VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VLIV ZVÝŠENÉ KONCENTRACE OXIDU UHLIČITÉHO A DUSÍKATÉHO HNOJENÍ NA OBSAH PROTEINŮ GLUTENINOVÉ A GLIADINOVÉ FRAKCE U OZIMÉ PŠENICE

IMPACT OF ELEVATED CARBON DIOXIDE CONCENTRATION AND NITROGEN NUTRITION ON PROTEIN CONTENT OF GLUTENIN AND GLIADIN FRACTION IN WINTER WHEAT

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE — **Bc. Klára Chadimová**
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE — **PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.**
SUPERVISOR

BRNO 2016

Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	**FCH-DIP0970/2015**	Akademický rok:	**2015/2016**
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií		
Student(ka):	**Bc. Klára Chadimová**		
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)		
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)		
Vedoucí práce	**PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.**		
Konzultanti:			

Název diplomové práce:

Vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého a dusíkatého hnojení na obsah proteinů gluteninové a gliadinové frakce u ozimé pšenice

Zadání diplomové práce:

Na základě studia literatury napsat pojednání o vlivu zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na kvalitu pšeničného zrna. Zvláště se zaměřit na obsah proteinů gluteninové a gliadinové frakce.
V experimentální části sledovat vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého, dusíkatého hnojení, sucha a UV záření na obsah proteinů gluteninové a gliadinové frakce.

Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Klára Chadimová Student(ka)	PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D. Vedoucí práce	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc. Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V této práci byl studován vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého, dusíkatého hnojení, sucha a UV záření na obsah proteinů gluteninové a gliadinové frakce pšeničného lepku. Ozimá pšenice odrůdy Bohemia byla kultivována za podmínek normální (AC; 400 μmol $CO_2.mol^{-1}$) a zvýšené (EC; 700 μmol $CO_2.mol^{-1}$) koncentrace CO_2. Polovina vzorků byla hnojena dávkou 200 kg $N.ha^{-1}$ (N+, N–) a dalšími sledovanými environmentálními faktory bylo vyloučení UV záření u poloviny komor (UV–, UV+) a manipulace přirozených srážek (DRY, WET). Gliadinová frakce lepku byla separována metodou A-PAGE, gluteninová frakce metodou SDS-PAGE. Proteiny byly kvantifikovány počítačovou denzitometrií. Dusíkaté hnojení významně zvýšilo obsah proteinů gliadinové a gluteninové frakce lepku. V menší míře se projevil vliv sucha, které významně snížilo koncentraci některých subfrakcí gliadinů, naopak významný pokles množství proteinů vlivem sucha byl pozorován u HMW gluteninových podjednotek. Vyloučení UV záření způsobilo významné snížení obsahu proteinů několika subfrakcí gliadinových a gluteninoých podjednotek. Vliv zvýšené koncentrace CO_2 se projevil pouze v malé míře významným zvýšením koncentrace proteinů gluteninových subrakcí HMW 1 a 2. Naopak významné snížení množství proteinů vlivem zvýšené koncentrace CO_2 bylo pozorováno u gliadinových subfrakcí ω-5 1 a β 1.

ABSTRACT

The present study investigates effects of elevated atmospheric carbon dioxide concentration, different nitrogen fertilization levels, drought and UV radiation on protein content of wheat gluten fractions glutenins and gliadins. Winter wheat cultivar Bohemia was grown under ambient CO_2 concentration (AC; 400 μmol $CO_2 mol^{-1}$) and elevated CO_2 concentration (EC; 700 μmol CO_2 mol^{-1}). Half of the samples was fertilized with 200 kg $N.ha^{-1}$ (N+) and the other part stayed unfertilized (N–). Other environmental factors were UV radiation exclusion (UV–, UV+) and drought (DRY, WET). Gliadins were separated by A-PAGE, glutenins by SDS-PAGE. Proteins were quantified by computer densitometry. Nitrogen fertilization caused an significat increase of gliadins and glutenins. While some gliadins subfractions were significantly lowered by drought, HMW glutenin subunits showed significant increase. UV radiation exclusion resulted in significant decrease of some gliadin subfractions and glutenin subunits. CO_2 enrichment caused significant increase of glutenin subfractions HMW 1 and 2, while gliadin subfractions ω-5 1 and β 1 were significantly decreased by elevated CO_2 concentration.

.

KLÍČOVÁ SLOVA

pšenice, zvýšená koncentrace CO_2, lepek, gliadiny, gluteniny

KEYWORDS

wheat, elevated CO_2 concentration, gluten, gliadins, glutenins

CHADIMOVÁ, K. *Vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého a dusíkatého hnojení na obsah proteinů gluteninové a gliadinové frakce u ozimé pšenice*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 70 s. Vedoucí diplomové práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování: Tímto bych ráda poděkovala mému vedoucímu diplomové práce panu PhDr. Miroslavu Hrstkovi, Ph.D. za podporu, vstřícnost a poskytnuté rady při vypracování této práce a panu Ing. Karlu Klemovi, Ph.D. za cenné rady a konzultace při zpracování výsledků.

OBSAH

1 Úvod 7
2 Teoretická část 8
2.1 Globální klimatická změna 8
2.2 Vliv zvýšené koncentrace CO_2 na rostliny 10
2.3 Vliv zvýšené koncentrace CO_2 na fotosyntézu 10
2.4 Vliv zvýšené koncentrace CO_2 na fotorespiraci 12
2.5 Vliv zvýšené koncentrace CO_2 na respiraci 12
2.6 Vliv zvýšené koncentrace CO_2 na vodivost průduchů 12
2.7 Stavba a složení pšeničného zrna 13
2.8 Technologická jakost pšenice 15
2.8.1 Objemová výtěžnost 16
2.8.2 Obsah hrubých bílkovin 16
2.8.3 Zelenyho test 16
2.8.4 Číslo poklesu 17
2.8.5 Objemová hmotnost 17
2.8.6 Vaznost mouky 17
2.9 Pšeničné proteiny 17
2.9.1 Albuminy a globuliny 18
2.9.2 Lepek 18
2.9.2.1 Gliadiny 19
2.9.2.2 Gluteniny 21
2.10 Vliv zvýšené koncentrace CO2 na pšeničné proteiny 22
2.11 Metody stanovení lepkových proteinů 23
2.11.1 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu 23
2.11.1.1 A-PAGE 25
2.11.1.2 SDS-PAGE 25
2.11.1.3 Izoelektrická fokusace 25
2.11.1.4 2-D elektroforéza 26
2.11.2 Chromatografické metody 26
2.11.3 Hmotnostní spektrometrie 26

2.11.4 ELISA ... 26
3 Experimentální část ... 28
3.1 Materiál ... 28
3.2 Stanovení obsahu gliadinů metodou A-PAGE ... 29
3.2.1 Přístroje ... 29
3.2.2 Chemikálie ... 29
3.2.3 Příprava roztoků ... 30
3.2.4 Příprava polyakrylamidového gelu ... 30
3.2.5 Příprava vzorku ... 30
3.2.6 Elektroforéza ... 31
3.2.7 Fixace a vizualizace bílkovin ... 31
3.3 Stanovení obsahu gluteninů metodou SDS-PAGE ... 31
3.3.1 Přístroje ... 31
3.3.2 Chemikálie ... 32
3.3.3 Příprava roztoků ... 32
3.3.4 Příprava vzorků ... 33
3.3.5 Příprava gelů ... 33
3.3.5.1 Separační gel ... 34
3.3.5.2 Zaostřovací gel ... 34
3.3.6 Elektroforéza ... 35
3.3.7 Vizualizace bílkovin ... 35
3.4 Vyhodnocení gelů ... 35
3.5 Statistické zpracování výsledků ... 35
4 Výsledky ... 36
5 Diskuse ... 55
6 Závěr ... 58
7 Literatura ... 59
8 Seznam zkratek ... 70

1 ÚVOD

Jedna z nejdůležitějších globálních změn způsobených lidskou činností je rychlý nárůst koncentrace oxidu uhličitého v atmosféře. Koncentrace oxidu uhličitého vzrostla od počátku průmyslové revoluce nejméně o 35 % a stále stoupá.

Protože oxid uhličitý je substrátem fotosyntézy, jakákoli změna v jeho vzdušné koncentraci má vliv na růst rostlin. Jelikož zvýšená koncentrace CO_2 stimuluje fotosyntézu a růst rostlin, můžeme v budoucnu očekávat vyšší výnosy zemědělských plodin. Předpokládá se, že stimulace fotosyntézy povede ke zvýšené produkci sacharidů oproti bílkovinám, což bude mít negativní dopad na výživovou kvalitu potravin.

Jednou z nejvýznamnějších zemědělských plodin na světě je pšenice. Obsah hrubé bílkoviny v pšeničném zrnu je hlavním kritériem výživové hodnoty a pekařských vlastností mouky. Dusíkatá výživa by měla silně interagovat se zvýšenou koncentrací CO_2 a dohromady tak výrazně ovlivňovat metabolismus rostliny a kvalitu zrna. Podle některých hypotéz zvýšená koncentrace CO_2 snižuje obsah dusíkatých látek v pšeničném zrnu bez ohledu na množství dusíkaté výživy, avšak mechanismus tohoto procesu nebyl doposud zcela objasněn.

Nejdůležitějšími pšeničnými proteiny jsou lepkové proteiny. Lepek tvoří ve vodě nerozpustnou elastickou složku těsta a je tvořen dvěma frakcemi proteinů, monomerními gliadiny a polymerními gluteniny. Obsah lepkových proteinů ovlivňuje objem pečiva. Obě frakce lepku významně ovlivňují reologické vlastnosti těsta a jejich správný poměr určuje viskoelastické vlastnosti a pekařskou kvalitu konečného produktu.

Navzdory velkému důrazu kladenému na kvalitu pšenice pěstované pro potravinářské účely máme stále nedostatek informací o vlivu zvýšené koncentrace CO_2 na důležité parametry kvality pšeničného zrna. Práce zabývající se vlivem zvýšené koncentrace CO_2 na kvalitu pšeničného zrna často přinášejí protichůdná zjištění.

Cílem této práce bylo sledovat vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého, dusíkatého hnojení, sucha a UV záření na obsah proteinů gluteninové a gliadinové frakce lepku u ozimé pšenice odrůdy Bohemia.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Globální klimatická změna

Klima Země se neustále mění, což je důsledek působení kontinentálních pohybů, změn kvality a množství slunečního záření, parametrů oběžné dráhy Země, sopečné činnosti, dopadu meteoritů a komet, rozrůstání a zmenšování ledovců, změn v cirkulaci a složení oceánů a atmosféry a konečně změn ekosystémů.

Přibližně od počátku 20. století lze přitom pozorovat dlouhodobou odchylku klimatických parametrů Země od průměrů a trendů, které panovaly na Zemi předtím. Tato dlouhodobá odchylka se nazývá globální klimatická změna [1] a její nejpravděpodobnější příčinou je uvolňování velkého množství skleníkových plynů. Rychlost tohoto uvolňování je přitom několikanásobně větší než přirozené změny za období nejméně 20 000 let [2].

Mezi skleníkové plyny s přímou vazbou na lidskou činnost patří oxid uhličitý, jenž je do ovzduší uvolňován spalovacími procesy, methan, který produkují hospodářská zvířata, oxidy dusíku, vznikající ve spalovacích motorech a při různých průmyslových výrobách, freony, které jsou do atmosféry uvolňovány z různých chladicích zařízení, a nakonec vodní pára. Společným znakem skleníkových plynů je jejich výrazný účinek na radiační bilanci Země, protože jsou propustné pro krátkovlnnou složku dopadajícího slunečního záření, ale daleko méně propustné pro dlouhovlnnou složku emitovanou zemským povrchem [3]. V důsledku toho přestala být zářivá bilance Země vyrovnaná a přízemní vrstvy ovzduší, pevniny a oceány se postupně ohřívají. Největší vliv na oteplování má oxid uhličitý (asi 47 %), methan (27 %) a freony (10%) [4].

Důsledky účinků skleníkových plynů na radiační bilanci atmosféry ale nelze jednoduše spojovat s bezprostředními změnami klimatu, protože v důsledku existence rozsáhlých tepelných rezervoárů v podobě oceánů dochází k významnému zpoždění reakce klimatu a zpětnovazebné mechanismy působící mezi atmosférou, oceány a biosférou mohou výrazně měnit rychlost produkce nebo odbourávání skleníkových plynů v ovzduší.

To, že globální klimatická změna je především důsledkem lidské činnosti, dokládá řada literárních údajů. Za posledních 1000 let byla koncentrace CO_2 v ovzduší poměrně stabilní a pohybovala se v rozmezí hodnot od 270 až 290 $\mu mol.mol^{-1}$[5]. Etheridge a kol. [6] analyzovali vzorky vzduchu odebrané z ledovců LawDome ve východní Antarktidě dokumentující uplynulých 1000 let. Z jejich výzkumu jasně vyplývá, že k prudkému vzrůstu koncentrace CO_2 došlo počátkem 19. století v souladu s počátky rozvoje průmyslu. Změny koncentrace CO_2 v uplynulých 500 letech hodnotili také Wahlen a kol. [7]. Vzorky postihující období od roku 1530 do roku 1940 byly odebrány v oblasti středního Grónska. Podle jejich měření nastává vzestup koncentrace CO_2 ještě před obdobím, kdy se ve větší míře začala spalovat fosilní paliva, což vysvětlují změnou ve využívání půdy (odlesňování a přeměna zemědělsky využívané plochy).

Zatímco v polovině 18. století činila koncentrace CO_2 v ovzduší 270–280 $\mu mol.mol^{-1}$ (tedy 270–280 ppm), koncentrace v současné době se pohybuje okolo 390 $\mu mol.mol^{-1}$ (údaje za rok 2010). Výrazně se rovněž zvyšuje i meziroční nárůst koncentrace CO_2 v atmosféře. Zatímco

v období 1970–1979 činil tento nárůst 1,3 μmol.mol^{-1} v letech 2000–2006 to bylo 1,9 μmol.mol^{-1}. [8; 9]. Tyto údaje potvrzují i analýzy vzorků z arktických ledů, izotopová analýza letokruhů, měření obsahu CO_2 v atmosféře na různých místech Země a stejně tak i modelové studie založené na výpočtech spotřeby fosilních paliv. Hönisch a kol. [10] uvádějí, že současná koncentrace CO_2 je nejvyšší za posledních 2,1 milionu let.

Zdá se, že v uplynulých 150 000 letech byly změny klimatu a koncentrace CO_2 velmi těsně spojeny [11]. Konec doby ledové je spojen se zvýšením koncentrace CO_2, například přechod z doby ledové do doby meziledové byl doprovázen zvýšením koncentrace CO_2 přibližně o 30 %. Tento nárůst koncentrace CO_2 je přičítán uvolnění několika set gigatun uhlíku z moře do atmosféry. Naopak již několik tisíc let před nástupem doby ledové lze pozorovat pokles koncentrace CO_2. Popsané změny souvisí pravděpodobně se změnami biologické produktivity, alkality a cirkulace oceánů, se změnami stupně pokrytí ledovci a s ukládáním $CaCO_3$ do korálových útesů. Změny koncentrace CO_2 v atmosféře tedy nepředstavují jev, který by se v historii Země již neobjevil, ale neobvyklá je rychlost těchto změn v posledních letech. Největším problémem je, že emise CO_2 do atmosféry stále pokračují v důsledku spotřeby fosilních paliv, rozsáhlého odlesňování v tropických oblastech a změn ve využívání půdy.

Změny koncentrace CO_2 jsou provázeny nejen zvyšováním koncentrace skleníkových plynů, ale i zvýšenou depozicí dusíku na souši i v mořích. Zdrojem tohoto dusíku jsou hnojiva používaná v zemědělství a různé produkty spalování pocházející například z automobilové dopravy. Tato depozice kolísá na jednotlivých místech planety od minima kolem 10 kg N na hektar až po neuvěřitelných 150 kg N na hektar za rok [12]. Díky zvýšené depozici C i N, jejichž metabolismus spolu v rostlině velmi těsně souvisí, lze očekávat v rozvinutých zemích vzestup produktivity a výnosů o 15 až 20 %. Tyto změny však mohou mít za následek například pokles druhové diverzity v přirozených ekosystémech.

Z přesných a systematických měření koncentrace CO_2, která se provádějí od roku 1958 na lokalitě Mauna Loa na Havajských ostrovech, je patrný systematický růst koncentrace CO_2 v uplynulých 40 letech i pravidelné sezónní kolísání v průběhu roku [11]. K poklesu dochází s rozvojem jarní vegetace na severní polokouli a naopak vzrůst koncentrace CO_2 souvisí s nástupem podzimu na severní polokouli, kdy většina vegetace přestává být fotosynteticky aktivní a dochází k uvolnění velkého množství CO_2 do ovzduší. Amplituda tohoto ročního cyklu se každým rokem zvyšuje. Vliv na kolísání koncentrace CO_2 v průběhu roku má například sezónní kolísání spalování fosilních paliv, sezónní kolísání depozice dusíku pocházejícího z fosilních paliv, protože dusík vykazuje pozitivní vliv na rostlinnou produkci a tím i na spotřebu CO_2, sezónní kolísání spalování tropických lesů nebo změny v délce vegetace ve větších zeměpisných šířkách. Zvyšující se amplitudu ročního kolísání CO_2 ovlivňuje i zvyšující se teplota atmosféry. Keeling a kol. [13] prokázali, že roční amplituda se zvyšuje o 19 % ± 4 % s každým zvýšením teploty o 1 °C. Je však nutné si uvědomit, že při hodnocení koncentrace CO_2 v delších časových intervalech jsou sezónní kolísání v průběhu roku i lokální rozdíly v oblastech různých zeměpisných šířek zanedbatelné.

2.2 Vliv zvýšené koncentrace CO_2 na rostliny

Oxid uhličitý má dva přímé fyziologické účinky na fotosyntézu. (1) V procesu označovaném jako karbamylace aktivují molekuly CO_2 primární enzym Calvinova cyklu ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasu/oxygenasu (Rubisco). Nejprve dochází k navázání jedné molekuly CO_2 na molekulu inaktivního enzymu (pomalá reverzibilní reakce) a následně k navázání kationtu Mg^{2+} (rychlá nevratná reakce) za vzniku aktivovaného komplexu. Tento proces je katalyzován Rubisco-aktivasou. (2) Molekuly CO_2 jsou vstupním substrátem karboxylace. V prvním kroku této enzymatické reakce s primárním akceptorem RuBP (ribulosa-1,5-bisfosfátem) dochází k navázání molekuly CO_2 na aktivní místo enzymu Rubisco zpřístupněné karbamylací a vzniká komplex $Rubisco_{akt}{}^{-}CO_2$. Tento komplex ve druhém kroku reaguje s molekulou RuBP. Poté následuje syntéza triosafosfátů, primárních produktů Calvinova cyklu. Oxid uhličitý je tedy aktivátorem i substrátem fotosyntézy, ale kromě toho má vliv na procesy fotorespirace, dýchání a na vodivost průduchů [3].

2.3 Vliv zvýšené koncentrace CO_2 na fotosyntézu

Při krátkodobém působení zvýšené koncentrace CO_2 dochází k průkaznému zvýšení rychlosti asimilace u C3-rostlin [3]. Současná koncentrace CO_2 v atmosféře totiž není schopna plně saturovat karboxylační aktivitu Rubisco. Zvýšením poměru mezi koncentracemi CO_2 a O_2 se zvýší pravděpodobnost navázání molekuly CO_2 na aktivní místo enzymu Rubisco, čímž dojde k upřednostnění karboxylační aktivity enzymu před aktivitou oxygenázovou a v důsledku toho ke zvýšení rychlosti fotosyntézy.

K navýšení rychlosti asimilace CO_2 dochází při intenzitě slunečního záření vyšší než 250 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ [3]. Při nižších intenzitách světla je limitujícím faktorem fotosyntézy množství dopadajících fotonů a vliv zvýšené koncentrace CO_2 se na úrovni rychlosti asimilace neprojeví [14]. Zvýšená hodnota poměru asimilace/fotorespirace má za následek také navýšení fotochemické efektivity asimilace.

Odezva rostlin dlouhodobě vystavených zvýšené koncentraci CO_2 se může značně lišit. Obecně lze říci, že stimulační efekt zvýšené koncentrace CO_2 klesá s délkou působení zvýšené koncentrace CO_2, což lze pozorovat zejména při nedostatečné minerální výživě rostlin. Stav, kdy asimilační kapacita rostliny kultivované při zvýšené koncentraci CO_2 je nižší v porovnání s rostlinami kultivovanými v podmínkách přirozené koncentrace CO_2 se nazývá aklimační deprese fotosyntézy. Míra poklesu asimilační kapacity při aklimační depresi se u různých druhů rostlin liší a pohybuje se v rozmezí 30 až 60 % původních hodnot asimilační kapacity [15]. V literatuře je možné nalézt několik hypotéz vysvětlujících příčiny nástupu aklimační deprese fotosyntézy [15, 16]:

a) Redistribuce nebo snížení koncentrace anorganického fosfátu. V důsledku zvýšené rychlosti fotosyntézy dochází ke zvýšené akumulaci fosforylovaných meziproduktů Calvinova cyklu a následné redistribuci anorganického fosfátu (P_i) mezi vnitřním prostorem chloroplastů a cytosolem. Snížené množství P_i limituje syntézu adenosintrifosfátu (ATP) nezbytného pro regeneraci primárního akceptoru CO_2 RuBP a dokončení Calvinova cyklu. Kromě této zpětnovazebné limitace spotřebou triosafosfátů může snížené množství P_i a ATP

vést ke zpětnovazebné limitaci aktivity enzymu aktivasy Rubisco, jehož omezená funkčnost způsobuje pomalejší aktivaci enzymu Rubisco.

b) Snížení obsahu či aktivity enzymu Rubisco. U mnoha rostlinných druhů byl zaznamenán pokles rychlosti asimilace CO_2 jako důsledek poklesu karboxylační aktivity enzymu Rubisco [3]. Pokles množství enzymu Rubisco i jeho aktivity *in vitro* u rostlin dlouhodobě pěstovaných při zvýšené koncentraci CO_2 dokládá řada experimentálních prací. Aktivita enzymu Rubisco může být snížena právě v důsledku lokálního nedostatku P_i a tím snížené aktivity Rubisco-aktivasy, jak bylo popsáno výše. Další mechanismus deaktivace tohoto enzymu představuje potlačení jeho genové exprese, na čemž se nejvíce podílejí nestrukturní sacharidy, například glukosa a sacharosa. Třetím typem mechanismu je potlačení genové exprese enzymu karbonátdehydratasy, který katalyzuje ustavení rovnováhy mezi CO_2 a HCO_3^- ve stromatu chloroplastů, čímž napomáhá difuzi CO_2 z intercelulárního prostoru listů k místům aktivního působení Rubisco v chloroplastech. Pokles aktivity tohoto enzymu tak může nepřímo způsobit i pokles aktivity enzymu Rubisco jeho nedostatečnou karbamylací.

c) Mechanické poškození tylakoidů v důsledku nadměrné akumulace škrobu. Transport asimilátů (glyceraldehyd-3-fosfátu a dihydroxyacetonfosfátu) z chloroplastu do cytosolu zajišťuje translokátor fosfátu fosfát-triosafosfát-fosfoglycerát-translokátor (TPT). Protože TPT pracuje jako striktní antiport s PO_4^{3-}, může při nedostatku fosforu docházet k nadměrnému hromadění škrobu ve stromatu chloroplastů a následnému poškození tylakoidních membrán. Tento typ aklimační deprese je však řadou autorů považován za extrémní.

d) Inhibování transkripce genů. Při kultivaci rostlin ve zvýšené koncentraci CO_2 může zvýšený obsah volných sacharidů způsobovat snížení genové exprese enzymů nezbytných pro jejich syntézu (Rubisco, karbonátdehydratasa). Genová exprese enzymů pro zužitkování sacharidů je v takovém případě naopak stimulována a dochází například k nárůstu počtu genů kódujících ADP-glukosapyrofosforylasu, enzym katalyzující biosyntézu škrobu.

e) Úroveň minerální výživy, efekt dusíku. Řada experimentů dokládá, že nedostatek dusíku prohlubuje aklimační depresi fotosyntézy a stres vyvolaný nedostatečnou minerální výživou může zcela potlačit pozitivní účinek zvýšené koncentrace CO_2. U rostlin pěstovaných při zvýšené koncentraci CO_2 dochází ke snížení obsahu dusíku v pletivech listů. V některých případech můžeme pozorovat tzv. zřeďovací efekt, kdy je sice zachováno stejné množství dusíku, ale připadá na vyšší množství biomasy. Snížený obsah dusíku negativně ovlivňuje aktivitu všech fotosyntetických enzymů, převážně enzymu Rubisco, který obsahuje 25–50 % listového dusíku. V neposlední řadě může nedostatek dusíku v listech způsobovat i snížení syntézy chlorofylů.

f) Změny ve struktuře světlosběrných komplexů. Dlouhodobé působení zvýšené koncentrace CO_2 na rostliny může způsobovat pokles obsahu fotosyntetických aktivních pigmentů, tj. chlorofylů a karotenoidů, a rozpad světlosběrných pigmentoproteinových komplexů. Pozorované změny pravděpodobně souvisí s potlačením fotorespirace, která při vysoké ozářenosti a teplotě plní roli „zhášeče“ nadměrných excitací, které mohou vést k nevratnému poškození proteinů zapojených v transportu elektronů.

g) Změny poměru zdroj/úložiště CO_2 v rostlinách. Při kultivaci rostlin za podmínek zvýšené koncentrace CO_2 se po určité době rychlost fotosyntézy stává závislá na schopnosti rostliny vytvářet nová uhlíková úložiště, což se projevuje například nárůstem listové plochy nebo tvorbou sekundárních letorostů. Nedostatek aktivních úložišť uhlíku vede k prohloubení aklimační deprese fotosyntézy. Podle obecně přijímaného modelu vývoje aklimace fotosyntézy na zvýšenou koncentraci CO_2 je fotosyntetická kapacita řízena poměrem aktuálních změn biochemických a morfologických [17]. Biochemickou změnou je například změna fixace CO_2 enzymem Rubisco nebo regenerace RuBP a triosafosfátů, mezi morfologické změny patří rychlost zabudovávání sacharidů do buněk, nárůst šířky listů, tvorba nových uhlíkových úložišť atd. Pokud převažují biochemické změny, dochází k aklimační depresi fotosyntézy. Převažují-li změny morfologické, dochází k dlouhodobé stimulaci asimilačních procesů zvýšenou koncentrací CO_2 [3].

2.4 Vliv zvýšené koncentrace CO_2 na fotorespiraci

V průběhu fotorespirace dochází k uvolňování molekul CO_2 a NH_3, spotřebě ATP a redukčních ekvivalentů NADPH. Navzdory tomu, že fotorespirace snižuje kvantový výtěžek asimilačních reakcí, přestavuje významný ochranný mechanismus, kterým se rostliny chrání před fotoinhibičním poškozením. Zvýšená koncentrace CO_2 v ovzduší zvyšuje poměr koncentrací CO_2 a O_2 v rostlině a tím i pravděpodobnost navázání molekuly CO_2 na aktivní místo enzymu Rubisco. Potlačení oxygenázové aktivity enzymu Rubisco vede ke snížení fotorespirace a následnému zvýšení dostupnosti ATP a NADPH, které stimulují fotosyntetické procesy a zajišťují transport vlastních produktů fotosyntézy [3].

2.5 Vliv zvýšené koncentrace CO_2 na respiraci

Podle některých studií způsobuje kultivace rostlin při dvojnásobné koncentraci oxidu uhličitého (700 $\mu mol.mol^{-1}$) potlačení mitochondriální respirace v průměru o 15–20 % [18]. U některých druhů obilovin byl naopak zaznamenán až 20% nárůst respirace [3]. Předpokládá se, že inhibici respiračních procesů zvýšenou koncentrací CO_2, způsobuje snížení aktivity cytochrom c-oxidasy, tj. redukce přenosu elektronů v dýchacím řetězci, nebo snížení aktivity enzymů na úrovni citrátového cyklu.

Rozdílnou reakci dýchání na zvýšenou koncentraci CO_2 mohou způsobovat změny obsahu nestrukturních sacharidů, rychlosti růstu a struktury rostlinné biomasy, změny ve složení biomasy, změny v přímé chemické interakci mezi CO_2 a enzymy dýchacího řetězce a změny v přímé chemické vazbě CO_2 na různé buněčné komponenty, změny v míře temnotní fixace CO_2 a v míře biosyntézy ethylenu.

2.6 Vliv zvýšené koncentrace CO_2 na vodivost průduchů

Zvýšená koncentrace CO_2 vyvolává u většiny rostlin přivření průduchů. Tento jev zřejmě souvisí se zvýšením koncentrace CO_2 v intercelulárách. Snížení vodivosti průduchů má za následek pokles rychlosti transpirace. Mechanismus tohoto děje zatím nebyl uspokojivě popsán. Jednou z možností je, že zvýšená koncentrace CO_2 vede ke zvýšené akumulaci sacharosy v buněčných stěnách svěracích buněk, což se projeví pomalejším otevíráním

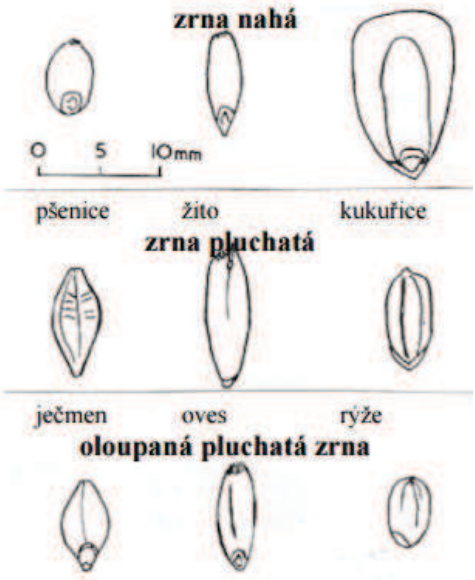
průduchů. Drake a kol. [19] provedli 41 pokusů s 28 druhy rostlin. Z výsledků vyvodili, že průměrné snížení vodivosti průduchu při dvojnásobné koncentraci CO_2 je 20 %.

Zatím nebylo prokázáno, že by docházelo k aklimaci vodivosti průduchů během dlouhodobé kultivace rostlin při zvýšené koncentraci CO_2 [11]. V důsledku aklimace na zvýšenou koncentraci CO_2 pravděpodobně dochází k poklesu frekvence průduchů na listech rostlin. Analýzou rostlin z herbářů bylo zjištěno, že frekvence průduchů v polovině 18. století byla o 21 % vyšší, než v současné době [20].

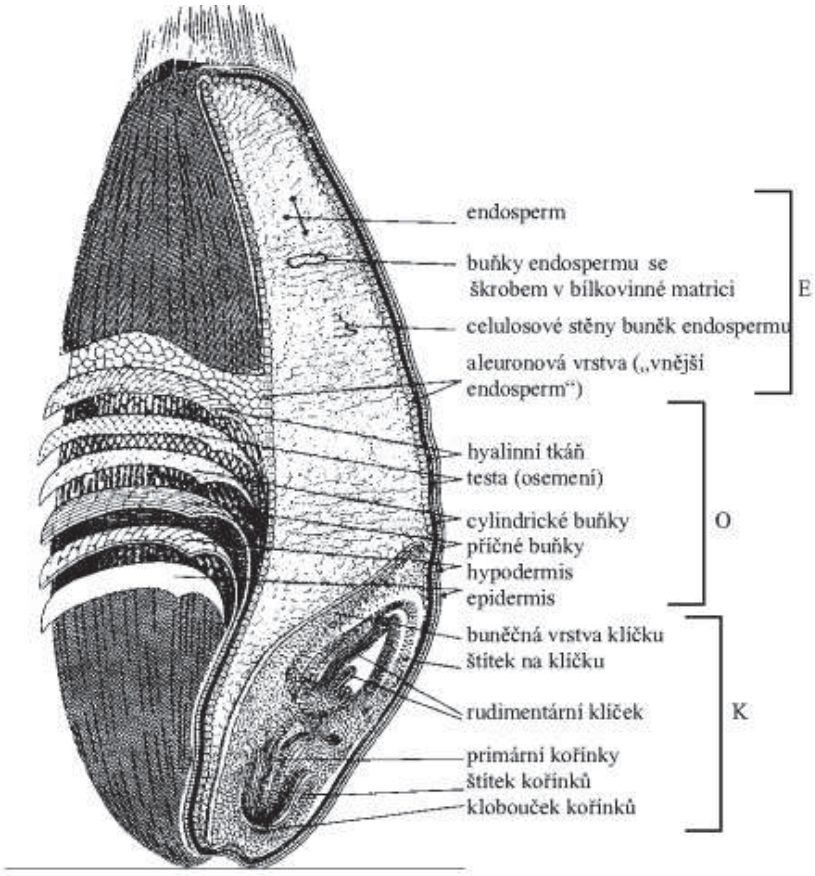
2.7 Stavba a složení pšeničného zrna

Pšenice patří mezi jednu z nejdůležitějších plodin zajišťujících výživu lidstva. Z jejích zralých zrn se získává mouka, která slouží převážně k výrobě chleba a jiných produktů. V roce 2013 činila celosvětová produkce pšenice 713 milionů tun [21].

Pšeničné zrno je obilka s více vnějšími vrstvami tvořenými z tkání různého původu a složení. Pšenice má zrna nahá, což znamená, že při mlácení zrn vypadává samotné zrno z obalů, které na jiných zrnech tvoří přirostlé pluchy (obr. 1) [22]. Skladba pšeničného zrna je znázorněna na obrázku 2.



Obr. 1 Tvary a přibližné rozměry zrna nejdůležitějších obilovin [22]

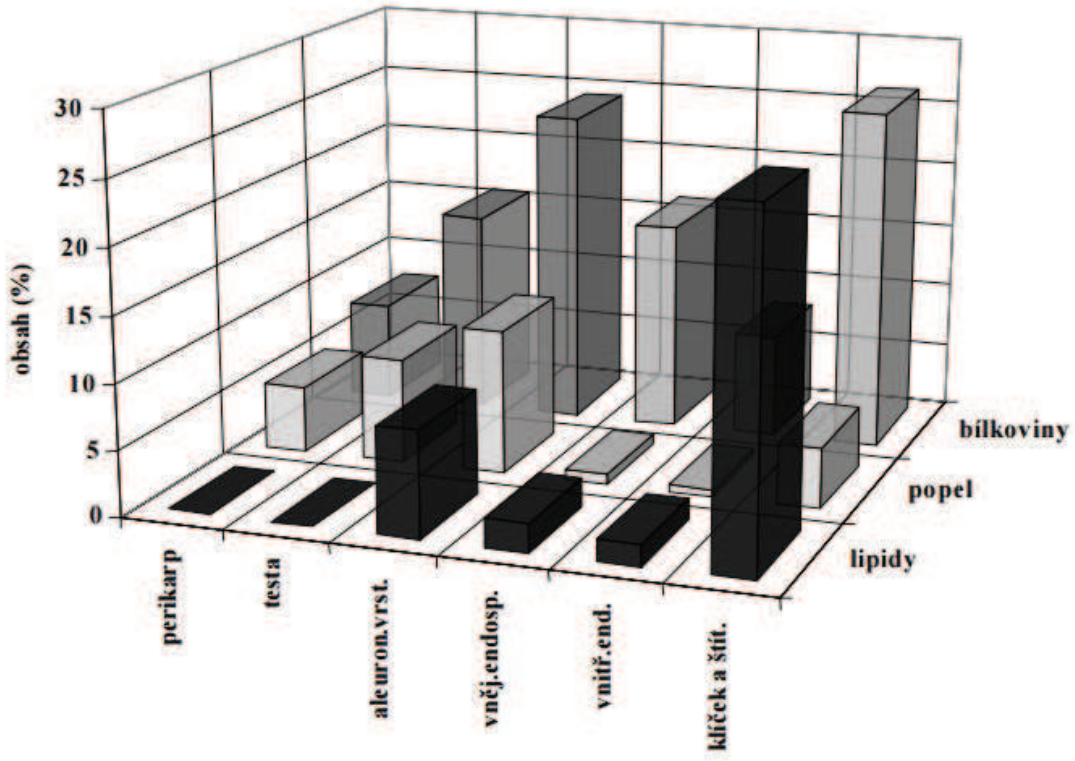


Obr. 2 Podélný řez pšeničným zrnem se znázorněním jeho morfologických vrstev. Vrstva přecházející při mletí do otrub označena O, do mouky označena E, odstraňované s klíčkem K [22]

Zralé vnější vrstvy pšeničného zrna, takzvané oplodí, jsou suché, bohaté na vlákninu, minerály a fenolické sloučeniny [22, 23]. Chrání zrno před mechanickým poškozením, krátkodobými účinky vody a škodlivých látek. Pod oplodím se nachází osemení, které obsahuje ve svých buňkách barviva určující výsledný barevný vzhled zrna. Po osemení následují vrstvy obsahující polysacharidické látky schopné bobtnat a vázat vodu, které napomáhají udržovat rovnováhu vlkosti zrna. Všechny tyto vrstvy se při mletí zrna stávají součástí otrub a na obr. 2 jsou označeny jako O.

Uvnitř vnějších vrstev se nachází klíček (na obr. 2 označen jako K) a hlavní zásobní tkáň nazývaná endosperm (na obr. 2 označena jako E) [23, 22]. Klíček s vysokým obsahem bílkovin, lipidů a minerálů je před mlýnským zpracováním vždy předem odstraněn tzv. boušením, neboť velmi rychle podléhá oxidačním a enzymovým reakcím a zhoršoval by senzorickou kvalitu výrobků [22]. Sušina endospermu je tvořena ze 75 % škrobem, 10–11 % tvoří proteiny a 3–4 % vláknina [23]. Endosperm obsahuje pouze malé množství vitamínů a minerálů, výjimkou je pouze vnější vrstva endospermu, takzvaná aleuronová vrstva, která je bohatá na bílkoviny, vitamíny, minerály a vlákninu, avšak ta se při mletí stává součástí otrub a pouze 10 % z ní je obsaženo v bílé mouce používané pro pečení chleba [23].

Zastoupení hlavních chemických složek v jednotlivých částech zrna se značně různí, jak ukazuje sloupcový diagram na obr. 3, zpracovaný ze statistik FAO OSN [22]. Obsah bílkovin je třeba brát pouze za přibližný a průměrný, protože je silně ovlivňován odrůdou a vnějšími podmínkami v průběhu pěstování.



Obr. 3 Obsah hrubých bílkovin, lipidů a minerálních látek (vyjádřeno jako popel po spálení) v částech pšeničného zrna na 14% vlhkost [22]

2.8 Technologická jakost pšenice

Technologická jakost pšenice závisí nejen na odrůdě, ale i působení vnějších podmínek v průběhu vegetace, sklizně a sladování. Základními parametry pro stanovení pekařské jakosti pšenice jsou objemová hmotnost, vaznost mouky, Zelenyho test, obsah dusíkatých látek v sušině, objem pečiva a číslo poklesu [24, 25]. Mezi doplňkové parametry patří tvrdost a alveografické stanovení. [24]

Podle způsobu dalšího využití dělíme odrůdy pšenice na základě vybraných technologických parametrů na [25]:

- pšenice pro pekárenské zpracování, vhodné pro výrobu kynutých těst
- pšenice pečivárenské vhodné pro výrobu keksů a sušenek
- pšenice pro speciální použití (výroba škrobu a lihu)
- pšenice krmné.

Kategorie pšenice pro pekárenské zpracování je dále rozdělena do následujících skupin podle tab. 1 [25, 26]:

- elitní pšenice E, dříve označované jako velmi dobré, zlepšující
- kvalitní pšenice A, dříve označovaná jako dobrá, samostatně zpracovatelná
- chlebová pšenice B, dříve označovaná jako doplňková, zpracovatelná ve směsi.

Tab. 1 Minimální požadavky na zařazení odrůd do skupin jakosti [26]

Jakostní skupina	E-elitní	A-kvalitní	B-chlebová
Objemová výtěžnost (ml)	530	500	470
Obsah hrubých bílkovin (%)	12,6	11,8	11,0
Zelenyho test (ml)	49	35	21
Číslo poklesu (s)	286	226	196
Objemová hmotnost ($g.l^{-1}$)	790	780	760
Vaznost mouky (%)	55,4	53,2	52,1

Odrůdy nevyhovující svými parametry těmto třem kategoriím jsou dále rozřazeny do výše popsaných skupin pečivárenských a pro jiné účely (výrobě škrobu, krmné atd.).

2.8.1 Objemová výtěžnost

Objemová výtěžnost pečiva vyjádřená v ml pečiva na 100 g mouky se získá jako výsledek Rapid Mix Test pokusu a je rozhodujícím kritériem při zařazování pšenice do jakostních tříd E, A a B [25, 27]. Pokusné pečení probíhá za standardních podmínek při použití přesně definovaných postupů, receptur a zařízení. Těsto je intenzivně hněteno, následuje krátké odležení, strojové tvarování těsta na klonky a pečení. Nedílnou součástí pokusu je i senzorické hodnocení těsta a konečného výrobku[27].

2.8.2 Obsah hrubých bílkovin

Obsah hrubých bílkovin může být stanoven metodou blízké infračervené spektrometrie. Vzorky jsou měřeny v blízké infračervené spektrální oblasti 4000 až 10000 cm^{-1}, 1 000 až 2500 nm, s reflektanční detekcí [27]. Tato metoda s výhodou nahrazuje zdlouhavé a méně přesné stanovení obsahu mokrého lepku [25]. Vyhodnocení probíhá matematickými statistickými postupy z kalibračního modelu, který vyjadřuje míru korelace mezi výsledky získanými metodou NIR spektrometrie (near infrared spectrometry – blízká červená spektrometrie) a laboratorní referenční metodou (LRM) a pro jeho spolehlivé vytvoření je potřeba získat dostatečně obsáhlý soubor analyzovaných vzorků [27]. Před měřením je vzorek upraven mletím a homogenizací a následně je měřen v pevném stavu. Stoupající obsah hrubé bílkoviny působí pozitivně na chování těsta během pečení [25].

2.8.3 Zelenyho test

Nejen obsah bílkovin, ale především jejich viskoelastické vlastnosti ovlivňují procesy v těstě během kynutí. Tato zkouška je založena na schopnosti bílkovin bobtnat v kyselém prostředí. Je připravena suspenze ze zkoušené mouky, kyseliny mléčné a isopropanolu

s přídavkem barviva. Po přesně určené době protřepávání a klidu je stanoven objem sedimentu v ml, který charakterizuje kvalitu lepkové bílkoviny [27].

2.8.4 Číslo poklesu

Číslo poklesu charakterizuje aktivitu α-amylasy, která ovlivňuje stupeň poškození zásobních látek endospermu pšeničného zrna [25, 27]. Porostlé zrno má nízké číslo poklesu, neboť jeho endosperm může být poškozen jak činností vlastní α-amylasy endospermu tak i činností α-amylas nižších hub [25]. Nízké číslo poklesu negativně ovlivňuje pekařskou kvalitu mouky, což se projeví zeslabením pružnosti střídky pečiva, těsto bude lepivé, těžko zpracovatelné těsto a objem pečiva malý. Princip stanovení spočívá ve schopnosti vodní suspenze mouky rychle zmazovatět ve vodní lázni. Měří se ztekucení škrobu, ke kterému dochází působením α-amylasy obsažené ve vzorku. Ztekucení ovlivňuje odpor škrobového gelu proti viskozimetrickému míchadlu a je měřen čas v sekundách potřebný k poklesu míchadla o určenou vzdálenost [27].

2.8.5 Objemová hmotnost

Objemová hmotnost obilnin vyjádřená v $g.l^{-1}$ se získává z hmotnosti přesně definovaného objemu obilniny. Ke stanovení se podle normy ČSN EN ISO 7971-3 užívá ruční obilní zkoušeč o objemu 1/4 l, skládající se z násypky, plniče, odměrné nádoby, nože a běhounu [28]. Objemová hmotnost závisí na pěstitelských podmínkách, zdravotním stavu a odrůdě [25].

2.8.6 Vaznost mouky

Vaznost mouky je ovlivněna obsahem bílkovin, poškozených škrobových zrn a pentosanů [25]. Při větším poškození škrobu mouka váže větší množství vody. Vaznost charakterizuje výtěžnost a stabilitu těsta [25]. Farinograficky stanovíme vaznost vody v mouce jako množství vody přidané k mouce potřebné pro dosažení maximální konzistence těsta [27, 29]. Vyjádří se v procentech vody vztažených na hmotnost mouky [29].

2.9 Pšeničné proteiny

Koncentrace proteinů v pšeničném zrnu a jejich složení jsou hlavnímu ukazateli výživové hodnoty zrna a pekařské kvality mouky [30, 31, 32]. Pšeničné zrno obsahuje asi 10 až 13 % proteinů, které se navzájem velice liší svým složením a molekulovými hmotnostmi [33]. Na základě první frakcionace pšeničných proteinů provedené Osbornem v roce 1924 [34] za použití vody, roztoku soli a vodného roztoku 70% ethanolu dělíme pšeničné proteiny na albuminy rozpustné ve vodě, globuliny rozpustné ve zředěném roztoku soli, gliadiny rozpustné ve vodném roztoku ethanolu a v ethanolu nerozpustné gluteniny. 80 % pšeničných proteinů jsou gliadiny a gluteniny, souhrnně označované jako zásobní lepkové proteiny, zbylých 20 % tvoří albuminy a globuliny, jejichž funkce v pšeničném zrnu je převážně metabolická [35].

2.9.1 Albuminy a globuliny

Na rozdíl od gliadinů a gluteninů, albuminy a globuliny se zabývá pouze malá část studií. Během růstu a zrání pšenice hrají albunimy a globuliny důležitou metabolickou roli například jako enzymy a inhibitory enzymů regulujících vývoj rostliny [36]. Některé globuliny a vysokomolekulární albuminy mohou být disulfidickými vazbami spojeny s lepkovými proteiny a plnit tak funkci zásobních proteinů [37]. Z výživového hlediska mají tyto proteiny lepší aminokyselinové složení než gliadiny a gluteniny, protože obsahují více lysinu a methioninu, avšak často bývají původci alergie, astma, průjmu a zvracení [36, 38].

Albuminy a globuliny rovněž ovlivňují zpracování a reologické vlastnosti pšeničné mouky [39, 40]. Například pšeničná mouka nižší pekařské kvality může být vylepšena přídavkem amylasy nebo xylanasy [36]. Elasticita lepku a další kritéria pekařské kvality mouky jako například reologické vlastnosti nebo vaznost vody mohou být vylepšeny přídavkem pentosanasy [41]. Endoxylanasa se v pekařském průmyslu běžně přidává do směsí pro přípravu těsta ke zlepšení manipulace s těstem a objemu chleba [42].

2.9.2 Lepek

Při vypírání těsta vodou dochází k oddělení škrobových zrn a dalších vodorozpustných složek od lepku, elastické, ve vodě nerozpustné složky těsta. V závislosti na preciznosti vypírání je sušina lepku tvořena ze 75–85 % proteiny, 5–10 % tvoří lipidy zbytek připadá na škrob a neškrobové sacharidy [43]. Právě lepek je zodpovědný za jedinečné pekařské vlastnosti mouky, jako je soudržnost a schopnost zadržovat vodu, díky své schopnosti vytvářet během hnětení těsta viskoelastickou síť, a proto obsah proteinů v mouce úzce souvisí s objemem chleba [31, 35, 43].

Lepkové proteiny můžeme rozdělit na dvě hlavní frakce na základě jejich rozpustnosti ve vodném roztoku alkoholu (například 60% roztoku ethanolu) a to na monomerní rozpustné gliadiny a polymerní nerozpustné gluteniny [35]. Proteiny obou těchto frakcí jsou bohaté na glutamin a prolin a mají nízký obsah aminokyselin s nabitým postranním řetězcem. Gliadiny se skládají převážně z monomerních proteinů s molekulovou hmotností v rozmezí 28 000 až 55 000 a dle primární struktury je můžeme rozdělit na ω5-, ω1,2-, α-, β- a γ-gliadiny [35]. Agregované proteiny spojené disulfidickými vazbami jsou základem gluteninové frakce lepku [43]. Gluteninové podjednotky dělíme na vysoko (HMW) a nízkomolekulární (LMW) s molekulovou hmotností okolo 80 000 a 33 000 [35]. Součástí gluteninové frakce lepku je i malé množství ω-gliadinů navázaných na glutenin, které mohou být označovány jako ωb-gliadiny.

Největší podíl na složení lepku mají α- a γ- gliadiny a nízkomolekulární gluteniny, přičemž každá tato skupina proteinů tvoří asi 20–30% lepku [35]. Menší část lepku je tvořena ω5-, ω1,2- a ωb- gliadiny a vysokomolekulárními gluteniny, každá z nich tvoří přibližně 2–10% lepku [35]. Genotyp a hnojení mají významný vliv na množství a poměr lepkových proteinů v zrnu a v mouce. Podle Wiesera a Seilmeiera [44] má dusíkaté hnojení větší vliv na gliadiny než na gluteniny. Výsledky jejich studie ukazují, že při zvýšené dusíkaté výživě je množství

ω5- a ω1,2-gliadinů a vysokomolekulárních gluteninů zvýšeno, zatímco zastoupení γ-gliadinů a nízkomolekulárních gluteninů je sníženo [44].

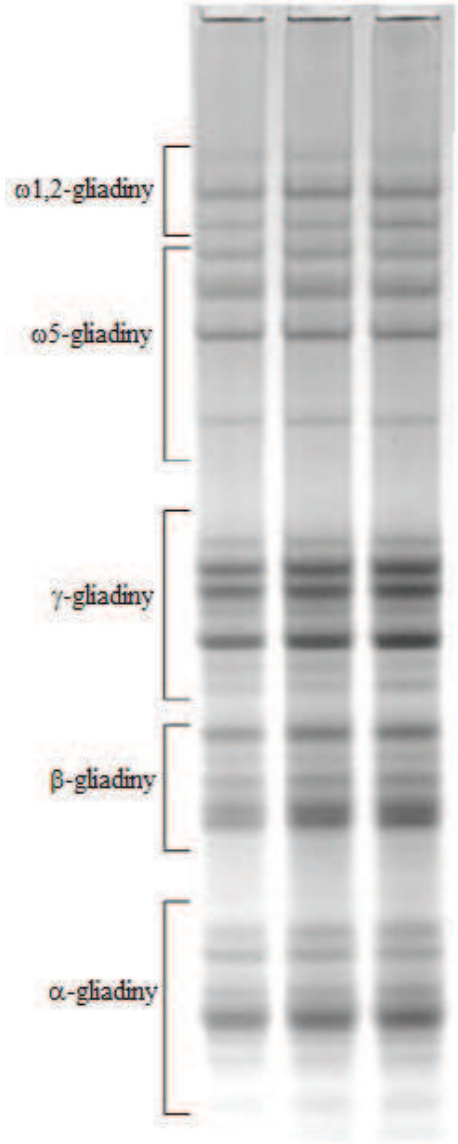
Obě frakce lepku se významně podílejí na reologických vlastnostech těsta, avšak jejich funkce jsou odlišné [43]. Hydratované gliadiny jsou důležité pro viskozitu a prodloužitelnost těsta. Jsou charakterizovány malou elasticitou a nižší soudržností v porovnání s gluteniny [43]. Hydratované gluteniny jsou kohezní a elastické. Síla těsta, elasticita a tím i objem chleba jsou významně ovlivněny největšími gluteninovými agregáty takzvanými gluteninovými makropolymery [31, 43]. Zjednodušeně řečeno lepek je vlastně dvousložkové lepidlo, v němž gliadiny slouží coby plastifikátor nebo rozpouštědlo pro gluteniny, a správný poměr obou složek určuje viskoelastické vlastnosti a pekařskou kvalitu konečného produktu [43].

Struktura a funkčnost lepkové bílkoviny je významně ovlivněna cysteinem, ačkoli jeho podíl na složení lepku je pouze asi 2 % ze všech aminokyselin [45, 46]. Jeho významný vliv na vlastnosti lepku spočívá v tom, že většina cysteinu se nachází v oxidovaném stavu a tvoří disulfidické vazby buď uvnitř řetězců proteinů, nebo mezi jednotlivými řetězci proteinů. Tyto vazby jsou hlavními účastníky redoxních reakcí probíhajících během zrání zrna, mletí, přípravy těsta a pečení [46]. Během pečení chleba se vytvářejí další kovalentní vazby [43]. Může dojít například k propojení lepkových proteinů přes vazbu tyrosin-tyrosin [47] nebo k navázání lepkových proteinů na arabinoxylany přes tyrosin a dehydroferulovou kyselinu [48].

Kromě kovalentních vazeb se na struktuře lepku a nakonec i samotného těsta podílejí i vazby nekovalentní jako například iontové vazby a slabé nevazebné interakce, ke kterým řadíme vodíkové můstky a hydrofobní interakce. Přítomnost vodíkových vazeb v lepku lze prokázat přidáním činidel štěpících tyto vazby (například močoviny) k těstu, což se projeví oslabením těsta [43]. Použitím těžké vody namísto běžné vody získáme naopak těsto silnější. Důležitost iontových vazeb v těstě můžeme demonstrovat přídavkem NaCl nebo bipolárních iontů jako například aminokyselin nebo dikarboxylových kyselin k těstu, čímž získáme těsto silnější. Hydrofobní interakce stabilizují strukturu lepku, s rostoucí teplotou dochází na rozdíl od ostatních vazeb ke zvýšení jejich energie a tím ke stabilizaci konečného produktu během pečení [43].

2.9.2.1 Gliadiny

Gliadiny se nacházejí převážně ve formě monomerů [35]. Gliadinová frakce lepku bývá obvykle dělena na základě elektroforetické mobility v polyakrylamidovém gelu (obr 4), katodicky při pH 3 na α- (nejvyšší mobilita), β-, γ- a ω-gliadiny (nejnižší mobilita) [33, 49]. Díky moderním metodám jako je dvou dimenzionální elektroforéza nebo vysokoúčinná chromatografie na reverzní fázi lze gliadinovou grakci rozdělit na více než sto komponent. Na základě analýzy sekvencí aminokyselin, aminokyselinového složení a molekulové hmotnosti lze gliadiny rozdělit na čtyři odlišné skupiny ω5-,ω1,2-, α/β- a γ-gliadiny [50].



Obr. 4 A-PAGE gliadinových frakcí [51]

ω-Gliadiny se z 80 % skládají z glutaminu, prolinu a fenylalaninu. Molekulová hmotnost ω5-gliadinů se pohybuje okolo 50 000, ω1,2-gliadinů okolo 40 000 [43]. Frakce ω-gliadinů obvykle neobsahuje žádný cystein, a proto se zde netvoří disulfidické můstky. Molekulové hmotnosti α/β- gliadinů a γ-gliadinů se pohybují v rozmezí 28 000–35 000 a obsahují méně prolinu a glutaminu než ω-gliadiny [43]. Tyto frakce se vzájemně liší především aninokyselinovým složením, například obsahem tyrosinu. Na C konci řetězce se u α/β-gliadinů nachází šest cysteinů umožňujících vytvořit tři disulfidické můstky uvnitř řetězce a u γ-gliadinů osm cysteinů, které se podílejí na tvorbě čtyř disulfidických můstků [45].

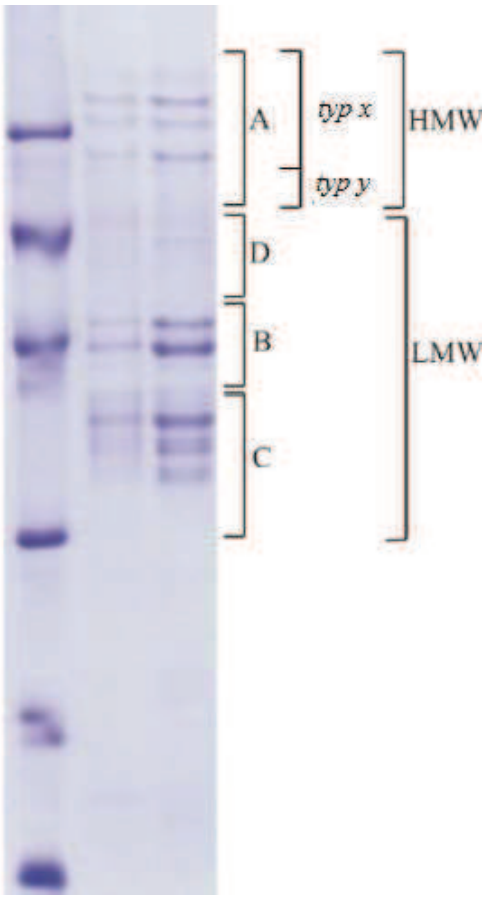
Skupina α/β-gliadinů a γ-gliadinů tvoří hlavní část gliadinové frakce, ω-gliadiny nacházíme obvykle v menším množství. Celková distribuce jednotlivých skupin gliadinů je závislá na kultivaru pšenice a navíc je ovlivněna podmínkami kultivace, jako jsou například půda, klima nebo hnojení [52].

Zvláštní skupinou gliadinů jsou takzvané oligomerní gliadiny, nazývané též jako vysokomolekulární gliadiny, agregované gliadiny nebo gluteniny rozpustné v ethanolu [53, 54]. Obsahují různé množství cysteinu a disulfidickými můstky jsou spojeny dohromady nebo jsou navázány na gluteniny. Můžeme je nalézt jako součást gliadinového extraktu rozpustného v alkoholu i jako součást v alkoholu nerozpustné gluteninové frakce. Tvoří je α/β-, γ-gliadiny a nízkomolekulární podjenotky gluteninů spojené disulfidickými vazbami a jejich molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 100 000–500 000 [43].

2.9.2.2 Gluteniny

Pšeničné gluteniny, které patří k největším proteinům nacházejícím se v přírodě, tvoří agregované proteiny spojené disulfidickými můstky, jejichž molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 500 000 až 10 milionů [33, 43]. Distribuce molekulových hmotností gluteninů v lepku je jedním z hlavních ukazatelů pekařské kvality mouky. Gluteninové makropolymery formují vlastnosti těsta a jejich množství v mouce (20–40 mg/g) má vliv na sílu těsta a objem chleba [43].

Po redukci disulfidických vazeb získáme gluteninové podjednotky připomínající rozpustností ve vodném roztoku alkoholu gliadiny [43]. Hlavní složkou gluteninové frakce lepku jsou nízkomolekulární gluteninové podjednotky (LMW), podílející se na celkovém složení lepku asi 20 % [52]. Svým aminokyselinovým složením a molekulovou hmotností se podobají α/β- a γ-gliadinům a obsahují 8 cysteinů, podílejících se na disulfidických můstcích uvnitř řetězce nebo spojujících nízkomolekulární gluteninové podjednotky s jinými proteiny lepkového komplexu [43, 45, 46]. Menší část gluteninu tvoří vysokomolekulární gluteninové podjednotky (HMW), které přispívají k celkovému lepku asi 10 %. Každá odrůda pšenice má tři až pět vysokomolekulárních gluteninových podjednotek, které dělíme do dvou typů x (M_r 83 000–88 000) a y (M_r 67 000–74 000) [43]. Názvosloví vysokomolekulárních gluteninů je založeno na kódující části genomu (A, B, C, D), typu (x, y) a mobilitě při gelové elektroforéze v polyakrylamidovém gelu za použití dodecylsulfátu sodného (obr. 5) [43]. Řetězce vysokomolekulárních gluteninových podjednotek jsou spojeny disulfidickými můstky, takže se v mouce ani těstě nevyskytují jako monomery. Typ x má čtyři cysteiny, dva se podílejí na disulfidických vazbách uvnitř a dva na disulfidických vazbách mezi řetězci [43, 55]. Výjimku tvoří podjednotka Dx5, která má pět cysteinů. Pátý cystein tvoří disulfidickou vazbu mezi řetězci [43]. Typ y má celkem 7 cysteinů. Podle Wiesera a Kieffera [52] ovlivňuje vlastnosti těsta typ x výrazněji než typ y. Zvláště důležitá pro vlastnosti těsta a objem chleba je podjednotka Dx5, která má cystein navíc, a podjednotka Bx7, která se vyskytuje v největším množství [56].



Obr 5. SDS-PAGE gluteninových podjednotek [57]

2.10 Vliv zvýšené koncentrace CO_2 na pšeničné proteiny

V dřívějších letech bylo díky ročním i víceletým experimentům s použitím systému FACE (Free Air CO_2 Enrichment, volně přeloženo obohacení volného vzduchu oxidem uhličitým) prokázáno, že u C3 rostlin, mezi které patří i pšenice, má zvýšená koncentrace CO_2 při dostatku vody a živin za následek zvýšení produkce nadzemní biomasy [58, 59]. Přestože jsou výsledky jednotlivých pokusů někdy protichůdné, zvýšení koncentrace CO_2 na 550–600 $\mu mol.l^{-1}$ způsobuje zvýšení výnosu zrna v průměru o 10–16 % [60, 61].

Doposud bylo publikováno pouze málo prací zabývajících se dopady zvýšené koncentrace CO_2 na chemické parametry kvality zrna a tyto práce přinášejí často protichůdná zjištění. Některé experimenty prováděné v polních podmínkách dokazují, že jisté kvalitativní znaky zrna nejsou ovlivněny zvýšenou koncentrací CO_2, zatímco další experimenty přinášejí důkazy o výrazném vlivu zvýšené koncentrace CO_2 na tyto znaky. Nejnovější studie uvádějí, že zvýšená koncentrace CO_2 má především za následek snížení obsahu dusíkatých sloučenin v zrnu [35; 59, 62]. Přestože negativní spojitost mezi výnosem zrna a sníženou koncentrací dusíku je dobře známá [63, 64], zvýšená koncentrace CO_2 navíc zvyšuje účinnost využívání zdrojů vody a dusíku, což má za následek změny v chemickém složení vegetativních částí rostlin [65; 66, 67]. Jelikož obsah zrna je z velké části závislý na remobilizaci a dodávkách asimilátů jako například sacharosy a aminokyselin a jejich metabolické regulaci, předpokládá

se, že zásobní metabolismus zrna a tedy i klíčové znaky kvality zrna budou ovlivněny zvýšenou koncentrací CO_2.

Pšeničné zrno je významným zdrojem sacharidů, proteinů, aminokyselin, lipidů a minerálních látek, což ovlivňuje nutriční hodnotu stravy a vlastnosti konečných výrobků. Zvláště celková koncentrace bílkovin je důležitým ekonomickým faktorem, protože se jedná o základní ukazatel kvality chleba. Nejvýznamnějším zjištěním předchozích studií je pokles celkové koncentrace bílkovin v zrnu o 3,5–14,3 % vyvolaný zvýšenou koncentrací CO_2, který je navíc doprovázen změnou složení proteinů [35, 68]. Při dalších experimentech byl pozorován pokles proteinů lepku, buď z důvodu poklesu pouze gliadinů [59, 68] nebo z důvodu poklesu jak frakce gliadinů tak i gluteninů [35], což může mít vliv na vlastnosti důležité pro výrobu kvalitního chleba. Při těchto studiích byl také zaznamenán pokles celkové koncentrace proteinogenních aminokyselin [62].

V pokusech s použitím systému FACE buď nebyla koncentrace škrobu, hlavního zásobního polysacharidu pšeničných zrn, zvýšenou koncentrací CO_2 vůbec ovlivněna, nebo byla pouze zvýšena. Přestože neškrobové polysacharidy tvoří méně než 3 % celkové hmotnosti mouky, hrají důležitou roli při výrobě chleba tím, že přispívají k distribuci vody v těstě a slouží jako živná půda pro kvasinky při kynutí těsta [68]. V experimentech s použitím systému FACE bylo zaznamenáno zvýšení koncentrace fruktosy a fruktanů [59].

Lipidy přispívají pouze 1–1,5 % k celkové hmotnosti pšeničného zrna, mají však také vliv na pečení. Jejich koncentrace nebyla při zvýšené koncentraci CO_2 zvýšena, pouze se zvýšilo jejich množství sklizené na jednotku plochy [59]. Při tomto experimentu bylo rovněž zaznamenáno zvýšené množství minerálních látek jako draslíku, molybdenu a olova, zatímco množství hořčíku, železa, kadmia a křemíku bylo nižší. Tyto údaje naznačují, že zvýšená koncentrace CO_2 může mít vliv na nutriční hodnotu pšeničných zrn a kvalitu výrobků z nich [59]. Při dalších pokusech byl zaznamenán pokles koncentrace síry [70], zatímco koncentrace jednotlivých makro- a mikroprvků zůstaly v jiné studii nezměněny [68].

2.11 Metody stanovení lepkových proteinů

Zásobní proteiny pšenice představují komplexní směs polymorfních proteinů sdílejících stejné biochemické vlastnosti, což ztěžuje jejich izolaci a purifikaci [71]. Pro stanovení obsahu lepkových proteinů je užívána celá řada elektroforetických, chromatografických a imunochemických metod, přičemž právě metody imunochemické se v posledních letech dostávají do popředí zájmu a jsou v potravinářské chemii široce využívány ke kontrole „bezlepkových potravin“ [72].

2.11.1 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

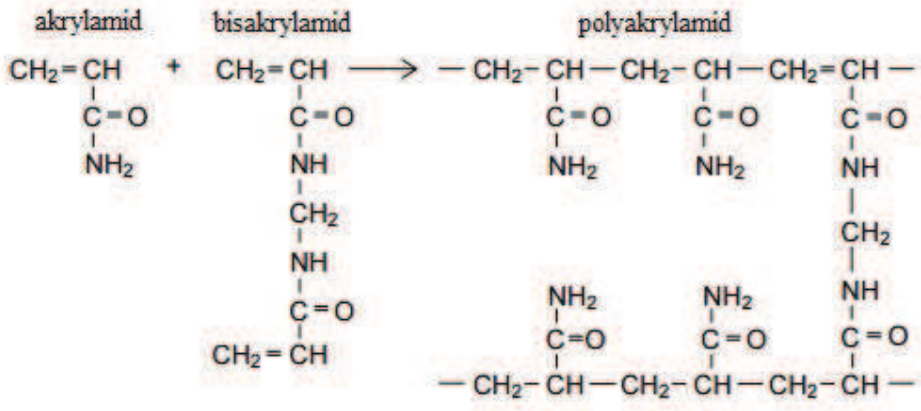
K často užívaným metodám analýzy pšeničných proteinů patří elektroforetické techniky, využívající schopnosti nabitých molekul migrovat gelovou matricí při aplikaci stejnosměrného elektrického pole [74, 75].

Proteiny jsou amfolyty, protože ve svých molekulách obsahují jak kyselé, tak i bazické skupiny, a mohou být analyzovány jako anionty, nebo kationty v závislosti na použitém pufru

[76]. Pokud se nachází v médiu s pH vyšším, než je jejich izolektrický bod, nesou kladný náboj a pohybují se směrem ke katodě, v prostředí s pH nižším než jejich izoelektrický bod, je celkový náboj proteinů záporný a migrace probíhá směrem k anodě [75]. V izoelektrickém bodě se počet kladných nábojů na molekule rovná počtu záporných nábojů, molekula proteinu se chová elektroneutrálně a nepohybuje se v elektrickém poli [75, 77].

Rychlost pohybu proteinů v elektrickém poli je dána poměrem mezi nábojem a hmotností. Čím vyšší je množství náboje na jednotku hmotnosti, tím rychleji se bude protein v elektrickém poli pohybovat [75]. Elektroforetické techniky lze použít k dělení proteinů podle náboje, molekulové hmotnosti nebo izoelektrického bodu [77].

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu je široce využívána k separaci proteinů, protože je levná, rychlá a schopná pracovat i s mikrogramovým množstvím proteinů [75]. Polyakrylamidový gel je mechanicky pevný, transparentní a chemicky inertní [76]. Získáme jej polymerací akrylamidu s použitím N',N'-methylenbisakrylamidu jako zesíťovacího činidla [76]. Polymerace probíhá ve vodném prostředí, radikálovým mechanismem s použitím katalyzátoru [76]. Jako iniciátor poskytující volné radikály slouží peroxodisíranový anion ($S_2O_7^{2-}$) ve formě peroxodisíranu amonného. TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin) katalyzuje polymeraci tím, že stabilizuje volné radikály [75].



Obr 6. Polymerace akrylamidu [78]

Poměr akrylamidu a bisakrylamidu a jejich konečná koncentrace určuje velikost pórů a tuhost konečného gelu, a to tak, že velikost pórů je nepřímo úměrná koncentraci akrylamidu [75]. Koncentrace používaných gelů se pohybuje mezi 8–12 % akrylamidu [76]. Pro separaci větších proteinů volíme gely s nižší koncentrací akrylamidu, koncentrovanější gely slouží k rozdělení menších proteinů. Speciálně připravené gradientové gely s nižší koncentrací akrylamidu na začátku a vyšší koncentrací akrylamidu na konci umožňují separaci širšího rozmezí molekulových hmotností [75].

2.11.1.1 A-PAGE

Pro separaci gliadinů je z elektroforetických technik nejčastěji užívána elektroforéza v kyselém prostředí neboli A-PAGE (acid polyacrylamide gel electrophoresis) [74, 79]. K separaci proteinů dochází bez přítomnosti denaturačního činidla na základě náboje, velikosti a tvaru [80]. Významnou roli při separaci za nativních podmínek hraje také sekundární a terciární struktura proteinů [76]. Náboj proteinů při konkrétním pH je roven součtu nábojů převládajících na postranních skupinách aminokyselinových zbytků. Při nativní elektroforéze je pH systému obvykle 3, protože všechny proteiny mají při tomto pH celkový kladný náboj a putují ke katodě [81]. Kyselý pufr pro separaci gliadinů obsahuje kyselinu octovou a glycin [76]. A-PAGE je velice citlivá technika a umožňuje i separaci proteinů o stejné molekulové hmotnosti při rozdílném náboji [82]. Protože pKa pufru i analytů závisí na teplotě, je důležitým faktorem teplota gelu [76]. Tato metoda je často užívána pro tzv. „fingerprinting“ kultivarů [83, 84]. Modifikací A-PAGE pomocí močoviny, která podpoří rozpustnost, lze úspěšně separovat i gluteniny [85].

2.11.1.2 SDS-PAGE

SDS-PAGE byla poprvé užita k separaci proteinů pšenice Bietzem a Wallem [86]. Tato metoda je vhodná především k rozdělení vysokomolekulárních gluteninových podjednotek [87]. Proteiny jsou denaturovány přídavkem detergentu dodecylsulfátu sodného (SDS). SDS působí jako redukční činidlo, štěpí disulfidické vazby, čímž dochází k rozdělení proteinů na jednotlivé podjednotky [75]. Proteinům je pomocí tohoto činidla udělen jednotný záporný náboj, dochází k porušení terciární struktury a jejich řetězce jsou nataženy [86]. Následně dochází k separaci výlučně na základě délky polypeptidového řetězce, která je přímo úměrná molekulové hmotnosti [75, 76]. Kromě SDS obsahuje separační pufr také Tris-glycin [76]. Časté je i využití gradientových gelů [83, 84, 88]. Nevýhodou této techniky je potřeba barvení k vizualizaci bendů, obtížná kvantifikace a nutnost použití akrylamidu coby potenciálního neurotoxinu [88].

2.11.1.3 Izoelektrická fokusace

Principem této techniky je pohyb molekul v gelu s gradientem pH [76]. Amfoterní molekuly proteinů jsou separovány v prostředí zvoleném tak, že oblast anody je kyselá a oblast katody alkalická a mezi nimi je gradient pH, ve kterém dojde k rozdělení na základě izoelektrického bodu molekul [75]. Molekuly proteinů nesou celkový kladný nebo záporný náboj v závislosti na jejich pozici v gradientu pH a pohybují se směrem k opačně nabité elektrodě [76]. Ve chvíli, kdy protein dosáhne pH svého izoelektrického bodu, je jeho celkový

náboj nulový a migrace se zastaví [75]. Touto metodou lze získat velmi ostré zóny, avšak je nutné dodržet přesně definovanou teplotu, protože izoelektrický bod proteinů závisí právě na teplotě [76]. Dalším úskalím této techniky je zachování rozpustnosti proteinů po celou dobu separace [88]. Tento problém se řeší právě přídavkem močoviny, která zvyšuje rozpustnost, nebo pomocí vodných roztoků alkoholů [83, 89].

2.11.1.4 2-D elektroforéza

2-D elektroforéza je založena na separaci směsi proteinů na základě dvou molekulových vlastností, každé v jedné dimenzi [75]. Jako první dimenze bývá obvykle volena izoelektrická fokusace a po rozdělení na základě izoelektrického bodu následuje druhá dimenze, kde dojde k rozdělení podle molekulové hmotnosti pomocí SDS-PAGE [90]. Kromě této tradiční metody nyní známe i nové kombinace různých typů gelů jako například A-PAGE-SDS-PAGE 2-D separaci nebo 2-D nativní PAGE při kyselém a alkalickém pH za použití dimethylsulfoxidu pro zvýšení rozpustnosti proteinů za bazických podmínek. [79, 85, 88].

2.11.2 Chromatografické metody

Pomocí moderních HPLC přístrojů lze analyzovat prakticky jakékoli sloučeniny. Chromatografické techniky se využívají především pro přečištění proteinů. Nejvíce využívanými metodami jsou gelová permeační HPLC, HPLC na reverzní fázi (RP-HPLC) a HPLC na iontoměničích [72]. RP-HPLC lze využít také pro identifikaci kultivarů a určení pekařské jakosti pšenice [91].

2.11.3 Hmotnostní spektrometrie

Pro analýzu proteinů se nejčastěji využívá MALDI-TOF MS [77]. Bílkoviny jsou ionizovány dusíkovým laserem za asistence nízkomolekulární matrice, která zabraňuje rozpadnutí makromolekul [72]. MALDI-MS nachází uplatnění zejména pro „fingerprinting“ proteinů různých vzorků potravin [76].

Hmotnostní spektrometrie bývá obvykle spojována s chromatografickými metodami. Pro určení molekulové hmotnosti proteinů se využívá například tandem LC-ESI-MS s využitím TOF analyzátoru [76].

2.11.4 ELISA

Moderní metodou, kterou lze využít pro stanovení pšeničných gliadinů, je enzymová imunoanalýza na pevné fázi (ELISA). Jejím principem je nekovalentní interakce specifické protilátky s antigenem [92]. Nejvíce používaným uspořádáním je tzv. sendvičové uspořádání, spočívající v postupném vytvoření zakotvených komplexů protilátka-antigen-enzymově značená protilátka [72]. Pro antigeny, jejichž prostorové uspořádání brání vytvoření sendvičového komplexu lze využít kompetitivní imunochemické stanovení, při kterém dochází k soutěžení značené látky a analytu o vazebná místa omezeného množství molekul protilátek [92].

Pro metody ELISA lze využít jak protilátek polyklonálních, jejichž výhodou je nižší cena a jednoduchá příprava, tak i protilátek monoklonálních, které vynikají specifitou a možností

kvantifikace pšeničných gliadinů i v nízkých koncentracích. Významné modifikace metody ELISA využívající polyklonální protilátky jsou například kompetitivní radioimunoanalýza pro stanovení pšeničných α-gliadinů popsaná Ciclitirem a kol. [93] nebo sendvičová metoda využívající dvě protilátky sestavená Tonconem a kol. [94]. Významným pokrokem v detekci gliadinu bylo využití monoklonální protilátky R5 v komerčních ELISA kitech. Výhodou této metody oproti starší, avšak široce využívané metodě zaměřující se na ω-gliadiny, nejvíce tepelně odolnou frakci lepku, je, že se zaměřuje přímo na ty složky lepku, které jsou zodpovědné za alergenní účinky lepku [73].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

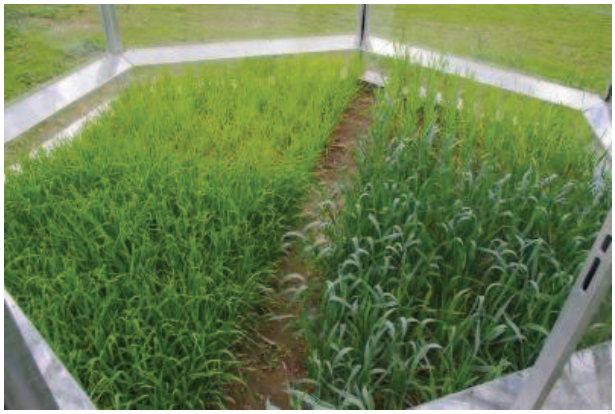
3.1 Materiál

Experiment byl založen na experimentální stanici Centra výzkumu globální změny AV ČR v.v.i. v Domanínku u Bystřice nad Pernštejnem v Českomoravské vrchovině (49°521'N, 16°235'E, nadmořská výška 575 m). Půdní typ je modální kambisol s geologickým podložím zvětralá rula v hloubce 60–90 cm. Půdní druh je hlinito-písčitá půda s podílem písčité frakce 45–60 % a obsahem jílnatých částic do 16 %. Půdní kyselost pH_{KCl} se na dané lokalitě pohybuje v rozmezí 4–5. Tato oblast je charakteristická jako srážkově bohatá s průměrným ročním úhrnem srážek 610 mm a průměrnou teplotou 7,2 °C. Experiment probíhal ve 24 komorách umožňujících automatickou fumigaci zvýšenou koncentrací CO_2, manipulaci srážek a vyloučení UV radiace u poloviny komor (obr. 7). Komory mají šestiúhelníkový tvar s opsanou kružnicí o průměru 4 m se základní výškou 2 m, na které je postavena sedlová lamelová stříška. Komory jsou vyrobeny ze dvou typů transparentních akrylátů a z toho jeden je propustný pro UV-A a UV-B záření a druhý nepropouští UV-B záření a pouze částečně propouští UV-A. Vzduch se zvýšenou koncentrací CO_2 je do komor vháněn pomocí ventilačního systému po obvodu celé komory. Manipulace srážek probíhá na základě uzavírání a otevírání otočných lamel, které jsou řízeny na základě signálu ze srážkoměru.

Obr. 7 Kultivační komory na experimentální stanici v Domanínku u Bystřice nad Pernštejnem [95]

Ozimá pšenice odrůdy Bohemia (s potravinářskou kvalitou A) byla vyseta 10 října 2012 v hustotě 4 MKS na ha (miliony klíčivých semen). Fumigace zvýšenou koncentrací CO_2 (EC; 700 $\mu mol.mol^{-1}$) byla zahájena u poloviny komor v růstové fázi poloviny sloupkování (polovina května), v druhé polovině komor byla ponechána normální koncentrace CO_2 (AC; 400 $\mu mol.mol^{-1}$). Parcelky uvnitř komor byly rozděleny na dvě menší části (obr. 8), z nichž jedna byla hnojena dávkou dusíku 200 kg N ha^{-1} (ledek vápenatý) v růstové fázi konec odnožování. Druhá parcelka zůstala bez hnojení dusíkem. Každá kombinace faktorů byla založena ve třech opakováních představujících samostatné komory. Sklizeň zrna byla

provedena ručně s následným výmlatem pomocí přesné maloparcelní sklízecí mlátičky (Wintersteiger).



Obr. 8 Parcelky uvnitř kultivačních komor rozděleny na část hnojenou a nehnojenou [95]

3.2 Stanovení obsahu gliadinů metodou A-PAGE

Stanovení bylo provedeno podle metody Polišenské et al. [96] a ČSN 46 1085-2.

3.2.1 Přístroje

Analytické váhy HR-120-EC, firma A&D INSTRUMENTS LTD
Centrifuga 5430 R, firma EPPENDORF
Vortex – stuart, firma MERCI
Chladnička s mrazicí částí, firma GORENJE
Aparatura pro vertikální elektroforézu s možností chlazení – Owl Seperation Systems, Inc., Portsmouth, NH USA
Zdroj – Major Science MP-500P
Třepačka LT2, firma KAVALIER

3.2.2 Chemikálie

Akrylamid (SIGMA ALDRICH)
Bis-akrylamid (SIGMA ALDRICH)
Močovina (LACHEMA)
Kyselina askorbová (LACH-NER)
Síran železnatý heptahydrát (LACHEMA)
Peroxodisíran amonný (SIGMA ALDRICH)
TEMED – N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (SIGMA ALDRICH)
2-chlorethanol (SIGMA ALDRICH)
Pyronin G (SIGMA ALDRICH)
Kyselina octová – ledová (SIGMA ALDRICH)
Glycin (SIGMA ALDRICH)
Kyselina trichloroctová (SIGMA ALDRICH)
Coomassie Brilliant Blue R-250 (SIGMA ALDRICH)
Coomassie Brilliant Blue G-250 (SERVA)

3.2.3 Příprava roztoků

0,15% vodný roztok síranu železnatého: 0,014 g heptahydrátu síranu železnatého bylo rozpuštěno v 5,0 ml destilované vody. Roztok byl připraven vždy čerstvý před každým použitím.

10% vodný roztok peroxodisíranu amonného: 0,1 g peroxodisíranu amonného bylo rozpuštěno v 1,0 ml destilované vody. Roztok byl připraven vždy čerstvý těsně před každým použitím.

Extrakční roztok pro gliadiny: 25 ml 2-chlorethanolu a 0,05 g pyroninu G bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky na 100 ml a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Roztok byl uchováván při teplotě 4 °C.

Elektrodový tlumivý roztok: 4,0 ml ledové kyseliny octové a 0,4 g glycinu byly kvantitativně převedeny do odměrné baňky na 1 000 ml a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Roztok byl uchováván při teplotě 4 °C. Elektrodový tlumivý roztok nelze používat pro elektroforézu opakovaně.

Gelový tlumivý roztok: K 20 ml ledové kyseliny octové a 1,00 g glycinu bylo přidáno 1 000 ml destilované vody. Roztok byl uchováván při teplotě 4 °C.

Fixační roztok: 100 g kyseliny trichloroctové bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky na 1 000 ml a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Roztok byl uchováván při teplotě 20 °C.

Barvicí roztok: 0,50 g Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,50 g Coomassie Brilliant Blue G-250 bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky na 100 ml a baňka byla doplněna ethanolem po rysku. Roztok byl uchováván při teplotě 20 °C.

3.2.4 Příprava polyakrylamidového gelu

Do cca 60 ml gelového tlumivého roztoku bylo v následujícím pořadí přidáno 10,00 g akrylamidu, 0,40 g bisakrylamidu, 6,00 g močoviny, 0,10 g kyseliny askorbové a 3,4 ml roztoku síranu železnatého. Směs byla promíchána a doplněna do objemu 100 ml gelovým tlumivým roztokem. Poté byla směs temperována v mrazicí části chladničky na teplotu cca 6 °C. Do vychlazeného roztoku bylo současně přidáno 0,2 ml roztoku peroxodisíranu amonného a 0,3 ml TEMED. Tímto roztokem byla ihned naplněna až po okraj gelová kazeta, předem vychlazena také na teplotu 6 °C. Do horní části kazety byl umístěn hřeben, sloužící pro vytvoření prohlubní pro dávkování vzorku. Polymerace by měla proběhnout během 5 minut. Gel je možné použít cca po 60 minutách od zpolymerování gelu v kazetě nebo je možné jej uchovat do druhého dne v chladničce.

3.2.5 Příprava vzorku

Pro extrakci gliadinů bylo do mikrozkumavky Eppendorf o objemu 1,5 ml naváženo cca 50 mg pšeničné mouky, což zhruba odpovídá hmotnosti jednoho zrna. K navážce bylo přidáno 0,3 ml extrakčního roztoku pro gliadiny. Obsah byl důkladně promíchán na vortexu a v uzavřené mikrozkumavce byl ponechán přes noc v chladničce. Druhý den byla směs

odstředěna při 10 000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut. Supernatant byl odpipetován do čisté mikrozkumavky a použit pro elektroforézu. Hotové extrakty byly uchovávány v mrazničce při teplotě –18 °C.

3.2.6 Elektroforéza

Hřeben byl vytažen z gelu a prohlubně pro dávkování vzorku byly promyty elektrodovým tlumivým roztokem. Aparatura na elektroforézu byla naplněna elektrodovým tlumivým roztokem. Zdroj byl připojen tak, aby elektroforetické dělení probíhalo od horní elektrody, kterou je anoda, k záporné elektrodě ve spodní části aparatury. Byla spuštěna elektroforéza na prázdno (tzv. „předelektroforéza“) po dobu 60 minut při konstantním napětí 480 V. Po uplynutí této doby byla elektroforéza vypnuta a do jamek byly nadávkovány připravené extrakty v množství 10 µl. Přístroj byl znovu zapnut, přičemž elektroforéza probíhala za stejných podmínek po dobu 4 hodin. Vzhledem k velikosti vloženého napětí bylo nutné elektrodový tlumivý roztok v průběhu elektroforézy chladit.

3.2.7 Fixace a vizualizace bílkovin

Po skončení elektroforézy byl gel uvolněn do misky s destilovanou vodou. Voda z misky byla vylita a gel byl převrstven 300 ml fixačního roztoku, ke kterému bylo přidáno 15 ml barvicího roztoku. Gel musí být během barvení zcela ponořen. Miska s gelem byla umístěma na třepačku a barvení bylo ukončeno po 24 hodinách. Delší čas nemá na barvení vliv. Po ukončení barvení byl gel promyt vodou z vodovodu pro odstranění nadbytečného barviva. Gel byl uchováván na skle zabalený do potravinářské fólie, která jej chrání před vyschnutím, v chladničce při teplotě 4 °C.

3.3 Stanovení obsahu gluteninů metodou SDS-PAGE

3.3.1 Přístroje

Analytické váhy HR-120-EC, firma A&D INSTRUMENTS LTD
Centrifuga 5430 R, firma EPPENDORF
Vortex – stuart, firma MERCI
Vortex – Genie 2, firma SCIENTIFIC INDUSTRIES, INC.
Termoblok TDB-100, firma BIOSAN
Chladnička s mrazicí částí, firma GORENJE
Aparatura pro elektroforézu Mini PROTEAN 3, firma BIO-RAD
Zdroj Power Pac 300l, firma BIO-RAD
Třepačka LT2, firma KAVALIER

3.3.2 Chemikálie

Akrylamid (SIGMA ALDRICH)
Bis-akrylamid (SIGMA ALDRICH)
TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan (SIGMA ALDRICH)
Kyselina chlorovodíková (PENTA)
SDS – dodecylsulfát sodný (SIGMA ALDRICH)
Peroxodisíran amonný (SERVA)
Bromfenolová modř Na sůl (SERVA)
Coomassie Brilliant Blue G-250 (SERVA)
TEMED – N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (SIGMA ALDRICH)
Glycin (SERVA)
DTT – dithiothreitol (SIGMA ALDRICH)
Glycerol (SIGMA ALDRICH)
2-merkaptoethanol (SIGMA ALDRICH)
Methanol (LACH-NER)
Kyselina octová (LACHEMA)
Ethanol (LACHEMA)
Butanol (LACHEMA)

3.3.3 Příprava roztoků

Roztok A: 30 g akrylamidu a 0,8 g bisakrylamidu bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky na 100 ml a baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Roztok byl uchováván při teplotě 4 °C.

Roztok B: 18,16 g TRIS bylo rozpuštěno v 50 ml destilované vody, po rozpuštění bylo upraveno pH pomocí koncentrované HCl na 8,8, roztok byl převeden do odměrné baňky na 100 ml a baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Roztok byl uchováván při teplotě 4 °C.

Roztok C: 18,16 g TRIS bylo rozpuštěno v 50 ml destilované vody, po rozpuštění bylo upraveno pH pomocí koncentrované HCl na 6,8, roztok byl převeden do odměrné baňky na 100 ml a baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Roztok byl uchováván při teplotě 4 °C.

Roztok D: 10 g SDS bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky na 100 ml a baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Roztok byl uchováván v temnu při laboratorní teplotě.

Roztok E: 0,1 g peroxodisíranu amonného bylo rozpuštěno v 1 ml destilované vody. Roztok byl připraven čerstvý pro každé stanovení.

Roztok F: 10 mg bromfenolové modři bylo rozpuštěno v 1 ml destilované vody. Roztok byl uchováván při teplotě 4 °C.

Elektrodový pufr: 6 g TRIS, 2 g SDS a 18,8 g glycinu bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky na 1 000 ml a baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Roztok byl uchováván při teplotě 4 °C. Tento roztok se používá opakovaně.

50% vodný roztok isopropanolu: Isopropanol byl smíchán s destilovanou vodou v poměru 1:1. Roztok byl uchováván při laboratorní teplotě.

Roztok pro extrakci gluteninů: 0,6057 g TRIS bylo rozpuštěno v 90 ml 50% vodného roztoku isopropanolu, po rozpuštění bylo upraveno pH pomocí koncentrované HCl na 7,5. Byl přidán 1 g DTT a roztok byl převeden do odměrné baňky na 100 ml a baňka byla doplněna po rysku 50% vodným roztokem isopropanolu. Roztok byl připraven čerstvý pro každé stanovení.

Vzorkový pufr: Bylo smícháno 4,8 ml roztoku C, 4 ml roztoku D, 0,2 ml roztoku F, 6 ml glycerolu, 4,8 ml vody a 1 ml merkaptoethanolu. Roztok byl uchováván při teplotě 4 °C.

Stabilizační roztok: Bylo smícháno 100 ml methanolu a 400 ml vody.

Barvicí roztok: Bylo smícháno 0,5 g Coomasie Blue G 250, 450 ml methanolu, 100 ml koncentrované kyseliny octové a 450 ml vody.

Odbarvovací roztok: Bylo smícháno 250 ml methanolu, 100 ml koncentrované kyseliny octové a 650 ml vody.

3.3.4 Příprava vzorků

Do mikrozkumavky Eppendorf o objemu 1,5 ml bylo naváženo 200 mg pšeničné mouky, K navážce byl přidán 1 ml 50% vodného roztoku isopropanolu a směs byla protřepávána po dobu 30 minut pomocí vortexu Genie 2. Následně byla směs odstředěna při 2 500 g po dobu 15 minut. Supernatant byl slit a sediment byl stejným postupem ještě dvakrát extrahován 50% vodným roztokem isopropanolu. Tímto způsobem byly vyextrahovány gliadiny. Ze sedimentu po extrakci gliadinů byly extrahovány gluteniny. Sediment byl důkladně rozmíchán v 1 ml extrakčního roztoku pro gluteniny a směs byla inkubována v termobloku při teplotě 60°C po dobu 30 minut. Poté byla směs odstředěna při 10 000 g 10 minut. 0,5 ml supernatantu obsahujícího gluteniny bylo odpipetováno do čisté mikrozkumavky Eppendorf o objemu 1,5 ml a bylo přidáno 0,5 ml vzorkového pufru. Hotové extrakty byly uchovávány v mrazničce při teplotě -18 °C.

3.3.5 Příprava gelů

Elektroforetická skla byla omyta vodou a odmašťovacím prostředkem, opláchnuta destilovanou vodou a odmaštěna pomocí ethanolu. Skla byla upevněna do stojanu tak, že větší sklo bylo vzadu. Spodní hrany skel byly zajištěny gumovou podložkou a tlakem svrchu proti vytečení gelu. Ke stanovení byly použity 5% zaostřovací gel a 8% separační gel.

3.3.5.1 Separační gel

Pomocí automatických pipet byly do kádinky odměřeny objemy roztoků podle Tab. 1.

Tab. 2 Objemy k přípravě 10% separačního gelu (10 ml)

Roztok	Objem (ml)
Destilovaná voda	4,0
A	3,3
B	2,5
D	0,1
E	0,1
TEMED	0,004

Roztok E a TEMED byl přidán těsně před nalitím roztoku mezi skla. Roztok byl nalit mezi skla do výšky asi 2 cm od horního okraje. Roztok byl převrstven asi 3 mm butanolu, aby se vyrovnala hladina gelu a nedocházelo k odpařování vody. Po ztuhnutí separačního gelu byl butanol odstraněn a gel byl promyt destilovanou vodou.

3.3.5.2 Zaostřovací gel

Pomocí automatických pipet byly do kádinky odměřeny objemy roztoků podle Tab. 2.

Tab. 3 Objemy k přípravě 5% zaostřovacího gelu (3 ml)

Roztok	Objem (ml)
Destilovaná voda	2,1
A	1,0
C	0,38
D	0,03
E	0,03
TEMED	0,003

Roztok E a TEMED byl opět přidáván těsně před nalitím. Roztok byl nalit na vrstvu separačního gelu a prostor mezi skly byl naplněn až po okraj. Po nalití byl ihned do prostoru mezi skla vložen elektroforetický hřebínek. Hřebínek byl odstraněn až po zatuhnutí gelu před nanášením vzorků a samotným stanovením, aby se zabránilo vysychání gelu. Takto připravený gel může být uchováván v lednici do druhého dne.

3.3.6 Elektroforéza

Skla s připraveným a dokonale ztuhlým gelem byla vytažena ze stojanu a očištěna od zbytků gelu. Fixem byl obkreslen tvar hřebenu na zadní sklo. Byl odstraněn elektroforetický hřebínek a skla byla upevněna do stojanu pro elektroforézu větším sklem ven. Stojan byl umístěn do elektroforetické nádoby, vnitřní prostor stojanu byl zcela naplněn elektrodovým roztokem a vnější prostor byl naplněn přibližně do poloviny. Pomocí automatické pipety byly do jamek nadávkovány připravené vzorky v množství 5 μl. Aparatura byla připojena ke zdroji a byla spuštěna elektroforéza, které probíhala po dobu 120 minut při konstantním napětí 100 V.

3.3.7 Vizualizace bílkovin

Elektroforetická skla byla vyjmuta ze stojanu a gel byl uvolněn do misky s destilovanou vodou pomocí umělohmotné špachtle. Voda v misce byla odlita a gel byl převrstven stabilizačním roztokem a 5 minut stabilizován na třepačce. Stabilizační roztok byl odlit a gel byl převrstven barvícím roztokem a 30 minut barven na třepačce. Poté byl gel promyt odbarvovacím roztokem a 90 minut odbarvován na třepačce. Po slití odbarvovacího roztoku byl gel promyt destilovanou vodou. Gel byl uchováván na skle zabalený do potravinářské fólie, která jej chrání před vyschnutím, v chladničce při teplotě 4 °C.

3.4 Vyhodnocení gelů

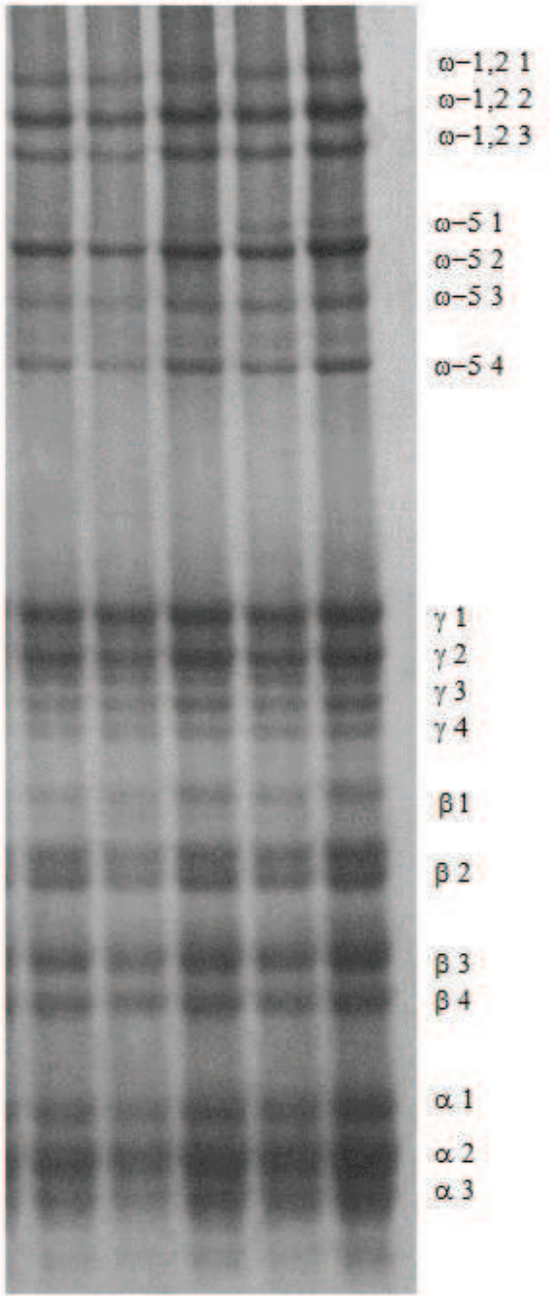
Hotové gely byly naskenovány a kvantifikace gliadinových podjednotek byla provedena počítačovou denzitometrií (program FUJIFILM, Science Lab 2006, Multi Gauge, verze 3.X). Zóny jednotlivých podjednotek byly převedeny na píky a integrací byla vypočítána jejich plocha. Kvůli nedostupnosti standardu nebyly tyto plochy píků přepočteny na koncentraci. Pro porovnání jednotlivých variant byly tedy použity příslušné plochy píků.

3.5 Statistické zpracování výsledků

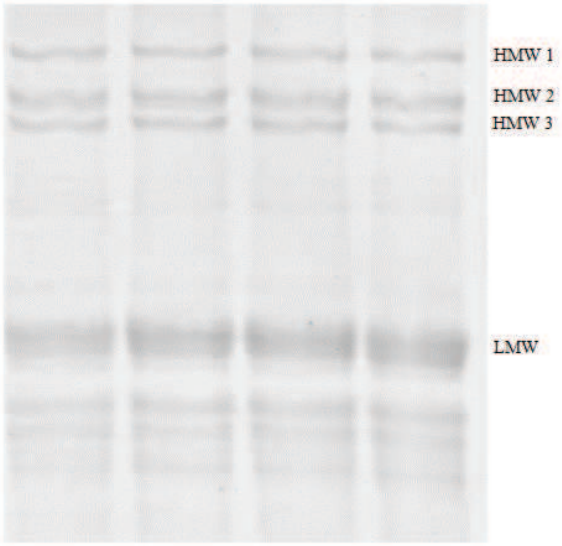
Statistická analýza dat byla provedena pomocí statistického software Statistica 12 (StatSoft, USA). Pro vyhodnocení vlivu jednotlivých faktorů, tj. vlivu zvýšené koncentrace CO_2, výživy dusíkem, UV záření, stresu sucha a jejich vzájemných interakcí bylo použito vícefaktorové analýzy variance (ANOVA). Pro porovnání průkaznosti rozdílů mezi průměry jednotlivých variant pak bylo využito následného (post-hoc) testování s použitím Tukeyova testu při hladině významnosti $p = 0.05$. Pro porovnání průkaznosti rozdílů mezi průměry pak byly varianty zařazeny do homogenních skupin, které jsou v grafech vyznačeny pomocí malých písmen nad sloupci. Rozdílná písmena vyjadřují průkazný rozdíl při hladině pravděpodobnosti $p = 0,05$. Výsledky byly graficky zpracovány v programu SigmaPlot 11 (SysStat, USA) ve formě sloupcových grafů s chybovými úsečkami znázorňujícími směrodatné odchylky.

4 VÝSLEDKY

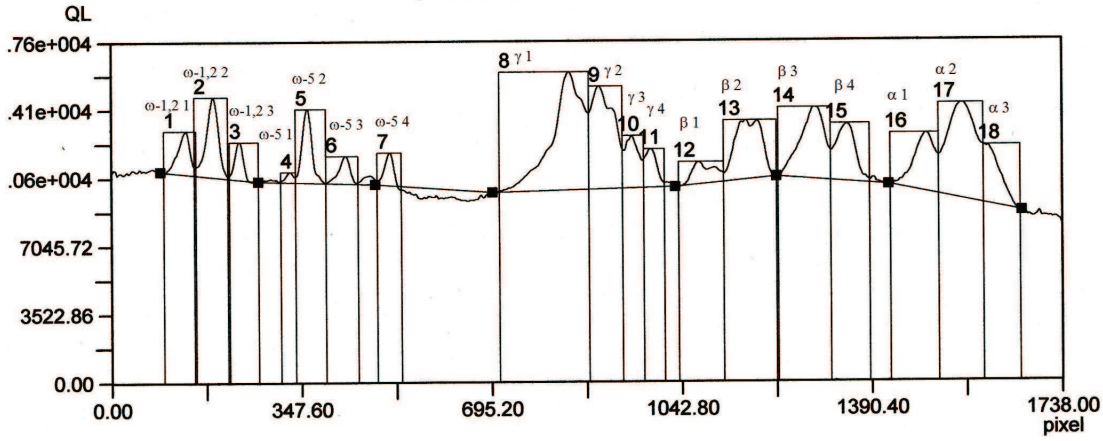
Gely na obr. 9 a 10 byly získány při vypracování experimentální části této práce a znázorňují proteinové spektrum pšenice seté odrůdy Bohemia. Převedení jednotlivých zón gelu na píky, které byly dále vyhodnocovány, můžeme vidět na obr. 11 a 12.



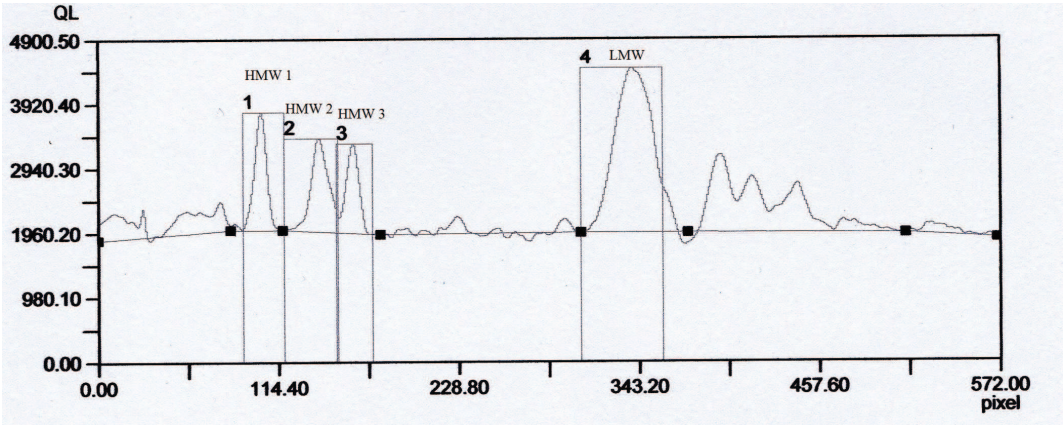
Obr. 9 A-PAGE gliadinových proteinů pšenice seté odrůdy Bohemia s popisem jednotlivých frakcí



Obr. 10 SDS-PAGE gluteninových proteinů pšenice seté odrůdy Bohemia s popisem jednotlivých frakcí



Obr. 11 Převedení zón na píky v rámci A-PAGE gliadinových proteinů



Obr. 12 Převedení zón na píky v rámci SDS-PAGE gluteninových proteinů

Tab. 4 ANOVA - Čtyřstupňová analýza variance. Statistické vyhodnocení vlivů jednotlivých faktorů na obsah jednotlivých frakcí gliadinových proteinů

	UV–	N–	sucho	CO_2
ω-1,2 1	0,842	0,000	0,091	0,609
ω-1,2 2	0,650	0,000	0,002	0,377
ω-1,2 3	0,430	0,000	0,000	0,908
ω-5 1	0,074	0,000	0,005	0,944
ω-5 2	0,124	0,000	0,054	0,205
ω-5 3	0,295	0,000	0,017	0,742
ω-5 4	0,475	0,000	0,323	0,552
γ 1	0,273	0,401	0,200	0,465
γ 2	0,775	0,002	0,430	0,357
γ 3	0,627	0,001	0,427	0,746
γ 4	0,037	0,454	0,344	0,003
β 1	0,000	0,002	0,161	0,555
β 2	0,208	0,000	0,056	0,187
β 3	0,281	0,002	0,706	0,343
β 4	0,420	0,000	0,274	0,658
α 1	0,711	0,000	0,027	0,035
α 2	0,562	0,005	0,195	0,960
α 3	0,001	0,000	0,806	0,653
gliadiny celkem	0,131	0,000	0,091	0,422

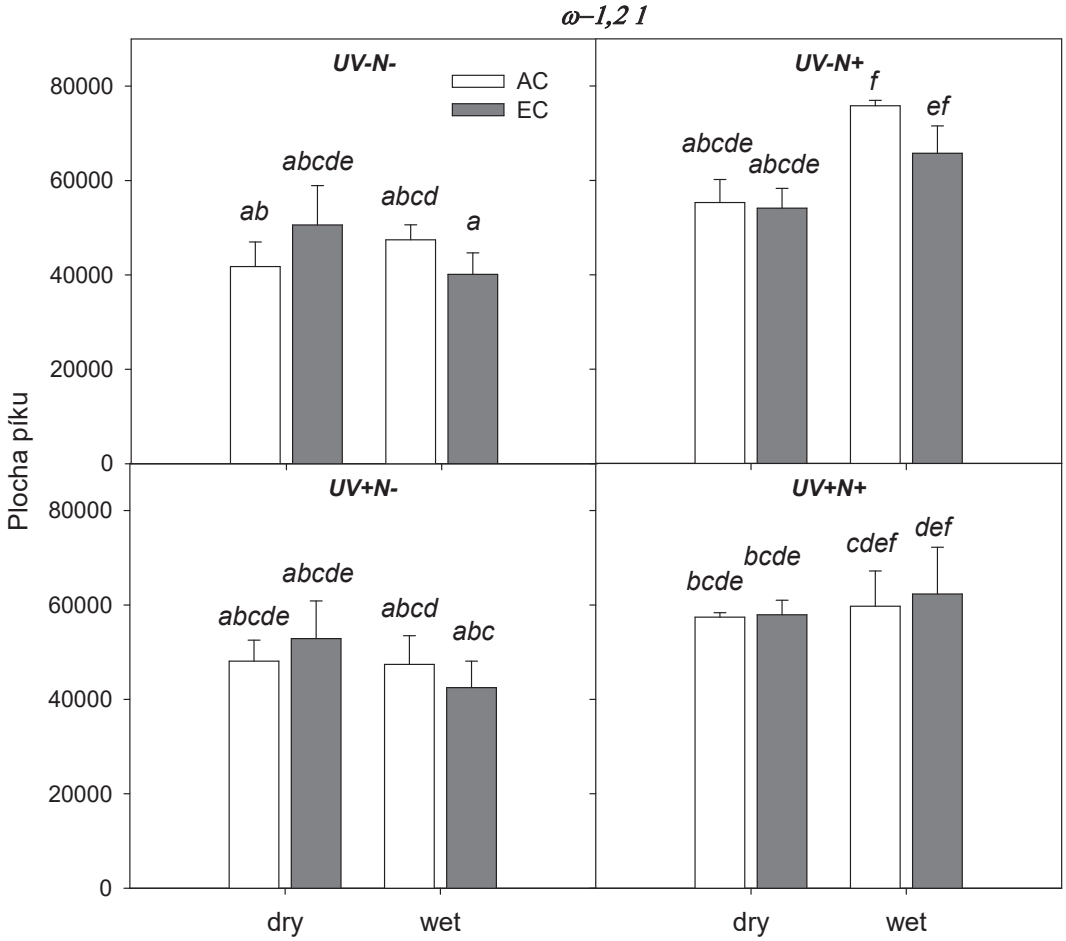
Tab. 5 ANOVA - Čtyřstupňová analýza variance. Statistické vyhodnocení vlivů jednotlivých faktorů na obsah jednotlivých frakcí gluteninových proteinů

	UV–	N–	sucho	"CO2"
HMW1	0,154	0,000	0,000	0,865
HMW2	0,114	0,000	0,035	0,023
HMW3	0,002	0,000	0,000	0,015
LMW	0,003	0,004	0,000	0,115
Gluteniny celkem	0,002	0,000	0,000	0,041

V tab. 4 a 5 jsou uvedeny hladiny významnosti p určující průkaznost účinků jednotlivých faktorů, které byly sledovány, na jednotlivé frakce gliadinových a gluteninových proteinů. Metodou A-PAGE bylo na gelu detekováno osmnáct frakcí gliadinů. Skupina ω-1,2 byla tvořena třemi frakcemi, skupiny ω-5, γ a β čtyřmi frakcemi a skupina α třemi frakcemi (obr. 9). Metodou SDS-PAGE byly na gelu rozlišeny tři frakce HMW gluteninů a jedna frakce LMW gluteninů. V posledním řádku u každé tabulky můžeme sledovat průkaznost účinků jednotlivých faktorů na celkové množství gliadinů a gluteninů. V tabulkách jsou jednotlivé frakce seřazeny podle klesající molekulové hmotnosti. Hodnota p menší než 0,05 značí průkazný vliv daného faktoru. Všechny hodnoty menší než 0,05 jsou v tabulce zvýrazněny červeně. Pokud je hodnota p menší než 0,01, byl vliv vysoce průkazný.

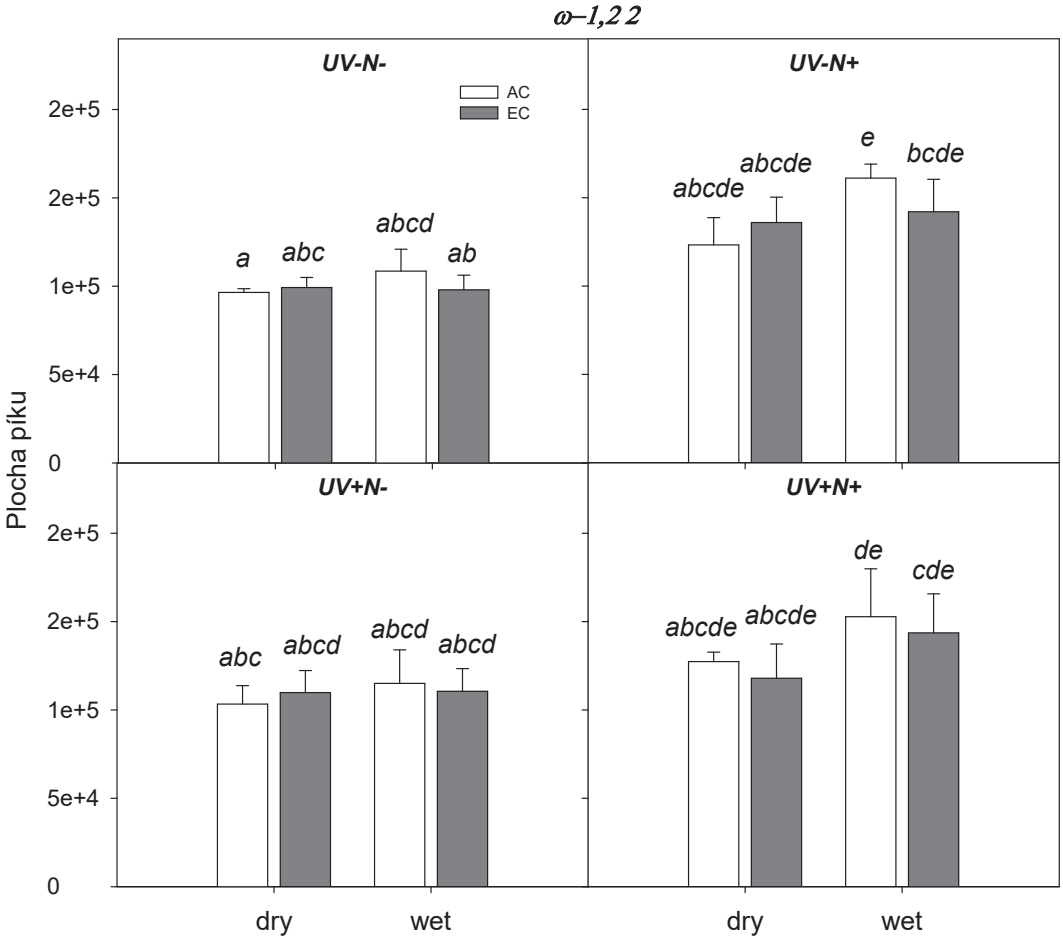
Vysoce průkazný účinek mělo dusíkaté hnojení na téměř všechny frakce gliadinových proteinů s výjimkou frakce γ 1 a γ 4, a na všechny frakce gluteninů. Zvýšená koncentrace CO_2 měla vysoce průkazný vliv na gliadinovou frakci γ 4 a průkazný vliv na frakci gliadinů α 1 a gluteninů HMW 2 a HMW 3, u ostatních frakcí nebyl vliv prokázán. Průkazný účinek sucha můžeme sledovat u frakcí gliadinů ω-5 3 a α 1 a gluteninové frakce HMW 2, vysoce průkazný účinek sucha u frakcí gliadinových proteinů ω-5 1, ω-1,2 2 a ω-1,2 3 a gluteninových proteinů HMW 1, HMW 3 a LMW. UV záření průkazně ovlivnilo gliadinové proteiny frakce γ 4 a vysoce průkazně proteiny gliadinových frakcí β 1 a α 3 a frakcí gluteninů HMW 3 a LMW.

Grafy na obr. 13–25 znázorňují srovnání vlivu všech sledovaných faktorů v rámci jednotlivých frakcí i celkového množství gliadinů a gluteninů. Písmenné označení každého sloupce v grafu určuje, zda existuje mezi variantami statisticky významný rozdíl (následné testování ANOVA, Turkeyho test) na hladině významnosti p = 0,05. Pokud jsou dva sloupce označeny stejným písmenem, není mezi nimi statisticky významný rozdíl.



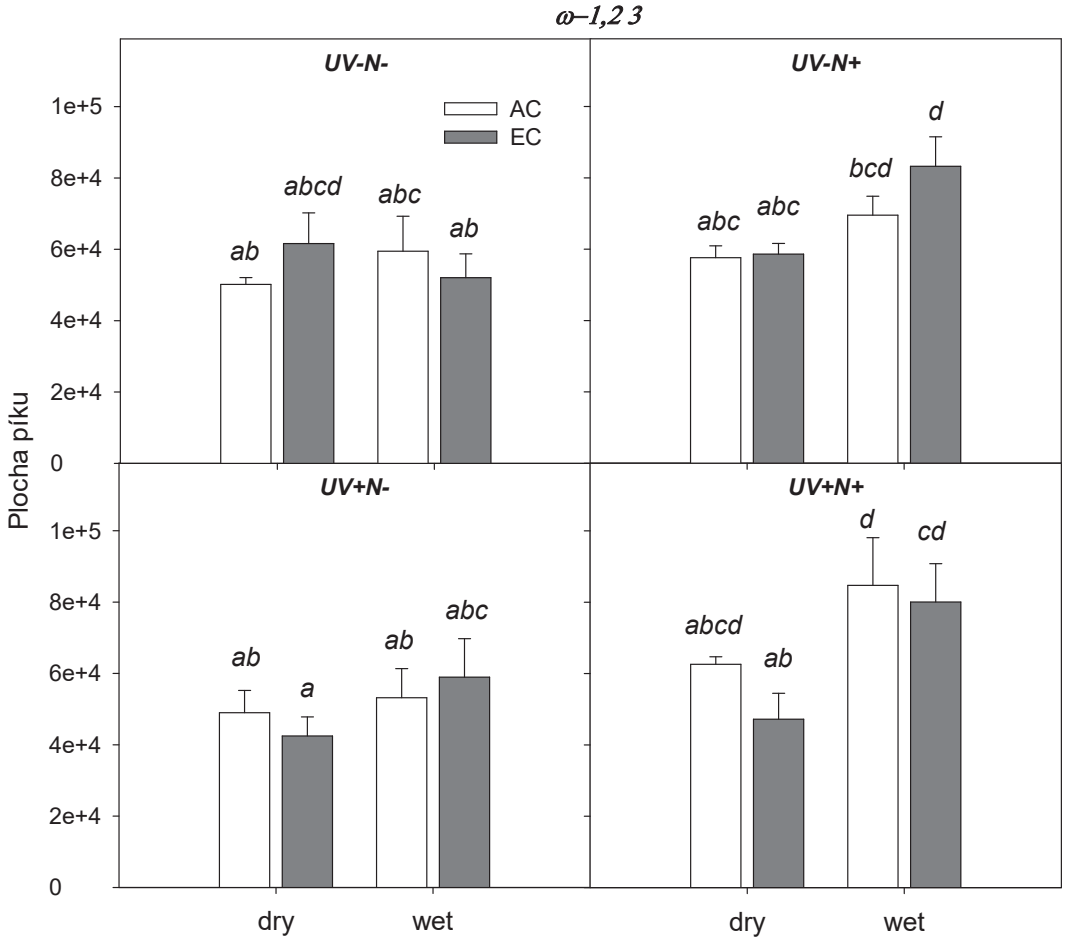
Obr. 13 Graf zobrazující srovnání ploch píků všech variant (koncentrace CO_2 – AC (400 μmol.mol^{-1}) vs. EC (700 μmol.mol^{-1}) , dusíkaté hnojení – N– vs. N+ , sucho – dry vs. wet, UV záření – UV– vs. UV+) v rámci gliadinové frakce ω-1,2 1. Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (SD) ze tří opakování. Malými písmeny jsou indikovány homogenní skupiny určující průkaznost mezi jednotlivými variantami, vyhodnocené následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti p = 0,05.

Sucho způsobilo statisticky významný pokles koncentrace proteinů frakce ω-1,2 1 u varianty AC UV– N+ (o 25 %). Bez vyloučení přirozených srážek můžeme pozorovat statisticky významný vliv dusíkatého hnojení u varianty UV– N+ při normální i zvýšené koncentraci CO_2 (nárůst o 60 %) a také u varianty UV+ N+ při zvýšené koncentraci CO_2 (nárůst o 46 %). U varianty DRY nebyl zjištěn významný rozdíl mezi variantami AC a EC ani mezi N+ a N–, sucho se tedy projevilo jako limitující faktor. Vliv zvýšené koncentrace CO_2 ani UV záření nebyl u žádné varianty pozorován.



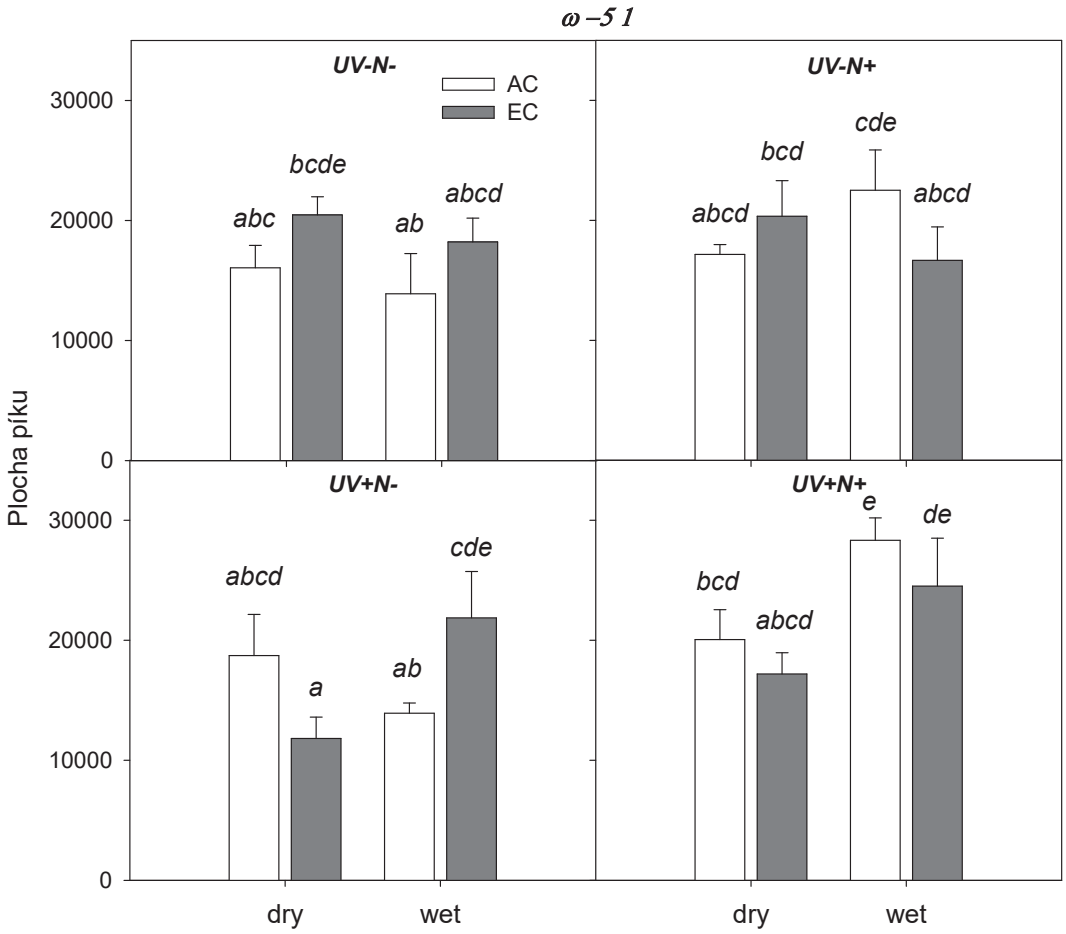
Obr. 14 Graf zobrazující srovnání ploch píků všech variant (koncentrace CO_2 – AC (400 µmol.mol^{-1}) vs. EC (700 µmol.mol^{-1}), dusíkaté hnojení – N– vs. N+ , sucho – dry vs. wet, UV záření – UV– vs. UV+) v rámci gliadinové frakce ω-1,2 2. Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (SD) ze tří opakování. Malými písmeny jsou indikovány homogenní skupiny určující průkaznost mezi jednotlivými variantami, vyhodnocené následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti p = 0,05.

U frakce ω-1,2 2 byl pozorován statisticky významný vliv dusíkatého hnojení při normální koncentraci CO_2 u varianty WET UV– (nárůst koncentrace proteinů o 47 %). Zvýšená koncentrace CO_2, sucho ani vyloučení UV záření neměly statisticky významný vliv na množství proteinů této frakce.



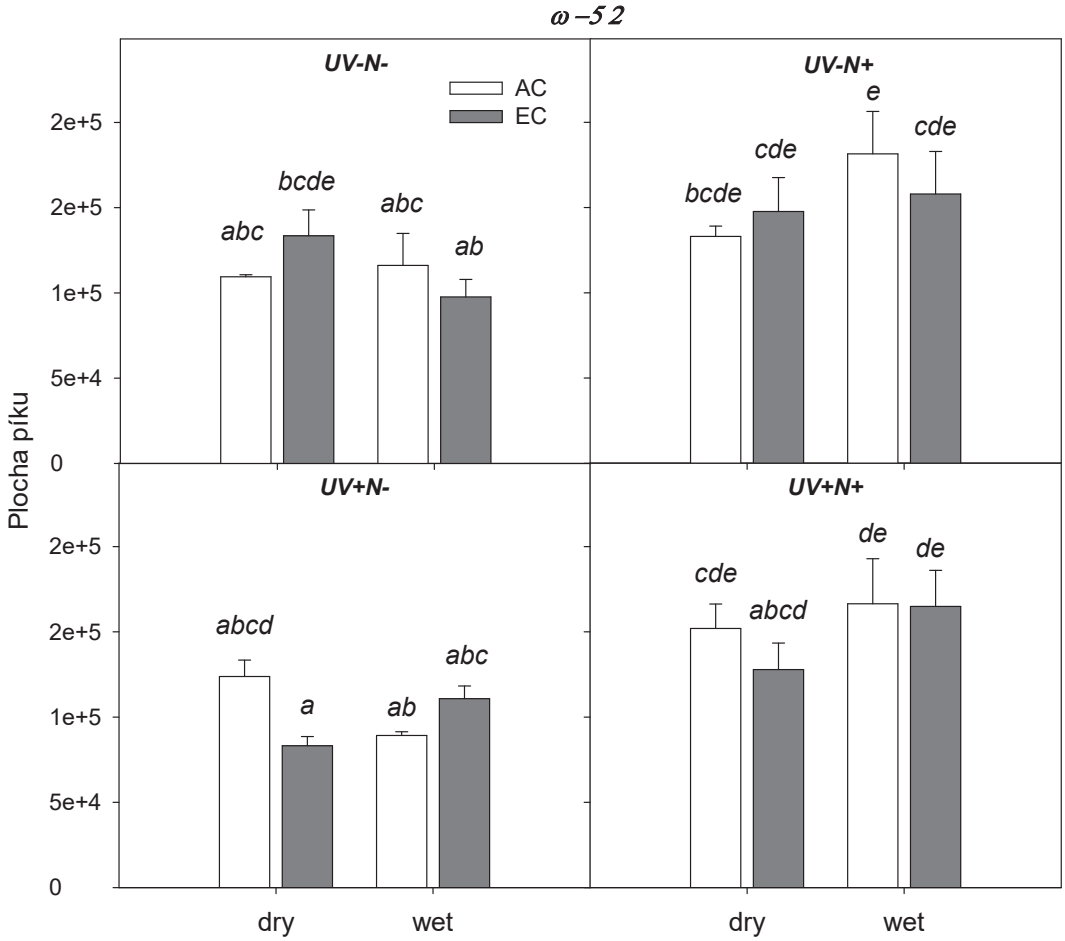
Obr. 15 Graf zobrazující srovnání ploch píků všech variant (koncentrace CO_2 – AC (400 µmol.mol^{-1}) vs. EC (700 µmol.mol^{-1}), dusíkaté hnojení – N– vs. N+ , sucho – dry vs. wet, UV záření – UV– vs. UV+) v rámci gliadinové frakce ω-1,2 3. Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (SD) ze tří opakování. Malými písmeny jsou indikovány homogenní skupiny určující průkaznost mezi jednotlivými variantami, vyhodnocené následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti p = 0,05.

Stres vyvolaný nedostatkem vody způsobil významný pokles koncentrace gliadinových proteinů frakce ω-1,2 3 při zvýšené koncentraci CO_2 a dostatku dusíkaté výživy s vyloučením i bez vyloučení UV záření. U varianty UV– v tomto případě pozorujeme pokles o 27 % a u varianty UV+ pokles o 41 %. Dusíkaté hnojení zvýšilo obsah proteinů u varianty WET při vyloučení UV záření a zvýšené koncentraci CO_2 o 53 % a při normální koncentraci CO_2 bez vyloučení UV záření o 57 %. Statisticky významný nebyl vliv zvýšené koncentrace CO_2 ani UV záření.



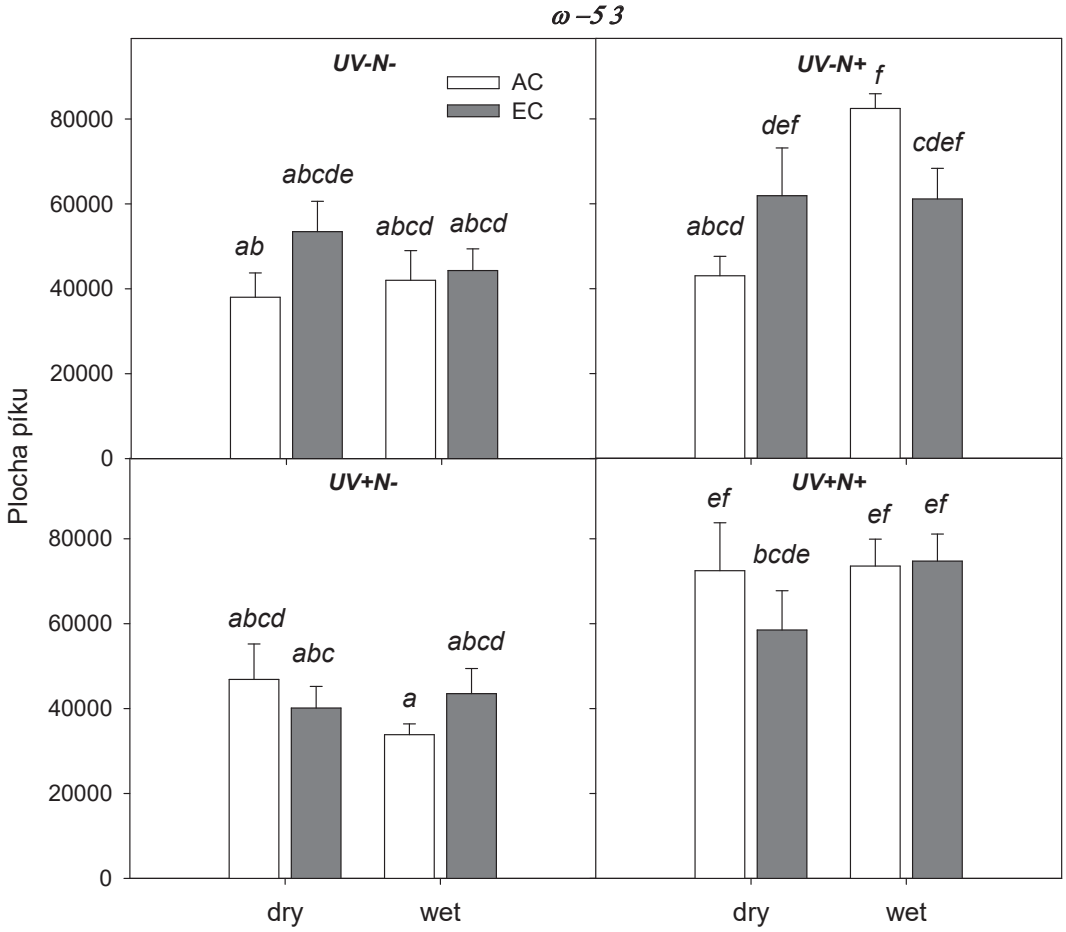
Obr. 16 Graf zobrazující srovnání ploch píků všech variant (koncentrace CO_2 – AC (400 μmol.mol^{-1}) vs. EC (700 μmol.mol^{-1}), dusíkaté hnojení – N– vs. N+ , sucho – dry vs. wet, UV záření – UV– vs. UV+) v rámci gliadinové frakce ω-5 1. Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (SD) ze tří opakování. Malými písmeny jsou indikovány homogenní skupiny určující průkaznost mezi jednotlivými variantami, vyhodnocené následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti p = 0,05.

Zvýšená koncentrace CO_2 způsobila statisticky významný nárůst koncentrace proteinů frakce ω-5 1 u varianty WET UV+ N– a to o 63 %. Vyloučení srážek snížilo významně obsah proteinů u vzorků pěstovaných za působení UV záření při nedostatku dusíkaté výživy a zvýšené koncentraci CO_2 (o 46 %) a při dostatku dusíku a normální koncentraci CO_2 (o 38 %). Vliv dusíkatého hnojení se projevil pouze za dostatku vody a normální koncentrace CO_2, a to při vyloučení UV záření nárůstem množství proteinů u hnojené varianty o 63 % a u hnojených vzorků vystavených UV záření zvýšením obsahu proteinů o 112 %. UV záření ovlivnilo koncentraci proteinů této frakce u nehnojené varianty vystavené vodnímu stresu a zvýšené koncentraci CO_2. Varianta UV– byla o 71 % vyšší než varianta UV+ a tento rozdíl byl statisticky významný.



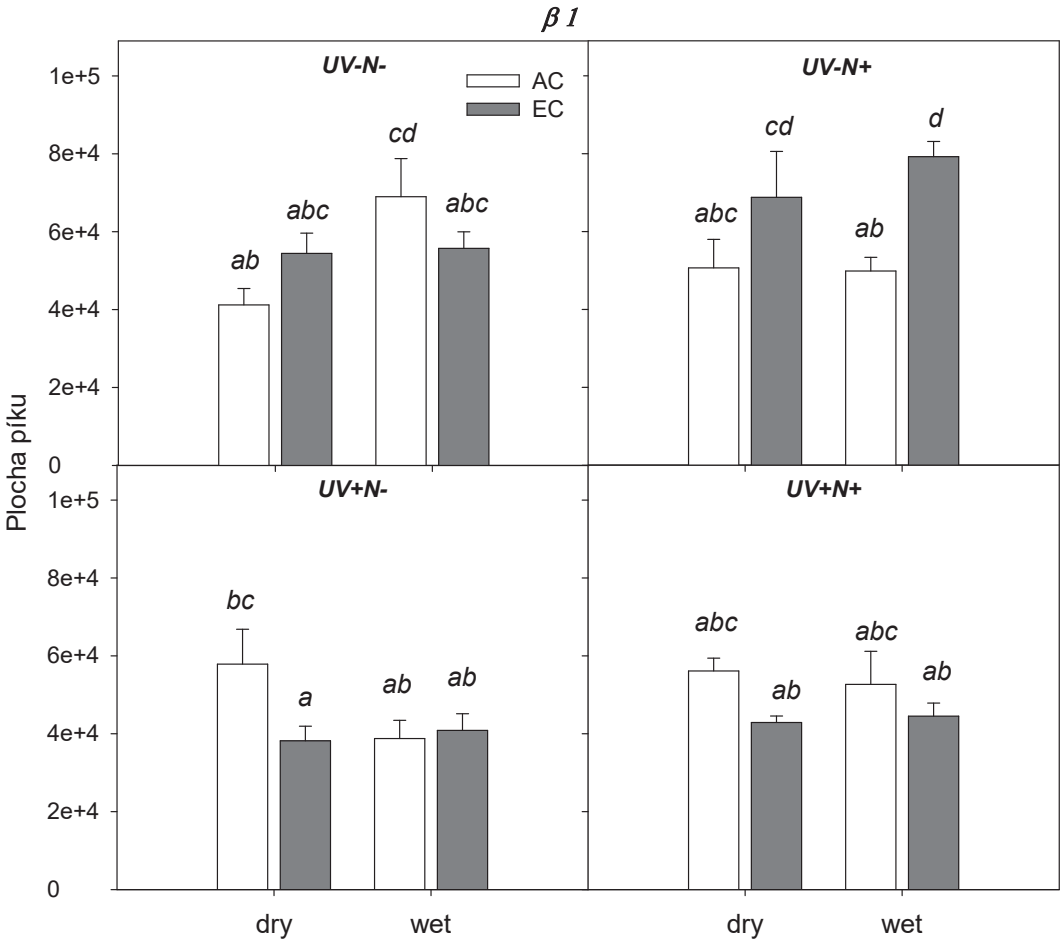
Obr. 17 Graf zobrazující srovnání ploch píků všech variant (koncentrace CO_2 – AC (400 μmol.mol^{-1}) vs. EC (700 μmol.mol^{-1}), dusíkaté hnojení – N– vs. N+ , sucho – dry vs. wet, UV záření – UV– vs. UV+) v rámci gliadinové frakce ω-5 2. Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (SD) ze tří opakování. Malými písmeny jsou indikovány homogenní skupiny určující průkaznost mezi jednotlivými variantami, vyhodnocené následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti p = 0,05.

Dostatek dusíku významně zvýšil koncentraci proteinů frakce ω-5 2, pouze pokud nedošlo k vyloučení přirozených srážek. Za podmínek normální koncentrace CO_2 byl pozorován nárůst o 55 % při vyloučení UV záření a při působení UV záření až o 86 %. Za zvýšené koncentrace CO_2 a vyloučení UV záření byl zaznamenán nárůst o 63 % a u varianty vystavené UV záření o 51 %. Statisticky významné zvýšení množství proteinů této frakce (o 64 %) bylo vyvoláno také vyloučením UV záření u varianty DRY N– vystavené zvýšené koncentraci CO_2. Zvýšená koncentrace CO_2 ani vyloučení přirozených srážek statisticky významně neovlivnily koncentraci gliadinů frakce ω-5 2.



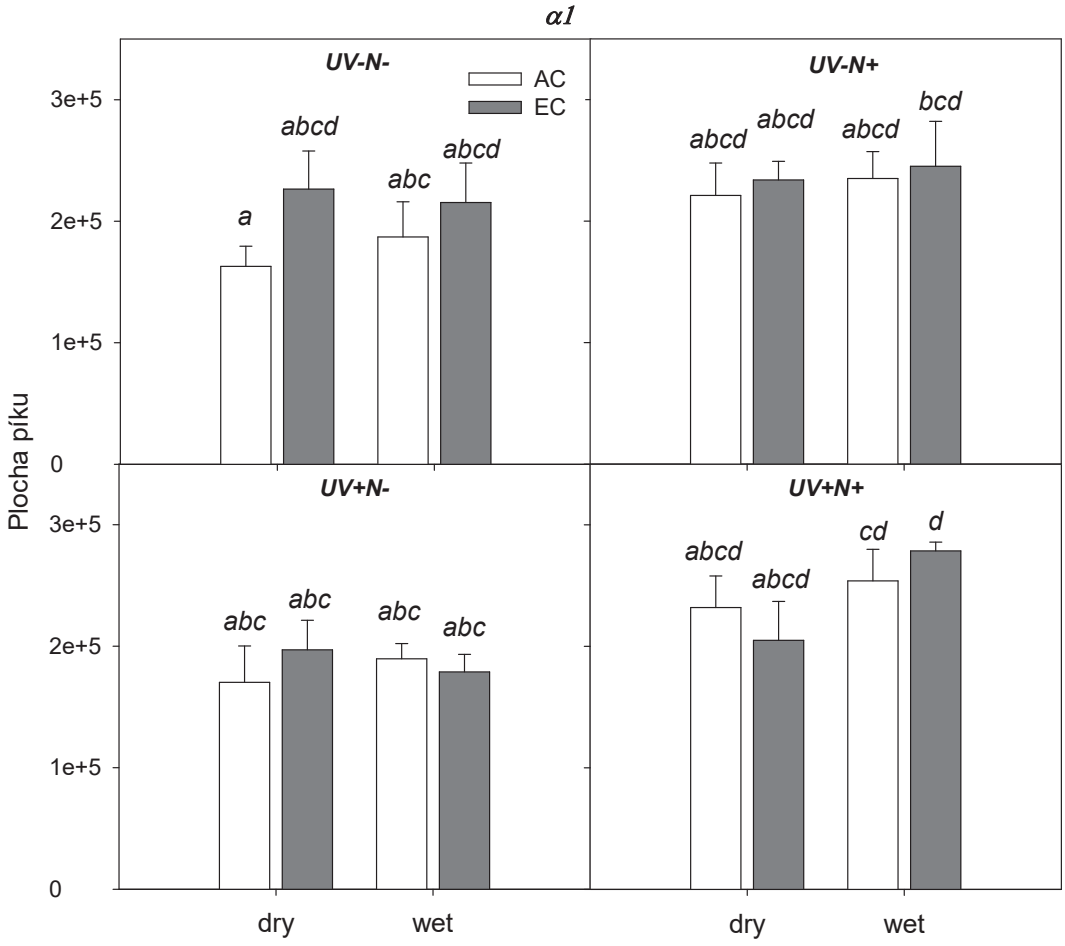
Obr. 18 Graf zobrazující srovnání ploch píků všech variant (koncentrace CO_2 – AC (400 μmol.mol^{-1}) vs. EC (700 μmol.mol^{-1}), dusíkaté hnojení – N– vs. N+ , sucho – dry vs. wet, UV záření – UV– vs. UV+) v rámci gliadinové frakce ω-5 3. Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (SD) ze tří opakování. Malými písmeny jsou indikovány homogenní skupiny určující průkaznost mezi jednotlivými variantami, vyhodnocené následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti p = 0,05.

Statisticky významný pokles obsahu gliadinů frakce ω-5 3 (o 48%) vlivem sucha lze pozorovat u varianty UV– N+ za normální koncentrace CO_2. Dusíkaté hnojení bylo významným faktorem, který zvýšil obsah proteinů varianty WET AC UV– (o 92 %), DRY AC UV+ (o 50 %), WET AC UV+ (o 120 %) a WET EC UV+ (o 63 %). Za podmínek normální koncentrace CO_2 a vyloučení srážek mělo na hnojenou variantu významný vliv UV záření, množství proteinů u varianty UV+ se zvýšilo o 66 %. Vliv zvýšené koncentrace CO_2 nebyl pozorován.



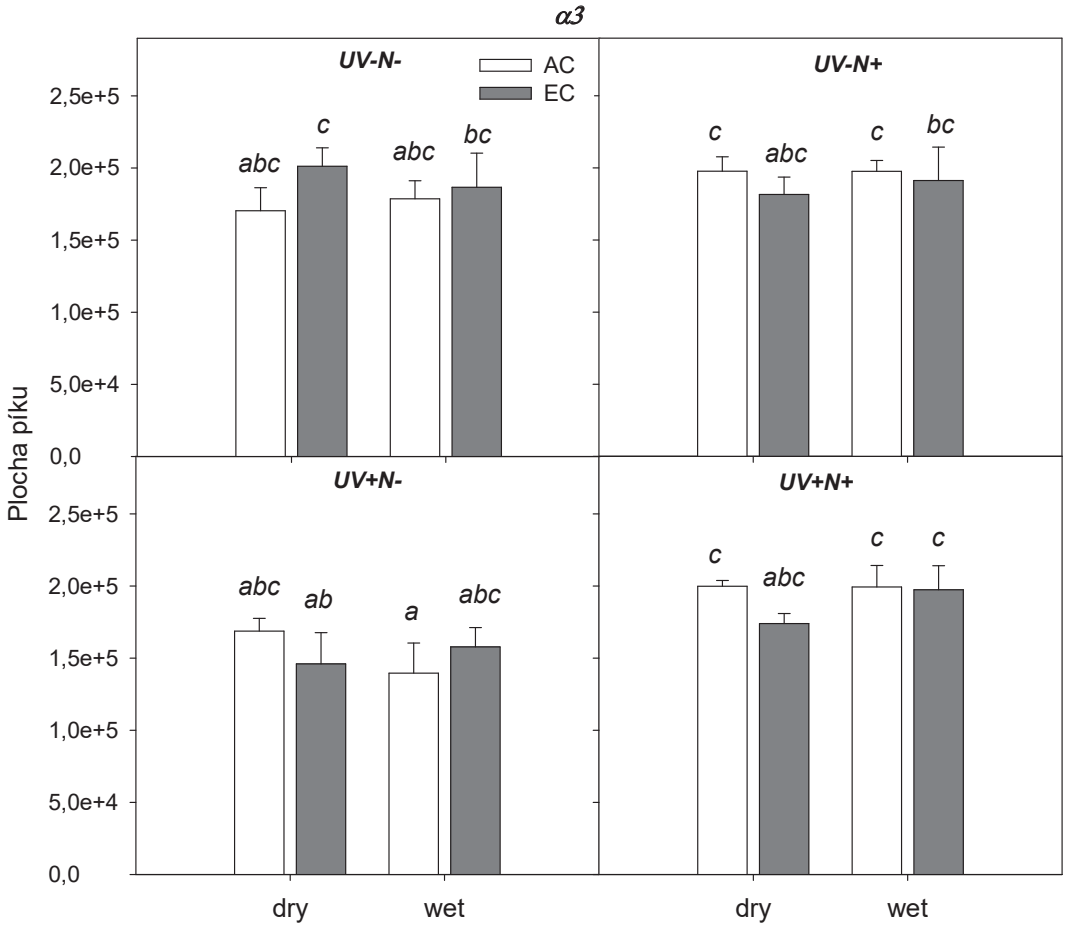
Obr. 19 Graf zobrazující srovnání ploch píků všech variant (koncentrace CO_2 – AC (400 μmol.mol^{-1}) vs. EC (700 μmol.mol^{-1}), dusíkaté hnojení – N– vs. N+ , sucho – dry vs. wet, UV záření – UV– vs. UV+) v rámci gliadinové frakce β 1. Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (SD) ze tří opakování. Malými písmeny jsou indikovány homogenní skupiny určující průkaznost mezi jednotlivými variantami, vyhodnocené následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti p = 0,05.

Zvýšená koncentrace CO_2 způsobila statisticky významný nárůst koncentrace gliadinů frakce β 1 (o 65 %) u varianty WET při dostatku dusíku a vyloučení UV záření. Naopak u varianty DRY bez hnojení a bez vyloučení UV záření byl při zvýšené koncentraci CO_2 pozorován významný pokles množství proteinů frakce β 1 (o 31 %). Vyloučení přirozených srážek snížilo obsah proteinů u varianty AC UV– N– o 69 %. Tento rozdíl byl statisticky významný. U kombinace přirozené úrovně srážek, vyloučení UV záření a normální koncentrace CO_2 byl pozorován významný pokles koncentrace proteinů u hnojené varianty a to o 45 %. Naopak významné zvýšení koncentrace proteinů u varianty N+ (o 35 %) nastalo za podmínek přirozené úrovně srážek, vyloučení UV záření a zvýšené koncentrace CO_2.Vliv UV záření byl prokázán za normální koncentrace CO_2 u varianty WET UV– N– nárůstem o 80 % a také při zvýšené koncentraci CO_2 u variant DRY UV– N+ nárůstem o 48 % a WET UV– N+ nárůstem o 80 %.



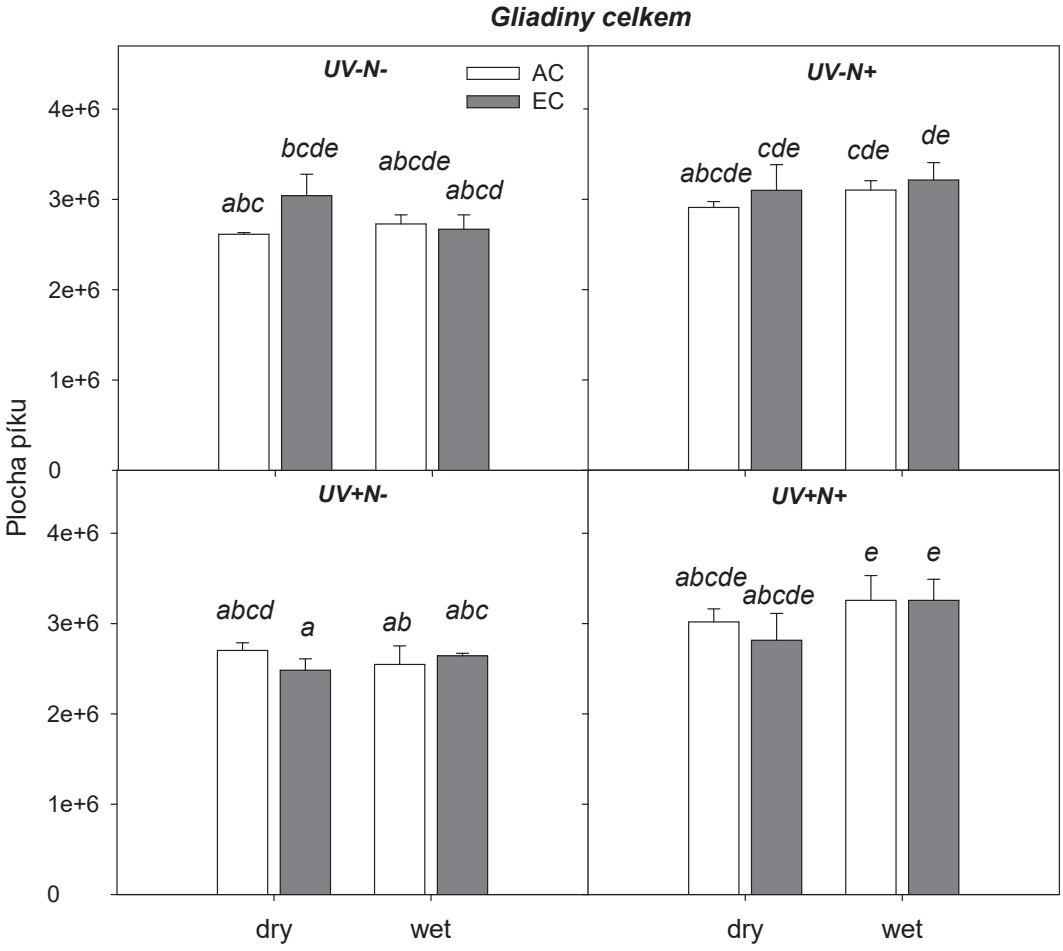
Obr. 20 Graf zobrazující srovnání ploch píků všech variant (koncentrace CO_2 – AC (400 μmol.mol^{-1}) vs. EC (700 μmol.mol^{-1}), dusíkaté hnojení – N– vs. N+ , sucho – dry vs. wet, UV záření – UV– vs. UV+) v rámci gliadinové frakce α 1. Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (SD) ze tří opakování. Malými písmeny jsou indikovány homogenní skupiny určující průkaznost mezi jednotlivými variantami, vyhodnocené následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti p = 0,05.

Vliv dusíkatého hnojení byl prokázán nárůstem koncentrace gliadinů frakce α 1 u hnojené varianty o 55 % při zvýšené koncentraci CO_2, v přirozených srážkách a při působení UV záření. Zvýšená koncentrace CO_2, vyloučení přirozených srážek ani vyloučení UV záření statisticky významně neovlivnily množství proteinů této frakce.



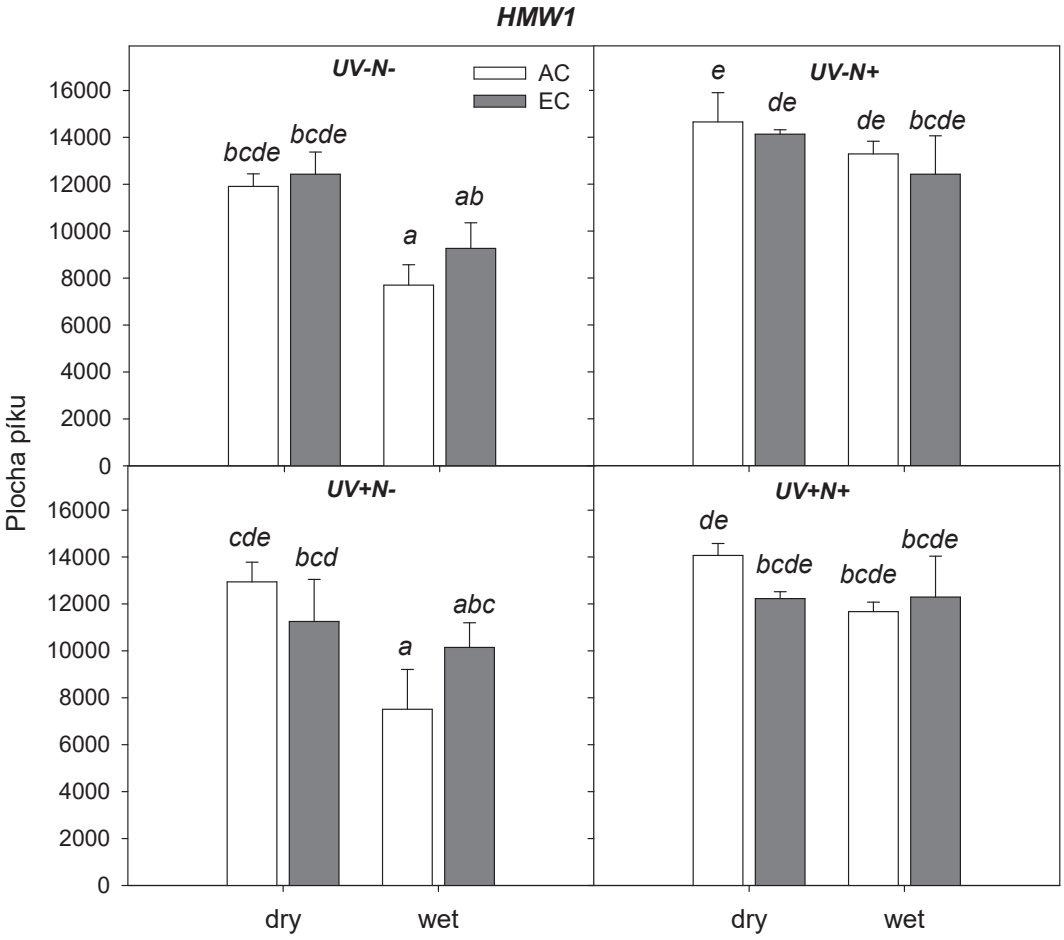
Obr. 21 Graf zobrazující srovnání ploch píků všech variant (koncentrace CO_2 – AC (400 μmol.mol^{-1}) vs. EC (700 μmol.mol^{-1}), dusíkaté hnojení – N– vs. N+ , sucho – dry vs. wet, UV záření – UV– vs. UV+) v rámci gliadinové frakce α 3. Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (SD) ze tří opakování. Malými písmeny jsou indikovány homogenní skupiny určující průkaznost mezi jednotlivými variantami, vyhodnocené následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti p = 0,05.

Koncentrace gliadinových proteinů frakce α 3 byla u hnojené varianty při normální koncentraci CO_2, bez vyloučení srážek a UV záření vyšší o 45 % než u varianty nehnojené. Tento nárůst byl statisticky významný. Vyloučení UV záření zvýšilo významně obsah proteinů varianty DRY EC N– (o 35%). Vliv zvýšené koncentrace CO_2 ani sucha nebyl u gliadinů frakce α 3 prokázán.



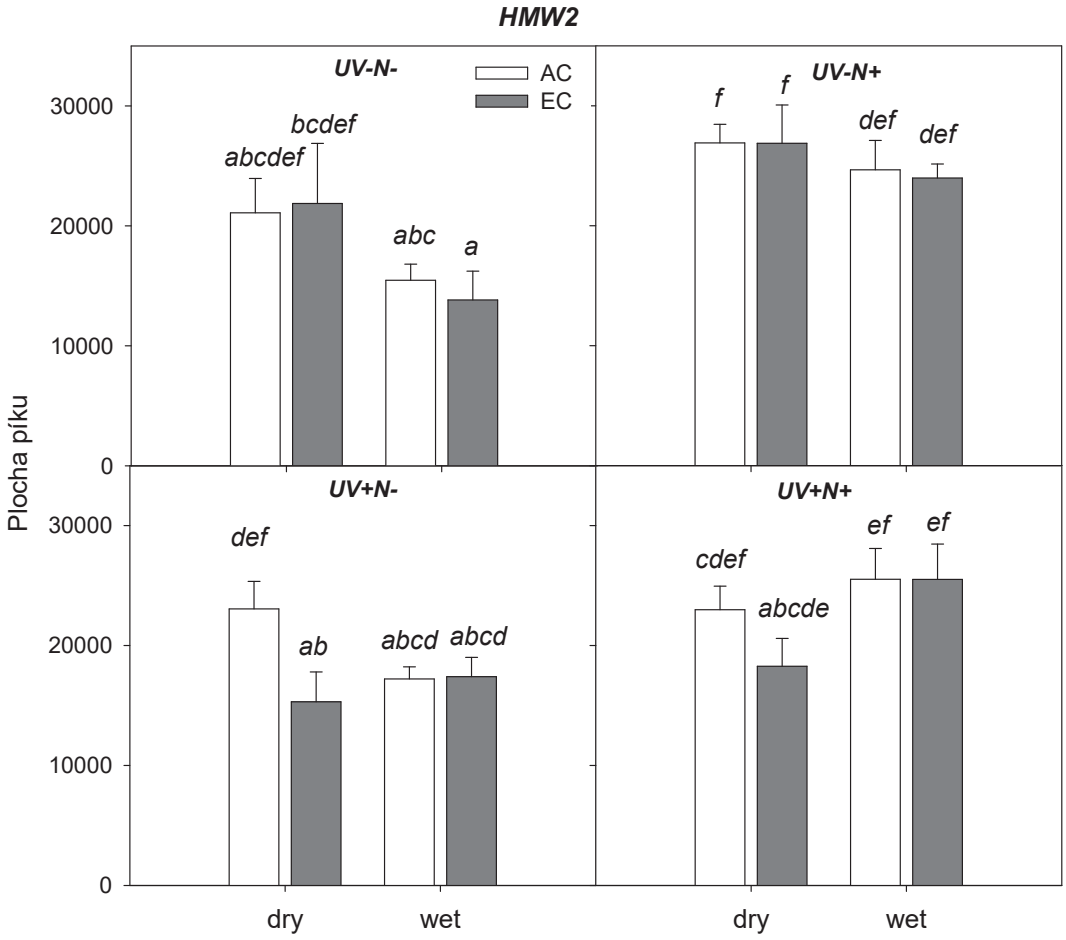
Obr. 22 Graf zobrazující srovnání ploch píků všech variant (koncentrace CO_2 – AC (400 μmol.mol^{-1}) vs. EC (700 μmol.mol^{-1}), dusíkaté hnojení – N– vs. N+ , sucho – dry vs. wet, UV záření – UV– vs. UV+) v rámci celkového množství gliadinů. Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (SD) ze tří opakování. Malými písmeny jsou indikovány homogenní skupiny určující průkaznost mezi jednotlivými variantami, vyhodnocené následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti p = 0,05.

Vliv dusíkatého hnojení na celkové množství gliadinů se projevil zvýšením koncentrace gliadinů o 25 % u varianty WET UV+ N+ při normální i zvýšené koncentraci CO_2. Při vyloučení UV záření můžeme pozorovat statisticky významný nárůst celkové koncentrace gliadinových proteinů (o 23 %) za podmínek zvýšené koncentrace CO_2, sucha a nedostatku dusíkaté výživy. Zvýšená koncentrace CO_2 a vyloučení přirozených srážek neměly statisticky významný vliv na celkové množství gliadinů.



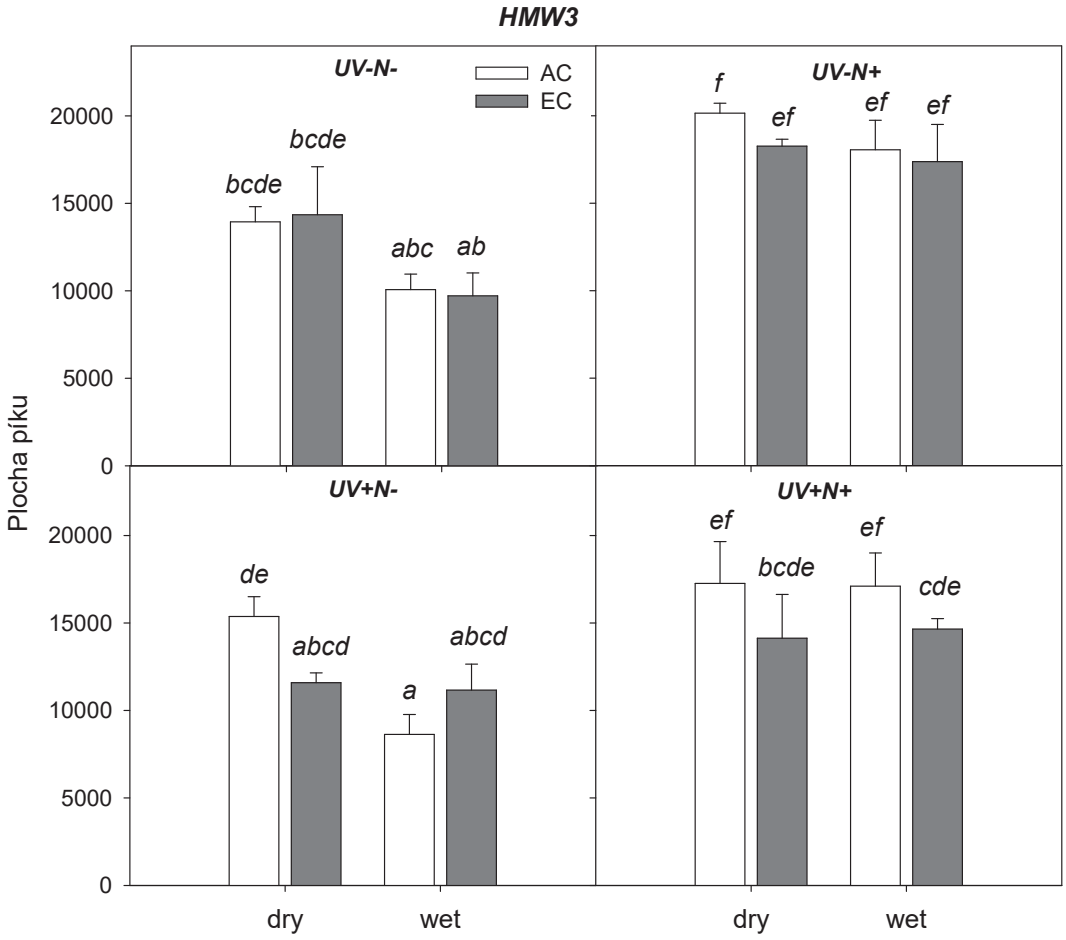
Obr. 23 Graf zobrazující srovnání ploch píků všech variant (koncentrace CO_2 – AC (400 μmol.mol^{-1}) vs. EC (700 μmol.mol^{-1}), dusíkaté hnojení – N– vs. N+ , sucho – dry vs. wet, UV záření – UV– vs. UV+) v rámci gluteninové frakce HMW 1. Sloupce znázorňují ar itmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (SD) ze tří opakování. Malými písmeny jsou indikovány homogenní skupiny určující průkaznost mezi jednotlivými variantami, vyhodnocené následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti p = 0,05.

Při nedostatku dusíku a normální koncentraci CO_2 byl pozorován nárůst koncentrace gluteninů frakce HMW 1 vlivem sucha u varianty UV– DRY o 55 % a u varianty UV+ DRY o 76 %. Tyto rozdíly byly statisticky významné. Vliv dusíkatého hnojení se projevil zvýšením množství proteinů u hojených vzorků za normální koncentrace CO_2 a přirozených srážek při vyloučení UV záření (o 78 %) a bez vyloučení UV záření (o 58 %). Vliv zvýšené koncentrace CO_2 a UV záření nebyl u této frakce gluteninových proteinů prokázán.



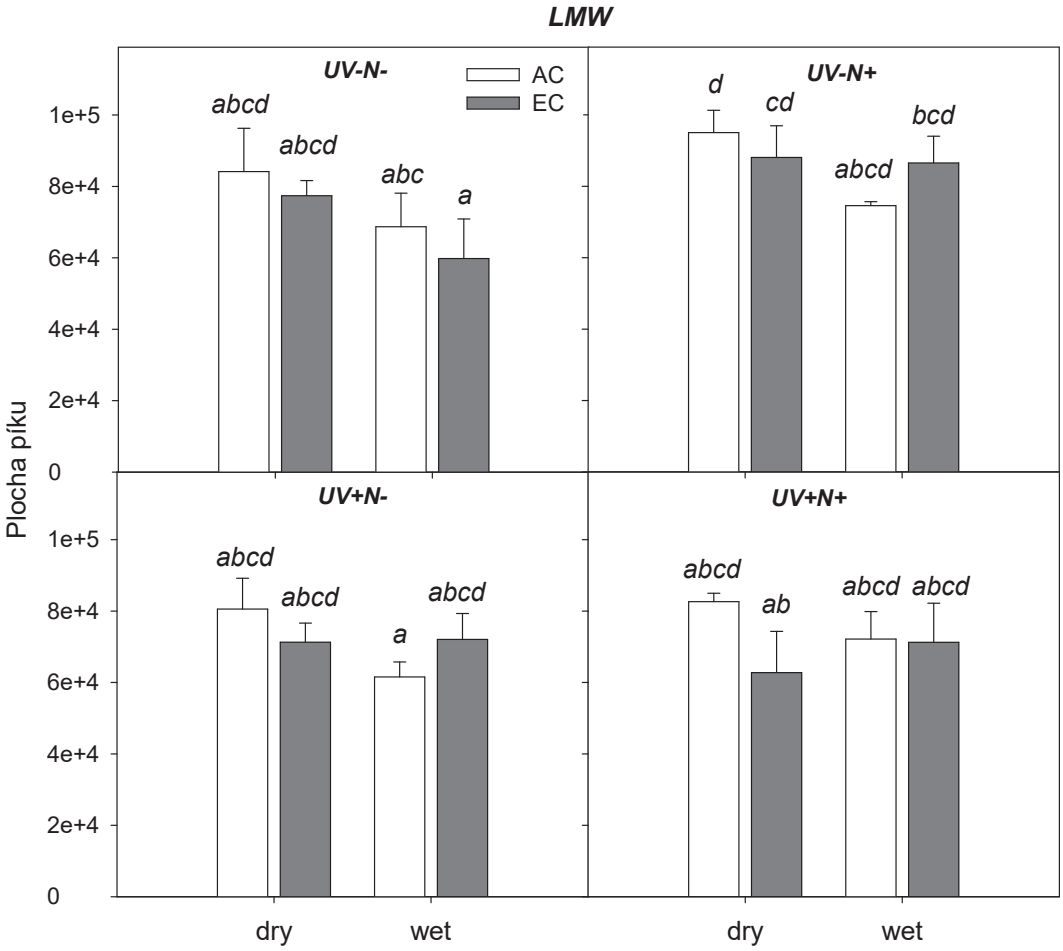
Obr. 23 Graf zobrazující srovnání ploch píků všech variant (koncentrace CO_2 – AC (400 μmol.mol^{-1}) vs. EC (700 μmol.mol^{-1}), dusíkaté hnojení – N– vs. N+ , sucho – dry vs. wet, UV záření – UV– vs. UV+) v rámci gluteninové frakce HMW 2. Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (SD) ze tří opakování. Malými písmeny jsou indikovány homogenní skupiny určující průkaznost mezi jednotlivými variantami, vyhodnocené následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti p = 0,05.

Zvýšená koncentrace CO_2 způsobila statisticky významný pokles koncentrace gluteninů frakce HMW 2 u varianty DRY UV+ N– o 33 %. Vlivem sucha došlo k významnému nárůstu gluteninů (o 57 %) za podmínek zvýšené koncentrace CO_2, vyloučení UV záření a nedostatku dusíku. Hnojení dusíkem způsobilo v podmínkách přirozených srážek nárůst množství proteinů této frakce u varianty AC UV– o 52 %, u varianty EC UV– o 73% a u variant EC UV+ a AC UV+ o 48 %. Tyto rozdíly byly statisticky významné. V důsledku vyloučení UV záření se za podmínek sucha, dostatku dusíkaté výživy a zvýšené koncentrace CO_2 významně zvýšil obsah gluteninových proteinů (o 50 %).



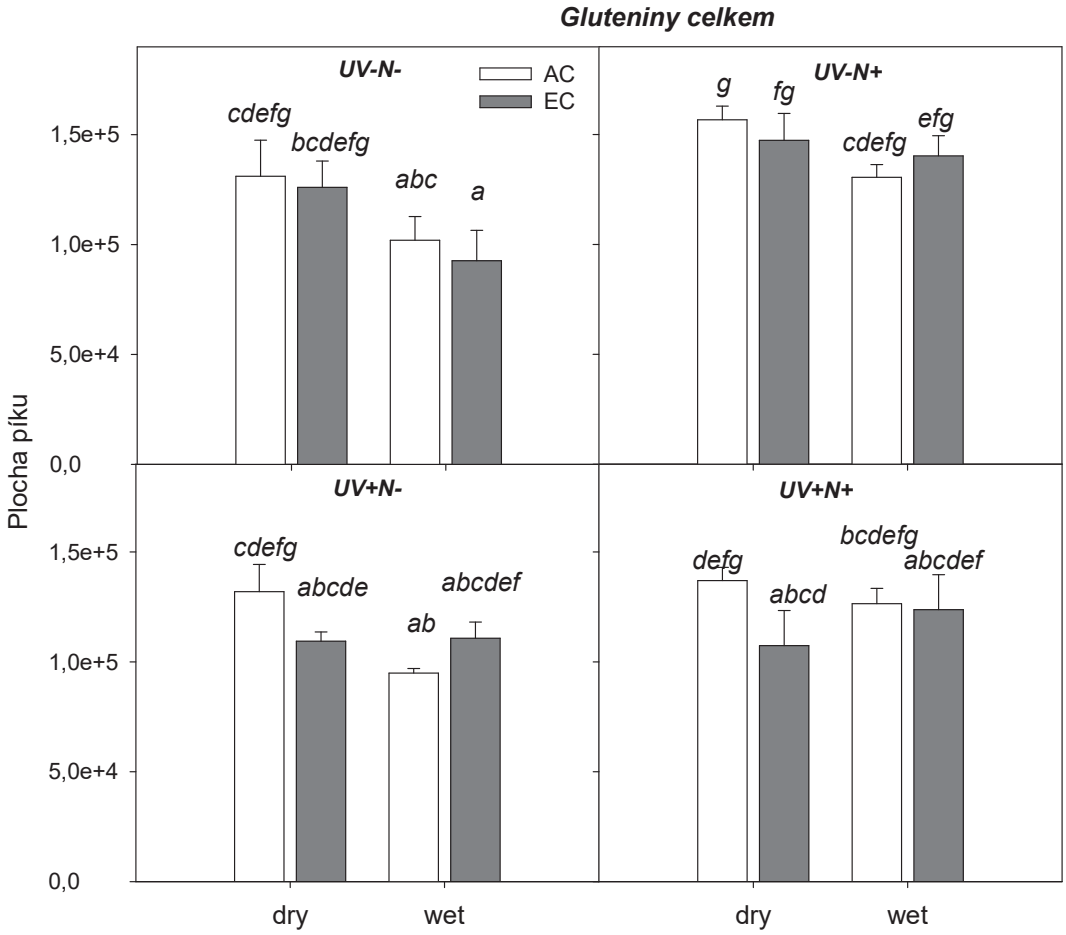
Obr. 24 Graf zobrazující srovnání ploch píků všech variant (koncentrace CO_2 – AC (400 μmol.mol^{-1}) vs. (EC 700 μmol.mol^{-1}), dusíkaté hnojení – N– vs. N+ , sucho – dry vs. wet, UV záření – UV– vs. UV+) v rámci gluteninové frakce HMW 3. Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (SD) ze tří opakování. Malými písmeny jsou indikovány homogenní skupiny určující průkaznost mezi jednotlivými variantami, vyhodnocené následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti p = 0,05.

Vliv zvýšené koncentrace CO_2 na množství gluteninových proteinů frakce HMW 3 byl prokázán při vyloučení srážek, nedostatku dusíkaté výživy a působení UV záření poklesem u varianty EC o 32 %. Za podmínek normální koncentrace CO_2, bez vyloučení UV záření a bez hnojení byl pozorován statisticky významný nárůst koncentrace gluteninů této frakce (o 77 %) u vzorků pěstovaných při vyloučení přirozených srážek oproti vzorkům, které byly srážkám vystaveny. Významný nárůst gluteninové frakce HMW 3 způsobený dusíkatým hnojením se projevil u variant AC DRY UV– (o 20 %), AC a EC WET UV– (o 80 %) a AC WET UV+ (o 100 %). UV záření nemělo na tuto frakci gluteninů vliv.



Obr. 25 Graf zobrazující srovnání ploch píků všech variant (koncentrace CO_2 – AC (400 μmol.mol^{-1}) vs. EC (700 μmol.mol^{-1}), dusíkaté hnojení – N– vs. N+ , sucho – dry vs. wet, UV záření – UV– vs. UV+) v rámci gluteninové frakce LMW. Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (SD) ze tří opakování. Malými písmeny jsou indikovány homogenní skupiny určující průkaznost mezi jednotlivými variantami, vyhodnocené následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti p = 0,05.

Byl prokázán vliv dusíkatého hnojení zvýšením koncentrace gluteninů frakce LMW při zvýšené koncentraci CO_2 u varianty WET UV– N+ o 48 %. Vyloučení UV záření statisticky významně navýšilo obsah gluteninů (o 40 %) za podmínek zvýšené koncentrace CO_2, sucha a dostatku dusíkaté výživy. Vliv zvýšené koncentrace CO_2 ani sucha se neprojevil.



Obr. 25 Graf zobrazující srovnání ploch píků všech variant (koncentrace CO_2 – AC (400 μmol.mol^{-1}) vs. EC (700 μmol.mol^{-1}), dusíkaté hnojení – N– vs. N+ , sucho – dry vs. wet, UV záření – UVp vs. UV+) v rámci celkového množství gluteninů. Sloupce znázorňují aritmetický průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (SD) ze tří opakování. Malými písmeny jsou indikovány homogenní skupiny určující průkaznost mezi jednotlivými variantami, vyhodnocené následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti p = 0,05.

Vlivem sucha došlo k významnému nárůstu celkové koncentrace gluteninů u varianty UV– N– při zvýšené koncentraci CO_2 (o 37 %) a u varianty UV+ N– při normální koncentraci CO_2 (o 35%). Hnojení dusíkem statisticky významně zvýšilo celkový obsah gluteninů při zvýšené koncentraci CO_2, působení přirozených srážek a vyloučení UV záření o 52 %. V důsledku vyloučení UV záření za sucha při dostatku dusíkaté výživy a zvýšené koncentraci CO_2 došlo ke zvýšení celkového množství gluteninů o 40 %. Tento rozdíl byl statisticky významný. Vliv zvýšené koncentrace CO_2 na celkové množství gluteninů nebyl prokázán.

5 DISKUSE

V této diplomové práci byl sledován vliv zvýšené koncentrace CO_2, dusíkatého hnojení, sucha a UV záření na obsah gluteninů a gliadinů u ozimé pšenice odrůdy Bohemia.

Nejvýznamnější vliv na koncentraci jednotlivých frakcí gliadinů a gluteninů mělo hnojení dusíkem. Koncentrace gliadinových proteinů byla významně zvýšena dusíkatým hnojením při působení přirozených srážek. Tento nárůst byl pozorován jak při normální koncentraci CO_2 u varianty UV– u frakcí ω-1,2 1 (o 63 %), ω-1,2 2 (o 47 %), ω-5,1 (o 63 %), ω-5 2 (o 55 %) a ω-5 3 (o 92 %) a u varianty UV+ u frakcí ω-1,2 3 (o 57%), ω-5,1 (o 112 %), ω-5 2 (o 86 %), ω-5 3 (o 120 %) a α 3 (o 45%), tak i při zvýšené koncentraci CO_2 u varianty UV– u frakcí ω-1,2 1 (o 60 %), ω-1,2 3 (o 53%), ω-5 2 (o 63 %) a β 1 (o 35 %) a u varianty UV+ u frakcí ω-1,2 1 (o 46 %), ω-5 2 (o 51 %), ω-5 3 (o 63 %) a α + (o 55 %). Při vyloučení přirozených srážek se pozitivní vliv hnojení dusíkem projevil pouze u gliadinů frakce ω-5 3 při normální koncentraci CO_2 a působení UV záření nárůstem o 50 %. Za podmínek normální koncentrace CO_2, přirozených srážek a vyloučení UV záření byl naopak u hnojené varianty frakce β 1 pozorován statisticky významný pokles množství gliadinů oproti variantě hnojené (o 45 %). Celkové množství gliadinů bylo významně ovlivněno dusíkatým hnojením při normální i zvýšené koncentraci CO_2 bez vyloučení UV záření a srážek (nárůst o 25 %). Také u gluteninů bylo zvýšení koncentrace proteinů jednotlivých frakcí při hnojení dusíkem pozorováno převážně u varianty WET. Při normální koncentraci CO_2 byl u hnojených vzorků s vyloučením UV záření zaznamenán významný nárůst frakcí HMW 1 (o 78 %), HMW 2 (o 52 %) a HMW 3 (o 80 %) a bez vyloučení UV záření u frakcí HMW 1 (o 58 %), HMW 2 (o 48 %) a HMW 3 (o 100 %). Pří zvýšené koncentraci CO_2 zvýšilo dusíkaté hnojení při vyloučení UV záření koncentraci proteinů frakcí HMW 2 (o 73 %), HMW 3 (o 80 %) a LMW (o 48 %) a při působení UV záření HMW 2 (o 48 %). Za sucha byl obsah gluteninů v důsledku hnojení vyšší pouze u frakce HMW 3 (o 20 %) a to pro variantu AC UV–. Celkový obsah gluteninů byl u hnojené varianty významně zvýšen (o 52 %) při zvýšené koncentraci CO_2, normální úrovni srážek a vyloučení UV záření.

Hamříková [97] ve své diplomové práci také uvádí, že nejvíce gliadinových podjednotek reagovalo na hnojení dusíkem. Významné zvýšení hnojené varianty zaznamenala u gliadinových frakcí ω-1,2 3, ω-5 2 a všech frakcí β a α. Zvýšení relativního množství proteinů jednotlivých frakcí lepku popisují ve své práci také Wieser a Seilmeier [44], kteří zaznamenali, že při hnojení dusíkem je množství ω-5 a ω-1,2gliadinů a vysokomolekulárních gluteninů zvýšeno. Na rozdíl od našich výsledků však bylo v jejich práci zastoupení γ-gliadinů a nízkomolekulárních gluteninů sníženo. Wroblewitz a kol. [98] popisují významný vliv dusíkatého hnojení na všechny gluteninové podjednotky s výjimkou podjednotek x-HMW. Podle jejich práce byl u LMW gluteninových podjednotek prokázán významný pokles vlivem dusíkaté výživy, což je v rozporu s naší prací. Stejně jako v naší studii y-HMW podjednotky byly při jejich pozorování silně zvýšeny při hnojení dusíkem, avšak na rozdíl od našeho experimentu gliadinové podjednotky nebyly statisticky významně dusíkatou výživou ovlivněny s výjimkou ω-5 podjednotek, které prokázaly pokles při zvýšené dusíkaté výživě.

Velmi důležitým faktorem ovlivňujícím koncentraci pšeničných lepkových proteinů je také sucho. Při vyloučení srážek byl u pěti frakcí gliadinových proteinů pozorován významný pokles. Za podmínek normální koncentrace CO_2 byl snížen obsah proteinů frakce ω-1,2 1 (N+ UV– o 25 %), ω-5 1 (o 38 %), ω-5 3 (N+ UV– o 48 %) a β 1 (N– UV– o 69 %) a za podmínek zvýšené koncentrace CO_2 frakce ω-1,2 3 (N+ UV– o 27 %, N+ UV+ o 41 %) a ω-5 1 (N– UV+ o 46 %). Celková koncentrace pšeničných gliadinů nebyla suchem významně ovlivněna. Všechny frakce gluteninových proteinů naopak vykazovaly za sucha významný nárůst, kromě frakce LMW, která nebyla vyloučením srážek významně ovlivněna. Frakce HMW 1 varianty N+ UV– (zvýšení o 55%) a N– UV+ (zvýšení o 76 %) a frakce HMW 3 varianta N– UV+ (zvýšení o 77 %) reagovaly při normální koncentraci CO_2, při zvýšené koncentraci CO_2 vzrostlo množství proteinů frakce HMW 2 varianty EC N– UV– (o 57 %). Celková koncentrace gluteninů byla významně zvýšena při vyloučení srážek u varianty AC N– UV+ (o 35 %) a EC N– VU– (o 37 %).

Mnoho studií popisuje zvýšení celkové koncentrace proteinů v pšeničném zrnu při nedostatku vody [99, 100]. Stejně jako my i Hamříková [97] pozorovala významné snížení obsahu gliadinových proteinů vlivem sucha, ačkoli při jejím experimentu byla ovlivněna pouze frakce α 2. Podobně jako v naší práci popisují pokles koncentrace α-a γ-gliadinů za sucha Yang a kol. [101], kteří však na rozdíl od nás zaznamenali také u HMW gluteninových podjednotek v důsledku deficitu vody pokles a nárůst koncentrace zjistili pouze u LMW gluteninových podjednotek. V rozporu s našimi výsledky jsou Zhang a kol. [100], kteří zaznamenali nárůst celkové koncentrace gliadinů při vystavení pšenice kultivaru Gaocheng 8901 nedostatku vody.

Vliv UV záření se také významně projevil, a to jak na celkové koncentraci gliadinů (varianta DRY EC N– UV– zvýšení o 25 %), tak i na celkovém množství gluteninů (varianta DRY EC N+ UV– zvýšení o 40 %). Nejvíce podjednotek reagovalo za sucha nezávisle na vzdušné koncentraci CO_2 a limitaci dusíkem. Vyloučení UV záření způsobilo významný nárůst obsahu proteinů u frakcí gliadinů ω-5 1 (DRY AC N– o 71 %), ω-5 2 (DRY EC N– o 64 %), β 1 (WET AC N– a EC N+ o 80 %, DRY EC N+ o 48 %) a α 3 (DRY EC N– o 35 %) a gluteninů HMW 2 (DRY EC N+ o 50 %) a LMW (DRY EC N+ o 40 %). Výjimkou byla pouze gliadinová frakce ω-5 3 u které byl při normální koncentraci CO_2, hnojení dusíkem a vyloučení srážek pozorován významný nárůst koncentrace proteinů při působení UV záření (o 66 %).

Studie zabývající se vlivem UV-B záření na kvalitu pšeničného zrna přinášejí často protichůdné výsledky. Hamříková [97] zaznamenala vliv UV záření pouze u gliadinové frakce β 1, která podle jejích výsledků vykazovala nárůst množství proteinů při působení UV záření. Yao a kol [102] zaznamenali pokles celkové koncentrace proteinů v zrnu u ozimé pšenice kultivaru Shiman 15 při zvýšené úrovni UV-B záření. Naopak při pokusech s jarní pšenicí Zu a kol [103] popisují zvýšení koncentrace proteinů pšeničného zrna v důsledku zvýšení úrovně UV-B záření a Lizana a kol.[104] neprokázali významný vliv UV-B záření na koncentraci pšeničných proteinů.

Méně významným faktorem ovlivňujícím složení pšeničného lepku byla zvýšená koncentrace CO_2. Při zvýšené koncentraci CO_2, působení UV záření, vyloučení přirozených srážek a bez hnojení dusíkem byla snížena koncentrace gliadinových proteinů frakce β 1 (o 31 %) a gluteninových proteinů frakce HMW 2 (o 33 %) a HMW 3 (o 32 %). Naopak nárůst obsahu proteinů frakce gliadinů β 1 při zvýšené koncentraci CO_2 byl pozorován u hnojené varianty WET UV– (o 65 %) a stejným způsobem reagovala i nehnojená varianta WET UV+ frakce ω-5 1 (EC nárůst o 63 %).

Hamříková ve své práci [97] zjistila také významný pokles obsahu proteinů gliadinové frakce β 1 vlivem zvýšené koncentrace CO_2. Ve shodě s našimi výsledky Högy a kol [105] zaznamenali u pšenice jarní odrůdy Triso pokles celkové koncentrace pšeničných proteinů i pokles koncentrace samotných lepkových proteinů při zvýšené koncentraci CO_2. Podle jejich studie celkové gliadiny a jejich podjednotky ω-5,ω-2,1 α a γ byly pří zvýšené koncentraci CO_2 významně sníženy a celkové gluteniny a jejich podjednotky nebyly významně ovlivněny. Bylo prokázáno, že pšenice pěstovaná za podmínek zvýšené koncentrace CO_2 vykazuje vyšší poměr C/N a předpokládá se, že toto relativní snížení celkového N vzhledem k množství C povede ke snížení celkového množství proteinů [105]. Při zvýšené koncentraci CO_2 zaznamenali také Wieser a kol [35] a Hogy a kol. [59] průkazné snížení celkového množství proteinů pšeničného zrna a změny ve složení jednotlivých proteinových frakcí s výjimkou albuminů a globulinů, přičemž tento efekt se více projevil u gliadinových proteinů a jejich podjednotek než u frakcí gluteninů. Tento jev vysvětlují například Wieser a Seilmeier [44] tím, že syntéza gliadinů a glutenů je regulována dostupností dusíku při vývoji zrna a proto jsou více ovlivněny na dusík a glutamin bohaté gliadiny než gluteniny [105].

6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo sledovat vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého, dusíkatého hnojení, sucha a UV záření na obsah proteinů gluteninové a gliadinové frakce lepku.

Ozimá pšenice odrůdy Bohemia byla kultivována na Experimentální stanici Centra výzkumu globální změny AV ČR v.v.i. v Domanínku u Bystřice nad Pernštejnem v Českomoravské vrchovině (49°521'N, 16°235'E, nadmořská výška 575 m). Experiment probíhal ve 24 komorách umožňujících automatickou fumigaci zvýšenou koncentrací CO_2, manipulaci srážek a vyloučení UV radiace u poloviny komor. Vzorky byly vysety 10. října 2012 v hustotě 4 MKS na ha. V polovině května byla zahájena fumigace zvýšenou koncentrací CO_2 v koncentraci 700 $\mu mol.mol^{-1}$. Parcelky uvnitř komor byly rozděleny na dvě části, jedna byla hnojena dávkou dusíku 200 kg N ha^{-1} a druhá hnojena nebyla. Sklizeň tprobíhala ručně.

Gliadinové proteiny byly separovány metodou A-PAGE, separace gluteninových proteinů byla provedena metodou SDS-PAGE. Obsah proteinů jednotlivých frakcí gliadinů a gluteninů byl stanoven počítačovou denzitometrií.

Za nejvýznamnější faktor ovlivňující kvalitu pšeničného zrna lze jednoznačně považovat hnojení dusíkem, které významně zvýšilo obsah většiny gliadinových podjednotek a všech gluteninových podjednotek i celkovou koncentraci gliadinů a gluteninů. Nárůst koncentrace proteinů jednotlivých frakcí se projevil zejména při působení přirozených srážek (všechny ω-1,2 gliadiny, ω-5 gliadiny, gliadinová frakce β 1, α 1 a α 3 a všechny frakce gluteninů), sucho bylo ve většině případů limitujícím faktorem.

Významný byl i vliv sucha, které v rámci gliadinové frakce způsobilo významné snížení obsahu proteinů u frakcí ω-1,2 1 a 3, ω-5 3 a β 1. U gluteninů byl pozorován opačný efekt. Vyloučení srážek významně zvýšilo jak celkové množství gluteninů, tak i všechny frakce HMW gluteninů.

Vyloučení UV záření zvýšilo významně koncentraci gliadinových frakcí ω-5 1 a 2, β 1 a α 3 a gluteninových frakcí HMW 2 a LMW.

Zvýšená koncentrace CO_2 se projevila pouze v malé míře a její účinky byly značně protichůdné. Očekávaný pokles obsahu proteinů byl pozorován u frakce gluteninů HMW 2 a 3 a gliadinové frakce β 1 při působení UV záření, nedostatku dusíku a vyloučení přirozených srážek. Odlišně reagovaly vzorky při působení přirozených srážek. Varianta WET N+ UV– frakce gliadinů β 1 vykazovala významný nárůst obsahu proteinů a stejným způsobem reagovala varianta WET N– UV+ frakce ω-5 1.

7 LITERATURA

[1] KRÄUCHI, N. Potential impacts of a climate change on forest ecosystems. *Forest Pathology*. 1993, **23**(1), 28-50. DOI: 10.1111/j.1439-0329.1993.tb00804.x. ISSN 1437-4781. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0329.1993.tb00804.x

[2] JOOS, F. a R. SPAHNI. Rates of change in natural and anthropogenic radiative forcing over the past 20,000 years. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008, **105**(5), 1425-1430. DOI: 10.1073/pnas.0707386105. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0707386105

[3] MAREK, Michal V. *Uhlík v ekosystémech České republiky v měnícícm se klimatu*. 1. Praha: Academia, 2011. ISBN 978-80-904351-1-7.

[4] FORSTER, P. V. et al Changes in Atmospheric Constituents and in Radiative Forcing. In: Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovermental Planel on Climate Change [Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K. B., Tignor, M., Miller, H. L. (Eds)]. Cambridge university Press, Cambridge, United Kingdom a New York, NY, USA, p 207.

[5] SMITH, T. M., W. P. CRAMER, R. K. DIXON, R. LEEMANS, R. P. NEILSON a A. M. SOLOMON. The Global Terrestrial Carbon Cycle. *Terrestrial Biospheric Carbon Fluxes*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1993, **70**, 19. DOI: 10.1007/978-94-011-1982-5_2. ISBN 978-0-7923-2502-4. Dostupné také z: http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-94-011-1982-5_2

[6] ETHERIDGE, D. M., L. P. STEELE, R. L. LANGENFELDS, R. J. FRANCEY, J.-M. BARNOLA a V. I. MORGAN. Natural and anthropogenic changes in atmospheric CO2 over the last 1000 years from air in Antarctic ice and firn. *Journal of Geophysical Research*. 1996, **101**, 4115-4128.

[7] WAHLEN, M., D. ALLEN, B. DECK a A. HERCHENRODER. Initial measurements of CO 2 concentrations (1530 to 1940 AD) in air occluded in the GISP 2 Ice Core from central Greenland. *Geophysical Research Letters*. 1991, **18**(8), 1457-1460. DOI: 10.1029/91GL01724. ISSN 00948276. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1029/91GL01724

[8] CANADELL, J. G., C. LE QUERE, M. R. RAUPACH, et al. Contributions to accelerating atmospheric CO2 growth from economic activity, carbon intensity, and efficiency of natural sinks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007, **104**(47), 18866-18870. DOI: 10.1073/pnas.0702737104. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0702737104

[9] Trends in Atmospheric Carbon Dioxide. *National Oceanic and Atmospheric Administration* [online]. 2007 [cit. 2014-04-08]. Dostupné z: http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/

[10] HONISCH, B., N. G. HEMMING, D. ARCHER, M. SIDDALL a J. F. MCMANUS. Atmospheric Carbon Dioxide Concentration Across the Mid-Pleistocene Transition. *Science*. 2009, **324**(5934), 1551-1554. DOI: 10.1126/science.1171477. ISSN 0036-8075. Dostupné také z: http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1171477

[11] NÁTR, Lubomír. *Koncentrace CO_2 a rostliny*. 1. vyd. Praha: ISV, 2000. ISBN 80-85866-62-5.

[12] BAZZAZ, F. A. Elevated CO2 and plant prodictivity in the 21 st century: Can we feed billions and preserve biological diversity? In: GARAB, G. *Proceedings of the XIth International Congress of Photosynthesis*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1998, s. 3923-3940.

[13] KEELING, C. D., J. F. S. CHIN a T. P. WHORF. Increased activity of northern vegetation inferred from atmospheric CO2 measurements. *Nature*. 1996-7-11, **382**(6587), 146-149. DOI: 10.1038/382146a0. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/382146a0

[14] ŠPUNDA, V., J. KALINA, O. URBAN, V.C. LUIS, I. SIBISSE, J. PUÉRTOLAS, M. ŠPRTOVÁ a M.V. MAREK. Diurnal dynamics of photosynthetic parameters of Norway spruce trees cultivated under ambient and elevated CO2: the reasons of midday depression in CO2 assimilation. *Plant Science*. 2005, **168**(5), 1371-1381. DOI: 10.1016/j.plantsci.2005.02.002. ISSN 01689452. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016894520500052X

[15] AINSWORTH, ELIZABETH A. a ALISTAIR ROGERS. The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO 2]: mechanisms and environmental interactions. *Plant, Cell*. 2007, **30**(3), 258-270. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2007.01641.x. ISSN 01407791. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3040.2007.01641.x

[16] URBAN, O. Psysiological impacts of elevated CO2 concentration ranging from molecular to whole plant responses. *Photosynthetica*. 2003, **41**(1), 9-20. DOI: 10.1023/A:1025891825050. ISSN 03003604. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1023/A:1025891825050

[17] LUO, YiqI., James REYNOLDS, Yingping WANG a David WOLFE. A search for predictive understanding of plant responses to elevated [CO2]. *Global Change Biology*. 1999, **5**(2), 143-156. DOI: 10.1046/j.1365-2486.1999.00215.x. ISSN 1354-1013. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2486.1999.00215.x

[18] GONZALEZ-MELER, M. A. a J. N. SIEDOW. Direct inhibition of mitochondrial respiratory enzymes by elevated CO2: does it matter at the tissue or whole-plant level? *Tree Physiology*. 1999, **19**(4-5), 253-259. DOI: 10.1093/treephys/19.4-5.253. ISSN 0829-318x. Dostupné také z: http://treephys.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/treephys/19.4-5.253

[19] DRAKE, Bert G., Miquel A. GONZÀLEZ-MELER a Steve P. LONG. MORE EFFICIENT PLANTS: A Consequence of Rising Atmospheric CO 2 ? *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1997, **48**(1), 609-639. DOI: 10.1146/annurev.arplant.48.1.609. ISSN 1040-2519. Dostupné také z: http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.48.1.609

[20] PEÑUELAS, JOSEP a ROSER MATAMALA. Changes in N and S Leaf Content, Stomatal Density and Specific Leaf Area of 14 Plant Species during the Last Three Centuries of CO 2 Increase. *Journal of Experimental Botany*. 1990, **41**(9), 1119-1124. DOI: 10.1093/jxb/41.9.1119. ISSN 0022-0957. Dostupné také z http://jxb.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/jxb/41.9.1119

[21] *FAOSTAT* [online]. 2011 [cit. 2014-04-11].

[22] PŘÍHODA, Josef, Marie HRUŠKOVÁ a Pavel SKŘIVAN. *Cereální chemie a technologie*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2003, 202 s. ISBN 80-708-0530-7.

[23] SHEWRY, P. R. The HEALTHGRAIN programme opens new opportunities for improving wheat for nutrition and health. *Nutrition Bulletin*. 2009, **34**(2): 225-231. DOI: 10.1111/j.1467-3010.2009.01747.x. ISSN 14719827. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1467-3010.2009.01747.x

[24] HORÁKOVÁ, V. Pekařská jakost odrůd pšenice ozimé registrovaných v roce 2010. In: *Jakost obilovin 2010*. Kroměříž: Agrofest fyto a.s., 2010, s. 42-44.

[25] HRUBÍK, K. a F. NOVOTNÝ. Nové směry v hodnocení jakosti potravinářské pšenice. *Obilnářské listy*. 1997, **5**(3), 49-52.

[26] VACULKOVÁ, Kateřina, Ondřej JIRSA, Petr MARTINEK a Marta BALOUNOVÁ. Hodnocení kvality zrna vybraných vzorků netradiční pšenice a bezpluchého ječmene. *Obilnářské listy*. 2010, **XVIII**(3), 71-77. Dostupné také z: http://www.vukrom.cz/obilnarske-listy/pdf-ol/obil-listy-2-10.pdf

[27] KABÁTOVÁ, Naděžda, Radvana ŠULOVÁ a Pavel RYŠAVÝ. *Jednotné pracovní postupy - Testování odrůd*. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, 2012, 1 CD-ROM. ISBN 978-80-7401-063-7

[28] ČSN EN ISO 7971-3. *Obiloviny - Stanovení objemové hmotnosti zvané "hektolitrová váha" - Část 3: Rutinní metoda*. Brno: Ing. Jiří Hrazdil, 2009. 12 s

[29] KOVAŘÍKOVÁ, Dana a Věra NETOLICKÁ. *Vzdělávací materiál pro předmět technologická příprava* [online]. 2011 [cit. 2016-11-23]. Dostupné z: http://www.spspas.cz/esf-technologicka-priprava

[30] FEIL, B. The inverse yield-protein relationship in cereals: possibilities and limitations for genetically improving the grain protein yield. *Trends Agron*. 1997, (1): 103-119.

[31] WEEGELS, P.L., R.J. HAMER a J.D. SCHOFIELD. Functional Properties of Wheat Glutenin. *Journal of Cereal Science*. 1996, **23**(1): 1-17. DOI: 10.1006/jcrs.1996.0001. ISSN 07335210. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521096900016

[32] SHEWRY, P. R. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*. 2002, **53**(370): 947-958. DOI: 10.1093/jexbot/53.370.947. ISSN 14602431. Dostupné také z: http://jxb.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/jexbot/53.370.947

[33] WRIGLEY, Colin W, Ferenc BÉKÉS a Walter BUSHUK. *Gliadin and glutenin: the unique balance of wheat quality*. St. Paul, Minn.: AACC International, c2006, x, 466 p. ISBN 978-189-1127-519.

[34] OSBORNE, T. B. *Vegetable proteins*. London: Longsmas Green, 1924.

[35] WIESER, Herbert, Remy MANDERSCHEID, Martin ERBS a Hans-Joachim WEIGEL. Effects of Elevated Atmospheric CO 2 Concentrations on the Quantitative Protein Composition of Wheat Grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, **56**(15): 6531-6535. DOI: 10.1021/jf8008603. ISSN 0021-8561. Dostupné z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf8008603

[36] GAO, Liyan, Aili WANG, Xiaohui LI, Kun DONG, Ke WANG, Rudi APPELS, Wujun MA a Yueming YAN. Wheat quality related differential expressions of albumins and globulins revealed by two-dimensional difference gel electrophoresis (2-D DIGE). *Journal of Proteomics*. 2009, **73**(2): 279-296. DOI: 10.1016/j.jprot.2009.09.014. ISSN 18743919. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874391909002656

[37] GIANIBELLI, M. C., O. R. LARROQUE, F. MACRITCHIE a C. W. WRIGLEY. Biochemical, Genetic, and Molecular Characterization of Wheat Glutenin and Its Component Subunits. *Cereal Chemistry*. 2001, **78**(6): 635-646. DOI: 10.1094/CCHEM.2001.78.6.635. ISSN 0009-0352. Dostupné také z: http://cerealchemistry.aaccnet.org/doi/abs/10.1094/CCHEM.2001.78.6.635

[38] LÁSZTITY, Radomir. *The chemistry of cereal proteins*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 1996. ISBN 08-493-2763-6.

[39] SONG, Yihu a Qiang ZHENG. Dynamic rheological properties of wheat flour dough and proteins. *Trends in Food Science*. 2007, **18**(3): 132-138. DOI: 10.1016/j.tifs.2006.11.003. ISSN 09242244. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224406003451

[40] HILL, K., E. HORVÁTH-SZANICS, Gy. HAJÓS a É. KISS. Surface and interfacial properties of water-soluble wheat proteins. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2008, **319**(1-3): 180-187. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2007.06.047. ISSN 09277757. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775707006693

[41] JIMENEZ, T. a M.A. MARTINEZ-ANAYA. Amylases and Hemicellulases in Breadmaking. Degradation By-Products and Potential Relationship with Functionality. *Food Science*. 2001, **7**(1): 5-14. DOI: 10.1106/7U5G-5AKQ-HVBQ-4XA0. ISSN 15321738. Dostupné také z: http://fst.sagepub.com/cgi/doi/10.1106/7U5G-5AKQ-HVBQ-4XA0

[42] COURTIN, C.M. a J.A. DELCOUR. Arabinoxylans and Endoxylanases in Wheat Flour Bread-making. *Journal of Cereal Science*. 2002, **35**(3): 225-243. DOI: 10.1006/jcrs.2001.0433. ISSN 07335210. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521001904333

[43] WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology.* 2007, **24**, 115-119.

[44] WIESER, Herbert a Werner SEILMEIER. The influence of nitrogen fertilisation on quantities and proportions of different protein types in wheat flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1998, **76**(1): 49-55.

[45] GROSCH, W. a H. WIESER. Redox Reactions in Wheat Dough as Affected by Ascorbic Acid. *Journal of Cereal Science*. 1999, **29**(1): 1-16. DOI: 10.1006/jcrs.1998.0218. ISSN 07335210. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521098902181

[46] WIESER, H. CAUVAIN, ed. by Stanley P. *Bread making: improving quality*. 1st published. Boca Raton: CRC Press, 2003, s. 424-426. ISBN 1855735539.

[47] TILLEY, Katherine A., Rachel E. BENJAMIN, Katherine E. BAGOROGOZA, B. Moses OKOT-KOTBER, Om PRAKASH a Haidoo KWEN. Tyrosine Cross-Links: Molecular Basis of Gluten Structure and Function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001, **49**(5): 2627-2632. DOI: 10.1021/jf010113h. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf010113h

[48] PIBER, Michael a Peter KOEHLER. Identification of Dehydro-Ferulic Acid-Tyrosine in Rye and Wheat: Evidence for a Covalent Cross-Link between Arabinoxylans and Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, **53**(13): 5276-5284. DOI: 10.1021/jf050395b. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf050395b

[49] BARAK, Sheweta, Deepak MUDGIL a B. S. KHATKAR. Biochemical and Functional Properties of Wheat Gliadins: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2014, **55**(3), 357-368. DOI: 10.1080/10408398.2012.654863. ISSN 1040-8398. Dostupné také z: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2012.654863

[50] WIESER, H. Relation between gliadin structure and coeliac toxicity. *Acta Paediatrica*. 1996, **85**(s412): 3-9. DOI: 10.1111/j.1651-2227.1996.tb14239.x. ISSN 0803-5253. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1651-2227.1996.tb14239.x

[51] DZIUBA, Marta, Dorota NAŁECZ, Iwona SZERSZUNOWICZ a Jacek WAGA. Proteomic Analysis of Wheat α/A-and β-Gliadins. *Czech J. Food Sci*. 2014, **32**(5), 437-442. Dostupné také z: http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/133171.pdf

[52] WIESER, H. a R. KIEFFER. Correlations of the Amount of Gluten Protein Types to the Technological Properties of Wheat Flours Determined on a Micro-scale. *Journal of Cereal Science*. 2001, **34**(1): 19-27. DOI: 10.1006/jcrs.2000.0385. ISSN 07335210. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521000903850

[53] SHEWRY, P. R., B. J. MIFLIN, ELLEN J-L. LEW a D. D. KASARDA. The Preparation and Characterization of an Aggregated Gliadin Fraction from Wheat. *Journal of Experimental Botany*. 1983, **34**(11): 1403-1410. DOI: 10.1093/jxb/34.11.1403. ISSN 0022-0957. Dostupné také z: http://jxb.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/jxb/34.11.1403

[54] HUEBNER, R. F. a J. A. BIETZ. Improved chromatographic separation and characterization of ethanol-soluble wheat proteins. *Cereal chemistry*. 1993, (70): 506-506.

[55] SHEWRY, P.R. a A.S. TATHAM. Disulphide Bonds in Wheat Gluten Proteins. *Journal of Cereal Science*. 1997, **25**(3): 207-227. DOI: 10.1006/jcrs.1996.0100. ISSN 07335210. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521096901009

[56] WIESER, H. a G. ZIMMERMANN. Importance of amounts and proportions of high molecular weight subunits of glutenin for wheat quality. *European Food Research and Technology*. 2000-3-22, **210**(5): 324-330. DOI: 10.1007/s002170050558. ISSN 1438-2377. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/s002170050558

[57] WALTER, Dane B. *Gluten: sources, composition and health effects*. New York: Nova Biomedical, c2013, s. 71-86. Food science and technology series (Nova Science Publishers). ISBN 1626183430.

[58] KIMBALL, BRUCE A., PAUL J. PINTER, RICHARD L. GARCIA, et al. Productivity and water use of wheat under free-air CO2 enrichment. *Global Change Biology*. 1995, **1**(6), 429-442. DOI: 10.1111/j.1365-2486.1995.tb00041.x. ISSN 1354-1013. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2486.1995.tb00041.x

[59] HÖGY, P., H. WIESER, P. KÖHLER, K. SCHWADORF, J. BREUER, J. FRANZARING, R. MUNTIFERING a A. FANGMEIER. Effects of elevated CO 2 on grain yield and quality of wheat: results from a 3-year free-air CO 2 enrichment experiment. *Plant Biology*. 2009, **11**, 60-69. DOI: 10.1111/j.1438-8677.2009.00230.x. ISSN 14358603. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1438-8677.2009.00230.x

[60] KIMBALL, B.A., K. KOBAYASHI a M. BINDI. Responses of Agricultural Crops to Free-Air CO2 Enrichment. *Advances in Agronomy*. 2002, **77**, 293. DOI: 10.1016/S0065-2113(02)77017-X. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S006521130277017X

[61] AINSWORTH, Elizabeth A. a Stephen P. LONG. What have we learned from 15 years of free-air CO2 enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO2. *New Phytologist*. 2005, **165**(2), 351-372. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2004.01224.x. ISSN 0028646x. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-8137.2004.01224.x

[62] HÖGY, Petra, Matthias KECK, Karsten NIEHAUS, Jürgen FRANZARING a Andreas FANGMEIER. Effects of atmospheric CO2 enrichment on biomass, yield and low molecular weight metabolites in wheat grain. *Journal of Cereal Science*. 2010, **52**(2), 215-220. DOI: 10.1016/j.jcs.2010.05.009. ISSN 07335210. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521010001062

[63] SINCLAIR, Thomas R. Historical Changes in Harvest Index and Crop Nitrogen Accumulation. *Crop Science*. 1998, **38**(3), 638-. DOI: 10.2135/cropsci1998.0011183X003800030002x. ISSN 0011-183x. Dostupné také z: https://www.crops.org/publications/cs/abstracts/38/3/CS0380030638

[64] BARNEIX, Atilio J. Physiology and biochemistry of source-regulated protein accumulation in the wheat grain. *Journal of Plant Physiology*. 2007, **164**(5), 581-590. DOI: 10.1016/j.jplph.2006.03.009. ISSN 01761617. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0176161706001246

[65] COTRUFO, M. Francesca, Phil INESON a AndY. SCOTT. Elevated CO2 reduces the nitrogen concentration of plant tissues. *Global Change Biology*. 1998, **4**(1), 43-54. DOI: 10.1046/j.1365-2486.1998.00101.x. ISSN 1354-1013. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2486.1998.00101.x

[66] JABLONSKI, L. M., WANG, X. a CURTIS, P. S. Plant reproduction under elevated CO_2 conditions: ameta-analysis of reports on 79 crop and wild species. *New Phytologist*. 2002, roč. 156, s. 9-26.

[67] LOLADZE, Irakli. Rising atmospheric CO2 and human nutrition: toward globally imbalanced plant stoichiometry? *Trends in Ecology*. 2002, **17**(10), 457-461. DOI: 10.1016/S0169-5347(02)02587-9. ISSN 01695347. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169534702025879

[68] HÖGY, P., H. WIESER, P. KÖHLER, K. SCHWADORF, J. BREUER, M. ERBS, S. WEBER a A. FANGMEIER. Does elevated atmospheric CO2 allow for sufficient wheat grain quality in the future? *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 2009, **82**(2), 114-121. Dostupné také z: http://pub.jki.bund.de/index.php/JABFQ/article/view/2089/2474

[69] STONE, P. J. a R. SAVIN. Grain quality and its physiological determinants. SATORRE, Emilio H a Gustavo A SLAFER. *Wheat: ecology and physiology of yield determination*. New York: Food Products Press, c1999, s. 85-120. ISBN 1560228741.

[70] ERBS, Martin, Remy MANDERSCHEID, Gisela JANSEN, Sylvia SEDDIG, Andreas PACHOLSKI a Hans-Joachim WEIGEL. Effects of free-air CO2 enrichment and nitrogen supply on grain quality parameters and elemental composition of wheat and barley grown in a crop rotation. *Agriculture, Ecosystems*. 2010, **136**(1-2), 59-68. DOI: 10.1016/j.agee.2009.11.009. ISSN 01678809. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167880909003405

[71] RUMBO, Martin, Fernando Gabriel CHIRDO, Sergio Alejandro GIORGIERI, Carlos Alberto FOSSATI a Maria Cristina AÑÓN. Preparative Fractionation of Gliadins by Electrophoresis at pH 3.1 (A-PAGE). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999, **47**(8), 3243-3247. DOI: 10.1021/jf990001e. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf990001e

[72] Petr, Pavel DOSTÁLEK a Igor HOCHEL. Metody stanovení lepkových bílkovin v potravinách. *Chemické listy*. 2008, (102), 132-137. Dostupné také z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_05_327-337.pdf

[73] LESTER, Diane R. Gluten measurement and its relationship to food toxicity for celiac disease patients. *Plant Methods*. 2008, **4**(1), 26-. DOI: 10.1186/1746-4811-4-26. ISSN 1746-4811. Dostupné také z: http://www.plantmethods.com/content/4/1/26

[74] BIETZ, J.A. a D.G. SIMPSON. Electrophoresis and chromatography of wheat proteins: available methods, and procedures for statistical evaluation of the data. *Journal of Chromatography A*. 1992, **624**(1-2), 53-80. DOI: 10.1016/0021-9673(92)85674-I. ISSN 00219673. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002196739285674I

[75] GARCA-DESCALZO, Laura, Eva GARCA-LPEZ, Alberto ALCZAR, Fernando BAQUERO a Cristina CI. Gel Electrophoresis of Proteins. *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. InTech, 2012. DOI: 10.5772/37514. ISBN 978-953-51-0458-2. Dostupné také z: http://www.intechopen.com/books/gel-electrophoresis-principles-and-basics/gel-electrophoresis-of-proteins

[76] ÖTLEŞ, Semih. *Handbook of food analysis instruments*. Boca Raton, FL: CRC Press, c2009, xv, 525 p. ISBN 14-200-4566-0.

[77] ŠÍPAL, Zdeněk. *Biochemie: Celostát.vysokoškol.učeb.pro stud.pedag.a přírodověd.fak.stud.oboru 76-12-8 učitelství všeobecněvzdělávacích předmětů*. 1.vyd. Praha: SPN, 1992, 479 s. Učebnice pro vysoké školy (Státní pedagogické nakladatelství). ISBN 80-042-1736-2.

[78] MENTER, Paul. Acrylamide polymerization-a practical approach. In: *Electrophoresis* [online]. [cit. 2016-02-07]. Dostupné z: http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_1156.pdf

[79] LAFIANDRA, Domenico a Donald D. KASARDA. One- and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis in a single gel: separation of wheat proteins. *Cereal Chemistry*. 1985, **62**(5), 314-319. Dostupné také z: http://www.aaccnet.org/publications/cc/backissues/1985/Documents/chem62_314.pdf

[80] WRIGLEY, C. W. Identification of Cereal Varieties by Gel Electrophoresis of the Grain Proteins. *Seed analysis*. S.l.: Springer-Verlag Berlin An, 2013, s. 17. DOI: 10.1007/978-3-662-01639-8_2. ISBN 9783662016411. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-01639-8_2

[81] SMITH, B. J. Acetic Acid-Urea Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Proteins*. New Jersey: Humana Press, 1984-11-7, , 63. DOI: 10.1385/0-89603-062-8:63. ISBN 0-89603-062-8. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1385/0-89603-062-8:63

[82] Acetic Acid-Urea Polyacrylamide Gel Electrophoresis. In: *Molecular Techniques and Methods* [online]. 2001 [cit. 2016-01-28]. Dostupné z: http://www.molecularinfo.com/MTM/G/G1/G1-3.html

[83] KULP, Karel a Joseph G PONTE. *Handbook of cereal science and technology*. 2nd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, 2000, ix, 790 p. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), v. 99. ISBN 08-247-8294-1.

[84] WRIGLEY, Colin W. *Identification of food-grain varieties*. St. Paul, Minn.: American Association of Cereal Chemists, c1995, v, 283 p. ISBN 09-132-5085-6.

[85] MOREL, M. H. Acid-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Wheat Glutenins: A New Tool for the Separation of High and Low Molecular Weight Subunits. *Cereal Chemistry*. 1994, **71**(3), 238-242. Dostupné také z: http://www.aaccnet.org/publications/cc/backissues/1994/Documents/71_238.pdf

[86] BIETZ, J. A. a S. J. WALL. Wheat Gluten Subunits: Molecular Weights Determined by Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Cereal Chemistry*. 1972, **49**(4), 416-429. Dostupné také z: http://www.aaccnet.org/publications/cc/backissues/1972/Documents/chem49_416.pdf

[87] PAYNE, P. I., K. G. CORFIELD a J. A. BLACKMAN. Identification of a high-molecular-weight subunit of glutenin whose presence correlates with bread-making quality in wheats of related pedigree. *Theoretical and Applied Genetics*. 1979, **55**(3-4), 153-159. DOI: 10.1007/BF00295442. ISSN 0040-5752. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/BF00295442

[88] BEAN, S.R a G.L LOOKHART. Electrophoresis of cereal storage proteins. *Journal of Chromatography A*. 2000, **881**(1-2), 23-36. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)01270-4. ISSN 00219673. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967399012704

[89] RIGHETTI, Pier Giorgio. *Isoelectric focusing theory, methodology, and applications*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1983. ISBN 978-008-0858-807.

[90] O'FARRELL. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of biological chemistry*. 1975, **250**(10), 4007-4021. Dostupné také z: http://www.jbc.org/content/250/10/4007.full.pdf+html

[91] LÁSZTITY, Radomír a F BÉKÉS. *Proceedings of the 3rd International Workshop on Gluten Proteins, Budapest, Hungary, May 9-12, 1987*. Teaneck, NJ, USA: World Scientific, c1987, xvi, 618 p. ISBN 99-715-0493-6.

[92] MIČKOVÁ, B., P. RAUCH a L. FUKAL. Možnosti imunochemického stanovení organokovových a karbamátových pesticidů. *Chemické listy*. 2004, (98), 970-980. Dostupné také z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_11_02.pdf

[93] CICLITIRA, P J, H J ELLIS a N L FAGG. Evaluation of a gluten free product containing wheat gliadin in patients with coeliac disease. *BMJ*. 1984, **289**(6437), 83-83. DOI: 10.1136/bmj.289.6437.83. ISSN 0959-8138. Dostupné také z: http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.289.6437.83

[94] TRONCONE, Riccardo, Mario VITALE, Anna DONATIELLO, Evelina FARRIS, Guido ROSSI a Salvatore AURICCHIO. A sandwich enzyme immunoassay for wheat gliadin. *Journal of Immunological Methods*. 1986, **92**(1), 21-23. DOI: 10.1016/0022-1759(86)90498-9. ISSN 00221759. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022175986904989

[95] Pozoruhodný experiment simuluje rostlinám budoucí klima. *Akademie věd České republiky* [online]. 2013 [cit. 2016-02-08]. Dostupné z: http://www.cas.cz/sd/novinky/hlavni-stranka/130709-pozoruhodny-experiment-simuluje-rostlinam-budouci-klima.html

[96] POLIŠENSKÁ, Ivana, Lenka NEDOMOVÁ a Stanislav CUPÁK. *Charakterizace genotypů ovsa s využitím elektroforézy aveninů v polyakrylamidovém gelu (A-PAGE): [metodika]*. Kroměříž: Agrotest fyto, 2010, 12 s. ISBN 978-80-904594-2-7.

[97] HAMŘÍKOVÁ, Dominika. *Vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na obsah proteinů gliadinové frakce u ozimé pšenice*. Brno, 2015. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.

[98] WROBLEWITZ, Stefanie, Liane HÜTHER, Remy MANDERSCHEID, Hans-Joachim WEIGEL, Hermann WÄTZIG a Sven DÄNICKE. Effect of Rising Atmospheric Carbon Dioxide Concentration on the Protein Composition of Cereal Grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014, **62**(28), 6616-6625. DOI: 10.1021/jf501958a. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf501958a

[99] OZTURK, A. a F. AYDIN. Effect of Water Stress at Various Growth Stages on Some Quality Characteristics of Winter Wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 2004, **190**(2), 93-99. DOI: 10.1046/j.1439-037X.2003.00080.x. ISSN 0931-2250. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1046/j.1439-037X.2003.00080.x

[100] ZHANG, Yu-feng, Xiu-wen HUANG, Li-li WANG, Liu WEI, Zhi-hui WU, Ming-shan YOU a Bao-yun LI. Proteomic Analysis of Wheat Seed in Response to Drought Stress. *Journal of Integrative Agriculture*. 2014, **13**(5), 919-925. DOI: 10.1016/S2095-3119(13)60601-2. ISSN 20953119. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095311913606012

[101] YANG, Fen, Anders D. JØRGENSEN, Huawei LI, et al. Implications of high-temperature events and water deficits on protein profiles in wheat (Triticum aestivum L. cv. Vinjett) grain. *PROTEOMICS*. 2011, **11**(9), 1684-1695. DOI: 10.1002/pmic.201000654. ISSN 16159853. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.201000654

[102] YAO, Xiaoqin, Jianzhou CHU, Xueli HE a Chao SI. Grain yield, starch, protein, and nutritional element concentrations of winter wheat exposed to enhanced UV-B during different growth stages. *Journal of Cereal Science*. 2014, **60**(1), 31-36. DOI: 10.1016/j.jcs.2014.01.012. ISSN 07335210. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521014000241

[103] ZU, Yanqun, Yuan LI, Jianjun CHEN a Haiyan CHEN. Intraspecific responses in grain quality of 10 wheat cultivars to enhanced UV-B radiation under field conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2004, **74**(2-3), 95-100. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2004.01.006. ISSN 10111344. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134404000235

[104] LIZANA, X. Carolina, Susan HESS a Daniel F. CALDERINI. Crop phenology modifies wheat responses to increased UV-B radiation. *Agricultural and Forest Meteorology*. 2009, **149**(11), 1964-1974. DOI: 10.1016/j.agrformet.2009.07.003. ISSN 01681923. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168192309001683

[105] HÖGY, P., M. BRUNNBAUER, P. KOEHLER, K. SCHWADORF, J. BREUER, J. FRANZARING, D. ZHUNUSBAYEVA a A. FANGMEIER. Grain quality characteristics of spring wheat (Triticum aestivum) as affected by free-air CO2 enrichment. *Environmental and Experimental Botany*. 2013, **88**, 11-18. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2011.12.007. ISSN 00988472. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098847211003145

8 SEZNAM ZKRATEK

A-PAGE	acid polyacrylamide gel electrophoresis
ELISA	enzyme linked imunosorbent assay
FACE	free air CO_2 enrichment
HMW	high molekular weight
HPLC	high-performance liquid chromatography
LMW	low molekular weight
LRM	laboratorní referenční metoda
MALDI	matrix assisted laser desorption ionization
MS	mass spectrometry
NIR	near infrared spectrometry
RP-HPLC	reverse phase high-performance liquid chromatography
Rubisco	ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa
RuBP	ribulosa-1,5-bisfosfátem
SDS	sodium dodecyl sulfate
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TOF	time of flight detektor
TPT	fosfát-triosafosfát-fosfoglycerát-translokátor