivé frakce 1-5 z peletu hroznů. Do jamek (kromě ST) bylo napipetováno 5 μ g vzorku. F1A, F1B, F1C, F1D, F2A, F2B, F2C a F2D jsou proteinové pásy v daných frakcích.

Ten představuje inhibitor cysteinových proteas, který je zde zřejmě přímo navázaný na CYSP, a proto se objevuje v této frakci. Avšak protože je na CYSP navázán nekovalentně, dochází k jeho oddělení od struktury v případě SDS-PAGE, kdy se účinkem SDS oslabují nekovalentní vazebné interakce. Naopak v oddílu B je podle tabulky 13 inhibitor ve stejném pásu jako CYSP. To znamená, že je možné, že je stále navázán na CYSP (nebyl nalezen v posledním pásu jako u SDS-PAGE, ale v pásu F2A), protože při nativní elektroforéze není používán SDS ani β -merkapt ethanol, které narušují nekovalentní vazby. Ve frakci 3 je nejvýraznější pás v oblasti molekulové hmotnosti 75-50 kDa, který představuje invertasu a chitinasu (tabulka 6). Dále lze slabě pozorovat i další pásy v důsledku znečištění způsobeným propojením peaků při separaci (viz obr. 12) nebo se může jednat o isoformy daných proteinů. Ve frakci 4 oddílu A je nejvýraznější pás v oblasti 37-25 kDa představující chitinasu (tabulka 6), dalším pásem je pás v oblasti 25-20 kDa představující z větší části TLPs, chitinasy a další PR-proteiny. Stejně pásy se nachází ve frakci 5 oddílu A. V oddílu B jsou tyto dvě poslední frakce v oblastech vyšších molekulových hmotností. Při SDS-PAGE dochází k interakci SDS s proteiny, kdy jsou narušeny nekovalentní vazby, proto jsou tyto proteiny vizualizovány v nižších oblastech molekulových hmotností. Naopak při nativní elektroforéze zůstávají nekovalentní vazby beze změny a molekuly zůstávají ve své oligomerní podobě. Dále je možné, že tyto proteiny jsou glykosylované. V případě SDS-PAGE proteiny doputovaly dále, protože migrují na základě molekulové hmotnosti. Zatímco v případě nativní

elektroforézy proteiny migrují na i na základě náboje, takže může docházet k jejich zbrzdění.

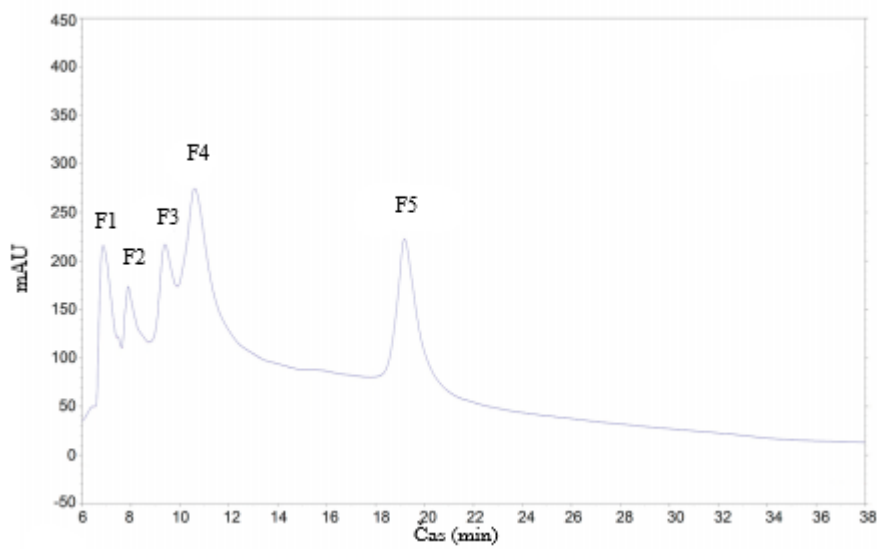
Tabulka 12: Proteiny identifikované hmotnostní spektrometrií z gelu po SDS-PAGE z frakcí 1 a 2. Popis provedení metody je uveden v popisku tabulky 6.

Proteinový pás	NCBI gi	Protein	-10lgP	Pokrytí sekvence (%)	Peptidy	Unikátní peptidy
F1A	gi 297740510	"CYSP"	229.97	42	35	35
F1B	gi 147787076	Chitinasa	190.62	29	19	6
F1B	gi 225441373	β -glukosidasa	80.64	10	4	4
F1C	gi 7406716	TLP	166.18	57	16	16
F1C	gi 1552171564	Endochitinasa EP3	119.41	29	5	3
F1C	gi 225441373	β -glukosidasa	101.10	20	6	6
F1D	gi 225436454	Akvaporin TIP1-1	124.15	16	5	1
F1D	gi 1552260595	Kalmodulin	108.72	8	3	3
F2A	gi 359483753	"CYSP"	269.15	42	74	2
F2A	gi 1552168278	α -řetězec oryzainu	268.86	44	73	1
F2B	gi 1552171564	Endochitinasa EP3	141.20	30	8	4
F2B	gi 297740510	α -řetězec oryzainu	114.18	20	7	7
F2C	gi 296083924	"Inhibitor CYSP"	186.38	84	24	24
F2C	gi 1552172856	Kalmodulin	157.00	64	12	5
F2C	gi 526117629	LTP prekurzor	125.67	53	10	5

Tabulka 13: Proteiny identifikované hmotnostní spektrometrií z gelu po nativní elektroforéze z frakce 2. Popis provedení metody je uveden v popisku tabulky 6.

Proteinový pás	NCBI gi	Protein	-10lgP	Pokrytí sekvence (%)	Peptidy	Unikátní peptidy
F2A	gi 297740510	"CYSP"	267.36	56	68	2
F2A	gi 296083924	"Inhibitor CYSP"	171.51	57	16	16
F2A	gi 28194086	LTP	121.26	44	8	2
F2A	gi 225459538	Protein obsahující LysM doménu	114.40	18	6	6
F2B	gi 1116693195	Endochitinasa třídy IV	140.40	26	6	6
F2C	gi 1552171564	Endochitinasa EP3	137.42	27	8	4
F2C	gi 1839578	Vakuolární invertasa	93.64	7	5	5
F2D	gi 1552260595	Kalmodulin	119.81	13	5	3

Obdobných výsledků při HPLC proteinů bílých hroznů na molekulovém sítu bylo dosaženo v experimentu popsaném ve článku Tian *et al.* (2015), kdy vědci odseparovali proteiny do pěti frakcí (obrázek 15). Tento experiment byl zaměřen na PR-proteiny a byla provedena SDS-PAGE frakcí 3 a 4, které tyto proteiny z velké části obsahují. Konkrétně se jedná o chitinasy a TLPs. K poslednímu peaku (F5) byly přiřazeny chitinasy (Tian *et al.*, 2015).

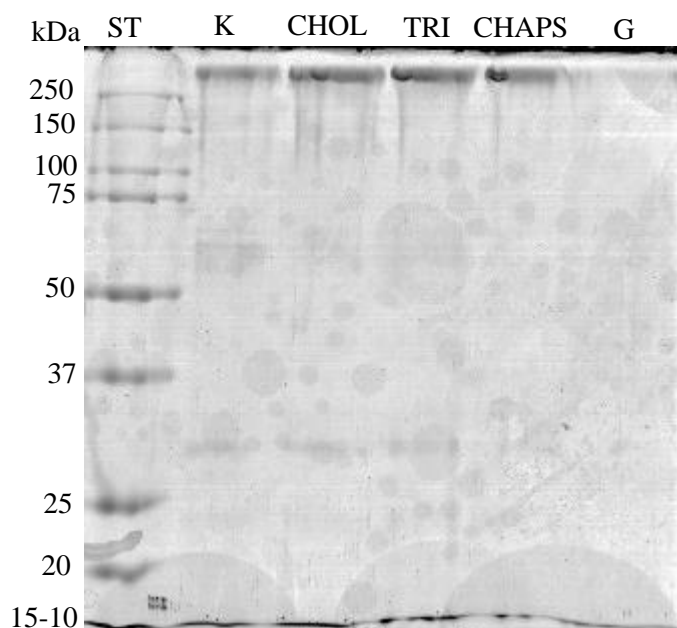


Obrázek 15: HPLC proteinů bílých hroznů Sauvignon Blanc na C8 koloně (reversed phase kolona, průtoková rychlost 1 ml/min). Převzato a upraveno z Tian *et al.*, 2015.

4.4 Stanovení molekulové hmotnosti monomeru cysteinové proteasy

CYSP je protein nacházející se v hroznovém víně (*Vitis vinifera*) a jeho některých produktech. Doposud je málo prozkoumaný, avšak jak už bylo zmíněno, je podobný některým dalším cysteinovým proteasám. Je odolný procesům vinifikace a také je aktivní v kyselé oblasti pH (Perutka a Šebela, 2019). V důsledku vysoké molekulové hmotnosti CYSP se předpokládá, že se jedná o oligomer. Pro rozvolnění oligomerního stavu a charakterizaci monomerních jednotek CYSP byly kromě SDS-PAGE použity další detergentní činidla, což jsou látky, které se běžně užívají v laboratoři například k lýzi buněk. Díky svým amfifilním vlastnostem dokáží kromě denaturace proteinů i narušit slabé vazebné interakce mezi proteiny, lipidy a mezi proteiny a lipidy.

Pokus byl proveden za přídavku detergentních a chaotropních činidel ke frakci 2 z peletu hroznů. Konkrétně byl použit cholát, Triton X-100, CHAPS a guanidin. Cholát patří do skupiny solí žlučových kyselin, jejichž úkolem v organismu živočichů je štěpení lipidů. Je součástí skupiny ionogenních (aniontových) detergentů a jeho výhodou je, že nezpůsobuje denaturaci proteinů a dá se ze vzorku odstranit. Triton X-100 je součástí skupiny neionogenních detergentů, které nezpůsobují denaturaci vzorků a obsahují nenabitě hydrofilní hlavní části. CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate) je detergent, patřící do skupiny zwitterionů, které obsahují jak kladně, tak i záporně nabitě částice. Typicky jsou agresivnější než neionogenní detergenty.



Obrázek 16: Proteinové zastoupení ve frakci 2 po působení detergentních činidel a provedení SDS-PAGE. Jako standard byly použity 3 μ l proteinového standardu Dual Color Standard od formy Bio-Rad. K je značení pro frakci 2, která sloužila jako kontrola. CHOL je značení pro cholát, TRI je značení pro Triton X-100 a G je značení pro guanidin.

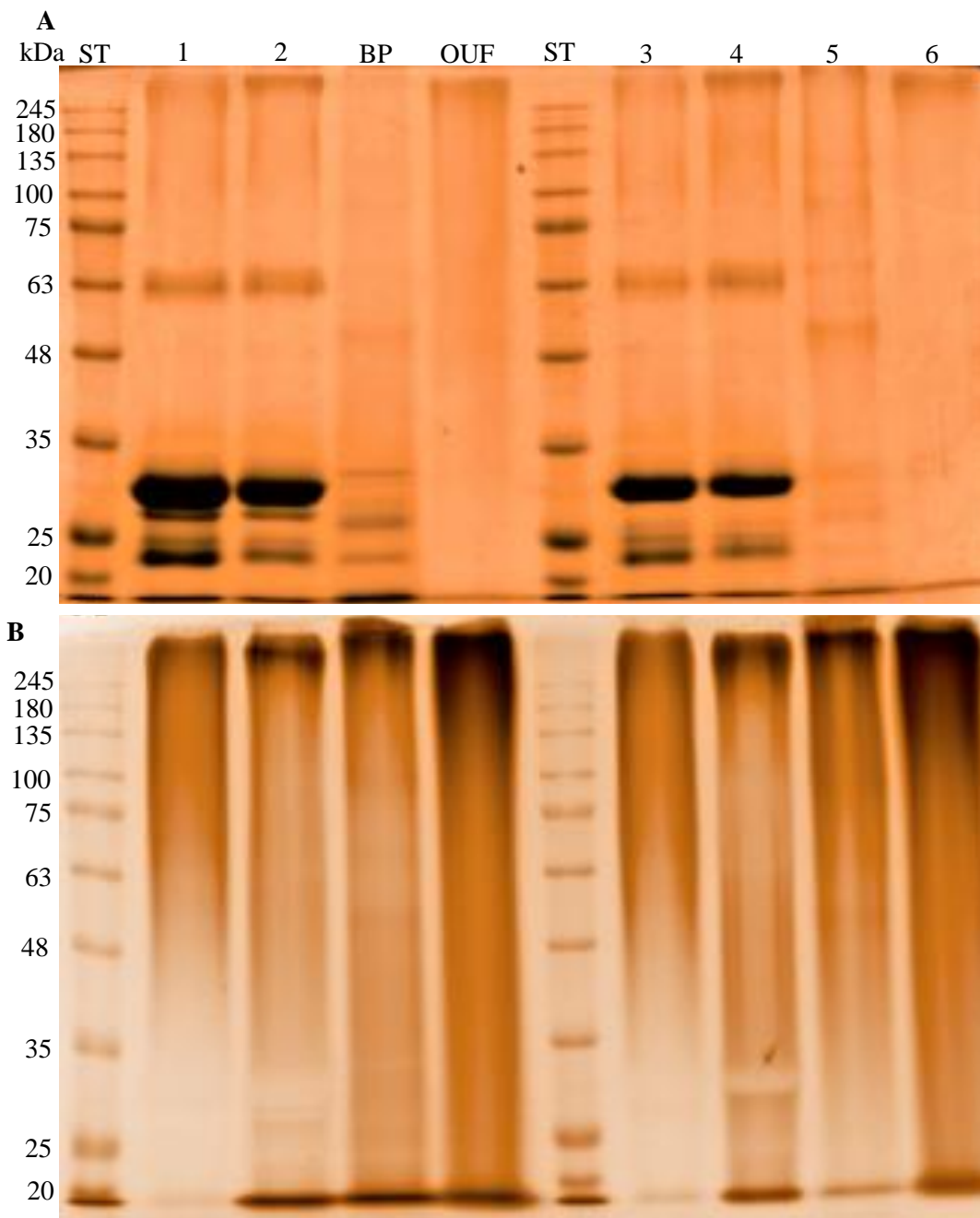
Do každé jamky bylo napipetováno 5 μ g vzorku.

Guanidin patří do skupiny chaotropních činidel, které snižují stabilitu proteinů tím, že narušují vodíkové vazby ve strukturách. Podle vědců dochází k ovlivnění stability proteinů přímo vazbou činidla do jejich struktury, nebo dochází ke změně vlastností rozpouštědla (Salvi, 2005; Johnson, 2013).

Účinky použitých činidel na CYSP byly pozorovány pomocí SDS-PAGE. Na obrázku 16 je zobrazen gel po SDS-PAGE. Při porovnání s kontrolním vzorkem z frakce 2 lze vidět, že otestovaná detergentní i chaotropní činidla v kombinaci s SDS nemají účinek na CYSP. To nejspíše značí o tom, že předpokládané monomery ve struktuře multimeru CYSP nejsou k sobě vázány slabými vazebnými interakcemi, ale kovalentně. Dále je patrné, že inhibitor již není navázaný přímo na CYSP, ale je v oblasti molekulové hmotnosti 15-10 kDa, jako při SDS-PAGE bez použití výše zmíněných činidel.

4.5 Barvení proteinů alciánovou modří

Bylo provedeno barvení dvou gelů, kdy každý byl barven jiným typem barviva pro porovnání jiných typů proteinů (neglykosylovaných). Barvení alciánovou modří je specifické pro glykoproteiny, jak je popsáno v kap. 3.9.



Obrázek 17: SDS-PAGE gelu obarveného alciánovou modří (A) a Coomassie Brilliant Blue (B).

Odstín byl upraven na počítači (Gel Doc EZ Systém). 1 představuje vzorek z peletu hroznů po ultrafiltraci (34 μg), 2 představuje vzorek z hroznové šťávy po ultrafiltraci (88 μg), BP představuje pelet z burčáku (80 μg), OUF představuje ocet po ultrafiltraci (108 μg), 3 představuje precipitovaný vzorek peletu, 4 představuje precipitovaný vzorek hroznové šťávy, 5 představuje precipitovaný pelet burčáku, 6 představuje precipitovaný vzorek octu. Jako standard byly použity 3 μl proteinového standardu BLUeye Prestained Protein Ladder od firmy Sigma. Do každé jamky (kromě ST) bylo napipetováno 15 μl vzorku. Do jamky 3-6 bylo napipetováno zhruba 66 μg vzorku (precipitované).

Při porovnání gelů A a B na obrázku 17 lze vidět velký rozdíl v oblastech proteinů o molekulové hmotnosti 63 a 35-20 kDa. Na gelu obarveném alciánovou modří jsou tyto proteiny vidět jako bílé místo. To může značit přítomnost glykoproteinů obsahující kyselé cukry, což je typické například pro invertasu (Avigad a Dey, 1997). Na gelu B jsou tato světlá místa tmavě zbarvena, což odpovídá jejich hojnému výskytu odpovídajících

proteinů ve zralých plodech vinné révy. Dále jde vidět, že pás nad oblastí 245 kDa (CYSP) je při barvení alciánovou modří silněji zabarven, což naznačuje, že se izolovaná CYSP vyskytuje v glykosylované formě. Neglykosylované proteiny zůstaly neobarvené.

5 ZÁVĚR

Teoretická část bakalářské práce se zaměřovala na proteinové složení jak révy vinné a hroznového vína, tak i vína jako nápoje. Byly popsány charakteristické vlastnosti jednotlivých skupin proteinů a jejich role v rostlině, zejména v jejích plodech. Dále byly shrnuty metody izolace a charakterizace proteinů použité v praktické části bakalářské práce.

Hlavním objektem zájmu bakalářské práce je cysteinová proteasa (CYSP) révy vinné (*Vitis vinifera*). Další věc, která nás zajímala bylo, jak se liší obsah proteinů ve šťávě hrozna a burčáku v porovnání s vínem. Aby toto bylo možné, musely být vzorky hroznové šťávy a burčáku ošetřeny dialýzou a zahuštěny ultrafiltrací. Byl vytvořen proteinový profil hrozna metodou SDS-PAGE s následnou identifikací metodou hmotnostní spektrometrie. Při porovnání chromatogramu vinných proteinů, proteinů peletu z hrozna identifikovaných hmotnostní spektrometrií a proteinů z burčáku separovaných SDS-PAGE jde vidět, že mezi proteiny, které se nacházejí jak v peletu hroznové šťávy, tak i ve víně a burčáku, patří PR-proteiny, konkrétně chitinasy a TLPs.

Byla provedena separace proteinů ze vzorku PUF na molekulovém sítu pro získání obohacené frakce CYSP. Byla také vypočtena přibližná molekulová hmotnost frakce 2, kde se CYSP nacházela. Tato hodnota odpovídá molekulové hmotnosti na SDS-PAGE. V důsledku vysoké molekulové hmotnosti CYSP se předpokládá, že se jedná o oligomer, proto byl proveden experiment pro rozvolnění této struktury pomocí detergentních a chaotropních činidel. Ta nakonec neměla na CYSP žádný účinek, takže nedošlo k rozvolnění předpokládané oligomerní struktury, což svědčí o její stabilitě.

Protože byla CYSP přítomna i ve vinném octu, byl proveden experiment pro důkaz aktivity tohoto enzymu. Ta byla stanovena přímo pro koncentrát octu štěpením hovězího sérového albuminu. Výsledná hodnota specifické aktivity byla $0,242 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$. Jedna z možných funkcí CYSP ve vinném octu je štěpení proteinů v jídle (například při aplikaci octu na tlačenu), což může pomáhat při trávení.

Pro další zkoumání CYSP by mohlo být zajímavé měření její aktivity přímo z hroznové šťávy a porovnání výsledků s aktivitou ve vinném octu.

6 LITERATURA

- ANDREWS, P., 1964. Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration. *Biochemical Journal* [online]. **91**(2), 222-233 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.1042/bj0910222. ISSN 0006-2936. Dostupné z: <https://portlandpress.com/biochemj/article/91/2/222/53192/Estimation-of-the-molecular-weights-of-proteins-by>.
- AVIGAD, G. a P.M. DEY, 1997. Carbohydrate Metabolism: Storage Carbohydrates. *Plant Biochemistry* [online]. San Diego: Elsevier, 1997, s. 143-204 [cit. 2020-04-29]. DOI: 10.1016/B978-012214674-9/50005-9. ISBN 9780122146749. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780122146749500059>.
- BOYER, R.F., 2012. *Biochemistry laboratory: modern theory and techniques*. 2nd ed. Boston: Prentice Hall. ISBN 978-0-13-604302-7.
- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* [online]. **72**(1-2), 248-254 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3. ISSN 00032697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269776905273>.
- CATARINO, S., M. MADEIRA, F. MONTEIRO, F. ROCHA, A.S. CURVELO-GARCIA a R.B. DE SOUSA, 2008. Effect of Bentonite Characteristics on the Elemental Composition of Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **56**(1), 158-165 [cit. 2020-02-25]. DOI: 10.1021/jf0720180. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf0720180>.
- CILINDRE, C., S. JÉGOU, A. HOVASSE, C. SCHAEFFER, A.J. CASTRO, C. CLÉMENT, A. VAN DORSSELAER, P. JEANDET a R. MARCHAL, 2008. Proteomic Approach To Identify Champagne Wine Proteins as Modified by Botrytis cinerea Infection. *Journal of Proteome Research* [online]. **7**(3), 1199-1208 [cit. 2020-04-28]. DOI: 10.1021/pr070419p. ISSN 1535-3893. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr070419p>.
- DADAKOVA, K., M. HAVELKOVA, B. KURKOVA, I. TLOLKOVA, T. KASPAROVSKY, Z. ZDRAHAL a J. LOCHMAN, 2015. Proteome and transcript analysis of Vitis vinifera cell cultures subjected to Botrytis cinerea infection. *Journal of Proteomics* [online]. **119**, 143-153 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1016/j.jprot.2015.02.001. ISSN 18743919. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187439191500055X>.
- DE HOFFMANN, E., 2005. *Mass Spectrometry* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons [cit. 2020-04-02]. ISBN 0471238961. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471238961.1301191913151518.a01.pub2>.
- DERCKEL, J.-P., J.-C. AUDRAN, B. HAYE, B. LAMBERT a L. LEGENDRE, 1998. Characterization, induction by wounding and salicylic acid, and activity against Botrytis cinerea of chitinases and beta-1,3-glucanases of ripening grape berries. *Physiologia Plantarum* [online]. **104**(1), 56-64 [cit. 2020-03-20]. DOI: 10.1034/j.1399-3054.1998.1040108.x. ISSN 0031-9317. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1399-3054.1998.1040108.x>.
- DERCKEL, J.-P., L. LEGENDRE, J.-C. AUDRAN, B. HAYE a B. LAMBERT, 1996. Chitinases of the grapevine (Vitis vinifera L.): five isoforms induced in leaves by salicylic acid are constitutively expressed in other tissues. *Plant Science* [online]. **119**(1-2), 31-37 [cit. 2020-02-24]. DOI: 10.1016/0168-9452(96)04459-7. ISSN 01689452. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168945296044597>.
- DI GIROLAMO, F., A. D'AMATO a P.G. RIGHETTI, 2011. Horam nonam exclamavit: sitio. The trace proteome of your daily vinegar. *Journal of Proteomics* [online]. **75**(2), 718-724 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.08.004. ISSN 18743919. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874391911003915>.
- DU TOIT, M. a I.S. PRETORIUS, 2000. Microbial Spoilage and Preservation of Wine: Using Weapons from Nature's Own Arsenal -A Review. *South African Journal of Enology & Viticulture* [online]. **21**(1), 74-96 [cit. 2020-03-15]. DOI: 10.21548/21-1-3559. ISSN 22247904. Dostupné z: <https://www.journals.ac.za/index.php/sajev/article/view/3559>.
- EDENS, L., L. HESLINGA, R. KLOK, A.M. LEDEBOER, J. MAAT, M.Y. TOONEN, C. VISSER a C.T. VERRIPS, 1982. Cloning of cDNA encoding the sweet-tasting plant protein

- thaumatin and its expression in *Escherichia coli*. *Gene* [online]. **18**(1), 1-12 [cit. 2020-02-24]. DOI: 10.1016/0378-1119(82)90050-6. ISSN 03781119. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0378111982900506>.
- EXPOSITO, J.M., C.M. GORDILLO, J.I.M. MARÍÑO a J.L.M. IGLESIAS, 1991. Purification and characterization of a cysteine protease in *Vitis vinifera* L. grapes (Macabeo variety). *Food / Nahrung* [online]. **35**(2), 139-142 [cit. 2020-03-03]. DOI: 10.1002/food.19910350204. ISSN 0027769X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/food.19910350204>.
- FALCONER, R.J., M. MARANGON, S.C. VAN SLUYTER, K.A. NEILSON, C. CHAN a E.J. WATERS, 2010. Thermal Stability of Thaumatin-Like Protein, Chitinase, and Invertase Isolated from Sauvignon blanc and Semillon Juice and Their Role in Haze Formation in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **58**(2), 975-980 [cit. 2020-02-25]. DOI: 10.1021/jf902843b. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf902843b>.
- FARMER, E.E. a C.A. RYAN, 1990. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **87**(19), 7713-7716 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1073/pnas.87.19.7713. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.87.19.7713>.
- FERREIRA, R.B., M.A. PIÇARRA-PEREIRA, S. MONTEIRO, V.B LOUREIRO a A.R. TEIXEIRA, 2001. The wine proteins. *Trends in Food Science & Technology* [online]. **12**(7), 230-239 [cit. 2020-02-24]. DOI: 10.1016/S0924-2244(01)00080-2. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224401000802>.
- GIRIBALDI, M. a M. Gabriella GIUFFRIDA, 2010. Heard it through the grapevine: Proteomic perspective on grape and wine. *Journal of Proteomics* [online]. **73**(9), 1647-1655 [cit. 2020-02-24]. DOI: 10.1016/j.jprot.2010.05.002. ISSN 18743919. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874391910001363>.
- GOMÈS, E., E. SAGOT, C. GAILLARD, L. LAQUITAINE, B. POINSSOT, Y.-H. SANEJOUAND, S. DELROT a P. COUTOS-THÉVENOT, 2003. Nonspecific Lipid-Transfer Protein Genes Expression in Grape (*Vitis* sp.) Cells in Response to Fungal Elicitor Treatments. *Molecular Plant-Microbe Interactions* [online]. **16**(5), 456-464 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1094/MPMI.2003.16.5.456. ISSN 0894-0282. Dostupné z: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/MPMI.2003.16.5.456>.
- GRZONKA, Z., E. JANKOWSKA, F. KASPRZYKOWSKI, R. KASPRZYKOWSKA, L. LANKIEWICZ, W. WICZK, E. WIECZERZAK, J. CIARKOWSKI, P. DRABIK, R. JANOWSKI, M. KOZAK, M. JASKÓLSKI a A. GRUBB, 2001. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochimica Polonica* [online]. **48**(1), 1-20 [cit. 2020-03-03]. DOI: 10.18388/abp.2001_5108. ISSN 1734-154X. Dostupné z: <https://ojs.ptbioch.edu.pl/index.php/abp/article/view/5108>.
- HAMES, B.D., 1998. *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*. 3rd ed. New York: Oxford University Press. ISBN 0-19-963641-9.
- HART, G., 1992. Glycosylation. *Current Opinion in Cell Biology* [online]. **4**(6), 1017-1023 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/0955-0674(92)90134-X. ISSN 09550674. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/095506749290134X>.
- CHAMBERS, P.J. a I.S. PRETORIUS, 2010. Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. *EMBO reports* [online]. **11**(12), 914-920 [cit. 2020-03-16]. DOI: 10.1038/embor.2010.179. ISSN 1469-221X. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1038/embor.2010.179>.
- CHIBALE, K., 2002. Towards broadspectrum antiprotozoal agents. *Arkivoc* [online]. **2002**(9), 93-98 [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.3998/ark.5550190.0003.910. ISSN 1551-7012. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/2027/spo.5550190.0003.910>.
- JAECKELS, N., S. TENZER, S. ROSFA, H. SCHILD, H. DECKER a P. WIGAND, 2013. Purification and structural characterisation of lipid transfer protein from red wine and grapes. *Food Chemistry* [online]. **138**(1), 263-269 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.09.113. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814612015725>.

- JOHNSON, M., 2013. Detergents: Triton X-100, Tween-20, and More. *Materials and Methods* [online]. **3** [cit. 2020-04-01]. DOI: 10.13070/mm.en.3.163. ISSN 2329-5139. Dostupné z: <http://www.labome.com/method/Detergents-Triton-X-100-Tween-20-and-More.html>.
- KAMBIRANDA, D., R. KATAM, S.M. BASHA a S. SIEBERT, 2013. ITRAQ-Based Quantitative Proteomics of Developing and Ripening Muscadine Grape Berry. *Journal of Proteome Research* [online]. **13**(2), 555-569 [cit. 2020-04-28]. DOI: 10.1021/pr400731p. ISSN 1535-3893. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/pr400731p>.
- KORNFELD, R. a S. KORNFELD, 1985. Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides. *Annual Review of Biochemistry* [online]. **54**(1), 631-664 [cit. 2020-02-24]. DOI: 10.1146/annurev.bi.54.070185.003215. ISSN 0066-4154. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.bi.54.070185.003215>.
- KŘIVÁNKOVÁ, L., P. PANTUČKOVÁ a P. BOČEK, 1999. Isotachopheresis in zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A* [online]. **838**(1-2), 55-70 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00169-7. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967399001697>.
- KULSHRESTHA, S., P. TYAGI, V. SINDHI a K.S. YADAVILLI, 2013. Invertase and its applications – A brief review. *Journal of Pharmacy Research* [online]. **7**(9), 792-797 [cit. 2020-05-06]. DOI: 10.1016/j.jopr.2013.07.014. ISSN 09746943. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0974694313002934>.
- LASANTA, C. a J. GÓMEZ, 2012. Tartrate stabilization of wines. *Trends in Food Science & Technology* [online]. **28**(1), 52-59 [cit. 2020-03-15]. DOI: 10.1016/j.tifs.2012.06.005. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224412001215>.
- LE BOURSE, D., A. CONREUX, S. VILLAUME, P. LAMEIRAS, J.-M. NUZILLARD a P. JEANDET, 2011. Quantification of chitinase and thaumatin-like proteins in grape juices and wines. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. **401**(5), 1541-1549 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1007/s00216-011-4912-8. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-011-4912-8>.
- LIS, H. a N. SHARON, 1993. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *European Journal of Biochemistry* [online]. **218**(1), 1-27 [cit. 2020-02-24]. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18347.x. ISSN 0014-2956. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18347.x>.
- MARANGON, M., S.C. VAN SLUYTER, P.A. HAYNES a E.J. WATERS, 2009. Grape and Wine Proteins: Their Fractionation by Hydrophobic Interaction Chromatography and Identification by Chromatographic and Proteomic Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **57**(10), 4415-4425 [cit. 2020-03-16]. DOI: 10.1021/jf9000742. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf9000742>.
- MARANGON, M., S.C. VAN SLUYTER, E.J. WATERS, R.I. MENZ a P.A. TEMUSSI, 2014. Structure of Haze Forming Proteins in White Wines: *Vitis vinifera* Thaumatin-Like Proteins. *PLoS ONE* [online]. **9**(12) [cit. 2020-02-25]. DOI: 10.1371/journal.pone.0113757. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0113757>.
- MARANGON, M., S.C. VAN SLUYTER, K.A. NEILSON, C. CHAN, P.A. HAYNES, E.J. WATERS a R.J. FALCONER, 2011. Roles of Grape Thaumatin-like Protein and Chitinase in White Wine Haze Formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **59**(2), 733-740 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1021/jf1038234. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf1038234>.
- MARCZENKO, Z., 2000. *Separation, preconcentration, and spectrophotometry in inorganic analysis*. New York: Elsevier Science B.V. Analytical spectroscopy library, v. 10. ISBN 0-444-50524-5.
- MAURER, H.R., 1971. *Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis*. 2., rev. and expanded ed. New York: de Gruyter. ISBN 3-11-003495-6.
- MEHTA, A. a A.L. ZYDNEY, 2005. Permeability and selectivity analysis for ultrafiltration membranes. *Journal of Membrane Science* [online]. **249**(1-2), 245-249 [cit. 2020-04-27]. DOI: 10.1016/j.memsci.2009.12.003. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0376738804007021?via%3Dihub>.

- MILLER, J.M., 2009. Chromatography. *Digital Encyclopedia of Applied Physics* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., s. 1057-1101 [cit. 2020-05-21]. ISBN 9783527600434. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/3527600434.eap064.pub2>.
- MIN, K., S.C. HA, P.M. HASEGAWA, R.A. BRESSAN, D.-J. YUN a K.K. KIM, 2004. Crystal structure of osmotin, a plant antifungal protein. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* [online]. **54**(1), 170-173 [cit. 2020-02-25]. DOI: 10.1002/prot.10571. ISSN 08873585. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/prot.10571>.
- MONTEIRO, S., M.A. PIÇARRA-PEREIRA, P.R. MESQUITA, V.B. LOUREIRO, A. TEIXEIRA a R.B. FERREIRA, 2001. The Wide Diversity of Structurally Similar Wine Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **49**(8), 3999-4010 [cit. 2020-02-24]. DOI: 10.1021/jf0013914. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf0013914>.
- NOVÁK, F.A., 1961. *Vyšší rostliny: tracheophyta*. Praha: Československá akademie věd.
- ODA, K., 2011. New families of carboxyl peptidases: serine-carboxyl peptidases and glutamic peptidases. *Journal of Biochemistry* [online]. **151**(1), 13-25 [cit. 2020-03-03]. DOI: 10.1093/jb/mvr129. ISSN 0021-924X. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jb/article-lookup/doi/10.1093/jb/mvr129>.
- OGATA, C.M., P.F. GORDON, A.M. DE VOS a S.-H. KIM, 1992. Crystal structure of a sweet tasting protein thaumatin I, at 1.65 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* [online]. **228**(3), 893-908 [cit. 2020-02-24]. DOI: 10.1016/0022-2836(92)90873-I. ISSN 00222836. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002228369290873I>.
- OHTSUBO, K. a J.D. MARTH, 2006. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell* [online]. **126**(5), 855-867 [cit. 2020-02-24]. DOI: 10.1016/j.cell.2006.08.019. ISSN 00928674. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867406010865>.
- OTTO, H.-H. a T. SCHIRMEISTER, 1997. Cysteine Proteases and Their Inhibitors. *Chemical Reviews* [online]. **97**(1), 133-172 [cit. 2020-03-03]. DOI: 10.1021/cr950025u. ISSN 0009-2665. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr950025u>.
- PAVLOUŠEK, P., 2010. *Výroba vína u malovinářů*. 2. vydání. Praha: Grada. ISBN 9788024774725.
- PAVLOUŠEK, P., 2011. *Pěstování révy vinné: moderní vinohradnictví*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3314-2.
- PEI, J. a N.V. GRISHIN, 2003. Peptidase family U34 belongs to the superfamily of N-terminal nucleophile hydrolases. *Protein Science* [online]. **12**(5), 1131-1135 [cit. 2020-04-02]. DOI: 10.1110/ps.0240803. ISSN 09618368. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1110/ps.0240803>.
- PERUTKA, Z. a M. ŠEBELA, 2019. Mass spectrometry of peptides and proteins using digestion by a grape cysteine protease at pH 3. *Journal of Mass Spectrometry* [online]. [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1002/jms.4444. ISSN 10765174. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jms.4444>.
- PERUTKA, Z., M. ŠUFEISL, M. STRNAD a M. ŠEBELA, 2019. High-proline proteins in experimental hazy white wine produced from partially botrytized grapes. *Biotechnology and Applied Biochemistry* [online]. **66**(3), 398-411 [cit. 2020-05-10]. DOI: 10.1002/bab.1736. ISSN 0885-4513. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bab.1736>.
- POOLE, C.F. a S.K. POOLE, 1991. *Chromatography today*. New York, NY, U.S.A.: Distributors for the U.S. and Canada, Elsevier Science Pub. Co. ISBN 0-444-89161-7.
- RAPPSILBER, J., Y. ISHIHAMA a M. MANN, 2003. Stop and Go Extraction Tips for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Nanoelectrospray, and LC/MS Sample Pretreatment in Proteomics. *Analytical Chemistry* [online]. **75**(3), 663-670 [cit. 2020-05-21]. DOI: 10.1021/ac026117i. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac026117i>.
- RICHAU, K.H., F. KASCHANI, M. VERDOES, T.C. PANSURIYA, S. NIESSEN, K. STÜBER, T. COLBY, H.S. OVERKLEEF, M. BOGYO a R.A.L. VAN DER HOORN, 2012. Subclassification and Biochemical Analysis of Plant Papain-Like Cysteine Proteases Displays Subfamily-Specific Characteristics. *Plant Physiology* [online]. **158**(4), 1583-1599 [cit. 2020-

- 03-19]. DOI: 10.1104/pp.112.194001. ISSN 0032-0889. Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.112.194001>.
- ROBINSON, S.P. a C. DAVIES, 2000. Molecular biology of grape berry ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research* [online]. **6**(2), 175-188 [cit. 2020-02-24]. DOI: 10.1111/j.1755-0238.2000.tb00177.x. ISSN 1322-7130. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1755-0238.2000.tb00177.x>.
- ROBINSON, S.P., A.K. JACOBS a I.B. DRY, 1997. A Class IV Chitinase Is Highly Expressed in Grape Berries during Ripening. *Plant Physiology* [online]. **114**(3), 771-778 [cit. 2020-02-24]. DOI: 10.1104/pp.114.3.771. ISSN 0032-0889. Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.114.3.771>.
- SALVI, G., P. DE LOS RIOS a M. VENDRUSCOLO, 2005. Effective interactions between chaotropic agents and proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* [online]. **61**(3), 492-499 [cit. 2020-03-16]. DOI: 10.1002/prot.20626. ISSN 08873585. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/prot.20626>.
- SANCHEZ-PULIDO, L. a C.P. PONTING, 2016. Vasohibins: new transglutaminase-like cysteine proteases possessing a non-canonical Cys-His-Ser catalytic triad. *Bioinformatics* [online]. **32**(10), 1441-1445 [cit. 2020-05-10]. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv761. ISSN 1367-4803. Dostupné z: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btv761>.
- SELA-BUURLAGE, M.B., A.S. PONSTEIN, S.A. BRES-VLOEMANS, L.S. MELCHERS, P.J.M. VAN DEN ELZEN a B.J.C. CORNELISSEN, 1993. Only Specific Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Chitinases and [beta]-1,3-Glucanases Exhibit Antifungal Activity. *Plant Physiology* [online]. **101**(3), 857-863 [cit. 2020-02-24]. DOI: 10.1104/pp.101.3.857. ISSN 0032-0889. Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.101.3.857>.
- SELS, J., J. MATHYS, B.M.A. DE CONINCK, B.P.A. CAMMUE a M.F.C. DE BOLLE, 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry* [online]. **46**(11), 941-950 [cit. 2020-03-20]. DOI: 10.1016/j.plaphy.2008.06.011. ISSN 09819428. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942808001137>.
- SHEVCHENKO, A., H. TOMAS, J. HAVLI, J.V. OLSEN a M. MANN, 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols* [online]. **1**(6), 2856-2860 [cit. 2020-05-21]. DOI: 10.1038/nprot.2006.468. ISSN 1754-2189. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nprot.2006.468>.
- SMITH, P.K., R.I. KROHN, G.T. HERMANSON, A.K. MALLIA, F.H. GARTNER, M.D. PROVENZANO, E.K. FUJIMOTO, N.M. GOEKE, B.J. OLSON a D.C. KLENK, 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* [online]. **150**(1), 76-85 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1016/0003-2697(85)90442-7. ISSN 00032697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269785904427>.
- STANLEY, P., 2011. Golgi Glycosylation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. **3**(4), 1-13 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1101/cshperspect.a005199. ISSN 1943-0264. Dostupné z: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a005199>.
- ŠEBELA, M., T. ŠTOSOVÁ, J. HAVLIŠ, N. WIELSCH, H. THOMAS, Z. ZDRÁHAL a A. SHEVCHENKO, 2006. Thermostable trypsin conjugates for high-throughput proteomics: synthesis and performance evaluation. *PROTEOMICS* [online]. **6**(10), 2959-2963 [cit. 2020-05-21]. DOI: 10.1002/pmic.200500576. ISSN 1615-9853. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.200500576>.
- TATTERSALL, D.B., R. VAN HEESWIJCK a P.B. HOJ, 1997. Identification and Characterization of a Fruit-Specific, Thaumatin-Like Protein That Accumulates at Very High Levels in Conjunction with the Onset of Sugar Accumulation and Berry Softening in Grapes. *Plant Physiology* [online]. **114**(3), 759-769 [cit. 2020-02-24]. DOI: 10.1104/pp.114.3.759. ISSN 0032-0889. Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.114.3.759>.
- TESFAYE, W., M.L. MORALES, M.C. GARCÍA-PARRILLA a A.M. TRONCOSO, 2002. Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in Food Science & Technology* [online]. **13**(1), 12-21 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.1016/S0924-2244(02)00023-7.

- ISSN 09242244. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224402000237>.
- THEIS, T. a U. STAHL, 2004. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* [online]. **61**(4), 437-455 [cit. 2020-02-24]. DOI: 10.1007/s00018-003-3231-4. ISSN 1420-682X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-003-3231-4>.
- TIAN, B., R. HARRISON, J. MORTON, S. DEB-CHOUDHURY a M. SCALI, 2015. Proteomic Analysis of Sauvignon Blanc Grape Skin, Pulp and Seed and Relative Quantification of Pathogenesis-Related Proteins. *PLOS ONE* [online]. **10**(6) [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1371/journal.pone.0130132. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0130132>.
- TURNER, J.G., C. ELLIS a A. DEVOTO, 2002. The Jasmonate Signal Pathway. *The Plant Cell* [online]. **14**(suppl 1), 153-164 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1105/tpc.000679. ISSN 1040-4651. Dostupné z: <http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.000679>.
- VAN LOON, L.C., M. REP a C.M.J. PIETERSE, 2006. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology* [online]. **44**(1), 135-162 [cit. 2020-02-24]. DOI: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425. ISSN 0066-4286. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>.
- VAN SLUYTER, S.C., J.M. MCRAE, R.J. FALCONER, P.A. SMITH, A. BACIC, E.J. WATERS a M. MARANGON, 2015. Wine Protein Haze: Mechanisms of Formation and Advances in Prevention. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **63**(16), 4020-4030 [cit. 2020-03-15]. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b00047. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.5b00047>.
- VEVERKOVÁ, E., 2018. *Identifikace glykoproteinů v kultivarech hrachu setého* [online]. Česká Republika [cit. 2020-05-06]. Dostupné z: https://theses.cz/id/nfxlff/DP_2018_Veverkova_Eliska.pdf?lang=cs;verze=2017. Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta.
- WATERS, E.J., N.J. SHIRLEY a P.J. WILLIAMS, 1996. Nuisance Proteins of Wine Are Grape Pathogenesis-Related Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **44**(1), 3-5 [cit. 2020-02-24]. DOI: 10.1021/jf9505584. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf9505584>.
- WATERS, E.J., W. WALLACE, M.E. TATE a P.J. WILLIAMS, 1993. Isolation and partial characterization of a natural haze protective factor from wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **41**(5), 724-730 [cit. 2020-02-25]. DOI: 10.1021/jf00029a009. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00029a009>.
- YAMAMOTO, S., K. NAKANISHI a R. MATSUNO, 1988. *Ion-exchange chromatography of proteins*. 4th ed. New York: M. Dekker. ISBN 0-8247-7903-7.
- YAMASHITA, A.C. a K. SAKURAI, 2015. Dialysis Membranes — Physicochemical Structures and Features. SUZUKI, H.. *Updates in Hemodialysis* [online]. Japonsko: IntechOpen, s. 163-187 [cit. 2020-04-27]. ISBN 978-953-51-7255-0. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/updates-in-hemodialysis/dialysis-membranes-physicochemical-structures-and-features>.
- Wine Statistics, c1934-2020. *Wine Institute* [online]. San Francisco: Trade Data And Analysis [cit. 2020-04-28]. Dostupné z: <https://wineinstitute.org/our-industry/statistics/>.

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AA/BIS	poměr akrylamidu k bisakrylamidu
APS	persíran amonný
B	burčák
BCA	bicinchoninová kyselina
BP	pelet burčáku
BPUF	pelet burčáku po ultrafiltraci
BSA	hovězí sérový albumin
BUF	burčák po ultrafiltraci
CA	acetátcelulosevé membrány
CDA	diacetátcelulosevé membrány
CTA	triacetátcelulosevé membrány
CYSP	cysteinová proteasa
DAD	detektor s diodovým polem
DTT	dithiotreitol
ESI	ionizace elektrosprejem
F1-F5	číslo proteinové frakce
FA	kyselina mravenčí
GLC	plynová rozdělovací chromatografie
GSC	plynová adsorpční chromatografie
HIC	chromatografie s hydrofobní interakcí
HP1-HP10	číslo pásu na gelu
HPD	hroznová šťáva po dialýze
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HUF	hroznová šťáva po ultrafiltraci
CHAPS	3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate
IAA	2-jodacetamid
IT	iontová past
LTPs	proteiny přenášející lipidy
m/z	poměr hmotnosti a náboje
MALDI	matrix-assisted laser desorption ionization
MS-MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
OPD	ocet po dialýze

OUF	ocet po ultrafiltraci
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PPD	pelet po dialýze
PR-proteiny	pathogenesis-related proteiny
PUF	pelet po ultrafiltraci
rpm	otáčky za minutu
S	substrát
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsíránu sodného
ST	standard
TCA	kyselina trichloroctová
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethyldiamin
TLPs	proteiny podobné thaumatinu
TOF	time-of-flight