

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2006

JITKA ČERMÁKOVÁ

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta
katedra rostlinné výroby



Studijní program: B4131 Zemědělství
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie
Specializace: Rostlinné biotechnologie

Studium metod izolace vodorozpustných bílkovin brambor a pšenice

Jitka Čermáková

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Jan Bárta, Ph.D.**

České Budějovice

2006

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně na základě vlastních experimentálních výsledků a s použitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích, 28. dubna 2006

Děkuji vedoucímu bakalářské práce Ing. Janu Bártovi, Ph.D. za odborné rady, návrhy a všestrannou pomoc při vypracování bakalářské práce, Ing. Veronice Heřmanové za pomoc při experimentální práci a zpracování výsledků této práce.

Děkuji touto cestou rovněž Ing. Václavu Dvořáčkovi, Ph.D. z VÚRV za poskytnutí výchozího materiálu (imitace pšeničné prací vody) pro precipitační testy.

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	7
2.1. Brambory	7
2.1.1. Technologie výroby bramborového škrobu	7
2.1.2. Výroba bramborového škrobu v České republice	8
2.1.3. Složení hlízové vody	8
2.1.4. Bílkoviny hlízové vody	9
2.2. Pšenice	12
2.2.1. Technologie výroby pšeničného škrobu	12
2.2.2. Výroba pšeničného škrobu v ČR	13
2.2.3. Složení pšeničného zrna	13
2.2.4. Bílkoviny pšeničného zrna	14
2.3. Metody izolace bílkovin	17
2.3.1. Koagulační techniky	18
2.3.2. Chromatografické techniky	19
2.3.3. Membránové techniky	20
3. CÍL PRÁCE	21
4. MATERIÁL A METODY	22
4.1. Výchozí materiál	22
4.2. Precipitace proteinů	22
4.3. Testování zpětné rozpustnosti precipitátů	23
4.4. Analýza obsahu dusíku	24
4.5. SDS-PAGE elektroforéza	24
5. VÝSLEDKY	26
5.1. Charakterizace výchozího materiálu	26
5.2. Testování precipitačních činidel	27
5.3. Determinace bílkovinných frakcí pomocí SDS – PAGE	29
6. DISKUSE	32
7. ZÁVĚR	35
8. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	36

1. ÚVOD

V roce 2005 se v České republice vyrobilo 33 660 t bramborového škrobu při průměrné škrobnatosti brambor 18,8 %. Na toto množství škrobu se zpracovalo 152 301 t brambor (SVOBODA, 2005). Při výrobě bramborového škrobu vzniká z tuny brambor přibližně 650 – 750 l hlízové vody (STRAETKVERN et al., 1999). Teoreticky tedy může vzniknout 99 000 – 114 000 m³ hlízové vody.

V současné době je v ČR tato produkce používána pouze jako dusíkato-draselné organické hnojivo aplikované na pole v blízkosti škrobárenských provozů. To však může způsobovat problémy – zatěžování stejných pozemků, závislost na počasí, obtěžování okolního prostředí zápachem aj. (BÁRTA et al., 2006).

Nařízení týkající se nutnosti zpracovávat hlízovou vodu již existují v Nizozemí a Německu (ZWIJNENBERG et al., 2002). Nizozemská škrobárna AVEBE (největší světový producent škrobu) a německá škrobárna SUDSTARKE využívají reverzní osmózu k zakoncentrování odpadní hlízové vody a následně izolují bílkoviny v ní obsažené použitím tepelné koagulace - injekce páry (105 °C) po úpravě pH hlízové vody kyselinou chlorovodíkovou na pH 5. Proces výroby škrobu tedy produkuje další prodejní produkt – proteinový koncentrát používaný jako krmivo pro malá zvířata (WIJNHOLDS, RANGLES, 1998; ZHIPING, 2004). Je pravděpodobné, že v budoucnu bude podobná povinnost součástí direktiv EU i pro ostatní členské země (HEŘMANOVÁ et al., 2006).

Podobná situace také nastává při výrobě pšeničného škrobu. Pšeničného škrobu se v České republice v roce 2003 vyrobilo přibližně 30 000 t (JIŘÍ, 2001), na toto množství bylo nutno zpracovat 75 281 t mouky. Při spotřebě 4 m³ vody na tunu mouky tedy mohlo vzniknout 301 125 m³ prací vody. Tato prací voda obsahuje přibližně 18,09 % dusíkatých látek resp. bílkovin v sušině, teoreticky tedy toto množství prací vody obsahuje 1143,9 m³ bílkovin. České škrobárny tuto vodu likvidují v čističkách odpadních vod, některé zahraniční podniky provádějí izolaci pomocí membránové filtrace či hydrocyklonů. Pravděpodobně pro nižší množství sušiny v této vodě a tudíž i nižší ekologickou zátěž, není zpracování odpadních vod v tomto škrobárenském odvětví věnována taková pozornost, jako v případě bramborové hlízové vody.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

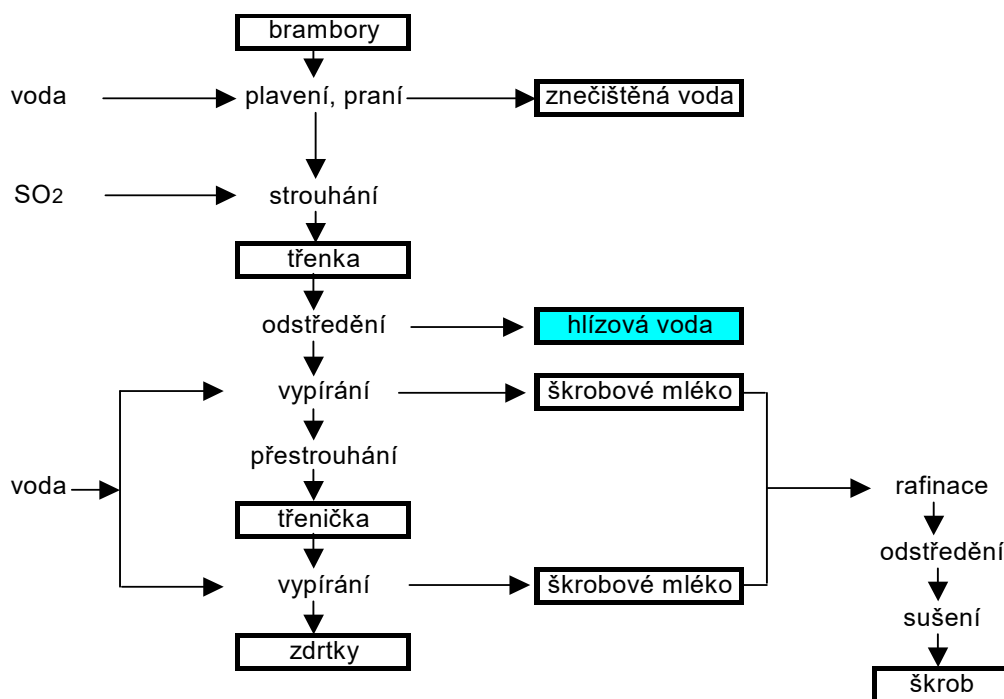
2.1. Brambory

V roce 2005 vzrostla celková plocha osázených brambor na výrobu škrobu na 7 764 ha (meziroční nárůst o 734 ha). Nárůst ploch v těchto letech je podmíněn a limitován národní výrobní kvótou bramborového škrobu, která činí pro ČR 33 600 t. Podle odhadu ČSÚ k 15.9.2005 byla celková produkce brambor na výrobu škrobu v roce 2005 cca 252 tis. t (meziroční nárůst o 45 %). V celkové produkci je však započtena i sadba brambor. V roce 2005 byl průměrný výnos brambor na výrobu škrobu 32,51 t . ha⁻¹ (SVOBODA, 2005).

2.1.1. Technologie výroby bramborového škrobu

V procesu výroby škrobu vzniká z tuny brambor 160-180 kg škrobu (KONINGSVELD, 2001). Produkce bramborového škrobu zahrnuje mytí a strouhání hlíz, přičemž vzniká kašovitá hlízová voda (tzv. třenka), škrob a bramborová vláknina. Škrob je extrahován a rafinován na hydrocyklonech a vláknina je izolována centrifugací (WIJNHOLDS, RANGLES 1998). Schéma výroby škrobu znázorňuje obr. 1.

Obr. 1. Klasické technologické schéma výroby bramborového škrobu (ALTERA et al., 2003):



2.1.2. Výroba bramborového škrobu v České republice

Výroba bramborového škrobu v ČR se z původních 17 závodů v osmdesátých letech ustálila na současných pěti výrobních závodech. V ČR jsou v současnosti čtyři společnosti celkem s pěti závody, které zpracovávají brambory na škrob (tab. 1).

Tab. 1. Zpracovatelské závody na výrobu bramborového škrobu v ČR v roce 2005 (SVOBODA, 2005)

Název a sídlo firmy	Výrobní závody	Kapacita zpracování brambor v t	Kapacita výroby škrobu v t	Přídělená kvóta v t
Amylex Radešínská Svratka s.r.o.	Hodíškov	10 000	2 000	1 387
LYCKEBY AMYLEX, a.s. Horažďovice	Horažďovice	150 000	30 000	17 887
NATURAMYL, a.s. Hamry	Hamry	20 000	4 000	2 213
Škrobárny Pelhřimov, a.s.	Pelhřimov, Chýnov	75 000	15 000	12 173
Celkem		255 000	51 000	33 660

2.1.3. Složení hlízové vody

Hlízová voda získaná při výrobě škrobu má koncentraci sušiny přibližně 5 % a hodnotu pH mezi 5,6 a 6 (KONINGSVELD, 2001). Průměrné složení hlízové vody a sušiny udává tab. 2.

Z volných aminokyselin jsou v hlízové vodě zastoupeny hlavně glutamin, kyselina glutamová, asparagin a kyselina γ -aminomáselná. Další nízkomolekulární látky obsažené v hlízách jsou mimo jiné glykoalkaloidy, z nich nejhojnější jsou α -solanin a α -chaconin. Z cukrů obsahuje hlízová voda redukující D-glukosu a D-fruktosu a neredukující disacharid sacharosu. Lipidy jsou zastoupeny volnými mastnými kyselinami (30 %), tuky (30 %) a fosfolipidy (40 %). Sušina hlízové vody obsahuje přibližně 25 – 30 % bílkovin (KONINGSVELD, 2001).

Tab. 2. Průměrné složení hlízové vody, sušiny (KONINGSVELD, 2001).

složka	koncentrace v hlízové vodě (g · l ⁻¹) (min - max)	% sušiny
bílkoviny (N x 6,25)	13,4 (8,5 – 22,2)	26,8
peptidy (N x 6,25)	2,2 (1,5 – 3,1)	4,4
aminokyseliny + amidy (N x 5,13)	4,8 (3,3 – 7,8)	9,6
další dusíkaté složky	0,9	1,8
sacharidy	7,9 (3,0 – 24,9)	15,8
lipidy	1,1	2,2
kyselina citrónová	5,0 (2,0 – 12,0)	10,0
kyselina askorbová	0,3 (0,1 – 0,6)	0,6
další organické kyseliny	1,3 (0,7 – 5,4)	2,6
kyselina chlorogenová	0,2 (0,1 – 0,5)	0,4
kyselina kávová	0,007 (0,003 – 0,3)	0,1
draslík	5,6 (3,9 – 7,3)	11,2
fosfor	0,5 (0,2 – 0,9)	1,0
další složky	5,0	10,1

2.1.4. Bílkoviny bramborových hlíz

V minulosti bylo preferováno rozdělení hlízových bílkovin podle rozpustnosti na frakci albuminovou, globulinovou, prolaminovou a glutelinovou. Prvotně byla za hlavní frakci hlízových bílkovin považována globulinová frakce, která byla pojmenována tuberin. Později se uvažovalo, že tuberin tvoří 70 % a tzv. tuberinin (albuminová frakce) 30 % obsahu hlízových bílkovin. Data z počátku 80. let udávají poměr 60 % pro albuminovou a 20 % pro globulinovou frakci (BÁRTA,ČURN, 2004).

S rozvojem elektroforetických a chromatografických technik začala být preferována (a v současné době převažuje) klasifikace bílkovin podle molekulové hmotnosti. Na jejím základě se hlízové bílkoviny dělí na:

- patatinový komplex (patatin)
- bramborové inhibitory proteáz
- ostatní bílkoviny

První dvě skupiny představují přes dvě třetiny obsahu bílkovin v bramborových hlízách (BÁRTA,ČURN, 2004; POTS et al., 1999). KONINGSVELD (2001) uvádí, že proteiny hlízové vody tvoří z 38 % patatin, z 50 % inhibitory proteáz a z 12 % ostatní bílkoviny.

A) Patatinový komplex (patatin)

Skupina patatinových bílkovin, dříve nesprávně označovaná tuberin, je skupina imunologicky identických glykoproteinů s molekulovou hmotností v rozmezí 40 – 43 kDa, v nativní formě však tvoří dimer s molekulovou hmotností 80 – 88 kDa (BÁRTA, ČURN, 2004). Předpokládá se, že patatin je *in vivo* syntetizován jako větší prekurzor, který je do zralého proteinu zpracován odštěpením signálního peptidu (KRISCHNER, HAHN, 1986). Je přítomný ve všech odrůdách brambor a tvoří 20 – 40 % rozpustných bílkovin bramborových hlíz (BÁRTA, ČURN, 2004; SHEWRY, 2003).

Za normálních podmínek, kdy rostlina aktivně vytváří hlízy, se patatin vyskytuje ve významných množstvích jen v hlízách. V listech, stoncích a kořenech se vyskytuje jen ve stopových množstvích (BÁRTA, ČURN, 2004).

Tento protein je nejen zásobní protein, ale vykazuje také enzymatickou aktivitu (ANDREWS et al., 1988). Patatin má lipid acyl hydrolázovou aktivitu (LAH - aktivita) pro deacylaci lipidů a tvorbu voskových esterů (KONINGSVELD, 2001; JIMENEZ et al., 2002; SHARMA et al., 2004). Uvažuje se o tom, že by patatin mohl být zapojen do rezistentní reakce indukované útokem patogena. LAH - aktivita by mohla být důležitá pro rychlou degradaci buněčné membrány a tím rychlou degradaci určitých metabolitů (HOANG et al., 2001). Dalším typem hydrolázové aktivity je acid β -1,3-glukanázová aktivita (TONÓN et al., 2001). Patatin je také aktivní jako fosfolipáza A₂ (JIMENEZ – ATIENZAR et al., 2003). U patatinu byla zjištěna významná antioxidační aktivita, široká esterázová aktivita a acyl transferázová aktivita (HOANG et al., 2001; ANDREWS et al., 1988; BÁRTA et al., 2004).

Možnost využití izolovaných patatinových bílkovin je v krmivářství, v potravinářství k produkci instantních polévek, omáček či sušených výrobků z brambor (BÁRTA, ČURN, 2004), nebo jako surovina pro tvorbu potravinářsky stabilních emulzí a pěn (RALET, GUEGUEN, 2000). Počítá se i s využitím enzymových vlastností nativního patatinu v biotechnologických procesech (BÁRTA, ČURN, 2004).

B) Bramborové inhibitory proteáz

Inhibitory proteáz představují cca. 20 - 30 % extrahovatelných bílkovin hlíz brambor. Hrají významnou roli v obranných mechanismech proti atakujícímu hmyzu a mikroorganismům inhibicí jejich specifických proteáz. Syntéza proteázových inhibitorů

v listech je indukována poraněním, zatímco v hlízách se akumulují jako zásobní bílkoviny (BÁRTA, ČURN, 2004).

Hlavní charakteristika inhibitorů proteáz je, že jsou to malé, na cystein bohaté a tepelně rezistentní proteiny s molekulovou hmotností 3 - 23 kDa. Předpokládá se, že mají také anti-karcinogenní a pozitivní dietetický efekt (KONINGSVELD, 2001).

Bramborové inhibitory proteáz jsou rozděleny do sedmi skupin. Jejich základní vlastnosti uvádí tab. 3.

Tab. 3. Rozdělení inhibitorů proteáz a jejich základní charakteristika (KONINGSVELD, 2001; POUVREAU et al., 2001)

skupina inhibitorů proteáz	označení	struktura (počet monomerů)	rozpětí molekulové hmotnosti monomerů (kDa)	isoelektrický bod (pH)	relativní zastoupení (%)
bramborový inhibitor I	PI-1	5	7,7 – 7,9	5,1 – 7,8	4,5
bramborový inhibitor II	PI-2	2	20,4	5,5 – 6,9	22
cystein proteázový inhibitor	PCPI	nejméně 9	20,1 – 22,8	5,8 – 9	12
aspartát proteázový inhibitor	PAPI	6	19,9 – 22,0	6,2 – 8,7	6
proteázový inhibitor brambor typu Kunitz	PKPI	2	20,2	8,0 a >9,0	4
ostatní serinové inhibitory	OSPI	2	21,0 a 21,8	7,5 – 8,8	1,5
karboxypeptidázový inhibitor	PCI	1	4,3	-	1

Bramborové inhibitory proteáz vykazují široké spektrum enzymových inhibicí. Všechny skupiny kromě PCI inhibují trypsin a/nebo chymotrypsin. PI-2 izoformy vykazují 82 a 50 % celkové trypsinové a chymotrypsinové inhibiční aktivity. Silná různorodost ve výše zmíněných aktivitách byla pozorována v rámci jedné skupiny i mezi jednotlivými skupinami inhibitorů proteáz (POUVREAU et al., 2001).

C) Ostatní bílkoviny

Tato skupina zahrnuje kolem 12 % bílkovin hlízové vody. Převážně obsahuje bílkoviny s vyšší molekulovou hmotností, např. lektin (KONINGSVELD, 2001),

β -1,2-xylosidáza (PEYER et al., 2004), polyfenoloxidáza, enzym zapojený do syntézy škrobu atd. (KONINGSVELD, 2001).

2.2. Pšenice

Pšenice je na našem trhu s obilovinami zcela dominantní plodinou, která tvoří 56,2 % nabídky všech obilovin.

Na základě odhadu produkce ČSÚ k 15. 9. 2005 se očekává v ČR sklizeň pšenice v roce 2005 v množství 4536,0 tis. tun. Průměrný výnos se očekává ve výši 5,53 t/ha. Osevní plocha pšenice podle soupisu osevních ploch ČSÚ k 31. 5. dosáhla 820,4 tis. ha (KŮST, ADAMEC, 2005).

2.2.1. Technologie výroby pšeničného škrobu

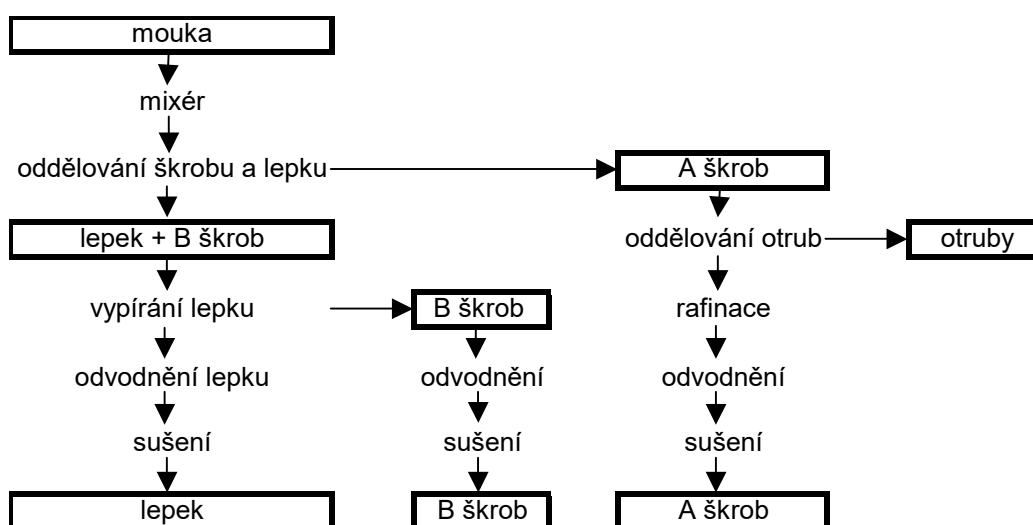
Z hlediska výroby škrobu jsou škrobnaté suroviny srovnatelné. Je možné ale konstatovat, že nejvýhodnější je technologie zpracování pšenice, neboť vedle škrobu se získává pšeničný lepek (PELIKÁN et al., 2002).

Klasická technologie zpracování pšeničné mouky (tab. 4) na škrob je založena na vypírání škrobu z hustého těsta. Vznikající prací voda obsahuje asi 1 - 2 % sušiny. Schéma výroby škrobu znázorňuje obr. 2.

Tab. 4. Průměrné složení pšeničné mouky používané pro výrobu škrobu (KODET, BABOR, 1991)

složka	obsah v %
voda	14,0
bílkoviny (N x 5,7)	13,5
tuky	1,5
škrob	68,4
cukry	0,8
vláknina	1,2
popel	0,6 (někdy 0,7)

Obr. 2. Schéma výroby pšeničného škrobu (PELIKÁN et al., 2002):



2.2.2. Výroba pšeničného škrobu v ČR

Kapacita škrobáren v roce 2001 umožňovala zpracování pšenice z plochy 11 000 ha až 20 000 ha. Pšenicí na škrob zpracovávají škrobárny v Krnově a Havlíčkově Brodě a v modernizované škrobárně Batelov, která patří Škrobárnám Pelhřimov. Kapacita všech existujících pšeničných škrobáren za rok 2001 byla 110 t zpracované mouky za 24 hodin, což dává možnost vyrobit ročně až 16 000 t pšeničného škrobu a 3 000 t lepku. K roku 2003 se očekávalo dosažení roční produkce 30 000 t pšeničného škrobu (JIRŮ, 2001).

2.2.3. Složení pšeničného zrna

Chemické složení pšeničného zrna je různorodé. Obsahuje škrob bílkoviny, tuky, cukry, vlákninu, popeloviny, fosfatiny, vitaminy, fermenty a jiné látky (PRUGAR, HRAŠKA, 1986).

Tab. 5. Chemické složení jednotlivých částí zrna v % (PRUGAR, HRAŠKA, 1986)

	škrobový endosperm	aleuronová vrstva	obalové vrstvy	zárodek
voda	13,4	11,8	11,1	-
vláknina	0,3	48,8	76,6	-
N látky	10,2	25,0	9,4	do 40
popeloviny	0,5	5,3	2,9	5,6
tuky	0,9	9,1	-	12,3
škrob	74,7	-	-	23

VACULOVÁ (1994) uvádí, že obsah škrobu kolísá v evropských odrůdách pšenice od 62 do 75%, přičemž měkké pšenice mají vyšší obsah škrobu než tvrdé.

Strukturální polysacharidy (celulóza, hemicelulóza, apod.) patří k živinové skupině nazývané hrubá vláknina. Hlavní součástí buněčných stěn endospermu pšenice jsou arabinosylany, které tvoří přibližně 88 % z neškrobových polysacharidů. β -D-glukany jsou v pšeničném zrně přítomny v nepatrném množství 0,5 – 1 %. Dalšími součástmi buněčných stěn je celulóza a glukomanany (VACULOVÁ, 1994).

Hrubá vláknina (lignin) a popel jsou přítomny v 2 – 2,7 % a 1,4 – 2 %. Lipidy v zrně pšenice kolísají od 2,54 do 3,32 g / 100 g sušiny a jejich variabilita je poměrně malá (VACULOVÁ, 1994)

2.2.4. Bílkoviny pšeničného zrna

Pšenice je nejvýznamnějším producentem obilných bílkovin, protože produkuje asi 55 % z celkového množství bílkovin. Průměrný obsah bílkovin v ozimé pšenici je 12,97 % s rozpětím od 6,9 % do 22,0 %. Obsah bílkovin v zrně pšenice závisí kromě kultivaru především na klimatických podmínkách, agrotechnických opatření, výživě, půdě apod. (PRUGAR, HRAŠKA, 1986).

Klasifikaci bílkovin endospermu zrna pšenice dle rozpustnosti znázorňuje tab. 6.

Tab. 6. Dělení bílkovin endospermu pšenice dle rozpustnosti (HUBÍK, 1991):

obecný název	název specifický pro pšenici	rozpouštědlo
albuminy		voda
globuliny		solné roztoky
prolaminy	gliadiny	vodný roztok alkoholu
gluteliny	gluteniny	zředěné kyseliny a alkálie

Poměrné zastoupení je 7 - 10 % albuminů, 4 - 6 % globulinů, 40 - 45 % gliadinů a 34 - 45 % gluteninů. Nejvyšší nutriční hodnotu po stránce aminokyselinového složení mají albuminy a globuliny, nejnižší gliadiny (PRUGAR, HRAŠKA, 1986).

Podle obsahu sirných aminokyselin v molekule bílkoviny rozdělit prolaminy do tří skupin (HUBÍK, 1991; SHEWRY, 1997):

Tab. 7. Dělení prolaminů dle obsahu sirných aminokyselin

	vysokomolekulární prolaminy	S-chudé prolaminy	S-bohaté prolaminy
pšenice	vysokomolekulární podjednotky gluteninů	gliadiny	gliadiny, nízkomolekulární podjednotky gluteninů

Proti dělení dle rozpustnosti se uvádí mnoho námitek, např. bílkoviny jedné skupiny jsou částečně rozpustné v extrakčních činidlech skupiny druhé. Současně úplnost extrakce bílkovin závisí na podmínkách prostředí a průběhu extrakce (povaha rozpouštědla, koncentrace roztoků, teplota, pH apod.). Někdy se albuminy a globuliny označují rozpustné bílkoviny a gliadiny a gluteiny bílkoviny lepku. V posledních letech se však v terminologii nejčastěji používá dělení podle funkčního významu bílkovinných složek na tzv. protoplazmatické a zásobní bílkoviny. Protoplazmatické bílkoviny tvoří velmi složitou část bílkovin s rozličnými funkcemi. Patří k nim katalytické a konstituční bílkoviny (PRUGAR, HRAŠKA, 1986).

A) Protoplazmatické bílkoviny

Protoplazmatické bílkoviny jsou velmi heterogenní, mají příznivou skladbu aminokyselin a jejich obsah je pod silnou genetickou kontrolou.

Konstituční bílkoviny jsou představovány albuminy, globuliny, dusíkem nerozpustného zbytku a částečně gluteniny. V zrně se nacházejí nejvíce v zárodku a v aleuronové vrstvě.

Katalytické bílkoviny jsou enzymaticky aktivní. Patří k nim albuminy a globuliny (PRUGAR, HRAŠKA, 1986).

Albuminy jsou bílkoviny rozpustné ve vodě při slabě kyselé nebo neutrální reakci. Usazují se účinkem solí a koagulují při vaření.

Obsah albuminů kolísá podle podmínek extrakce a v závislosti na kultivaru a je udáván spolu s globuliny na 10 - 15 %. Největší část albuminů pšeničného zrna se nachází v zárodku.

Albuminy jsou velmi heterogenní směsí více složek s rozličným aminokyselinovým složením. Elektroforézou ve škrobovém gelu lze albuminy rozdělit na 21 podfrakcí. Celková množství major a minor komponentů albuminů je od 17 - 25, čímž se jeví bílkoviny albuminů jako nejheterogennější bílkoviny pšeničného zrna. Molekulová hmotnost albuminů je z bílkovinných frakcí zrna nejmenší – 17000 až 28000 (PRUGAR, HRAŠKA, 1986).

Globuliny jsou bílkoviny rozpustné v roztocích neutrálních solí, ale nerozpustné ve vodě. V zrně obilí se nacházejí v nepatrném množství.

Globuliny podobně jako albuminy jsou součástí konstitučních bílkovin a mají katalytické účinky. Jsou to velmi heterogenní bílkoviny složené z 15 - 21 komponent. Molekulová hmotnost globulinů je v rozmezí 25 000 až 300 000. Převážná část globulinů pšeničného zrna se nachází v aleuronové vrstvě a v zárodku. Obsah globulinů je geneticky kontrolovaný a poměrně málo ovlivněný prostředím (PRUGAR, HRAŠKA, 1986).

B) Zásobní bílkoviny

Zásobní bílkoviny tvoří skupinu specializovaných bílkovin s relativně menším počtem komponentů a horším aminokyselinovým složením v porovnání s albuminy a globuliny. Tvoří je gliadiny a gluteniny. Charakterizuje je vysoký obsah glutaminu a kys. glutamové a prolinu. Poměr a množství zásobních bílkovin je v pšeničném zrně velmi variabilní, mění se se změnami obsahu celkových bílkovin v závislosti na podmínkách pěstování, genetických zvláštností a také v procesu dozrávání (PRUGAR, HRAŠKA, 1986).

Gliadinové bílkoviny endospermu zrna pšenice tvoří bílkovinnou matrix, která obklopuje spolu s jinými bílkovinami škrobová zrna endospermu (HUBÍK, 1991).

Gliadiny jsou spolu s gluteniny hlavní součástí lepku, přičemž rozhodující mírou ovlivňují jeho fyzikální a chemické vlastnosti. V zrně pšenice tvoří hlavní část bílkovin, přičemž jejich obsah je rozdílný v závislosti na vnějších podmínkách, pěstitelské oblasti, kultivaru a podmínkách extrakce (PRUGAR, HRAŠKA, 1986). Aminokyselinové složení ukazuje velký podíl kys. glutamové a prolinu a nízký obsah esenciálních aminokyselin. Toto aminokyselinové složení je nežádoucí, zvláště z nutričního hlediska, a jelikož gliadinová frakce tvoří cca 30 – 40 % celkového obsahu bílkovin zrna pšenice, je závažným problémem (HUBÍK, 1991).

Gliadiny jsou velmi heterogenní bílkoviny složené z mnoha složek (PRUGAR, HRAŠKA, 1986). Na elektroforetickém spektru, pořízeném elektroforézou na polyakrylamidovém nosiči v prostředí Al-laktátového pufru pH 3,1 se gliadinové spektrum rozpadne na 4 skupiny: α , β , γ a ω gliadiny. Molekuly gliadinů jsou relativně malé, jejich hmotnost se pohybuje okolo 35 kilodaltonů (HUBÍK, 1991).

HUEBNER (1990) rozdělil chromatograficky gliadiny na HMW gliadiny, omega gliadiny a LMW gliadiny. Čtvrtá, později eluovaná frakce, obsahovala LMW (<25kD) proteiny, pravděpodobně albuminy.

Gliadiny jsou ochotně rozpustné v 50 - 90 % vodném roztoku ethanolu s maximem kolem 70 % (NIERLE, EL BAYA, 1990).

Gluteninové bílkoviny jsou tvořeny velkými agregáty makromolekul, dosahujících hmotnosti řádově miliónů daltonů. Jsou tvořeny mezimolekulárními disulfidickými vazbami z menších bílkovinných molekul, tzv. gluteninových podjednotek. Gluteninové agregáty bílkoviny jsou zapojeny rozhodující měrou do tvorby lepku a významně se podílejí na technologické kvalitě zrna pšenice (HUBÍK, 1991).

Gluteniny jsou nejméně rozpustnou částí pšeničné mouky, charakteristické rozpustností v zředěných kyselinách a zásadách, ale nerozpustné v neutrálních solných roztocích. Jsou poměrně bohaté na aminokyseliny arginin, prolin a kys. glutamovou (NIERLE, EL BAYA, 1990).

Redukcí disulfidických vazeb se získají tzv. gluteninové podjednotky, které lze elektroforézou rozdělit na dvě skupiny - na nízkomolekulární (LMW) a vysokomolekulární (HMW) podjednotky gluteninů (HUBÍK, 1991; MOSLETH et al., 1990).

2.3. Metody izolace bílkovin

Rozpustnost bílkovinné molekuly ve vodném rozpouštědle je podmíněna rozmístěním nabitých hydrofilních a hydrofobních skupin na jejím povrchu. Tyto nabitě skupiny na povrchu interagují s iontovými skupinami rozpouštědla. Bílkovinná sraženina se vytváří agregací bílkovinných molekul, způsobenou změnou pH nebo iontové síly, nebo přidáním mísitelného organického rozpouštědla či jiných inertních roztoků nebo polymerů. Stupeň agregace bude také ovlivněn teplotou (ROE, 2001).

2.3.1. Koagulační techniky

A) Isoelektrické srážení

Nejjednodušší metodou srážení bílkovin je regulace pH roztoku na pH blízké nebo rovné isoelektrickému bodu bílkoviny. Při pH nad pI převažuje na molekule proteinu negativní náboj a molekuly se navzájem odpuzují. Naopak při pH pod pI jsou molekuly nabitě kladně a opět se odpuzují. V pI dojde k vyrušení kladných a záporných nábojů, nedojde k elektrostatickému odporu mezi molekulami a molekuly se přitahují. To vede k tvorbě sraženiny. Při isoelektrickém srážení však může dojít k denaturaci a inaktivaci bílkoviny (ROE, 2001).

B) Srážení rostoucí iontovou silou (vysolování)

Srážení přidáním neutrálních solí (např. síran amonný) je asi nejpoužívanější metoda pro rozdělení bílkovin při srážení. Nedochozí k denaturaci a je zachována aktivita po rozpuštění peletu. Vysolování je závislé na hydrofobní povaze povrchu bílkovin. Hydrofobní skupiny jsou převážně uvnitř molekuly, ale nějaké jsou i na povrchu, kde tvoří hydrofobní plochy. Tato místa jsou obklopena vodou, ale po přidání soli je voda nahrazena ionty. Hydrofobní plochy jednotlivých molekul začnou navzájem interagovat a dochází k agregaci. Bílkoviny s většími hydrofobními plochami interagují dříve a tak dochází k frakcionaci (ROE, 2001).

C) Srážení organickými rozpouštědly

Mnoho proteinů je možno srážet přidáním rozpouštědel mísitelných s vodou, jako je aceton a etanol. Přidání těchto rozpouštědel snižuje dielektrickou konstantu roztoku a tím jeho solvatační schopnost. Tak se sníží rozpustnost bílkoviny a může dojít k agregaci elektrostatickou přitažlivostí. Srážení je rychlejší, pokud je pH blízké pI proteinu. Pro snížení rizika denaturace se srážení provádí při teplotě kolem 0 °C (ROE, 2001).

D) Srážení vysokou teplotou

Vysoká teplota způsobuje denaturaci rozrušením mnoha můstků, spojujících bílkovinu do nativní konformace - např. van der Waalsovy síly, iontové interakce a v extrémních případech i peptidické vazby (ROE, 2001). Tepelné srážení má velmi vysoké výnosy, ale sraženina již není zpětně rozpustná při neutrálním pH (KONINGSVELD, 2001).

2.3.2. Chromatografické techniky

Chromatografie je separační technika založená na sorpci a desorpci (KERESE, 1984). Vzorek se nanáší mezi dvě fáze – stacionární (nepohyblivá) a mobilní (pohyblivá). Díky pohybu mobilní fáze je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku, které jsou ochotněji ke stacionární fázi než k fázi mobilní, se při pohybu zdržují více než jiné složky, které se ke stacionární fázi poutají hůře. Tím se složky postupně od sebe separují (KLOUDA, 1994).

Pro separaci proteinů, peptidů či aminokyselin je možno použít adsorpční a iontovýměnnou chromatografii (KERESE, 1984).

A) Iontovýmienná chromatografie

O separaci rozhodují různě velké elektrostatické přitažlivé síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze a ionty vzorku. Stacionární fází je měnič iontů. Tím je makromolekulární matrice nesoucí vhodné funkční skupiny kyselé nebo zásadité povahy. Každá tato funkční skupina je pevně vázaným iontem, na který je iontovou vazbou připojen protiion s opačným nábojem. Tento protiion je vyměňován iontem stejného znaménka náboje obsaženým v kapalně fázi. Při tom se uplatňují Coulombovy síly (KLOUDA, 1994). Náboj proteinů a peptidů v roztoku je dán nejen přítomností kyselých, neutrálních či zásaditých aminokyselin, ale i pH roztoku (KERESE, 1984) Pro izolaci bramborových bílkovin se testovalo použití iontovýmienné chromatografie na carboxymethylcelulose (polysacharid interagující s hlízovými proteiny), nutno ale použít nízké pH (1,5 – 4,0). Výsledný produkt je tedy částečně denaturovaný (KONINGSVELD, 2001). Pro izolaci patatinu je dále možno

použít techniku Expanded Bed Adsorption, avšak pro průmyslové použití je tato technika příliš drahá (KONINGSVELD, 2001).

B) Adsorpční kapalinová chromatografie

O separaci rozhoduje různá schopnost složek poutat se (adsorbovat se) na povrch stacionární fáze (KLOUDA, 1994). Pro izolaci bílkovin a peptidů jsou stacionární fází adsorbenty obsahující hydrofilní skupiny, např. hydroxid hlinitý, kaolin nebo celuloza. Proteiny a peptidy jsou na tyto nízkokapacitní sorbenty vázány van der Waalsovými silami (KERESE, 1984).

2.3.3. Membránové techniky

Membránové techniky umožňují zakoncentrování roztoků a separaci jeho složek bez použití tepla. Částice jsou oddělovány na základě jejich velikosti a tvaru s použitím tlaku a speciálně navržené polopropustné membrány (ANONYM, 2006). Tyto membrány se zhotovují z organických polymerů – celuloza a její estery, polyamidy, metakrylát, apod. (KLOUDA, 1994). Pokud aplikovaná mechanická síla převyšuje osmotický tlak, voda je nucena prostupovat proti koncentračnímu gradientu. Kapalina procházející membránou je nazývána permeát, frakce která membránou neprojde retentát (ANONYM, 2006).

Pro zakoncentrování vod škrobárenského průmyslu byly testovány především ultrafiltrace a reverzní osmóza.

A) Ultrafiltrace

Velikost pórů membrán pro ultrafiltraci je v rozmezí 0,001 – 0,1 μm . Častěji se ale tyto membrány klasifikují podle molekulové hmotnosti látek, které již membránou nemohou projít. Zde se uvádí rozpětí 1 000 – 1 000 000 Da (HARRISON et al., 2003). Při izolaci bílkovin hlízové vody se pro zabránění nadměrnému znečištění membrány provádí před vlastní ultrafiltrací koagulace bílkovin přidáním CaHPO_4 do pH 7,5 (KONINGSVELD, 2001).

B) Reverzní osmóza (hyperfiltrace)

Do permeátu procházejí částice o menší molekulové hmotnosti než 150 – 250 Da (voda).

3. CÍL PRÁCE

Cílem předkládané práce je demonstrovat možnost izolace potenciálně využitelných vodorozpustných bílkovin pšeničného zrna a bramborové hlízy. Jedná se o nutričně a biologicky zajímavé hlízové bílkoviny, které se uvolňují do tzv. hlízové vody (PFJ), vznikající jako odpad při výrobě bramborového škrobu a dále o pšeničné bílkoviny, které zůstávají v obdobném odpadním produktu, který je produkován při zpracování pšenice na škrob. Pozornost byla zaměřena zejména na využití precipitačních technik, po kterých byla zachována rozpustnost izolovaných bílkovin. Hodnocena byla výtěžnost precipitace, podíl opětovně rozpustných bílkovin a elektroforetické spektrum proteinů ve výchozích materiálech a ve finálních precipitátech.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Výchozí materiál - hlízová voda brambor a pšeničná prací voda

Použity byly dva typy odpadních vod vznikajících v průběhu produkce škrobu. Jednalo se o tzv. hlízovou vodu brambor (dále PFJ), která vzniká při zpracování brambor na škrob, a dále byla použita centrifugovaná škrobová voda (imitace prací vody vznikající ve škrobárenském průmyslu při výrobě pšeničného škrobu).

A. Průmyslová hlízová voda

Průmyslová PFJ byla získána přímo ze škrobárenského provozu (Lyckeby Amylex a.s., Horažďovice). PFJ byla zamražena v PET láhvích a sloužila jako uniformní, zásobní zdroj pro následné analýzy. Po rozmražení byla hlízová voda centrifugována (15 min; 3600g; 4 °C) a tekutý podíl přefiltrován papírovým filtrem KA1 (Fischer). Výsledný filtrát byl použit pro veškeré testy.

B. Pšeničná prací voda

Centrifugovaná škrobová voda byla pro tento účel připravena pomocí přístroje Glutomatic 2300. 10g navážky bylo vypíráno jedenkrát po dobu 2 minut a to se opakovalo 4x z daného množství vzorku. Na 10g vzorku bylo spotřebováno cca 100 ml 2 % roztoku NaCl (připraveno ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Praze). Prací voda byla zamražena v PET láhvích a sloužila jako uniformní, zásobní zdroj pro analýzy. Po rozmražení byla hlízová voda centrifugována (15 min; 3600 g; 4 °C) a tekutý podíl přefiltrován papírovým filtrem KA1 (Fischer). Výsledný filtrát byl použit pro veškeré testy.

4.2. Precipitace proteinů

Před přidáním precipitačního činidla bylo pH hlízové i pšeničné vody upraveno na hodnotu 5,0. Koncentrace precipitačních činidel a metodika vycházejí z předchozích pokusů (KONINGSVELD et al., 2001; BÁRTA et al., 2006; HEŘMANOVÁ et al., 2006). Precipitační činidla (viz. tab. 8) byla přidávána k 8 ml takto upravené hlízové vody a k 25 ml takto upravené pšeničné vody (25 ml pšeničné vody bylo použito z důvodu nízkého obsahu sušiny a proteinu ve vzorku). U všech variant použitých aditiv probíhala precipitace po dobu 60 minut při teplotě 0 °C. Vzorky byly následně centrifugovány (10 min, 4 °C, 3600 g) a dvakrát promyty přidáním 5 ml 0,1M Na-acetátového pufru pH 5,0 s ekvivalentním množstvím příslušného precipitačního činidla pro udržení precipitovaného stavu. V případě kyseliny, jako aditiva, byly precipitáty promývány tímž pufrem pH 3,5. Po každém promytí byly vzorky centrifugovány (10 min., 4 °C, 3600 g). Před promýváním byly z tekutého podílu odebrány vzorky pro pozdější determinaci frakcí proteinu (SDS-PAGE). Celkem byly provedeny čtyři opakování precipitace u každého činidla. Vzorky byly lyofilizovány a následně byla u precipitátů zjištěna hmotnost sušiny, dva vzorky byly použity pro stanovení obsahu N a zbylé dva vzorky pro test zpětné rozpustnosti.

Tab. 8. Přehled precipitačních aditiv – koncentrace použitých roztoků a množství aditiva přidaného k hlízové a pšeničné vodě.

Aditivum	Výsledná koncentrace aditiva w/w v PFJ Výsledné pH*	Přidáno k 8 ml hlízové vody	Přidáno k 25ml pšeničné vody
Kys. octová	3,5*	konc. kys.octová (do dosažení požadovaného pH)	konc. kys.octová (do dosažení požadovaného pH)
Ethanol	20 %	2 ml abs. ethanolu	6,25 ml abs. ethanolu
FeCl ₃	15 mM	142 µl 1M roztoku	444 µl 1M roztoku

4.3. Testování zpětné rozpustnosti precipitátů

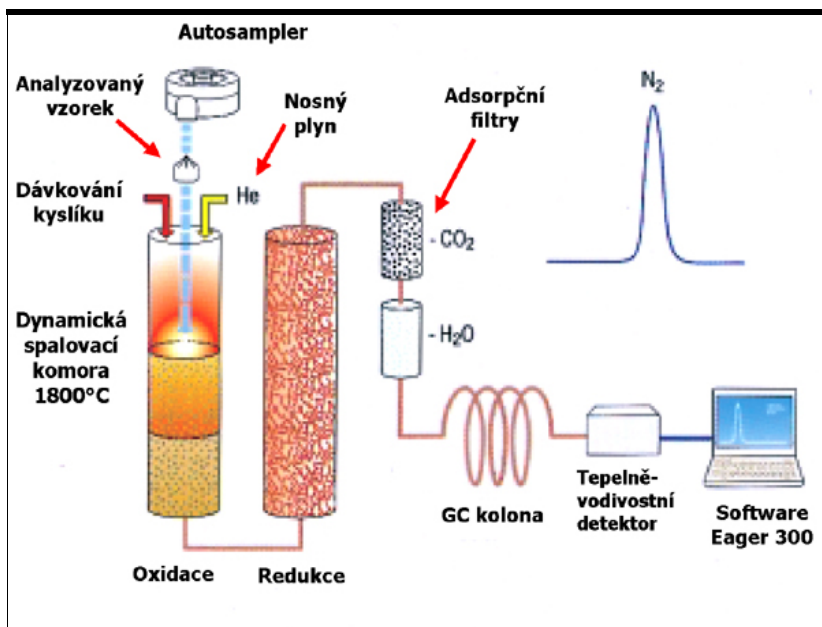
K promyтым precipitátům bylo přidáno 20 ml 100 mM Na-fosfátového pufru; pH 7,0. Při použití FeCl₃ jako precipitačního činidla, obsahoval výše zmíněný pufr 30 mM EDTA. Precipitáty byly důkladně roztřepány v pufru, inkubovány 60 minut při 30 °C a centrifugovány (15 min., 3600 g, 22 °C). Z tekutého podílu byly odebrány vzorky pro pozdější determinaci frakcí proteinu (SDS-PAGE). Nerozpustný precipitát byl opět lyofilizován a následně analyzován obsah N na elementárním analyzátoru FLASH EA 1112.

Podíl rozpustného proteinového N byl stanoven negativně odečtem nerozpustného N od celkového proteinového N.

4.4. Analýza obsahu dusíku

Obsah dusíku (N) v sušině precipitátů resp. hlízové vody brambor a pšeničné prací vody byl stanoven prostřednictvím elementárního analyzátoru FLASH EA 1112. Materiál před vlastní analýzou byl upraven lyofilizací a N byl stanoven na základě dvou opakování. Proteinový N ve výchozím materiálu (hlízová voda a pšeničná prací voda) byl stanoven jako N obsažený v precipitátu získaného působením TCA. Pro vysrážení celkového proteinu testovaného materiálu byla použita 100 % TCA (500 g TCA ve 350 ml dH₂O). 250 µl 100% TCA bylo přidáno k 1 ml vzorku. Vzorky byly inkubovány 20 minut při teplotě 4 °C a následně centrifugovány (15 min., 3600 g, 4 °C). Vzniklý pelet byl 2x promýván 200 µl acetonu. Nerozpustný precipitát byl lyofilizován a následně analyzován obsah N na elementárním analyzátoru FLASH EA 1112 (obr. 3).

Obr. 3. Pracovní schéma znázorňující analýzu na elementárním analyzátoru dusíku



4.5. SDS-PAGE elektroforéza

Determinace bílkovinných spekter byla provedena u nevysráženého podílu a rozpustné části precipitátů s využitím elektroforetické techniky SDS-PAGE. Byl sledován vliv různých typů precipitačních činidel na frakční složení bílkovin rozpustné části precipitátů v porovnání s původním kvalitativním založením frakcí bílkovin u výchozího materiálu – hlízové vody brambor a pšeničné prací vody.

Během testování zpětné rozpustnosti získaných precipitátů bylo z každé varianty odebráno 200 μ l supernatantu. Ke vzorkům bylo přidáno 200 μ l extrakčního pufru (0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8, 5 % 2-merkapt ethanol, 2 % SDS) a vše bylo ponecháno při 4 °C po dobu 4 hod. Po přidání 100 μ l nanášecího pufru (5 x NP: 5 ml 1.25 M Tris-HCl, pH 6.8, 2.3 g SDS, 10 ml glycerol, 5 mg Bromophenol Blue; k 500 μ l pufru se těsně před použitím přidá 170 μ l 2-merkapt ethanolu) a promíchání byly vzorky 2 minuty vařeny ve vodní lázni. Na gel byly vzorky nanášeny v množství 20 μ l. Pro dělení proteinů byla použita desková denaturační elektroforéza na polyakryamidovém gelu – 4 % zaostřovací gel a 10 % separační gel (LAEMMLI, 1970). Detekce bílkovin byla provedena barvením roztokem Coomassie Brilliant Blue přes noc. Po detekci byly gely odbarveny od nespecifického „barvení“, dehydratovány a následně usušeny (BÁRTA, 2002). Získané gely byly zpracovány digitální obrazovou analýzou.

5. VÝSLEDKY

Výsledková část práce je rozdělena do třech kapitol – první kapitola se zabývá všeobecným popisem výchozího materiálu (PFJ a pšeničná prací voda) z hlediska vlastností, které mohou ovlivnit precipitační proces – pH, obsah sušiny, obsah N ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) a množství proteinu, který lze získat pomocí TCA (tzv. TCA protein). Druhá kapitola se zabývá testováním možného využití precipitačních činidel (kys. octová, etanol a FeCl_3) pro izolaci bílkovin z průmyslové PFJ a pšeničné prací vody za standardních podmínek (precipitace na ledu). Sledován byl proces precipitace z hlediska celkové výtěžnosti a zpětné rozpustnosti precipitovaného proteinu. Optimalizace precipitačního procesu spočívá ve snaze získat maximální množství proteinu s co nejvyšší zpětnou rozpustností. Zpětně rozpustný protein je pro tyto účely považován za protein, který si ponechal nativní charakter (KONINGSVELD et al., 2001). Třetí část se zabývá hodnocením bílkovinných frakcí pomocí denaturační elektroforetické techniky SDS-PAGE. Hodnocena byla bílkovinná spektra proteinů, které nebyly danými precipitačními činidly vyizolovány a bílkovinná spektra rozpustného podílu proteinového izolátu.

5.1. Charakterizace výchozího materiálu

Výchozí materiál, který následně sloužil k izolaci hlízových a pšeničných bílkovin byl testován z hlediska pH, obsahu sušiny, obsahu N, obsahu hrubého proteinu ($\text{N}^*6,25$) obsah čistého (TCA) proteinu a byla také zjištěna objemová hmotnost.

Tab. 9. Charakterizace výchozího materiálu

	pH	% sušiny	N ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Hrubý protein $\text{N}^*6,25$ ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)	TCA protein $\text{N}^*6,25$ ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Objemová hmotnost ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)
Hlízová voda	5,68	7,18	4,21	26,30	15,26	1473,70
Pšeničná voda	6,34	2,50	0,26	1,63	1,27	1477,23

Hlízová voda vznikající při zpracování brambor na škrob obsahuje v průměru vyšší zastoupení sušiny (7,18 %) v porovnání s pšeničnou vodou (2,50 %). Stejně tak i obsah N je u hlízové vody vyšší: 4,21 mg . ml⁻¹ v případě hlízové vody a 1,63 mg . ml⁻¹ u pšeničné vody. Z hlízové vody bylo pomocí TCA vysráženo 15,26 mg . ml⁻¹ proteinu, což představuje 58,02 % z celkového hrubého proteinu PFJ. Tento tzv. TCA protein je dále považován pro účely této práce za čistý protein PFJ. V případě pšeničné vody bylo pomocí TCA vysráženo 77,9 % z obsahu N (tzv. hrubého proteinu), tento TCA protein (1,27 mg . ml⁻¹) je opět považován za čistý protein pšeničné vody.

U hlízové vody bylo zjištěno nižší pH než v případě pšeničné vody, což pravděpodobně znamená vyšší pI rozpustných pšeničných proteinu. Vzhledem k významu vlivu isoelektrického bodu (pI) proteinů na jejich rozpustnost v určitých hodnotách pH prostředí může být tato skutečnost významnou při vlastní precipitaci.

Objemová hmotnost hlízové vody činila 1473,70 mg . ml⁻¹, u pšeničné vody byla tato hodnota jen nepatrně vyšší (1477,23 mg . ml⁻¹).

5.2. Testování precipitačních činidel – výtěžnost a zpětná rozpustnost bílkovinných izolátů

V rámci tohoto experimentu byla testována precipitační činidla, která by mohla být využitelná při izolaci „odpadních“ bílkovin z hlízové a pšeničné vody. Cílem precipitace za stabilních podmínek je nalezení precipitačního činidla, které zajistí maximální výtěžnost precipitačního procesu a zároveň co nejvyšší míru rozpustnosti tohoto vyizolovaného proteinu. Získané hodnoty, uvedené v tab. 10 a 11, byly statisticky zpracovány pomocí programu STATISTICA 6.0 za použití Tukey HSD testu.

Tab. 10: Výtěžnost precipitačního postupu v závislosti na typu použitého precipitačního činidla; hlízová voda brambor (PFJ)

Precipitační činidlo	Protein N*6,25 (mg) vysrážený z 1ml PFJ	% z celkového TCA proteinu	Nerozpustný protein N*6,25 (mg) vysrážený z 1ml PFJ	% z celkového TCA proteinu	Rozpustný protein N*6,25 (mg) vysrážený z 1ml PFJ	% z celkového TCA proteinu
Kys. octová	9,31 ^a	60,99	8,25 ^a	54,05	1,06 ^a	6,95
Etanol	6,52 ^a	42,70	4,20 ^b	27,49	2,32 ^a	15,21
FeCl ₃	17,95 ^b	117,63	8,17 ^a	53,52	9,78 ^b	64,11

TCA	15,26	100	/	100	/	100
-----	-------	-----	---	-----	---	-----

Pozn.: Shoda písmen indikuje neprůkaznost rozdílů mezi precipitačními činidly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (Tukey HSD test)

Jak vyplývá z tabulky 10 a následně z grafu 1A při izolaci hlízových bílkovin z PFJ bylo nejúspěšnější použití FeCl_3 , a to jak z hlediska celkové výtěžnosti proteinu (117,63 % TCA proteinu), tak i z hlediska rozpustnosti získaného proteinu. Zpětná rozpustnost u FeCl_3 činila 64,11 %. Denaturační vliv na izolovaný protein byl potvrzen při použití kys. octové, přestože celková výtěžnost precipitace je relativně vysoká 60,99 % TCA proteinu, zpětná rozpustnost získaného proteinu je velmi nízká 6,95 %. Zajímavá je nízká výtěžnost i zpětná rozpustnost proteinu při použití etanolu jako precipitačního činidla. Výtěžnost činila pouze 42,70 % TCA, zpětná rozpustnost 15,21 %.

Tab. 11: Výtěžnost precipitačního postupu v závislosti na typu použitého precipitačního činidla; centrifugovaná škrobová voda pšenice

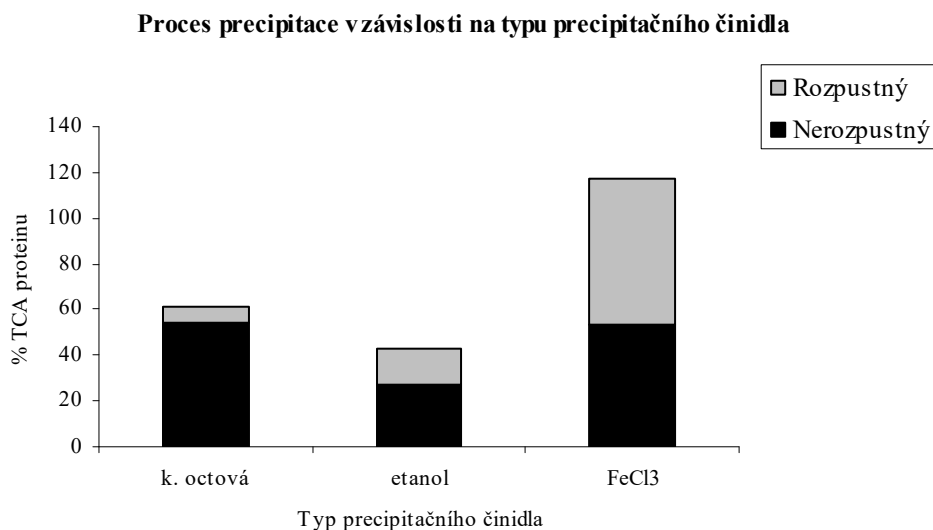
Precipitační činidlo	Protein N*6,25 (mg) vysrážený z 1ml PFJ	% z celkového TCA proteinu	Nerozpustný protein N*6,25 (mg) vysrážený z 1ml PFJ	% z celkového TCA proteinu	Rozpustný protein N*6,25 (mg) vysrážený z 1ml PFJ	% z celkového TCA proteinu
Kys. octová	0,38 ^a	30,25	0,30 ^a	23,85	0,08 ^a	6,40
Etanol	0,61 ^a	47,74	0,17 ^a	13,67	0,43 ^a	34,07
FeCl_3	0,40 ^a	31,43	0,23 ^a	18,01	0,17 ^a	13,42
TCA	1,27	100	/	100	/	100

Pozn.: Shoda písmen indikuje neprůkaznost rozdílů mezi precipitačními činidly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (Tukey HSD test)

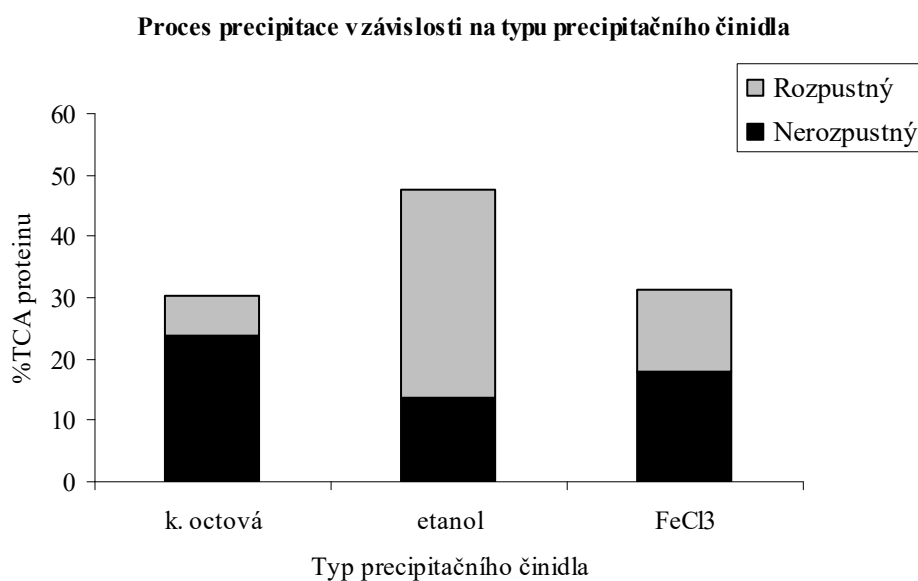
Výtěžnost a zpětná rozpustnost pšeničného proteinu je při použití stejných precipitačních činidel jako v předchozí části znázorněna v tabulce 11 a grafu 1B. Na rozdíl od izolace hlízového proteinu byla v tomto případě nejúspěšnější izolace pomocí etanolu – celková výtěžnost činí 47,74 % TCA proteinu, zpětná rozpustnost 34,07 %. Při použití kys. octové byla zjištěna nižší výtěžnost než u hlízového proteinu, zde činila 30,25 %, ovšem denaturační účinek je obdobný. Zpětná rozpustnost je u pšeničného proteinu pouze 6,04 % TCA proteinu. Na rozdíl od hlízového proteinu byla precipitace pomocí FeCl_3 relativně neúspěšná – výtěžnost činila 31,43 % a zpětná rozpustnost pouze 13,42 %.

Graf 1. Výtěžnost precipitačního postupu v závislosti na typu precipitačního činidla

A. Precipitace hlízových bílkovin brambor z odpadní škrobárenské vody



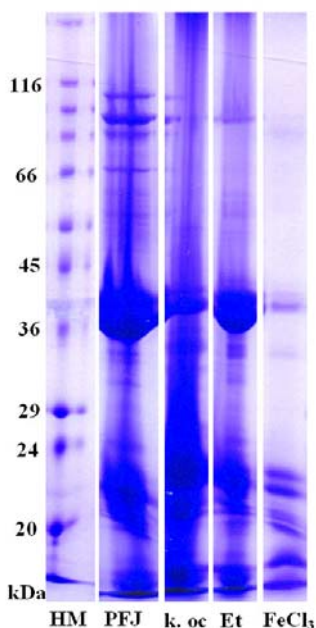
B. Precipitace pšeničných bílkovin z prací vody



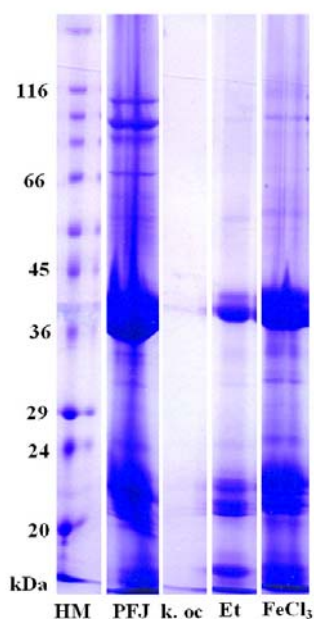
5.3. Determinace bílkovinných frakcí pomocí SDS-PAGE

V průběhu precipitace byl sledován vliv použitých precipitačních činidel na změny ve složení bílkovinných frakcí. Separace denaturovaných bílkovin pomocí SDS-PAGE techniky byla provedena u vzorků nevysrážené části hlízové vody a pšeničné prací vody a dále

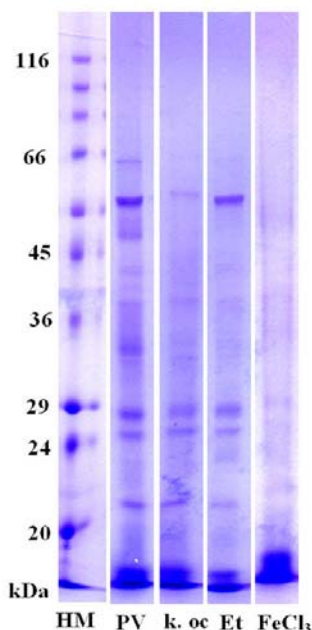
u vzorků rozpustného podílu získaných precipitátů. Srovnávacím standardem byl vzorek původní hlízové a pšeničné prací vody.



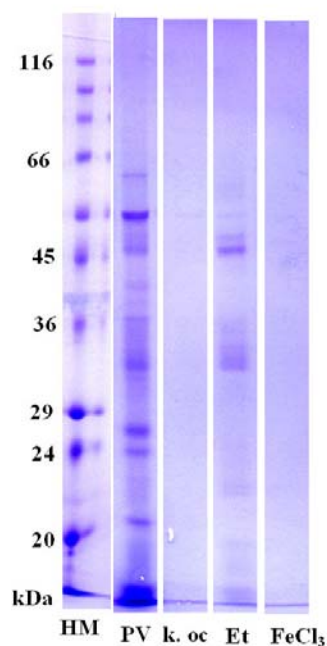
Obr. 4 : SDS-PAGE profily bílkovin hlízové vody (PFJ) a bílkovin nevysráženého podílu PFJ při použití precipitačních činidel k. octová, etanol a FeCl₃



Obr. 5 : SDS-PAGE profily bílkovin hlízové vody (PFJ) a bílkovinná spektra rozpustného podílu bílkovinných precipitátů – precipitační činidla k. octová, etanol, FeCl₃



Obr. 6 : SDS-PAGE profily bílkovin pšeničné prací vody a bílkovin nevysráženého podílu pšeničné vody při použití precipitačních činidel k. octová, etanol a FeCl₃



Obr. 7 : SDS-PAGE profily bílkovin pšeničné prací vody a bílkovinná spektra rozpustného podílu bílkovinných precipitátů – precipitační činidla k. octová, etanol, FeCl₃

Spektra bílkovinných frakcí, získaných pomocí SDS-PAGE techniky odpovídají u většiny testovaných variant výsledkům prezentovaným v předcházející kapitole.

A) Izolace bílkovin z hlízové vody

Jak je patrné z obrázku 4 při použití kyseliny octové a etanolu jako precipitačních činidel, zůstala v roztoku velká část nevysrážených bílkovinných frakcí. Při srovnání zastoupení bílkovinných frakcí v původní hlízové vodě je patrné, že kyselina octová zanechává v nevysráženém podílu především proteiny spadající do oblasti inhibitorů proteáz (0 - 25 kDa). Použitím etanolu nedošlo k vysrážení části bílkovin patatinové oblasti (cca 43 kDa). Použití FeCl_3 vysráželo patatin téměř zcela, část proteinů v oblasti inhibitorů proteáz zůstalo nevysráženo. Bílkovinné frakce zachovávající si zpětnou rozpustnost jsou zobrazeny na obr. 5. Tato spektra korelují se závěry uvedenými k předcházejícímu obrázku a závěry o vlivu precipitačního činidla na zpětnou rozpustnost precipitátu. Při použití kys. octové je patrné, že rozpustnost bílkovin byla minimální, a to ve všech sledovaných frakcích. Při použití etanolu a FeCl_3 je rozpustnost bílkovinných izolátů vyšší, zvláště pak v případě FeCl_3 . Významná v případě použití FeCl_3 je zachování rozpustnosti zejména u nutričně cenné patatinové frakce.

B) Izolace bílkovin z pšeničné prací vody

Při srovnání zastoupení bílkovinných frakcí hlízové a pšeničné prací vody je zřejmé, že pšeničná prací voda obsahuje méně proteinu (viz obr. 6 a 7). Hlavní bílkovinné frakce nacházejí se v pšeničné prací vodě jsou přibližně na úrovni 55 kDa, 29 kDa, 25 kDa a 21 kDa a výrazná frakce v oblasti cca 14 – 6,5 kDa. Méně výrazná oblast pruhů se nachází v oblasti mezi 55 – 35 kDa. U varianty kys. octová a etanol zůstávají hlavní bílkovinné frakce pšeničné prací vody nevysrážené, oblast mezi 55 – 35 kDa byla vysrážena. Při použití FeCl_3 jsou vysráženy všechny významné frakce s výjimkou proteinů s malou molekulovou hmotností (oblast 14 – 6,5 kDa). Při detekci proteinových frakcí v zpětně rozpustné části byly detekovány bílkovinné frakce v oblasti cca 45 – 50 kDa u varianty etanol. U ostatních činidel se nepodařilo bílkovinné frakce detekovat.

6. DISKUSE

Bakalářská práce se zabývala objasněním možností využití precipitačních činidel etanolu a FeCl_3 pro izolaci bílkovin z hlízové vody brambor a pšeničné prací vody, které vznikají jako odpad při zpracování brambor respektive pšenice na škrob (BÁRTA et al., 2006; ZWIJNENBERG et al., 2002; KONINGSVELD et al., 2001). Metodika použitá v pokusu je modifikací metodiky uváděné v práci KONINGSVELD (2001), kde byla prezentována možnost využití různých precipitačních činidel (různé kyseliny, soli kovů a organická rozpouštědla) pro izolaci bramborových bílkovin z hlízové vody. Izolace pšeničných proteinů pomocí zmiňovaných precipitačních činidel nebyla doposud v dostupných literárních zdrojích prezentována.

Již při hodnocení základních charakteristik hlízové a pšeničné prací vody, byly zjištěny významné rozdíly ve výchozím materiálu. Kromě hodnoty pH se jedná především o množství sušiny a tedy i množství hrubého a čistého proteinu. Pšeničná prací voda obsahovala menší množství sušiny, hrubého i čistého proteinu než hlízová voda. Z tohoto hlediska se použití precipitačních činidel pro izolaci „odpadních“ bílkovin jeví výhodnější u odpadní hlízové vody. Nízký obsah sušiny resp. proteinu ve výchozím materiálu je v případě průmyslové izolace bílkovin možné řešit zakoncentrováním odpadní vody membránovými technikami, především reversní osmózou (ZWIJNENBERG, 2002; BÁRTA et al., 2006), což je nutné především v případě pšeničné prací vody. Tímto způsobem řeší snížení pracovních objemů hlízové vody před tepelnou koagulací (injektací páry) například firma Avebe, Foxhol (WIJNHOLDS, RANGLES, 1998).

Ve vlastních precipitačních testech byl izolační postup s využitím precipitačních činidel hodnocen z hlediska výtěžnosti precipitačního činidla a zpětné rozpustnosti získaného precipitátu. Požadovaná je maximální výtěžnost se zachováním přijatelné (tzn. maximální) rozpustnosti bílkovinného izolátu (KONINGSVELD et al., 2001). V případě izolace bílkovin z hlízové vody se jako nejvhodnější precipitační činidlo jeví FeCl_3 , u kterého byly nejlepší výsledky jak v případě výtěžnosti, tak i z hlediska zpětné rozpustnosti bílkovinného precipitátu. Nízká rozpustnost izolátu byla zjištěna při použití kys. octové a překvapivě při použití etanolu. Nízká rozpustnost izolátu v případě kys. octové odpovídá výsledkům uvedeným v práci KONINGSVELD (2001), kde je při pH 3,5 zpětná rozpustnost precipitátu uváděna kolem 15 % TCA proteinu. Vysoká výtěžnost a zpětná rozpustnost FeCl_3 precipitátu je překvapivá, vzhledem ke skutečnosti, že KONINGSVELD et al. (2001) uvádí při použití FeCl_3 výtěžnost na hodnotě 41 % TCA proteinu. Rozpustnost tohoto precipitátu je však

i v této práci uváděna vysoká - až 88 % získaného precipitátu. Přestože KONINGSVELD et al. (2001) označuje etanol jako velmi perspektivní precipitační činidlo s výtěžností kolem 90 % celkového proteinu a s rozpustností až 80 % z TCA proteinu, předkládaná práce toto nepotvrdila. Výtěžnost i zpětná rozpustnost etanolového precipitátu byla oproti výsledkům (KONINGSVELD et al., 2001, HEŘMANOVÁ et al., 2006, BÁRTA et al., 2006) nízká. Důvodem tohoto rozdílu může být značná závislost výsledku precipitačního procesu při použití organických rozpouštědel na průběhu precipitace, zvláště pak na teplotě (BÁRTA et al., 2006 – nepublikované výsledky).

Izolace bílkovin z pšeničné prací vody při použití stejných precipitačních činidel potvrdila denurační účinek kys. octové – výtěžnost i rozpustnost precipitátu byla velmi nízká. Na rozdíl od hlízové vody se v tomto systému, jako velmi výhodné jeví použití etanolu – výtěžnost i zpětná rozpustnost je vyšší i než při použití FeCl_3 . V průběhu precipitace s tímto činidlem pravděpodobně nedošlo k denuraci izolovaných bílkovin jak se zřejmě stalo v případě hlízových bílkovin.

Bílkoviny brambor nejsou z chemického hlediska homogenní skupinou (RYBÁČEK et al., 1988). Ve starší literatuře je uváděna klasifikace hlízových bílkovin podle rozpustnosti na globulinovou, albuminovou, prolaminovou a glutelinovou frakci. Názory na zastoupení zmiňovaných frakcí se ovšem mezi autory liší – např. LINDNER et al. (1960) klasifikovali hlízovou bílkovinu na albuminy (50 %), globuliny (26 %) a zbytek (22 %), který zahrnoval prolaminovou a glutelinovou frakci. Bez ohledu na rozdíl v zastoupení zmiňovaných frakcí se většina autorů se shoduje na vysokém zastoupení snadno rozpustných bílkovin, které z tohoto důvodu mohou přecházet v průběhu zpracování brambor na škrob do odpadní hlízové vody.

Nověji (POTS et al., 1999) jsou bílkovinné frakce brambor klasifikovány na základě molekulové hmotnosti do tří základních skupin:

1. Patatin – skupina imunologicky identických glykoproteinů s MW kolem 43 kDa.
2. Inhibitory proteáz – heterogenní skupina proteinů, které mají schopnost inhibovat proteázové enzymy. MW těchto proteinů se udává v rozsahu 4,3 – 25 kDa.
3. Ostatní proteiny – hlízové proteiny, které nelze zařadit do žádné z předcházejících skupin.

Použitím SDS-PAGE analýzy byly všechny zmiňované frakce nalezeny u hlízové vody. V průběhu precipitace docházelo ke kvalitativním změnám v zastoupení bílkovinných frakcí. Při použití kys. octové je spektrum rozpustných bílkovinných frakcí velmi chudé jak v oblasti patatinu, tak i v oblasti inhibitorů proteáz, což je pravděpodobně způsobeno silným denuračním účinkem tohoto precipitačního činidla. Obdobné výsledky lze nalézt i v práci

KONINGSVELD et al. (2001). Při použití etanolu a FeCl_3 zůstávají zachovány všechny výše uvedené frakce. U precipitačního činidla FeCl_3 je zastoupena především nutričně cenná frakce patatinu, v případě etanolu je oblast patatinu kvantitativně chudší. Z hlediska zastoupení nutričně problematické frakce inhibitorů proteáz se jako lepší variantou jeví použití etanolu pro izolaci hlízových proteinu z PFJ.

Pšeničné bílkoviny jsou dle rozpustnosti rozděleny do čtyř skupin (HUBÍK, 1991):

1. Albuminy – rozpustné ve vodě, heterogenní směs více složek o $\text{MW} = 17 - 28$ kDa
2. Globuliny – rozpustné v solném roztoku, heterogenní bílkoviny, $\text{MW} = 25 - 300$ kDa
3. Gliadiny – rozpustné ve vodném roztoku alkoholu, hlavní část bílkovin pšenice, $\text{MW} = 35$ kDa
4. Gluteniny – rozpustné ve zředěných roztocích kyselin a zásad, velké agregáty makromolekul dosahující řádově miliónů Da

Někdy se albuminy a globuliny označují rozpustné bílkoviny a gliadiny a gluteiny bílkoviny lepku (PRUGAR, HRAŠKA, 1986). Z toho vyplývá, že do pšeničné prací vody budou přecházet především albuminy a globuliny, zbylé dvě frakce jen v menší míře.

V SDS-profilech nebylo možno rozeznat jednotlivé bílkovinné složky. Hlavní bílkovinné frakce pšeničné prací vody jsou přibližně na úrovni 55 kDa, 29 kDa, 25 kDa a 21 kDa a výrazná frakce v oblasti cca 14 – 6,5 kDa. Méně výrazná oblast pruhů se nachází v oblasti mezi 55 – 35 kDa. V případě kys. octové a FeCl_3 nebyly frakce rozpustných bílkovin detekovatelné, což mohlo být způsobeno např. nerozpustností vysrážených bílkovin vlivem denaturace. Při použití podchlezeného etanolu byla detekována v zpětně rozpustné části frakce v oblasti cca 45 – 50 kDa. Z hlediska izolace bílkovin z pšeničné prací vody se jako nejlepší varianta jeví etanol, jehož působením došlo k vysrážení většiny bílkovinných frakcí.

7. ZÁVĚR

Byla provedena precipitace bílkovin brambor a pšenice z odpadní vody vzniklé při výrobě škrobu (hlízová voda, pšeničná prací voda) použitím tří precipitačních činidel - podchlazený etanol, kyselina octová a chlorid železitý. Mezi těmito činidly byly sledovány rozdíly v účinnosti precipitace a následné rozpustnosti získaných izolátů. Dále byla hodnocena spektra nevyizolovaných bílkovin a rozpustného precipitátu, která byla získána pomocí SDS-PAGE elektroforézy.

V případě hlízové vody bylo dosaženo největší výtěžnosti proteinů při použití FeCl_3 , a to jak z hlediska celkové výtěžnosti proteinu (117,63 % TCA proteinu), tak i z hlediska rozpustnosti získaného proteinu (64,11 %). Nečekaně nízké výtěžnosti bylo dosaženo při použití podchlazeného etanolu - pouze 42,70 % a i zpětná rozpustnost dosáhla nízkých hodnot (15,21 %).

Oproti hlízové vodě byla u pšeničné prací vody neúčinnější precipitace ethanolem - celková výtěžnost činila 47,74 % TCA proteinu, zpětná rozpustnost 34,07 %. Nízkých hodnot dosáhla izolace pomocí FeCl_3 - výtěžnost činila 31,43 % TCA a zpětná rozpustnost pouze 13,42 %.

V obou případech byl potvrzen vysoký denaturační vliv kys. octové. Při jejím použití bylo dosaženo sice optimální výtěžnosti (60,99 % u hlízové vody a 30,25 % TCA proteinu u pšeničné prací vody), ale 93 % resp. 94 % proteinů zůstalo nerozpustných.

Výhodnost použití FeCl_3 pro izolaci bramborových bílkovin potvrdila i SDS-spektra. Pomocí tohoto činidla došlo k téměř úplnému vysrážení patatinu, bílkoviny nutričně nejhodnotnější, který si zachoval svou rozpustnost. Nevysrážena zůstala jen část inhibitorů proteáz. Ostatní činidla vykazovala nižší výtěžnost, u kys. octové se opět potvrdil denaturační vliv. U pšeničné prací vody dosáhl nejlepších výsledků etanol, kde si z vysrážených bílkovin zachovaly rozpustnost bílkoviny o molekulové hmotnosti 45 – 50 kDa. U ostatních variant se nepodařilo detekovat frakce zpětně rozpustných bílkovin.

8. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

1. ANONYM (2006): Membrane Processing. [citováno 9.4.2006].
<http://www.energymanagertraining.com/dairy/Membrane%20Processing.htm>.
2. BÁRTA, J. (2002): Studium vlivu dusíkatého hnojení na kvalitu konzumních brambor. Disertační práce. ZF JU v Českých Budějovicích, 191 p.
3. BÁRTA, J., ČURN, V. (2004): Bílkoviny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.) – klasifikace, charakteristika, význam. Chemické listy 98: 373–378.
4. BÁRTA, J., HEŘMANOVÁ, V., DIVIŠ, J., KOTLÁŘOVÁ, L., ŠVAJNER, J. (2006): Potato tuber proteins – a waste in starch production or valuable raw material? Biotechnology 2006. Scientific Pedagogical Publishing. Č. Budějovice, Czech Republic, 526-528.
5. DAVÍDEK, V., ET AL. (1987): Komplexní řešení bílkovinného programu. Sborník ČSAZ č. 117. Československá akademie zemědělská. Praha.
6. DIVIŠ, J., JŮZA, J., MOUDRÝ, J., VONDRYS, J. (2000): Pěstování rostlin. 1.vyd. ZF JU v Českých Budějovicích, 258 p.
7. HARRISON, R. G., TODD, P., RUDGE, S. R., PETRIDES, D. P. (2003): Bioseparation science and engineering. Oxford University Press, New York, 406 p.
8. HEŘMANOVÁ, V., BÁRTA, J., DIVIŠ, J. (2006): Izolace bílkovin brambor z odpadní vody brambor: tepelná koagulace versus precipitace pomocí nízkomolekulárních činidel. Odpadové fórum 2006. In press.
9. HOANG, J. H. B. HIRSCHBERG, JAN-WILLEM F. A. SIMONS, NIEK DEKKER, MAARTEN R. EGMOND (2001): Cloning, expression, purification and characterization of patatin, a novel phospholipase A, the Netherlands, Eur. J. Biochem. 268: 5037-5844.
10. HUBÍK, K. (1991): Zásobní bílkoviny endospermu zrna pšenice a ječmene: Metodiky pro zavádění výsledků výzkumu do zemědělské praxe. 3.vyd. Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, 27 p.
11. HUEBNER, F. R., CHRISTIANSON, D. D., NELSEN, T. C., BIETZ, J. A. : Gliadin and glutenin analysis by SE-HPLC for wheat classification. IN: Bushuk, W., Tkachuk, R. eds. 1.vyd. (1991): Gluten proteins. American Association of Cereal Chemists, 145-155.

12. **JIMENEZ – ATIENZAR, M., CABANES, J., GANDIA – HERRERO, F., ET AL.** (2003): Determination of the phospholipase activity of patatin by a continuous spectrophotometric assay. *Lipids*; 38 (6): 677-82.
13. **JIMENEZ, M., ESCRIBANO, J., GANDIA-HERRERO, F., CHAZARRA, S., CABANES, J., GARCIA-CARMONA, F., PEREZ-GILABERT, M.** (2002): Characterization of patatin esterase activity in AOT-isooctane reverse micelles. *Biotechnol. Prog.* 18 (3): 635-40.
14. **JIRÍ, P.** (2001): Pěstování pšenice podle užitkových směrů. Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha. *Zemědělské informace č. 20*, 40 p.
15. **KLOUDA, P.** (1994): Analytická chemie: separační metody. Vydal Ing. Pavel Klouda ve spolupráci s SPŠ akademika Heyrovského, Ostrava – Zábřeh, 60 p.
16. **KERESE, I.** (1984): Methods of protein analysis. Akadémiai Kiadó. Budapest, 371 p.
17. **KODET, J., BABOR, K.** (1991): Modifikované škroby, dextriny a lepidla. 1.vyd. Vydalo SNTL – Nakladatelství technické literatury, n. p. Praha, 338 p.
18. **KONINGSVELD, G.** (2001): Physico-chemical and functional properties of potato proteins. Ph.D. thesis. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
19. **KONINGSVELD VAN G. A., GRUPPEN, H., JONGH DE H. H. J., BOEKEI VAN M. A. J. S., WALSTRA, P., VORAGEN, A. G. J.** (2001): The solubility of potato proteins from industrial potato fruit juice as influenced by pH and various additives. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82 (1): 134-142.
20. **KRISCHNER, B., HAHN, H.** (1986): Patatin, a major soluble protein of the potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber is synthesized as a larger precursor. *Planta.* 168 (3): 386–389.
21. **KŮST, L., ADAMEC, J.** (2005): Situační a výhledová zpráva - Obiloviny. Ministerstvo zemědělství České republiky, 95 p.
22. **LAEMMLI, U. K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
23. **LINDNER, K., JASCHIK, S., KORPACZY, I.** (1960): Amino acid composition and biological value of potato protein fractions. *Qual. Plant Mater. Veg.* 7: 289-294.
24. **MOSLETH, E., UHLEN, A. K.** : Associations between the composition of gliadins and HMW glutenin subunits and the gluten quality in wheat (*T.aestivum* L.). IN: Bushuk, W., Tkachuk, R. eds. 1.vyd. (1991): *Gluten proteins.* American Association of Cereal Chemists, 112-128.

25. **NIERLE, W., EL BAYA, A. W.:** Functionality of modified wheat gluten in baking. IN: Bushuk, W., Tkachuk, R. eds. 1.vyd. (1991): Gluten proteins. American Association of Cereal Chemists, 42-56.
26. **PEYER, C., BONAY, P., STAUDACHER, E.** (2004): Purification and characterization of a beta-xylosidase from potatoes (*Solanum tuberosum*). Biochim Biophys Acta. 1672 (1): 27-35.
27. **PELIKÁN, M., HŘIVNA, L., HUMPOLA, J.** (2002): Technologie sacharidů. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 154 p.
28. **POTS, A. M., GRUPPEN, H., HESSING, M., BOEKEL VAN M. A. J. S., VORAGEN, A. G. J.** (1999): Isolation and characterization of patatin isoforms. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47: 4587-4592.
29. **POUVREAU, L., GRUPPEN, H., PIERSMA, S. R., VAN DEN BROEK, L. A., VAN KONINGSVELD, G. A., VORAGEN, A. G.** (2001): Relative abundance and inhibitory distribution of protease inhibitors in potato juice from cv. Elkana. J Agric. Food Chem. 49 (6): 2864-74.
30. **PRUGAR, J., HRAŠKA, Š.** (1986): Kvalita pšenice. Příroda. Bratislava. 210 p.
31. **RALET, M-C, GUÉGUEN, J.** (2000). Fractionation of potato proteins: solubility, thermal coagulation and emulsifying properties. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie 33: 380–387.
32. **ROE, S.** (2001): Protein purification techniques. Second edition. Oxford University Press, Oxford, 262 p.
33. **ROTOVÁ, A.** (1991): Bilance obilnin v zemích Evropského společenství - Zemědělská ekonomika, Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, Praha, 1-33.
34. **RYBÁČEK, V.** (1988): Brambory. Státní zemědělské nakladatelství. 358 p.
35. **SHARMA, N., GRUSZEWSKI, H. A., PARK, S. W., HOLM, D. G., VIVANCO, J. M.** (2004): Purification of an isoform of patatin with antimicrobial activity against *Phytophthora infestans*. Plant Physiology and Biochemistry 42: 647-655.
36. **SHEWRY, P. R.** (1997): Cereal grain proteins. IN: Henry, R. J., Kettlewell eds. Cereal grain quality. Chapman & Hall, 478p.
37. **SHEWRY, P. R.** (2003): Tuber Storage Proteins. Annals of Botany 91: 755-769.
38. **STRAETKVERN, K. O., SCHWARZ, J. G., WIESENBERN, D. P., ZAFIRAKOS, E., LIHME, A.** (1999): Expanded bed adsorption for recovery of patatin from crude potato juice. Bioseparation. 7: 333 – 345.

39. **SVOBODA, I.** (2005): Situační a výhledová zpráva - Brambory. Ministerstvo zemědělství České republiky, 47 p.
40. **TONÓN, C., DALEO, G., OLIVA, C.** (2001): An acidic β -1,3 glucanase from potato tubers appears to be patatin. *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 849–854.
41. **VACULOVÁ, K.** (1994): Detekce a studium odrůd obilovin s maximální utilizací živin při zkrmování hospodářským zvířatům. Závěrečná zpráva, 13 - 14.
42. **WIJNHOLDS, RANGLES, N. J.** (1998): Recovery of protein from potato starch effluent. [citováno 29.3.2006].
http://www.emcentre.com/unepweb/tec_case/food_15/recovery/r1.htm.
43. **ZELENKA, S., ČURDA, K., BOHAČENKO, I.** (1983): Technologie krmiv a škrobu. 2. vyd. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 266 p.
44. **ZHIPING, W.** (2004): High Quality Potato Starch Process. World Potato Congress. [citováno 2.4.2006]. <http://www.potatocongress.org/sub.cfm?source=316>
45. **ZWIJNENBERG, H. J., KEMPERMAN, A. J. B., BOERRIGTER, M. E., LOTZ, M., DIJKSTERHUIS J. F., POULSEN, P. E., KOOPS, G-H.** (2002): Native protein recovery from potato fruit juice by ultrafiltration. *Desalination* 144: 331-334.