

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

## STUDIUM FENOLICKÝCH KYSELIN A PROTEINOVÉHO SLOŽENÍ MOUKY Z LUPINY BÍLÉ (*Lupinus albus L.*)

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce: Bc. Kateřina Bojková  
Studijní program: N1407 Chemie  
Studijní obor: Analytická chemie  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: RNDr. Petr Tarkowski, PhD.  
Termín odevzdání práce: duben 2010

**Olomouc 2010**

## Souhrn

Lupina bílá je luštěnina, která nachází využití především v potravinářském průmyslu, ale i v zemědělství jako krmivo nebo zelené hnojivo. Jde o plodinu běžně pěstovanou v Jižní Americe, v okolí Nilu, ale i na různých místech v Evropě (např. Polsko). Mouka ze semen lupiny bílé se pro zvýšení nutriční kvality přidává do výrobků, jako jsou těstoviny, pečivo či emulgované masné produkty. Pro složení lupinových semen je typický vysoký obsah proteinů (až 47 %) a vyvážený obsah mastných kyselin.<sup>1, 2</sup> Semena lupiny také obsahují vitaminy, především vitaminy skupiny B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>).<sup>1</sup> Významná je také přítomnost fenolických látek v lupině. Jedná se o látky s antioxidačními, bakteriostatickými a fungicidními vlastnostmi.<sup>3</sup> Lupina bílá je zdrojem dalších významných látek a živin, jako jsou cukry, lipidy, vláknina a minerály.<sup>4</sup> Lupina ale obsahuje i řadu antinutričních složek, jako jsou např. chinolizidinové alkaloidy a  $\alpha$ -galaktosidy.<sup>1, 2, 4</sup>

Tato diplomová práce se věnuje analýze chemického složení mouky ze semen lupiny bílé (odrůda Amiga) se zaměřením na proteiny a fenolické látky. V analyzovaném materiálu byl metodou Folin-Ciocalteaua stanoven obsah celkových fenolických látek. Dále byly pomocí systému UPLC-MS/MS analyzovány fenolické kyseliny (volné i vázané). Pomocí technik SDS-PAGE a MALDI-MS byla provedena analýza proteinového složení lupinové mouky. Na základě spektrofotometrického měření byla stanovena aktivita vybraných enzymů (lipasy a amylasy).

## Summary

White lupin is a legume that is used especially in the food industry but also in agriculture as feed or green manure. It is a crop widely grown in South America, around the Nile, but also in various places in Europe (e.g. Poland). Flour from the seeds of white lupin is added to improve the nutritional quality of the products such as pasta, bread or emulsified meat products. Composition of lupin seeds is high in protein content (up to 47 %) and it has well balanced content of fatty acids.<sup>1,2</sup> Lupin seeds also contain vitamins, especially B-group vitamins (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>).<sup>1</sup> There is a significant presence of phenolic compounds in lupin. These substances exhibit with antioxidant, bacteriostatic and fungicidal properties.<sup>3</sup> White lupin is the source of the other important substances and nutrients such as sugars, lipids, fiber and minerals.<sup>4</sup> Lupin also contains a number of antinutritional constituents such as chinolizidin alkaloids and  $\alpha$ -galactosides.<sup>1,2,4</sup>

This thesis provides an analysis of the chemical composition of white lupin flour (variety of Amiga), focusing on proteins and phenolic compounds. The content of total phenolics was analyzed using the Folin-Ciocalteu method. Qualitative and quantitative analysis of phenolic acids were performed by UPLC-MS/MS. The protein composition was studied by SDS-PAGE and MALDI-TOF-MS techniques. Activity of selected enzymes (lipase and amylase) was determined by the spectrophotometric measurement.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

Chtěla bych poděkovat RNDr. Petru Tarkowskému, Ph.D. za vedení, připomínky a rady, které pro mě byly při zpracování této diplomové práce velkým přínosem. Děkuji Bc. Barboře Kulhánkové, Mgr. Ondřeji Strouhalovi, Mgr. Jiřímu Grúzovi, Ph.D. i dalším studentům a pracovníkům Katedry biochemie UP a Laboratoře růstových regulátorů UP za rady a pomoc během experimentální práce. Také bych ráda poděkovala svému snoubenci a své rodině za podporu a pochopení.

# Obsah

1. Teoretická část.....	9
1.1 Lupina bílá.....	9
1.1.1 Chemické složení semen lupiny a jejich využití.....	10
1.1.2 Tolerance ke stresu .....	12
1.2 Fenolické látky.....	12
1.2.1 Chemické vlastnosti fenolických látek .....	13
1.2.2 Základní rozdělení fenolických látek.....	13
1.2.3 Biosyntéza fenolických látek .....	17
1.2.3.1 Šikimátová metabolická dráha a biosyntéza fenylypropanoidů.....	17
1.2.3.2 Biosyntéza fenolkarboxylových kyselin a jednoduchých fenolů.....	19
1.2.3.3 Polyketidová metabolická dráha .....	20
1.2.3.4 Syntéza složitých fenolických látek.....	20
1.3 Proteinové složení lupinových semen .....	21
1.4 Metody studia fenolických kyselin.....	23
1.4.1 Úprava vzorku .....	23
1.4.1.1 Hydrolýza fenolických kyselin .....	23
1.4.1.2 Extrakce .....	24
1.4.2 Stanovení celkových fenolických látek .....	24
1.4.3 Separace fenolických kyselin .....	26
1.4.3.1 Papírová chromatografie a chromatografie na tenké vrstvě .....	26
1.4.3.2 Plynová chromatografie .....	26
1.4.3.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....	27
1.4.3.4 UPLC .....	29
1.4.3.5 Elektromigrační metody .....	29
1.5 Metody analýzy aminokyselinového složení.....	30
1.5.1 Hydrolýza proteinů .....	30
1.5.2 Kvantitativní stanovení aminokyselin .....	31

1.5.2.1 Stanovení celkových aminokyselin .....	31
1.5.2.2 Instrumentální metody analýzy aminokyselin .....	32
1.6 Analýza proteinů.....	33
1.6.1 Stanovení celkových proteinů.....	33
1.6.2 Identifikace proteinů .....	35
1.6.2.1 Frakcionace proteinů.....	35
1.6.2.2 SDS-PAGE .....	36
1.6.2.3 MALDI-MS .....	37
1.7 Enzymy .....	38
2. Experimentální část .....	40
2.1 Biologický materiál .....	40
2.2 Chemikálie.....	40
2.2.1 Stanovení celkových fenolických látek (TPC) metodou Folin-Ciocalteaua.....	40
2.2.2 Analýza fenolických kyselin systémem UPLC-MS/MS .....	40
2.2.3 Frakcionace proteinů: .....	41
2.2.4 Stanovení celkových proteinů metodou BCA .....	41
2.2.5 SDS-PAGE: .....	41
2.2.6 MALDI: .....	43
2.2.7 Stanovení aktivity lipáz .....	43
2.2.8 Stanovení aktivity amyláz.....	43
2.3 Přístrojové vybavení .....	44
2.4 Postupy analýz .....	46
2.4.1 Stanovení celkových fenolických látek (TPC) metodou Folin-Ciocalteaua.....	46
2.4.2 Analýza fenolických kyselin systémem UPLC-MS/MS .....	48
2.4.3 Analýza proteinového složení.....	50
2.4.3.1 Frakcionace proteinů.....	50
2.4.3.2 SDS-PAGE .....	51
2.4.3.3 MALDI-MS .....	52

2.4.4 Stanovení aktivity lipas.....	53
2.4.5 Stanovení aktivity amylas .....	53
2.4.6 Stanovení celkových proteinů metodou BCA (pro výpočet enzymové aktivity) .....	54
3. Výsledky a diskuse .....	55
3.1 Stanovení celkových fenolických látek (TPC) .....	55
3.2 Analýza fenolických kyselin metodou UPLC-MS/MS .....	59
3.3 Identifikace proteinů v lupinové mouce .....	68
3.3.2 SDS-PAGE .....	68
3.3.3 MALDI-MS analýza proteinů v lupinové mouce.....	71
3.4 Enzymová aktivita lipas.....	73
3.4.1 Stanovení celkových proteinů v enzymových extraktech metodou BCA .....	74
3.4.2 Aktivita lipas.....	77
3.5 Aktivita amylas .....	78
4. Závěr.....	80
Literatura: .....	82
Seznam použitých zkratk .....	90



# 1. Teoretická část

## 1.1 Lupina bílá

Lupina bílá (*Lupinus albus L.*) je jednoletá rostlina patřící mezi luštěniny. Jde o jeden z druhů řazený do rodu *Lupinus*. Jednotlivé druhy lupiny se vyskytují hlavně ve středozeší a Jižní Americe. Nejvíce pěstované druhy jsou *Lupinus albus L.* (lupina bílá), *Lupinus angustifolius L.* (lupina modrá), *Lupinus luteus L.* (lupina žlutá), *Lupinus mutabilis* (lupina perleťová). Lupiny lze použít jako zelené hnojivo a píci. Rostliny také mohou být pěstovány k řezu. Vzhledem k vysokému obsahu proteinů a obsahu olejů se lupina využívá i v humánní výživě.<sup>1,2</sup>



**Obr. 1** Lupina bílá (převzato z literatury<sup>1</sup>).

Lupina bílá je nejvíce rozšířená ve středozeší a v okolí Nilu. Jde o rostlinu převážně samosprašnou. U tohoto druhu existuje široká vnitrodruhová variabilita většiny morfologických znaků, velikosti a složení semen lupiny a tolerance ke stresovým faktorům, jako je například chlad. Tato skutečnost je způsobena rozlohou oblasti, ve které je lupina bílá

přírozně rozšířená, rozmanitostí půdních a klimatických podmínek a také rozsahem využití této plodiny.<sup>2</sup>

### 1.1.1 Chemické složení semen lupiny a jejich využití

Hlavním zdrojem rostlinných bílkovin jsou luštěniny a mezi nimi se nejvyšším obsahem proteinů vyznačují právě lupinová semena. Jejich nutriční hodnota je srovnatelná se sójovými boby a lupina je považována za nejsilnějšího potenciálního konkurenta sóji. Výhodou je to, že lupinu lze oproti sóji úspěšně pěstovat i v Evropě. Pro lupinová semena je, mezi luštěninami, také charakteristický nejnižší obsah nežádoucích složek bez nutriční hodnoty, což je další z přínosných vlastností lupiny. Látkami bez nutriční hodnoty rozumíme např. inhibitory trypsinu, saponiny a lektiny.<sup>2, 3, 4</sup>

Obsah proteinů v semenech lupiny bílé se pohybuje v rozmezí 33–47 % v závislosti na genotypu a místu pěstování. Na rozdíl od obilovin obsahují proteiny v lupině velké množství lysinu a malé množství aminokyselin obsahujících síru. Obsah olejů je v rozsahu 6–13 %. V lupinových semenech se vyskytují vysoké koncentrace polynenasycených mastných kyselin.<sup>1, 2</sup> Obsah nasycených mastných kyselin je v lupině nižší než u většiny rostlinných olejů. Mezi nenasyčené mastné kyseliny, které jsou v lupině přítomny, patří kyseliny olejová (hlavní mastná kyselina v oleji z lupinových semen) a esenciální kyseliny linoleová a linolenová. Složení mastných kyselin v lupině bílé je podobné jako u podzemnice olejné nebo semen řepky, ale nezahrnuje kyselinu erukovou. Poměrně vyvážený obsah mastných kyselin v lupině je jedním z důvodů vhodnosti využití tohoto materiálu v lidské stravě.<sup>1</sup> Mezi další významné látky obsažené v lupině řadíme také fenolické látky, např. fenolické kyseliny, které jsou mimo jiné známé svými fungicidními a bakteriostatickými účinky.<sup>3</sup> V závislosti na genotypu se také liší průměrná váha semen lupiny (70 mg až více než 1 g).<sup>2</sup>

V lupině jsou přítomny také chinolizidinové alkaloidy, především spartein a lupanin. Vzhledem k tomu není možná její přímá konzumace. Tyto alkaloidy způsobují nahořklou chuť lupiny bílé a vyvolávají respirační problémy a poškození jater. V nízkých koncentracích ovšem nejsou toxické. S výhodou lze využít skutečnosti, že většina alkaloidů obsažených v lupině je ve vodě rozpustná. Namáčením semen v tekoucí vodě či solném roztoku nebo jejich spařením lze obsah alkaloidů v lupině snížit z 0,5–4 % na 0,04 %. Nebo je možné pěstovat odrůdy s nízkým obsahem alkaloidů. Vzhledem k nízkému obsahu alkaloidů se

lupina bílá řadí mezi tzv. sladké odrůdy. Sladké, odrůdy lupiny mají celkový obsah alkaloidů nižší než 0,01-0,02 %. Odrůdy s vyšším obsahem alkaloidů pak označujeme jako hořké.<sup>1,2</sup>

Mouka ze semen lupiny bílé se může použít k výrobě různých produktů, jako jsou těstoviny, chléb a emulgované masné výrobky. Lze tak zvýšit nutriční hodnotu těchto výrobků a zlepšit jejich aroma.<sup>1</sup> Přídavkem lupiny do klasické světlé pšeničné mouky vzniká tzv. kompozitní mouka. Bylo zjištěno, že přídavek 10 % lupiny ke světlé pšeničné mouce zvyšuje nutriční význam i jiné vlastnosti produktů. Naopak přidání většího množství lupiny má na tyto parametry vliv opačný.<sup>5</sup> Lupina je dobrým zdrojem živin, a to nejen bílkovin, ale také cukrů, lipidů, vlákniny, minerálů a vitamínů.<sup>4</sup> Mezi vitamíny, které jsou obsaženy v lupinových semenech patří niacin (vit. B<sub>3</sub>), thiamin (vit. B<sub>1</sub>) a riboflavin (vit. B<sub>2</sub>). V nejvyšších koncentracích se vyskytuje niacin, obsah thiaminu a riboflavinu je srovnatelný s jinými luštěninami (fazole, čočka, sojové boby) a pšenicí. 100 g lupinových semen představuje přibližně 30 % u niacinu, 50 % u thiaminu a 20 % u riboflavinu z požadovaného množství 2000 kcal/den.<sup>1</sup> Lupina dále obsahuje látky s antioxidačními vlastnostmi, jako jsou polyfenoly—především taniny a flavonoidy. V lupinových semenech se ale vyskytuje velké množství  $\alpha$ -galaktosidů. Konzumace vyšších koncentrací těchto látek je má negativní dopad na fyziologické funkce. Pro zvýšení nutriční hodnoty je tedy potřeba  $\alpha$ -galaktosidy odstranit. K tomu lze využít extrakce voda–ethanol.<sup>4</sup>

Semena lupiny bílé neobsahují škrob. Slupky semen, které představují asi 18 % jejich váhy, jsou tvořeny stavebními polysacharidy, k nimž se řadí celulóza, hemicelulóza a lignin. V zesílených stěnách kotyledonů jsou lokalizované zásobní cukry. Převládajícími monosacharidy v lupinových semenech jsou galaktosa, arabinosa a kyselina uronová. K nejrozšířenějším oligosacharidům pak patří stachyosa, verbaskosa a rafinosa. Vláknina obsažená v semenech má řadu žádoucích vlastností. Patří mezi ně bílá barva, vysoká kapacita vstřebávání vody (7,1 g H<sub>2</sub>O/g) a dobrá nutriční hodnota. Tuto vlákninu lze přidávat do široké řady potravin.<sup>2</sup>

### 1.1.2 Tolerance ke stresu

Tolerance ke stresovým faktorům se u jednotlivých genotypů liší. Existují různé typy lupiny bílé, odlišnosti jsou například v době setí (podzim, jaro). Stresové faktory lze rozdělit do dvou skupin – biotické a abiotické. K biotickým faktorům řadíme různé škůdce a parazity. Významně působí plísňové choroby, *Pleiochaeta setosa*, *Uromyces lupinicolus* a *Colletotrichum gloeosporioides*. Tyto plísně jsou pro lupinu specifické a plně přizpůsobené přítomnosti alkaloidů, takže v toleranci nejsou rozdíly u hořkých a sladkých linií tohoto druhu. Mráz, sucho a vysoké pH půdy spojené s přítomností vápence, popřípadě přemokření půdy jsou faktory způsobující abiotický stres.<sup>2</sup>

### 1.2 Fenolické látky

Fenolické látky spolu s isoprenoidy a alkaloidy řadíme k sekundárním metabolitům rostlin. Primární metabolismus se vztahuje na biosyntézu a přeměny sacharidů, lipidů, bílkovin a nukleových kyselin, což jsou látky pro rostlinu základní a nezbytné. Metabolické dráhy, které do primárního metabolismu patří, jsou obdobné ve všech rostlinách. Sekundární metabolity vznikají z metabolitů primárních. Cesty, kterými vznikají, jsou často typické pro daný rostlinný druh, tzn. jsou taxonomickým znakem. Tyto látky vznikají pouze v některých konkrétních orgánech rostliny a v určitém období. Sekundární metabolity jsou látky, které jsou pro rostlinu potřebné, nebo se může jednat o odpadní produkty metabolismu. Lze říci, že tyto látky v rostlině zastávají různé specifické funkce.<sup>6, 7, 8</sup>

Fenolické látky jsou sloučeniny v přírodě běžné. Jedná se o sloučeniny, které mají ve své struktuře benzenové jádro substituované alespoň jednou hydroxylovou skupinou. Můžeme je nalézt ve všech vegetativních částech rostliny. Obsah fenolických látek v jednotlivých rostlinných částech (např. listy, plody, pecky, semena) se ale významně liší. Odlišnosti ve struktuře a vlastnostech jednotlivých fenolických látek určují senzorycké vlastnosti materiálu i jeho vhodnost pro využití v potravinářství a významně ovlivňují kvalitu potravin rostlinného původu. Fenolické látky vykazují antioxidační vlastnosti, mají antibakteriální účinky a mohou ovlivňovat autoimunitní systém živočišných organismů.<sup>3, 9</sup> Rostlinné fenoly mají důležitou roli v řadě fyziologických procesů. Mohou vystupovat např. jako přenašeče elektronů, strukturní či impregnační látky nebo signální molekuly. Mohou rostlinu chránit před UV zářením nebo se podílet na lákání opylovačů apod.<sup>6</sup> Rostlinné fenolické látky jsou velkou skupinou látek. Řadíme k nim jak strukturně jednoduché molekuly, tak různé

makromolekulární polymery. Z jednoduchých fenolických látek jsou to např. kyselina gallová, *p*-hydroxybenzoová, ferulová, kávová a jiné. Mezi složité polyfenolické sloučeniny patří například strukturální polymery lignin, suberin a kutin. Například lignin je komplexním polymerem, na jehož syntéze se jako meziprodukty podílí kyseliny *p*-kumarová, ferulová a sinapová. Strukturu ligninu pak tvoří alkoholy odvozené od těchto hydroxyskořicových kyselin redukcí karboxylové skupiny – *p*-kumaryl alkohol, koniferyl alkohol a sinapylalkohol, které jsou označovány jako monolignoly.<sup>7, 10, 11</sup>

### 1.2.1 Chemické vlastnosti fenolických látek

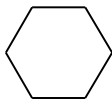
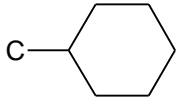
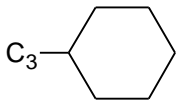
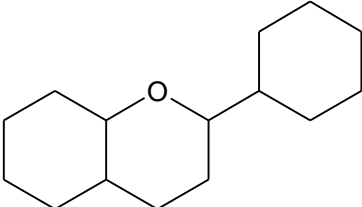
Fenolické látky mají díky své struktuře schopnost tvořit relativně stabilní radikály. Tato skutečnost je zapříčiněna interakcí hydroxylové skupiny a  $\pi$ -elektronů benzenového kruhu. Díky této vlastnosti fenoly mohou mít v organismu důležitou biologickou roli. Působí jako antioxidanty a začleňují se do různých oxidačních procesů, které jsou radikály zprostředkované. Za dobré antioxidanty jsou považovány fenolické sloučeniny, které mají benzenový kruh dvěma hydroxylovými skupinami substituovaný v poloze *ortho*. Fenolické hydroxylové skupiny mohou být snadno ionizovány, látka pak má vlastnosti slabé kyseliny a je dobrým H-donorem při tvorbě vodíkových vazeb. Z toho pak vyplývá schopnost některých polymerních fenolů, které mají ve struktuře takovýchto donorových skupin velké množství, tvořit stabilní komplexy s jinými molekulami.<sup>10, 12</sup>

### 1.2.2 Základní rozdělení fenolických látek

Na základě struktury, tzn. uhlíkatého skeletu, je možné fenolické látky rozdělit do čtyř skupin. Jde o jednoduché fenoly, fenolkarboxylové kyseliny, fenylpropanoidy a flavonoidy. *Jednoduché fenoly* ve struktuře obsahují cyklické C<sub>6</sub> řetězce. Základní skelet molekuly často bývá substituován methylovými skupinami. Tato skupina není v rostlinné říši příliš zastoupená a řadíme do ní například hydrochinon. *Fenolkarboxylové kyseliny*, mezi které patří např. kyseliny *p*-hydroxybenzoová, gallová či pyrokatechová, v molekule obsahují základní strukturu C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> skelet. Tyto látky jsou v rostlinách poměrně běžné. Často se například vyskytují jako taniny neboli třísloviny a jde o polymery kyseliny gallové. *Fenylpropanoidy* jsou sloučeniny, které ve struktuře obsahují aromatický (fenolový) kruh s navázaným C<sub>3</sub> řetězcem. Jde o poměrně rozsáhlou skupinu fenolických látek. Typickými představiteli této skupin látek jsou deriváty kyseliny skořicové, např. kyseliny *p*-kumarová, kávová, ferulová a sinapová. Řadíme zde i kumariny a polymerní stavební látku lignin. *Flavonoidy* jsou látky

v rostlinách velmi běžně rozšířené a existuje jich velké množství. Základ struktury molekuly je u těchto sloučenin odvozen od flavanu a skládá se ze dvou částí. První částí je C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> řetězec, který je výsledkem šikimátové metabolické dráhy a druhou částí je cyklický řetězec C<sub>6</sub> s navázaným atomem kyslíku. Druhá část struktury vzniká odvozením od acetátů. Na hydroxylové skupiny flavonoidů se např. mohou navázat molekuly cukrů. Mezi flavonoidy řadíme podskupiny látek, jako např. anthokyany, flavony a flavonoly. Anthokyany jsou rostlinná barviva, která způsobují červené až modré zbarvení květů a někdy je lze nalézt např. i v plodech, listech či jiných rostlinných částech. Patří k nim např. cyanidin (květ chrpy), petunidin (petunie) a pelargonidin (červená pelargonie). Flavony a flavonoly také vystupují jako barevné pigmenty.<sup>6, 11</sup>

**Tab. I** Hlavní skupiny fenolických látek (částečně převzato z literatury<sup>6</sup>).

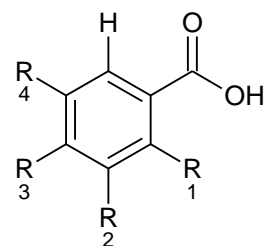
Skupina	Uhlíkový skelet	Příklad
Jednoduché fenoly		hydrochinon
Kyseliny fenolkarboxylové		kys. <i>p</i> -hydroxybenzoová
Fenylpropanoidy		kys. hydroxyskořicové
Flavonoidy		flavony, flavanol

Ačkoliv je důležitým rysem fenolických látek přítomnost jedné či více hydroxylových skupin na benzenovém kruhu, bývají do této skupiny látek zařazovány i některé nehydroxylované sloučeniny, které hrají roli v metabolismu fenolů, např. kyselina skořicová (3-fenylpropenová kyselina). Tyto látky pak ale samozřejmě nemají chemické vlastnosti charakteristické pro fenoly.

V rostlinné říši jsou důležité fenolické kyseliny. Obsah fenolických kyselin závisí na druhu a kultivaru rostliny, ale je ovlivněn také stupněm zralosti plodiny a dobou a podmínkami skladování. V přírodě fenolické kyseliny vystupují jako fungicidy a bakteriostatika a chrání rostlinu před různými chorobami. Rostlinné fenolické kyseliny se mohou vyskytovat ve volné formě, často jsou ale vázány ve formě esterů nebo glykosidů. Řadíme k nim kyseliny, jejichž struktura je odvozena od skeletu kyseliny benzoové nebo skořicové. Struktura jejich uhlíkového skeletu je C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> (u hydroxybenzoových kyselin) a C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (u hydroxyskořicových kyselin). Díky násobné vazbě v postranním C<sub>3</sub> řetězci mohou hydroxyskořicové kyseliny existovat jako *cis*- a *trans*-izomery. V rostlinách se tyto látky vyskytují hlavně v *trans*-formě. Působením UV záření ale mohou přecházet na *cis*-formu. K hydroxybenzoovým kyselinám řadíme např. kyselinu gallovou, *m*-hydroxybenzoovou, protokatechovou, vanilovou a syringovou. Mezi kyseliny hydroxyskořicové patří např. kyselina *p*-kumarová, kávová, ferulová, sinapová a chlorogenová (ester kyseliny kávové a chinové).<sup>3, 11</sup> Do skupiny fenolických kyselin také bývají zařazovány aldehydicke sloučeniny s analogickou strukturou, jejich uhlíkový skelet je C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>. Jedním z představitelů těchto látek je vanilin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyd).<sup>13</sup>

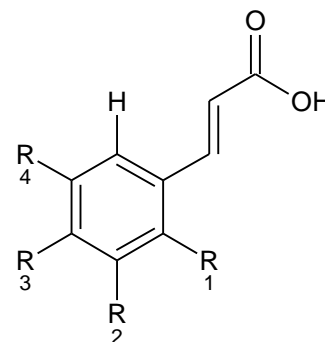
**Tab. II** Struktury některých hydroxybenzoových kyselin.

Hydroxybenzoové kyseliny				
Název	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Benzoová	H	H	H	H
<i>p</i> -hydroxybenzoová	H	H	OH	H
Vanilová	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Gallová	H	OH	OH	OH
Protokatechová	H	OH	OH	H
Syringová	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
Gentisová	OH	H	H	OH
Salicylová	OH	H	H	H



**Tab. III** Struktury některých hydroxyskořicových kyselin a kyseliny skořicové.

Hydroxyskořicové kyseliny				
Název	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Skořicová*	H	H	H	H
<i>o</i> -kumarová	OH	H	H	H
<i>m</i> -kumarová	H	OH	H	H
<i>p</i> -kumarová	H	H	OH	H
Ferulová	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Sinaponá	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
Kávová	H	OH	OH	H



\* Kyselina skořicová nepatří mezi fenolické kyseliny a tedy ani mezi hydroxyskořicové kyseliny

Mezi další fenolické látky patří taniny neboli třísloviny. Jde o polyfenolické látky, které sráží bílkoviny a tvoří s nimi reverzibilní nebo ireverzibilní komplexy. Obecně lze taniny rozdělit do dvou skupin. Kondensované taniny vznikají jako produkty fenypropanoidového metabolismu a jde o polymerní flavonoidy. Druhou skupinou jsou hydrolyzovatelné taniny, na jejichž tvorbě se podílí glykosylovaná kyselina gallová. Taniny se všeobecně považovaly za nežádoucí složky, protože nemají nutriční hodnotu. Třísloviny lze použít k činění kůží. Tyto látky působí na proteiny sliznic a chuťové receptory a jsou příčinou trpké či hořké chuti potravin. Tyto polyfenoly brání rozkladu rostlinných zbytků, což je nežádoucí v procesu tvorby humusu. Taniny se využívají i v medicíně pro jejich antiseptické účinky. Taniny vykazují dobré antioxidační vlastnosti a jsou tedy spolu s jinými polyfenoly, karotenoidy a vitamíny C a E zařazeny k přírodním antioxidačním látkám.<sup>3,7</sup>

Celkový obsah fenolických látek v semenech lupiny závisí na různých faktorech. Patří mezi ně např. druh lupiny, ale také obecně klimatické a půdní podmínky a úrodnost půdy. Obsah fenolů se také liší v jednotlivých částech semene. Jde o osemení (obal semene) a kotyledon. Celkový obsah fenolů je nižší v osemení. Podobně je tomu i u taninů. Naopak volné fenolické kyseliny jsou obsaženy ve větší míře v osemení. Z volných fenolických kyselin se v semenech lupiny vyskytují např. kyselina protokatechová, *p*-hydroxybenzoová, chlorogenová, vanilová, *p*-kumarová a ferulová. S obsahem fenolických látek v lupinových semenech souvisí antibakteriální účinky. Antibakteriální aktivitu vykazují pouze extrakty získané z osemení.<sup>3</sup>

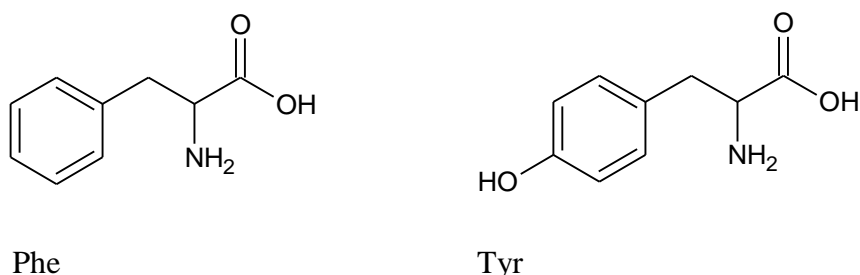


### 1.2.3 Biosyntéza fenolických látek

Syntéza fenolických látek v rostlinách může probíhat několika různými způsoby. Uplatnit se může šikimátová metabolická dráha, která vychází z produktů vznikajících při syntéze cukrů. Tímto způsobem vznikají sloučeniny substituované hydroxylovou skupinou v polohách *ortho*- a *para*- na benzenovém kruhu. Druhou cestou je polyketidová (acetogeninová) dráha, která je založena na kondenzaci kyseliny octové popř. propionové, přičemž dochází ke tvorbě poly- $\beta$ -ketonického řetězce. Tato dráha se uplatňuje při syntéze látek substituovaných v poloze *meta*- na aromatickém jádře. Při biosyntéze složitějších struktur může dojít ke kombinaci obou metabolických drah. Tvorbě fenolických látek začíná vznikem určité základní struktury, která je pak dále pozměňována za účasti potřebných enzymů.<sup>14</sup>

#### 1.2.3.1 Šikimátová metabolická dráha a biosyntéza fenypropanoidů

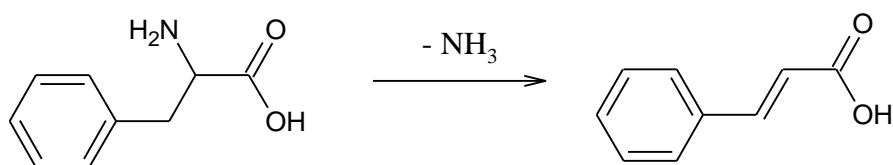
Fenolické sloučeniny jsou rozsáhlou skupinou sekundárních metabolitů odvozených často z šikimátové dráhy a metabolismu fenypropanoidů. Šikimátová metabolická dráha je sled reakcí, které vedou k biosyntéze dvou aromatických aminokyselin, fenyalaninu a tyrosinu. Důležitými látkami, ze kterých šikimátová dráha vychází, jsou erytroza-4-fosfát a fosfoenolpyruvát. Jde o látky, které vznikají při fotosyntetické syntéze cukrů. Kondenzací erytroza-4-fosfátu a fosfoenolpyruvátu, která je následována řadou dalších reakcí, vzniká kyselina šikimová neboli šikimát. Jde o meziprodukt, podle kterého je tato metabolická dráha pojmenována.<sup>7, 9, 14</sup>



**Obr. 2** Struktura fenyalaninu a tyrosinu.

Produkty šikimátové dráhy jsou látky důležité pro metabolismus fenypropanoidů. Fenyalanin je běžným prekurzorem při syntéze řady rostlinných fenolických sloučenin. Deaminací fenyalaninu vzniká kyselina *trans*-skořicová. Na této reakci se podílí specifický

enzym fenylalanin-amoniak lyasa (PAL). V některých případech může jako prekurzor pro syntézu fenylpropanoidů vystupovat i tyrosin. Tyrosin je pak deaminován tyrosin-amoniak lyasou (TAL) za vzniku kyseliny *p*-kumarové. Tato reakce je však u rostlin daleko méně běžná než analogická reakce vedoucí ke kyselině skořicové a byla zaznamenána například u travin. Enzym PAL hraje významnou roli v biosyntéze řady fenylpropanoidových sloučenin, např. ligninu a flavonoidových pigmentů. V rostlinách se největší množství PAL vyskytuje v cévních pletivech a epidermu. Výskyt PAL v těchto rostlinných částech souvisí s hromaděním ligninu v cévních pletivech a tvorbou flavonoidových pigmentů v epidermu.<sup>6, 7, 8, 9, 10, 12, 14</sup>



**Obr. 3** Deaminace fenylalaninu za vzniku kyseliny *trans*-skořicové působením fenylalanin-amoniak lyasy (PAL).

Z kyseliny skořicové pak dalšími reakcemi (hydroxylace a methoxylace) vznikají různé fenolické kyseliny. Nejprve dochází k navázání hydroxylové skupiny za vzniku kyseliny *p*-kumarové a následně k dalším modifikacím struktury. Reakci, jejímž produktem je kyselina *p*-kumarová (4-hydroxyskořicová kyselina), katalyzuje enzym cinamát-4-hydroxylasa. Kyselina *p*-kumarová může dále podléhat hydroxylaci v polohách 3 a 5 na aromatickém kruhu. Tyto reakce jsou katalyzovány hydroxylasami, přičemž není zcela jasný reakční mechanismus těchto reakcí. Takto navázané hydroxylové skupiny mohou být methylovány působením O-methyl transferas, kdy jako donor methylové skupiny vystupuje S-adenosylmethionin. Tímto způsobem mohou vznikat další fenolické kyseliny. Jde o kyseliny kávovou, ferulovou a sinapovou. Kyselina kávová (3,4-dihydroxyskořicová kyselina) se syntetizuje hydroxylací kyseliny *p*-kumarové. Methylací kyseliny kávové vzniká kyselina ferulová (3-methoxy-4-hydroxyskořicová kyselina), která je známá svými antioxidačními vlastnostmi. Další methylace vede na kyselinu sinapovou (3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová kyselina). Mezi enzymy, které se uplatňují v metabolismu fenolických látek, patří i CoA ligasy katalyzující vznik CoA esterů

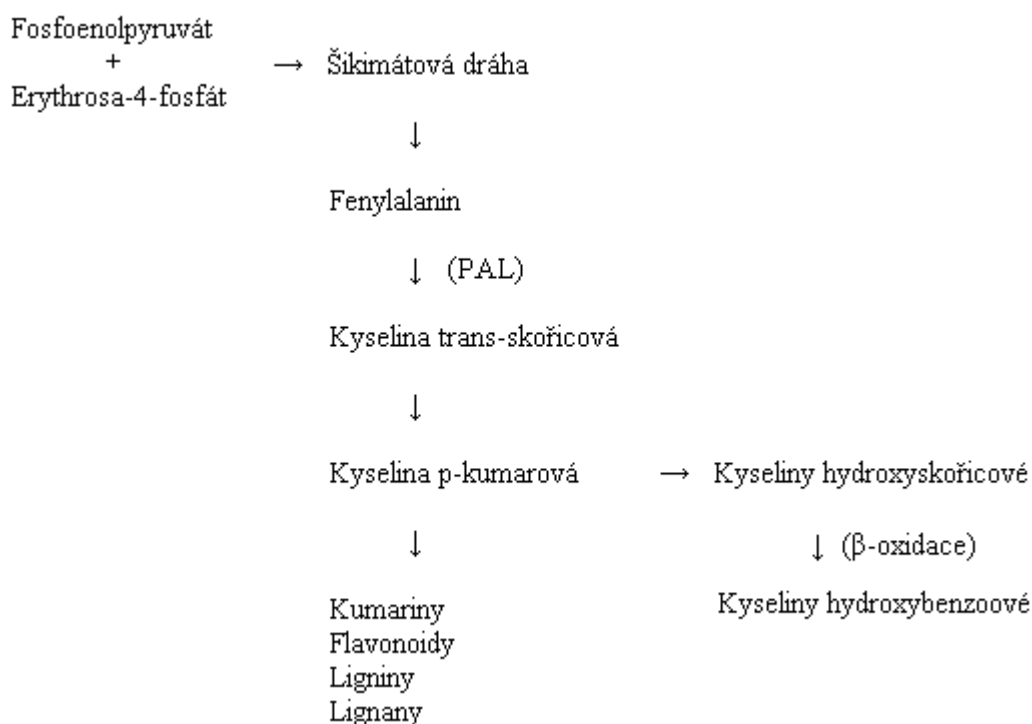
jednotlivých fenolických kyselin. Dalšími enzymy, které spadají do fenylypropanoidového metabolismu, jsou cinamoyl-CoA reductasa a cinamoyl alkohol dehydrogenasa. První zmíněný enzym katalyzuje tvorbu *p*-kumaraldehydu, koniferylaldehydu a případně i sinapaldehydu. Cinamoyl alkohol dehydrogenasa se podílí na vzniku *p*-kumaryl, koniferyl a sinapyl alkoholů.<sup>7, 10, 12</sup>

Toto obecné schéma fenylypropanoidového metabolismu, ale neodpovídá syntéze fenolických látek u všech druhů rostlin nebo rostlinných pletiv. Často se při syntéze konkrétních fenolických látek v jednotlivých pletivech využívá jen některá část metabolické dráhy.<sup>12</sup>

Z kyseliny *trans*-skořicové a jejích derivátů vychází také syntéza kumarinů. Kumariny jsou sloučeniny, které také řadíme k fenylypropanoidům. Např. hydroxylací kyseliny *trans*-skořicové v poloze *ortho*- vzniká kyselina *o*-kumarová. Následně se vytvoří  $\beta$ -glukosid kyseliny *o*-kumarové. Působením UV záření přechází *trans*-forma této látky na *cis*-konfiguraci. Za určitých podmínek (např. poranění) pak na  $\beta$ -glukosid začne působit  $\beta$ -glukosidasa a vzniká kumarin (dojde k hydrolyze a uzavření laktonového kruhu). Podobně se z odpovídajících skořicových kyselin syntetizují i jiné kumariny.<sup>11</sup>

### 1.2.3.2 Biosyntéza fenolkarboxylových kyselin a jednoduchých fenolů

Z fenylypropanoidů jsou odvozeny další fenolické sloučeniny. Z kyselin hydroxyskořicových se  $\beta$ -oxidací syntetizují kyseliny fenolkarboxylové, např. z kyseliny kumarové vzniká kyselina hydroxybenzoová, z kyseliny ferulové se tvoří kyselina vanilová apod. Dekarboxylací kyseliny *p*-hydroxybenzoové pak může docházet k tvorbě hydrochinonu (zástupce jednoduchých fenolů). Odštěpením C<sub>2</sub> ze struktury fenylypropanoidů a dalšími modifikacemi uhlíkového skeletu vznikají deriváty kyseliny benzoové. Další možná cesta pro vznik hydroxybenzoových kyselin vychází z meziproductů šikimové metabolické dráhy. Díky řadě enzymatických reakcí dochází k přeměně 3-dehydrošikimátu na deriváty kyseliny benzoové. Jde např. o kyselinu salicylovou (2-hydroxybenzoovou), jejíž syntéza je v rostlinách vyvolaná např. infekcí a zvýšení obsahu této kyseliny může vyvolat tvorbu obranných látek. Kyselina salicylová tedy vystupuje jako signální látka. Od struktury fenylypropanoidů je dále odvozena i aromatická látka vanilin, jde o 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyd.<sup>7, 8, 11, 13</sup>



**Obr. 4** Zjednodušené schéma biosyntézy některých fenolických látek.

### 1.2.3.3 Polyketidová metabolická dráha

Polyketidová metabolická dráha vychází z kyseliny octové (popř. propionové), jejíž lineární kondenzací se tvoří poly- $\beta$ -ketonický řetězec. Díky činnosti enzymů dochází k prodlužování řetězce vždy o dva nebo tři uhlíkové atomy, přičemž  $\beta$ -keto skupina zůstává zachována, nedochází k její redukci. Prodlužování řetězce je započato od aktivní formy iniciační kyseliny. Iniciační kyselinou může například být kyselina *p*-kumarová při metabolismu flavonoidů. Následně dochází k úpravám vzniklého řetězce cyklizací, která vede ke vzniku aromatického jádra. Další změny řetězce se uskutečňují alkyací či jiným způsobem a následuje transformace na výslednou strukturu daného metabolitu.<sup>14</sup>

### 1.2.3.4 Syntéza složitých fenolických látek

Přírodní rostlinná barviva, např. žluté či oranžové flavonoidy (anthoxanthiny) nebo červené, fialové až modré anthokyany, nebo i jiné složitější struktury polyfenolických látek vznikají využitím obou metabolických drah, jak šikimátové, tak polyketidové. Struktura flavonoidů vychází z fenylpropanoidů, kdy je druhý aromatický kruh navázán na uhlíku C<sub>9</sub> ve fenylpropanoidovém skeletu. Při syntéze flavonoidů se vychází z fenylalaninu, který je

prostřednictvím šikimátové metabolické dráhy převeden přes kyselinu skořicovou na kyselinu *p*-kumarovou. Kyselina *p*-kumarová pak vystupuje jako iniciační kyselina pro kondenzaci kyseliny octové, která vede ke vzniku polyketidu a následně dochází k dalším transformacím vzniklé struktury. Meziproduktem při syntéze flavonoidů je chalkon. Ten vzniká reakcí *p*-kumaryl-CoA se třemi molekulami malonyl-CoA, přičemž reakci katalyzuje enzym chalkon synthasa. Působením chalkon isomerasy přechází chalkon na flavanon, který slouží jako základ pro syntézu řady flavonoidů.<sup>7, 14</sup>

### 1.3 Proteinové složení lupinových semen

Mezi luštěninami je lupina jeden z nejbohatších zdrojů proteinů.<sup>15, 16</sup> Obsah proteinů je podobný jako u sójových bobů a liší se v závislosti na druhu a klimatických podmínkách. Uvádí se, že proteiny tvoří 33–47 % hmotnosti lupinových semen.<sup>1, 2</sup> Hlavní proteiny se u luštěnin nachází v zásobních vakuolách kotyledonů a většinou mají funkci proteinů zásobních. Během klíčení a růstu rostliny totiž dochází ke kvantitativnímu snížení jejich hladiny.<sup>16, 17</sup> Pro aminokyselinové složení lupinových proteinů je typická nižší hladina aminokyselin obsahujících síru, tzn. methioninu (tvoří asi 0,2 % semen) a cysteinu (asi 0,4 % semen).<sup>1, 18, 19</sup> Lupina je ale dobrým zdrojem lysinu.<sup>1, 20</sup> Obsah lysinu v semenech je asi 1,46 %.<sup>18</sup>

Proteiny obsažené v semenech luštěnin se často klasifikují podle postupu T. B. Osborna do čtyř skupin. Toto třídění bylo původně navrženo pro frakcionaci proteinů z pšenice a je založeno na jejich rozdílné rozpustnosti. Proteiny se extrahují z rozdrčených nebo rozemletých semen. Materiál pro analýzu je před frakcionací většinou odtučněn pomocí organického rozpouštědla (př. hexan).<sup>21</sup> První skupinou jsou albuminy (1,6S-2S), což jsou proteiny rozpustné ve vodě. Další skupinu tvoří globuliny (7S-13S) extrahovatelné roztokem NaCl. Ve vodném roztoku alkoholu jsou rozpustné prolaminy a v slabě kyselém nebo zásaditém prostředí jsou rozpustné gluteliny. U luštěnin a jiných dvouděložných rostlin se jako hlavní zásobní proteiny vyskytují albuminy a globuliny. Naopak pro jednoděložné rostliny (např. obilniny) jsou typickými proteiny prolaminy a gluteliny.<sup>19</sup>

V semenech lupiny bílé se vyskytují především proteiny, které patří do globulinové (G) a albuminové (A) frakce. Přičemž jsou zastoupeny v přibližném poměru 9:1 (G:A).<sup>19, 20, 21</sup> Z hlediska aminokyselinového složení je pro albuminy i globuliny typický vyšší obsah kyseliny glutamové (Glu), kyseliny asparagové (Asp) a argininu (Arg). Ve strukturách těchto

proteinů se naopak nejméně objevují aminokyseliny cystein (Cys), methionin (Met) a tryptofan (Trp).<sup>24</sup>

Albuminy se v lupině vyskytují v poměrně malém množství a mají roli zásobních proteinů, popřípadě plní obrannou funkci, např. jako inhibitory hydrolas nebo lektiny.<sup>16</sup> Pro albuminy je charakteristické vyvážené zastoupení aminokyselin. Vzhledem k tomu, že tvoří pouze malou část celkových proteinů, je z nutričního hlediska jejich význam omezený.<sup>24</sup>

Globuliny jsou hlavními proteiny lupiny, tvoří 85-88 % celkových proteinů. Lze je dále rozčlenit do čtyř skupin, na  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - a  $\delta$ -konglutiny. Tyto frakce lze separovat na základě jejich rozdílné elektroforetické mobility, popř. lze využít isoelektrické fokusace, gelové filtrace nebo iontově výměnné chromatografie. Frakce zvaná  $\alpha$ -konglutiny představuje 35-37 % z celkových globulinů. Jedná se o oligomerní proteiny, které jsou tvořeny hexamerními jednotkami. Bývají označovány také jako proteiny leguminového typu. Asi 44-45 % globulinů představují  $\beta$ -konglutiny, jde o trimerní proteiny nazývané jako proteiny vicilinového typu. Jak  $\alpha$ -, tak  $\beta$ -konglutiny v rostlinách plní zásobní funkci. Tyto dvě hlavní frakce jsou podle jejich sedimentačních koeficientů označovány jako 11S a 7S globuliny.<sup>16, 17,</sup><sup>24</sup> Dalšími frakcemi jsou  $\gamma$ -konglutiny (4-5 % z celkových globulinů), jde o glykoproteiny, jejichž kvartérní struktura odpovídá tetrameru a  $\delta$ -konglutiny (10-12 % globulinů) tvořené monomery.<sup>16</sup> Pro oba tyto typy proteinů je charakteristický vyšší obsah aminokyselin obsahujících síru.<sup>25</sup> Přesná funkce  $\gamma$ - a  $\delta$ -konglutinů není zcela objasněna.<sup>16</sup> Všechny proteiny patřící mezi globuliny jsou charakterizovány na molekulární úrovni, ale pouze pro  $\gamma$ -konglutin je známá aminokyselinová sekvence.<sup>23</sup>

Jednotlivé skupiny konglutinů se mezi sebou liší obsahem esenciálních aminokyselin. Ve struktuře  $\alpha$ -konglutinů jsou z esenciálních aminokyselin nejhojnější leucin (Leu; 7,5 %) a isoleucin (Ile; 5,8 %). Naopak nejnižší obsah byl zaznamenán u methioninu (Met; 0,2 %) a tryptofanu (Trp; 1 %). Pro  $\beta$ -konglutiny je typický vyšší obsah leucinu (7,3 %) a fenyalaninu (Phe; 4,9 %) a naopak nízký obsah tryptofanu (0,1 %). Methionin a cystein (Cys) se vyskytují ve stopovém množství. Běžnými aminokyselinami ve struktuře  $\gamma$ -konglutinů jsou leucin (9,4 %) a threonin (Thr; 7,4 %). V omezeném množství se pak opět vyskytují methionin (0,8 %) a tryptofan (1,1 %). Pro poslední frakci,  $\delta$ -konglutiny, je charakteristický vyšší obsah opět u leucinu (8,8 %) a také cysteinu (6,5 %). Stejně jako

v předchozích skupinách konglutinů jsou methionin (0,5 %) a tryptofan (1,1 %) zastoupeny pouze v malé míře.<sup>16</sup>

Prolaminy a gluteliny byly v lupině identifikovány také, ale pouze v malém množství.<sup>20</sup> Prolaminy se vyskytují jako monomery nebo malé agregáty, zatímco gluteliny jsou představovány velkými agregáty s disulfidovými vazbami.<sup>19</sup>

## **1.4 Metody studia fenolických kyselin**

Při analýze fenolických látek je potřeba vzít v úvahu formy, ve které se tyto látky v rostlině nacházejí. Pouze malá část těchto látek se vyskytuje jako volné kyseliny. Většina fenolických látek existuje ve vázané formě; mohou tvořit esterové, etherové nebo acetalové vazby a jsou pak součástí složitějších struktur.<sup>26, 27</sup> Rostlinné fenoly jsou strukturně rozmanitou skupinou látek. Důležitými kroky před vlastní instrumentální analýzou jsou tedy úprava vzorku, purifikace a extrakce látek.<sup>26</sup>

### **1.4.1 Úprava vzorku**

Jde o velmi důležitý krok analýzy fenolických látek. Postup přípravy vzorku závisí na chemické struktuře a vlastnostech analyzovaných látek, např. polarita, acidita, koncentrace, komplexita matrice, atd. Pevné vzorky je třeba upravit mletím nebo drcením, homogenizovat a vysušit. Kapalně vzorky často postačí zfiltrovat nebo centrifugovat. Pro analýzu fenolických kyselin je také důležité provést hydrolýzu a extrakci požadovaných látek. Příprava vzorku pro analýzu většinou zahrnuje několik kroků. Přičemž každý další krok může významně zlepšit selektivitu a citlivost stanovení. Naopak ale dochází ke snížení návratnosti metody a zvyšuje se riziko vnesení chyb do procesu.<sup>26</sup>

#### **1.4.1.1 Hydrolýza fenolických kyselin**

Fenolické kyseliny lze hydrolyzovat kysele, alkalicky (saponifikace), případně enzymaticky. Kyselá hydrolýza se provádí působením anorganické kyseliny, většinou HCl, ve vodném nebo organickém rozpouštědle.<sup>26</sup> Nejčastěji se hydrolyzují methanolické extrakty vzorku. Jednotlivé postupy se liší koncentrací použité kyseliny, dobou trvání a teplotou, při které k reakci dochází. K alkalické hydrolýze se pak používá různě koncentrovaný roztok hydroxidu sodného. Saponifikace většinou probíhá za laboratorní teploty. Postupy popsané v literatuře se odlišují trváním hydrolýzy. V některých případech se požaduje, aby reakce probíhala v temnu, popř. v inertní atmosféře (např. v atmosféře dusíku).<sup>26, 28</sup> Alternativou pro

uvolnění fenolických kyselin je využití enzymů, např. pektinasy, amylasy nebo celulasy. Tyto postupy se však příliš často nepoužívají.<sup>26</sup>

#### **1.4.1.2 Extrakce**

Před vlastní analýzou je třeba analyty izolovat z matrice. Mezi běžně využívané postupy extrakce řadíme extrakci kapalina-kapalina (L-L) a pevná látka-kapalina (S-L). Tyto techniky nejsou náročné na instrumentaci, jsou jednoduché, účinné a poměrně univerzální. Jako extrakční činidla se používají alkoholy (methanol, ethanol), aceton, ethylacetát a diethylether. Pro velmi polární fenolické kyseliny (např. benzoová kyselina) je lépe použít směs alkohol-voda nebo aceton-voda, protože do čistého organického rozpouštědla by nepřešly kvantitativně. Doprovodné nepolární látky (vosky, oleje, chlorofyl, atd.) je možné z rostlinné matrice odstranit extrakcí málo polárním rozpouštědlem, jako jsou např. dichlormethan, chloroform, hexan, či benzen. Během extrakce hraje roli i zvolené pH a teplota, použité objemy vzorku a rozpouštědla a doba působení extrakčního činidla. Často se zařazují dva až tři extrakční kroky, přičemž získané extrakty jsou následně spojeny a dále upravovány. Pro získání čistých extraktů lze využít i superkritickou fluidní extrakci (SFE). Výhodné je, že takto lze odstranit nepolární látky, které jsou v superkritickém CO<sub>2</sub> nerozpustné.<sup>26</sup> Z pevného vzorku je možné požadované látky vyextrahovat pomocí soxhletu. Jako rozpouštědlo se používá např. methanol.<sup>26, 29</sup> Pro izolaci fenolických kyselin byly popsány i postupy jako mikrovlnná extrakce nebo sonifikace.<sup>30</sup>

Získané rostlinné extrakty je potřeba ještě přečistit. K tomu lze použít např. extrakci na pevné fázi (SPE). Běžně se využívají SPE kolonky s C<sub>18</sub> sorbentem. Jde o metodu rychlou a nenáročnou, která se vyznačuje poměrně dobrou reprodukovatelností. Získáme čisté extrakty, analyty lze zakonzentrovat do malého objemu rozpouštědla a během extrakce nevznikají emulze, což bývá problém klasické L-L extrakce.<sup>26</sup>

#### **1.4.2 Stanovení celkových fenolických látek**

Stanovení celkového obsahu fenolů se provádí spektrofotometricky s využitím Folin-Ciocalteova činidla. Jde o techniku jednoduchou a reprodukovatelnou. Podstatou metody je barevná reakce FC činidla s hydroxylovými skupinami látek v roztoku vzorku. Základním mechanismem reakce je přenos elektronu. Elektron z antioxidantu redukuje próbu neboli oxidant a při této reakci dochází ke vzniku modrého zbarvení. Intenzita zbarvení je závislá na koncentraci látky s antioxidačními schopnostmi přítomné ve vzorku.<sup>31, 32</sup>



Složení Folin-Ciocalteova činidla není zcela jasné. Činidlo obsahuje soli heteropolykyselin molybdenu a wolframu. Za vznikající modré zbarvení odpovídá komplex o pravděpodobném složení  $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$ , k jehož tvorbě dochází reverzibilní redukcí molybdenu ( $\text{Mo}^{\text{VI}} \rightarrow \text{Mo}^{\text{V}}$ ). FC činidlo reaguje jak s fenolickými látkami, tak i s kyselinou askorbovou a jinými redukčními činidly. Reakce fenolů s FC činidlem je zajištěna přítomností uhličitanu sodného, který vytváří potřebné bazické prostředí.<sup>26, 31</sup>

Ke stanovení celkového obsahu fenolických látek se používá methanolický extrakt biologického materiálu. Extrakce se provádí 80 % methanolem za laboratorní či vyšší teploty. Lišit se může i doba trvání extrakce.<sup>4, 32, 33</sup> Připravené roztoky vzorků i standardu se nechávají určitou dobu inkubovat a následně se měří absorbance při vlnové délce 725 nebo 765 nm. Obsah fenolických látek se určuje metodou kalibrační křivky a vyjadřuje se v ekvivalentech např. kyseliny gallové, ferulové, kávové nebo katechinu.<sup>3, 32, 33, 34, 35</sup>

K vyhodnocení obsahu fenolických látek ve vzorku se používá měření absorbance ve viditelné oblasti elektromagnetického záření (asi 400–760 nm). Základními prvky instrumentace jsou zdroj záření, monochromátor, kyveta se vzorkem nebo slepým pokusem (blank) a detektor. Jako zdroj spojitého záření se běžně pro VIS oblast používá wolframová žárovka nebo halogenová lampa, jako monochromátor většinou slouží mřížka nebo hranol a častým detektorem je fotonásobič nebo fotonka. Monochromátor ze spojitého záření vyčlení záření o určité vlnové délce a paprsek prochází kyvetou s měřeným vzorkem. Dochází k pohlcení části záření, přičemž absorbance je úměrná koncentraci absorbující látky ve vzorku.

Pro absorpci záření platí tzv. Lambert-Beerův zákon. Jde o vztah mezi absorbancí a koncentrací látky a je vyjádřen jako  $A = \varepsilon \cdot l \cdot c$ . Absorbance je tedy přímo úměrná molárnímu dekadickému absorpčnímu koeficientu ( $\varepsilon$ ), tloušťce absorbující vrstvy (tzn. tloušťce kyvety) a molární koncentraci absorbující látky. Hodnotu  $\varepsilon$  lze experimentálně stanovit. Platnost Lambert-Beerova zákona je omezena jen na nízké koncentrace (do  $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a použití zcela monochromatického záření.<sup>36</sup>

### 1.4.3 Separace fenolických kyselin

Pro analýzu fenolických kyselin se používají chromatografické techniky, např. chromatografie na tenké vrstvě a plynová či kapalinová chromatografie. Také lze využít elektromigrační metody, jako jsou kapilární elektroforéza nebo kapilární elektrochromatografické techniky. Jednotlivé analytické postupy lze spojit s řadou detekčních technik.

#### 1.4.3.1 Papírová chromatografie a chromatografie na tenké vrstvě

Dříve se fenolické kyseliny separovaly pomocí papírové (PC) nebo tenkovrstevné (TLC) chromatografie. Jako stacionární fáze se pro PC používá filtrační papír Whatman. Pro TLC je k dispozici řada stacionárních fází, např. vrstva silikagelu, celulosy nebo polyamidu. Zásadní nevýhodou těchto postupů, je omezená možnost kvantifikace. Jedná se ale o metody rychlé a levné, proto se ještě v dnešní době TLC využívá pro rychlé stanovení fenolických kyselin v přírodním materiálu před samotnou instrumentální analýzou. Detekce se často provádí pomocí UV záření při vlnových délkách  $\lambda = 350-365$  nebo  $250-260$  nm. Případnou kvantifikaci lze provést denzitometricky při obdobných vlnových délkách.<sup>13, 26</sup>

#### 1.4.3.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) se řadí mezi běžnější metody používané pro analýzu fenolických kyselin. GC je velmi vhodnou metodou pro separaci těkavých látek. Fenolické sloučeniny ale příliš těkavé nejsou. Příčinou je přítomnost hydroxylových skupin ve struktuře, které se mohou podílet na vzniku vodíkových vazeb, což vede ke zvýšení teploty varu. Proto je nutné před samotnou analýzou zařadit derivatizaci analytů.<sup>13, 26</sup> Po provedení derivatizace je i GC velmi selektivní a citlivou metodou pro stanovení fenolických kyselin.<sup>37</sup> Těkavé deriváty získáme převedením fenolických kyselin na ethery či estery.<sup>13, 26</sup> Derivatizační reakce nejběžněji vedou ke vzniku alkyl, acetyl, alkoxy či trimethylsilyl (TMS) derivátů fenolických kyselin.<sup>38</sup> Často se provádí methylace, jako derivatizační činidlo používá např. diazomethan nebo dimethyl sulfoxid s methyljodidem v alkalickém prostředí.<sup>13, 26</sup> Silylace je velmi výhodná vzhledem k tomu, že používaná činidla mohou reagovat s více funkčními skupinami derivatizovaných kyselin.<sup>38</sup> Jako běžná silylační činidla slouží např. N,O-bis-(trimethylsilyl)acetamid (BSA), N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (MSTFA) nebo N,O-bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA). Reakční směs se většinou zahřívá, důvodem je urychlení silylace.<sup>13, 26</sup> Byla uveřejněna i práce, kdy silylace neprobíhala

za zvýšené teploty, ale byla provedena za působení mikrovlnného záření. Reakce trvala podstatně kratší dobu, přičemž výtěžek mikrovlnně asistované derivatizace byl srovnatelný s klasickým postupem.<sup>39</sup>

Pro analýzu fenolických kyselin pomocí GC se většinou používají křemenné kapilární klony o délce 25-30 m s vnitřním průměrem v rozmezí 0,25-0,5 mm a tloušťkou filmu stacionární fáze 0,25  $\mu\text{m}$ . Velmi často se používá nepolární stacionární fáze, nejčastěji typu DB 5. Jedná se o fázi tvořenou z 95 % methylsilikonem a z 5 % fenylsilikonem.<sup>13</sup> Technika GC je často spojena s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie. Běžně lze využít i plamenově ionizační detektor (FID).<sup>13, 26, 38</sup>

#### **1.4.3.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie**

V poslední době je metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) nejběžněji používanou technikou pro analýzu fenolických kyselin. Ve srovnání s plynovou chromatografií je výhodnější, protože odpadá krok derivatizace analytů. Pomocí HPLC lze stanovit fenolické látky v poměrně nízkých koncentracích. A to i v případě přítomnosti jiných sloučenin ve vzorku, které by mohly s analyty interferovat, čímž by stanovení pomocí jiné techniky mohly rušit.<sup>26</sup>

Nejčastěji voleným systémem pro analýzu fenolických kyselin je chromatografie v systému reverzních fází (RP). Pokud pracujeme v prostředí, kdy jsou analyty přítomné v disociované formě, lze také využít mechanismus iontové výměny nebo iontového párování. Většina postupů uvedených v literatuře je založena na využití stacionárních fází typu  $\text{C}_{18}$ , př. cit.<sup>3, 37, 40</sup> Běžně se používají chromatografické kolony o délce 10-25, popř. 30 cm. Vnitřní průměr kolon může být různý, rozsah je asi 2,1-5 mm.<sup>13, 26</sup> Poměrně často se pracuje s kolonami o vnitřním průměru 4,6 mm, př. cit.<sup>41, 42, 43</sup> Velikost částic stacionární fáze bývá 3-10  $\mu\text{m}$ , často se pro analýzu volí kolony s částicemi o velikosti 3 nebo 5  $\mu\text{m}$ .<sup>13, 26</sup>

Jako mobilní fáze se obvykle používá organická fáze a vodná fáze s přídavkem kyseliny. Z organických rozpouštědel se většinou volí acetonitril nebo methanol, častěji se používá methanol. Mezi používané kyseliny patří např. kyselina octová nebo mravenčí. Místo vodného roztoku kyseliny je možné použít roztok pufru s nízkou hodnotou pH, např. fosfátový, citrátový nebo acetátový. Kyselina či pufr se do mobilní fáze přidává pro udržení analytů v nedisociované formě. Pro analýzu fenolických kyselin se většinou

volí gradientová eluce.<sup>13, 26, 37, 38</sup> Bylo však popsáno i využití eluce isokratické s mobilní fází tvořenou směsí methanol/voda/kyselina octová (23:77:1, v/v/v).<sup>44</sup>

Metoda HPLC je velmi často spojena s UV detekcí, lze využít i detektor diodového pole (DAD). Tyto techniky je možné využít díky přítomnosti chromoforu ve struktuře fenolických kyselin (aromatický kruh), který způsobuje absorpci UV záření. Absorpční maxima jednotlivých látek jsou odlišná, proto se absorbance měří v poměrně širokém rozsahu vlnových délek (190-380 nm). Deriváty kyseliny benzoové absorbují v oblasti 200-290 nm, v tomto rozsahu neleží pouze maximum kyseliny gentisové (355 nm). Absorpční maxima kyselin hydroxyskořicových nalezneme v rozsahu vlnových délek 270-360 nm.<sup>13, 26, 37, 44</sup> Fenolické kyseliny jsou látky elektrochemicky oxidovatelné, detekci lze tedy provést také pomocí elektrochemických technik, jako jsou voltametrie či amperometrie (spojení HPLC-ECD). Spojení s ECD se nevyužívá příliš často, ve srovnání s jinými metodami se tyto techniky vyznačují řadou nevýhod. Oproti UV detekce se jedná o techniky méně robustní, odezva elektrod nebývá reprodukovatelná, je potřeba používat vodivé mobilní fáze a HPLC separace musí probíhat za izokratických podmínek. Naopak výhodou je vysoká citlivost a selektivita stanovení. Pro ECD jsou typické dobré detekční limity.<sup>45</sup> Pro stanovení nízkých koncentrací je vhodné využít detekci pomocí spojení HPLC-MS.<sup>13, 26, 37, 38</sup>

Spojení HPLC-MS je poměrně běžné. Pro analýzu fenolických kyselin se často využívá ionizace elektrosprejem (ESI). ESI se řadí mezi měkké ionizační techniky. Jedná se o velmi vhodný typ ionizace pro spojení s HPLC průtokovými technikami. Analyty jsou rozpuštěné v těkavém rozpouštědle. Na sprejovací kapiláru se vkládá vysoké napětí (2-5 kV). V silném elektrickém poli dochází ke sprejování eluátu z kolony, vytváří se nabitě kapky. Proudem horkého inertního plynu se postupně odpařuje rozpouštědlo, čímž se zvyšuje povrchový náboj kapek. Dojde ke coulombické explozi a uvolnění iontů analytu. Takto se získají ionty v plynné fázi, které se zavádí dále do hmotnostního spektrometru.<sup>36, 46, 47</sup>

Pro identifikaci analytů pomocí HPLC-MS je vhodné využít tzv. tandemovou hmotnostní spektrometrii (MS/MS, MS<sup>n</sup>). Zde se uplatňují různé hmotnostní analyzátoři, pro detailní identifikaci je nejvhodnější iontová past, která umožňuje MS<sup>n</sup>. Je ovšem možno použít i trojitého kvadrupolového analyzátoři, analyzátoři doby letu (TOF) nebo hybridního analyzátoři (Q-TOF). První dva umožňují identifikaci molekuly na základě interpretace

kolizních spekter; naopak TOF a Q-TOF na základě stanovení přesné hmoty (exact mass determination).<sup>36, 47, 48</sup>

#### 1.4.3.4 UPLC

Další vhodnou technikou pro analýzu fenolických látek je ultraúčinná kapalinová chromatografie (UPLC, UHPLC). Principy metody, využívané mobilní a stacionární fáze a detektory jsou podobné jako u HPLC. Používají se ale kolony se stacionární fází o velikosti částic pod 2,5  $\mu\text{m}$  a instrumentace snese zpětný tlak v systému až do 100 MPa. Z toho vyplývají pozitiva techniky UPLC. Tato metoda se vyznačuje vysokou účinností, citlivostí a lepším rozlišením než klasická HPLC. Je možné pracovat při vyšších průtokových rychlostech. Analýzy jsou tedy kratší oproti HPLC analýzám a spotřeby potřebných rozpouštědel jsou mnohem nižší. Tato technika tedy přináší výhody jak z hlediska ekonomického, tak ekologického.<sup>26, 37, 49</sup>

#### 1.4.3.5 Elektromigrační metody

Elektromigrační metody využívané pro analýzu fenolických kyselin se liší podle povahy analyzovaných látek. Pro separaci a stanovení nabitých fenolických kyselin lze použít kapilární zónovou elektroforézu (CZE). Separaci pomocí CZE ovlivňují zvolené podmínky analýzy. Vliv na analýzu má složení separačního pufru či vložené napětí. Důležitá je i volba pH. Pokud separace probíhá v alkalickém prostředí, dochází k deprotonizaci fenolických kyselin a analyzujeme tedy anionty. Jak nabité, tak nenabitě analyty je možné separovat pomocí micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC). Technika MEKC využívá tvorby micel v separačním pufru po přidání surfaktantu v koncentraci vyšší, než je kritická micelární koncentrace. V systému pak dochází k interakcím mezi analyty a micelami a vznikající agregáty se liší svými mobilitami. Nejčastěji používanými surfaktanty jsou SDS (dodecylsírán sodný) nebo tetraalkylamoniové soli.<sup>26, 30, 38</sup>

Běžně se pro potřeby elektromigračních technik využívají fosfátový či borátový pufr. Vlastnosti používaného pufru lze změnit přidáním organických rozpouštědel či tenzidů. Např. přidáním kationtového tenzidu do elektrolytu dojde k obrácení elektroosmotického toku, popř. vyšší přidavek tenzidu může vést ke tvorbě micel. K separacím se používají křemenné kapiláry pokryté polyimidem o vnitřním průměru 50-100  $\mu\text{m}$ . Vkládané napětí se pohybuje v rozmezí 10-30 kV.<sup>26,30, 38</sup>

Tyto metody nejsou tak náročné na úpravu vzorků, jako plynová či kapalinová chromatografie a jsou pro ně typické krátké doby analýz. Výhodou je i nízká spotřeba rozpouštědel. Z toho vyplývá i nižší ekonomická náročnost než u jiných používaných metod. Dalšími pozitivními rysy těchto technik jsou selektivita a vysoká účinnost. Naopak pro elektromigrační metody obecně platí, že se vyznačují horší opakovatelností než metody chromatografické. Jelikož se dávkované objemy vzorku pohybují v desítkách nl, je potřeba separační metodu spojit s velmi citlivými detektory. Běžně používaným je UV-VIS detektor. Elektromigrační techniky lze spojit i s hmotnostní spektrometrií, nebo s laserem indukovanou fluorescencí (LIF).<sup>26, 30, 37, 38</sup>

## **1.5 Metody analýzy aminokyselinového složení**

Existuje řada metod pro důkaz a stanovení aminokyselin v biologickém materiálu. Tyto techniky jsou často založeny na charakteristických reakcích postranních řetězců aminokyselin. Lze analyzovat v materiálu přítomné volné aminokyseliny, nebo provést stanovení celkového aminokyselinového složení po hydrolýze proteinů. Pro kvantifikaci aminokyselin se běžně používá ninhydrinová reakce spojená se spektrofotometrickým stanovením, nebo reakce s fluoreskaminem a fluorimetrické stanovení. Pro separaci a následné stanovení aminokyselin jsou pak vhodné chromatografické metody ve spojení s různými typy detekce.

### **1.5.1 Hydrolýza proteinů**

Hydrolýza izolovaných proteinů se provádí pomocí 6 M HCl v pyrexových nádobkách. Jedná se o nejběžnější postup hydrolýzy proteinů. Používaná kyselina chlorovodíková může obsahovat např. i příměs fenolu nebo jiných látek (merkptoethanol, indol, atd.). Tyto příměsi slouží jako činidlo, které má zabránit ztrátám některých reziduí, které během hydrolýzy vznikají. Nádobky pro hydrolýzu se pak plní dusíkem. Reakce probíhá 24 hodin při teplotě 110 °C. Po uplynutí doby potřebné pro hydrolýzu se zbylá HCl odstraní např. pomocí vakuové odparky. Za daných podmínek dochází k rozkladu tryptofanu a aminokyselin obsahujících síru (cystein, methionin). Tyto aminokyseliny je potřeba stanovit zvlášť. Tryptofan lze stanovovat po alkalické hydrolýze, kdy dochází k destrukci všech ostatních aminokyselin. K alkalické hydrolýze se běžně používají NaOH nebo KOH, občas také Ba(OH)<sub>2</sub>. Jinou alternativou pro stanovení tryptofanu je kyselá hydrolýza sulfonovou nebo methansulfonovou kyselinou. V případě sirných aminokyselin je nejprve nutné provést

jejich oxidaci, čímž získáme produkty méně náchylné k rozkladu. K oxidativní hydrolyze těchto aminokyselin se používá čerstvě připravená kyselina peroxymravenčí nebo směs kyseliny mravenčí a peroxidu vodíku. Podmínky této reakce (např. teplota, čas) se v různých uvedených pracích liší.<sup>15, 50-55</sup> Po hydrolyze proteinů a následném odpaření nadbytečné HCl je možné aminokyseliny derivatizovat (např. pomocí diethyl ethoxymethylenmalonátu) a upravené vzorky analyzovat např. metodou RP-HPLC s PDA detekcí.<sup>51</sup>

## 1.5.2 Kvantitativní stanovení aminokyselin

### 1.5.2.1 Stanovení celkových aminokyselin

Základní metodou pro kvantifikaci aminokyselin je reakce s ninhydrinem (2,2-dihydroxy-1,3-indandion). Reakcí aminoskupin s ninhydrinem vzniká fialově zbarvená Ruhemanova violet'. Stanovení se provádí spektrofotometricky, absorbanci měříme při 570 nm. U prolinu ale dochází k reakci ninhydrinu s iminoskupinou za vzniku žlutého produktu, vlnová délka maxima je pak 440 nm. Principem reakce s ninhydrinem je oxidativní dekarboxylace aminokyseliny, přičemž vzniká oxid uhličitý, amoniak a aldehyd kratší o jeden uhlík. Z ninhydrinu vzniká reaktivní 2-amino-1,3-indandion, který s další molekulou ninhydrinu tvoří Ruhemanovu violet'. Pro lepší citlivost této reakce je možné přidat hydrindantin (částečně zredukovaný ninhydrin). Ten reaguje s amoniakem, který se během reakce uvolňuje, čímž se výsledné zbarvení prohlubuje.<sup>54, 55, 56</sup> Výhodou této metody oproti instrumentálním analýzám, jako je např. HPLC, je nenáročnost na experimentální vybavení a vhodnost pro sériové analýzy.<sup>57</sup> Existuje řada modifikací původního postupu, které se liší např. dobou zahřívání reakční směsi, teplotou, při které reakce probíhá, používaným pufrem, nebo pH roztoků pufru a rozpouštědel.<sup>57</sup>

Pro stanovení aminokyselin lze využít i citlivější fluorimetrickou metodu. Její nevýhodou ale je nižší citlivost. Jde o reakci s fluoreskaminem nebo *o*-ftalaldehydem vedoucí ke vzniku produktů, které pod UV lampou luminiskují.<sup>56</sup>

Aminokyseliny mohou reagovat např. i s 2,4-dinitrofluorbenzenem (DNFB) za tvorby produktu, který silně absorbuje záření v UV-VIS oblasti. Vzniklé dinitrofenyl-deriváty lze extrahovat do organického rozpouštědla a stanovit. Principem reakce je skutečnost, že nitroskupiny a fluor odčerpávají z benzenového kruhu elektronovou hustotu a ten následně podléhá nukleofilnímu ataku aminoskupiny.<sup>58</sup>

### 1.5.2.2 Instrumentální metody analýzy aminokyselin

K separaci a kvantifikaci jednotlivých aminokyselin je možné použít automatické aminokyselinové analyzátory, nebo metody, jako jsou papírová nebo tenkovrstevná chromatografie (PC, TLC), plynová, vysokoúčinná kapalinová chromatografie (GC, HPLC) nebo chromatografie na ionexech (IEC) a kapilární elektroforéza (CE) spojené s řadou detekčních technik. Separaci aminokyselin lze provést na základě odlišností v polaritě a náboji těchto sloučenin.<sup>58</sup>

Detekce aminokyselin rozseparovaných pomocí chromatografických nebo elektroforetických technik je možná díky derivatizace analytů. Pro detekci a následnou kvantifikaci lze využít specifické reakce aminokyselin s některými činidly, např. ninhydrin, *o*-ftalaldehyd, dansylchlorid a 2,4-dinitrofluorbenzen, fenyliothiokyanát. Reakci lze provést před nebo za kolonou. Běžnější a dříve známý postup je derivatizace za kolonou. Směs aminokyselin je nejprve separována na katexu a následuje reakce s ninhydrinem, fluorskaminem nebo jiným činidlem a spektrofotometrická nebo fluorimetická detekce. Druhou možností je derivatizace aminokyselin před samotnou separací a následná analýza např. pomocí RP-HPLC nebo CZE. V tomto případě se často jako činidlo používá např. fenyliothiokyanát.<sup>53, 58</sup>

Pro analýzu směsi aminokyselin se často využívá iontoměničová chromatografie na katexu. K dělení aminokyselin dochází díky rozdílům v jejich náboji. V kyselém prostředí existují aminokyseliny ve formě kationtů a elektrostatickými interakcemi se vážou na  $-\text{SO}_3^-$  skupiny iontoměniče. Aminokyseliny z kolony eluujeme pufrý o rostoucím pH, eluce je umožněna tím, že při určité hodnotě pH aminokyselina přechází na amfion. Aminokyseliny jsou z kolony vymývány podle klesající polaritě a nejprve jsou eluovány ty, které mají negativní náboj. Jednotlivé aminokyselinové frakce je pak možné stanovit např. ninhydrinovou reakcí. Na tomto principu pracují i automatické aminokyselinové analyzátory, obsah aminokyselin ve směsi vyhodnotíme ze získané chromatografické eluční křivky.<sup>54, 55</sup>

Kromě klasické iontoměničové chromatografie s ninhydrinovou detekcí lze využít i jiné metody analýzy. Pro analýzu směsi aminokyselin byla např. publikována metoda LC/MS/MS. Byla provedena butylace analytů a k separaci byla použita reverzní stacionární fáze  $\text{C}_8$  a jako mobilní fáze směs 20 % acetonitril/0,1 % kyselina mravenčí. Ke kvantifikaci je



možné použít izotopicky značené (deuterované) interní standardy. Oproti LC s ninhydrinovou detekcí můžeme touto metodou dosáhnout rychlejší analýzy.<sup>59</sup>

Další technikou, která derivatizační krok nevyžaduje je např. vysokoúčinná iontově výměnná chromatografie na anexu s pulzní amperometrickou detekcí (HPAEC-IPAD). Díky této detekční technice před vlastní chromatografickou analýzou odpadá krok derivatizace a pro úpravu vzorku proteinu je nutná pouze hydrolýza kyselinou chlorovodíkovou nebo jiným činidlem a následné odpaření kyseliny, rozpuštění odparku ve vhodném rozpouštědle a filtrace.<sup>60</sup>

Dále je možné směs aminokyselin značit fluorescenčním činidlem a analýzu provést pomocí kapilární elektroforézy s fluorescenční detekcí. Vhodným derivatizačním činidlem je například již zmíněný fluoreskamin. Výhodou fluorimetrické detekce oproti detekci spektrofotometrické je její vyšší citlivost. Díky tomu je tento typ detekce vhodný pro spojení s technikami, jako je CE nebo HPLC. V případě analýzy metodou CE je potřeba vhodně zvolit pH používaných pufrů tak, aby analyty nesly náboj a byla tedy možná jejich separace.<sup>61</sup>

## 1.6 Analýza proteinů

### 1.6.1 Stanovení celkových proteinů

Existuje řada metod pro stanovení celkových proteinů. Řadíme mezi ně např. biuretovou, Hartree–Lowryho, bicinchoninovou metodu, metodu Bradfordové nebo UV spektrofotometrickou metodu. Jedná se však o techniky vhodné pro stanovení ve vodě rozpustných proteinů. Nerozpustné proteiny lze stanovit pomocí kjeldahlizace.

*Biuretová metoda* je založena na vzniku červeného komplexu reakcí  $\text{Cu}^{2+}$  iontu s imidovými skupinami v alkalickém prostředí. Biuretové činidlo obsahuje  $\text{CuSO}_4$ , vinan sodno-draselný a NaOH. Měří se absorbance při vlnové délce 550 nm. Vyhodnocení obsahu proteinů ve vzorku se využívá metoda kalibrační přímky. Jako standard je možné použít např. hovězí sérový albumin (BSA) nebo vaječný albumin (ovalbumin, OVA). Tato metoda nezávisí na aminokyselinovém složení proteinu. Nevýhodou je interference s řadou látek, např. glukosa, keratin,  $\text{NH}_4^+$  soli atd.<sup>55, 62</sup>

*Hartree-Lowryho metoda* vychází z biuretové metody, která je doplněna použitím Folin-Ciocalteuova činidla, což vede ke zvýšení citlivosti stanovení.

S Folin-Ciocalteuovým činidlem reaguje tyrosin a tryptofan. Metoda je tedy poměrně závislá na aminokyselinovém složení proteinů. Po reakci s oběma činidly získáme modře zbarvené roztoky a měříme jejich absorbanci při 750 nm. Jako standard lze opět použít BSA nebo OVA.<sup>55, 62, 63</sup>

*Bicinchoninová metoda* je opět spektrofotometrickou metodou stanovení celkových proteinů. V alkalickém prostředí probíhá reakce proteinu a  $\text{Cu}^{2+}$  iontu a dochází k jeho redukci na  $\text{Cu}^+$ . Vzniklé  $\text{Cu}^+$  ionty komplexuje kyselina bicinchoninová (BCA) za vzniku červeného zbarvení. Připravené roztoky se inkubují 30 min při 37 °C a jejich absorbance se měří při  $\lambda = 562$  nm. Kalibračním standardem je např. BSA. Tato metoda se vyznačuje jednoduchým provedením a podobnou citlivostí jako Lowryho metoda.<sup>55, 62</sup>

*Metoda Bradfordové* je založena na vazbě barviva Coomassie Brilliant Blue G250 na proteinové molekuly v kyselém prostředí. Na nepolární části proteinu se barvivo váže trifenylmethanovou skupinou a  $-\text{SO}_3^-$  skupina se váže na kladně nabitě postranní řetězce aminokyselin, např. arginin a lysin. Intenzita zbarvení je závislá na koncentraci proteinů ve vzorku. Po pěti minutové inkubaci při pokojové teplotě se u všech připravených roztoků změní absorbance při 595 nm. Ke zhotovení kalibrační přímky lze opět použít BSA o různých koncentracích.<sup>55, 62</sup>

*UV spektrofotometrická metoda* je založena na přítomnosti aromatických aminokyselin (tyrosin, tryptofan), které absorbují UV záření. Pro spektrofotometrické stanovení se tedy používají křemenné kyvety. Metoda je závislá na aminokyselinovém složení proteinu, je nutná přítomnost absorbujících aminokyselin. Absorbance se měří při  $\lambda = 280$  nm, nebo při více vlnových délkách (např. 205, 235, 260 a 280 nm) a obsah proteinů ve vzorku se vypočte.<sup>55, 62, 63</sup>

Pro stanovení obsahu nerozpustných proteinů předchozí metody využít nelze. Celkový obsah proteinů je možné určit na základě *kjeldahlizace*. Principem této techniky je převedení organického dusíku na amoniak, jeho destilace a titrace. Získáme informaci o celkovém množství dusíku ve vzorku. Tuto hodnotu je pak třeba vynásobit korekčním faktorem. Vychází se z předpokladu, že bílkoviny obsahují asi 16 % dusíku. Univerzálně má tedy korekční faktor hodnotu 6,25 (tzn.  $100/16 = 6,25$ ). Obsah dusíku se v různých proteinech liší,

proto se pro výpočet tzv. hrubé bílkoviny používají i jiné hodnoty korekčního faktoru v závislosti na druhu analyzované potraviny.

Vzorek organické dusíkaté látky nejprve mineralizujeme zahříváním s kyselinou sírovou. Pro zvýšení teploty během rozkladu se ke kyselině sírové přidává síran draselný, popř. jiná vhodná sůl. Potřebné je přidat také katalyzátor, např. selen, rtuť, měď, oxid měďnatý, oxid rtuťnatý. Mineralizaci lze urychlit i přidávkem oxidačního činidla. Běžně se používá peroxid vodíku, ale je možné zvolit např. peroxosíran draselný, kyselinu chloristou nebo manganistan draselný. Amino a iminodusík se převede na síran amonný. Reakční směs se zalkalizuje roztokem hydroxidu sodného a uvolněný amoniak se vydestiluje do odměrného roztoku kyseliny sírové. Nadbytek kyseliny sírové se pak retitruje odměrným roztokem hydroxidu sodného na Tashiro indikátor (roztok methylčerveně a methylenové modře). Jinou možností je destilovat amoniak uvolněný ze síranu amonného do zředěné kyseliny borité a acidimetrické stanovení (titrace kyselinou sírovou). Opět lze použít Tashiro indikátor. Ze spotřeby titračního činidla se vypočítá obsah dusíku ve vzorku a vynásobením korekčním faktorem se přepočítá na obsah hrubé bílkoviny.<sup>64, 65</sup>

## **1.6.2 Identifikace proteinů**

### **1.6.2.1 Frakcionace proteinů**

Pro analýzu proteinů je vhodné nejprve provést jejich frakcionaci a následně proteiny v jednotlivých frakcích separovat a identifikovat. Frakcionaci proteinů lze provést podle postupu T. B. Osborna. Metoda je založena na rozdílné rozpustnosti proteinů v různých rozpouštědlech. Frakcionací podle Osborna získáme čtyři skupiny proteinů. Jedná se o albuminy, globuliny, prolaminy a gluteliny. Skupina albuminů je rozpustná ve vodě, extrakce se provádí jako první. Následuje oddělení globulinů, které jsou rozpustné v roztocích solí. Používá se např. 0,5 M NaCl. Prolaminy se rozpouštějí v 70 % ethanolu a gluteliny ve zředěných kyselinách a zásadách. Gluteliny se extrahují např. do 0,1 M NaOH. K separaci proteinů v jednotlivých frakcích je vhodné použít gelovou elektroforézu (SDS-PAGE). Nejprve je ale nutné globulinovou frakci dialyzovat a tím zbavit solí.<sup>66-69</sup>

### 1.6.2.2 SDS-PAGE

Velmi vhodnou metodou pro dělení proteinů je gelová elektroforéza. Často se využívá elektroforéza na polyakrylamidovém gelu. Proteiny se na gelu dělí podle velikosti molekul. Větší molekuly gelem putují pomaleji než molekuly malé, které procházejí snadněji.

Příprava polyakrylamidového gelu je založena na radikálové polymeraci akrylamidu (AA) a N,N'-metylenbisakrylamidu (BIS). Polymerace je iniciována přidavkem peroxidisíranu amonného (APS). Ke směsi pro přípravu gelu se přidává i N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED), který reakci katalyzuje tím, že stabilizuje volné radikály vznikající z APS.<sup>55, 70</sup> Používají se gely o různé celkové koncentraci akrylamidu (AA + BIS), nejčastěji 10–13 %.<sup>71</sup> Čím větší je koncentrace akrylamidu, tím menší póry v gelu vznikají.

Oproti klasické elektroforéze na polyakrylamidovém gelu (PAGE) se u SDS-PAGE do gelu přidává i roztok dodecylsíranu sodného (SDS). Jedná se o aniontový tenzid, který molekulám proteinů udílí stejný (uniformní) záporný náboj. Díky této skutečnosti pak separace probíhá na základě rozdílných relativních molekulových hmotností (tzn. podle velikosti molekul) proteinů.<sup>55, 70</sup>

Lepší separace (užší zóny) lze dosáhnout tzv. diskontinuální elektroforézou. K zaostření nejprve dochází na zaostřovacím gelu. Rozdíl mezi těmito gely spočívá v odlišné velikosti pórů a v různém pH pufrů, které se při přípravě gelů používají. Zaostřovací gel má větší póry, celková koncentrace akrylamidu je běžně 4 %, např. cit.<sup>67, 72</sup>. Gely obsahují Tris-HCl pufr, pH pufru v zaostřovacím gelu je nižší (6,8) než v gelu dělicím (8,8). Jako elektrodový pufr se používá jiný pufr, než pro přípravu gelů. Jedná se o další rozdíl oproti klasické kontinuální elektroforéze, kdy se gelový i elektrodový pufr složením neliší.<sup>55</sup> Nejběžněji se používá Tris-glycinový pufr (tzv. Laemliho systém). Během separace vznikají ostré zóny lišící se elektroforetickými mobilitami. Nejvyšší mobilitu mají chloridové ionty, následují zóny proteinů a poslední zónou je glycin. Uplatňuje se izotachoforetický samozaostřující efekt. Existují i modifikované systémy, např. Tris-Tricinový podle Shaggera a von Jagowa.<sup>55, 72</sup>

Současně se vzorkem provádíme i separaci standardu (markeru). Jde o směs určitého množství proteinů o známých molekulových hmotnostech. Po proběhnutí elektroforézy je

možné na základě porovnání vyhodnotit přibližné molekulové hmotnosti jednotlivých separovaných zón vzorku.

Po ukončení elektroforézy je potřeba provést vizualizaci separovaných proteinů. Často se gely barví barvivem Coomassie Brilliant Blue. Výhodou je, že dochází ke kvantitativnímu barvení a tudíž lze dále jednotlivé zóny analyzovat pomocí hmotnostní spektrometrie. Citlivějším způsobem vizualizace je barvení stříbrem. Oproti předchozímu způsobu ale k barvení nedochází kvantitativně, protože se ionty stříbra vážou jen na aminokyselinové zbytky, jako jsou Asp, Glu, His, Cys, Met a Lys. Alternativou je použití fluorescenčních činidel typu SYPRO (SYPRO Ruby, Orange). Pro tento typ barvení je charakteristické jednoduché provedení, kvantitativnost i vysoká citlivost.<sup>70, 71</sup>

Pro analýzu směsi proteinů je vhodnou metodou také dvourozměrná elektroforéza (2-DE). Nejprve se analyty dělí pomocí izoelektrické fokusace (IEF). Proteiny se separují podle svých izoelektrických bodů (pI), ne podle molekulových hmotností. Parametr pI vyjadřuje hodnotu pH, při kterém analyt v elektrickém poli nemigruje. V druhém rozměru se provádí SDS-PAGE.<sup>55, 71, 73</sup>

### 1.6.2.3 MALDI-MS

Po provedení separace proteinů pomocí gelové elektroforézy je dalším možným krokem analýzy hmotnostní spektrometrie s desorpční ionizací laserem v přítomnosti matrice (MALDI).<sup>74</sup> Zóny proteinů rozseparované na gelu je možné vyříznout a takto získaný vzorek dále upravit pro MS analýzu.

Proteiny lze působením proteolytických enzymů štěpit na peptidy, jejichž molekulové hmotnosti měříme pomocí hmotnostní spektrometrie. Nejčastěji se využívá trypsin, který proteiny štěpí v místě výskytu argininu nebo lysinu. Rozměry molekuly trypsinu umožňují proniknout do pórů běžně používaných gelů pro SDS-PAGE. Peptidy vzniklé po štěpení trypsinem jsou vhodné pro analýzu pomocí MS (dobrá ionizovatelnost).<sup>75</sup>

MALDI je měkkou ionizační technikou, která se velmi často využívá při hmotnostní spektrometrii biomolekul, konkrétně např. proteinů, peptidů či nukleotidů. Vzorek se nanese na nerezovou destičku a překryje netěkavou matricí. K často používaným matricím patří např. kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová a jiné. Nejprve matrice absorbuje laserový pulz, dojde k její ionizaci a zprostředkovaně pak k ionizaci

molekul analytů. Nedochozí tedy k takové fragmentaci jako v případě přímé ionizace laserem. Získáme ionty (většinou protonizované nebo deprotonizované molekuly analytů) v plynné fázi, které zavádíme dál do evakuované části hmotnostního spektrometru. Výhodou ionizace MALDI je možnost stanovit molekulové hmotnosti různých látek ve vzorku, vysoká citlivost stanovení a detekční limity v řádu pmol.<sup>36, 74, 76, 77</sup>

Technika MALDI se často spojuje s použitím analyzátoru doby letu (TOF). Ionty analytů se urychlují silným elektrickým polem, získají stejnou kinetickou energii a zavádí se do evakuované trubice analyzátoru. V této trubici se pohybují různými rychlostmi v závislosti na jejich náboji a hmotnosti, menší ionty se pohybují rychleji. Zjišťuje se doba letu částice nutná pro překonání trubice o dané délce a vypočte se poměr  $m/z$ . TOF analyzátor je poměrně jednoduché zařízení vyznačující se vysokou citlivostí.<sup>74, 76, 77</sup>

Po provedení MALDI-MS analýzy vzorku je potřeba provést identifikaci přítomných látek. K tomu je možné využít různé proteinové databáze a atlasy spekter proteinů. K identifikaci dochází srovnáním teoretických (možné štěpy) a experimentálně získaných dat.<sup>75</sup>

## 1.7 Enzymy

Enzymy jsou významnou skupinou látek všech živých organismů. Jedná se o biomolekuly s katalytickou funkcí (biokatalyzátory). Enzymy jsou látky bílkovinné povahy. Rozlišujeme jednosložkové enzymy tvořené pouze bílkovinou a dvousložkové enzymy (holoenzymy) složené z bílkovinné a nebílkovinné části (tzv. kofaktoru). Pro enzymy je typická specifita substrátu a specifita účinku. V organismu se enzymy podílí mimo jiné i na štěpení živin. Hlavními živinami jsou sacharidy, tuky a bílkoviny. Trávení každé skupiny živin je katalyzováno určitou skupinou enzymů. Sacharidy jsou štěpeny za účasti amylas. Trávení bílkovin je katalyzováno proteolytickými enzymy (proteasy, peptidasy). Na rozkladu tuků v organismu se podílí lipasy.<sup>78, 79</sup>

Lipasy jsou skupinou enzymů s širokým využitím např. v potravinářství, farmaceutickém průmyslu, či při výrobě detergentů. Jedná se o enzymy, které katalyzují hydrolytické štěpení triacylglyceridů na mastné kyseliny a glycerol. Aktivitu lipas lze stanovit řadou metod, např. fluorometricky, kolorimetricky, pomocí MS či chromatografických technik, imunologickými metodami atd. Spektrofotometrické metody jsou poměrně běžné

a jednoduché. Jako substrát je možné využít např. 4-nitrofenylbutyrát (4-NFB). Působením lipas vzniká žlutý 4-nitrofenol, jehož množství spektrofotometricky měříme při 405 nm.<sup>80</sup> Enzymové extrakty pro stanovení aktivity je nutné připravovat vždy čerstvé, protože s časem aktivita klesá. Uvádí se, že po 24 hodinách dojde k poklesu o 70 %.<sup>81</sup>

Amylasy se běžně využívají např. v pivovarnictví, lihovarnictví, či jiných odvětvích potravinářství.<sup>55</sup> Podle místa štěpení 1,4 $\alpha$ -D-glykosidových vazeb ve struktuře polysacharidu se dělí na  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -amylasy.  $\alpha$ -amylasy tyto vazby mohou hydrolyzovat kdekoliv, štěpením vznikají dextriny.  $\beta$ -amylasy štěpí 1,4- $\alpha$ -D-glykosidové vazby od neredukujícího konce řetězce polysacharidu za vzniku maltosy.  $\gamma$ -amylasy štěpí 1,4- $\alpha$ -D-glykosidové vazby i 1,6- $\alpha$ -D-glykosidové vazby opět z neredukujícího konce polysacharidového řetězce.<sup>55, 79</sup> Aktivitu amylas lze stanovit řadou metod, které se dělí do tří skupin. Jedná se o metody amyloklastické, které jsou založeny na sledování změny koncentrace substrátu (škrob, barvený amylopektin, amylosa). Druhou skupinou jsou metody sacharogenní, které stanovují redukující sacharidy vzniklé enzymatickým štěpením. Poslední skupinu tvoří metody chromogenní, které sledují vznik barevné sloučeniny z chromogenem značeného substrátu.<sup>79</sup>

Proteasy jsou skupinou enzymů, které katalyzují štěpení peptidových vazeb v proteinech nebo peptidech. K hydrolyze peptidových vazeb může docházet uvnitř řetězce, pak se jedná o endopeptidasy. Exopeptidasy katalyzují odštěpení koncové aminokyseliny a dělí se na N-koncové (aminopeptidasy) a C-koncové (karboxypeptidasy). Enzymatické štěpení proteinů proteolytickými enzymy se využívá pro jejich identifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie. Pro MS analýzu se běžně využívá trypsin, který proteinový řetězec štěpí v místě vazby lysinu nebo argininu. Mezi proteasy patří např. i pepsin, chymotrypsin, rennin a papain. Enzymová aktivita se stanovuje jako množství peptidů odštěpených za určitou dobu. Využít lze např. Ansonův test, kdy se jako substrát používá hemoglobin a Lowryho metodou se zjišťuje množství uvolněného tyrosinu. Dále je možné použít syntetické substráty, např. N- $\alpha$ -benzoyl-DL-arginin-4-nitroanilid (BAPNA) pro trypsin. V tomto případě spektrofotometricky stanovujeme množství uvolněného chromoforu.<sup>55, 75</sup>

## 2. Experimentální část

### 2.1 Biologický materiál

K analýzám byla použita mouka z lupiny bílé (*Lupinus albus L.*), odrůda Amiga, fa Alena Půlpánová, Olomouc. K dispozici byly vzorky mouky ze sklizní 2007, 2008 a 2009. Dále byla k dispozici mouka upravená pražením (sklizeň 2008 a 2009).

### 2.2 Chemikálie

#### 2.2.1 Stanovení celkových fenolických látek (TPC) metodou Folin-Ciocalteaua

Methanol, Lach-ner, Neratovice, ČR

Uhličitan sodný, bezvodý p.a., Lach-ner, Neratovice, ČR

Kyselina ferulová, Dr. Theodor Schuchardt GmbH & Co, Mnichov, Německo

Folin-Ciocalteuovo činidlo, katedra biochemie, UP Olomouc

#### 2.2.2 Analýza fenolických kyselin systémem UPLC-MS/MS

Methanol, Lach-ner, Neratovice, ČR

Deuterované interní standardy (2,3,5,6-D4) 4-hydroxybenzoová a (3,4,5,6-D4) salicylová kyselina, Cabridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA

Standardy fenolických kyselin: kyseliny ferulová (FA), gentisová (GA), gallová (GaA), *p*-kumarová (pCoA), *p*-hydroxybenzoová (pHBA), sinapová (SiA), syringová (SyA), vanilová (VA), protokatechová (PA), salicylová (SA), chlorogenová (ChA), kávová (CaA), *m*-kumarová (mCoA), *o*-kumarová (oCoA), 3,5-dihydroxybenzoová (3,5-DHBA), *trans*-skořicová (tCA), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Kyselina chlorovodíková 35 % p.a., Lach-ner, Neratovice, ČR

Hydroxid sodný p.a., Lach-ner, Neratovice, ČR

Kyselina askorbová p.a., Lach-ner, Neratovice, ČR

Diethylether nestabilizovaný p.a., Lach-ner, Neratovice, ČR



Kyselina mravenčí 98-100 % p.a., MERCK, Darmstadt, Německo

Acetonitril CHROMASOLV Plus, for HPLC,  $\geq 99,9$  %, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA

### **2.2.3 Frakcionace proteinů:**

Hexan p.a., Lachema, Neratovice, ČR

Chlorid sodný p.a., Lach-ner, Neratovice, ČR

Ethanol, denaturovaný, Lihovar Kojetín, ČR

Hydroxid sodný p.a., Lach-ner, Neratovice, ČR

### **2.2.4 Stanovení celkových proteinů metodou BCA**

Kyselina bicinchinová, roztok, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA

Síran měďnatý pentahydrát, Lachema, Neratovice, ČR

Hovězí sérový albumin (BSA), Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA

### **2.2.5 SDS-PAGE:**

Elektrodový pufr (0,025M Tris, 0,192M glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3):

Tris, Ultra Pure Grade, MP Biomedicals Inc., Ohio, USA

Glycin, Electrophoresis Grade, MP Biomedicals Inc., Ohio, USA

Dodecylsulfát sodný (SDS), Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA

Peroxodisíran amonný (APS), Fluka, Steinheim, Německo

Akrylamid, Electrophoresis Grade, MP Biomedicals Inc., Ohio, USA

N,N'-methylenbisakrylamid (BIS), Ultra Pure, MP Biomedicals Inc., Ohio, USA

N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED), SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo

1,5M Tris HCl pufr, pH 8,8

Tris, Ultra Pure Grade, MP Biomedicals Inc., Ohio, USA

Kyselina chlorovodíková 35 % p.a., Lach-ner, Neratovice, ČR

0,5M Tris HCl pufr, pH 6,8

Tris, Ultra Pure Grade, MP Biomedicals Inc., Ohio, USA

Kyselina chlorovodíková 35 % p.a., Lach-ner, Neratovice, ČR

Vzorkovací pufr (0,125M Tris-Cl, 4 % SDS, 20 % v/v glycerol, 0,2M dithiothreitol, 0,02 % bromophenol blue, pH 6,8)

Dodecylsulfát sodný (SDS), Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA

Glycerol bezvodý p.a., Lach-ner, Neratovice, ČR

Bromfenolová modř (Electrophoresis Purity Reagent), Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA

Dithiothreitol, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA

Coomassie Blue G-250, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA

Marker SDS 6H2-1VL (Carbonic anhydrase-bovine, Albumin-egg, Albumin-bovine, Phosphorylase B-rabbit,  $\beta$ -galactosidase-E. coli, Myosin-rabbit muscle), Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA

Marker SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range (Phosphorylase B, Serum albumin, Ovalbumin, Carbonic anhydrase, Trypsin inhibitor, Lysozyme), Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA

Marker Blueranger Prestained Protein Molecular Weight Marker Mix (Myosin, Phosphorylase B, BSA, Ovalbumin, Carbonic Anhydrase, Trypsin Inhibitor, Lysozyme), Pierce, Rockford, IL, USA

Molecular Weight Marker (Myosin-porcine,  $\beta$ -galactosidase-E. coli, Phosphorylase B-rabbit muscle, Albumin-bovine, Ovalbumin, Carbonic anhydrase-bovine erythrocytes), Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA

Ultra-low Range Molecular Weight Marker (Triose Phosphate Isomerase, Rabbit Muscle, Myoglobin, Horse Heart,  $\alpha$ -Lactalbumin, Bovine Milk, Aprotinin, Bovine Lung, Insulin Chain B, Oxidized, Bovine, Bradykinin), Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA

### **2.2.6 MALDI:**

Acetonitril, Plus, for HPLC,  $\geq 99,9\%$ , Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA

Dithiothreitol, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA

Hydrogenuhlčitan amonný, Lachema, Neratovice, ČR

Jodoacetamid (IAC), Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA

Modifikovaný trypsin, prof. Šebela, katedra biochemie

### **2.2.7 Stanovení aktivity lipáz**

4-nitrofenylbutyrát (4-NFB) 98 %, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA

Ethanol, denaturovaný, Lihovar Kojetín, ČR

0,1M K-fosfátový pufr pH 8,04:

Hydrogehfosforečnan draselný, MP Biomedicals Inc., Ohio, USA

Dihydrogenfosforečnan draseln, MP Biomedicals Inc., Ohio, USA

### **2.2.8 Stanovení aktivity amyláz**

4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES), Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA

$\alpha$ -Amylase-EPS, BioSystems S. A., Barcelona, Španělsko

## 2.3 Přístrojové vybavení

Analytické váhy GR-200 EC, A & D Instruments Ltd., Abingdon, Velká Británie

Centrifuga R 5415 R, Eppendorf AG, Hamburg, Německo

Centrifuga miniSpin, Eppendorf AG, Hamburg, Německo

Centrifuga chlazená IEC CL31 R Multispeed, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Centrifuga chlazená ROTANTA 460 R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Německo

Digitální bloková lázeň, Grant Instruments Ltd., Cambridge, Velká Británie

Elektroda Polyplast Pro, Hamilton Company, Reno, Nevada, USA

MALDI-MS systém:

Hmotnostní spektrometr MALDI-TOF MS Microflex, Bruker Daltonics GmbH, Brémy, Německo

Software FlexControl a FlexAnalysis, Bruker Daltonics GmbH, Brémy, Německo

Program pro vyhledávání v databázích Mascot, Matrix Science Inc., Boston, MA, USA

Chlazený laboratorní termostat Q-CELL 60/40 basic, Poll Lab, Bielsko-Biala, Polsko

Jednotka pro demineralizaci vody Simplicity 185 system, Millipore, Bedford, MA, USA

Kulový mlýn Retsch MM301 (Haan, Německo)

Laboratorní minitřepačka IKA MS 3 basic, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo

Laboratorní třepačka IKA KS 130 basic, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo

Lyofilizátor Lyovac GT 2, Leybold-Heraeus GmbH., Hanau, Německo

Magnetická míchačka IKA Big Squid STAR, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo

Magnetická míchačka RCT basic, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo

Membránová vakuová pumpa D-Lab, Edwards, Crawley, Velká Británie

pH metr inoLab Level 1, WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Německo

Pipety Research, Eppendorf AG, Hamburg, Německo

Spektrofotometr Biochrom WPA Lightwave II UV/Visible, Biochrom Ltd., Cambridge, Velká Británie

Termoblok ThermoStat plus, Eppendorf AG, Hamburg, Německo

Ultrafiltrační cela Amicon 8200, Millipore, Billerica, MA, USA

Ultrazvuková lázeň K5, Kraintek, Podhájska, Slovensko

UPLC-MS/MS systém:

Kapalinový chromatograf AQUICITY Ultra Performance LC system, Waters, Milford, MA, USA

Kolona BEH C<sub>8</sub>, 1,7 μm, 2,1 x 150 mm, Waters, Milford, MA, USA

Detektor PDA 2996, Waters, Milford, MA, USA

Hmotnostní detektor s trojitým kvadrupolem Micromass Quatro micro API, Waters MS Technologies, Manchester, Velká Británie

Software MassLynx verze 4.0, Waters, Milford, MA, USA

Váhy KERN 440-47, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo

Váhy KERN 440-33, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo

Váhy KERN 420-21N, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo

Vakuová rotační odparka Concentrator plus, Eppendorf AG, Hamburg, Německo

Vodní lázeň SUB6, Grant Instruments Ltd., Cambridge, Velká Británie

Vortex Grant-bio PV-1 (P-LAB a.s., Anglie)

Zařízení pro elektroforézu:

Elektroforetická komora s příslušenstvím BIO-RAD mini-PROTEAN 3 CELL,  
Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA

Zdroj pro elektroforézu Bio-Rad Powerpac 300, Bio-Rad Laboratories, Inc.,  
Hercules, CA, USA

## **2.4 Postupy analýz**

### **2.4.1 Stanovení celkových fenolických látek (TPC) metodou Folin-Ciocalteua**

Postup stanovení byl s drobnými úpravami převzat z literatury.<sup>4</sup> Obsah fenolických látek byl stanovován ve vzorcích lupinové mouky, sklizně 2007 (neupravená), 2008 (upravená, neupravená) a 2009 (upravená, neupravená).

Byly připraveny 80 % methanolicke extrakty pro stanovení celkových fenolických látek. Do centrifugačních kyvet byl navážen 1 g vzorku mouky (2007 neupravená, 2008 upravená a neupravená, 2009 upravená a neupravená) a vzorky byly extrahovány 10 ml 80 % methanolu na laboratorní třepačce. Extrakce probíhala 2 hodiny při 37 °C. Poté byly vzorky odstředěny na centrifuze (12000 g, 10 min, 25 °C). Supernatanty byly odpipetovány. Do centrifugačních mikrozkušavek byly napipetovány 2 ml supernatantu a opět odstředěny na centrifuze (16100 g, 10 min, 25 °C). Takto získané supernatanty byly odpipetovány a použity ke stanovení TPC.

Do centrifugačních kyvet bylo napipetováno 150 nebo 250 µl methanolickeho extraktu vzorku. Extrakty byly zředěny destilovanou vodou na výsledný objem 4250 µl. Poté bylo k extraktům napipetováno 250 µl Folin-Ciocalteuova (FC) činidla (zředěno vodou v poměru 1:1) a 500 µl nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Ze zásobního roztoku 0,01 % kyseliny ferulové (FA) byla napipetována sada kalibračních roztoků (Tab. IV). Připravené reakční směsi byly dobře promíchány pomocí vortexu a inkubovány 25 min při laboratorní teplotě. Sada roztoků byla centrifugována (4700 g, 10 min, 25 °C). Následně byly změřeny absorbance všech roztoků při vlnové délce 725 nm. Obsah fenolických látek ve vzorcích byl

určen metodou kalibrační přímky a výsledky byly vyjádřeny v mg FA/g, tzn. v mg ekvivalentů kyseliny ferulové na g mouky.

**Tab. IV** Příprava kalibračních roztoků kyseliny ferulové (FA).

<b>V FA (μl)</b>	<b>V H<sub>2</sub>O (μl)</b>	<b>V F-C. činidla (μl)</b>	<b>V nas. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (μl)</b>
0	4250	250	500
50	4200	250	500
100	4150	250	500
300	3950	250	500
500	3750	250	500

#### 2.4.2 Analýza fenolických kyselin systémem UPLC-MS/MS

Byl použit upravený postup převzatý z diplomové práce.<sup>82</sup> Vzorky byly připraveny duplicitně. Do centrifugačních mikrozkmavek bylo naváženo 30 mg mouky (2007 neupravená, 2008 upravená a neupravená, 2009 upravená a neupravená), napipetováno 700  $\mu\text{l}$  80% methanolu a 10  $\mu\text{l}$  (k navážce č. 1 a 3 z každého vzorku) nebo 20  $\mu\text{l}$  (k navážce č. 2 z každého vzorku) interních deuterovaných standardů. Byla provedena homogenizace vzorků pomocí kulového mlýnu (20 min, 2500 Hz/s). Vzorky byly 10 minut umístěny v ultrazvukové lázni, poté 30 minut třepány za laboratorní teploty na třepačce a odstředěny na centrifuze (16100 g, 20 min, 4 °C). Supernatanty byly odpipetovány. K pevnému podílu bylo znovu napipetováno 700  $\mu\text{l}$  80% methanolu, směs byla dobře promíchána pomocí vortexu a podle předchozího postupu byla provedena reextrakce mouky. Spojené supernatanty byly odpařeny do sucha na vakuové rotační odparce. Methanolické odparky i pevný podíl byly dále upravovány.

Byla připravena frakce volných fenolických kyselin (F1). K methanolickým odparkům bylo napipetováno 500  $\mu\text{l}$  0,1 mol.l<sup>-1</sup> HCl. Roztoky byly dobře promíchány na vortexu a extrahovány 750  $\mu\text{l}$  diethyletheru. Extrakty byly odstředěny (4000 g, 1 min), etherové vrstvy odděleny a byla provedena opětovná extrakce 750  $\mu\text{l}$  diethyletheru. Spojené etherové vrstvy byly odpařeny do sucha v termobloku (50 °C).

Byla provedena alkalická hydrolyza extraktů a tím připravena frakce esterů fenolických kyselin (F2). K methanolickým odparkům bylo napipetováno 400  $\mu\text{l}$  1 mol.l<sup>-1</sup> NaOH s 0,5% kyselinou askorbovou, vzorky byly dobře promíchány a při laboratorní teplotě třepány 3 hodiny ve tmě na laboratorní třepačce. Vzorky byly centrifugovány (16100 g, 4 min, 4 °C), supernatanty byly odpipetovány a okyseleny 50  $\mu\text{l}$  konc. HCl. Takto upravené vzorky byly 2x extrahovány 750  $\mu\text{l}$  diethyletheru a po každé extrakci byly centrifugovány (4000 g, 1 min). Etherové byly odpařeny do sucha v termobloku (50 °C).

Byla provedena kyselá hydrolyza extraktů a tím připravena frakce glykosidů fenolických kyselin (F3). K methanolickým odparkům bylo napipetováno 500  $\mu\text{l}$  1 mol.l<sup>-1</sup> HCl, vzorky byly promíchány pomocí vortexu a termostatovány 1 hodinu na 80 °C. Dále byly vzorky 2x extrahovány 750  $\mu\text{l}$  diethyletheru a vždy odstředěny na centrifuze (4000 g, 1 min). Etherové vrstvy byly spojeny a odpařeny do sucha v termobloku (50 °C).



Byla provedena alkalická hydrolyza pevného podílu a tím připravena frakce v methanolu nerozpustných vázaných fenolických kyselin (F4). K pevným podílům bylo napipetováno 400  $\mu\text{l}$  1  $\text{mol.l}^{-1}$  NaOH s 0,5 % kyselinou askorbovou a 20  $\mu\text{l}$  interních deuterovaných standardů. Vzorky byly třepány na třepačce 3 hodiny ve tmě při laboratorní teplotě. Hydrolyzované vzorky byly centrifugovány (16100 g, 4 min, 4 °C), supernatanty byly odděleny, okyseleny 50  $\mu\text{l}$  konc. HCl a 2x extrahovány 750  $\mu\text{l}$  diethyletheru. Spojené etherové vrstvy byly odpařeny do sucha v termobloku (50 °C).

K etherických odparkům bylo napipetováno 100  $\mu\text{l}$  5 % acetonitrilu v 7,5  $\text{mmol.l}^{-1}$  kyselině mravenčí. Roztoky byly promíchány pomocí vortexu, 3 minuty ponechány v ultrazvuku a opět vortexovány. Vzorky byly filtrovány přes mikrofiltry (0,45  $\mu\text{m}$ ; 11000 g, 4 min), napipetovány do skleněných vialek a použity k analýze pomocí UPLC-MS/MS. Nástřík vzorků pro analýzu byl 2  $\mu\text{l}$ .

Parametry pro analýzu systémem UPLC-MS/MS byly převzaty z literatury.<sup>49</sup> Separace látek byla provedena v systému reverzní fáze gradientovou elucí. Kolona BEH C<sub>8</sub>, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 150 mm (Waters, Milford, MA, USA) byla termostatována na 30 °C. Jako mobilní fáze byla použita 7,5  $\text{mmol.l}^{-1}$  kyselina mravenčí (roztok A) a acetonitril (roztok B) s průtokem 250  $\mu\text{l.min}^{-1}$ . Program gradientu mobilní fáze byl následující: 5 % B 0,8 min; 5-10 % B za 0,4 min; izokraticky 10 % B 0,7 min; 10-15 % B za 0,5 min; izokraticky 15 % B 1,3 min; 15-21 B za 0,3 min; izokraticky 21 % B 1,2 min; 21-27 % B za 0,5 min, 27-50 % B za 2,3 min; 50-100 % B za 1 min; 100-5 % B za 0,5 min. Systém UPLC byl vybaven PDA detektorem s rozsahem 210-600 nm a rozlišením 1,2 nm a hmotnostním spektrometrem s trojitým kvadrupolem. Ionizace vzorků byla provedena pomocí elektrospreje v negativním módu (-ESI). Teplota odpařovacího bloku byla 100 °C, desolvatační teplota byla 350 °C. Napětí vložené na kapiláru bylo 2,5 kV a *cone voltage* (napětí na vstupní štěrbině) bylo nastaveno na 25 V. Jako kolizní plyn byl použit argon (16 eV) a jako desolvatační plyn dusík s průtokem 500 l/hod.

## 2.4.3 Analýza proteinového složení

### 2.4.3.1 Frakcionace proteinů

K frakcionaci proteinů byl využit modifikovaný postup podle Osborna.<sup>67</sup> Nejprve bylo provedeno odtučnění mouky. Do polypropylenových centrifugačních kyvet bylo naváženo 1 g mouky (2007 neupravená) a napipetováno 3 ml hexanu. Extrakce lipofilních látek probíhala 30 minut. Vzorky byly odstředěny na centrifuze (10000 g, 30 min, 25 °C), supernatant byl odstraněn a mouka byla znovu extrahována 3 ml hexanu. Odtučněná mouka se ponechala přes noc v digestoři vyschnout a byla použita k frakcionaci proteinů.

K odtučněné mouce bylo přidáno 5 ml destilované vody. Vzorky byly 1 hodinu extrahovány při laboratorní teplotě na třepačce a poté centrifugovány (10000 g, 30 min, 25 °C). Supernatant byl odpipetován a byla provedena reextrakce mouky 5 ml destilované vody. Spojené supernatanty byly uschovány pro další zpracování. Takto byla připravena frakce albuminů.

K pevnému podílu bylo napipetováno 5 ml 0,5 mol.l<sup>-1</sup> NaCl. Mouka byla 2x extrahována 1 hodinu při laboratorní teplotě a poté centrifugována (10000 g, 30 min, 25 °C). Spojené supernatanty byly uschovány pro další zpracování. Byla provedena dialýza solných roztoků. Použito bylo dialyzační střívko 10 kDa (Sigma-Aldrich), dialýza probíhala 12 hod do 3 l destilované vody. Takto byla připravena frakce globulinů.

Pevný podíl byl dále 2x extrahován 5 ml 70% ethanolu. Extrakce probíhala vždy 1 hodinu, poté byly vzorky odstředěny na centrifuze (10000 g, 30 min, 25 °C). Supernatanty byly odpipetovány. Takto byla připravena prolaminová frakce.

Zbytek po extrakci prolaminů byl 2x 1 hodinu extrahován 5 ml 0,1 mol.l<sup>-1</sup> NaOH. Extrahované vzorky byly centrifugovány (10000 g, 30 min, 25 °C), supernatanty byly uschovány pro další zpracování. Takto byla připravena frakce glutelinů.

Alikvoty extraktů jednotlivých frakcí proteinů byly napipetovány do centrifugačních mikrozkuvek zmrazeny na -80 °C. Na stejnou teplotu byla vychlazená deska lyofilizátoru a následně byla provedena lyofilizace extraktů (12 hod). Lyofilizáty byly zamrazeny.

### 2.4.3.2 SDS-PAGE

Byly připraveny gely pro diskontinuální SDS-PAGE elektroforézu (Tab. V). Albuminová frakce byla separována na 10 % polyakrylamidovém gelu, byl použit marker SDS 6H2-VL (30-200 kDa). Pro separaci globulinové frakce byl také připraven 10 % gel, jako marker byl použit SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range (14,4-97,4 kDa). Pro analýzu frakcí prolaminů a glutelinů byly připraveny 10 %, 12 % a 17 % gely, použity byly markery Marker Blueranger Prestained Protein Molecular Weight Marker Mix (17,5-209 kDa, č. 1), Molecular Weight Marker (30-200 kDa, č. 2) a Color Marker Ultra-low Range (1,060-26,6 kDa, č. 3). Lyofilizáty byly rozpuštěny v destilované vodě, tak aby výsledná koncentrace byla 10 mg/ml. Ke vzorkům byl přidán vzorkovací pufr v poměru 1:1. Centrifugační mikrozkušavky s takto připravenými vzorky byly 5 minut termostatovány na 95 °C. Při separaci albuminů bylo nadávkováno 2, 4, 6 µl upraveného vzorku, při separaci globulinů 2, 4, 6, 8 a 10 µl upraveného vzorku a 7 µl markeru. Pro analýzu prolaminů na 10 % gelu bylo nadávkováno 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 µl vzorku prolaminů a glutelinů a 5 µl markeru (č. 1 nebo 2). Na 12 a 17 % gel bylo dávkováno 16, 18, 20 µl vzorku a 10 µl markeru (č. 3). Elektroforéza probíhala za konstantního napětí, pro separaci v zaostřovacím gelu bylo vloženo 100 V, pro separaci v dělicím gelu bylo vloženo napětí 200 V. Po ukončení elektroforézy byly gely na 10 minut vloženy do Petriho misky s destilovanou vodou. Potom 60 minut probíhalo barvení gelů v Coomassie Blue G 250. Gely byly přes noc ponechány v destilované vodě v lednici.

**Tab. V** Příprava gelů pro SDS-PAGE (objemy jsou uvedeny v µl).

	AA/BIS [30%/0,8%]	Tris.HCl [1,5M, pH 8,8]	Tris.HCl [0,5M, pH 6,8]	H <sub>2</sub> O	SDS [10%]	APS [10%]	TEMED
dělicí gel							
10 % T	3400	2500	/	3800	100	50	10
12 % T	4000	2500	/	3200	100	50	10
17 % T	5600	2500	/	1600	100	50	5
zaostřovací gel							
4 % T	650	/	1,250	2950	100	60	10

### 2.4.3.3 MALDI-MS

Po SDS-PAGE separaci albuminů a globulinů byly vybrané zóny proteinů skalpelem vyříznuty z gelu, vloženy do malých centrifugačních mikrozkuvek a rozřezány na malé kousky. Do centrifugačních mikrozkuvek bylo napipetováno 150  $\mu\text{l}$  0,1 mol.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> a 150  $\mu\text{l}$  acetonitrilu. Směs byla promíchána pomocí vortexu a nechána stát při laboratorní teplotě 15–20 minut do odbarvení kousků gelu. Směs byla odstředěna na centrifuze miniSpin a roztok byl odpipetován. Do centrifugačních mikrozkuvek bylo napipetováno 150  $\mu\text{l}$  acetonitrilu, směs byla vortexována a nechána 15 minut stát (kousky gelu zbělaly = dehydratace gelu). Vzorky byly stočeny pomocí centrifugy miniSpin a acetonitril byl dokonale odpipetován. Ke vzorkům bylo napipetováno 30  $\mu\text{l}$  10 mmol.l<sup>-1</sup> dithiothreitolu (DTT) v 0,1 mol.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Vzorky byly 30 minut inkubovány v termobloku při 56 °C. Po odstředění byl roztok odpipetován a bylo přidáno 150  $\mu\text{l}$  acetonitrilu. Po 15 minutách byly vzorky centrifugovány, acetonitril odstraněn a bylo přidáno 30  $\mu\text{l}$  55 mmol.l<sup>-1</sup> jodoacetamidu (IAC) v 0,1 mol.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Vzorky byly 20 minut inkubovány ve tmě za laboratorní teploty. Po centrifugaci byl roztok odpipetován. Vzorky byly 2x promyty 150  $\mu\text{l}$  0,1 mol.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Vždy byly vortexovány, odstředěny a roztok byl odpipetován. Ke kouskům gelu bylo napipetováno 150  $\mu\text{l}$  acetonitrilu, směs se nechala 15 minut stát a po centrifugaci byl acetonitril odpipetován. Gelové kousky byly v otevřených centrifugačních mikrozkuvkách volně vysušeny.

Následně bylo provedeno štěpení proteinů trypsinem. Byl připraven štěpící pufr. Lyofilizovaný modifikovaný trypsin byl rozpuštěn v 5 % kyselině mravenčí (HCOOH) tak, aby výsledná koncentrace byla 200  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Roztok trypsinu byl 100x zředěn 50 mmol.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Ke vzorkům byl napipetován připravený štěpící pufr (50  $\mu\text{l}$ ) a byly nechány 30-40 minut při 4 °C. Pufr byl odstraněn, ke vzorkům bylo napipetováno 50  $\mu\text{l}$  NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> a byly inkubovány přes noc při 37 °C.

Byla připravena matrice pro MALDI analýzu. Do centrifugační mikrozkuvky byly naváženy 2 mg hydroxyskořicové kyseliny a napipetováno 322  $\mu\text{l}$  deionizované vody, 660  $\mu\text{l}$  acetonitrilu a 8  $\mu\text{l}$  TFA. Na připravený AnchorChip bylo napipetováno 800 nl vzorků a zakápnuto 800 nl matrice. Napipetované roztoky se nechaly zaschnout a byla provedena MALDI-MS analýza.

Podmínky MALDI-MS analýzy byly nastaveny následně: polarita +, napětí iontového zdroje I 19 kV, iontového zdroje II 16,15 kV, napětí na čočkách 9,1 kV, napětí na reflektoru 20 kV, pulzní iontová extrakce 250 ns. Byl použit software FlexControl a FlexAnalysis. Pro vyhledávání v databázích byl použit program Mascot.

#### **2.4.4 Stanovení aktivity lipas**

Extrakt mouky pro stanovení enzymové aktivity byly připraveny duplicitně. Bylo naváženo 500 mg upravené a neupravené mouky 2008 a 2009 a vzorky byly extrahovány 3 ml  $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$  K-fosfátového pufru (pH 8,04) 1 hodinu při  $4^\circ\text{C}$ . Poté byly centrifugovány (4700 g, 5 min,  $4^\circ\text{C}$ ). Supernatanty byly přepipetovány do centrifugačních mikrozkmavek a znovu odstředěny (16100 g, 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ). Centrifugace se opakovala 2x. Připravené extrakty se uchovávaly v ledu. Roztok substrátu obsahoval 4  $\mu\text{l}$  4-nitrofenylbutyrátu a 219  $\mu\text{l}$  ethanolu. Enzymová kinetika byla měřena při 405 nm 4 minuty. Blank byl připraven následujícím způsobem: do kyvety bylo napipetováno 1980  $\mu\text{l}$  (nebo 1970  $\mu\text{l}$ )  $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$  pufru a 10  $\mu\text{l}$  (nebo 20  $\mu\text{l}$ ) enzymového extraktu. Po přidání 10  $\mu\text{l}$  substrátu bylo spuštěno měření kinetiky. Absorbance byly zaznamenávány po minutových intervalech. Byla vypočítána aktivita lipáz v jednotkách U/ml extraktu. Metodou BCA byl stanoven obsah proteinů v extraktu a enzymová aktivita byla vyjádřena v jednotkách U/mg proteinů. Byla porovnána enzymová aktivita v neupravené mouce a v mouce upravené pražením.

Pro srovnání výsledků bylo provedeno zakoncentrování extraktu pražené mouky 2009 ultrafiltrací pomocí ultrafiltrační cely Amicon 8200. Do Erlenmayerovy baňky bylo naváženo 7,5 g mouky, mouka byla extrahována 50 ml  $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$  K-fosfátového pufru (pH 8,04) 1 hodinu v lednici. Extrakt byl přelit do centrifugačních kyvet a 2x odstředěn (12500 g, 30 min,  $4^\circ\text{C}$ ). Supernatant byl zfiltrován přes fritu a následně ultrafiltrací zakoncentrován.

#### **2.4.5 Stanovení aktivity amylas**

Extrakt mouky pro stanovení enzymové aktivity byly připraveny duplicitně. Do centrifugačních kyvet bylo naváženo 250 mg mouky (2009 neupravená). Mouka byla extrahována 3 ml  $50 \text{ mmol.l}^{-1}$  HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina) pH 7,1 1 hodinu při  $4^\circ\text{C}$ . Vzorky byly centrifugovány (4700 g, 5 min,  $4^\circ\text{C}$ ). Supernatanty byly přepipetovány do centrifugačních mikrozkmavek a 2 x centrifugovány (16100 g, 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ). Extrakty byly vloženy do ledové lázně. Substrát byl připraven smícháním roztoků A a B z komerčního setu ( $\alpha$ -amylase-EPS) v poměru 4:1 a byl

termostatován na 37 °C. Do kyvety bylo jako blank napipetováno 700 µl substrátu, po přidání 24 µl enzymového extraktu bylo měření spuštěno. Aktivita amylas byla měřena při 405 nm 5 minut. Absorbance byly zaznamenávány po minutových intervalech.

#### 2.4.6 Stanovení celkových proteinů metodou BCA (pro výpočet enzymové aktivity)

Smícháním roztoků kyseliny bicinchoninové (roztok A) a 4 %  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (roztok B) v poměru 50 : 1 bylo připraveno pracovní činidlo. Byl připraven standardní roztok BSA v K-fosfátovém pufru (pH 8,04) o koncentraci  $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ . Do sady zkumavek byl napipetován 1 nebo 2 µl extraktu mouky v K-fosfátovém pufru a roztok byl pufrem doplněn do 100 µl. K napipetovaným roztokům byly přidány 2 ml pracovního činidla. Kalibrační roztoky BSA byly připraveny podle tabulky (Tab. VI). Reakční směsi byly promíchány na vortexu a 30 minut termostatovány na 37 °C. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla změřena absorbance jednotlivých roztoků při 562 nm. Obsah proteinů ve vzorcích byl vyhodnocen metodou kalibrační přímky a výsledky byly vyjádřeny v  $\text{mg.l}^{-1}$ .

**Tab. VI** Příprava kalibračních roztoků BSA.

Zkumavka	c BSA ( $\text{mg.l}^{-1}$ )	V [ $\mu\text{l}$ ] BSA ( $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ )	V [ $\mu\text{l}$ ] fosfátový pufr	V [ $\mu\text{l}$ ] BCA pracovní činidlo
1	0	0	100	2000
2	0,2	20	80	2000
3	0,4	40	60	2000
4	0,6	60	40	2000
5	0,8	80	20	2000
6	1,0	100	0	2000

### 3. Výsledky a diskuse

#### 3.1 Stanovení celkových fenolických látek (TPC)

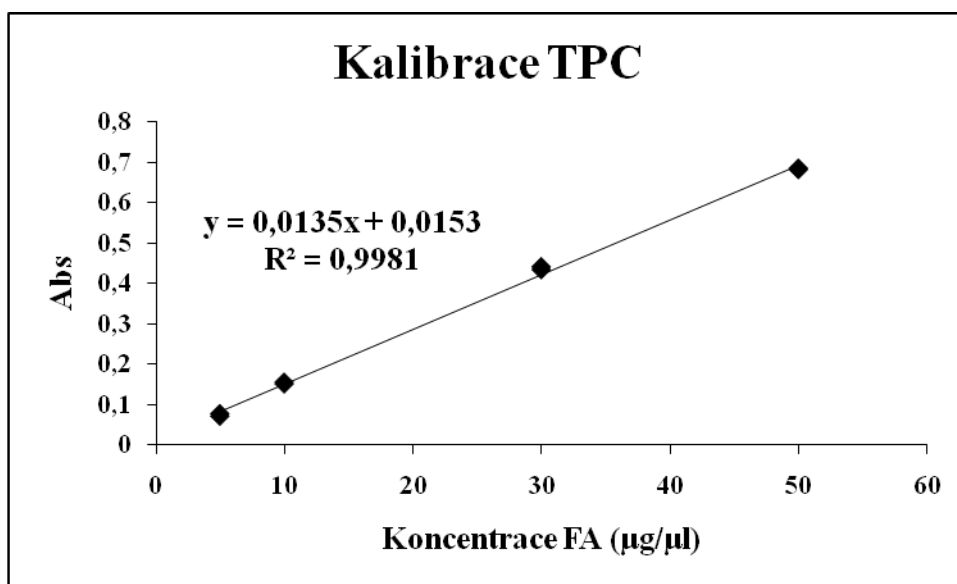
Metodou podle Folin-Ciocalteaua (viz. kap. 2.4.1) bylo stanoveno množství celkových fenolických látek v mouce z lupiny bílé (odrůda Amiga) ze sklizně 2007 (neupravená), 2008 (upravená, neupravená) a 2009 (upravená, neupravená). Měření bylo provedeno ve čtyřech opakováních. Extrakty vzorků byly vždy připraveny duplicitně a z každého připraveného extraktu byly odebrány dva různé objemy pro přípravu reakční směsi. Hladiny celkových fenolických látek ve vzorcích byly vyjádřeny v mg FA/g mouky, jsou shrnuty v tabulce (Tab. VII) a pro přehlednost dále znázorněny také graficky (Obr. 6–9).

Obsah celkových fenolů v neupravené mouce řádově odpovídá hodnotám uvedeným v literatuře ( $1,82 \pm 0,01$  mg FA/g).<sup>4</sup> Odchytky naměřených hodnot od publikovaných mohou být zapříčiněny různými podmínkami pěstování, jako jsou klima, typ půdy, úroveň hnojení.<sup>3</sup> Hodnoty nalezené v literatuře se týkaly jiné odrůdy lupiny bílé (Multolupa),<sup>4</sup> z čehož také vyplývají určité odchytky.

Obsah celkových fenolických látek ve vzorcích mouky 2007 N, 2008 N, 2009 N je následující: 1,401 mg FA/g mouky ( $s = 0,195$ ), 1,630 mg FA/g mouky ( $s = 0,512$ ), 1,692 mg FA/g mouky ( $s = 0,437$ ). Výsledné hodnoty byly porovnány pomocí F-testu shody rozptýlů jednotlivých výběrů a studentova T-testu. Z provedených testů vyplývá, že mezi obsahy TPC v rámci jednotlivých sklizní (2007 N, 2008 N, 2009 N) nejsou statisticky významné rozdíly. Lze tedy říci, že množství TPC ve vzorcích neupravené mouky je shodné a skladováním se nemění. Dále bylo provedeno porovnání obsahu TPC ve vzorcích upravené a neupravené mouky v rámci jedné sklizně. Pro mouku sklizně 2008 a 2009 byly experimentálně stanoveny následující hodnoty; 2008 U: 1,409 mg FA/g mouky ( $s = 0,144$ ); 2008 N: 1,630 mg FA/g mouky ( $s = 0,512$ ); 2009 U: 0,588 mg FA/g mouky ( $s = 0,122$ ); 2009 N: 1,692 mg FA/g mouky ( $s = 0,437$ ). K porovnání výsledných průměrných hodnot byly opět použity statistické testy. Z provedených T-testů ( $\alpha = 0,05$ ) vyplývá, že ve vzorcích mouky 2009 U a 2009 N je obsah TPC rozdílný, ve vzorcích 2008 U a 2008 N se však obsah TPC neliší. Zjištěné hodnoty obsahu TPC v mouce 2008 U a 2009 U jsou statisticky odlišné. Teoretickou příčinou této odlišnosti by mohly být jiné podmínky pražení mouky. Mouka byla pražena po dobu 60 min

až k teplotě 118 °C. V roce 2008 byla mouka pražena na jiném zařízení než v roce 2009. Použitá zařízení se lišila kapacitou, a tudíž došlo k jinému průběhu procesu pražení.

Oproti postupu pro přípravu extraktů, který byl uveden v literatuře<sup>4</sup>, byl přidán ještě jeden krok centrifugace (16100 g, 10 min, 25 °C). I přesto nebyly získané methanolicke extrakty zcela čiré, a to především u mouky neupravené pražením. Z toho pak vyplývají rozdíly výsledků opakovaných měření.



**Obr. 5** Příklad kalibrační přímky pro stanovení celkových fenolických látek.

Příklad výpočtu TPC pro vzorek mouky 2008 upravená, použitý objem extraktu 150 µl, zjištěná absorbance  $y = 0,306$ ; neznámá  $x$  (µg ekvivalentů FA ve 150 µl extraktu):

$$y = 0,0135x + 0,0153$$

$$x = (y - 0,0153) / 0,0135$$

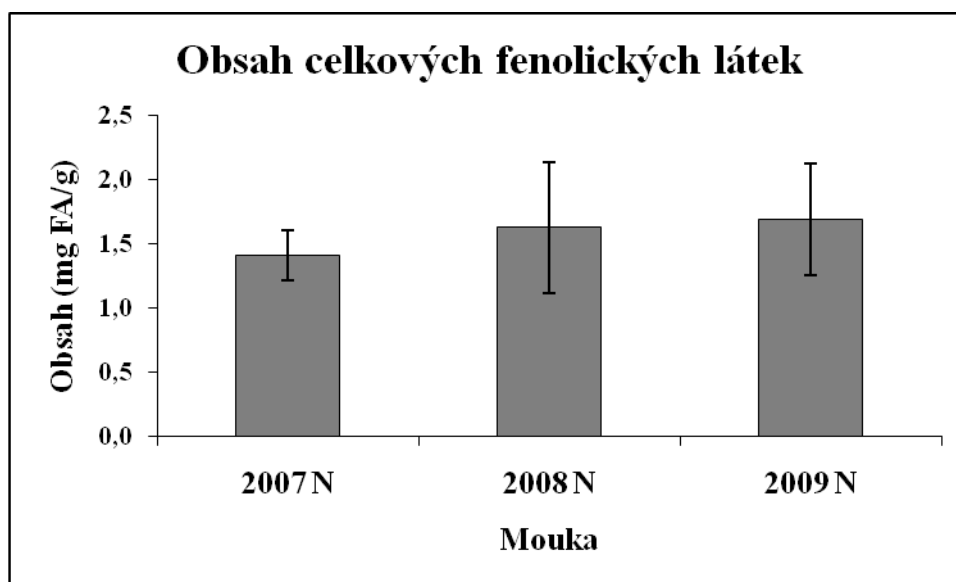
$$x = (0,306 - 0,0153) / 0,0135 = 21,533 \text{ µg FA/150 µl} \rightarrow 1,436 \text{ mg FA/1,0077 g}$$

$$\rightarrow \underline{1,425 \text{ mg FA/g}}$$

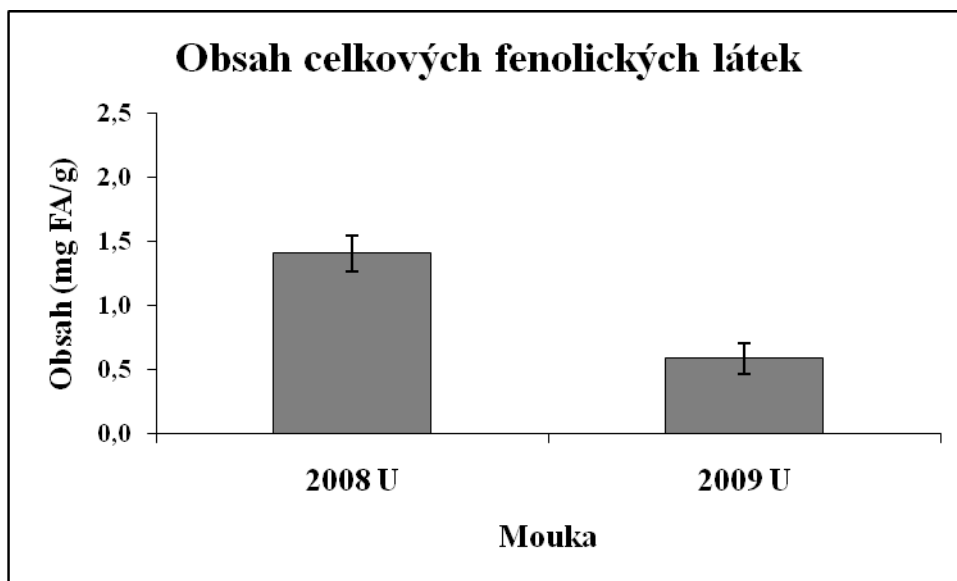


**Tab. VII** Obsah celkových fenolických látek vyjádřený v mg FA/g mouky (počet technických replikátů n = 4).

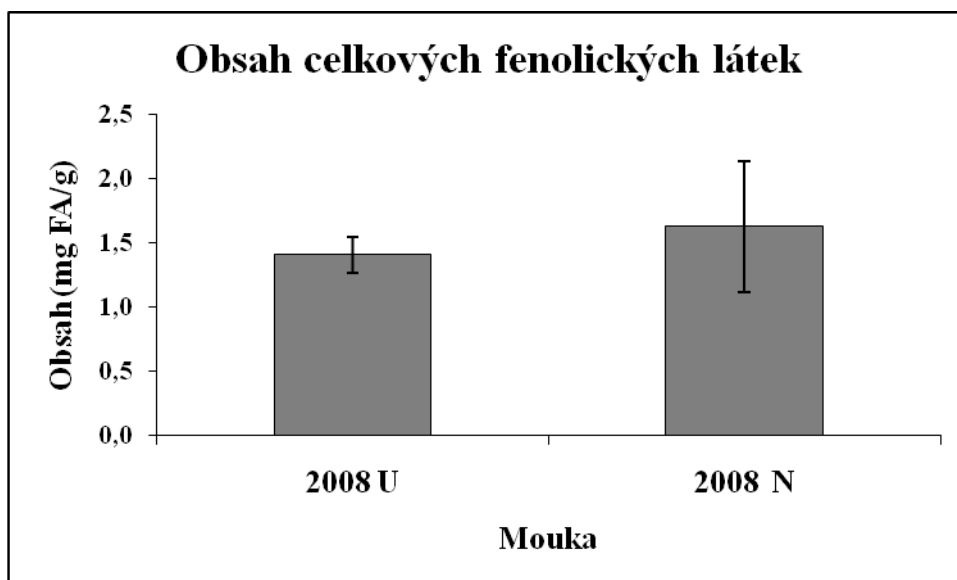
Měření č.	Vzorek				
	2007 N	2008 U	2008 N	2009 U	2009 N
1	1,324	1,452	1,560	0,653	1,655
2	1,522	1,428	1,954	0,495	1,957
3	1,372	1,345	1,496	0,578	1,573
4	1,384	1,410	1,509	0,625	1,581
<b>Průměr</b>	<b>1,401</b>	<b>1,409</b>	<b>1,630</b>	<b>0,588</b>	<b>1,692</b>
<b>Směr. odchylka</b>	0,195	0,144	0,512	0,122	0,437



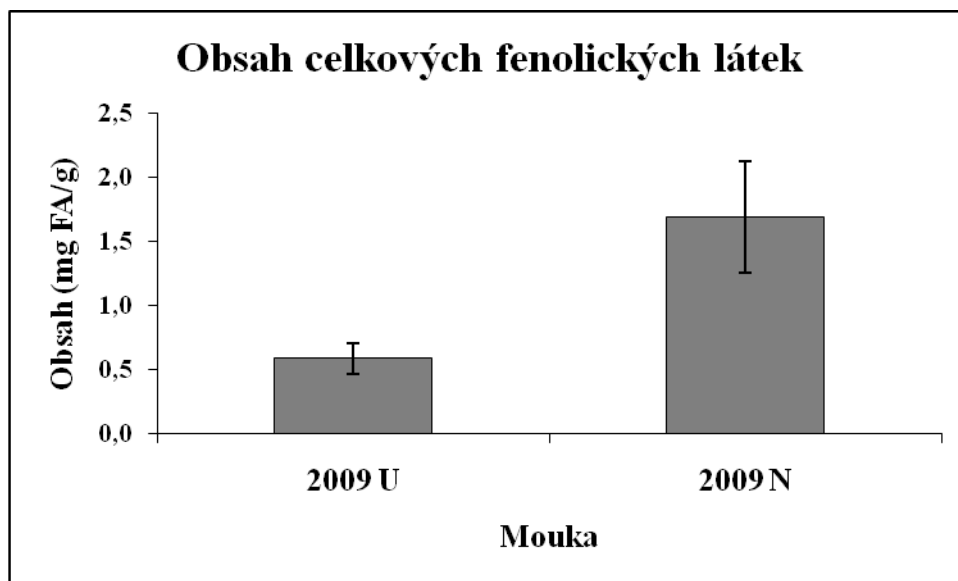
**Obr. 6** Průměrný obsah fenolických látek v neupravené mouce sklizní 2007, 2008, 2009, vyjádřeno v mg FA/g mouky.



**Obr. 7** Průměrný obsah fenolických látek v upravené mouce sklizní 2008, 2009, vyjádřeno v mg FA/g mouky.



**Obr. 8** Průměrný obsah fenolických látek v upravené a neupravené mouce sklizně 2008, vyjádřeno v mg FA/g mouky.



**Obr. 9** Průměrný obsah fenolických látek v upravené a neupravené mouce sklizně 2009, vyjádřeno v mg FA/g mouky.

### 3.2 Analýza fenolických kyselin metodou UPLC-MS/MS

Metodou UPLC-MS/MS byla provedena identifikace a kvantifikace fenolických kyselin v mouce z lupiny bílé (odráda Amiga) sklizně 2007 (neupravená), 2008 (upravená, neupravená) a 2009 (upravená, neupravená) (viz. kap. 2.4.2). Analyzovány byly čtyři frakce získané úpravou methanolických extraktů mouky. Jednalo se o frakce volných fenolických kyselin (F1), esterů fenolických kyselin (F2), glykosidů fenolických kyselin (F3) a v methanolu nerozpustných vázaných fenolických kyselin (F4). Všechny vzorky byly připraveny duplicitně.

V analyzovaném materiálu byly identifikovány (Tab. VIII) a poté kvantifikovány tyto fenolické kyseliny: protokatechová (PA), *p*-hydroxybenzoová (pHBA), vanilová (VA), *p*-kumarová (pCoA), ferulová (FA) a salicylová (SA). U všech vzorků byla ve všech frakcích nalezena pouze kyselina *p*-hydroxybenzoová. Dalšími hojně zastoupenými kyselinami jsou kyseliny ferulová a vanilová. Jedná se o kyseliny v rostlinách běžně rozšířené.<sup>37, 83</sup> Výčet identifikovaných kyselin v mouce z lupiny bílé odpovídá údajům publikovaným v literatuře.<sup>3</sup> Oproti v literatuře uváděným fenolickým kyselinám byla ve vzorcích mouky z lupiny bílé identifikována také kyselina salicylová (frakce F2, F3), naopak identifikována nebyla kyselina

chlorogenová. Tato fenolická kyselina patří mezi látky relativně labilní. Při přípravě vzorků se často velmi rychle rozloží (Mgr. J. Grúz, Ph.D., LRR, osobní sdělení). V rámci rešerše se nepodařilo najít publikaci pro srovnání stanoveného obsahu fenolických kyselin.

Obsahy fenolických kyselin v jednotlivých frakcích analyzovaných vzorků mouky byly vyjádřeny v  $\mu\text{mol/g}$  mouky a jsou shrnuty v tabulkách (Tab. IX-XIV). Nejvyšší množství fenolických kyselin bylo stanoveno ve frakcích F2 (estery fenolických kyselin) a F3 (glykosidy fenolických kyselin), což souhlasí s publikovanými informacemi (Obr. 10-14). Z literatury vyplývá, že fenolické kyseliny se vyskytují především ve vázané formě.<sup>13, 83</sup> Nejnižší koncentrace by tedy měly být ve frakci F1 (volné fenolické kyseliny), což se experimentem nepodařilo potvrdit. Příčinou nalezených vyšších koncentrací fenolických kyselin ve frakci F1 může být chyba při přípravě této frakce. Methanolické odparky pro přípravu frakce F1 byly rozpuštěny v  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  HCl. Ke kyselé hydrolyze se používá  $1 \text{ mol.l}^{-1}$  HCl. Již působením  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  HCl ale může docházet k hydrolytickému štěpení vázaných fenolických kyselin. Pokud tedy nenásleduje okamžitá extrakce analytů diethyletherem, může dojít k nadhodnocení výsledků.

Celkový obsah fenolických kyselin (ve všech frakcích) jeví stejný trend jako množství celkových fenolických látek ve vzorcích (Obr. 15–18). Výsledné koncentrace fenolických kyselin ve vzorcích neupravené mouky sklizní 2007, 2008 a 2009 má mírně rostoucí charakter, experimentálně byly stanoveny hodnoty  $6,7930 \mu\text{mol/g}$ ,  $7,0114 \mu\text{mol/g}$  a  $7,9297 \mu\text{mol/g}$ . Na základě provedených statistických testů (F-test shody rozptylů a studentův T-test) lze říci, že mezi stanovenými hodnotami celkových fenolických kyselin v neupravených moukách sklizní 2007, 2008, 2009 nejsou statisticky významné rozdíly. Vzhledem ke skutečnosti, že fenolické látky jsou relativně stabilní, je nepravděpodobné, že by mírně odlišné obsahy fenolických kyselin v jednotlivých sklizních byly dány různou dobou skladování. Pravděpodobně se jedná o meziroční variabilitu zapříčiněnou rozdílnými podmínkami při pěstování lupiny. Biosyntéza sekundárních metabolitů je výrazně ovlivňována vnějšími faktory (teplota, kvalita závlahy, interakce s fytopatogeny, atd.).<sup>12</sup> Často jsou tyto faktory používány k indukci biosyntézy vybraných sekundárních metabolitů (stresem indukovaná biosyntéza). Hladina fenolických kyselin v upravené mouce 2008 je opět vyšší ( $5,8777 \mu\text{mol/g}$ ) než v upravené mouce 2009 ( $3,2980 \mu\text{mol/g}$ ), po provedení T-testu bylo zjištěno, že rozdíly jsou statisticky významné. Odlišné obsahy fenolických kyselin

můžou být způsobeny různými podmínkami pražení. Vliv pražení mouky na obsah fenolických kyselin je statisticky významný u mouky sklizně 2009. Celková hladina fenolických kyselin v upravené a neupravené mouce 2008 se sice mírně liší, z T-testu ale vyplývá, že rozdíly nejsou statisticky významné ( $\alpha = 0,05$ ).

**Tab. VIII** Identifikace fenolických kyselin.

Kyselina	Zkratka	[M+H] <sup>+</sup>	Fragmenty
Protokatechová	PA	153	109
<i>p</i> -hydroxybenzoová	pHBA	137	93
Vanilová	VA	167	108, 152, 123
<i>p</i> -kumarová	pCoA	163	119
Ferulová	FA	193	134, 178, 149
Salicylová	SA	137	93

Výpočet obsahu fenolické kyseliny ve vzorku:

$$x = (n \cdot V_1) / (m \cdot V_2)$$

n ... množství fenolické kyseliny v nástřiku vyjádřené v pmol  
m ... navážka vzorku mouky  
V<sub>1</sub> ... celkový objem vzorku pro UPLC-MS/MS analýzu (100 µl)  
V<sub>2</sub> ... objem nástřiku (2 µl)

**Tab. IX** Průměrný obsah fenolických kyselin ve vzorku mouky 2007 neupravená ve frakcích F1, F2, F3, F4, vyjádřeno v µmol/g mouky a směrodatné odchylky stanovení (počet technických replikátů n = 2).

Kyselina	Mouka 2007 N							
	F1	s	F2	s	F3	s	F4	s
PA	n.d.		n.d.		n.d.		n.d.	
pHBA	0,2319	0,0119	0,5319	0,0488	0,4786	0,0254	0,1625	0,0126
VA	0,2386	0,0067	0,4486	0,1528	1,1009	0,1790	n.d.	
pCoA	n.d.		0,0583	0,0037	0,0450	0,0071	n.d.	
FA	0,0860	0,0105	1,3074	0,1701	1,9156	0,0142	n.d.	
SA	n.d.		0,0796	0,0206	0,1085	0,0392	n.d.	

**Tab. X** Průměrný obsah fenolických kyselin ve vzorku mouky 2008 upravená ve frakcích F1, F2, F3, F4, vyjádřeno v  $\mu\text{mol/g}$  mouky a směrodatné odchylky stanovení (počet technických replikátů  $n = 2$ ).

Kyselina	Mouka 2008 U							
	F1	s	F2	s	F3	s	F4	s
PA	n.d.		n.d.		0,0096	0,0030	n.d.	
pHBA	0,3224	0,0069	0,6020	0,0289	0,5574	0,0364	0,2262	0,0203
VA	0,3761	0,0778	0,4191	0,1067	1,1299	0,0358	n.d.	
pCoA	n.d.		0,0632	0,0086	n.d.		n.d.	
FA	0,0289	0,0211	0,9397	0,0805	1,0747	0,2344	n.d.	
SA	n.d.		0,0620	0,0332	0,0665	0,0046	n.d.	

**Tab. XI** Průměrný obsah fenolických kyselin ve vzorku mouky 2008 neupravená ve frakcích F1, F2, F3, F4, vyjádřeno v  $\mu\text{mol/g}$  mouky a směrodatné odchylky stanovení (počet technických replikátů  $n = 2$ ).

Kyselina	Mouka 2008 N							
	F1	s	F2	s	F3	s	F4	s
PA	0,0512	0,0045	n.d.		0,0651	0,0204	n.d.	
pHBA	0,1332	0,0032	0,3224	0,0209	0,2898	0,0332	0,1243	0,0049
VA	0,3774	0,0109	0,2504	0,0301	1,2101	0,2455	n.d.	
pCoA	0,0272	0,0008	0,0593	0,0056	0,0485	0,0005	n.d.	
FA	0,1368	0,0078	0,9238	0,0221	2,7259	0,2336	n.d.	
SA	n.d.		0,1037	0,0041	0,1624	0,0120	n.d.	

**Tab. XII** Průměrný obsah fenolických kyselin ve vzorku mouky 2009 upravená ve frakcích F1, F2, F3, F4, vyjádřeno v  $\mu\text{mol/g}$  mouky a směrodatné odchylky stanovení (počet technických replikátů  $n = 2$ ).

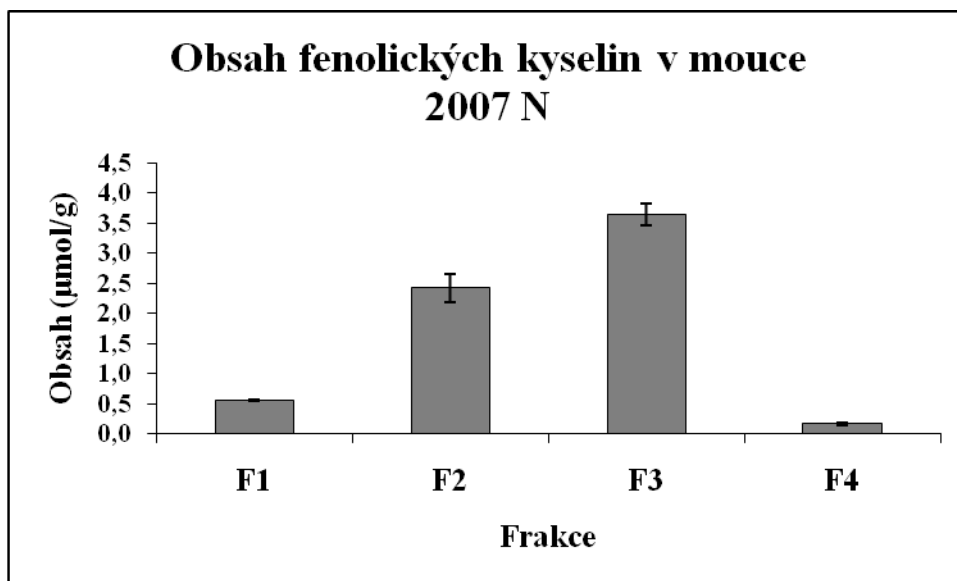
Kyselina	Mouka 2009 U							
	F1	s	F2	s	F3	s	F4	s
PA	0,0380	0,0008	n.d.		0,0374	0,0106	n.d.	
pHBA	0,1098	0,0134	0,1966	0,0111	0,1540	0,0122	0,1688	0,0553
VA	0,5444	0,1760	0,4701	0,0508	0,5129	0,0867	n.d.	
pCoA	n.d.		0,0133	0,0020	n.d.		0,0432	0,0048
FA	n.d.		0,1299	0,0256	0,4904	0,0630	0,3413	0,0039
SA	n.d.		0,0478	0,0108	n.d.		n.d.	

**Tab. XIII** Průměrný obsah fenolických kyselin ve vzorku mouky 2009 neupravená ve frakcích F1, F2, F3, F4, vyjádřeno v  $\mu\text{mol/g}$  mouky a směrodatné odchylky stanovení (počet technických replikátů  $n = 2$ ).

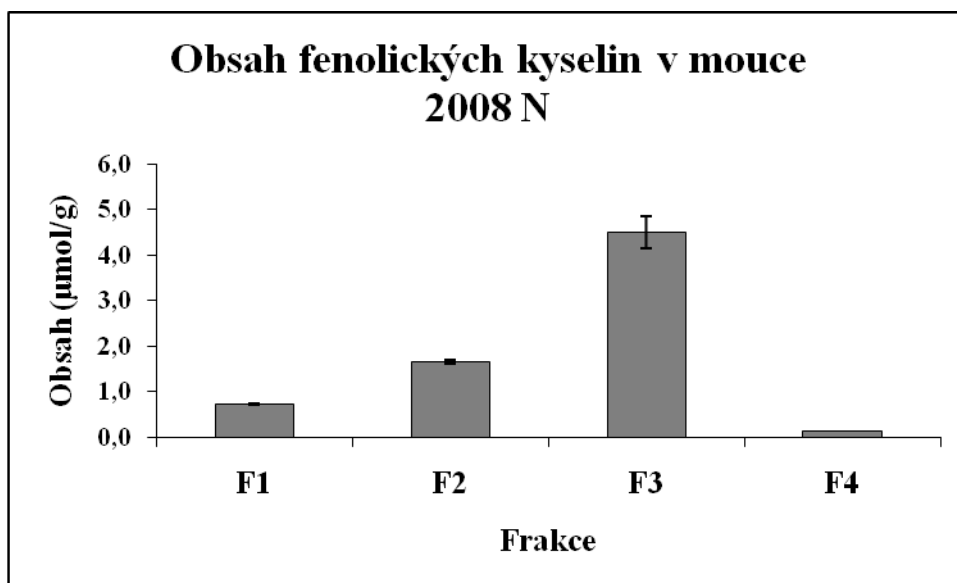
Kyselina	Mouka 2009 N							
	F1	s	F2	s	F3	s	F4	s
PA	0,1513	0,0159	n.d.		0,1779	0,0402	n.d.	
pHBA	0,1444	0,0005	0,3407	0,0184	0,3164	0,0619	0,1461	0,0093
VA	0,5985	0,1018	0,5835	0,0275	1,5581	0,2530	n.d.	
pCoA	n.d.		0,0709	0,0071	n.d.		n.d.	
FA	0,1593	0,0347	0,9193	0,2195	2,5185	0,5797	n.d.	
SA	n.d.		0,1332	0,0840	0,1117	0,0303	n.d.	

**Tab. XIV** Průměrný obsah fenolických kyselin v jednotlivých frakcích a celkový obsah fenolických kyselin ve vzorcích lupinové mouky, vyjádřeno v  $\mu\text{mol/g}$  mouky.

	Frakce				$\Sigma$
	F1	F2	F3	F4	
			<b>2007 N</b>		
Směr. odchylka	0,5566	2,4253	3,6486	0,1625	6,7930
	0,0172	0,2347	0,1857	0,0126	0,3001
			<b>2008 U</b>		
Směr. odchylka	0,7274	2,0860	2,8381	0,2262	5,8777
	0,0809	0,1410	0,2400	0,0203	0,2906
			<b>2008 N</b>		
Směr. odchylka	0,7258	1,6595	4,5018	0,1243	7,0114
	0,0145	0,0433	0,3413	0,0049	0,3444
			<b>2009 U</b>		
Směr. odchylka	0,6922	0,8577	1,1948	0,5533	3,2980
	0,1765	0,0590	0,1083	0,0557	0,2224
			<b>2009 N</b>		
Směr. odchylka	1,0534	2,0475	4,6826	0,1461	7,9297
	0,1087	0,2374	0,6375	0,0093	0,6890

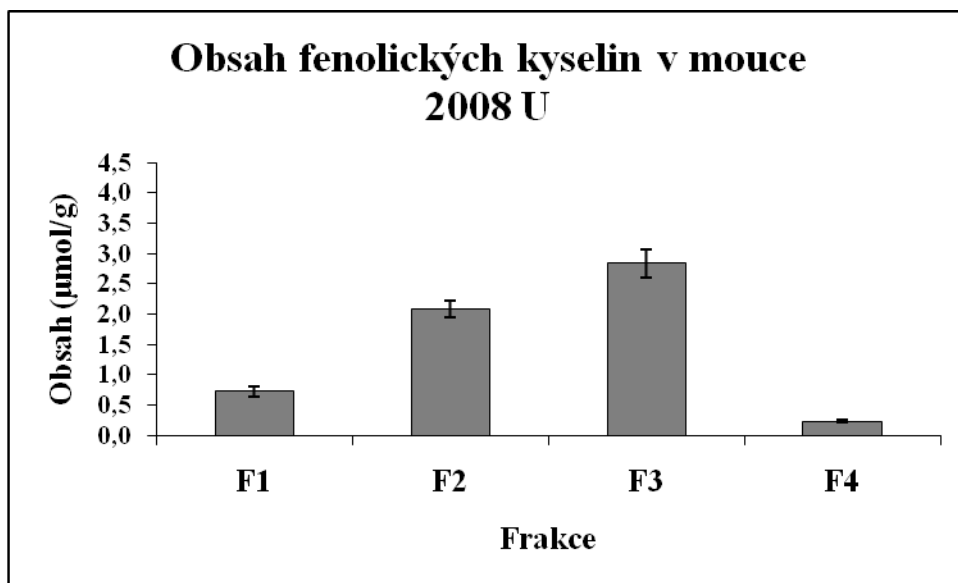


**Obr. 10** Obsah fenolických kyselin v jednotlivých frakcích mouky 2007 N, vyjádřeno v  $\mu\text{mol/g}$  mouky.

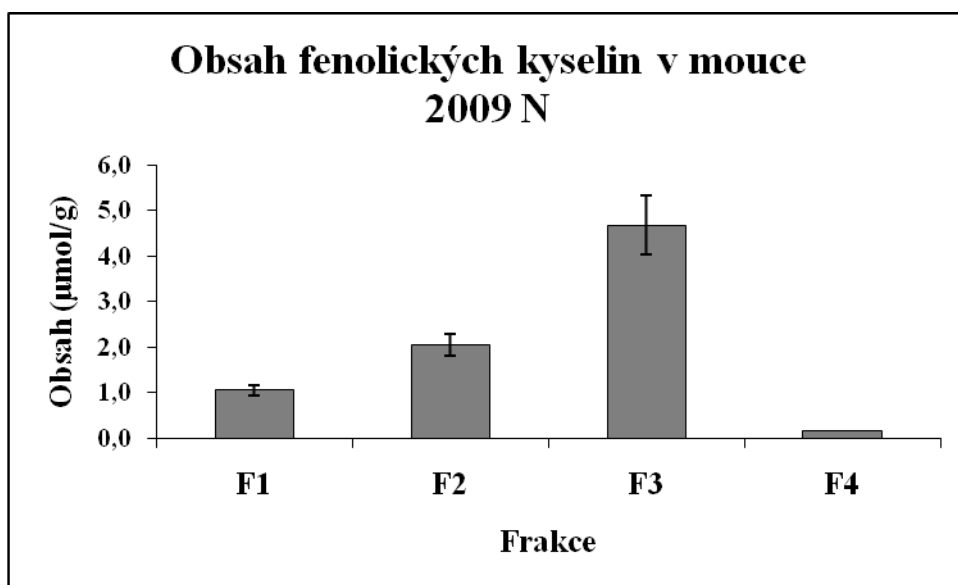


**Obr. 11** Obsah fenolických kyselin v jednotlivých frakcích mouky 2008 N, vyjádřeno v  $\mu\text{mol/g}$  mouky.

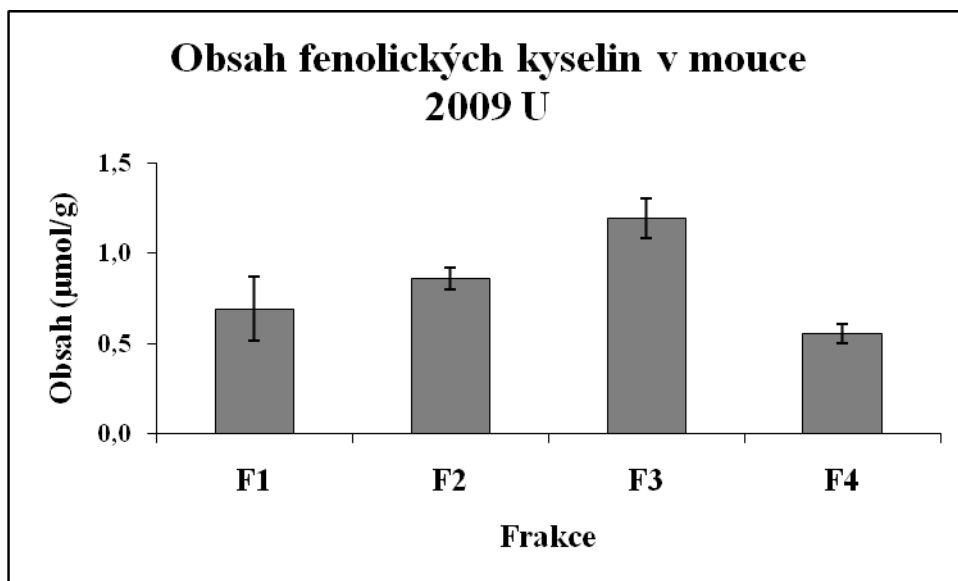




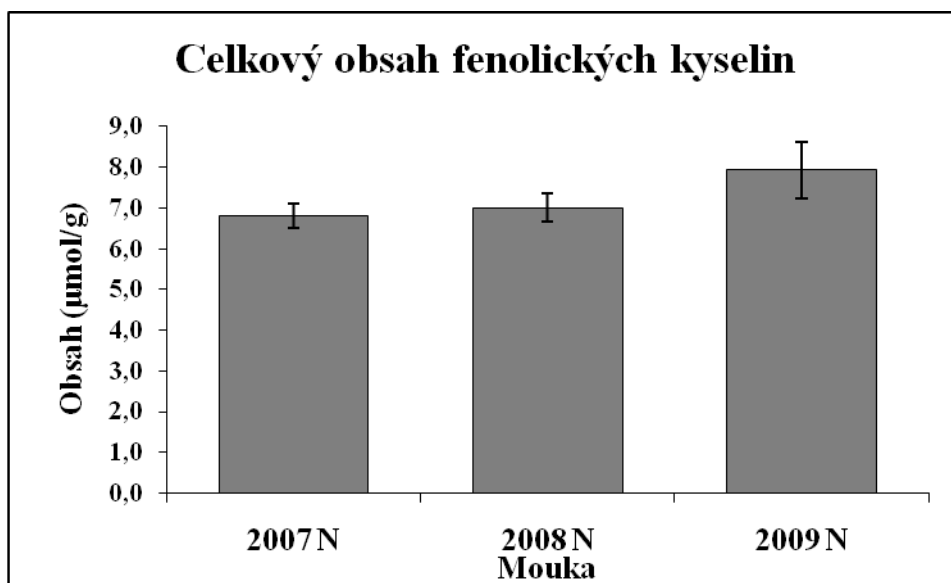
**Obr. 12** Obsah fenolických kyselin v jednotlivých frakcích mouky 2008 U, vyjádřeno v μmol/g mouky.



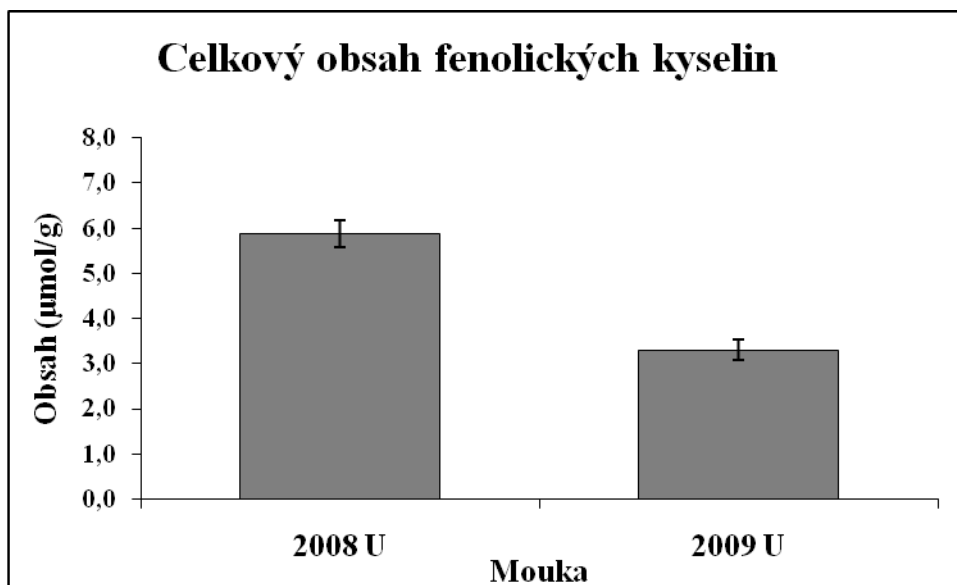
**Obr. 13** Obsah fenolických kyselin v jednotlivých frakcích mouky 2009 N, vyjádřeno v μmol/g mouky.



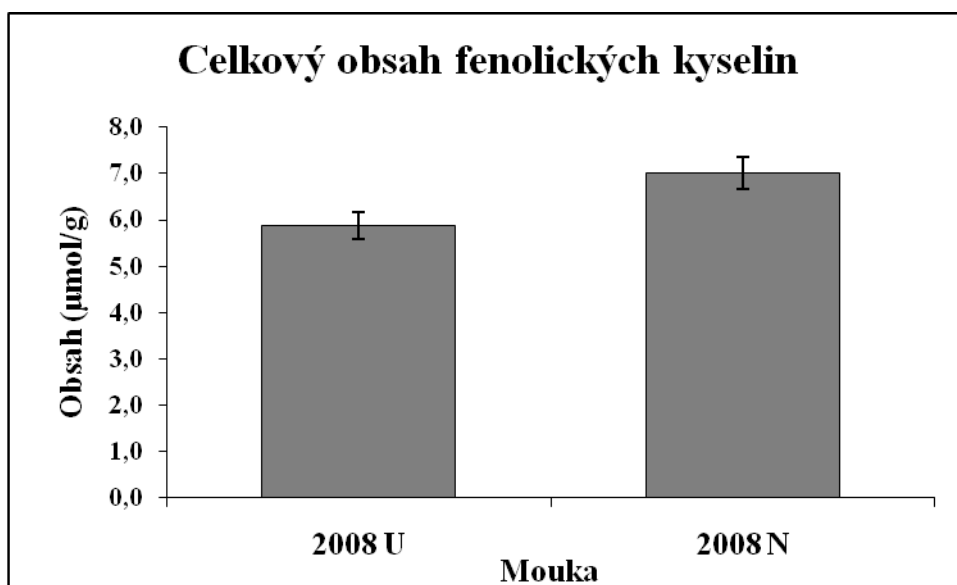
**Obr. 14** Obsah fenolických kyselin v jednotlivých frakcích mouky 2009 U, vyjádřeno v µmol/g mouky.



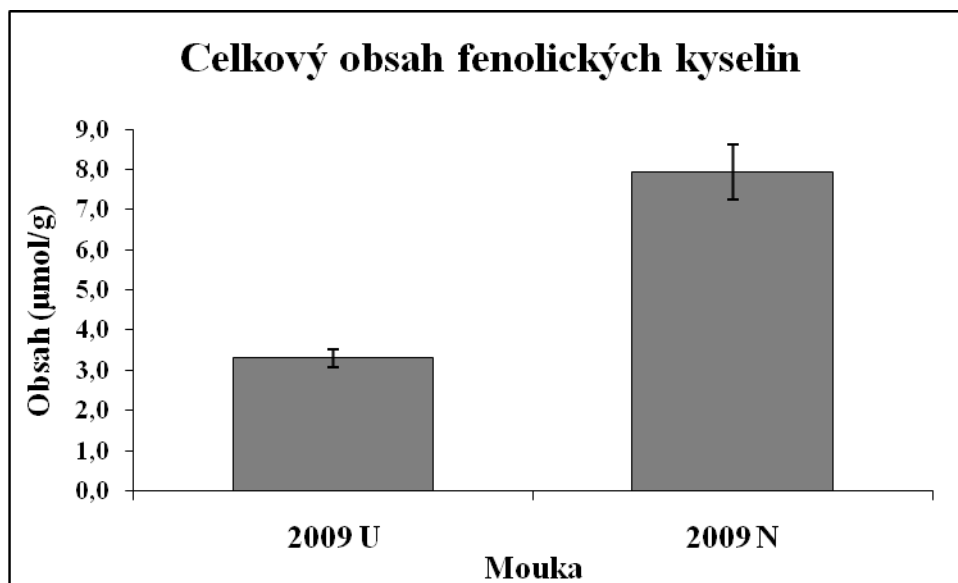
**Obr. 15** Celkový obsah fenolických kyselin stanovený ve frakcích F1, F2, F3, F4 v lupinové mouce 2007 neupravená, 2008 neupravená a 2009 neupravená, vyjádřeno v µmol/g mouky.



**Obr. 16** Celkový obsah fenolických kyselin stanovený ve frakcích F1, F2, F3, F4 v lupinové mouce 2008 upravená a 2009 upravená, vyjádřeno v  $\mu\text{mol/g}$  mouky.



**Obr. 17** Celkový obsah fenolických kyselin stanovený ve frakcích F1, F2, F3, F4 v lupinové mouce 2008 upravená a 2008 neupravená, vyjádřeno v  $\mu\text{mol/g}$  mouky.



**Obr. 18** Celkový obsah fenolických kyselin stanovený ve frakcích F1, F2, F3, F4 v lupinové mouce 2009 upravená a 2009 neupravená, vyjádřeno v µmol/g mouky.

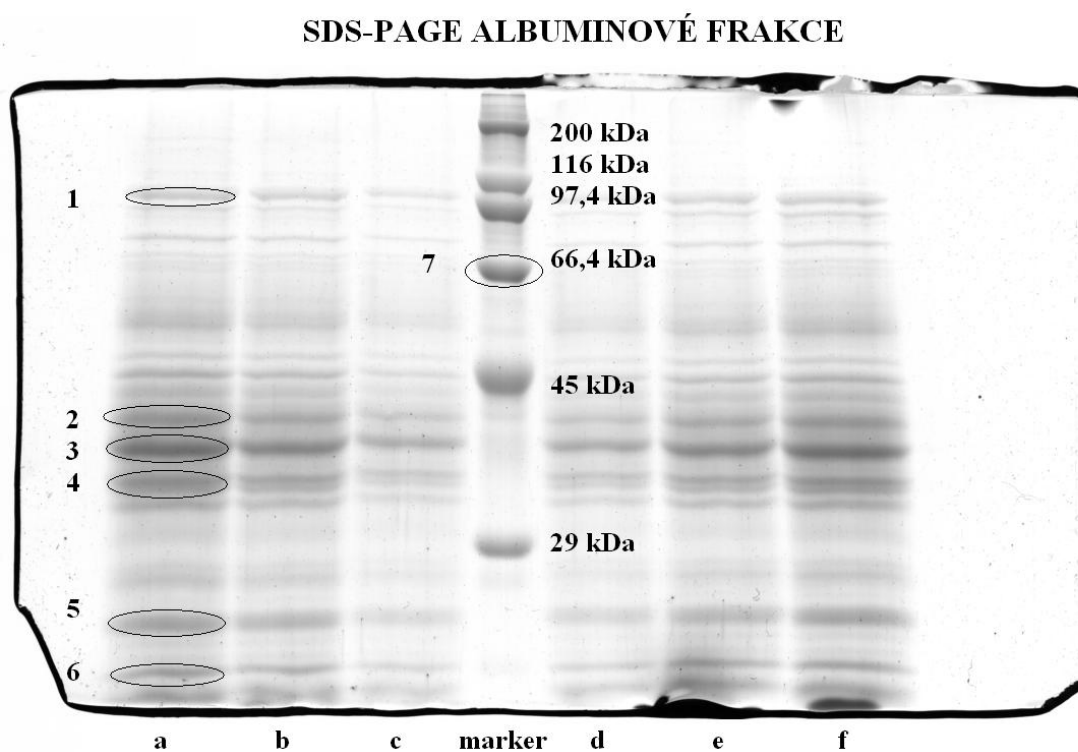
### 3.3 Identifikace proteinů v lupinové mouce

#### 3.3.2 SDS-PAGE

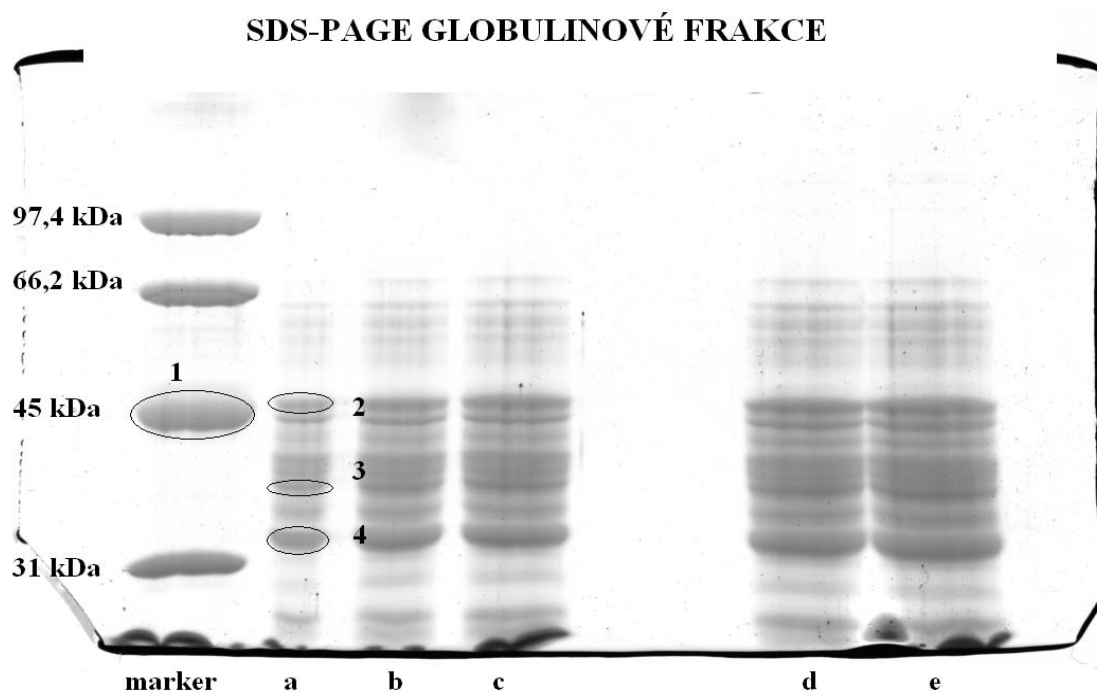
Lyofilizované frakce albuminů a globulinů byly separovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 19-22). Použity byly 4 % zaostřovací a 10 % dělicí gely. Separace proběhla úspěšně, vybrané zóny proteinů byly vyříznuty a upraveny pro analýzu pomocí MALDI-MS. Separace frakce prolaminů a glutelinů byla provedena na 10 %, 12 % a 17 % dělicích gelech, k fokusaci zón byl použit 4 % zaostřovací gel. Na 10 a 12 % gelu se proteiny prolaminové a glutelinové frakce nepodařilo rozseparovat. Vzhledem ke své malé molekulové hmotnosti migrovaly vždy v čele elektroforézy. Po použití 17 % gelu k určité separaci došlo, ale zóny nebyly příliš intenzivní. Málo intenzivní zóny není možné kvůli nízkému obsahu proteinů identifikovat pomocí MALDI-TOF. Množství proteinů v zóně je kritické právě u malých proteinů (< 30 kDa), protože poskytují menší počet proteolytických štěpů (peptidů) pro identifikaci. Dalším problémem je velikost molekuly trypsinu, který se používá ke štěpení před vlastní identifikací pomocí MALDI-TOF. Při použití SDS-PAGE s hustotou dělicího gelu > 12 %, trypsin špatně proniká do gelu a proteolýza je málo účinná. V takovém případě je vhodnější

štěpení celé frakce v roztoku, které je následováno identifikací pomocí LC-MS. Takové zařízení jsme však neměli k dispozici.

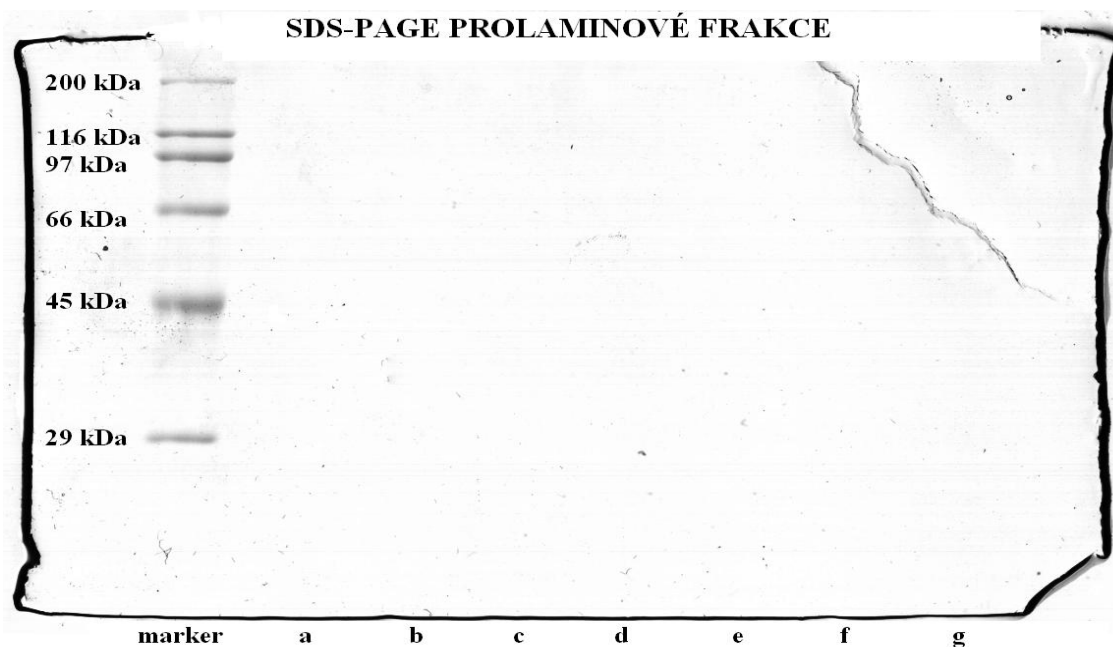
Získané výsledky odpovídají informacím o proteinovém složení lupinových semen.<sup>16, 24, 84</sup> Majoritními složkami proteinů jsou globuliny a albuminy, které se vyskytují v přibližném vzájemném poměru 9:1.<sup>16</sup> Naopak prolaminy a gluteliny jsou v lupinových semenech zastoupeny ve velmi malém množství. Dalším důvodem špatné separace prolaminů a glutelinů je velikost jejich molekul, která se pohybuje pouze v desítkách kDa.<sup>85, 86</sup> K lepší separaci tedy došlo na 17 % gelu. Pro spojení SDS-PAGE a MALDI-MS se ale běžně používají 12 % gely.<sup>7</sup>



**Obr. 19** Separace albuminové frakce pomocí SDS-PAGE (10% dělicí gel), dávkování vzorku v jednotlivých jamkách bylo následující: a, f 6  $\mu$ l; b, e 4  $\mu$ l; c, d 2  $\mu$ l.

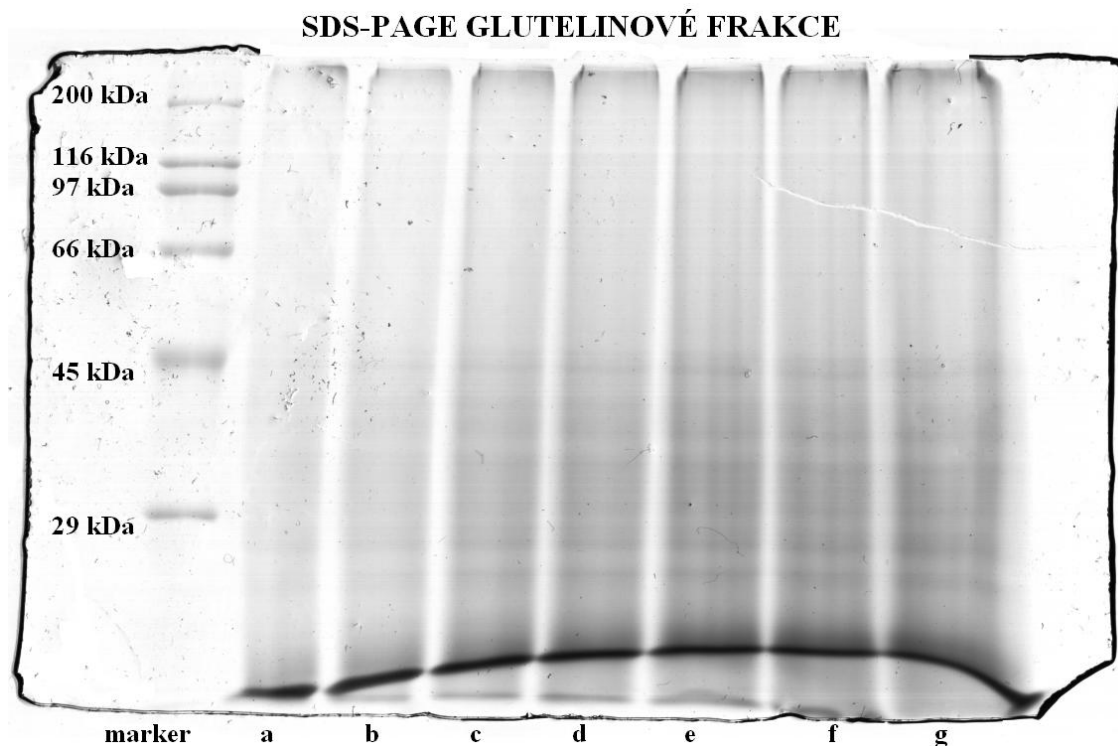


**Obr. 20** Separace globulinové frakce pomocí SDS-PAGE (10% dělicí gel), dávkování vzorku v jamkách a-e: 2, 4, 6, 8, 10  $\mu$ l.



**Obr.**

**21** Separace prolaminové frakce pomocí SDS-PAGE (10% dělicí gel), dávkování vzorku v jamkách a-f: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16  $\mu$ l.



**Obr. 22** Separace glutelinové frakce pomocí SDS-PAGE (10 % dělicí gel), dávkování vzorku v jamkách a-f: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 µl.

### 3.3.3 MALDI-MS analýza proteinů v lupinové mouce

Po separaci proteinů z albuminové a globulinové frakce pomocí SDS-PAGE byla s využitím systému MALDI-MS provedena jejich identifikace. Výsledky jsou shrnuty v tabulkách (Tab. XV, Tab. XVI). K identifikaci proteinů byl použit program Mascot (Matrix Science). V tabulkách jsou uvedeny názvy proteinů identifikované v jednotlivých zónách vyříznutých z gelu po SDS-PAGE. Dále je uveden počet peptidů, proteinové skóre a pokrytí. Počet peptidů je počet peptidů, které byly identifikovány, a byla u nich nalezena shoda s hodnotami v databázi. Proteinové skóre lze vyjádřit jako  $-10 \cdot \log P$ , kde  $P$  je pravděpodobnost, že zjištěná shoda je náhodná. Pokrytí vyjadřuje procentové zastoupení pozitivně identifikovaných peptidů v kompletní aminokyselinové sekvenci.

V obou frakcích (albuminy, globuliny) byly nalezeny následující proteiny:  $\beta$ -konglutin prekurzor, BLAD a vicilin-like protein. Jedná se o proteiny patřící mezi globuliny, přičemž BLAD je fragmentem prekurzoru  $\beta$ -konglutinu. Globuliny jsou nejvíce zastoupené proteiny

v lupinových semenech, představují zhruba 90 % celkových proteinů.<sup>16, 19</sup> Frakcionací proteinů podle Osborna nedošlo k oddělení albuminů od globulinů. V případě materiálu, kde je jedna skupina proteinů majoritní, tedy použití této metody nebude vhodné. Ve všech analyzovaných zónách z gelů (odpovídaly různým molekulovým hmotnostem) byly nalezeny tytéž proteiny. Jedná se o fragmenty uvedených proteinů rozdělených podle molekulových hmotností.

K separaci proteinů jednotlivých frakcí byla použita jednodimenzionální (1D) elektroforéza. Výrazně odlišné výsledky však neposkytuje ani dvourozměrná elektroforéza.<sup>84</sup> V citované práci autoři po separaci pomocí 2D elektroforézy identifikovali především  $\beta$ -konglutin prekurzor a dále  $\alpha$ -a  $\gamma$ -konglutin prekurzor.

**Tab. XV** Identifikace proteinů albuminové frakce.

Zóna	Identifikovaný protein	Skóre	Počet peptidů	Pokrytí (%)
1	neidentifikováno	/	/	/
2	$\beta$ -konglutin prekurzor ( <i>Lupinus albus</i> )	266	30	49
	BLAD ( <i>Lupinus albus</i> )	167	16	79
	vicilin-like protein ( <i>Lupinus albus</i> )	252	29	47
3	vicilin-like protein ( <i>Lupinus albus</i> )	270	28	45
	$\beta$ -konglutin prekurzor ( <i>Lupinus albus</i> )	224	25	43
	BLAD ( <i>Lupinus albus</i> )	159	15	78
4	$\beta$ -konglutin prekurzor ( <i>Lupinus albus</i> )	155	17	39
	BLAD ( <i>Lupinus albus</i> )	144	12	78
	vicilinlike protein ( <i>Lupinus albus</i> )	154	17	35
5	$\beta$ -konglutin prekurzor ( <i>Lupinus albus</i> )	182	20	36
	BLAD ( <i>Lupinus albus</i> )	173	14	78
	vicilinlike protein ( <i>Lupinus albus</i> )	165	18	31
6	BLAD ( <i>Lupinus albus</i> )	137	13	68
	$\beta$ -konglutin prekurzor ( <i>Lupinus albus</i> )	90	14	26
	vicilinlike protein ( <i>Lupinus albus</i> )	80	13	23
7	Serum albumin (BSA) (MW STD)	261	48	72



**Tab. XVI** Identifikace proteinů globulinové frakce.

Zóna	Identifikovaný protein	Skóre	Počet peptidů	Pokrytí (%)
1	Ovalbumin (MW STD)	124	21	72
2	$\beta$ -konglutin prekurzor ( <i>Lupinus albus</i> )	116	16	27
	vicilinlike protein ( <i>Lupinus albus</i> )	94	14	26
3	vicilinlike protein ( <i>Lupinus albus</i> )	125	15	28
	$\beta$ -konglutin prekurzor ( <i>Lupinus albus</i> )	99	13	24
	BLAD ( <i>Lupinus albus</i> )	79	9	52
4	neidentifikováno	/	/	/

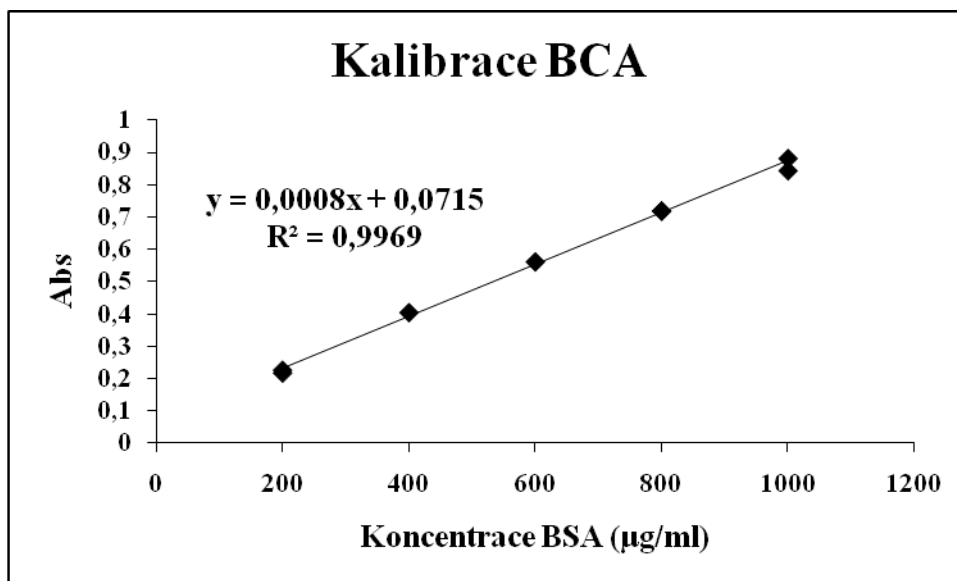
### 3.4 Enzymová aktivita lipas

Pomocí spektrofotometrické metody bylo provedeno stanovení aktivity lipas v extraktech mouky z lupiny bílé sklizní 2008 (upravená, neupravená) a 2009 (upravená a neupravená) (viz. kap. 2.4.4). Každý vzorek byl analyzován duplicitně, měření bylo provedeno ve třech opakováních. Výsledky byly vyjádřeny v jednotkách U/ml extraktu. Metodou BCA byl stanoven obsah proteinů v extraktech mouky (viz. kap. 2.4.6) a aktivity lipas byly vyjádřeny v jednotkách U/mg proteinů. Výsledky jsou shrnuty v tabulkách (Tab. XVII – obsah proteinů, Tab. XIX – aktivity vyjádřené v U/ml, Tab. XX – aktivity vyjádřené v U/mg).

Experimentálně bylo potvrzeno, že pražením mouky dochází k degradaci enzymů. V extraktech mouky upravené pražením byla lipasová aktivita neměřitelná. V rámci experimentu bylo ultrafiltrací provedeno zakoncentrování extraktu mouky 2009 upravená (viz. kap. 2.4.4). Objem extraktu byl snížen 9,06x. Bylo zopakováno měření enzymové aktivity. Aktivita lipas byla opět neměřitelná.

Aktivity lipas v extraktech neupravené mouky 2008 a 2009 jsou uvedeny v tabulce (Tab. XX). Experimentálně naměřená hodnota aktivity v mouce 2008 neupravená je 0,0524 U/mg, v mouce 2009 neupravená 0,0420 U/mg.

### 3.4.1 Stanovení celkových proteinů v enzymových extraktech metodou BCA



**Obr. 23** Příklad kalibrační přímky pro stanovení celkových proteinů metodou BCA.

Příklad výpočtu obsahu proteinů pro vzorek mouky 2008 upravená (enzymový extrakt byl při přípravě reakční směsi 5x zředěn  $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$  K-fosfátovým pufrém, pro měření absorbance byla reakční směs zředěna pufrém v poměru 3:1, změřená absorbance  $y = 0,765$ ):

$$y = 0,0008x + 0,0715$$

$$x = (y - 0,0715) / 0,0008$$

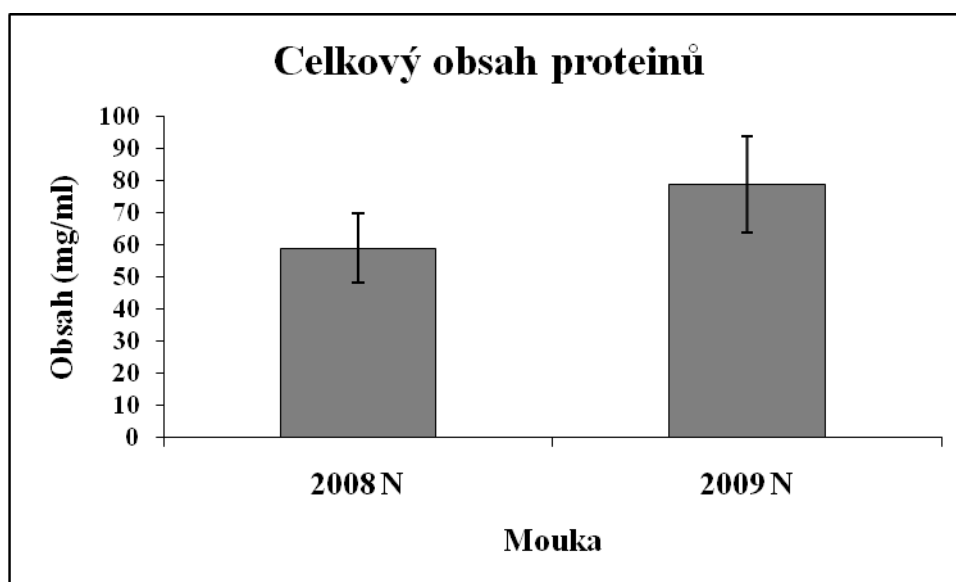
$$x = (0,765 - 0,0715) / 0,0008 = 866,875 \text{ µg /ml 5x zřed. extraktu}$$

$$\text{zřed'ovací faktor } F_t = 4 \rightarrow x' = 866,875 \cdot 4 = 3467,5 \text{ µg /ml 5x zřed. extraktu}$$

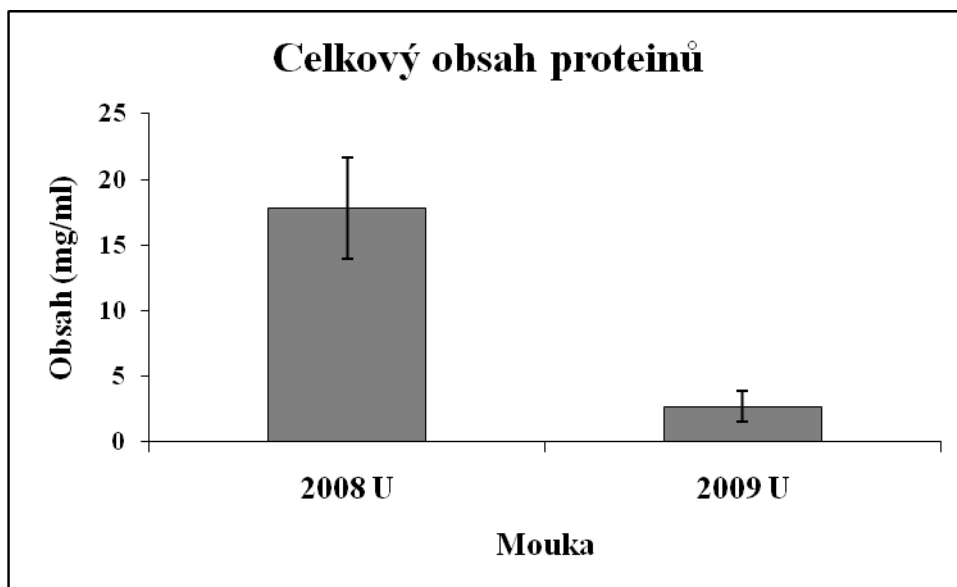
$$\rightarrow 17337,5 \text{ µg /ml} = \underline{17,338 \text{ mg/ml}}$$

**Tab. XVII** Obsah proteinů v enzymových extraktech (500 mg mouky + 3 ml pufru) vyjádřený v mg/ml (počet technických replikátů n = 2).

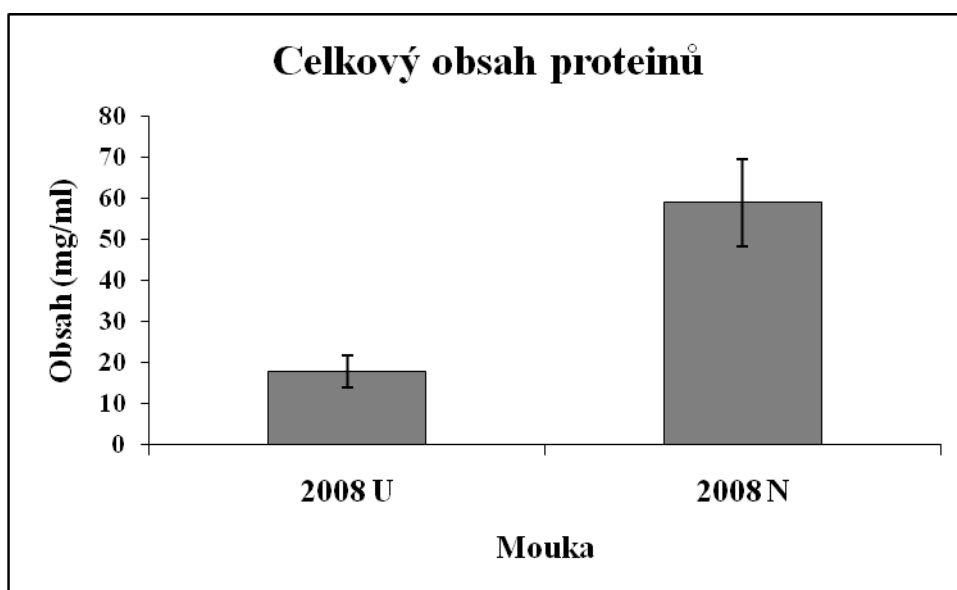
Měření č.	Vzorek			
	2008 U	2008 N	2009 U	2009 N
1	17,341	66,501	2,668	84,044
2	18,429	52,751	2,583	81,419
3	17,691	58,001	2,899	73,988
<b>Průměr</b>	<b>17,820</b>	<b>59,084</b>	<b>2,717</b>	<b>79,029</b>
<b>Směr. odchylka</b>	<b>3,877</b>	<b>10,665</b>	<b>1,136</b>	<b>15,051</b>



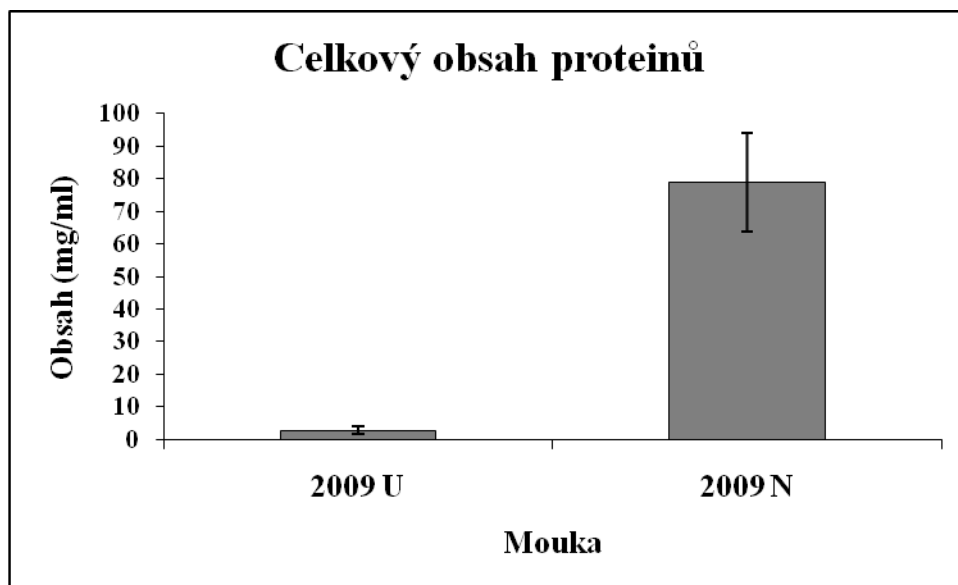
**Obr. 24** Průměrný obsah proteinů v extraktu mouky 2008 neupravená a 2009 neupravená, vyjádřeno v mg/ml extraktu.



**Obr. 25** Průměrný obsah proteinů v extraktu mouky 2008 upravená a 2009 upravená, vyjádřeno v mg/ml extraktu.



**Obr. 26** Průměrný obsah proteinů v extraktu mouky 2008 upravená a 2008 neupravená, vyjádřeno v mg/ml extraktu.



**Obr. 27** Průměrný obsah proteinů v extraktu mouky 2009 upravená a 2009 neupravená, vyjádřeno v mg/ml extraktu.

### 3.4.2 Aktivita lipas

Příklad výpočtu aktivity lipas v extraktu mouky 2008 neupravená (reakční směs: 10  $\mu$ l extrakt + 10  $\mu$ l substrát + 1980  $\mu$ l pufr):

**Tab. XVIII** Příklad výsledků měření enzymové kinetiky.

$t_{\min}$	Abs	$\Delta$ Abs
1	0,055	
2	0,133	0,078
3	0,2114	0,081
4	0,302	0,088
		$\bar{\Delta}$ 0,082

Unit/sample =  $(A \cdot 2) / (4,6 \cdot \Delta t)$  A ... průměrná absorbance za časový interval

2 ... objem kyvety

4,6 ... absorbance 1  $\mu$ mol *p*-nitrofenolu (produkt) v 1 ml

$\Delta t$  ... časový interval měření (1 min)

$$u = (0,082 \cdot 2) / (4,6 \cdot 1) = 0,03565 \text{ U}/10 \mu\text{l} \rightarrow 3,565 \text{ U/ml}$$

**Tab. XIX** Aktivita lipas v enzymových extraktech (500 mg + 3 ml pufr), vyjádřeno v U/ml extraktu (počet technických replikátů n = 2).

Měření č.	Vzorek			
	2008 U	2008 N	2009 U	2009 N
1	/	3,243	/	3,497
2	/	2,993	/	3,232
3	/	2,996	/	3,305
<b>Průměr</b>	/	<b>3,077</b>	/	<b>3,345</b>
<b>Směr. odchylka</b>	/	0,490	/	0,761

/ hodnoty neměřitelné

**Tab. XX** Aktivita lipas v enzymových extraktech, vyjádřeno v U/mg proteinů.

Měření č.	Vzorek	
	2008 N	2009 N
1	0,0488	0,0416
2	0,0567	0,0397
3	0,0517	0,0463
<b>Průměr</b>	<b>0,0524</b>	<b>0,0425</b>
<b>Směr. odchylka</b>	0,0040	0,0034

### 3.5 Aktivita amylas

Spektrofotometrickou metodou (viz. kap. 2.4.5) byla měřena aktivita amylas v extraktu mouky 2009 neupravená. Měření bylo provedeno ve třech opakováních. Výsledky byly vyjádřeny v jednotkách U/ml extraktu a po stanovení obsahu proteinů metodou BCA byly převedeny na U/mg proteinů. výsledky jsou shrnuty v tabulkách (Tab. XXI – obsah proteinů, Tab. XXII – aktivita vyjádřená v U/ml, Tab. XXIII – aktivita vyjádřená v U/mg).

Rozdíly absorbancí zaznamenané po minutových intervalech v průběhu měření byly velmi nízké. Z tohoto důvodu nebylo provedeno stanovení amylasové aktivity u vzorku mouky 2008 neupravená, ani u vzorků upravených pražením, kde se předpokládá ještě nižší (případně nulová) enzymová aktivita.

**Tab. XXI** Obsah proteinů v enzymových extraktech (250 mg mouky + 3 ml pufru) stanovený metodou BCA vyjádřený v mg/ml (počet technických replikátů n = 2).

<b>Extrakt č.</b>	<b>Vzorek 2009 N</b>
1	34,205
2	38,205
<b>Průměr</b>	<b>36,205</b>
<b>Směr. odchylka</b>	0,929

Unit/sample =  $(A \cdot 2) / (4,6 \cdot \Delta t)$     A ... průměrná absorbance za časový interval  
 2 ... objem květy  
 4,6 ... absorbance 1  $\mu$ mol *p*-nitrofenolu (produkt) v 1 ml  
 $\Delta t$  ... časový interval měření (1 min)

**Tab. XXII** Aktivita amylas v enzymových extraktech, vyjádřeno v U/ml extraktu (počet technických replikátů n = 2).

<b>Měření č.</b>	<b>Vzorek 2009 N</b>
1	0,230
2	0,161
<b>Průměr</b>	<b>0,196</b>
<b>Směr. odchylka</b>	0,083

**Tab. XXIII** Aktivita amylas v enzymových extraktech, vyjádřeno v U/mg extraktu.

<b>Měření č.</b>	<b>Vzorek 2009 N</b>
1	0,0067
2	0,0042
<b>Průměr</b>	<b>0,0055</b>
<b>Směr. odchylka</b>	0,0018

## 4. Závěr

Předložená diplomová práce je věnována poznatkům o chemickém složení semen lupiny bílé (*Lupinus albus L.*). Teoretická část obsahuje informace o složení lupinových semen se zaměřením fenolické látky a proteiny, jsou v ní také popsány metody studia těchto látek. Experimentální část je zaměřena na stanovení celkových fenolických látek metodu Folin-Ciocalteaua, analýzu fenolických kyselin a studium proteinového složení lupinové mouky a stanovení aktivity vybraných enzymů.

Stanovený obsah celkových fenolických látek (TPC) ve vzorcích mouky 2007 N, 2008 U, 2008 N, 2009 U, 2009 N je následující: 1,401 mg FA/g mouky ( $s = 0,195$ ); 1,409 mg FA/g mouky ( $s = 0,144$ ); 1,630 mg FA/g mouky ( $s = 0,512$ ); 0,588 mg FA/g mouky ( $s = 0,122$ ); 1,692 mg FA/g mouky ( $s = 0,437$ ). Variabilita u neupravené mouky v rámci jednotlivých sklizní není statisticky významná. K významnému poklesu TPC došlo u mouky 2009 pražením.

Ve vzorcích lupinové mouky (2007 N, 2008 U, 2008 N, 2009 U, 2009 N) byly identifikovány a kvantifikovány fenolické kyseliny: protocatechová (PA), *p*-hydroxybenzoová (pHBA), vanilová (VA), *p*-kumarová (pCoA), ferulová (FA) a salicylová (SA). Fenolické kyseliny jsou v biologickém materiálu nejvíce zastoupeny ve vázané formě (estery, glykosidy). V rámci jednotlivých sklizní nebyly stanoveny výrazně odlišné obsahy fenolických kyselin. Významný vliv na hladinu fenolických kyselin má opět pražení mouky (sklizeň 2009).

Majoritní skupinu proteinů v lupinové mouce představují globuliny. Pomocí MALDI-MS byly identifikovány proteiny  $\beta$ -konglutin prekurzor, BLAD a vicilin-like protein, všechny patří mezi globuliny. Albuminy pomocí MALDI-MS identifikovány nebyly. Extrakcí podle Osborna k oddělení albuminů a globulinů nedošlo a v albuminové frakci byly také identifikovány abundantní globuliny. Separace a identifikace prolaminů a glutelinů nebyla úspěšná vzhledem k jejich malé molekulové hmotnosti a nízkému obsahu v analyzovaném materiálu.

Enzymová aktivita je v neupravené lupinové mouce velmi nízká, v upravené mouce pak neměřitelná. Stanovená aktivita lipas v mouce 2008 N a 2009 N je následující:



0,0524 U/mg ( $s = 0,0033$ ); 0,0420 U/mg ( $s = 0,0021$ ). Zjištěná aktivita amylas v mouce 2009 N byla o jeden řád nižší (0,0055 U/mg,  $s = 0,0013$ ).

Proces pražení mouky, který se využívá k prevenci inhibice kvasného procesu, vede k degradaci proteinů, fenolických látek a inaktivaci enzymů. Podle průběhu pražení se liší obsah fenolických látek a proteinů ve vzorcích mouky. Obsah celkových fenolických látek pražením klesl o 65 % u mouky sklizně 2009, avšak pouze o 13,6 % u sklizně 2008. Podobně pražením klesl obsah fenolických kyselin o 58,4 % u sklizně 2009 a o 16,2 % u sklizně 2008. Obsah proteinů se pražením snížil o 96,6 % v mouce sklizně 2009 a o 69,8 % v mouce sklizně 2008. Tyto hodnoty odpovídají poklesu rozpustných proteinů získaných jedinou spektrofotometrickou metodou.

Z provedených experimentů vyplývá skutečnost, aktivita zymasy (souhrnný název pro komplex amylas, peptidas a lipas) je v mouce minimální a není tedy nutné snižovat ji pražením. Peptidasová aktivita je neměřitelná, stanovená aktivita lipas je v mouce 2008 (neupravená) 0,0524 U/mg, v mouce 2009 (neupravená) 0,0425 U/mg a aktivita amylas v mouce 2009 (neupravená) 0,0055 U/mg.

## Literatura:

1. Erbas M., Certel M., Uslu M. K.: *Food Chem.* **89**, 341 (2005).
2. Huyghe Ch.: *Field Crops Research* **53**, 147 (1997).
3. Lampart-Szczapa E., Siger A., Trojanowska K., Nogala-Kalucka M., Malecka M., Pacholek B.: *Nahrung Food* **47**, 286 (2003).
4. Martínez-Villaluenga C., Zieliński H., Frias J., Piskula M. K., Kozłowska H., Vidal-Valverde C.: *Food Chem.* **112**, 84 (2009).
5. Hrušková M. a kol.: *Chem. Listy* **103**, 763 (2009).
6. Luštinec J., Žárský V.: *Úvod do fyziologie vyšších rostlin*, 1. vydání, kap. 9 Karolinum, Univerzita Karlova v Praze, Praha 2005.
7. Heldt H., W.: *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, kap. 18 Oxford Univerzity Press, Oxford 1997.
8. Kindl H., Wöber B.: *Biochemie rostlin*. Academia, Praha 1981.
9. Ryan D., Antolovich M., Prenzler P, Robards K, Lavee S.: *Scientia Horticulturae* **92**, 147 (2002).
10. Parr A., J., Bolwell G., P.: *J. Sci. Food Agric.* **80**, 985 (2000).
11. Hess D.: *Fyziologie rostlin*. Academia, Praha 1983.

12. Buchanan B., B., Grissem W., Jones R. L.: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville 2000.
13. Robbins R. J.: *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2866 (2003).
14. Macholán L.: *Sekundární metabolisme*, Masarykova Univerzita, Pff, Brno 1998.
15. Sujak A., Kotlarz A., Strobel W.: *Food Chem.* **98**, 711 (2006).
16. Duranti M., Consonni A., Magni Ch., Sessa F., Scarafoni A.: *Trends Food Sci. Technol.* **19**, 624 (2008).
17. Scarafoni A., Magni Ch., Duranti M.: *Trends Food Sci. Technol.* **18**, 454 (2007).
18. Písaříková B., Zralý Z.: *Acta Vet. Brno* **78**, 399 (2009).
19. Mandal S., Mandal R. K.: *Current Sci.* **79**, 576 (2000).
20. Gulewicz P., Martínez-Villaluenga C., Frias J., Ciesiolka D., Gulewicz K., Vidal-Valverde C.: **107**, 830 (2008).
21. Wäsche A., Müller K., Knauf U.: *Nahrung Food* **45**, 393 (2001).
22. Wait R., Gianazza E., Brambilla D., Eberini I., Morandi S., Arnoldi A., Sirtori C. R.: *J. Agric. Food Chem.* **53**, 4599 (2005).

23. Sirtori C. R., Lovati M. R., Manzoni C., Castiglioni S., Duranti M., Magni Ch., Morandi S., D'Agostina A., Arnoldi A.: *J. Nutr.* **134**, 18 (2004).
24. Duranti M., Cerletti P.: *J. Agric. Food Chem.* **27**, 977 (1979).
25. Sironi E., Sessa F., Duranti M.: *Eur. Food Res. Technol.* **221**, 145 (2005).
26. Stalikas C. D.: *J. Sep. Sci.* **30**, 3268 (2007).
27. Andreasen M. F., Christensen L. P., Meyer A. S., Hansen A.: *J. Sci. Food Agric.* **79**, 411 (1999).
28. Rommel A., Wrolstad R. E.: *J. Agric. Food Chem.* **41**, 1237 (1993).
29. Glowniak K., Zgórk G., Kozyra M.: *J. Chromatogr. A* **730**, 25 (1996).
30. Pomponio R., Gotti R., Hudaib M., Cavrini V.: *J. Chromatogr. A* **945**, 239 (2002).
31. Huang D., Ou B., Prior R. L.: *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1841 (2005).
32. Fernandez-Orozco R., Frias J., Muñoz R., Zielinski H., Piskula M., Kozłowska H., Vidal-Valverde C.: *Eur. Food Res. Technol.* **227**, 979 (2008).
33. Velioglu Y. S., Mazza G., Gao L., Oomah B. D.: *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4113 (1998).
34. Kim K. H., Tsao R., Yang R., Cui S. W.: *Food Chem.* **95**, 466 (2006).

35. Taruscio T. G., Barney D. L., Exon J.: *J. Agric. Food Chem.* **52**, 3169 (2004).
36. Pingoud A., Urbanke C., Hoggett J., Jeltsch A.: *Biochemical methods. A concise guide for students and researchers*, 1. vydání, kap. 7. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2002.
37. Spáčil Z., Nováková L., Solich P.: *Talanta* **76**, 189 (2008).
38. Wurst M., Pacáková V., Štulík K.: *Chem. Listy* **95**, 270 (2001).
39. Chu T., Chang C., Liao Y., Chen Y.: *Talanta* **54**, 1163 (2001).
40. Wen D., Li C., Di H., Liao Y., Liu H.: *J. Agric. Food Chem.* **53**, 6624 (2005).
41. Dawes H. M., Keene J. B.: *J. Agric. Food Chem.* **47**, 2398 (1999).
42. Schieber A., Keller P., Carle P.: *J. Chromatogr. A* **910**, 267 (2001).
43. Anakura Y., Okada M., Tsuji S., Tonoga Y.: *J. Chromatogr. A* **891**, 183 (2000).
44. Zgórka G., Kawka S.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **24**, 1065 (2001).
45. Jirovský D., Horáková D., Kotouček M., Valentová K., Ulrichová J.: *J. Sep. Sci.* **26**, 739 (2003).
46. Němcová I., Engst P., Jelínek I., Sejbal J., Rychlovský P.: *Spektrometrické analytické metody II.*, 1. vydání, 3. kap. Karolinum, Praha, 1998.

47. Dongré A. R., Eng J. K., Yates J. R.: Trends Biotechnol. **15**, 418 (1997).
48. Rafii M., Elango R., Courtney-Martin G., House J. D., Fisher L., Pencharz P. B.: Anal. Biochem. **371**, 71 (2007).
49. Grúz J., Novák O., Strnad M.: Food Chem. **111**, 789 (2008).
50. De la Rosa B., Gueguen J., Paredes-López O., Viroben G.: J. Agric. Food Chem. **40**, 931 (1992).
51. Adebawale Y. A., Adeyemi I. A., Oshodi A. A., Niranjan K.: Food Chem. **104**, 287 (2007).
52. El-Adawy T. A., Rahma E. H., El-Bedawey A. A., Gafar A., F.: Food Chem. **74**, 455 (2001).
53. Fountoulakis M., Lahm H. W.: J. Chromatogr. A **826**, 109 (1998).
54. Šípal Z., Anzenbacher P., Peč P., Pospíšil J., Růžička I.: *Biochemie*, 1. vydání, kap. 2. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 1992.
55. Peč P. a kol.: *Laboratorní cvičení z biochemie*, 2. vydání, kap. 1. UP v Olomouci, Olomouc, 2004.
56. Jelly R., Patton E., Lennard C., Lewis S., Lim K.: Anal. Chim. Acta **652**, 128 (2009).

57. Sun S., Lin Y., Weng Y., Chen M.: J. of Food Composition and Analysis **19**, 12 (2006).
58. Chen L., Chen Q., Zhang Z., Wan X.: J. of Food Composition and Analysis **22**, 137 (2009).
59. Dietzen D. J., Weindel A. L., Carayannopoulos M., Landt M., Normansell E. T., Reimschisel T. E., Smith C. H.: Rapid Commun. Mass Spectrom. **22**, 3481 (2008).
60. Rombouts I., Lamberts L., Celus I., Lagrain B., Brijs K., Delcour J. A.: J. Chromatogr. A **1216**, 5557 (2009).
61. Zhan W., Wang T., Li S.: Electrophoresis **21**, 3593 (2000).
62. Pingoud A., Urbanke C., Hoggett J., Jeltsch A.: *Biochemical methods. A concise guide for students and researchers*, 1. vydání, kap. 5. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2002.
63. Wallace J. M., Foxx P. F.: Food Chem. **62**, 217 (1998).
64. Věčeřa M.: *Organická elementární analýza*, 1. vydání, kap. 3. SNTL, Praha, 1967.
65. Ogg C. L.: Anal. Chem. **28**, 766 (1956).
66. Chmelík J., Řehulka P., Střelcová M., Kubáň V., Mayrhofer C., Allmaier G.: Rostl. Výr. **48**, 261 (2002).

67. Chanput W., Theerakulkait C., Nakai S.: *J. Cereal Sci.* **49**, 422 (2009).
68. Jideani I. A., Owusu R. K., Muller H. G.: *Food Chem.* **51**, 51 (1994).
69. Cholz E., Ganzler K., Gergely S., Salgo A.: *Chromatographia Supplement* **51**, 130 (2000).
70. Pingoud A., Urbanke C., Hoggett J., Jeltsch A.: *Biochemical methods. A concise guide for students and researchers*, 1. vydání, kap. 4. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2002.
71. Bouchal P., Kučera I.: *Chem. Listy* **97**, 29 (2003)
72. Braun R. J., Kinkl N., Beer M., Ueffing M.: *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 1033 (2007).
73. O'Farell P. H.: *J. Biol. Chem.* **250**, 4007 (1975).
74. Havliš J.: *Vesmír* **78**, 448 (1999).
75. Štosová T., Havliš J., Lenobel R., Šebela M.: *Chem. Listy* **99**, 896 (2005).
76. Godula M.: *Chem. Listy* **99**, 9330 (2005).
77. Zaluzec E. J., Gage D. A., Watson J. T.: *Protein Expr. Purif.* **6**, 109 (1995).
78. Klouda P.: *Základy biochemie*, 2. vydání, kap. 28. Pavel Klouda, Ostrava, 2005.



79. Zajoncová L., Šebela M.: Chem. Listy **101**, 36 (2007).
80. Hasan F., Shah A. A., Hameed A.: Biotechnol. Adv. **27**, 782 (2009).
81. Sanz L. C., Olias J. M.: Food Chem. **37**, 221 (1990).
82. Gášková Z.: *Fenolické látky a peroxidace membránových lipidů v odpovědi rostlin na stresové faktory*. Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2008.
83. Yu J., Vasanthan T., Temelli F.: J. Agric. Food Chem. **49**, 4352 (2001).
84. Magni C., Scarafoni A., Herndl A., Sessa F., Princi B., Espen L., Duranti M.: Phytochem. **68**, 997 (2007).
85. Shewry P. R., Halford N. G.: J. Exp. Bot. **53**, 947 (2002).
86. Wen T. N., Luthe D. S.: Plant Physiol. **78**, 172 (1985).

## Seznam použitých zkratek

AA	akrylamid
APS	peroxodisíran amonný
Arg	arginin
Asp	kyselina asparagová
BAPNA	N- $\alpha$ -benzoyl-DL-arginin-4-nitroanilid
BCA	kyselina bicinchoninová
BIS	N,N'-methylenbisakrylamid
BSA	hovězí sérový albumin
BSTFA	N,O-bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
CE	kapilární elektroforéza
Cys	cystein
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	detektor diodového pole
2-DE	dvourozměrná elektroforéza
DNFB	2,4-dinitrofluorbenzen
ECD	elektrochemický detektor
ESI	ionizace elektrosprejem
FA	kyselina ferulová
FID	plamenově ionizační detektor
GC	plynová chromatografie
Glu	kyselina glutamová

His	histidin
HPAEC-IPAD	vysokoúčinná iontově výměnná chromatografie na anexu s pulzní amperometrickou detekcí
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS	spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
IEC	chromatografie na ionexech
IEF	izoelektrická fokusace
Ile	izoleucin
Leu	leucin
LIF	laserem indukovaná fluorescence
Lys	lysin
MALDI	laserová desorpce a ionizace s účastí matrice
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
Met	methionin
MSTFA	N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
4-NFB	4-nitrofenylbutyrát
OVA	vaječný albumin
PA	kyselina protokatechová
PAL	fenylalanin-amoniak lyasa
PC	papírová chromatografie
pCoA	kyselina <i>p</i> -kumarová

pHBA	kyselina <i>p</i> -hydroxybenzoová
Phe	fenylalanin
RP	reverzní fáze
SA	kyselina salicylová
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
SFE	superkritická fluidní extrakce
SPE	extrakce na pevné fázi
TAL	tyrosin-amoniak lyasa
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Thr	threonin
TLC	tenkovrstevná chromatografie
TOF	analyzátoru doby letu
Trp	tryptofan
Tyr	tyrosin
UPLC (UHPLC)	ultraúčinná kapalinová chromatografie
VA	kyselina vanilová