



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

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

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

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Markéta Veselá

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

BRNO 2016





Vysoké učení technické v Brně

**Fakulta chemická**

Purkyňova 464/118, 61200 Brno

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK1042/2015** Akademický rok: **2015/2016**  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Markéta Veselá**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)  
Studijní obor: Potravinářská chemie (2901R021)  
Vedoucí práce **PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

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

### Zadání bakalářské práce:

Na základě studia literatury napsat pojednání o vlivu zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na kvalitu pšeničného zrna. Zvláště se zaměřit na obsah proteinů gluteninové a gliadinové frakce.

V experimentální části sledovat vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého, dusíkatého hnojení a UV záření na obsah proteinů gluteninové frakce.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 20. 5. 2016

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

-----  
Markéta Veselá  
Studentka

-----  
PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31. 1. 2016

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



## **ABSTRAKT**

V této bakalářské práci byl studován vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého, dusíkaté výživy a UV záření na obsah proteinů gluteninových frakcí ozimé pšenice (*Triticum aestivum*) odrůdy Bohemia. Gluteninové proteiny byly separovány metodou SDS-PAGE a jejich kvantifikace byla provedena počítačovou denzitometrií. Bylo prokázáno, že dusíkaté hnojení má velký vliv na obsah gluteninových proteinů, u všech vzorků došlo ke zvýšení jejich obsahu. Samotný vliv zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> není zdaleka tak výrazný, nicméně jisté rozdíly se vyskytují. Vzorky pšenice pěstované za podmínek redukovaného UV záření, a vzorky pšenice pěstované v přirozených podmínkách nevykazují velké rozdíly v obsahu gluteninů.

## **ABSTRACT**

This bachelor thesis studies the impact of elevated carbon dioxide concentration in the atmosphere and nitrogen nutrition on protein content in winter wheat (*Triticum aestivum*) var. Bohemia. Glutenin proteins were separated by SDS-PAGE method and protein quantification was performed by computer densitometry. It was proved that the nitrogen fertilization has a great influence on the amount of glutenin proteins, which increased in all samples. Effect of elevated CO<sub>2</sub> concentration is not nearly as significant, however certain differences can be seen. Samples of wheat grown under conditions of reduced UV radiation, and samples of wheat grown under natural conditions did not show great differences in the content of glutenins.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

lepek, gliadiny, gluteniny, zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub> a pšenice, zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub> a kvalita pšeničného zrna, zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub> a lepek

## **KEYWORDS**

gluten, gliadins, glutenins, elevated CO<sub>2</sub> and wheat, elevated CO<sub>2</sub> and grain quality, elevated CO<sub>2</sub> and gluten

VESELÁ, M. *Vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého a dusíkatého hnojení na obsah proteinů gluteninové frakce u ozimé pšenice*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 42 s. Vedoucí bakalářské práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

*Poděkování: Ráda bych tímto poděkovala mému vedoucímu bakalářské práce panu PhDr. Miroslavu Hrstkovi, Ph.D. za věcné připomínky a jeho vstřícnost při konzultacích a tvorbě této práce. Velké díky patří také mé rodině za obrovskou podporu.*

## OBSAH

1. ÚVOD .....	7
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1 Globální změna klimatu.....	8
2.1.1 Skleníkový efekt.....	9
2.1.2 Změny koncentrace CO <sub>2</sub> .....	11
2.2 Vliv zvýšené koncentrace CO <sub>2</sub> na rostliny .....	12
2.2.1 Rychlost fotosyntézy a růstu.....	12
2.2.2 Transpirace, efektivní využívání vody, vodivost průduchů .....	13
2.2.3 Aklimace na zvýšenou koncentraci CO <sub>2</sub> .....	13
2.3 Vliv zvýšené koncentrace CO <sub>2</sub> na pšenici .....	14
2.4 Pšeničné proteiny .....	15
2.4.1 Albuminy a globuliny .....	15
2.4.2 Lepek .....	15
2.4.3 Gliadiny .....	16
2.4.4 Gluteniny .....	16
2.4.5 Pšeničné proteiny a kvalita těsta.....	17
2.4.5.1 Tvorba těsta.....	17
2.4.5.2 Vliv proteinů na kvalitu těsta.....	17
2.5 Metody stanovení lepkových proteinů.....	18
2.5.1 Extrakce .....	18
2.5.2 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu .....	19
2.5.3 Vysokoučinná kapilární elektroforéza.....	19
2.5.4 Chromatografické metody – HPLC .....	20
2.5.5 Hmotnostní spektrometrie .....	20
2.5.6 NIR spektrometrie .....	20
2.5.7 Imunochemické metody – ELISA testy.....	20
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	22
3.1 Materiál.....	22
3.2 Stanovení obsahu lepkových proteinů metodou SDS-PAGE .....	23
3.2.1 Přístroje.....	23
3.2.2 Chemikálie.....	23
3.2.3 Příprava roztoků .....	23

3.2.3.1	Roztoky pro přípravu gelů .....	23
3.2.3.2	Pomocné roztoky .....	24
3.2.3.3	Roztoky k vizualizaci bílkovin .....	24
3.2.4	Příprava polyakrylamidových gelů.....	24
3.2.4.1	Separáční gel.....	25
3.2.4.2	Zaostřovací gel.....	25
3.2.5	Příprava vzorku.....	26
3.2.5.1	Extrakce gluteninů z pšeničné mouky .....	26
3.2.5.2	Příprava směsných vzorků .....	26
3.2.6	Elektroforéza .....	26
3.2.7	Fixace a vizualizace bílkovin .....	26
3.2.8	Vyhodnocení gelu.....	26
4.	VÝSLEDKY .....	27
5.	DISKUSE.....	32
6.	ZÁVĚR.....	34
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	35
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	42



# 1. ÚVOD

Počet obyvatel planety Země neustále roste, a s ním také nároky na zemědělskou produkci, a na dostatek energie. Energie je stále získávána především spalováním fosilních paliv, a rostoucí zemědělská produkce je zajišťována masivním odlesňováním a přeměnou původních rostlinných ekosystémů na zemědělsky obdělávanou půdu. Současně se rozrůstají průmyslové zóny, které produkují obrovské množství odpadů a emisí. Největší dopad má antropogenní činnost na emise skleníkových plynů, konkrétně oxidu uhličitého. Ten vzniká hlavně při spalování fosilních paliv, dále je zastoupen v emisích mnoha průmyslových výroby, a rostlinné ekosystémy, které by jej mohly z ovzduší fixovat fotosyntézou, jsou ničeny. Právě oxid uhličitý je přitom úzce spjat s globální změnou klimatu. Jeho koncentrace v atmosféře se zvyšuje takovou rychlostí, jaká v historii nebyla zaznamenána. Vzhledem k tomu, že patří mezi skleníkové plyny, podílí se také velkou měrou na globálním oteplování.

Nevidaně rychle rostoucí koncentrace  $\text{CO}_2$  má zásadní vliv také na fotosyntetizující organismy. Pro rostliny je tento plyn zdrojem uhlíku, který pomocí fotosyntetického aparátu přeměňují na sacharidy. Množství fixovaného  $\text{CO}_2$  závisí u většiny rostlin na jeho parciálním tlaku v ovzduší, neboli na jeho koncentraci. Pokud je jeho koncentrace vyšší, je pak pro rostliny lépe dostupný, a mohou tak rychleji ukládat produkty fotosyntézy. Ve výsledku by tedy rostliny měly rychleji růst a vykazovat vyšší výnosy. Taková situace ale nastane pouze za ideálních podmínek, které zahrnují spoustu environmentálních faktorů, jako je dostatek slunečního záření a minerální výživy, nebo dostatečný přísun vody. Pokud takové podmínky zajištěny nejsou, pak může mít vysoká koncentrace  $\text{CO}_2$  na rostliny negativní dopad, a velké výnosy jsou kompenzovány například nižším obsahem bílkovin. Jakým způsobem pak rostlina na danou situaci zareaguje, záleží i na rostlinném druhu a na jeho genetické výbavě. U kulturních rostlin, které jsou pěstovány pro lidskou výživu, by ale změny v obsahu bílkovin mohly způsobit velké problémy při technologickém zpracování rostlinných produktů, a v neposlední řadě by se tak měnila výživová hodnota potravin.

Obecně lze říci, že u většiny  $\text{C}_3$  rostlin je při vyšší koncentraci  $\text{CO}_2$  výrazně zvýšena rychlost fotosyntézy, a tím je stimulována i produkce biomasy. Tyto děje ale většinou probíhají za současné redukce obsahu bílkovin. U některých druhů již také byla pozorována aklimace, čili pokles rychlosti fotosyntézy, jako reakce rostlin na dlouhodobou kultivaci při vysokých koncentracích  $\text{CO}_2$ . Všechny uvedené změny byly v mnoha studiích pozorovány také na pšenici. Ta patří také mezi  $\text{C}_3$  rostliny, a je jednou z nejpěstovanějších plodin světa. V lidské výživě má nezastupitelnou roli, a změny v obsahu jejích bílkovin by vedly ke změnám kvality mouky, což by mělo negativní dopad na mnoho potravinářských výroby.

V této práci byl zkoumán vliv zvýšené koncentrace  $\text{CO}_2$  na obsah bílkovin pšeničného zrna. Spolu s vlivem oxidu uhličitého byl sledován i vliv dusíkaté výživy a UV záření. Konkrétně byly sledovány změny obsahu gluteninové frakce, která se z velké míry podílí na výsledné kvalitě pšeničných výrobků a zásadně tak ovlivňuje konečné využití pšenice v potravinářském průmyslu.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Globální změna klimatu

Zemské klima bylo v historii velmi proměnlivé. Dlouhá teplá období, ve kterých pravděpodobně ani neexistovaly ledové pokrývky pevnin, byla střídána studenými obdobími, kdy naopak docházelo k mohutnému zalednění. Změny klimatu se odehrávaly na planetě s velmi proměnlivým povrchem, kontinenty se spojovaly a opět rozpadaly, měnila se jejich poloha vzhledem ke světovým pólům, složení atmosféry bylo značně odlišné od současného a Země procházela etapami horotvorné i vulkanické činnosti [1]. Informace z ledovcových vrtů prováděných v Grónsku a Antarktidě poskytují varování, že klima na naší planetě se může měnit relativně rychle. Nejpodrobněji jsou prostudována zalednění odehrávající se během posledních 2 milionů let, tedy v kvartéru (čtvrtohorách). Vystřídalo se více než 50 dob ledových, nejvíce je ale prozkoumána ta poslední [2]. Přejít k teplejšímu klimatu holocénu (současná doba meziledová) probíhal dramaticky, po náhlých otepleních následoval několikrát opět návrat k podmínkám ledovým. Klima posledních 10 tisíc let je ale v porovnání s předchozími obdobími stále velmi klidné [1]. Změny charakteru zemského povrchu, složení atmosféry, změny stavu světového oceánu probíhající v současnosti často v důsledku lidské činnosti ale nejsou tak drastické, v porovnání s historickým vývojem Země. To svádí k domněnkám, že tyto zásahy člověka do klimatického systému se nemohou na klimatu projevit [3].

Změna klimatu může být vyvolána řadou faktorů, působících na klimatický systém, včetně vlivu lidské činnosti [1]. Ke studiu klimatického systému a antropogenních vlivů se v současné době používají především třírozměrné globální klimatické modely (GCM) [2], což jev podstatě matematická prezentace fyzikálních a chemických dějů probíhajících v klimatickém systému Země, počítaná pro celou planetu [4], [5]. V současnosti teplota na Zemi roste a brzy dosáhne hodnot, kterých již velice dlouho nedosáhla. Příčinou jsou hlavně antropogenní emise [3]. Pokud mluvíme o globální změně klimatu (GZK), vždy mluvíme právě o změnách způsobených člověkem. Tyto změny zahrnují hlavně enormní růst emisí skleníkových plynů [6]. Dopady GZK se již dnes negativně projevují. Dochází ke změnám v biodiverzitě rostlin a živočichů a jejich vymírání, pokračuje globální oteplování, je narušen koloběh prvků v přírodě, rostou rizika náhlých povodní, zvyšuje se erozní činnost. Horské oblasti se potýkají s ústupem ledovců, úbytkem sněhové pokrývky, v jižní Evropě narůstají letní teploty a klesá srážková činnost [6]. Zhoršuje se dostupnost vody a nedostatek vláh má vliv na zemědělskou produkci. Zvýšená četnost výskytu vln extrémně vysokých teplot stupňuje rizika vzniku rozsáhlých požárů. Ve střední a východní Evropě zřetelně klesají letní srážkové úhrny a klesají zásoby podzemních i povrchových vod. V severní Evropě se projevují i některá pozitiva (např. vyšší výnosy sklizní, rychlejší růst lesních porostů) [7].

Zvýšené emise skleníkových plynů spolu s nedostatkem vody, energie, kvalitní půdy a eutrofizací povrchových vod budou mít velký vliv i na produkci plodin. Rostoucí hladina moří a čím dál častější extrémní výkyvy počasí budou představovat nová rizika. Spojení rostoucí koncentrace CO<sub>2</sub>, rostoucí teploty a srážek je znepokojujícím faktorem, který bude dříve či později ovlivňovat celosvětové zabezpečení potravin pro lidstvo. V důsledku toho

roste i potřeba zkoumat vliv GZK na růst a vývoj rostlin a jejich produkci [4]. Dopady GZK na výnosy plodin jsou také odvozeny z různých simulačních modelů pro téměř všechny kontinenty. Některé studie ukazují, že rostoucí koncentrace CO<sub>2</sub> a zároveň zvýšená depozice dusíku může mít i pozitivní dopad na rostlinnou produkci, a to díky zvýšení rychlosti fotosyntézy, za současného zpomalení transpirace. Tento vliv bude ovšem nejspíš kompenzován negativním dopadem rostoucí teploty a odezvy rostlin budou velice variabilní [4], [6], [8]. Ke globální depozici dusíku dochází opět kvůli lidské činnosti, hlavně kvůli intenzivní urbanizaci, industrializaci a intenzifikaci zemědělství [2].

Středem zájmu jsou jednoznačně dopady GZK na pšenici, rýži a kukuřici, jelikož se řadí mezi šest nejpěstovanějších plodin světa, a tvoří také převážnou složku potravin a zvířecích krmiv [9]. Celkově bude mít GZK na tyto rostliny velký dopad, ale zatím nevíme, zda bude spíše negativní nebo pozitivní, právě díky nejednotným účinkům na fyziologii rostlin [10]. Například příliš prudký růst teploty způsobuje téměř lineární pokles rychlosti fotosyntézy a dochází spíše k mineralizaci prvků [4]. Naopak vyšší srážky vedou k většímu hromadění organické hmoty [11]. Obecně největší účinky mají výše uvedené změny na C3 rostliny, u C4 rostlin jako je například kukuřice setá, ke změnám v podstatě nedochází. Zásadní je, že mezi C3 rostliny patří drtivá většina druhů [2].

Prognózy vývoje globálního oteplování prozatím tvrdí, že během příštích 50 let bude teplota vyšší asi o 2 °C než je nyní světový průměr [3]. GCM ale stále podléhají řadě omezení, která zatím nedovolují všechny procesy dostatečně podrobně popsat a navíc řada z nich ještě není v plném rozsahu ani známá. Netýkají se však pouze klimatického systému. K odhadům změn je třeba ještě zohlednit i pravděpodobný výhled socioekonomického stavu světa například předpokládaný nárůst populace, technologický rozvoj, stav energetických zásob, využívání nových zdrojů energie apod. [7]. Aktuálně je možné se s globální klimatickou změnou vyrovnat buď přizpůsobením se změnám, které nastanou, a být na ně připraveni, nebo se snažit zastavit GZK omezením zdrojů, které ji způsobují [12].

### **2.1.1 Skleníkový efekt**

Záření emitované Sluncem a dopadající na naši planetu je zčásti odraženo a zčásti absorbováno jak atmosférou, tak i zemským povrchem. Velká část nebezpečného ultrafialového záření s krátkou vlnovou délkou je absorbována již ozonovou vrstvou. Oxid uhličitý a vodní pára, vyskytující se v nižších oblastech atmosféry, absorbují až v infračervené oblasti, zhruba mezi 1,5–2 μm. Na zemský povrch tedy dosáhne záření v rozmezí 0,3–2 μm. Toto záření je zčásti odraženo zemským povrchem a oblaky, nicméně větší část je absorbována, a tak se povrch Země ohřívá [13]. Stejně tak jako Slunce, i Země emituje tepelné záření, ale jelikož je na Zemi mnohem nižší teplota než na Slunci, jedná se o mnohem delší vlnové délky. Většina zemského povrchu a oceány jsou tak dobrými emitory záření, které se pohybuje mezi 10–25 μm, čili v dlouhovlnné infračervené oblasti. Právě toto záření je druhou příčinou zvyšování teploty povrchu Země, protože je čím dál více pohlcováno skleníkovými plyny, které následně část záření emitují do vesmíru, ale část směřují zpět k zemskému povrchu [14]. Takový skleníkový efekt je přirozenou vlastností zemské atmosféry. Skleníkové plyny, které jej způsobují, se v ní vyskytují v podstatě od chvíle, kdy

atmosféra vznikla [13], s tím, že nejvýznamnější roli v tomto procesu hraje vodní pára a oxid uhličitý [14].

Kromě oxidu uhličitého a vodní páry patří mezi skleníkové plyny methan, oxidy dusíku, a v posledních letech se k těmto plynům řadí i freony (alifatické uhlovodíky substituované chlorem a fluorem) a fluorid sírový [2]. Díky přirozenému výskytu skleníkových plynů, byla na planetě zajištěna vhodná teplota [7]. Dnes ale teplota na Zemi roste – dochází ke globálnímu oteplování, což je způsobeno nebývale rychlým růstem koncentrace těchto plynů a také výskytem úplně nových [12], [2]. I přes to, že  $\text{CH}_4$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  i freony mají mnohem kratší životnost v atmosféře než  $\text{CO}_2$ , jejich vliv na její ohřev je nepřehlédnutelný – již při malých koncentracích mají totiž vysokou účinnost [15]. Společnou vlastností skleníkových plynů je, jak již bylo uvedeno výše, propustnost krátkovlnného slunečního záření, a naopak daleko menší propustnost pro dlouhovlnné záření emitované zemským povrchem. Radiace jen z malé části uniká do vesmíru, konkrétně jen záření v intervalu vlnových délek 7–13  $\mu\text{m}$ , pro které je atmosféra skvěle propustná, a proto se tomuto intervalu říká atmosférické okno [6]. Záření emitované mimo toto okno je atmosférou silně absorbováno, tudíž se do vesmíru vyzařuje mnohem méně energie [2]. Toto atmosférické okno se ale stále zmenšuje, a zářivá bilance Země není v rovnováze [6]. Jsou to právě syntetické plyny, které absorbují v oblasti atmosférického okna, a tím ho zmenšují [2]. Výsledná bilance energie Země přitom formuje atmosférické a oceánické proudění a následně ovlivňuje výpar a srážkové procesy. Základní příčinou změn počasí a klimatu tedy jsou právě změny energetické bilance Země [7].

Antropogenní zdroje skleníkových plynů jsou rozdílné. Oxid uhličitý se do atmosféry dostává převážně spalováním fosilních paliv, emise methanu jsou tvořeny zemědělskou činností a zpracováním ropy a zemního plynu, oxid dusný uniká při řadě zemědělských procesů a emise freonů souvisí s rozvojem chladírenské a klimatizační techniky [7]. Freony jsou známy převážně díky narušování ozonové vrstvy, která nás chrání před nebezpečným ultrafialovým zářením. Ozonová vrstva se nachází ve stratosféře ve výšce asi 25–35 km, kde dochází k fotolýze freonů. Vznikající vysoce reaktivní chlor pak rozkládá ozon [2]. Přirozené emise oxidu dusného jsou způsobeny například nitrifikačními a denitrifikačními půdními bakteriemi. Antropogenní emise pocházejí například ze spalovacích procesů – používá se jako oxidační činidlo v motorech. Pod označením E942 se používá i v potravinářském průmyslu jako hnací plyn. Životnost  $\text{N}_2\text{O}$  v atmosféře je asi 130 let a také se podílí na destrukci ozonové vrstvy. Methan má velké využití jako zdroj energie, hojně je také využíván v chemickém průmyslu. V atmosféře je jeho životnost asi 10 let a jeho přirozenými zdroji jsou všechny druhy mokřadů, oceány a termišťe [2]. Úbytek methanu je zajišťován bakteriemi v provzdušněných půdách, a zejména oxidací hydroxylovými radikály v troposféře. Po oxidaci se podílí na rozkladu stratosférického ozonu [15].

Činností člověka jsou do atmosféry uvolňovány i pevné aerosoly, které působí proti zesilování skleníkového efektu [7]. Jedná se hlavně o sulfáty, které rozptylují dopadající sluneční záření. Jejich životnost v atmosféře je však relativně krátká, takže mají spíše lokální účinky [2].

### 2.1.2 Změny koncentrace CO<sub>2</sub>

Koncentrace CO<sub>2</sub> v atmosféře byla vždy ovlivněna přirozenými procesy, jako je dýchání nebo třeba vulkanická činnost [6]. Přibližně před 550 miliony let dosahovala koncentrace CO<sub>2</sub> až 6 000 μmol mol<sup>-1</sup>, a před asi 400 miliony let, kdy rostliny přecházely na souš, už jeho koncentrace činila 3 000 μmol mol<sup>-1</sup>, čili docházelo k jistému přizpůsobení se, pravděpodobně i proto, že sluneční záření mělo jiné vlastnosti, než má dnes. Většina takových údajů o koncentraci CO<sub>2</sub>, pochází z analýz vzduchu uzavřeného v polárních ledovcích, nebo jsou získány metodami založenými na stanovení poměru izotopů uhlíku v organických materiálech. Až z doby několik desítek až stovek tisíců let před současností existují poměrně podrobné údaje [2].

Před zhruba 2 miliony let, na začátku kvartéru došlo k velkému ochlazení a na severní polokouli se vytvořily mohutné ledovcové vrstvy. Pro kvartér je typické kolísání klimatu, střídání dob ledových a meziledových, přičemž pro tyto přechody je charakteristické zvýšení koncentrace CO<sub>2</sub> asi o 30 %. Předpokládá se tedy, že změny klimatu a koncentrace CO<sub>2</sub> byly těsně spjaty, a patrně souvisí s alkalitou a cirkulací oceánů, se změnami biologické produktivity i s ukládáním CaCO<sub>3</sub> do korálových útesů [2]. V preindustriálním období, čili před rokem 1800 byly emise z fosilních paliv i změny v užívání souše minimální. Mezi roky 1000 a 1550 byla koncentrace CO<sub>2</sub> zhruba 282 μmol mol<sup>-1</sup>. Do roku 1800 jeho koncentrace klesla asi o 6 μmol mol<sup>-1</sup>, zpět na 282 μmol mol<sup>-1</sup> se vrátila až počátkem 19. století, a potom následoval prudký vzrůst jako následek masivního průmyslového rozvoje [2], [6], [13]. Aktuální koncentrace oxidu uhličitého dosáhla hodnoty 400 μmol mol<sup>-1</sup>, což je nejvíce za posledních několik milionů let, antropogenní emise CO<sub>2</sub> tedy jednoznačně porušují přirozenou rovnováhu tohoto plynu [12]. Takto velké změny nejsou způsobeny jen spalováním fosilních paliv, ale i extrémně rozsáhlým a rychlým odlesňováním, především v tropických oblastech. Neodlesněné suchozemské ekosystémy jsou totiž díky fotosyntéze úložištěm nemalého množství CO<sub>2</sub> [6]. Jedním z hlavních sinků CO<sub>2</sub> jsou také oceány. V procesu saturace CO<sub>2</sub> do oceánských vod hraje ale velkou roli také teplota [2].

Již několik desetiletí je také sledováno kolísání koncentrace CO<sub>2</sub> v průběhu roku. K pravidelnému poklesu dochází v době rozvoje jarní vegetace na severní polokouli, a k uvolnění velkého množství CO<sub>2</sub> dochází na podzim, kdy vegetace přestává být fotosynteticky aktivní. Další příčinou ročního cyklu může být sezónní kolísání spalování fosilních paliv [2].

Současné změny v koncentraci CO<sub>2</sub> tedy nejsou raritou, nýbrž zcela očekávanou věcí. Co je ovšem neočekávané, je nevídaná rychlost těchto změn. Například rostliny nejsou a nebudou schopny se adekvátně rychle adaptovat na vzniklé podmínky. Nejmenší schopnost adaptace byla zatím pozorována u C<sub>3</sub> rostlin, mezi něž se řadí drtivá většina kulturních plodin, pěstovaných za účelem nakrmit neustále se rozrůstající lidskou populaci [2]. Některé kulturní plodiny ale zastupují také skupinu C<sub>4</sub> rostlin, například kukuřice, cukrová třtina nebo čirok [16].

## 2.2 Vliv zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> na rostliny

Pro studium vlivu CO<sub>2</sub> na růst a produktivitu rostlin se dnes používají systémy FACE (Free-Air CO<sub>2</sub> Enrichment). Jedná se o systém potrubí, které je umístěno v kruhu kolem pokusného pozemku, a obohacuje okolní vzduch oxidem uhličitým. Výhodou je, že není ovlivněno okolní mikroklima, ale zároveň lze sledovat změny na poměrně velkých plochách [2]. Drtivá většina FACE experimentů dokazuje, že fixace uhlíku fotosyntézou je u C<sub>3</sub> rostlin významně stimulována [17].

Přímým účinkem zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> je změna rychlosti fotosyntézy, fotorespirace, transpirace, ale i spousta dalších sekundárních změn, jako je odlišnost ve vodivosti průduchů [2], změna plochy listů [18], nebo třeba nárůst kořenové biomasy. To, do jaké míry se tyto účinky na rostlině projeví, záleží na rostlinném druhu a na dalších podmínkách růstu, jako je teplota, dostatek slunečního záření, nebo také dostupnost minerální výživy v půdě [6], obzvláště pak dostatek dusíku [6], [19], [20]. U mnoha C<sub>3</sub> rostlin byl sledován výrazný růst rychlosti fotosyntézy. Také byl prokázán pokles rychlosti transpirace, rostliny tedy v podmínkách vyšší koncentrace CO<sub>2</sub> efektivněji hospodaří s vodou [2].

Dlouhodobá expozice rostlin vysoké koncentraci CO<sub>2</sub> ovšem může mít i mnohé jiné účinky, vyplývající z provázanosti již uvedených jevů [17]. U mnoha druhů C<sub>3</sub> rostlin byla pozorována aklimace na zvýšenou rychlost fotosyntézy. To znamená, že dochází ke změnám asimilačního aparátu rostlin [6], konkrétně se rychlost fotosyntézy opět snižuje [2], [19], [21].

### 2.2.1 Rychlost fotosyntézy a růstu

Stimulace procesu fotosyntézy se projevuje nejvýrazněji u C<sub>3</sub> rostlin. Tyto rostliny totiž v temnostní fázi fotosyntézy fixují CO<sub>2</sub> Calvinovým cyklem, jehož první krok je vazba CO<sub>2</sub> na ribulosa-1,5-bisfosfát (RuBP). Tento krok je zprostředkován enzymem, jehož aktivita roste s rostoucí koncentrací CO<sub>2</sub> v ovzduší. Tento enzym (ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa, neboli Rubisco) ale váže i vzdušný kyslík, pro zajištění fotorespirace. Při fotorespiraci se naopak z asimilátů uvolňuje CO<sub>2</sub>, například v horkých letních dnech, kdy je rostlina nucena uzavřít průduchy, aby neztrácela vodu a CO<sub>2</sub> tak nemůže být fixován [6]. Pokud má ale rostlina v okolní atmosféře k dispozici více molekul oxidu uhličitého, než molekul kyslíku, pak dochází k intenzivnější karboxylaci Rubisco, jelikož navázání molekul CO<sub>2</sub> je pravděpodobnější [2]. Díky tomu pak roste rychlost fotosyntézy, rostlina má k dispozici více asimilátů a může tak i rychleji růst [17]. Například Poorter [21] porovnával výnosy 156 rostlinných druhů, kultivovaných při vzdušné koncentraci oxidu uhličitého 600–720 μmol mol<sup>-1</sup>. Jejich výnosy byly vztaženy k výnosu při koncentraci 300–360 μmol mol<sup>-1</sup> a výsledky ukazují, že u C<sub>3</sub> rostlin vzrostl obsah sušiny průměrně o 41 %. V mnoha FACE experimentech také bylo dokázáno, že obsah a aktivita enzymu Rubisco klesá, nicméně i přesto byla rychlost fotosyntézy stimulována [17], [21].

U C<sub>4</sub> rostlin by vliv vysoké koncentrace CO<sub>2</sub> neměl být tak markantní, jelikož roli Rubisca zastupuje enzym fosfoenolpyruvátkarboxylasa (PEPc), který neváže kyslík, pouze CO<sub>2</sub>, a zprostředkuje jeho vazbu na fosfoenolpyruvát [2]. Tento krok je součástí Hatch-Slackova cyklu, jehož cílem je zvyšovat koncentraci CO<sub>2</sub> v buňkách, kde je vázán Calvinovým cyklem. Tento mechanismus tak vyžaduje energii navíc, díky které se regeneruje fosfoenolpyruvát.

Rozhodující je tedy pro C4 rostliny dostatek zářivé energie [16]. I přes to Poorter [21] uvádí, že se výnos C4 rostlin pod vlivem zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> zvýšil, konkrétně vzrostla hmotnost sušiny zkoumaných rostlin o 22 %. To může být způsobeno například změnami ve vodivosti průduchů a obecně tím, že fotorespirace u C4 rostlin v podstatě neprobíhá [21], [16].

Obecně míra zvýšení rychlosti fotosyntézy značně závisí na dostupnosti zářivé energie. Při vyšších ozářenostech je zvýšení rychlosti fotosyntézy výraznější, nicméně i stinná spodní patra hustých porostů vykazují stimulaci fotosyntézy, jako odezvu na větší dostupnost CO<sub>2</sub> [2]. Dále záleží na rostlinném druhu a jeho genetické výbavě [21], na teplotě při kultivaci (ta ještě více podmiňuje stimulační účinek CO<sub>2</sub>) [22] a na řadě dalších environmentálních faktorů.

### **2.2.2 Transpirace, efektivní využívání vody, vodivost průduchů**

Jedním z hlavních faktorů ovlivňujících výnos plodiny je dostupnost půdní vlhkosti, nicméně obnovování zásob podzemních vod je často narušováno obdobím sucha [4]. Je tedy žádoucí změnou, že rostliny efektivněji hospodaří s vodou za podmínek zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> [2], konkrétně snižují vodní ztráty transpirací [17], [21]. V tomto procesu hrají důležitou roli průduchy. Ty totiž maximalizují rychlost difúze CO<sub>2</sub> do listu za udržení minimálních ztrát vody transpirací [17]. Právě vodivost průduchů je vlivem rostoucí koncentrace CO<sub>2</sub> snižována [2], [17], [8], a tato změna byla pozorována jak u C3 rostlin, tak u C4 rostlin [21].

Mechanismus, kterým CO<sub>2</sub> způsobí přivření průduchové štěrbin, není spolehlivě popsán, ale má na něj velký vliv i ozářenost (hlavně modré a červené spektrum viditelného záření). Předpokládá se, že množství fixovaného CO<sub>2</sub> ovlivňuje koncentraci zeaxantinu, který funguje právě jako receptor modrého záření v chloroplastech svěřacích buněk [6], [23].

### **2.2.3 Aklimace na zvýšenou koncentraci CO<sub>2</sub>**

Při dlouhodobé kultivaci za podmínek zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> dochází u C3 rostlin k postupnému poklesu rychlosti fotosyntézy. Existuje řada možných mechanismů, kterými je aklimace spuštěna [6]. Vzhledem k tomu, jak moc je vlivem CO<sub>2</sub> zpočátku fotosyntéza urychlena, jako první přichází v úvahu změny v obsahu a hlavně aktivitě enzymu Rubisco, nebo vliv nestrukturních sacharidů, asimilovaných ve velkém množství [24].

Pokud fotosyntetické procesy produkují více asimilátů, než je rostlina schopna uložit, začnou se hromadit ve vakuolách mezofylových buněk. Tyto asimiláty (nestrukturní sacharidy, převážně sacharosa a glukosa) způsobují represí genů fotosyntetického aparátu, tedy i genů, které ovlivňují aktivitu Rubisco. Mechanismus tohoto děje není detailně prozkoumán, nicméně je známo, že v něm hraje důležitou roli enzym hexokinasa, jehož substrátem jsou právě hexosy tvořené z asimilátů [6], [25].

Další příčinou, která vyvolá aklimaci by mohlo být snížení celkového obsahu dusíku v listech [26], který v mnoha studiích odpovídá i poklesu obsahu Rubisca [27]. Medlyn [28] uvádí, že při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> se rostliny snaží efektivněji využívat dusík, a to tak, že sníží obsah enzymu Rubisco, aby mohly dusík z něj použít například pro syntézu proteinů elektronového transportu, nebo jej využijí na enzymy důležité pro syntézu škrobu a sacharosy

[6]. Nakano a kol. [26] také pozorovali pokles obsahu Rubisco, ale dodávají, že tento pokles nesouvisel s efektivnějším využitím dusíku na jiné sloučeniny. Rogers a kol. [29] uvádí, že pokles v obsahu celkového množství proteinů (převážně pak Rubisco) je tím větší, čím méně je rostlina hnojena dusíkem. Výrazný vliv minerální výživy, hlavně dusíku, uvádí i Marek a kol. [6].

Pro zachování vyšších rychlostí fotosyntézy při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> je také nutné zachovat aktivitu enzymu Rubisco [26]. Mnoho studií uvádí, že aktivita enzymu postupně vlivem CO<sub>2</sub> klesá [30], [31], mnoho z nich ale tuto domněnku vyvrací [26], [32].

Kromě výše uvedených důvodů aklimace C<sub>3</sub> rostlin, existuje spousta dalších mechanismů, které se při tomto procesu mohou uplatňovat. Například redistribuce a nedostatek anorganického fosforu, nebo pokles obsahu fotosynteticky aktivních pigmentů, snížení obsahu dusíku je totiž spojováno s nižším obsahem chlorofylů [6], [26]. Všechny procesy jsou ale provázané, a tak nelze určit, který mechanismus se na aklimaci podílí nejvíce. Například nedostatek fosforu může být způsoben právě hromaděním asimilátů fotosyntézy – ty se totiž v prvním kroku fosforylují, čímž čerpají ATP potřebné pro dokončení Calvinova cyklu (pro regeneraci RuBP). Nedostatek anorganického fosforu také ovlivňuje hromaděním asimilátů ve stromatu chloroplastů, jelikož do cytosolu se mohou dostat jen přes striktní antiport, který přenáší současně PO<sub>4</sub><sup>-</sup> [6], [26], [32].

### 2.3 Vliv zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> na pšenici

Výzkumy z posledních dvaceti let naznačují, že vlivem zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> se výnos u pšenice bude zvyšovat, nicméně tato výhoda bude kompenzována nižší kvalitou (nižším obsahem bílkovin). Dokazují to například Fernando a kol. [33] se závěrem, že obsah proteinů vztahený na sušinu klesl o 9 % při expozici 550 μmol CO<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup>. Nicméně také tvrdí, že obsah proteinů vyjádřený jako procentuální obsah zrna se neměnil za rozdílných koncentrací CO<sub>2</sub>. Aranjuelo a kol. [34] uvádějí, že expozice zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub> významně zvýšila tvorbu biomasy, ale tento jev byl způsoben spíše vyšším počtem klasů na jednu rostlinu, než změnami samotného zrna. Stejný závěr má i studie Högyové a kol. [20], kde autoři potvrzují pozitivní vliv na produkci nadzemní biomasy a zároveň na počet klasů, i na počet zrn. Han a kol. [35] prováděli FACE experimenty v letech 2007–2010 a prokázali o 11,4 % vyšší výnos zrna, ale také nižší obsah dusíku v rostlině (nejnižší obsah dusíku byl stanoven v listech). Pokles obsahu dusíku v listech i v pšeničném zrně je jedním z nejčastěji pozorovaných jevů, způsobených vyšší koncentrací CO<sub>2</sub> [36]. Zajímavé je porovnání FACE experimentů s pšenicí ozimou, kdy bylo použito rozdílných dávek dusíkatého hnojení. Han a kol. [35] neprokázali interakci vlivu zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> a dusíkatého hnojení. Výnos zrna vzrostl o 11,4 %, ale výrazně se neměnil při vyšších dávkách dusíkaté výživy, která byla dávkována v množství 25–95 kg·ha<sup>-1</sup> dusíku. Ma a kol. [37] dávkovali dusíkaté hnojivo nejprve v množství 125 kg·ha<sup>-1</sup> dusíku, kdy množství nadzemní biomasy vzrostlo o 13,5 %. Poté dávkovali 250 kg·ha<sup>-1</sup> dusíku, a množství nadzemní biomasy vzrostlo dokonce o 26,8 %.

Prokázán byl také vliv na distribuci dusíku mezi rostlinnými orgány, a to v různých fázích vývoje rostliny [35]. Han a kol. [35] poukazují na pozitivní vliv dusíkaté výživy na obsah proteinů a také uvádějí, že dávky dusíkatého hnojení by měly být největší ve fázi růstu, aby



měla rostlina dostatek dusíku při kvetení, kdy je poptávka po něm největší. Taub a kol. [38] provedli meta analýzu publikací, které se týkají vlivu zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> na obsah proteinů nejvíce pěstovaných plodin světa. U pšenice potvrzují významné snížení obsahu proteinů, stejně tak jako tento vliv potvrzují meta analýzy Jablonského a kol. [39] a Loladze [40]. Taub a kol. [38] také uvádí, že tento jev je umocněn vyšší teplotou při kultivaci. Existuje předpoklad, že při dostatečném dusíkatém hnojení, a tedy při zachování, nebo dokonce zvýšení obsahu bílkovin zrna, může rostlina trpět nedostatkem síry, z důvodu vyčerpání proteinů bohatých na síru [41]. Snížení obsahu síry v pšeničných zrnech potvrzují Högy a kol. [20]. Leakey a kol [17] uvádějí, že zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub> může u pšenice jednak zvýšit pozitivní vliv půdního dusíku na efektivitu využívání vody, ale také stimuluje respiraci při nedostatku záření. Závěrem autoři dodávají, že stimulace výtěžku rostlin je nižší, než bylo očekáváno.

## **2.4 Pšeničné proteiny**

Pšeničné bílkoviny můžeme klasifikovat podle morfologického původu na bílkoviny endospermu, aleuronové vrstvy a bílkoviny klíčku. Endosperm pšeničného zrna, ze kterého se vyrábí převážná většina mouk, obsahuje asi 10–13 % proteinů, které jsou velmi heterogenní, liší se jak ve složení, tak i v molekulových hmotnostech [41]. Rozdělení těchto proteinů na základě rozpustnosti provedl Osborn pomocí postupné extrakce na čtyři frakce [42]. Prvními extrahovanými proteiny byly albuminy rozpustné ve vodě, následovaly globuliny rozpustné v roztocích solí, dále prolaminy (u pšenice nazývané gliadiny) rozpustné ve vodných roztocích alkoholů a gluteliny zčásti rozpustné ve zředěných kyselinách a zásadách [43]. Gluteliny (u pšenice nazývané gluteniny) byly později rozděleny ještě na dvě podskupiny – první je rozpustná v 0,05 M kyselině octové, druhá není [42]. Nejčastěji publikované vzájemné procentuální poměry mezi jednotlivými skupinami bílkovin u pšenice seté jsou v rozmezích 20–25 % albuminů a globulinů, 40–50 % gliadinů a 35–40 % gluteninů [43]. Každá z vyjmenovaných skupin obsahuje velké množství proteinů, které se navzájem nemálo liší, proto byla klasifikace pšeničných proteinů rozšiřována a dnes už klasifikujeme bílkoviny i na základě sekvence aminokyselin, nebo na základě jejich typické trojrozměrné struktury [44]. Velký vliv na celkový obsah proteinů, a hlavně na obsah jednotlivých frakcí, má genotyp daného druhu pšenice, ale také environmentální podmínky růstu [41].

### **2.4.1 Albuminy a globuliny**

Albuminy jsou společně s globuliny označovány jako rozpustné pšeničné bílkoviny [36]. V obilce mají především metabolickou, nebo strukturní funkci. Jsou tedy součástí enzymů a jejich inhibitorů, buněčných stěn i membrán [45]. Jejich aminokyselinové složení je z pohledu výživové hodnoty příznivější než složení zásobních bílkovin. Frakci rozpustných albuminů a globulinů tvoří jednak cytoplasmatické proteiny, jednak aktivní enzymy, mezi něž patří  $\alpha$ - a  $\beta$ -amylasy, proteasy, lipasy, fytasy, lipoxygenasy aj. [46].

### **2.4.2 Lepek**

Zásobní proteiny pšenice vytváří viskoelastickou hmotu zvanou lepek. Jedná se o směs proteinů, které nazýváme gliadiny a gluteniny [45]. Lepek jako takový, lze definovat jako viskoelastickou hmotu, složenou ze dvou třetin z vody a z jedné třetiny z hydratovaných

proteinů gliadinů a gluteninů, které jsou ve vodě nerozpustné, a nacházejí se nejen v pšenici, ale i v ječmeni nebo v žitě [44]. Nacházejí se v endospermu společně se škrobem a při klíčení slouží jako zásoba aminokyselin. Jelikož jsou nerozpustné ve vodě, nedochází k jejich vylouhování vlhkostí, která spouští klíčení [41].

Roztažnost a viskozita lepku je dána gliadinovou frakcí, zatímco gluteninová frakce přispívá k elasticitě a pevnosti [42]. Nedostatečně elastický lepek vede k nižšímu objemu pečárenských výrobků, a naopak zvýšená elasticita lepku zabraňuje expanzi plynových bublinek v pečivu, což vede opět k nižšímu objemu [47]. Pro tvorbu správné struktury lepku je tedy nutno dosáhnout vhodného poměru gliadinů a gluteninů [41].

### 2.4.3 Gliadiny

Gliadiny se nacházejí převážně v aleuronové vrstvě zrna, a jejich zásobní funkce je zajištěna hlavně díky vysokému obsahu prolinu a glutaminu [44]. Právě gliadinová frakce bílkovin je zodpovědná za imunitní odezvu, která se projevuje asi u 0,5 % evropské populace. Jedná se o geneticky podmíněné onemocnění – celiakii [44]. Jedním z nebezpečných projevů celiakie je histologická změna sliznice střeva, která může dojít až do fáze úplné atrofie, a hlavně souvisí s řadou dalších zdravotních potíží [48]. Jedinou léčbou je zatím “bezlepková dieta“ [44].

Mezi gliadiny patří monomerní bílkoviny s intramolekulárními disulfidickými vazbami [47]. Obecně gliadiny obsahují velké množství glutaminu (36–45 %) a prolinu (14–30 %), naopak v malém množství obsahují tryptofan, asparagovou a glutamovou kyselinu a bazické aminokyseliny. Všechny vyjmenované aminokyseliny jsou polární látky, a jejich absence v gliadinech tedy způsobuje mizivou rozpustnost ve vodě [44]. Molekulová hmotnost gliadinů je v rozmezí 30–75 kDa [41]. Podle strukturních a funkčních vlastností byly rozděleny na S-Poor (s nízkým obsahem síry), S-Rich (s vysokým obsahem síry) a HMW prolaminu, které jsou velmi podobné HMW gluteninům [44].

Gliadiny mohou být také rozděleny do skupin podle elektroforetických mobilit v polyakrylamidovém gelu na  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - a  $\omega$ -gliadiny [41]. Frakce  $\omega$ -gliadinů byla dále rozdělena na  $\omega$ -5 a  $\omega$ -1,2 gliadiny [47]. Frakce  $\alpha$ - a  $\beta$ -gliadinů obsahuje šest molekul cysteinu, které tvoří tři intramolekulární disulfidové můstky. Frakce  $\gamma$ -gliadinů obsahuje osm molekul cysteinu a  $\omega$ -gliadiny neobsahují cystein vůbec. Převážná část  $\omega$ -gliadinů je tvořena prolinem, glutamovou kyselinou a fenylalaninem [44]. Zastoupení jednotlivých frakcí gliadinů je variabilní v různých odrůdách pšenice, záleží ale samozřejmě i na podmínkách růstu. Obecně lze ale říci, že  $\alpha$ -gliadinů je vždy nejvíce [49].

### 2.4.4 Gluteniny

Gluteniny tvoří asi 10 % z lepkových proteinů. Jsou složené z polypeptidových řetězců, které obsahují nejen intramolekulární, ale i intermolekulární disulfidické vazby a patří mezi největší přírodní proteiny. Gluteniny podporují hlavně pevnost těsta a mají velký vliv na výsledný objem pečárenských výrobků [42]. Mají vysoký obsah aminokyselin prolinu, glutaminu i glycinu [44].

Gluteniny jsou děleny do skupin podle počtu cysteinových zbytků, které se nacházejí vždy na konci gluteninových podjednotek [46]. Pokud se cysteinové zbytky nacházejí na konci s karboxylovou skupinou (v C-koncové části řetězce), pak se jedná o x-typ (s molekulovou hmotností ~ 83–88 kDa). Pokud jsou cysteinové zbytky na konci s aminoskupinou (v N-koncové části), jde o y-typy (s molekulovou hmotností ~ 67–74 kDa) [47].

Pomocí SDS-PAGE je také možné rozdělit gluteniny na LMW a HMW podjednotky [41], které v nativní formě mohou obsahovat i podjednotky S-Rich gliadinů [44]. LMW gluteniny se syntetizují v raném stadiu vývoje zrna, zatímco HMW gluteniny jsou akumulovány převážně v pozdějším stadiu [50]. Proto budou mít globální změny klimatu větší vliv na frakci HMW gluteninů, a to pravděpodobně ovlivněním rychlosti zásobování dusíku pro syntézu těchto proteinů.

Pokles obsahu gluteninových proteinů má ale velký vliv na kvalitu mouky, a tedy i na kvalitu pekárenských výrobků. Například mouka s nižším obsahem HMW gluteninů není vhodná na pečení chleba, spíše se hodí pro výrobu těstovin [33]. Genovými úpravami se dnes mění počet a charakter gluteninových proteinů, za účelem modifikace zpracovatelských vlastností pšenice [46].

## **2.4.5 Pšeničné proteiny a kvalita těsta**

### **2.4.5.1 Tvorba těsta**

Pšeničné gliadiny a gluteniny v přítomnosti vody bobtnají pouze omezeně, ale dodáním mechanické energie vytvoří pevný gel, který nazýváme lepek. Ten tvoří kostru těsta [46]. Při jeho vývoji, při tvorbě specifické 3D struktury, jsou velmi důležité vazby tvořící se mezi bílkovinami. Jedná se hlavně o vodíkové můstky, které jsou sice slabší než vazby kovalentní, nicméně jejich velké množství ve výsledku přispívá velmi významně k tvorbě žádané 3D struktury. Iontové vazby vznikají mezi kyselými a bazickými skupinami aminokyselin, mohou je tedy tvořit například kyselina asparagová a glutamová, lysin, histidin, arginin nebo tryptofan [46]. Dalšími jsou vazby hydrofobní, ty vznikají interakcí nepolárních skupin aminokyselin a mají mnohem menší výsledný efekt. Mohou je tvořit například valin, leucin, isoleucin, fenylalanin apod. [41]. Ve vodném prostředí se mohou tvořit i vazby hydrofilní [46]. Nejpevnější disulfidické můstky spojují navzájem monomerní bílkovinné řetězce za vzniku polymerních [41].

### **2.4.5.2 Vliv proteinů na kvalitu těsta**

Kvalita pšenice se posuzuje podle toho, jak vhodná je pro vytvoření požadovaného konečného produktu – tím může být jakýkoliv druh pečiva, cereální výrobky, sušenky, dezerty, dokonce i v masných výrobcích se dnes setkáváme s přidáváním mouky. Proto je velmi těžké, přesně definovat pojem „kvalita pšenice“. Vždy bude záležet hlavně na požadavcích na konečný produkt. Například pšenice s vysokou hodnotou objemové hmotnosti je nežádoucí pro výrobu těstovin a nudlí, naopak pro pekárenský průmysl je tou nejkvalitnější pšenicí [41].

Při posuzování kvalitativních vlastností mouky je nejdůležitější obsah a složení proteinů, které jsou odpovědné za unikátní viskoelastické vlastnosti těsta [33]. Jedná se o ty proteiny,

keré zůstávají ve hmotě těsta, po jeho důkladném promytí vodou, tedy gliadiny a gluteniny. Wrigley [41] tvrdí, že vzorky pšenice s podobným celkovým obsahem proteinů, při zachování poměru gluteninů a gliadinů, mohou při změnách poměru samotných HMW a LMW gluteninů vykazovat velké změny v pevnosti těsta a jeho extensibilitě. Například pevnost těsta klesla a extensibilita vzrostla za podmínek snížení poměru HMW a LMW gluteninů. V případě zvýšení poměru HMW ku LMW gluteninům naopak došlo ke zvýšení pevnosti těsta, a tím také ke zvýšení objemové hmotnosti. N. Fernando a kol. [33] zkoumali změny vlastností těsta po vystavení pšenice vlivu zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> a došli k závěru, že k žádným rozdílům ve stabilitě těsta a jeho roztažnosti nedošlo, nicméně jeho pevnost byla nižší a klesla také objemová hmotnost. Zároveň v analyzovaných vzorcích objevili nižší celkový obsah proteinů, převážně HMW gluteninů. LMW gluteniny nevykazovaly změny v obsahu. To je pravděpodobně způsobeno tím, že jejich syntéza probíhá převážně v první polovině růstu zrna, a v této době nemá zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub> vliv na metabolické pochody rostliny [50].

Kromě obsahu proteinů v mouce, je asi nejdůležitější charakteristikou lepku distribuce velikosti (molekulové hmotnosti) proteinů lepku, která určuje dobu míchání těsta. Je důležité znát nejen poměr obsahu monomerních a polymerních proteinů, ale hlavně distribuci velikosti proteinů samotných polymerních molekul. Gluteninové polymery jsou tvořeny z gluteninů pomocí disulfidických vazeb. Působením redukčních činidel se tyto vazby štěpí, a těsto ztrácí pevnost. Naopak působením oxidačních činidel vzniká v těstě více intermolekulárních disulfidických vazeb. Jediné redukční činidlo, jehož účinek lze snadno zvrátit jiným oxidačním činidlem je dithiotreitol. Nejlepším oxidačním činidlem se zdá být bromičnan. Změny, způsobené těmito činidly nezasahují do struktury gliadinů, které obsahují pouze intramolekulární disulfidické vazby [41].

## **2.5 Metody stanovení lepkových proteinů**

### **2.5.1 Extrakce**

Při zkoumání struktury a funkce pšeničných proteinů je prvním krokem extrakce vhodnými rozpouštědly a následně může dojít k separaci získané skupiny proteinů [41]. Ze vzorku se nejprve vodnými roztoky solí odstraňují albuminy a globuliny, následně se alkoholickými roztoky o koncentraci 40–70 % odstraňují gliadiny, a zůstávají dvě frakce gluteninů – jedna „rozpustná“ a druhá „nerozpustná“. Nejčastěji se pro tuto fázi používá 50% isopropanol, nicméně zbylé frakce gluteninů jsou vždy kontaminovány malým množstvím gliadinů. „Nerozpustná“ frakce gluteninů se nerozpouští ve zředěné kyselině octové a musí být ještě zredukována dithiotreitem (DTT), aby bylo možné gluteniny analyzovat [41]. Extrakce proteinů lepku je tedy usnadněna redukcí disulfidických vazeb. Nejdelší gluteninové polymerní řetězce ale zůstávají v nerozpustném zbytku, a jejich vazby je nutno ještě rozštěpit pomocí SDS, který štěpí všechny hydrofilní i hydrofobní vazby, čímž v podstatě ruší většinu nekovalentních interakcí v molekulách [51].

Singh a kol. [52] popisuje rozpuštění nezredukovaných proteinů pouze působením ultrazvuku a SDS. Kompletní extrakce je tak dosaženo bez použití velkého množství chemických redukčních činidel, a navíc je tento proces selektivní – pokud je správně řízen,

jsou degradovány pouze největší polymerní molekuly gluteninů. Produkty degradace jsou přitom stále tak velké, že neovlivní separaci na gluteniny, gliadiny a albuminy a globuliny [52].

### 2.5.2 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Separace zásobních proteinů pšenice se pomocí elektroforetických technik provádí buď na základě rozdílů v molekulových hmotnostech, nebo rozdílů v jejich pohyblivosti v elektrickém poli [44]. Gliadiny mohou být separovány pomocí kyselé elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (A-PAGE), pro analýzu gluteninů se využívá metody SDS-PAGE. Pro gliadiny není metoda SDS-PAGE vhodná převážně z toho důvodu, že sdílí některé oblasti mobility s jistými frakcemi gluteninů [41]. Celá řada studií dokazuje, že přechody rozpustnosti mezi jednotlivými frakcemi nejsou ostré, prolínají se a jsou závislé na extrakčním činidle, jeho teplotě, nebo době extrakce. Velmi často je prokázán přechod frakce HMW gluteninů do spektra gliadinů, ale i překrývání LMW gluteninů s  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -gliadiny v prostředí SDS-PAGE [43]. Elektroforetickým technikám tudíž musí vždy předcházet důsledná extrakce [52].

*A-PAGE:* Elektroforéza v kyselém prostředí rozděluje proteiny v závislosti na náboji i na velikosti. Nepoužívá se tedy detergent SDS [53]. A-PAGE se používá hlavně pro charakterizaci jednotlivých frakcí gliadinů různých odrůd pšenice [44]. Gluteniny je také možné rozdělit pomocí A-PAGE, ale je nutné přidat močovinu pro zlepšení rozpustnosti, díky které se pak docílí dobrého rozlišení [54].

*SDS-PAGE:* Účinkem SDS, který s bílkoviny tvoří komplex, má každá bílkovina stejný náboj. K separaci pak dochází pouze na základě molekulové hmotnosti, menší molekuly pronikají póry v gelu snadněji než větší, které musí překonávat větší odpor [44].

*2-D elektroforéza:* 2-D elektroforéza je vhodná pro rozdělení jednotlivých proteinů [44], poskytuje vysoké rozlišení [53]. Nevýhodou je, že proteiny s moc velkou nebo moc nízkou molekulovou hmotností, nebo proteiny s moc vysokým izoelektrickým bodem se nemusí ve 2-D gelu rozdělit [33].

Mezi další využívané elektroforetické metody patří izoelektrická fokusace, kde je ale nutný přídavek silného rozpouštědla, např.: močoviny. Nevýhodami poměrně levných elektroforetických technik je problematická kvantifikace izolovaných proteinových frakcí a práce s nebezpečným akrylamidem [53].

### 2.5.3 Vysokoučinná kapilární elektroforéza

Při kapilární elektroforéze se látky separují podle rozdílů v pohyblivosti v elektrickém poli. Separace probíhá v kapiláře o velmi malém průměru, naplněné elektrolytem. Kapilární zónová elektroforéza je svou účinností srovnatelná s A-PAGE [53]. Může být využita k charakterizaci gluteninových podjednotek, ke stejnému účelu slouží i kapalinová chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC). Obě techniky dosahují vysokého rozlišení a mohou být použity k získání kvantitativních výsledků. Velkou výhodou je, že lze obě techniky automatizovat [42].

#### **2.5.4 Chromatografické metody – HPLC**

Chromatografické metody jsou vhodné spíše k přípravě jednotlivých podskupin bílkovin (např.: prolaminů), nebo jen k jejich přečištění. Jsou vyvinuty metody, jako je gelově permeační HPLC, nebo molekulové vylučovací (size exclusion HPLC, SE-HPLC), HPLC na reverzní fázi (RP-HPLC) a HPLC na iontoměničích [44].

#### **2.5.5 Hmotnostní spektrometrie**

Při hmotnostní spektrometrii se bílkoviny ionizují laserem ve vhodné nízkomolekulární matrici, která zabraňuje rozpadnutí makromolekul. Vzniklé ionty jsou následně urychleny silným stejnosměrným elektrickým polem. Měří se doba letu iontů k detektoru v trubici bez elektrického pole. Doba letu je úměrná poměru hmotnosti a náboje iontů, a z hmotnostního spektra se pak identifikuje analyt. U peptidů a proteinů jsou především žádoucí informace týkající se aminokyselinové sekvence molekul, takže velmi často hmotnostní spektrometrii předchází ještě třeba HPLC. Metoda ovšem slouží jen k určení známých peptidů. Nevýhodou je vysoká přístrojová a finanční náročnost a využívá se hlavně jako kontrolní srovnávací metoda pro odhalení falešně pozitivních výsledků imunochemických metod [44].

#### **2.5.6 NIR spektrometrie**

Stanovení jakostních parametrů pšenice nebo mouky přístrojem NIR se řadí k rychlým metodám. Principem metody je analýza světla o vlnových délkách blízkých infračervené oblasti (1400–1600 nm) odraženého od vzorku nebo vzorkem propuštěného. Během jedné minuty lze stanovit obsah mnoha složek ve vzorku – např. vlhkost, obsah popela, bílkovin, mokrého lepku, vaznost mouky, obsah vlákniny, škrobu aj. Přesnost metody závisí na přesnosti metody použité ke kalibraci [55].

#### **2.5.7 Imunochemické metody – ELISA testy**

Z imunochemických metod pro stanovení lepku v potravinách je dnes nejpoužívanější enzymová imunoanalýza na pevné fázi (ELISA) v tzv. sendvičovém uspořádání. Analytem bývá často vzorek získaný po separaci jednou z elektroforetických technik [53]. Metoda je založená na interakci specifické protilátky s antigenem a jako pevný nosič se nejčastěji používají stěny jamek mikrotitračních destiček. Jako antigen se používá gliadin, který se ukotví pevně do destiček [44]. Ve stejný čas se do jamek pipetují standardy gliadinů nebo roztoky vzorků, a k nim označené protilátky. U nepřímé kompetitivní enzymové imunoanalýzy antigen vázaný na pevný nosič soutěží s antigenem ve vzorku o omezený počet vazebných míst protilátky. Čím více antigenu obsahuje vzorek, tím méně protilátky se naváže na zakotvený antigen. Když se ustaví rovnováha a systém se promyje, množství navázané protilátky se zjišťuje pomocí přídatku chromogenu (dojde ke změně barvy). Nakonec se přidá stop roztok (další změna barvy), a vzorky se mohou proměřit spektrofotometricky. Absorbance je pak nepřímo úměrná koncentraci gliadinových proteinů ve vzorku [56]. Výhodou je univerzální použití označené protilátky [44].

Díky své citlivosti, levnému provedení, poměrně rychlému zisku výsledků a specifitě se v poslední době dostávají ELISA testy do popředí zájmu potravinářských chemiků. Právě selektivita tohoto testu jej dělá velice významným, jelikož roste počet celiaků, a roste tak

i potřeba spolehlivě analyzovat lepkové bílkoviny v cereáliích. Nevýhodou může být, že testy ELISA jsou vhodné jen pro analýzu většího souboru vzorků. Ještě vyšší citlivost vykazuje metoda PCR (polymerázová řetězová reakce), lze ji tedy využít při analýze bezlepkových potravin. Velkou nevýhodou PCR je ale nutnost přítomnosti pomnožitelné deoxyribonukleové kyseliny ve vzorku [44].

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Materiál

Experiment byl proveden v Experimentální stanici Centra výzkumu globální změny AV ČR v Domaníku u Bystřice nad Pernštejnem. Stanice se nachází v nadmořské výšce 575 m, v oblasti Českomoravské vrchoviny. Průměrný roční úhrn srážek je zde 610 mm a průměrná roční teplota 7,2 °C. Půdním typem je zde modální kambisol, geologickým podložím zvětralá rula v hloubce 60–90 cm a půdním druhem hlinitopísčité půda se zastoupením písčité frakce 45–60 %, s obsahem jílnatých částic pohybujícím se do 16 %. Kyselost půdy je v této lokalitě v rozmezí  $\text{pH}_{\text{KCl}}$  4–5.

Stanici tvoří 24 komor umožňujících sledování několika parametrů najednou. Je zde zajištěna automatická fumigace zvýšenou koncentrací  $\text{CO}_2$ , dále regulace srážek a také omezená propustnost pro UV záření. Komory mají tvar šestiúhelníku, jehož opsaná kružnice má průměr 4 m, a výška komor je 2 m. Jejich strop tvoří otočné lamely, které regulují množství srážek. Jako materiál byly použity dva typy transparentních akrylátů, přičemž jeden typ je propustný pro UV-A i UV-B záření ( $\text{UV}^+$ ) a druhý propouští částečně jen UV-A záření ( $\text{UV}^-$ ). Vzduch se zvýšenou (EC) nebo normální (AC) koncentrací  $\text{CO}_2$  je do komor vháněn pomocí ventilačního systému.



*Obr. 1 Kultivační komory na Experimentální stanici CVGZ AV ČR v Domaníku u Bystřice nad Pernštejnem (Obrázek laskavě poskytl Ing. Karel Klem, Ph. D.)*

Ozimá pšenice odrůdy Bohemia byla vyseta v hustotě 4 MKS na ha (miliony klíčivých semen). Fumigace zvýšenou koncentrací  $\text{CO}_2$  ( $700 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) byla zahájena v růstové fázi poloviny sloupkování (v polovině května). Plocha uvnitř komor byla rozdělena na dvě části,



z nichž jedna byla hnojena dávkou dusíku  $200 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  ( $\text{N}^+$ ) na konci odnožování. Jako hnojivo byl použit vápenatý ledek. Druhá část zůstala zcela bez hnojení ( $\text{N}^-$ ). Každá kombinace zkoumaných faktorů byla založena ve třech opakováních. Sklizeň zralého zrna byla provedena ručně s následným výmlatem pomocí sklízecí mlátičky (Wintersteiger).

## **3.2 Stanovení obsahu lepkových proteinů metodou SDS-PAGE**

### **3.2.1 Přístroje**

Analytické váhy HR-120-EC firmy HELAGO® CZ Hradec Králové –kapacita 120 g, nejmenší dílek 0,1 mg, atest ČMI

Centrifuga MLW T52.1

Vortex – stuart, firma MERCI s.r.o.

Termoblok TDB-100 firmy BIOSAN (Riga, Lotyšsko)

Aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN 3 firmy BIO-RAD (USA)

Zdroj – Power Pac 300 firmy BIO-RAD (USA)

Třepačka LT2

### **3.2.2 Chemikálie**

Akrylamid (SERVA)

Brilantní modř G-250 – Coomasie (SERVA)

Bromfenolová modř modř Na sůl (SERVA)

Buthanol (Lachema)

DTT – dithiotreitol (SIGMA-ALDRICH)

Ethanol (Lachema)

Glycerol (SIGMA-ALDRICH)

Glycin (SERVA)

Kyselina chlorovodíková (Penta)

Kyselina octová (Lachema)

Isopropanol (Lachema)

2-merkptoethanol (SIGMA-ALDRICH)

Methanol CHROMASOLV® (Seidel-de-Haën)

N,N'-methylenbisakrylamid(SERVA)

Peroxodisíran amonný (SERVA)

SDS – dodecylsulfát sodný (SIGMA-ALDRICH)

TEMED – N,N,N',N'-tetraethylendiamin (SERVA)

TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan (SIGMA-ALDRICH)

### **3.2.3 Příprava roztoků**

#### **3.2.3.1 Roztoky pro přípravu gelů**

*Roztok A:* Ve 100 ml destilované vody bylo rozpuštěno 0,8 g N,N'-methylenbisakrylamidu a 29,2 g akrylamidu. Roztok se uchovává při teplotě 4°C.

*Roztok B:* V 50 ml destilované vody bylo rozpuštěno 18,16 g TRIS, po rozpuštění bylo upraveno pH na hodnotu 8,8 pomocí koncentrované HCl, poté byl roztok doplněn vodou na 100 ml. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

*Roztok C:* V 50 ml destilované vody bylo rozpuštěno 18,16 g TRIS, po rozpuštění bylo upraveno pH na hodnotu 6,8 pomocí koncentrované HCl, poté byl roztok doplněn vodou na 100 ml. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

*Roztok D:* Ve 100 ml destilované vody bylo rozpuštěno 10 g SDS, roztok je nutno chránit před světlem, proto se uchovává v temnu.

*Roztok E:* V 1 ml destilované vody bylo rozpuštěno 0,1 g peroxidisíranu amonného. Roztok je nutno připravit pro každé stanovení čerstvý.

*Roztok F:* V 1 ml destilované vody bylo rozpuštěno 10 mg bromfenolové modři. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

### **3.2.3.2 Pomocné roztoky**

*Elektrodový pufr:* V 1000 ml destilované vody bylo rozpuštěno 6 g TRIS, 2 g SDS a 18,8 g glycinu. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C a používá se opakovaně.

*Extrakční roztok pro gluteniny:* Bylo smícháno 55 ml 100% isopropanolu a 55 ml vody. V 90 ml tohoto roztoku bylo rozpuštěno 0,6057 g TRIS a pomocí koncentrované HCl bylo upraveno pH na hodnotu 7,5. Poté byl přidán 1 g DTT a roztok byl doplněn ve 100ml odměrné baňce 50% roztokem isopropanolu po rysku. Roztok je nutno vždy připravit čerstvý.

*Vzorkový pufr:* Bylo smícháno 4,8 ml roztoku C, 4 ml roztoku D, 0,2 ml roztoku F, 6 ml glycerolu, 4,8 ml vody a 1 ml merkptoethanolu. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

### **3.2.3.3 Roztoky k vizualizaci bílkovin**

*Stabilizační roztok:* Bylo smícháno 100 ml methanolu a 400 ml vody. Roztok byl opakovaně používán a uchováván při laboratorní teplotě.

*Barvicí roztok:* Bylo smícháno 0,5 g Coomassie Blue G-250 a 250 ml methanolu. Potom bylo přidáno 50 ml ledové kyseliny octové a 200 ml destilované vody. Roztok byl opakovaně používán a uchováván při laboratorní teplotě.

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

### **3.2.4 Příprava polyakrylamidových gelů**

Čistá elektroforetická skla byla umístěna do stojanu. Spodní hrany skel ležely na gumové podložce a tlakem svrchu byla skla zajištěna proti vytečení gelu. Ke stanovení byly použity 10% separační gel a 5% zaostřovací gel.

#### **3.2.4.1 Separační gel**

Do kádinky byly pomocí automatických pipet odměřeny objemy roztoků podle tabulky 1. Roztok E a TEMED byly přidány těsně před nalitím roztoku mezi skla. Roztok byl nalit do výšky asi 2 cm od horního okraje. Zbýlý roztok byl ponechán v kádince pro kontrolu ztuhnutí gelu. Roztok mezi skly byl převrstven asi 5 mm vrstvou butanolu, aby došlo k vyrovnání

hladiny a jako ochrana proti vypařování vody. Po ztuhnutí separačního gelu byl butanol slit a gel několikrát promyt destilovanou vodou. Přebytek vody se odsál buničinou.

*Tabulka 1: Objemy roztoků k přípravě 10% separačního gelu (30 ml)*

<b>Roztok</b>	<b>Objem [ml]</b>
Destilovaná voda	11,9
A	10,0
B	7,5
D	0,3
E	0,3
TEMED	0,012

### **3.2.4.2 Zaostřovací gel**

Do kádinky byly pomocí automatických pipet odměřeny objemy roztoků podle tabulky 2.

*Tabulka 2: Objemy roztoků k přípravě 15% zaostřovacího gelu (8ml)*

<b>Roztok</b>	<b>Objem [ml]</b>
Destilovaná voda	6,3
A	3,0
C	1,14
D	0,09
E	0,09
TEMED	0,009

Po přidání roztoku E a TEMED byl zaostřovací gel rovnoměrně nalit na vrstvu ztuhlého separačního gelu až po okraj a do prostoru mezi skly byl ihned vložen elektroforetický hřebínek tak, aby se v gelu nevytvořily bublinky. Hřebínek byl odstraňován po zatuhnutí gelu, před nanášením vzorků (aby nedošlo k vyschnutí gelu). Hotový gel je možné uchovat maximálně jeden den v lednici.

### **3.2.5 Příprava vzorku**

#### **3.2.5.1 Extrakce gluteninů z pšeničné mouky**

Do mikrozku mávek bylo naváženo vždy 200 mg vzorku pšeničné mouky, poté byl pomocí automatické pipety přidán 1 ml 50% roztoku isopropanolu a suspenze byla míchána při 1000 rpm 30 minut při laboratorní teplotě. Následně byla suspenze odstředována 15 minut při 2500 g za laboratorní teploty a supernatant byl odstraněn pryč. Celý postup extrakce se ještě dvakrát zopakoval, čímž byly dostatečně odstraněny gliadiny ze vzorku. Následně byly extrahovány gluteniny – do mikrozku mávky byl přidán 1 ml extrakčního roztoku, roztoky

byly temperovány 30 minut při 60 °C, a každých 5–10 minut byly protřepány. Nakonec byly vzorky odstředovány 10 minut při 10 000 g za laboratorní teploty.

### **3.2.5.2 Příprava směsných vzorků**

Z každé mikrozkušavky, zastupující jeden určitý vzorek, bylo pipetováno 0,5 ml supernatantu do nové, čisté mikrozkušavky, Takto byla v jedné mikrozkušavce získána směs extraktů pšenice, která byla pěstována za stejných podmínek, čili směsný vzorek. Ze směsného vzorku bylo do další mikrozkušavky pipetováno 0,5 ml, k nimž bylo přidáno ještě 0,5 ml vzorkového pufru. Takto připravené vzorky byly uchovávány v mrazničce při -20 °C.

### **3.2.6 Elektroforéza**

Po odstranění elektroforetického hřebínku ze skel se ztuhlými gely, byla skla vytažena ze stojanu a upevněna do stojanu do elektroforetické nádoby. Vnitřní prostor nádoby byl zaplněn elektrolytickým roztokem po rysku. Pomocí automatické pipety s dlouhou špičkou bylo do první pozice nanášeno 5 µl směsného standardu (směs vzorků UV<sup>+</sup> WET AC N<sup>-</sup>) a do každé další jamky 5 µl směsného vzorku. Aparatura byla připojena ke zdroji, kde bylo nastaveno napětí 100 V, a elektroforéza byla ukončena ve chvíli, kdy právě prošlo čelo vzorku spodním okrajem gelu. Každý vzorek byl analyzován třikrát, některé pouze dvakrát, jelikož třetí vzorek nebyl k dispozici.

### **3.2.7 Fixace a vizualizace bílkovin**

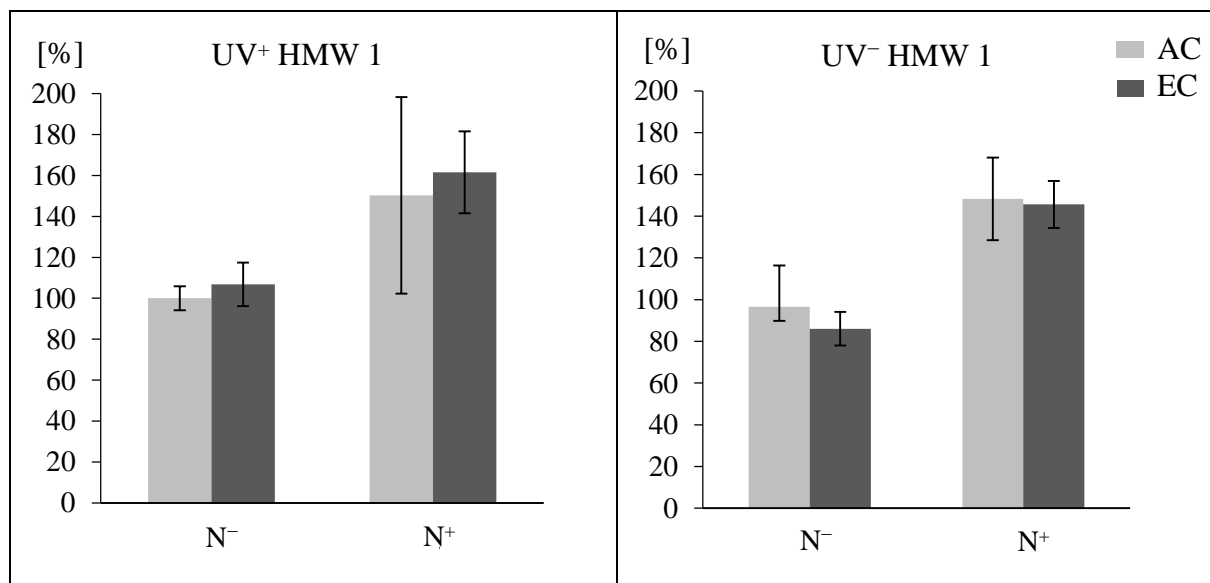
Po ukončení elektroforézy byl gel ponořen do destilované vody. Poté byla voda vylita a gel byl převrstven stabilizačním roztokem, ve kterém byl 5 minut protřepáván. Po slítí stabilizačního roztoku byl gel protřepáván 30 minut s barvicím roztokem. Nakonec byl gel promýván odbarvovacím roztokem po dobu 90 minut. Dále byl ještě promyt destilovanou vodou a pro ochranu proti vyschnutí byl gel zabalen potravinářskou folií na skle, a byl uchováván při teplotě 4 °C.

### **3.2.8 Vyhodnocení gelu**

Hotové gely byly naskenovány a kvantifikace gluteninových podjednotek byla provedena počítačovou denzitometrií (program FUJIFILM, Science Lab 2006, MultiGauge, verze 3.X.). Zóny jednotlivých podjednotek byly převedeny na píky a integrací byla vypočítána jejich plocha. Pro porovnání jednotlivých variant byl použit poměr mezi plochou píku vzorku a plochou píku standardu.

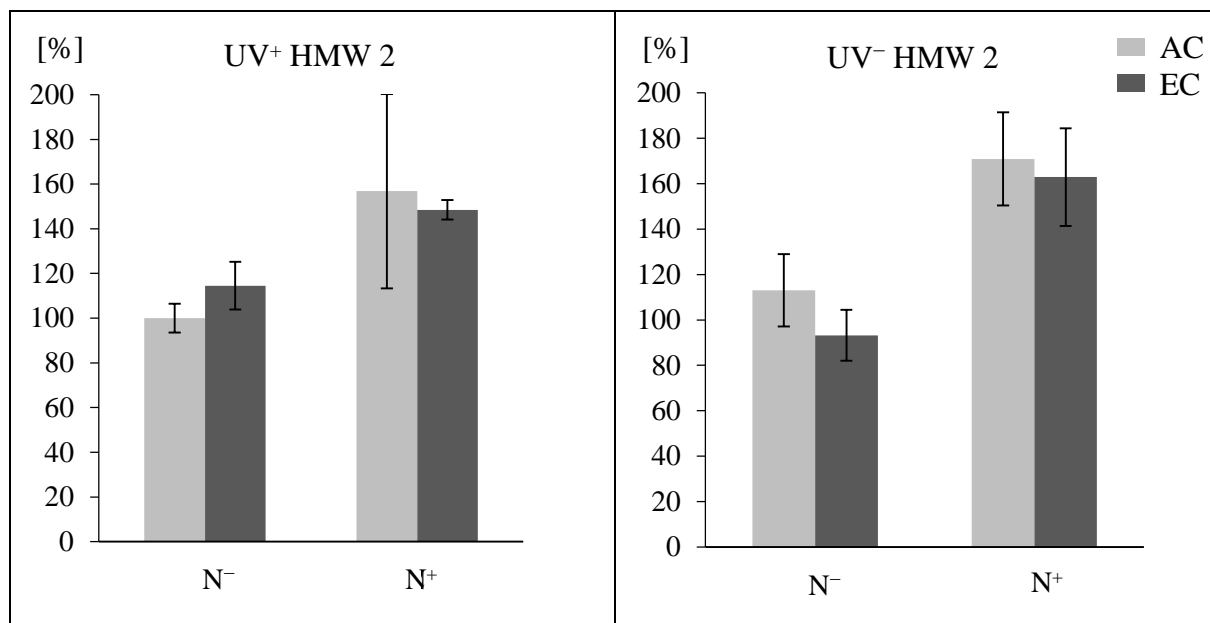
## 4. VÝSLEDKY

Ze vzorků pšeničné mouky byly extrahovány gluteninové proteiny. Jejich separace byla provedena metodou SDS-PAGE a zóny elektroforetických gelů byly převedeny na píky. Plochy píků pak byly porovnávány s plochou píku odpovídající standardu (varianta UV<sup>+</sup> WET AC N<sup>-</sup>) a následně byly převedeny na procenta. Ze tří hodnot byl vždy vypočten průměr a směrodatná odchylka. Výsledky jsou zobrazeny na obr. 2–6.



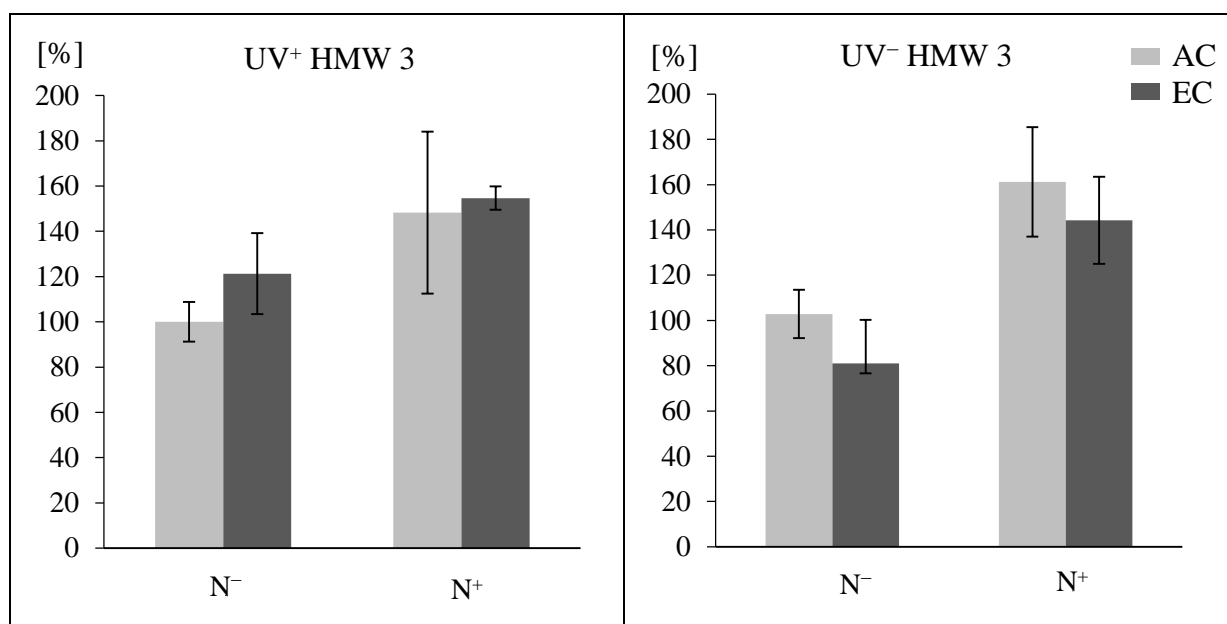
Obr. 2 Grafické porovnání procentuálního obsahu první frakce HMW gluteninů (vztaženo k průměrnému obsahu HMW 1 gluteninů ve standardu). Každý sloupec představuje aritmetický průměr pro daný typ vzorku a chybové úsečky udávají směrodatnou odchylku tří hodnot. Porovnány jsou varianty UV<sup>+</sup> (graf vlevo) a UV<sup>-</sup> (graf vpravo), dále pak varianty s normální koncentrací CO<sub>2</sub> (AC) a se zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub> (EC), varianty N<sup>-</sup> nebo N<sup>+</sup> zastupuje vždy dvojice sloupců.

Porovnání první frakce vysokomolekulárních gluteninových podjednotek nám poskytuje obr. 2. Všechny varianty pěstované při redukovaném UV záření vykazují nižší obsah této frakce, v porovnání s příslušnými vzorky, pěstovanými v podmínkách UV<sup>+</sup>. V rámci samotné varianty UV<sup>+</sup> je pozorován nárůst obsahu této frakce u všech tří variant (AC N<sup>+</sup>, EC N<sup>-</sup>, EC N<sup>+</sup>), v porovnání se čtvrtou, která je standardem (AC N<sup>-</sup>). Nejvyšší obsah těchto gluteninů má pšenice pěstovaná při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> a s dostatkem dusíkaté výživy (EC, N<sup>+</sup>), oproti standardu vzrostl obsah této frakce o 62 %.



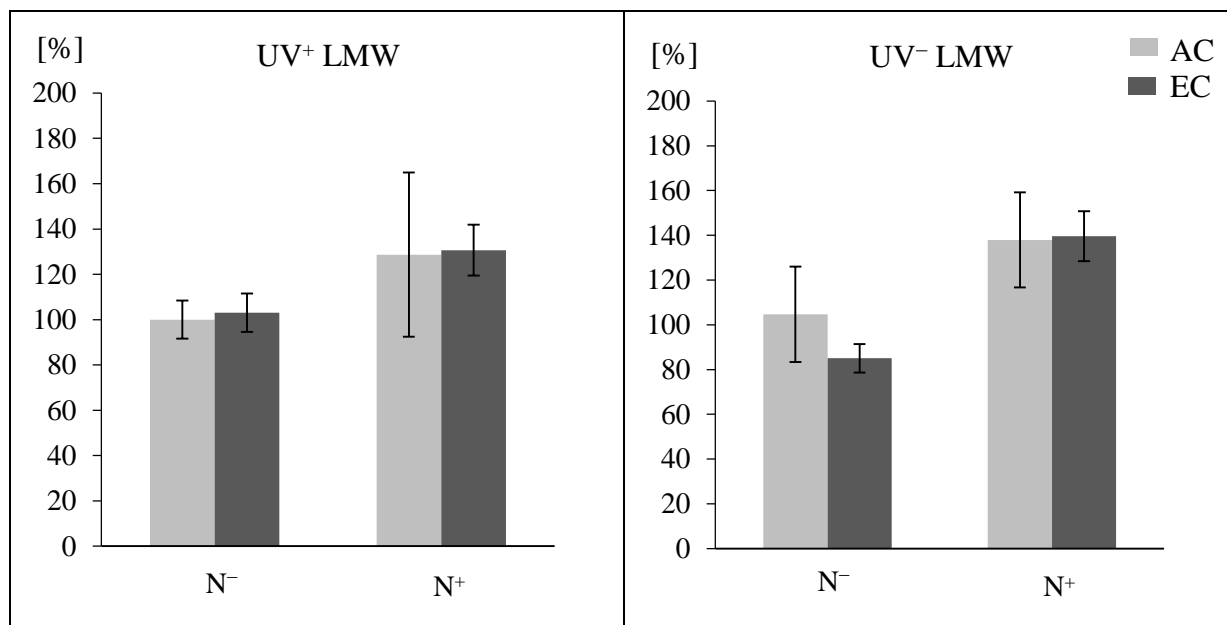
Obr. 3 Grafické porovnání procentuálního obsahu druhé frakce HMW gluteninů (vztaženo k průměrnému obsahu HMW 2 gluteninů ve standardu). Každý sloupec představuje aritmetický průměr pro daný typ vzorku a chybové úsečky udávají směrodatnou odchylku tří hodnot. Porovnány jsou varianty UV<sup>+</sup> (graf vlevo) a UV<sup>-</sup> (graf vpravo), dále pak varianty s normální koncentrací CO<sub>2</sub> (AC) a se zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub> (EC), varianty N<sup>-</sup> nebo N<sup>+</sup> zastupuje vždy dvojice sloupců.

Výsledky obsahů druhé frakce vysokomolekulárních gluteninových podjednotek poskytuje obr. 3, tato frakce byla opět mírně ovlivněna nedostatkem UV záření, ale došlo k opačnému efektu a kromě varianty EC N<sup>-</sup> vykazují všechny varianty UV<sup>-</sup> vyšší obsah této frakce, v porovnání s příslušnými vzorky UV<sup>+</sup>. Nejvyšší obsah HMW 2 gluteninů mají vždy varianty AC N<sup>+</sup>, nárůst oproti standardu je za normálního UV záření 57 % a při redukovaném záření dokonce 71 %.



Obr. 4 Grafické porovnání procentuálního obsahu třetí frakce HMW gluteninů (vztaženo k průměrnému obsahu HMW 3 gluteninů ve standardu). Každý sloupec představuje aritmetický průměr pro daný typ vzorku a chybové úsečky udávají směrodatnou odchylku tří hodnot. Porovnány jsou varianty UV<sup>+</sup> (graf vlevo) a UV<sup>-</sup> (graf vpravo), dále pak varianty s normální koncentrací CO<sub>2</sub> (AC) a se zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub> (EC), varianty N<sup>-</sup> nebo N<sup>+</sup> zastupuje vždy dvojice sloupců.

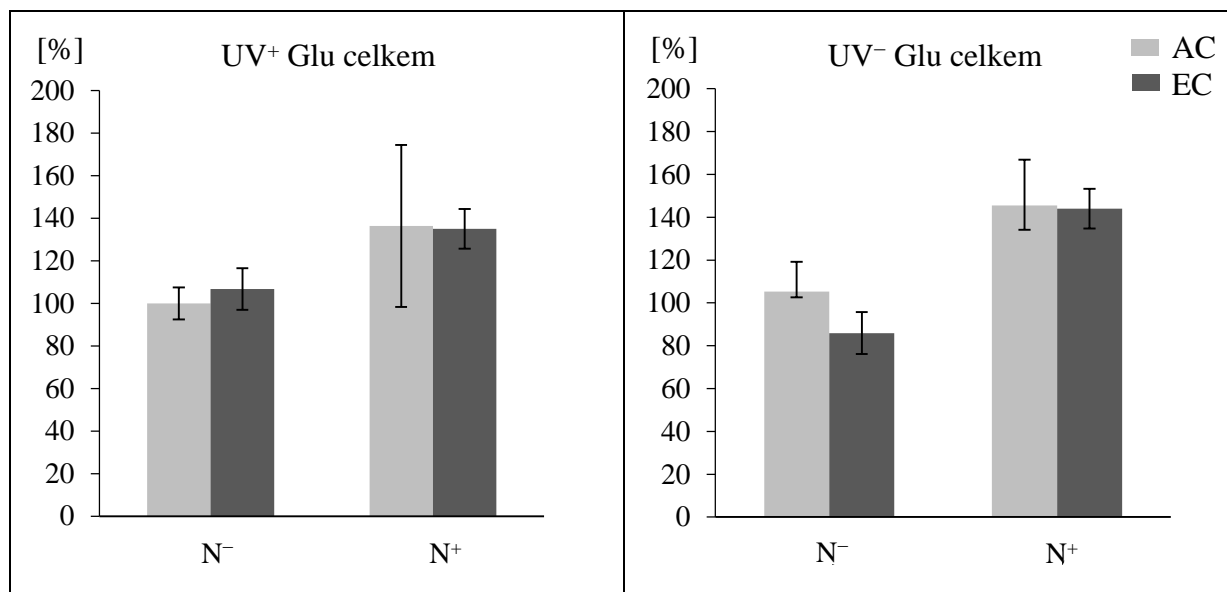
Procentuální obsah třetí frakce HMW gluteninů zachycuje obr. 4. Rozdíly mezi vzorky UV<sup>+</sup> a UV<sup>-</sup> nejsou výrazné, jediný významný pokles oproti standardu je pozorovatelný u varianty UV<sup>-</sup> EC N<sup>-</sup>, a to konkrétně na 81 %. Vzhledem ke směrodatným odchylkám nelze jednoznačně určit variantu, která vykazuje nejvyšší obsah gluteninů, ale jednoznačně nejvíce vzrostl obsah této frakce proteinů u variant N<sup>+</sup>.



Obr. 5 Grafické porovnání procentuálního obsahu LMW gluteninů (vztaženo k průměrnému obsahu LMW gluteninů ve standardu). Každý sloupec představuje aritmetický průměr pro daný typ vzorku a chybové úsečky udávají směrodatnou odchylku tří hodnot. Porovnány jsou varianty UV<sup>+</sup> (graf vlevo) a UV<sup>-</sup> (graf vpravo), dále pak varianty s normální koncentrací CO<sub>2</sub> (AC) a se zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub> (EC), varianty N<sup>-</sup> nebo N<sup>+</sup> zastupuje vždy dvojice sloupců.

Procentuální obsah LMW frakcí je zobrazen na obr. 5. Celkově byla tato frakce nejméně ovlivněna environmentálními faktory při pěstování. Varianty AC N<sup>-</sup> s ohledem na směrodatnou odchylku nevykazují žádnou odezvu, u varianty EC N<sup>-</sup> je výrazný pokles vlivem nedostatku záření. U variant s dostatečnou dusíkatou výživou je opět jasný nárůst obsahu LMW frakcí, při kultivaci s UV<sup>-</sup> je nárůst výraznější.





Obr. 6 Grafické porovnání procentuálního obsahu gluteninů (vztaženo k průměrnému obsahu gluteninů ve standardu). Každý sloupec představuje aritmetický průměr pro daný typ vzorku a chybové úsečky udávají směrodatnou odchylku tří hodnot. Porovnány jsou varianty UV<sup>+</sup> (graf vlevo) a UV<sup>-</sup> (graf vpravo), dále pak varianty s normální koncentrací CO<sub>2</sub> (AC) a se zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub> (EC), varianty N<sup>-</sup> nebo N<sup>+</sup> zastupuje vždy dvojice sloupců.

Celkový obsah gluteninových proteinů je zobrazen na obr. 6. Změny v celkovém obsahu jsou velmi podobné změnám LMW gluteninů. U AC N<sup>-</sup> variant nedochází v podstatě k žádné změně, naopak u EC N<sup>-</sup> varianty je opět znatelný pokles za podmínek UV<sup>-</sup>. Obsah proteinů všech vzorků N<sup>+</sup> je opět největší, s tím, že u varianty UV<sup>-</sup> je nárůst opět o něco málo výraznější.

## 5. DISKUSE

Gluteninové proteiny jsou společně s gliadiny hlavními ukazateli kvality pšeničného lepku, a svým obsahem mouku předurčují k jejímu konečnému využití [41], [46]. Vzhledem k tomu, jak moc frakce gluteninů ovlivňují pevnost a extensibilitu těsta, je velmi důležité zkoumat změny, které se v obsahu těchto proteinů odehrávají, při změnách různých environmentálních faktorů [33]. V této práci byly zkoumány změny způsobené vlivem interakce zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub>, dostupnosti půdního dusíku a UV záření. Rostliny byly současně vystaveny přirozené půdní vlhkosti. Změny v obsahu gluteninových proteinů pšeničného zrna byly zkoumány pomocí metody SDS-PAGE. Separace touto metodou poskytla dobré rozlišení, nicméně bylo problémové vyjádření obsahu píků LMW frakce gluteninů, ve které stále zůstávalo malé množství gliadinových proteinů. Stejný problém zaznamenali i Dvořáček [43] a Hulín a kol. [44].

Vliv dusíkaté výživy na obsah gluteninových proteinů pšeničného zrna byl jednoznačně prokázán. U všech variant kultivace se výrazně zvýšil obsah všech frakcí v porovnání se standardním vzorkem, který představovala pšenice pěstovaná bez hnojení dusíkem a za normální koncentrace CO<sub>2</sub> (aktuálně 400 μmol·mol<sup>-1</sup>). Taub a kol. [38] zkoumali interakci vlivu zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> a dusíkaté výživy, a uvádějí pokles obsahu celkových proteinů pšeničného zrna o 16,4 % při nedostatečné dusíkaté výživě, v opačném případě obsah proteinů klesl o 9,8 %. Tím také dokazují, že působení samotné zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> na pšenici způsobí významný pokles v obsahu proteinů. V této práci ale nebyl jednoznačně prokázán vliv CO<sub>2</sub> na snížení obsahu gluteninové frakce, respektive tento jev nebyl pozorován u pšenice kultivované s dostatkem UV záření. To vede k úvaze, že pokles v celkovém obsahu proteinů byl způsoben spíše změnami obsahu gliadinové frakce. Tuto domněnku můžeme najít ve studii Högyové a kol. [20]. V další studii Högyová a kol. [57] pak dokazují, že frakce albuminů, globulinů ani gluteninů se vlivem CO<sub>2</sub> významně nemění, nicméně velké rozdíly pozorovali v obsahu gliadinů. Další takový důkaz podává Wieser a kol. [36], existují ale i studie, kde je pozorován největší pokles právě v obsahu gluteninů, například v práci Fernanda a kol. [33].

U pšenice pěstované při redukovaném UV záření došlo k poklesu obsahu gluteninů, a je to jediný případ, kdy k poklesu došlo. Ve studii Högyové a kol. [57], autoři uvádějí jen velmi malý až nevýznamný pokles obsahu gluteninů s tím, že HMW podjednotky byly ovlivněny vyšší dostupností CO<sub>2</sub> více. Wieser a kol. [36] také pozorovali jen nepatrné snížení obsahu gluteninů, a zároveň potvrzují, že HMW podjednotky vykazují větší odezvu. Stejně tvrzení můžeme najít dokonce i ve studii Fernanda a kol. [33], kde také autoři uvádějí, že snížení obsahu gluteninů bylo mezi bílkovinnými frakcemi nejvýraznější. Zdůvodnění podávají Shewry a kol. [50], podle jejichž názoru se HMW gluteniny syntetizují v pozdějším stádiu vývoje rostliny, a tak jsou mnohem více ovlivněny vyšší koncentrací CO<sub>2</sub> než LMW gluteniny, jejichž syntéza probíhá hlavně při klíčení a při vývoji zrna. Takový vliv ale nebyl v této studii prokázán. Vzhledem k tomu, že uvedené studie nezkoumaly zároveň vliv dostupnosti záření, můžeme se jen domnívat, že jejich výsledky byly tímto faktorem

ovlivněny. Celkově měla dostupnost záření na obsah gluteninů jen mírný vliv, a vzhledem ke směrodatným odchylkám nelze udělat jednoznačný závěr.

V praxi mají změny v obsahu gluteninů silné dopady na kvalitu pekárenských výrobků [46]. Obzvlášť pak HMW frakce, jejíž snížený obsah v pšeničném zrně vede k nižší pevnosti těsta, nebo k nižší objemové hmotnosti [33]. Pokud by se změny v koncentraci gluteninů, způsobené vlivem stále se zvyšující koncentrace CO<sub>2</sub> projevovaly ve větší míře, je třeba na ně adekvátně reagovat. Nejlepším způsobem pro udržení kvality mlýnských a pekařských produktů se zdá být dusíkatá výživa [41]. Vzhledem k tomu, jak rozdílné jsou výsledky studií vlivu environmentálních faktorů na pšeničné proteiny, bylo by jistě přínosem, provést další studie, prováděné ve stejných časových intervalech, za použití stejných metod pro stanovení frakcí bílkovin. Také by bylo nutné sjednotit dávkování dusíkaté výživy a výši koncentrace CO<sub>2</sub> v atmosféře, obklopující pěstované rostliny. Prozatím se zdá, že zvyšování dávek dusíkaté výživy je nejlepším řešením, pro udržení pekařské kvality pšenice [20].

## 6. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo sledovat vliv dusíkatého hnojení, zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> a UV záření na obsah proteinů gluteninové frakce v zrnech ozimé pšenice (*Triticum aestivum* var. *Bohemia*). Proteiny gluteninové frakce byly ze vzorků pšeničné mouky extrahovány isopropanolem za přítomnosti DTT a následně separovány metodou SDS-PAGE. Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno počítačovou denzitometrií. Obsah gluteninů jednotlivých variant vzorků byl vztažen na obsah gluteninů ve standardu, kterým byl vzorek pšenice, pěstované za normální koncentrace oxidu uhličitého, bez dusíkatého hnojení a s přirozeným UV zářením.

Dostatek dusíkaté výživy významně zvýšil obsah proteinů gluteninové frakce ve všech vzorcích. Vliv samotného oxidu uhličitého na obsah proteinů nebyl s ohledem na směrodatnou odchylku pozorován, výjimkou byly vzorky pšenice kultivované při odstíněném UV-B záření, u nichž vyšší koncentrace CO<sub>2</sub> a nedostatek dusíkatého hnojení vedly ke snížení obsahu proteinů. Samotný vliv UV záření nebyl ve větší míře pozorován.

Na základě výsledků této práce lze říci, že právě dusíkaté hnojení je klíčovým faktorem, který ovlivňuje obsah gluteninových proteinů.

## 7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] FARMER, G. a J. COOK *Climate change science. A modern synthesis*. 1. vyd. Dordrecht: Springer, 2013. ISBN 978-940-0757-578.
- [2] NÁTR, L. *Koncentrace CO<sub>2</sub> a rostliny*. Vyd. 1. Praha: ISV, 2000, 257 s. Přírodní vědy (ISV). ISBN 80-858-6662-5.
- [3] ZALASIEWICZ, J. a M. WILLIAMS *Climate Change Through Earth's History. Climate Change*. Elsevier, 2016, , 3. DOI: 10.1016/B978-0-444-63524-2.00001-4. ISBN 9780444635242. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444635242000014>
- [4] TRIPATHI, A., D. TRIPATHI, D.K. CHAUHAN, N. KUMAR a G.S. SINGH *Paradigms of climate change impacts on some major food sources of the world: A review on current knowledge and future prospects. Agriculture, Ecosystems*. 2016, **216**, 356-373. DOI: 10.1016/j.agee.2015.09.034. ISSN 01678809. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167880915300992>
- [5] QIAN, B., R. DE JONG, T. HUFFMAN, H. WANG a J. YANG *Projecting yield changes of spring wheat under future climate scenarios on the Canadian Prairies. Theoretical and Applied Climatology*. 2016, **123**(3-4), 651-669. DOI: 10.1007/s00704-015-1378-1. ISSN 0177-798x. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00704-015-1378-1>
- [6] MAREK, M. *Uhlík v ekosystémech České republiky v měnícím se klimatu*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2011, 253 s. Živá příroda. ISBN 978-80-904351-1-7.
- [7] PRETEL, J. *Současná realita globální změny klimatu. PRO-ENERGY*. 2007, **3**, 44-49. ISSN 1802-4599.
- [8] HAMERLYNCK, E., T. HUXMAN, M. LOIK a S. SMITH *Effects of extreme high temperature, drought and elevated CO<sub>2</sub> on photosynthesis of the Mojave Desert evergreen shrub, Larrea tridentata. Plant Ecology*. b.r., **148**(2), 183-193. DOI: 10.1023/A:1009896111405. ISSN 13850237. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1009896111405>
- [9] GERRIE, J. B. Paul B. Thompson: *The Ethics of Intensification: Agricultural Development and Cultural Change. Journal of Agricultural and Environmental Ethics*. 2009, **22**(6), 611-614. DOI: 10.1007/s10806-009-9180-7. ISSN 1187-7863. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10806-009-9180-7>

- [10] KERSEBAUM, K.C. a C. NENDEL Site-specific impacts of climate change on wheat production across regions of Germany using different CO<sub>2</sub> response functions. *European Journal of Agronomy*. 2014, **52**, 22-32. DOI: 10.1016/j.eja.2013.04.005. ISSN 11610301. Dostupné také z: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10806-009-9180-7>
- [11] LOBELL, D. a M. BURKE Why are agricultural impacts of climate change so uncertain? The importance of temperature relative to precipitation. *Environmental Research Letters*. 2008, **3**(3), 034007-. DOI: 10.1088/1748-9326/3/3/034007. ISSN 1748-9326. Dostupné také z: <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1748-9326/3/3/034007/pdf>
- [12] LETCHER, T. Preface. *Climate Change*. Elsevier, 2016, . DOI: 10.1016/B978-0-444-63524-2.05001-6. ISBN 9780444635242. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444635242050016>
- [13] BURROUGHS, W. *Climate change: a multidisciplinary approach*. 1st pub. Cambridge: Cambridge University Press, 2001, xv, 298 s. ISBN 05-215-6771-8.
- [14] NÁTR, L. Rozvoj trvale neudržitelný. Vliv atmosférické koncentrace CO<sub>2</sub> na globální klima. *Kvasný průmysl*. 2006, **52**(6), 190-191. ISSN 0023-5830.
- [15] MONTZKA, S., E. DLUGOKENCKY a J. BUTLER Non-CO<sub>2</sub> greenhouse gases and climate change. *Nature*. 2011, **476**(7358), 43-50. DOI: 10.1038/nature10322. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature10322>
- [16] KUBÁSEK, J. Rostliny C4 1. Jak a proč vznikly a jak fungují. *Vesmír*. 2012, **91**(1), 35-40. ISSN 1214-4029.
- [17] LEAKEY, A., E. AINSWORTH, C. BERNACCHI, A. ROGERS, S. LONG a D. ORT Elevated CO<sub>2</sub> effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: six important lessons from FACE. *Journal of Experimental Botany*. 2009, **60**(10), 2859-2876. DOI: 10.1093/jxb/erp096. ISSN 0022-0957. Dostupné také z: <http://jxb.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/jxb/erp096>
- [18] XU, M. The optimal atmospheric CO<sub>2</sub> concentration for the growth of winter wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Plant Physiology*. 2015, **184**, 89-97. DOI: 10.1016/j.jplph.2015.07.003. ISSN 01761617. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0176161715001674>
- [19] WANG, L., Z. FENG a J. SCHJOERRING Effects of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> on physiology and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.): A meta-analytic test of current hypotheses. *Agriculture, Ecosystems*. 2013, **178**, 57-63. DOI: 10.1016/j.agee.2013.06.013. ISSN 01678809. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167880913002181>

- [20] HÖGY, P., H. WIESER, K. SCHWADORF, J. BREUER, M. ERBS, S. WEBER a A. FANGMEIER Does elevated atmospheric CO<sub>2</sub> allow for sufficient wheat grain quality in the future?. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 2008, **82**(2), 114-121. ISSN 1439-040X.
- [21] POORTER, H. Interspecific variation in the growth response of plants to an elevated ambient CO<sub>2</sub> concentration. *Vegetatio*. 1993, **104-105**(1), 77-97. DOI: 10.1007/BF00048146. ISSN 0042-3106. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00048146>
- [22] DAHAL, K., V. KNOWLES, W. PLAXTON a N. HÜNER Enhancement of photosynthetic performance, water use efficiency and grain yield during long-term growth under elevated CO<sub>2</sub> in wheat and rye is growth temperature and cultivar dependent. *Environmental and Experimental Botany*. 2014, **106**, 207-220. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2013.11.015. ISSN 00988472. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098847213002074>
- [23] SHIMAZAKI, K.-I., M. DOI, S. ASSMANN a T. KINOSHITA Light Regulation of Stomatal Movement. *Annual Review of Plant Biology*. 2007, **58**(1), 219-247. DOI: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105434. ISSN 1543-5008. Dostupné také z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105434>
- [24] ROGERS, A. a S. HUMPHRIES A mechanistic evaluation of photosynthetic acclimation at elevated CO<sub>2</sub>. *Global Change Biology*. 2000, **6**(8), 1005-1011. DOI: 10.1046/j.1365-2486.2000.00375.x. ISSN 1354-1013. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2486.2000.00375.x>
- [25] MOORE, B., S.-H. CHENG, D. SIMS a J. SEEMANN The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO<sub>2</sub>. *Plant, Cell and Environment*. 1999, **22**(6), 567-582. DOI: 10.1046/j.1365-3040.1999.00432.x. ISSN 0140-7791. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-3040.1999.00432.x>
- [26] NAKANO, H., A. MAKINO a T. MAE The Effect of Elevated Partial Pressures of CO<sub>2</sub> on the Relationship between Photosynthetic Capacity and N Content in Rice Leaves. *Plant Physiology* [online]. 1997, **115**(1), 191-198 [cit. 2016-05-15]. DOI: 10.1104/pp.115.1.191.
- [27] LONG, S., E. AINSWORTH, A. ROGERS a D. ORT RISING ATMOSPHERIC CARBON DIOXIDE: Plants FACE the Future\*. *Annual Review of Plant Biology*. 2004, **55**(1), 591-628. DOI: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141610. ISSN 1543-5008. Dostupné také z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141610>

- [28] MEDLYN, B. The Optimal Allocation of Nitrogen Within the C<sub>3</sub> Photosynthetic System at Elevated CO<sub>2</sub>. *Australian Journal of Plant Physiology*. 1996, **23**(5), 593-603. DOI: 10.1071/PP9960593. ISSN 0310-7841. Dostupné také z: <http://www.publish.csiro.au/?paper=PP9960593>
- [29] ROGERS, G., P. MILHAM, M. GILLINGS a J. CONROY Sink Strength May Be the Key to Growth and Nitrogen Responses in N-Deficient Wheat at Elevated CO<sub>2</sub>. *Australian Journal of Plant Physiology*. 1996, **23**(3), 253-264. DOI: 10.1071/PP9960253. ISSN 0310-7841. Dostupné také z: <http://www.publish.csiro.au/?paper=PP9960253>
- [30] SOCIAS, F., H. MEDRANO a T. SHARKEY Feedback limitation of photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* L grown in elevated CO<sub>2</sub>. *Plant, Cell and Environment*. 1993, **16**(1), 81-86. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1993.tb00847.x. ISSN 0140-7791. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3040.1993.tb00847.x>
- [31] SAGE, R., T. SHARKEY a J. SEEMANN Acclimation of Photosynthesis to Elevated CO<sub>2</sub> in Five C<sub>3</sub> Species. *Plant Physiology* [online]. 1989, **89**(2), 590-596 [cit. 2016-05-15]. ISSN 1532-2548.
- [32] SICHER, R., D. KREMER a S. RODERMEL Photosynthetic Acclimation to Elevated CO<sub>2</sub> Occurs in Transformed Tobacco with Decreased Ribulose-1,5- Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Content. *Plant Physiology* [online]. 1994, **104**(2), 409-415 [cit. 2016-05-15]. ISSN 1532-2548.
- [33] FERNANDO, N., J. PANOZZO, M. TAUSZ, R. NORTON, G. FITZGERALD, A. KHAN a S. SENEWEERA Rising CO<sub>2</sub> concentration altered wheat grain proteome and flour rheological characteristics. *Food Chemistry*. 2015, **170**, 448-454. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.07.044. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614010772>
- [34] ARANJUELO, I., G. ERICE, A. SANZ-SÁEZ et al. Differential CO<sub>2</sub> effect on primary carbon metabolism of flag leaves in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Plant, Cell*. 2015, **38**(12), 2780-2794. DOI: 10.1111/pce.12587. ISSN 01407791. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/pce.12587>
- [35] HAN, X., X. HAO, S. LAM, H. WANG, Y. LI, T. WHEELER, H. JU a E. LIN Yield and nitrogen accumulation and partitioning in winter wheat under elevated CO<sub>2</sub>: A 3-year free-air CO<sub>2</sub> enrichment experiment. *Agriculture, Ecosystems*. 2015, **209**, 132-137. DOI: 10.1016/j.agee.2015.04.007. ISSN 01678809. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167880915001395>



- [36] WIESER, H., R. MANDERSCHIED, M. ERBS a H. WEIGEL Effects of Elevated Atmospheric CO<sub>2</sub> Concentrations on the Quantitative Protein Composition of Wheat Grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, **56**(15), 6531-6535. DOI: 10.1021/jf8008603. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf8008603>
- [37] MA, H., J. ZHU, Z. XIE, G. LIU, Q. ZENG a Y. HAN Responses of rice and winter wheat to free-air CO<sub>2</sub> enrichment (China FACE) at rice/wheat rotation system. *Plant and Soil*. 2007, **294**(1-2), 137-146. DOI: 10.1007/s11104-007-9241-5. ISSN 0032-079x. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11104-007-9241-5>
- [38] TAUB, D., B. MILLER a H. ALLEN Effects of elevated CO<sub>2</sub> on the protein concentration of food crops: a meta-analysis. *Global Change Biology*. 2008, **14**(3), 565-575. DOI: 10.1111/j.1365-2486.2007.01511.x. ISSN 1354-1013. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2486.2007.01511.x>
- [39] JABLONSKI, L., X. WANG a P. CURTIS Plant reproduction under elevated CO<sub>2</sub> conditions: a meta-analysis of reports on 79 crop and wild species. *New Phytologist*. 2002, **156**(1), 9-26. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2002.00494.x. ISSN 0028-646x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1469-8137.2002.00494.x>
- [40] LOLADZE, I. Rising atmospheric CO<sub>2</sub> and human nutrition: toward globally imbalanced plant stoichiometry?. *Trends in Ecology*. 2002, **17**(10), 457-461. DOI: 10.1016/S0169-5347(02)02587-9. ISSN 01695347. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169534702025879>
- [41] WRIGLEY, C., F. BÉKÉS a W. BUSHUK *Gliadin and glutenin: the unique balance of wheat quality*. St. Paul, Minn.: AACC International, 2006, x, 466 p. ISBN 978-189-1127-519.
- [42] EDWARDS, W. *The science of bakery products*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2007, xiv, 259 p. ISBN 978-0-85404-486-3.
- [43] DVOŘÁČEK, V. *Optimalizace Osbornovy metody kvantifikace bílkovinných frakcí zrna pšenice ozimé (Triticum aestivum L.)* [online]. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2006, 8 s. [cit. 2016-04-11]. ISBN 80-865-5581-X.
- [44] HULÍN, P., P. DOSTÁLEK a I. HOCHÉL Metody stanovení lepkových bílkovin v potravinách. *Chemické listy* [online]. 2008, **102**(5), 327-337 [cit. 2016-05-01]. ISSN 1213-7103.
- [45] SKYLAS, D.J., D. VAN DYK a C.W. WRIGLEY Proteomics of wheat grain. *Journal of Cereal Science*. 2005, **41**(2), 165-179. DOI: 10.1016/j.jcs.2004.08.010. ISSN 07335210. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521004000943>

- [46] PŘÍHODA, J., M. HRUŠKOVÁ a P. SKŘIVAN *Cereální chemie a technologie*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2003. ISBN 80-708-0530-7.
- [47] BARAK, S., D. MUDGIL a B.S. KHATKAR Relationship of gliadin and glutenin proteins with dough rheology, flour pasting and bread making performance of wheat varieties. *LWT - Food Science and Technology*. 2013, **51**(1), 211-217. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.09.011. ISSN 00236438. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002364381200391X>
- [48] WAHAB, P., J. CRUSIUS, J. MEIJER a C. MULDER Gluten challenge in borderline gluten-sensitive enteropathy. *The American Journal of Gastroenterology*. 2001, **96**(5), 1464-1469. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2001.03812.x. ISSN 0002-9270. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1111/j.1572-0241.2001.03812.x>
- [49] YADA, R. *Proteins in food processing*. Cambridge, Eng.: Woodhead Pub., 2004, xviii, 686 p. ISBN 08-493-2536-6.
- [50] SHEWRY, P., C. UNDERWOOD, Y. WAN et al. Storage product synthesis and accumulation in developing grains of wheat. *Journal of Cereal Science*. 2009, **50**(1), 106-112. DOI: 10.1016/j.jcs.2009.03.009. ISSN 07335210. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521009000484>
- [51] DANNO, G. Extraction of Unreduced Glutenin from Wheat Flour with Sodium Dodecyl Sulfate. *Cereal Chemistry*. 1981, **58**(4), 311-313.
- [52] SINGH, N.K., G.R. DONOVAN, I.L. BATEY a F. MACRITCHIE Use of Sonication and Size-Exclusion High-Performance Liquid Chromatography in the Study of Wheat Flour Proteins. I. Dissolution of Total Proteins in the Absence of Reducing Agents. *Cereal Chemistry*. 1990, **67**(2), 150-161.
- [53] BEAN, S.R a G.L LOOKHART. Electrophoresis of cereal storage proteins. *Journal of Chromatography A*. 2000, **881**(1-2), 23-36. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)01270-4. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967399012704>
- [54] MOREL, M.H. Acid-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Wheat Glutenins: A New Tool for the Separation of High and Low Molecular Weight Subunits. *Cereal Chemistry*. 1994, **71**(3), 238-242.
- [55] MÍKA, V., A. KOHOUTEK a P. NERUŠIL *Spektroskopie v blízké infračervené oblasti (NIR): výběr praktických aplikací v zemědělství*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2008. ISBN 978-80-87011-53-9.
- [56] MIKULÍKOVÁ, R., Z. SVOBODA, K. BENEŠOVÁ a S. BĚLÁKOVÁ Pivo a celiakie. *Kvasný průmysl*. 2013, **59**(10-11), 321-323. ISSN 0023-5830.

- [57] HÖGY, P., M. BRUNNBAUER, P. KOEHLER, K. SCHWADORF, J. BREUER, J. FRANZARING, D. ZHUNUSBAYEVA a A. FANGMEIER Grain quality characteristics of spring wheat (*Triticum aestivum*) as affected by free-air CO<sub>2</sub> enrichment. *Environmental and Experimental Botany*. 2013, **88**, 11-18. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2011.12.007. ISSN 00988472. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098847211003145>

## 8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AC	normální koncentrace CO <sub>2</sub>
A-PAGE	kyselá elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
ATP	asenosintrifosfát
AV ČR	Akademie věd České Republiky
CVGZ	Centrum výzkumu globální změny
DTT	dithiothreitol
EC	zvýšená koncentrace CO <sub>2</sub>
ELISA	Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay
FACE	Free-Air CO <sub>2</sub> Enrichment
GCM	globální klimatický model
GZK	globální změna klimatu
HMW	vysokomolekulární podjednotky gluteninů
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
LMW	nízkomolekulární podjednotky gluteninů
MKS	miliony klíčivých semen
PCR	polymerázová řetězová reakce
RP-HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie s reverzní fází
Rubisco	ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa
RuBP	ribulosa-1,5-bisfosfát
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za použití SDS
SE-HPLC	molekulově vylučovací vysokoúčinná kapalinová chromatografie
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultrafialové záření