

**Izolace a identifikace mléčných proteinů  
chromatografickou metodou**  
**Isolation and Identification of Milk Proteins by  
Chromatography**

Bc. Filip Škrobák

---

Diplomová Práce  
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2013/2014

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Filip Škrobák**  
Osobní číslo: **T13788**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**  
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Izolace a identifikace mléčných proteinů chromatografickou metodou.**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Mléko ve vztahu k potravinářství a výrobky z něj
2. Chemické složení mléka
3. Izolační metody
4. Kapalinová rozdělovací chromatografie
5. Hmotnostní spektrometrie bílkovinných štěpů

### II. Praktická část

1. Izolace sérových frakcí mléčných proteinů
2. Detekce zvolených frakcí mléčných proteinů
3. Detekce získaných frakcí metodou hmotnostní spektrometrie
4. Diskuze
5. Závěr

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. FOX, P. ed.; MCSWEENEY, P.L.H. Dairy Chemistry and Biochemistry. London:Blackie Academic & Professional, 1998.
2. TOWLER, G.; SINNOTT, R. Separation of Fluids. 2013. ISBN:9780080966595.
3. VELÍŠEK, J. Chemie potravin 1. Vyd. 1. Tábor: OSSIS, 1999. 328 s. ISBN 8090239137.
4. Heftmann, E. Chromatography: Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods – Part A: Fundamentals and techniques. Elsevier, 2004. ISBN:0080472249
5. Hoffmann, E. Stroobant, V. Mass Spectrometry: Principles and Applications. John Wiley & Sons, 2013

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Věra Halabalová, Ph.D.**

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání diplomové práce:

**10. února 2014**


Termín odevzdání diplomové práce:

**2. května 2014**

Ve Zlíně dne 10. února 2014



doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



Ing. Jiří Mlček, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: Filip Šnrobek, Bc.

Obor: TKU-TVP

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby<sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3<sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60<sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60<sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 21.4.2017



<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3.

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užíje-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo.

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

Obrovské poděkování patří paní doktorce Věře Halabalové, za všechny cenné rady, připomínky a za všechny dlouhé dny plné trpělivosti strávené v laboratoři při měření. Další neméně poděkování patří mé rodině. Měli obrovskou, opravdu obrovskou trpělivost...

*„ a Mami, i když to nebylo lehké, moc děkuji za všechno“*

*„Hlavně se pokaždé zhluboka nadechni, nikdy nevíš, na jak dlouho budeš pod vodou...“*

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce se zabývá problematikou mléčných proteinů. Obecně popisuje základní použití v potravinářství, chemické složení a analytické metody. Přesněji se soustředíme na postupy pro jejich izolaci a identifikaci pomocí chromatografie. Během vlastní práce bylo stanoveno mnoho vzorků. Výsledkem práce je souhrn metod popisující postupy izolace a i konečné frakce izolovaných proteinů. Byla odzkoušena i metoda hmotnostní spektrometrie, která byla použita jako ukázková metoda.

Klíčová slova: Mléko, Proteiny, Izolace, Chromatografie, Hmotnostní spektrometrie

## **ABSTRACT**

This thesis deals with the milk proteins. Generally describes the basic use in the food industry, chemical composition and analytical methods. Strictly concentration for isolation and identification by chromatography. During their work was the determination of many samples. The result is a collection of methods describing the procedures of isolation and even the final fraction of isolated proteins. It was also tested by mass spectrometry, which was used as a sample method.

Keywords: Milk, Proteins, Isolations, Chromatography, Mass spectrometry

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 MLÉKO VE VZTAHU K POTRAVINÁŘSTVÍ A VÝROBKY Z NĚJ</b> .....	<b>12</b>
1.1 CHARAKTERISTIKA MLÉKA.....	12
1.2 KRAVSKÉ MLÉKO A POŽADAVKY NA JEHO ZDRAVOTNÍ NEZÁVADNOST .....	12
1.2.1 Zajištění zdravotní nezávadnosti konzumního mléka .....	13
1.3 MLÉČNÉ VÝROBKY .....	14
1.3.1 Princip výroby plnotučného, polotučného a nízkotučného mléka .....	15
1.3.2 Princip výroby sýru .....	15
1.3.3 Princip výroby mléčně kysaných výrobků .....	15
1.3.4 Princip sprejově sušených výrobků.....	16
<b>2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ KRAVSKÉHO MLÉKA</b> .....	<b>17</b>
2.1 BÍLKOVINY MLÉKA.....	17
2.1.1 Kaseiny.....	18
2.1.2 Sérové bílkoviny .....	19
2.2 MLÉČNÝ TUK .....	20
2.3 MLÉČNÝ CUKR .....	21
2.3.1 Laktóza.....	21
2.4 OSTATNÍ SLOŽKY MLÉKA .....	22
<b>3 IZOLAČNÍ METODY</b> .....	<b>23</b>
3.1 PŘÍPRAVA VZORKU.....	23
3.1.1 Izolace tuku .....	23
3.1.2 Izolace kaseinu .....	24
3.2 IZOLACE SÉROVÝCH PROTEINŮ.....	24
3.2.1 Vysolení pomocí síranu amonného .....	24
3.2.2 Izoelektrický bod.....	25
3.2.3 Dialýza .....	25
3.2.4 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.....	25
<b>4 KAPALINOVÁ ROZDĚLOVACÍ CHROMATOGRRAFIE</b> .....	<b>28</b>
4.1.1 Způsob vyhodnocení metody z chromatogramu .....	29
4.1.2 Typy chromatografie použité ke stanovení sérových proteinů .....	29
4.1.3 Vyhodnocení koncentrace frakcí proteinů dle Bradfordové .....	30
<b>5 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE BÍLKOVINNÝCH ŠTĚPŮ</b> .....	<b>31</b>
<b>6 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>33</b>
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>34</b>
<b>7 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE</b> .....	<b>35</b>
7.1 CHEMIKÁLIE.....	35
7.2 PŘÍSTROJE .....	36
<b>8 IZOLACE FRAKČÍ MLÉČNÝCH PROTEINŮ</b> .....	<b>37</b>
8.1.1 Odstranění tuku .....	37
8.1.2 Odstranění kaseinu .....	37



8.1.3	Izolace sérových proteinů .....	39
8.1.4	Dialýza vysolených sérových proteinů .....	41
<b>9</b>	<b>DETEKCE ZVOLENÝCH FRAKČÍ MLÉČNÝCH PROTEINŮ .....</b>	<b>43</b>
9.1	METODA IEC .....	43
9.2	POSTUP PŘÍPRAVY VZORKU PRO IEC ČISTÁ SYROVÁTKA.....	45
9.2.1	Základní úprava.....	45
9.2.2	Izolace sérových proteinů .....	45
9.3	METODA GPC .....	45
9.4	PŘÍPRAVA VZORKU PRO METODU GPC VZOREK - MLÉKA Z MLÉKOMATU .....	46
9.4.1	Základní úprava vzorku mléka z mlékomatu .....	46
9.4.2	Izolace sérových proteinů .....	46
9.5	ELEKTROFORÉZA ZÍSKANÝCH FRAKČÍ .....	47
<b>10</b>	<b>DETEKCE ZÍSKANÝCH FRAKČÍ METODOU HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.....</b>	<b>49</b>
<b>11</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>50</b>
11.1	MANIPULACE SE VZORKY .....	50
11.2	IZOLAČNÍ METODY .....	50
	<i>Izolace pomocí pH.....</i>	<i>50</i>
	<i>Izolace pomocí síranu amonného.....</i>	<i>50</i>
11.3	VYHODNOCENÍ CHROMATOGRAFICKÝCH A ELEKTROFORETICKÝCH STANOVENÍ.....	52
11.3.1	Syrovátka – metoda IEC–katex.....	52
11.3.2	Mléko z mlékomatu – metoda IEC – katex a následný IEC – anex FT .....	54
11.3.3	Mlezivo – metoda GPC .....	59
11.3.4	Mléko z mlékomatu – metoda GPC .....	61
11.4	SROVNÁNÍ METODY IEC A GPC.....	63
11.5	SROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ PRÁCE S ODBORNOU LITERATUROU.....	65
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>67</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>68</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>72</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>73</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>75</b>

## ÚVOD

Tato diplomová práce se zabývá dělením a detekcí mléčných proteinů a přímo navazuje na předchozí bakalářskou práci a odzkoušení funkčnosti metod, které již byly popsány předtím. Jako vzorek bylo zvoleno mléko kravské a to z důvodu jeho nezastupitelné role v potravinářství. Vždy bylo nutno izolovat danou skupinu proteinů. Proteiny mléka, kaseiny nebo sérové proteiny, zaznamenávají „BOOM“ v celosvětovém průmyslu a to ve všech odvětvích. Lze je využít napříč spektrem přes potravinářství, výrobu plastů, lepidel, farmaceutický průmysl a mnohá další odvětví. V základu této práce se opět jedná o rozbor mléka. Příprava vzorků se sestávala vždy ze základních kroků. Odstraněním tuku a kaseinů se získala směs sérových proteinů, které byly dále podrobeny dělicím a detekčním metodám. Nejúčinnější detekční metodou pro sérové proteiny je kapalinová rozdělovací chromatografie. Během analýzy se v koloně směs proteinů rozdělila na jednotlivé frakce. Byly použity 2 typy kapalinové chromatografie: **HPLC-GPC a IEC**.

U získaných frakcí, byly jednotlivé proteiny určeny **elektroforézou v akrylamidovém gelu**. Bylo provedeno na desítky analýz a při opakovaném dělení proteinů v konstantních polohách byla zavedena další detekční analýza a to **hmotnostní spektrometrie**. Jednotlivé bílkovinné frakce se izolovaly z gelu komplexním postupem za zisku trypsinových štěpů jednotlivých proteinů a ty poté byly podrobeny analýze na hmotnostním spektrometru.

Vlastní práce je zaměřena na mléčné sérové proteiny, jelikož kaseinové frakce jsou stabilní a lehce dělitelné, jejich původ je ovšem v mléku, a to znamená že je popsáno i nenahraditelné zastoupení mléka na poli potravinářské výroby.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 MLÉKO VE VZTAHU K POTRAVINÁŘSTVÍ A VÝROBKY Z NĚJ

Mléko hraje nezastupitelnou úlohu ve výživě lidstva. Člověk ji přijímá jako první stravu hned po narození. V celosvětovém měřítku jde produkce mléka přes miliony litrů ročně a nejvíce se zpracovává mléko **kravské**, následuje ho mléko **buvolí, ovčí a kozí**. V Evropě se setkáváme výhradně s mlékem kravským, v České republice je však zastoupeno i ve větší míře mléko kozí a ovčí. Naopak v zemích severní a jižní Ameriky se setkáváme s velkým zastoupením mléka buvolího, ale stále nedosahuje spotřeby mléka kravského. Celkově na světě existuje pře 4000 druhů mlék a pouze zlomek je lidstvu znám do té míry, že se dá s přesností identifikovat. [1,8]

### 1.1 Charakteristika mléka

Mléko je sekret mléčné žlázy samic savčího rodu. Ve svém složení se neliší ať se jedná o velrybu, koně, psa nebo člověka. Nacházejí se však rozdíly v zastoupení jednotlivých komponent. Mléko je bílá tekutina, nasládlé chuti a vůně. Primárně určená k výživě mláďate (novorozeněte). Obsahuje všechny důležité výživové faktory pro správný růst a mentální vývoj jedince. [1,8,10]

Mléka dělíme na **zralá a nezralá**. Mezi nezralá mléka řadíme **mlezivo a aberantní mléko**. Mlezivo se vyskytuje asi 5 dní před a 3 dny po porodu. Od mléka se liší velice výrazně. Má tmavší barvu, je méně viskózní a v neposlední řadě se odlišuje i pachem. Takové mléko se nezpracovává a během pár dnů po porodu se složky mléka stabilizují do podoby, nám již komerčně známého mléka. Proto po stabilizaci složek se již jedná o mléka zralá a ty se dále dělí na **kaseinová a albuminová**. S aberantním mlékem se můžeme setkat při hormonální nemoci samců. Toto mléko se taktéž do výroby nezařazuje. [1,3]

Základním kritériem pro dělení mlék do těchto kategorií je obsah bílkovinných složek. Tam kde přesahují kaseiny v poměru 80/20% ku sérovým proteinům hovoříme o kaseinovém mléku. Typickým kaseinovým zástupcem, je mléko přežvýkavců, a to **kravské, kozí, ovčí a buvolí**. Tam kde jsou naopak ve větším množství zastoupeny sérové proteiny, lze hovořit o albuminovém mléku, které je produkováno všežravci a to včetně člověka. [1,2]

### 1.2 Kravské mléko a požadavky na jeho zdravotní nezávadnost

Nejvíce zastoupeným mlékem v potravinářském průmyslu je mléko kravské. Produkce přesahuje **milióny** litrů ročně. Řadí se mezi **kaseinová mléka**. Před samotným použitím

mléka je nutné zjistit, zda je vhodné pro potravinářské zpracování. K tomu slouží celá řada spolehlivých testů. Základním testem je sensorická analýza, dále pak stanovení počtu somatických buněk, stanovení přítomnosti residuí inhibičních látek a v neposlední řadě i mikrobiologické rozbory. Jako zajištění zdravotní nezávadnosti je v technologii taktéž zahrnuto tepelné ošetření mléka. [3,6,7]

### 1.2.1 Zajištění zdravotní nezávadnosti konzumního mléka

Mléko je podrobena sensorické analýze, ale pouze **barvy a vůně**. Čerstvé mléko nelze posuzovat pomocí chuťové analýzy a to z důvodu možnosti kontaminace patogenními mikroorganismy. Zkouška barvy je důležitá z důvodu přítomnosti krve v mléku, anebo netypické barvy, kterou může mléko získat po nevyhovující sanitaci zařízení. Netypická vůně mléka je signalizací možné mikrobiální kontaminace. [8]

V mléku se stanovují **somatické buňky**, (SB) které jsou přítomny v každém mléku a jsou součástí obranného systému těla dojnice. Za průměrný obsah SB v mléku se považuje **100 000 – 250 000/ml**. V bazénovém vzorku mléka se stanoví celkový počet somatických buněk a přesáhne-li **400 000/ml**, mléko se nesmí zařadit do výroby. Tento ukazatel indikuje onemocnění stáda a možnou přítomnost patogenních mikroorganismů v mléce. [1,6]

Dalšími kroky pro zaručení zdravotní nezávadnosti je **tepelné ošetření mléka**. Jedná se o použití vhodné kombinace času a teplot za účelem dosažení obchodní sterility a tím i zvýšení údržnosti mléka. Pro mléko se používá **pasterace, sterilace a UHT záhřev**. [6]

**Pasterace** je tepelný záhřev po určitou dobu, kterým zničíme patogenní mikroorganismy, ale spory přežívají a mohou také přežít nepatogenní mikroorganismy. Za optimální dobu působení pasterační teploty se bere inaktivace **alkalické fosfatázy**, tato definice je dána Zákonem o potravinách 110/1993 Sb. Z technologického hlediska probíhá pasterace při teplotách do 100°C. [1,6]

**Sterilace** je tepelný záhřev nad 100 °C, při němž dochází k destrukci patogenních mikroorganismů, včetně jejich spor, ale nepatogenní mikroorganismy mohou přežít. Na sterilaci navazuje **UHT záhřev**, což je ošetření mléka, při kterém se využívá krátkého zahřání na teplotu cca 130°C. Od klasické sterilace se liší v tom, že se neprovádí nepřímou, přes nějaký přenašeč tepla (plechovka, sklenice), ale používá se přímý záhřev a to buď: **uperizace** – vstříknutí mléka do páry, nebo **palarizace** – vstříknutí páry do mléka. Bohužel po tomto

tepelném ošetření mléko ztrácí svou nasládlou a příjemnou chuť. Vytváří se zde disulfidické můstky a tím vařivá příchut' mléka.

Dosažení 100% sterility, tedy zničení všech mikroorganismů, není v potravinářství žádoucí. Došlo by k poškození, nebo destrukci důležitých komponent potravin a tím pádem i ke snížení výživové hodnoty, typického tvaru potravin a změně senzorických vlastností. [1,6]

**Residua inhibičních látek (RIL)** je jeden z parametrů, který pojednává o zbytkové přítomnosti antibiotik. Veškerá povolená antibiotika, která mohou být podána skotu v rámci léčby jsou předepsána v Zákoně o veterinární péči 166/1997 Sb. Před opětovným zařazením mléka do svozu musí uběhnout od posledního podání léku dojnici **ochranná lhůta 28 dnů**. Přítomnost RIL je nežádoucí ze dvou důvodů: první – při suplementaci organismu člověka může dojít k vytvoření resistance na antibiotika a následným komplikacím při léčení vážných nemocí. Druhý důvod – budou-li přítomny RIL v mléku pro zpracování na mléčně kysané výrobky (MKV) a může dojít k zastavení nebo zpomalení kysání MKV. [1]

**Mikrobiologické rozbory (MO)**, mléko jako takové je automaticky podrobováno MO rozborům, ale tento krok by mohl být vynechán, a to z důvodu tepelných ošetření, bez kterých se dnešní provozy neobejdou. Ovšem v Zákoně o veterinární péči 166/1997 Sb. je zakotvena poučka, která vyžaduje obsah celkový počet mikroorganismů (CPM) 100 000 CFU/ml. [8]

### 1.3 Mléčné výrobky

Technologie mléka v potravinářském průmyslu je velmi rozsáhlá, komplikovaná a v neposlední řadě zajímavá. Veškeré technologie kombinují „jednoduché“ operace a úpravy syrového mléka. Prvním krokem je zabezpečení zdravotní nezávadnosti a druhým krokem je výroba konečného produktu. Výrobek musí být vždy **po dobu použitelnosti zdravotně nezávadný**, po uplynutí této doby je nutno výrobek vyjmout z prodeje. Většina mléčných výrobků, je již ve svém základu tepelně ošetřena a to buď před úpravou na finální výrobek např. výroba sýrů, nebo až po ukončení výrobní technologie např. termix.

Celosvětově je nejvíce odbytové tekuté mléko. Dalším nejvíce spotřebovávaným artiklem jsou jogurty následovány sýry. Jogurty se vyrábí v nesčetném množství příchutí. Spotřebitelé nejčastěji upřednostňují ochucené, před „klasickými“ bílými jogurty. Na poli sýrů jsou nejvíce spotřebovávané sýry tvrdé a polotvrdé. Naopak v pozadí se vyskytují sýry tavené.

Bohužel za jejich menší spotřebu může z části i reklama postavená vůči tzv. éčkám, a proto lidé raději volí variantu tvrdých nebo přírodních sýrů. Nejmenší zastoupení na trhu mají sušené výrobky, ale i přesto zaujímají ve svém odvětví velký význam a to z důvodu výživových preparátů, součást kosmetiky, farmakochemie, lepidla a mnohé další. [1,8,10]

### 1.3.1 Princip výroby plnotučného, polotučného a nízkotučného mléka

Ve všech třech případech je technologie výroby totožná, mléko je přivedeno na odstředivku, kde se odděluje smetana cca 40 hm.% a mléko s obsahem tuku cca 0,003 hm.%. Smetana je podrobena standardizaci, kdy dojde ke zmenšení tukových kuliček, aby se zabránilo vyvstávání smetany na povrch. Takto oddělené a upravené komponenty mléka se potrubím dopravují do **deskového pasteru**. Dojde k tepelnému ošetření mléka, které zaručí obchodní sterilitu a následně se v aseptickém prostředí míchá na požadovanou tučnost. Nízkotučné 0,5 hm.%, polotučné 1,5 hm.% a plnotučné 3,5 hm.% tuku. [6]

### 1.3.2 Princip výroby sýru

Základem je tepelně ošetřené mléko, které je smícháno na požadovanou tučnost. Při výrobě se uplatňují bílkoviny, které jsou „vysráženy“ buď pomocí **syřidla** (tvrdé, polotvrdé a přírodní sýry), nebo pomocí mikroorganismů a poklesu pH k **izoelektrickému bodu** (tvarohy). Další technologie výroby sýrů spočívá v částečném „roztavení bílkovin“ a vytvoření roztíratelné konzistence tvrdého sýru, zde se využívají **tavicí soli** (tavené sýry). Je tedy patrné, že hlavní roli ve výrobě sýrů hrají mléčné bílkoviny a způsob jejich vysrážení a dalších modifikací. Pomocí syřidla vznikají sýry sladké a pomocí mikroorganismů sýry kyselé. Mikroorganismy se uplatňují buď jako **primární** výrobní postup, kdy vzniká díky jejich působení sýr, nebo jako **sekundární** a slouží k vytvoření typických aromat, chuťových látek a požadované konzistence (niva, hermelín a tvarůžky). [1,7,8]

### 1.3.3 Princip výroby mléčně kysaných výrobků

Mléčně kysané výrobky, jsou výrobky v jejichž výrobní technologii jsou zahrnuty bakterie mléčného kvašení (BMK). Tepelně ošetřené mléko požadované tučnosti je zaočkováno šlechtěnými kulturami mikroorganismů. Působením mikroorganismů vznikají látky vytvářející typickou chuť a strukturu mléčně kysaných výrobků. Jedná se o výrobky velmi oblíbené: jogurty, termixy a nápoje (např. keřirová mléka). [8]

#### **1.3.4 Princip sprejově sušených výrobků**

Mléko o požadované tučnosti je přivedeno na do sprejové sušárny. Zde se rozstříkne do prostoru a část vody je odpařena. Vzniká kyprý prášek, který je u dna sušárny míchán, aby se zabránilo násekům na stěny sušárny. Takto sušené výrobky jsou nejčastěji používány jako dochucovací prostředky nebo nutriční přípravky (smetana do kávy, sušené bílkoviny).

[8,10]



## 2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ KRAVSKÉHO MLÉKA

Kravské mléko je z analytického hlediska velmi dobře známo. Patří ke zlomku asi 60 druhů mlék, které se dají bezpečně určit se 100% jistotou. Jako v každé potravíně má největší zastoupení: voda asi 87-89 hm.%, dále obsahuje 3,5 hm.% tuku, 4,5 hm.% laktózy, 3,2 hm.% bílkovin 0,2 hm.% minerálních látek a další minoritní komponenty (vitaminy, plyny). Jednotlivé komponenty mohou různě klesat, závisí na fázi laktace, druhu dojnice, stáří dojnice, ročním období, na velikosti krmné dávky, způsob chovu a mnohé další faktory. [1,3,7,8]

Lze tedy o mléce hovořit jako o **polydisperzním systému**, který je zajišťován na třech úrovních. Ve formě emulze je v mléku přítomen tuk, jakožto tukové kuličky, jejichž povrch tvoří bílkoviny. **Koloidní disperzi** tvoří bílkovinné frakce a **pravý roztok** je zde zastoupen rozpuštěnou laktózou a solemi minerálních látek. [7,10]

### 2.1 Bílkoviny mléka

Bílkoviny přítomny mléku se v přírodě vyskytují pouze u savců. Mléčné bílkoviny dělíme na dva druhy: **kaseiny** a **sérové proteiny**. Jedná se o polypeptidy, které jsou strukturně složeny z 20 základních kódovaných aminokyselin. Aminokyselina má ve své struktuře  $-NH_2$  a  $-COOH$  skupinu a následně se liší svým postranním řetězcem. Jednotlivé aminokyseliny jsou spojeny vazbou  $-CO-NH-$ , tedy **peptidovou vazbou**. [1,3]

Dále bílkoviny charakterizuje jejich výživová hodnota pro člověka a to závisí na obsahu tzv. **esenciálních aminokyselin (EAK)**. Takovéto aminokyseliny nejsou syntetizovány v organismu a je proto nutné je přijímat v potravě. Mléčné bílkoviny **obsahují všechny EAK (valin, leucin, isoleucin, treonin, metionin, tryptofan, lysin a fenylalanin)** [3,7]

Nezbytně důležitou vlastností, kterou je nutné znát, pro jakoukoliv práci s mléčnými bílkoviny, je hodnota **izoelektrického bodu**. V tomto bodě je vyrovnán počet kladných a záporných nábojů molekul bílkoviny a dochází k její **precipitaci**.

Vyšší struktury proteinů, **základní (primární) struktura** je dána počtem a pořadím aminokyselin, denurací se nemění a její změna nastává, až pomocí peptidáz. **Sekundární struktura** je tvořena pomocí vodíkových a sulfidických můstků. Sekundární struktury jsou nejčastěji  **$\alpha$ -helix**,  **$\beta$ -list** a  **$\beta$ -ohyb**. Terciární a kvartérní struktura se vytváří již pomocí komplikovanějších vazeb. Veškeré vyšší struktury, než primární, podléhají denuraci a s jejich zaniknutím dochází i k zániku biologické aktivity proteinu, nebo enzymu. [1,3,7]

### 2.1.1 Kaseiny

Je-li obecně uváděný obsah bílkovin v kravském mléce cca 3,2g/100ml je obsah kaseinů 80% a to 2,6g. Kaseiny řadíme mezi fosfoproteiny. Ve své molekule mají zabudované zbytky kyseliny fosforečné, které jim udávají částečně polární charakter a díky nim mohou být dispergovány ve vodném roztoku. Existuje několik genetických variací odlišujících se podle velikosti, počtu fosfoserinových zbytků a polarity. [1,3]

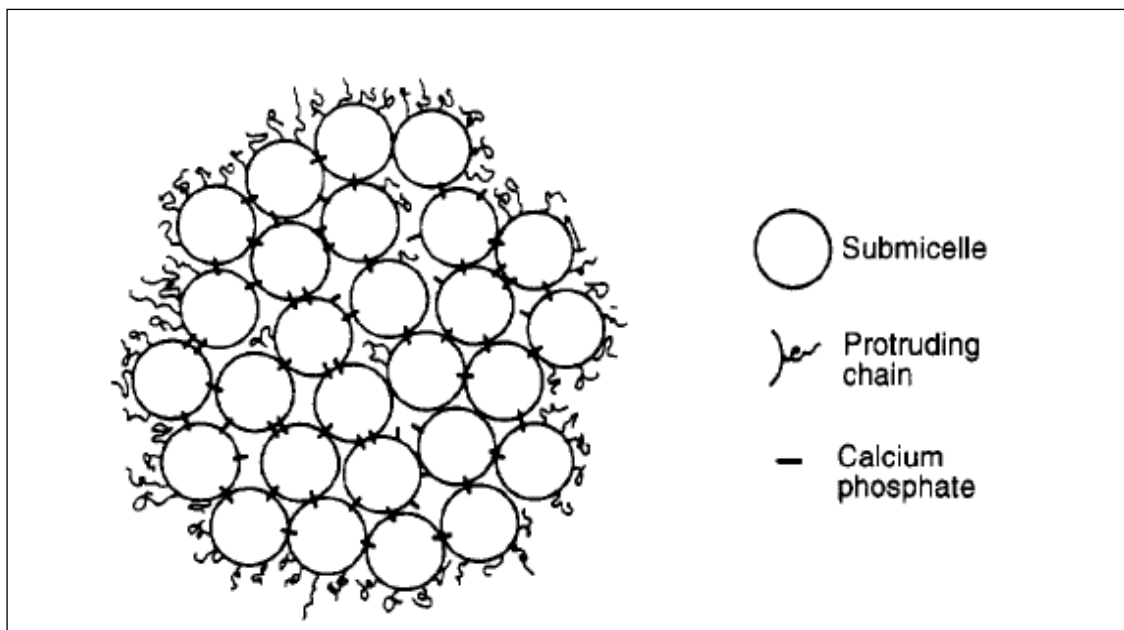
**TAB.Č1. Chemické parametry frakcí kaseinů [1,7]**

Frakce	molární hmotnost Da	Počet aminokyselin	Tvorba micely
<b>αs – kasein</b>	23 500 – 25 500	199 – 207	Jádro micely, je náchylný na Ca <sup>2+</sup>
<b>β – kasein</b>	24 000	209	Jádro micely, je náchylný na Ca <sup>2+</sup>
<b>κ – kasein</b>	19 000	169	Tvoří obal micely, díky polárnímu řetězci a jednomu FSZ
<b>γ - kasein</b>	11 500 – 20 000	102 – 181	Jádro micely, méně citlivý na Ca <sup>2+</sup>

Kaseiny, v důsledku své polarity, tvoří v roztoku **micely** (OBR. č.1.). Kaseinová micela je tvořena všemi frakcemi kaseinů α,β,γ a κ. Jejich stabilizace je dána hydrofobními reakcemi, vodíkovými můstky a vápenatými ionty. Kaseiny jsou náchylné k přítomnosti volných Ca<sup>2+</sup>, nebyly by frakce chráněny, došlo by k precipitaci. Ochrana spočívá v uzavření frakcí náchylných na přítomnost vápenatých iontů (αs, β, γ) uvnitř a zbylá frakce κ tvoří obal. Frakce κ nejsou náchylné k účinkům vápenatých iontů, protože obsahují jen jeden fosfoserinový zbytek a tím pádem se nedokáže vytvořit v kaseinu příčný můstek R–Ca–R. Tato vazba je též někdy nazývána jako **koloidní kalcium fosfát** a uplatňuje se i při stabilizaci micely. Při sladkém srážení kaseinu je κ – kasein hydrolyzován pomocí enzymů na dva štěpy. První se nazývá para κ – kasein a druhý glykomakropeptid (GMP), který poté přechází do sérových proteinů.

Další důležitou vlastností kaseinu je **termostabilita**. I po zahřívání na teplotu varu vody nedochází po dobu cca 24 hodin k denaturaci, sérové proteiny kompletně denaturují již při teplotě 90°C během 10 minut. Termostabilita je dána uspořádáním vyšších sekundárních, terciárních a kvartérních struktur. Sérové proteiny vyšší struktury netvoří. [1,3,7]

OBR. Č1. Kaseinová micela [1]



Průmyslová hodnota izoelektrického bodu kaseinu se uvádí v okolí pH 4,3-4,6. Kaseiny jsou náchylné ke změně pH. Při dosažení hodnoty pI se otevře obal kaseinové micely a dochází k precipitaci kaseinu. Následnou změnou pH jde zčásti kaseinovou micelu opět stabilizovat. Sérové proteiny jsou vůči účinku pH stabilnější a to opět díky tomu, že netvoří vyšší struktury proteinu. Technologická vlastnost **vaznost vody proteinu**. Na 1g proteinu připadá/2,7g vody.

U kaseinu je důležité zmínit taktéž i jeho možnou nesnášenlivost s konzumentem. Jedná se o **alergii na mléčnou bílkovinu**. Na poli veřejnosti není příliš známá a je často nesprávně spojována s laktózovou intolerancí. [1,3,10]

### 2.1.2 Sérové bílkoviny

Jedná se o druhou poměrně rozsáhlou frakci mléčných proteinů. Celkový obsah sérových proteinů v kravském mléce je 0,6g/100ml, tedy 20 hm.% všech bílkovin. Jsou obsaženy v mléčném séru. Jejich funkce v lidském organismu spočívá ve tvorbě imunitního systému jedince. Obecně netvoří micely, nejsou termostabilní, lehce denaturují při zahřátí. Díky této lehké denaturaci dokáží ve své struktuře zadržet vodu. Tento jev je žádoucí při výrobě jogurtů, naopak nežádoucí při výrobě tvrdých sýrů. Nejsou náchylné ke změně pH. Všechny sérové proteiny jsou plnohodnotné bílkoviny. Jejich využití je hlavně jako výživový preparát pro sportovce, kosmetické přípravky a doplněk stravy. **Laktoferrin** ve své struk-

tuře váže molekulu železa a tím pádem se účastní redoxních reakcí v těle a je součástí tvorby imunitních látek.

Do skupiny sérových proteinů zahrnujeme:  **$\alpha$ -laktalbumin (50 hm.%),  $\beta$ -laktoglobulin (20 hm.%), krevní sérum albumin (10hm.%), laktoferrin, imunoglobulin 1 a 2, glykomakropeptid a řadu enzymů.** [1,3,7]

**TAB. Č2. Chemické parametry sérových bílkovin [7]**

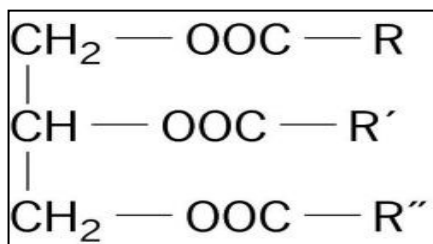
	molární hmotnost DA	Počet aminokyselin	Uplatnění
<b><math>\alpha</math>-laktalbumin</b>	14 200	162	Enzymové aparáty, výroba sýrů
<b><math>\beta</math>-laktoglobulin</b>	18 400	123	Enzymové aparáty, výroba sýrů
<b>Krevní sérum albumin</b>	10 000 -15 000	Různé genetické variace 100-120	Obranyschopnost organismu
<b>Laktoferrin</b>	76000 - 86000	Více než 200	Baktericidní vlast- nosti mléka
<b>Imunoglobulin</b>	70 000 <	Více než 200	Součást imunitního systému
<b>glykomakropeptid</b>	Záleží na typu hyd- rolyzované vazby	—	Štěp K – kaseinu

## 2.2 Mléčný tuk

Jedením z nekvalitnějších tuků v potravinářství je mléčný tuk jehož obsah se pohybuje v rozmezí 2,5-4,6 hm.%. Obsah tuku je tedy cca 3,5g/100ml mléka. Tuk je obecně složen z glycerolu a na něj vázaných mastných kyselin pomocí esterových vazeb. Jedná se o triacylglycerol. Je zde nutné uvést i **doprovodné látky lipidů**. Jelikož jsou to látky rozpustné v tucích a patří sem především **vitaminy lipofilního charakteru**, o kterých bude pojednáno níže. [1,3,9]

Důležitou vlastností tuku je jeho teplota tání specifikována **bodem tání**. Závisí na obsahu nenasyčených mastných kyselin (NMK). Čím více dvojných vazeb v řetězci a blíže k –COOH konci molekuly, tím nižší bod tání, proto jsou oleje tekuté a naopak čím vyšší obsah sudých uhlíků v řetězci a bez dvojných vazeb, tím je bod tání vyšší. Klasický mléčný tuk obsahuje více nasycených mastných kyselin a proto je jeho konzistence tužší. [1,3,9]

#### OBR. Č2. Obecný vzorec triacylglycerolu [7]



Vznik triacylglycerolu je dán esterifikační reakcí. Esterová vazba je R-OOC-R. V organismu dojnice probíhá za pomoci specifických enzymů esteráz. Na pozici R, R', R'' jsou navázány mastné kyseliny.

### 2.3 Mléčný cukr

Sacharidy jsou strukturně polyhydroxyaldehydy a polyhydroxyketony. Aby se dalo hovořit o sacharidu musí ve své molekule obsahovat minimálně jeden chirální (opticky aktivní) uhlík. Chiralita je dána čtyřmi různými substituenty na uhlíku. Rozlišuje se úhel stáčení roviny polarizovaného světla na L (levá) a D (pravá) forma. Další kritériem pro rozdělení sacharidů je reakce s fehlingovými činidly, tzv. redukující cukry. Takovýto sacharid má volnou poloacetalovou skupinu na prvním uhlíku a může se uplatňovat v řadě potravinářsky významných reakcích. [1,3]

Další dělení podléhá počtu jednotek sacharidu v řetězci: monosacharidy (jedna jednotka), oligosacharidy (dvě až deset jednotek) a polysacharidy (10 a více jednotek). Jsou spojeny glykosidovou vazbou. [1,3]

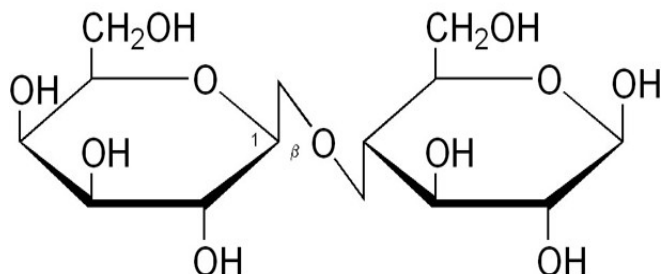
#### 2.3.1 Laktóza

Obsah cukru v mléce je cca 4,5 hm.% a obsah může kolísat. Laktóza je disacharid, složený z monosacharidických jednotek glukózy a galaktózy spojených  $\beta$  1  $\rightarrow$  4 glykosidovou vazbou. Jedná se o redukující cukr. Má menší sladivost než standard sacharózy. [1,3]

Mléčný cukr je spojován i s onemocněním – tzv. **laktózová intolerance**. Jedná se o onemocnění, které postihuje většinou obyvatele afrického kontinentu a východní Evropy. Je způsobeno nedostatkem enzymu laktázy, která je schopna hydrolyzovat laktózu na jednoduché cukry, ještě v tenkém střevě. Není-li v dostatečném množství přítomen enzym v těle

člověka, je laktóza trávena, až v tlustém střevě mikroflórou tlustého střeva, dochází k tvorbě plynu a vzniku zažívacích problémů. [1,3,10]

**OBR. Č3. Vzorec Laktózy [1]**



## 2.4 Ostatní složky mléka

Další neméně významnými složkami mléka, které hrají ve výživě člověka nezastupitelnou roli jsou vitaminy, min. látky a enzymy. **Vitaminy** – a to především skupiny B, C a rozpustné v tucích. Jsou součástí biochemických reakcí v těle a jejich nedostatek, nebo úplná absence, má za následek zhoršení stavu organismu člověka. Jsou řazeny mezi esenciální látky, které člověk nedokáže ve svém organismu syntetizovat.

Z **minerálních látek** jsou zastoupené v mléce Ca, P, Na, Fe a mnohé další, jejich obsah se mění a je ovlivněn vegetační dobou dojníc. Minerály jsou součástí kostí, enzymů, krve a uplatňují se jako katalyzátory biochemických reakcí.

Třetí skupinou jsou, již u bílkovin zmíněné, **enzymy**. Jedná se o bílkoviny s vázanou ne-bílkovinnou složkou (kofaktor nebo prostetická skupina). Účastní se mnoha dějů a jsou ukazately pasterace. [1,3,8,10]

### 3 IZOLAČNÍ METODY

V potravinářském průmyslu je nejdůležitější správně oddělit potřebný segment potraviny. Při analýzách se musí pamatovat na to, že potravina je silně heterogenní materiál a je tvořena směsí látek různých vlastností. Vždy volíme metodu šetrnou pro zvolený segment izolované potraviny. Největší problémy se vyskytují u izolace enzymů, bílkovin a vitamínů, protože jejich stabilita je velmi ovlivňována vlivy prostředí. [2]

#### 3.1 Příprava vzorku

Zvolený segment pro izolaci: Sérové proteiny

Mléko je složeno z mnoha komponent, které by negativně mohly ovlivnit izolační metodu. Zprvu je nutné odstranit **tuk**. Vzorek, který obsahuje tuk nemůže být podroben většině izolačních metod, není-li stanoveným segmentem právě tuk. Ve své struktuře dokáže vázat většinu látek. Bílkoviny se částečně uplatňují při tvorbě obalu tukových kuliček a docházelo by ke zkreslení výsledku. [2,10,11]

Druhým nutným krokem je odstranění **kaseinu**. V jeho přítomnosti nedochází ke ztrátám sérových proteinů, ale ve výsledku by se nám promítl ve všech detekčních metodách, protože je to také bílkovina. [11,12,13,14,15]

##### 3.1.1 Izolace tuku

Izolace tuku je v případě mléka velmi jednoduchá. Není zapotřebí žádných komplikovaných extrakčních postupů, které by mohly ohrozit výslednou kvalitu bílkovin.

**Princip:** Tuk se v mléce nachází ve formě tukových kuliček. Obecně se nemísí s vodou a proto je v roztoku stabilizován díky proteinovým obalům. K mechanickému rozrušení tukových kuliček je použita **centrifugace**, kdy dochází k rozrušení proteinového obalu a ke shlukování tuku. Takto nechráněný tuk následně vyvstává na povrch. [2]

**Centrifugace** je specifická izolační metoda, kterou lze uplatnit v případech dvou nemísitelných kapalin, emulzí, čištění jemných suspenzí a při získávání biologického materiálu. Podle způsobu izolace ji zařazujeme mezi **sedimentační analýzu**. Obecně platí, že čím jemnější suspenze, tím je potřeba vyšších otáček k oddělení složek. Centrifugy dělíme podle počtu **G stupňů v rotačním poli** – na centrifugy, ultracentrifugy a megacentrifugy. Jednotky centrifugace lze uvádět jako sílu odstředění např. 100 000g, nebo jako otáčky rotoru 10 000RPM (rotate per minute). Oba způsoby zápisu lze použít. Další možností jak

zvýšit efektivitu odstředování je snížením, nebo zvýšením teploty při sedimentaci. Pro oddělení tuku je lepší pracovat při teplotě 2-10<sup>0</sup>C. Uplatnění bodu tuhnutí. [1,2]

Centrifugace nebyla použita pouze pro odstranění tuku, ale její vhodnou úpravou se docílilo i oddělení vysolené syrovátky z roztoku.

### 3.1.2 Izolace kaseinu

Odstranění kaseinu následuje po odstranění tuku. Uplatňuje se při částečné tvorbě obalu tukových kuliček. Z tohoto důvodu by izolační postup nebyl účinný a kasein by i nadále zůstal přítomen v roztoku. Pro izolaci kaseinu je použito **kyselé srážení**.

**Princip:** Precipitace kaseinu je dosažena pomocí změny pH na hodnotu **izoelektrického bodu** s následnou inkubací při teplotě 40<sup>0</sup>C po dobu 20-30 minut. Obecně udávaná hodnota izoelektrického bodu pI je 4,6. [1,15,16]

## 3.2 Izolace sérových proteinů

Po odstranění rušivých vlivů, které by mohly zkreslit analýzu, se přistupuje k hlavnímu úkonu a to k izolaci sérových proteinů. Sérové proteiny se musí vyzolovat jako směs proteinů. Ve většině literatury se nedoporučuje komplikovaný extrakční postup. Při extrakci jednotlivých frakcí dojde vždy k jejich denaturaci, možným reakcím s použitými činidly a nebo k jejich hydrolýze. Pro izolaci sérových proteinů jsou zvoleny metody, které umožní získat maximum proteinů a vytvořit tak **standardní syrovátku**. Hodnota standardní syrovátky obsahuje **0,62-0,63g** proteinů na 100ml, čehož lze docílit pomocí vysolovací metody, izoelektrického bodu a dialýzy. [1,17,18]

### 3.2.1 Vysolení pomocí síranu amonného

Pro izolaci sérových proteinů bylo zvoleno opakované vysolení pomocí síranu amonného. Jedná se o extrakční metodu, která je šetrná k sérovým proteinům.

**Princip:** Do vodného roztoku syrovátky je přidán tuhý síran amonný. Dochází ke koncentrační změně a následnému shluku proteinů a vytvoření jemné sraženiny. Opakované vysolení spočívá v opětovném přidavku síranu k vysolené sraženině. Centrifugací je tedy sraženina oddělena, opět rozpuštěna a vysolena. [10,19]



Takto získaná směs proteinů není nijak kvalitativně pozměněna a zachovává si svou biologickou strukturu a účinnost. Při opětovném rozpuštění ve vodě dochází ke změně koncentrace a struktura bílkovin se opět navrácí do normální podoby. [1,10,20]

### 3.2.2 Izoelektrický bod

Jedná se o stejný princip, jako v případě odstranění kaseinu. Rozdíl mezi postupem u kaseinu a sérovými proteiny je ten, že hodnota pI pro sérové proteiny je mezi 4,9 - 5,2. Tato hodnota je jako v předchozím případě podporována přidavkem, zásady, protože po odstranění kaseinu je hodnota pH syrovátky vždy nižší, než 4,5. [25,26]

**Princip:** Přidavkem roztoku NaOH do upravené syrovátky, dochází ke zvýšení hodnoty pH na hodnotu pI a tvorbě jemné bílé sraženiny, která je následně oddělena centrifugací a rozpuštěna v destilované vodě.

Ani při použití tohoto postupu nedochází k destrukci proteinů a jejich čistota je vyšší, než při vysolování pomocí síranů. [10,25,26,27]

### 3.2.3 Dialýza

Dialýza je izolační metoda, kterou získáme, až 99% čistého proteinu, při které nemůže dojít k denaturaci. Vždy je volen vhodný dialyzační roztok pro daný substrát.

**Princip:** Vložením substrátu do dialyzačního střeva, tvořeného polopropustnou strukturou a umístěním do dialyzačního pufru dochází k difúzním procesům. **Difúze** je vyrovnání koncentrace roztoků po koncentračním spádu bez dodání energie pro přenos.

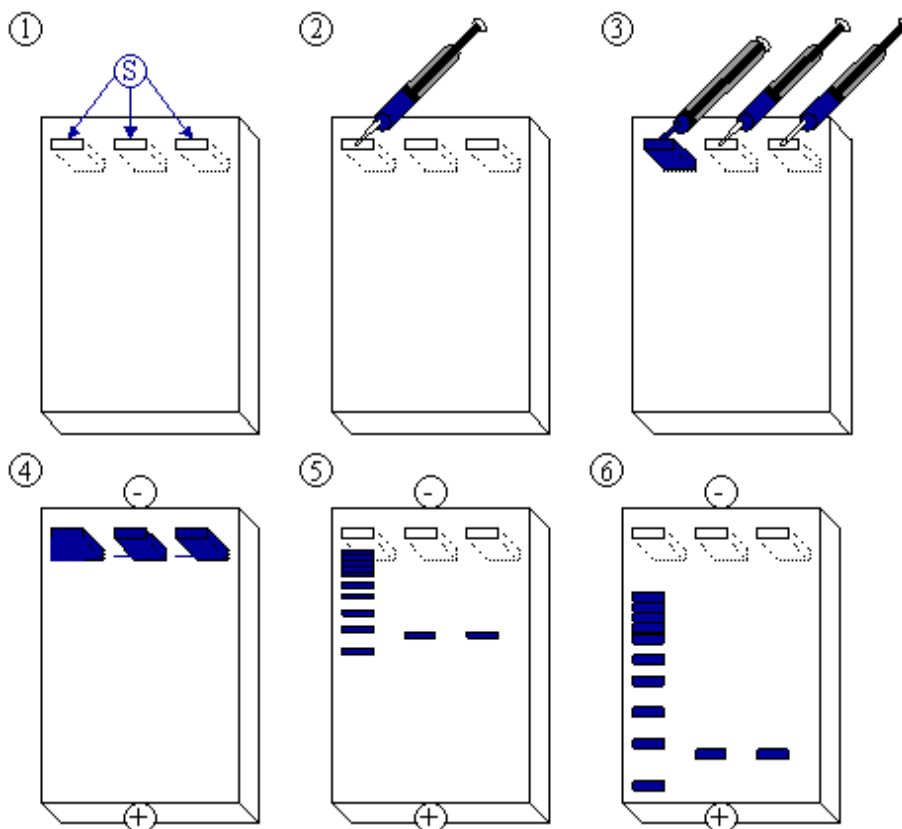
Tato metoda je zahrnuta hlavně jako izolační metoda pro odsolení sérových proteinů, kdy je nutno získat čistý protein bez amonných solí. [10,15,22]

### 3.2.4 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Jedná se o izolační metodu, která sloužila pro identifikaci jednotlivých frakcí, které byly odděleny pomocí kapalinové chromatografie. Gelová elektroforéza je jednou ze základních metod v analýze biomolekul, zejména při analýze nukleových kyselin a proteinů. Základem elektroforézy je gel, ve kterém dochází k dělení biomolekul. Podmínkou pro průběh elektroforézy je nutné, aby dělené molekuly nesly nenulový náboj.

**Princip:** Migrace iontu v elektrickém poli v gelu je dána jejich velikostí a silou náboje (OBR. Č.4.). Takto jsou při dostatečném času rozděleny veškeré molekuly. Po porovnání se standardy dochází k rozpoznání jednotlivých složek. [11,15,16,17,22,24]

**OBR. Č4. Elektroforetický postup analýzy [2]**



*Pozn.* Jednotlivé proteiny jsou dávkovány na start (S). Při průchodu proudem jsou jednotlivé frakce děleny podle své molekulové hmotnosti na bandy. V první řadě bývá dávkován tzv. marker (Tab. č.3.), který slouží jako molekulový žebřík s rozdílnými molekulovými hmotnostmi a slouží k rozpoznání složek frakce.

**TAB. Č3. Složení markeru pro identifikaci mléčných proteinů [38]**

<b>Složka markeru</b>	<b>Molární hmotnost (kDa)</b>
<b>Myosin (z masa skotu)</b>	<b>116</b>
<b>B-Galactosidase (genové inženýrství)</b>	<b>67</b>
<b>Albumin (BSA – ze skotu)</b>	<b>45</b>
<b>Albumin (vaječný extrakt)</b>	<b>29</b>
<b>Anhydrasa z krve skotu (enzym)</b>	<b>29</b>
<b>Trypsinový inhibitor (sojový extrakt)</b>	<b>21</b>
<b>Lysozym (vaječný extrakt)</b>	<b>14,3</b>
<b>Aprotinin (ze skotu)</b>	<b>6,5</b>

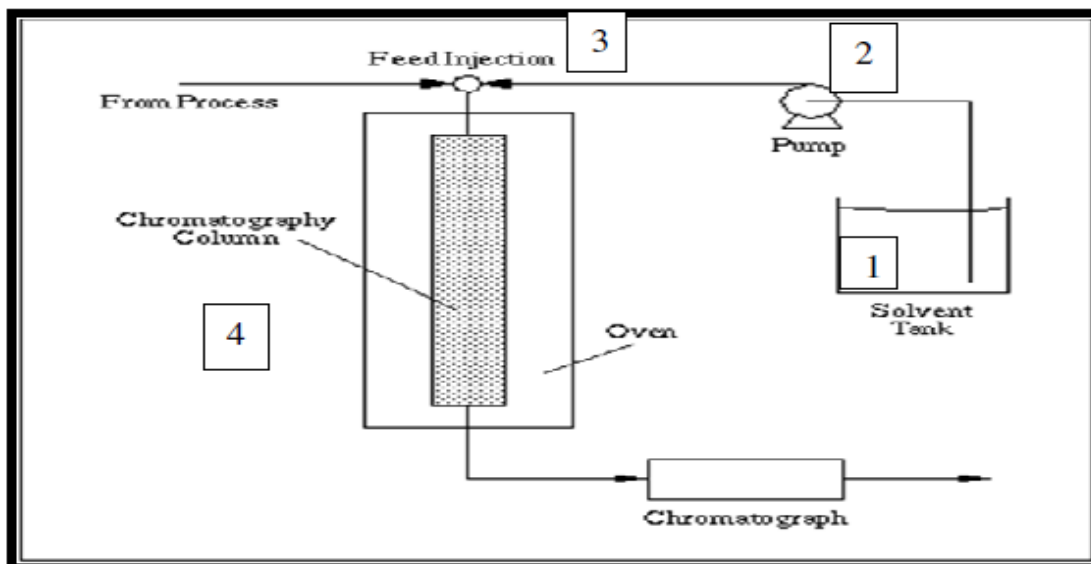
## 4 KAPALINOVÁ ROZDĚLOVACÍ CHROMATOGRRAFIE

Chromatografii jako první, na pole působnosti v odvětví analýzy, uvedl Michail Tswett. Jako prvním se mu povedlo rozdělit chlorofylová barviva pomocí tzv. malování v čase (chromo-čas, graf-kreslit). Pravda, v této době pana Tswetta se nedají srovnat možnost a přesnost dělicího procesu, ale princip zůstává nezměněn. Za svůj počín nicméně získal Nobelovu cenu. Chromatografie zažila největší rozkvět během 20. století, kdy se na světě objevila nejen papírová, ale i kapalinová a plynová chromatografie. [4]

**Princip:** Chromatografie spočívá v dělení látek, mezi stacionární (pevnou) a mobilní (pohyblivou) fází v čase.

Obecně analýza probíhá jednoduchým způsobem. Do chromatografické aparatury (chromatografu) (OBR. Č.5.) je dávkován vzorek pomocí **dávkovací smyčky (3)**. Po „nastříknutí vzorku“ je vzorek unášen pomocí **mobilní fáze**, kterou v pohybu udržuje **pumpa(2)**. Vlastní dělení probíhá v **koloně(4)**, která je naplněna **stacionární fází**. Po rozdělení jsou jednotlivé látky zachyceny na **detektoru** a zaznamenány do **chromatogramu**.

**OBR. Č5. Chromatograf [10]**



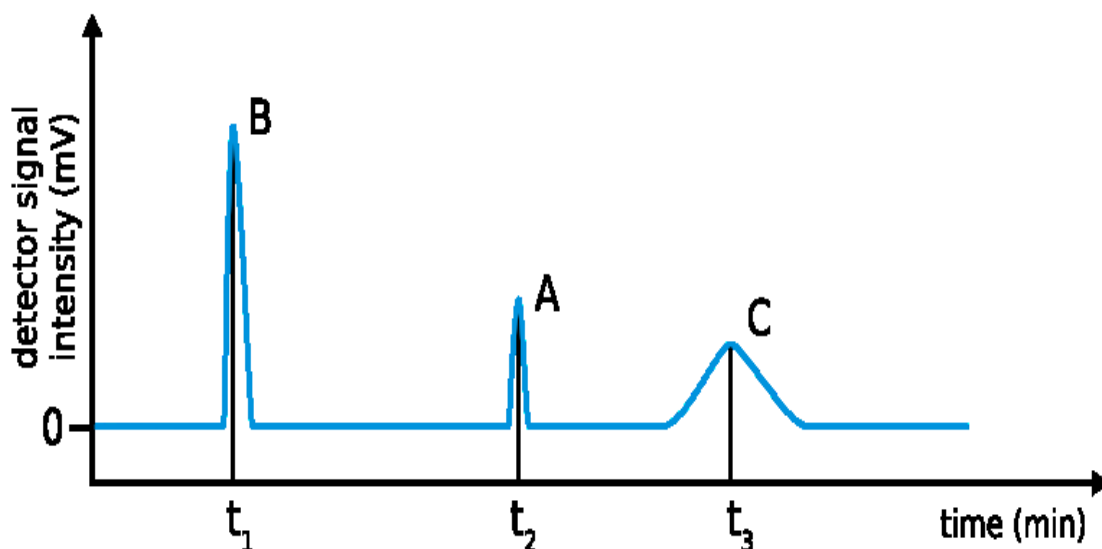
**Detektorů** existuje několik druhů. Pro účely stanovení bílkovin se nejčastěji používá **UV – detektor**. Měří se zde záření pohlcené peptidovými vazbami v proteinu při vlnové délce 280 nm. V této oblasti nejlépe proteiny absorbují dané záření. [4,10]

Dělicí proces můžeme nazvat dvěma způsoby: **Separace** – dělíme látky rozdílné molekulové hmotnosti a **frakcionace** – látky se liší v molekulové hmotnosti pouze minimálně.

#### 4.1.1 Způsob vyhodnocení metody z chromatogramu

Odezva detektoru je zaznamenávána pomocí **píků** (OBR. Č.6.), které odpovídají **retenčnímu času** stanovované látky. **Retenční čas** je doba, za kterou projde látka kolonou a je zaznamenána na detektoru. [4]

OBR. Č6. Chromatogram [4]



B, A, C – látky rozděleny pomocí chromatografie podle svých retenčních časů  $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$

Po získání chromatogramu se dají použít dva postupy vyhodnocení. **Metoda kalibrační křivky** je založena na sestavení kalibrační křivky o známých koncentracích stanovované látky. Následný výpočet obsahu látky ve vzorku se odvíjí od **rovnice regrese** ( $y=ax+b$ ). Druhý způsob vyhodnocení je **metoda standardu**. Není nutné vytvořit kalibrační křivku, ale je zde zahrnut softwarový výpočet plochy píku a následné porovnání s **retenčními časy standardu**.

#### 4.1.2 Typy chromatografie použité ke stanovení sérových proteinů

Ke stanovení sérových proteinů byly použity dva druhy chromatografie: iontoměničová chromatografie (IEC) a gelová permeační chromatografie (GPC). Tyto dvě metody lze zařadit do vysoko účinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Při použití **IEC** je stacionární fází silný katex nebo anex a jako mobilní fáze je použita iontová kapalina. Sérové proteiny jsou děleny z cca 90%. Na rozdíl od klasické kolony vlastnímu dělení předchází načerpání vzorku na kolonu. To co se nebylo navázáno na ko-

lonu se nazývá flow throw (FT). Vzorek je na kolonu čerpán do ustálení hodnoty detektoru. Lze do aparatury zakomponovat jak anexovou tak katexovou kolonu najednou. V další fázi jsou pomocí gradientové eluce (kombinování dvou mobilních fází) vyloučeny proteiny a následně detekovány na UV detektoru. Rychlost dělení proteinů závisí na jejich iontové síle, kterou jsou vázány na kolonu.

Gelová permeační chromatografie dělí sérové proteiny až z 99%. Stacionární fází zde tvoří porézní gel. Při dělení se molekuly o nejmenší velikosti dostávají hlouběji do pórů gelu a jejich průchod kolonou se zpomalují. Nejrychleji se vymývají ty proteiny, které mají největší molekulovou hmotnost. Na mobilní fází je kladen pouze jediný požadavek a to aby nereagovala s náplní gelu. [4,10]

### 4.1.3 Vyhodnocení koncentrace frakcí proteinů dle Bradfordové

Měření koncentrace vzorku dle Bradfordové je metoda, která se používá pro kvantifikaci proteinů. Podstatou metody je reakce proteinů s BioRad Protein Assay (komerční činidlo), čímž vzniká komplex tmavě červeného zbarvení a měří se absorbance vůči slepému vzorku.

**Princip:** Jedná se o spektrofotometrickou metodu, kdy je měřena absorbance upraveného vzorku při vlnové délce 595nm.

#### Výpočet:

$$C = (A * (V_{\text{celk.}} / V_{\text{vz}})) / K$$

C – koncentrace ( $\mu\text{g/ml}$ )

A – absorbance při 595nm

$V_{\text{celk.}}$  – objem celkového roztoku

$V_{\text{vz}}$  – objem vzorku

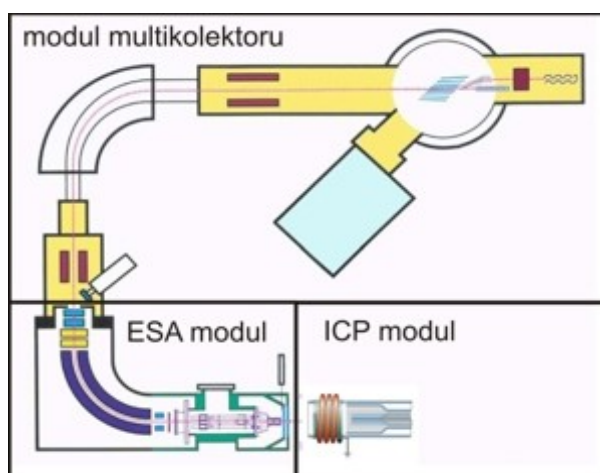
K – konstanta přístroje

## 5 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE BÍLKOVINNÝCH ŠTĚPŮ

Jedná se o metodu, která podává velmi přesné výsledky. Její rozvoj nastal až ve 20. století. Má obrovské uplatnění napříč spektrem celého průmyslu. Je to metoda, která dekuje i stopové množství látek a dokáže je zachytit se 100% jistotou. [5]

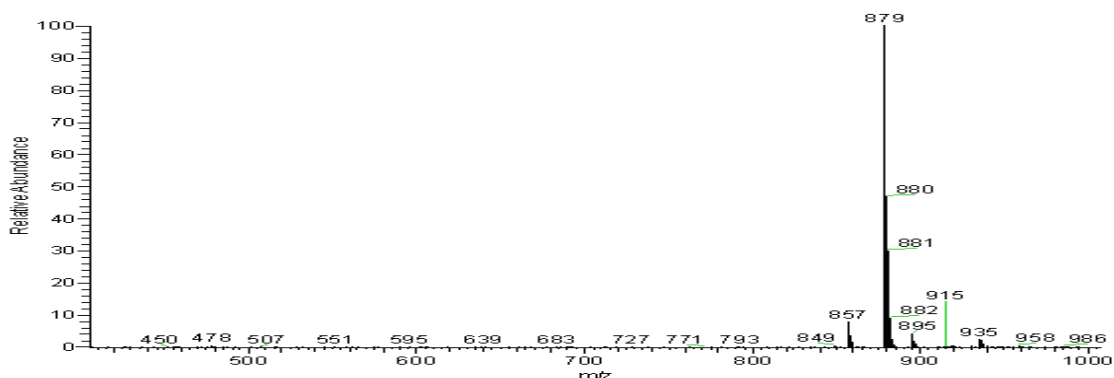
**Princip:** Metoda je založena na přebití jednotlivých molekul na „ionty“ a jejich následném dělení v elektromagnetickém poli (EMP) podle stupně nabití a rychlosti pohybu v EMP (OBR. Č.7.)

**OBR. Č7.** Schéma hmotnostního spektrometru [5]



Postup analýzy mléčných proteinů je založen na detekci štěpů bílkovin. Pro vytvoření štěpů byl použit trypsin. Následná detekce spočívala v převedení vzorku z polyakrylamidového gelu do vodného roztoku, tzv. modré barvení. Roztok je následně odpařen, nabit pomocí budícího zdroje (ICP) a poté prochází přes elektromagnetické pole. Posledním krokem analýzy je zachycení rozdělených iontů na detektoru a jejich vyhodnocení ze záznamu (OBR. Č.8.) dle online knihoven. [5]

**OBR. Č8.** Obecné spektrum analýzy



*Pozn.* Ukázka detekovaného štěpu proteinů mléka  $\beta$ -laktoglobulinu.

Metoda hmotnostní spektrometrie byla použita pouze jako ukázková metoda pro detekování jednotlivých štěpů. Pro opakování dané metody se musí dodržet vždy stejná kritéria. Metoda kapalinové chromatografie je pro proteiny rozhodně šetrnější a je i lépe reprodukovatelná a ne tak zdlouhavá jako metoda hmotnostní spektrometrie (MS). [5]



## **6 CÍL PRÁCE**

Cílem diplomové práce je zjistit nejvhodnější postupy izolace a identifikace mléčných proteinů chromatografickými metodami. Práce jako taková navazuje na moji bakalářskou práci „Metody izolace a detekce mléčných proteinů“ (2012).

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 7 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE

### 7.1 Chemikálie

- Akrylamid (Carl Roth, Německo)
- Biorad-Protein-Assay (Biorad laboratories, Německo)
- Demineralizovaná voda připravena na Aqua osmotic
- Dusičnan stříbrný (Carl Roth, Německo)
- Ethanol (Carl Roth, Německo)
- Formaldehyd (Lach-Ner s.r.o, Neratovice)
- Hydroxid sodný (Lach-Ner s.r.o, Neratovice)
- Chlorid sodný (Lach-Ner s.r.o, Neratovice)
- Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner s.r.o, Neratovice)
- Kyselina octová (Carl Roth, Německo)
- MES –2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (Carl Roth, Německo)
- *N,N* – methylenebisakrylamid (Lach-Ner s.r.o, Neratovice)
- Peroxodisíran amonný (Lach-Ner s.r.o, Neratovice)
- SDS (dodecylsulfát sodný) (Carl Roth, Německo)
- SERVA Protein SDS-Page protein marker (Serva electrophoresis, Německo)
- Síran amonný bezvodý (Lach-Ner s.r.o, Neratovice)
- Tetramethylethylenediamin (Carl Roth, Německo)
- Thiosíran sodný bezvodý (Lach-Ner s.r.o, Neratovice)
- Tricínový pufr redukující (N-(2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)glycin
- Tris-HCl = tris(hydroxymethyl)aminomethan (Carl Roth, Německo)
- Uhličitan sodný (PENTA, Chrudim)

## 7.2 Přístroje

- Analytické váhy (Denver Instrument SI-234 A)
- Automatické mikropipety (Nichipet EX, Japonsko)
- Běžné laboratorní sklo a vybavení
- Centrifuga (Marathón 21000R, Fischer Scientific, USA)
- Elektrická sušárna (UFB 500, Memmert, Německo)
- Elektroforetická aparatura, vertikální (SV10-CDC, Sigma–Aldrich, Německo)
- Chromatografická kolona *Hi Trap<sup>TM</sup> Capto<sup>TM</sup>S*
- Chromatografická kolona *Hi Trap<sup>TM</sup> Capto<sup>TM</sup>Q*
- Chromatografická kolona *Sephacryl S-100, HiPrep 16/60*
- Chromatografická pumpa LCP 5020 (INGOS s.r.o., Česká republika)
- Laboratorní třepačka (TPM-2, Desaga Sarstedt-Gruppe, Německo)
- pH metr (SPH 51, Ellecd)
- Počítač s programem CHROMuLAN v0.79
- Průtokový UV-detektor LCD 5000 (INGOS s.r.o., Česká republika)
- Sběrač frakcí (Frac-920, GE Healthshare Bio-Sciences AB, Švédsko)
- Zdroj napětí pro elektroforézu (FB 135, Fischer Scientific, USA)

## 8 IZOLACE FRAKČÍ MLÉČNÝCH PROTEINŮ

Izolace proteinů byla prvním krokem celé analýzy. Nejtěžší bylo dané proteiny získat v nativním stavu. Pro stanovení byly zvoleny tyto vzorky: –**Mlezivo**–kravské mlezivo odebráno 2 dny před porodem. –**Syrovátka**– z kravského mléka, stáří dojnice 2 roky. –**Mléko z mlékomatu**– neošetřené komerčně dostupné mléko. –**UHT mléko**– komerčně dostupné mléko ošetřeno postupem UHT. Veškeré vzorky byly uchovávány při teplotě  $-17^{\circ}\text{C}$ . V práci je uvedeno shrnutí získaných výsledků. Celkově bylo zanalyzováno 80 vzorků, kdy u každého bylo provedeno dvojité vysolení. Po úpravě vzorků následovala chromatografie a poté elektroforéza.

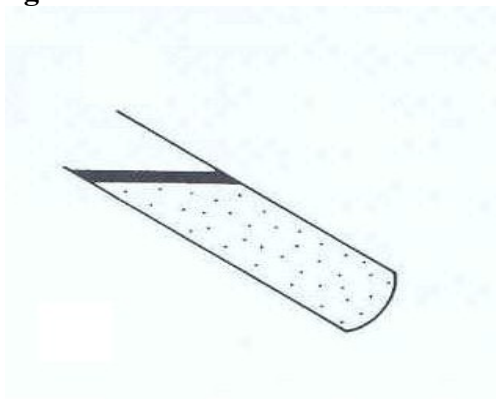
### 8.1.1 Odstranění tuku

Pro odstředování byla použita centrifugace v odstředivém poli. Vzorek byl rozlit z objemu 100ml na 4x 25ml. Vždy bylo důležité centrifugu vyvážit dle předpisu výrobce.

Parametry centrifugace: 10000 RPM po dobu 10minut při teplotě  $4^{\circ}\text{C}$ . Byla zvolena nižší teplota, protože je při ní lépe oddělitelný tuk.

Po centrifugaci nastala jedna z těžších fází a to odstranění vrstvy tuku. Pomocí skleněné tyčinky, byla sraženina, na kraji centrifugační vzorkovnice jemně proražena a supernatant byl odfiltrován pro další analýzu (OBR. Č9.). [25]

#### OBR. Č9. Tuk po centrifugaci



*Pozn.* Tuková vrstva byla cca 3-5mm silná a nebylo možné ji rozvříit.

### 8.1.2 Odstranění kaseinu

Pro odstranění kaseinu byl použit jeden postup izolace a dva postupy oddělení sraženiny (s přídavkem 1M HCl a bez). Nejprve bylo nutno upravit pH vzorků (viz Tab. č.4.) buď pomocí 1M kyseliny chlorovodíkové nebo 1M hydroxidu sodného na hodnotu 4,35, což je

komerčně uznávaná hodnota izoelektrického bodu kaseinu.[25,26,27] Pro úpravu byl použit pH metr (CPH 51) a před samotným měřením nastaven a kalibrován podle pokynů výrobce.

**TAB. Č4. Naměřené hodnoty pH jednotlivých vzorků**

Název vzorku	pH
Syrovátka	3,65
Syrovátka	3,64
Mléko z mlékomatu	6,89
Mléko z mlékomatu	6,82
Mléko UHT	6,8
Mléko UHT	6,84
Mlezivo	6,65
Mlezivo	6,72

*Pozn.* Čistá syrovátka by již kasein obsahovat neměla, ale byl proveden i izolační postup kaseinu a vždy se z upraveného vzorku ještě část kaseinu vyloučila.

Pro získání sraženiny kaseinu byla kádinka se vzorkem vložena do sušárny vyhřáté na 40<sup>0</sup>C po dobu 30 minut. Po uplynutí doby došlo k vytvoření kompaktní sraženiny, která byla oddělena filtrací, nebo pomocí centrifugace (dva postupy).

Prvním postupem centrifugace byly parametry 13000 RPM po dobu 20 minut při laboratorní teplotě. Jednalo se o pokus pro odstranění i části kaseinu, což se nesetkalo s účinností, protože kaseinové micely jsou v roztoku stálé a pro jejich rozrušení jsou zapotřebí mnohonásobně vyšší otáčky.

Druhým postupem je vlastní centrifugace již upraveného vzorku bez kaseinu, nebo s narušeným kaseinem pomocí kyseliny chlorovodíkové (1M) a částečně vysolenými sérovými proteiny. Pro tento typ centrifugace byla dostačující rychlost 10000 RPM po dobu 5 minut a při laboratorní teplotě.

### 8.1.3 Izolace sérových proteinů

Získaný supernatant bez tuku a kaseinu se dále upravuje pro získání sérových proteinů. Prvním krokem pro izolaci frakce sérových proteinů je vysolení pomocí síranu amonného.

Pro výpočet síranu amonného byla použita tabulka (Tab. č.5), pod ní je uveden i systém výpočtu přídatku síranu amonného. Ke 100ml vzorku bylo přidáno 31,3g síranu. Tím proběhlo vysolení frakce sérových proteinů na 50 hm.%. Po centrifugaci by získaný sediment rozpuštěn ve vodě a proběhlo konečné vysolení na 70 hm.% přídatkem 13,7g síranu amonného. Získaný supernatant byl poté podroben chromatografické analýze. V sedimentu se nepotvrdila přítomnost proteinů při chromatografické analýze.

**TAB. Č5. Tabulka postupu pro vysolení pomocí síranu amonného**

% obsah vysolení	10	20	30	40	50	60	70
0	56	114	176	243	313	390	472
20			59	123	189	262	340
30				62	127	198	273
40					63	132	205
50						101	137
60							69
70							

Pozn. V tabulce je uvedeno množství (g/l) přídatku síranu amonného do vodného roztoku bílkovin pro vysolení na požadovanou koncentraci. Postup pro určení potřebného množství je následující: **Vodorovná řada** - uvádí požadovanou koncentraci soli v roztoku v hm.%. **Svislá řada** - uvádí skutečnou koncentraci soli v roztoku v hm.%.

Př. Máme připravit vzorek bílkovin a máme roztok, o kterém víme že: Potřebný obsah soli pro vysolení proteinu je **40 hm.%** a máme **1L** roztoku. Obsah síranu amonného na počátku je 0%.

Pro 40 hm.% vysolení je třeba přidat **243g**  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

**Pro některé bílkoviny je třeba dvojité vysolení pro odstranění rušivých zbytkových frakcí.**

Př. Máme připravit vzorek sérových bílkovin a máme roztok, o kterém víme, že k jeho vysolení je potřeba odstranit i nechtěné doprovodné a zbytkové frakce kaseinu: Potřebný obsah soli pro vysolení proteinu je **70 hm.%** a máme **1L** roztoku. Obsah síranu amonného na počátku 0% a odstranění doprovodných frakcí nastává při **30 hm.%** koncentraci soli.

Postup: Pro vysolení z 0% na 30 hm.% je potřeba přidat **176g**  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Po odstranění doprovodných frakcí opět vysolujeme tentýž roztok a koncentrace soli je již 30 hm.%.

**Druhé vysolení:** ze 30% na 70% **Svislá řada 30%, Vodorovná 70%** -> **273g**  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Tento postup byl opakován u všech vzorků, protože se jevil jako nejefektivnější pro získání směsi sérových proteinů. Dále bylo vyzkoušeno vysolovat vzorky do různých finálních koncentrací solí (viz. Tab.č.6), ať už vyšších či nižších než 70 hm.%, ale tento postup vedl k získání nižších koncentrací konečných proteinů. Při vysolení na 25 hm.% bylo přidáno 14,4g a následně pro vysolení na 50 hm.% 15,8g síranu amonného. Proteiny byly příliš znečištěné doprovodnými frakcemi a při elektroforéze vznikaly neostré bandy. [25,26,27]



**TAB. Č6. Použité koncentrace vysolení síranem amonným**

Vzorek	1.Vysolení hm.%/ síran amonný (g)	2.Vysolení %/ síran amonný (g)	Výsledek na elektro- foréze
Mléko UHT	50%/31,3g	70%/13,7g	Ostré bandy, čisté proteiny
Mléko UHT	25%/14,4g	50%/15,8g	Znečištěné proteiny
Mléko UHT	20%/11,4g	40%/12,3g	Nedělené proteiny
Syrovátka	50%/31,3g	70%/13,7g	Ostré bandy, čisté proteiny
Syrovátka	25%/14,4g	50%/15,8g	Znečištěné proteiny
Mlezivo	50%/31,3g	70%/13,7g	Ostré bandy, čisté proteiny
Mlezivo	25%/14,4g	50%/15,8g	Znečištěné proteiny

Pozn. zjištěné hodnoty jsou vypočteny pomocí Tab.č.5.

#### **8.1.4 Dialýza vysolených sérových proteinů**

Po izolaci sérových proteinů vysolením následovala dialýza. Jejím cílem bylo odsolit získané proteiny a tím je navrátit do jejich nativního stavu. Jako dialyzační roztok byla použita voda a nebo pufr 0,05M NaCl a 0,05M TrisHCl pH 7,4. Vzorkem proteinů (po 70hm.% vysolení) bylo naplněno dialyzační střevo a přes noc zvolna mícháno na elektromagnetické míchačce v ledničce při teplotě 4<sup>0</sup>C. [28,29]

**TAB. Č7. Dialyzované vzorky**

Vzorek	Druh dialyzačního roztoku	Popis získaného vzorku
Čistá syrovátka	Demi-voda	Jemně bílá sraženina na dně čirého roztoku
Mléko z mlékomatu	Tris-HCl	Nažloutlý roztok bez sraženiny
Mléko UHT	Tris-HCl	Nažloutlý roztok bez sraženiny
Mlezivo	Demi-voda	Jemně bílá sraženina dně čirého roztoku

*Pozn.* Při použití Tris-HCl dochází k částečné hydrolyze proteinů a vzniká nažloutlé zabarvení roztoku.

Po skončení dialýzy byl roztok uvnitř sřeva přelit do kádinky, stočen na centrifuze a dále podroben chromatografické analýze.

Poté co bylo při dialýze zjištěno, že při pH 7,2 se roztok barví do jemně žluté barvy se u jednoho vzorku pokračovalo na zvýšení pH na hodnotu 8,5. Při této hodnotě se z roztoku vyloučila sraženina proteinů, protože došlo k jejich částečné hydrolyze a následně k problému jejich detekce pomocí chromatografie. Další vzorky již nebyly upravovány formou Tris-HCl, ale pouze vodou. [30,31,32]

## 9 DETEKCE ZVOLENÝCH FRAKČÍ MLÉČNÝCH PROTEINŮ

Pro detekci sérových proteinů byla použita metoda kapalinové chromatografie a elektroforéza v polyakrylamidovém gelu. Pro samotnou úpravu metod byly použity informace z více zdrojů, než jen z výše uvedených.[33,34,35]

### 9.1 Metoda IEC

Iontoměničová chromatografie byla použita na základě metod uvedených v člancích [13,14,19]. Zde byla použita katexová kolona Capto-S, při této metodě byly rozděleny mléčné proteiny s 80% účinností. Tento postup byl zařazen do vlastní práce, byl modifikován, aby bylo získáno co největší množství proteinů.

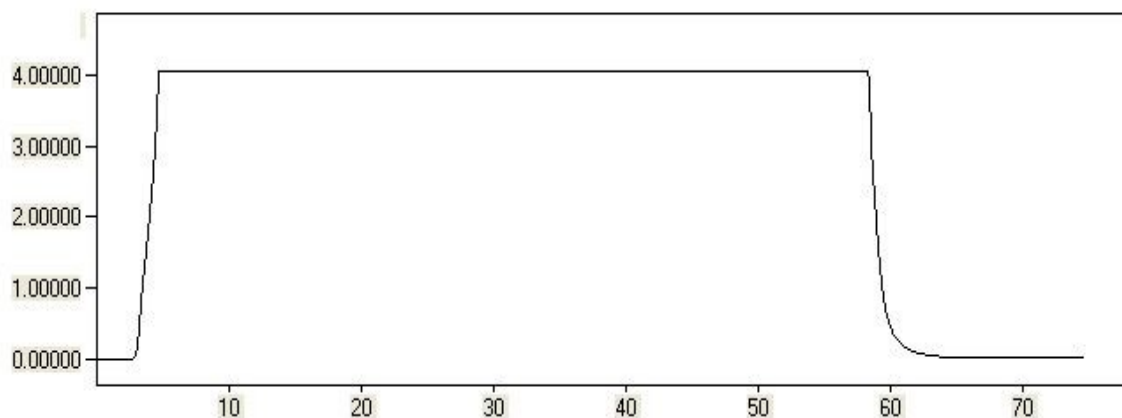
Modifikace spočívala v tom, že po načerpání vzorku na kolonu Capto-S byl získaný FT načerpán, v další analýze, na druhou kolonu Capto-Q s anexovou náplní, podle publikace[14,19].

**Příprava mobilní fáze:** pro tuto metodu byla zvolena gradientová eluce pomocí dvou mobilních fází, kdy první fázi (A) tvořila 50mM Tris-HCl o pH 7,7. Druhou fází (B) tvořil roztok 1M NaCl o pH 7.

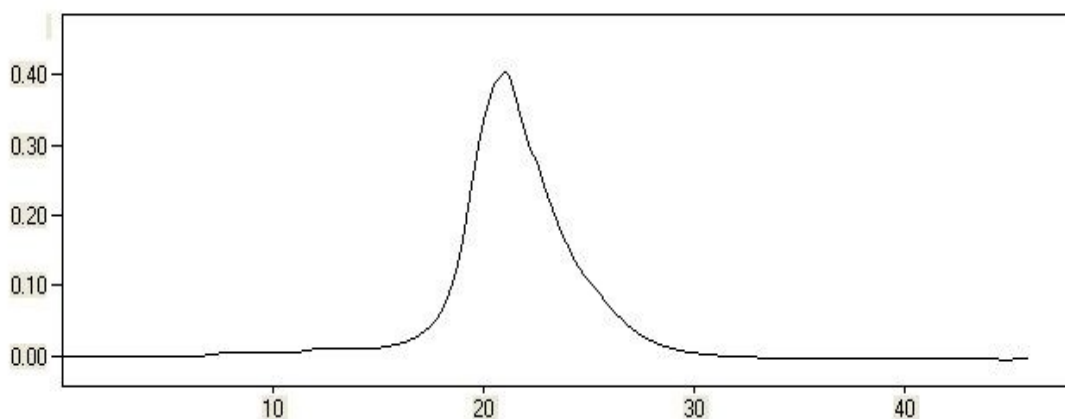
**Kolona pro analýzu:** *Hi Trap<sup>TM</sup> Capto<sup>TM</sup>S* – 2x1ml objem kolony.

**Parametry analýzy:** Gradientová eluce A:B, Průtok mobilních fází 1,5ml/min. V poměru 100% A ku 0% B až po 0% A a po 100% B fáze. S tímto poměrem fází: **0,5min** 100% fáze A, **5-35min** A+B fáze a **35-40min** 100% fáze B. Odebírání frakcí cca po 3 minutách. Detekce proteinů probíhala na UV detektoru při 280nm. Z vybraných frakcí byly rány vzorky na elektroforézu. Po navázání vzorku na kolonu byl zachycen FT průtok. Na OBR. Č10. je zaznamenán průběh čerpání vzorku na kolonu, dokud nebyla ustálena hodnota detektoru. Na OBR. Č11. je zaznamenán průběh analýzy IEC-katex.

OBR. Č10. Ukázka záznamu chromatogramu při čerpání vzorku na kolonu



OBR. Č11. Ukázkový chromatogram analýzy vzorku proteinu metodou IEC-katex



*Pozn. x – čas (min), y – Absorbance.*

Vzorek mléčné syrovátky bylo nutné 2x ředit, protože koncentrace proteinů byla příliš vysoká. Analýza tímto způsobem byla několikrát opakována u všech vzorků a vždy jsme se dobrali stejného konce. Metoda je dostatečná pro potvrzení přítomnosti, než ke kvantifikaci jednotlivých proteinů.

## 9.2 Postup přípravy vzorku pro IEC čistá syrovátka

Níže uvedený postup je univerzální pro jakoukoliv syrovátku. Byl vyzkoušen na několika desítkách vzorků a vždy se podařilo vyizolovat maximální množství proteinů.

### 9.2.1 Základní úprava

U vzorku bylo změřeno pH 3,65 a upraveno na hodnotu 4,35 pomocí 1M NaOH. Vzorek se jemně bíle zakalil, což indikovalo přítomnost zbytkového kaseinu. Takto upravený vzorek byl vložen do sušárny při 40<sup>0</sup>C po dobu 30 minut. Vzniklá jemně bílá sraženina byla buď odfiltrována, nebo centrifugována při 10000RPM po dobu 30 minut a při teplotě 4<sup>0</sup>C. Touto centrifugací byla odstraněna frakce kaseinu a ještě i zbylý tuk. Ze sedimentu i supernatantu bylo odebráno 20 $\mu$ l vzorku pro elektroforetické stanovení.

### 9.2.2 Izolace sérových proteinů

Po základní úpravě se zjistilo množství získaného supernatantu (100ml). Byl vypočten přírůstek stabilizačních solí (0,6g Tris-HCl a 0,3g NaCl), aby nedošlo k vysrážení během dělicího procesu chromatografie. Vzorek se opakovaně centrifugoval (10000RPM po dobu 30 minut a při teplotě 4<sup>0</sup>C), dokud se v roztoku tvořil sediment. Po každém stočení bylo odebráno 20 $\mu$ l vzorku pro elektroforetické stanovení, centrifugace byla opakována 3x. Konečný supernatant byl stanoven pomocí IEC.

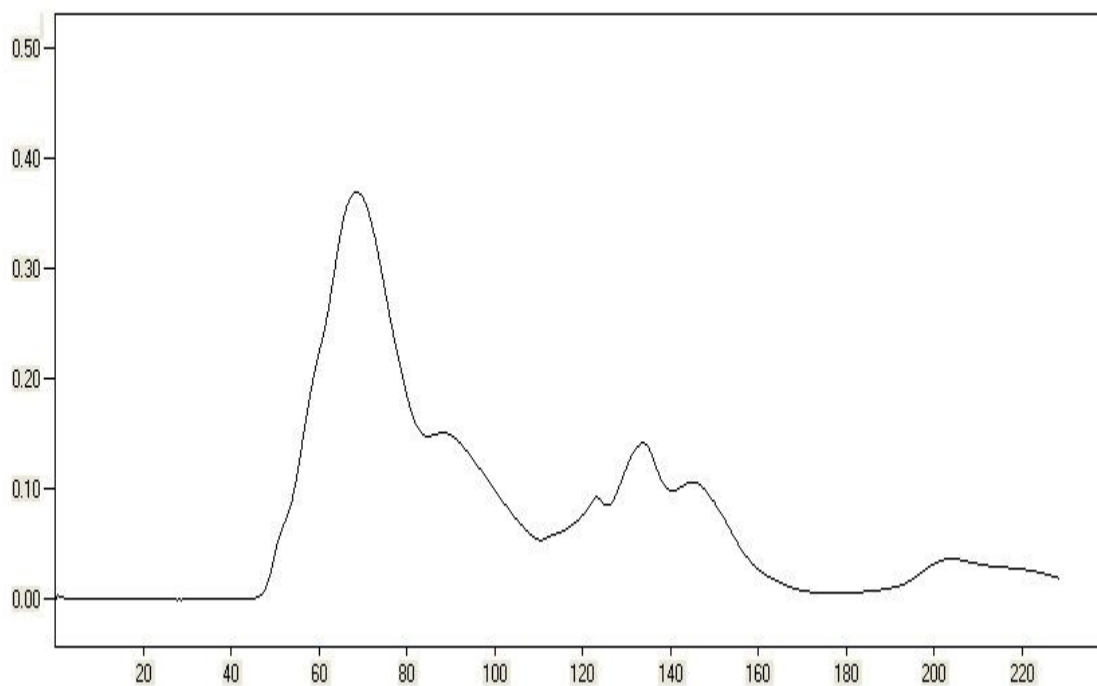
## 9.3 Metoda GPC

Metoda GPC byla zavedena do práce na základě mé původní bakalářské práce a byla převzata z odborných článků.[16,17,27,32].

**Kolona pro analýzu:** *Sephacryl S-100, HiPrep 16/60*

**Parametry analýzy:** Pro metodu GPC byla vybrána 60 cm kolona naplněná Sephacryl-100 gelem, který je dostatečný pro zachycení mléčných proteinů. Průtok mobilní fáze 1,5ml/min. Analýza probíhala za laboratorní teploty a mobilní fáze o složení 0,05M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 0,15M NaCl o pH = 7.0. Na kolonu bylo dávkováno 2ml vzorku proteinu. Detekce probíhala na UV detektoru při 280nm. Celková analýza (OBR. Č12.) trvala přibližně 200 minut. Jednotlivé frakce byly sbírány v intervalu 3 minut. [33,34]

**OBR. Č12. Ukázkový chromatogram analýzy vzorku proteinu metodou GPC**



*Pozn.* Metoda GPC podává na první pohled lepší výkon při dělení sérových proteinů, než metoda IEC. [26,29,32]

#### **9.4 Příprava vzorku pro metodu GPC vzorek - mléka z mlékomatu**

Pro metodu GPC byl použit vzorek vysolených proteinů, ne jako v případě IEC, kdy se použil přímo vzorek s přidavkem stabilizačních solí pro typizaci sérových proteinů

##### **9.4.1 Základní úprava vzorku mléka z mlékomatu**

Mléko bylo centrifugováno pro odstranění tuku (10000 RPM po dobu 10 minut při teplotě 4<sup>0</sup>C). Tuk byl oddělen filtrací. Původní hodnota pH 6,47 byla upravena pomocí 1M HCl na 4,35. Vznikla sraženina kaseinu, která byla inkubována v sušárně (40<sup>0</sup>C po dobu 30 minut). Vzniklá sraženina byla odfiltrována. Z každého meziprojektu byly odebírány vzorky na elektroforetické dělení 20μl.

##### **9.4.2 Izolace sérových proteinů**

Do upraveného vzorku byl přidán síran amonný do koncentrace 50hm.% (31,3g). Došlo ke vzniku sraženiny. Vzorek byl centrifugován při podmínkách metody (10000 RPM po dobu 10 minut při teplotě laboratorní teplotě). Sediment byl rozpuštěn ve vodě po odlití superna-

tantu na objem 100ml. Následně bylo provedeno vysolení síranem amonným do finální koncentrace 70hm.% (13,7g). Vzorek byl opět centrifugován za podmínek metody (10000 RPM po dobu 10minut při teplotě laboratorní teplotě). Konečný supernatant byl dávkován na kolonu chromatografu.

## 9.5 Elektroforéza získaných frakcí

Elektroforetické stanovení proteinů probíhalo na polyakrylamidovém gelu. Elektroforéza probíhala od původního vzorku použitého k chromatografii až po získané frakce z chromatografie.

**TAB. Č8. Tabulka pro namíchání zaostřovacího a separačního gelu**

Chemikálie	Separací gel (ml)	Zaostřovací gel (ml)
H <sub>2</sub> O	1,0	2,1
<sup>1)</sup> Roztok polyakrylamidu (49,5%T, 3% C)	1,1	0,25
<sup>2)</sup> Gelový pufr pH 8,45	1,75	0,775
50% Glycerol	1,4	----
<sup>3)</sup> 10% APS	$5 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$
<sup>4)</sup> TEMED	$50 \cdot 10^{-3}$	$50 \cdot 10^{-3}$

<sup>1)</sup>**Roztok akrylamidu 49,5%T** (total – celkové procento obou „akrylamidů“), 3% C (cross-linking – síťovací činidlo, tvoří 3% ze všech „akrylamidů“): 48% (w/v) akrylamidu, 1,5% (w/v) N,N'-methylenebisakrylamidu.

<sup>2)</sup>**Gelový pufr:** 3M Tris, 0,3% SDS, pH 8,45 Tris = tris(hydroxymethyl)aminomethan

<sup>3)</sup>**APS** – peroxodisíran amonný (amonium persulfát)

<sup>4)</sup>**TEMED** – tetramethylethylenediamine

### Vodící elektrolyty:

**Anodový pufr:** 0,2M Tris, pH 8,9

**Katodový pufr:** 0,1M Tris, 0,1M Tricin, 0,1% SDS; Tricin = N-(2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)glycin

**Postup přípravy elektroforetického stanovení:** Do kádinek, které se umístily na třepačku se dávkovalo uvedené množství chemikálií (podle TAB. Č.8.) v daném pořadí. Jako poslední se přidával APS a TEMED, protože po přidavku začal gel polymerovat. Bylo nutné roztoky nalít do skla v pořadí separační do cca  $\frac{3}{4}$  výšky skla a poté zaostřovací, aby elektroforetické dělení proběhlo dobře. Byla sestavena aparatura. Anodový pufr byl nalit do vany elektroforézy a katodový pufr byl nalit do druhé vany, ve které bylo upevněno sklo se vzorky, tak aby došlo k vytvoření elektrického okruhu. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 140V. Délka analýzy cca 1 hodina.

**Postup barvení gelu:**

Po vlastním dělení musí nastat postup barvení gelu, aby bylo možno jednotlivé frakce porovnat. Pro barvení byl zvolen postup barvení gelu stříbrem. Jako první se získaný gel inkuboval ve **fixačním roztoku** (50% ethanol, 12% kyselina octová, 0,05% formaldehyd) po dobu 2 hodin při míchání na třepačce, nebo přes noc bez míchání. V tomto kroku dojde k zafixování rozdělených mléčných proteinů. Následně se gel oplachoval 3x 15 minut v **oplachovacím roztoku** (20% ethanol). Poté byl gel inkubován 2 minuty v **citlivostním roztoku** (0,02%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) a 2x propláchnut destilovanou vodou po 1 minutu. 20 minut v **barvicím roztoku** (0,2% dusičnan stříbrný a 0,08% formaldehyd) a po dobu 40s v destilované vodě. V posledním kroku byl gel inkubován ve **vyvolávacím roztoku** (6% uhličitan sodný, 0,0004%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 0,05 % formaldehyd) a při dostatečné ostrosti bandů se zalil **zakončovacím** roztokem (12% kyselina octová) a proces barvení ukončen. [1,2,4]



## 10 DETEKCE ZÍSKANÝCH FRAKČÍ METODOU HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Hmotnostní spektrometrie byla vyzkoušena jen v návaznosti na práci Ing. Marka Dvořáka, který ji úspěšně použil ve své diplomové práci [37]. V případě mléčných proteinů šlo hlavně o to vyzkoušet univerzálnost popsané metody. Tato analýza spočívala v modrém barvení gelu, díky kterému bylo možné na gelu identifikovat proteiny. Takto obarvené proteiny se z gelu vyřízly a následoval komplikovaný extrakční postup a docílilo se zisku trypsinových štěpů proteinů, které se podařilo detekovat pomocí MS. [37]

V testovaném vzorku mléka z mlékomatu byl detekován  **$\beta$ -laktoglobulin** a  **$\alpha$ -laktalbumin**. Zbytek sérových proteinů se nepodařilo určit. Problém byl pravděpodobně v tom, že daný extrakční postup je volen pro proteiny mouky, které jsou stabilnější než proteiny mléka. Další možný důvod je vaznost sodíkových atomů na molekulu proteinu, které se uplatňují při nabíjení molekul, aby došlo k detekci. Naváže-li se 2-více atomů mění se hodnota štěpu bílkoviny a tím dochází ke zkreslení dat.

Nicméně se daná metoda v práci vyskytuje pouze ukázkově a proto je zde uvedena jen velmi okrajově. Hlavním cílem diplomové práce bylo vyizolovat z dodaných vzorků co největší množství sérových proteinů pomocí kapalinové chromatografie.

## 11 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 11.1 Manipulace se vzorky

Námi vybrané vzorky pro hlavní analýzu sérových proteinů byly voleny tak, aby byly lehce a především stále dostupné. V průběhu práce a měření se narazilo i na tzv. hluché vzorky, ve kterých již byly proteiny hydrolyzovány, popřípadě došlo ke změně barvy nebo konzistence (želírování vzorku). Tento úkaz byl pozorován po skladování delším než 6 měsíců a jen u některých vzorků.

Vzorky byly skladovány při  $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$ , vysolených vzorků bylo vyzorováno, že nezamrzly a část byla přítomna jako vodný roztok. Pravděpodobným důvodem byla velká koncentrace síranových solí v roztoku, které snížily bod tuhnutí.

### 11.2 Izolační metody

Izolace proteinů byla asi nejkomplicovanější částí práce. Během volby vhodného izolačního postupu jsme vyzkoušeli mnoho možných kombinací koncentrací solí, hodnot pH, koncentrací kyselin a mnohých dalších faktorů, ze kterých jsme vyvodili tyto výsledky.

#### *Izolace pomocí pH*

Tato izolační metoda se neosvědčila při získávání sérových proteinů, protože jejich stabilita je vůči změně pH veliká. Ač neúspěch na poli sérových proteinů, ukázala se tato metoda jako dostatečná pro odstranění kaseinu pomocí roztoků 1M NaOH a 1M NaCl.

Zajímavý úkaz byl vysledován při úpravě pH od 6 a výše. Při úpravě vzorku na hodnotu 7, která je nezbytná pro správnou funkci IEC byl zaznamenán slabý zákal. Při dalším postupu izolace se vybral jeden vzorek od každého druhu a jeho pH bylo upraveno na hodnotu 8,5, kdy se vytvořila největší sraženina. Bohužel tento jev neměl žádný zásadní dopad na průběh celkových analýz, později byla ke každému vzorku udělána i chromatografická analýza a výsledný nízký roztáhlý pik poukazoval na hydrolyzu proteinu, kterou pak ve výsledku potvrdila i elektroforetická dělení a tímto bylo od dané izolace ustoupeno.

#### *Izolace pomocí síranu amonného*

Tento postup izolace byl vybrán s ohledem na možnost degradace sérových proteinů. Metoda se osvědčila v práci jako šetrná pro získání proteinů. Vhodná koncentrace byla stanovena na 50hm.% pro odstranění doprovodných frakcí kaseinů a 70hm.% koncentrace síranu jako

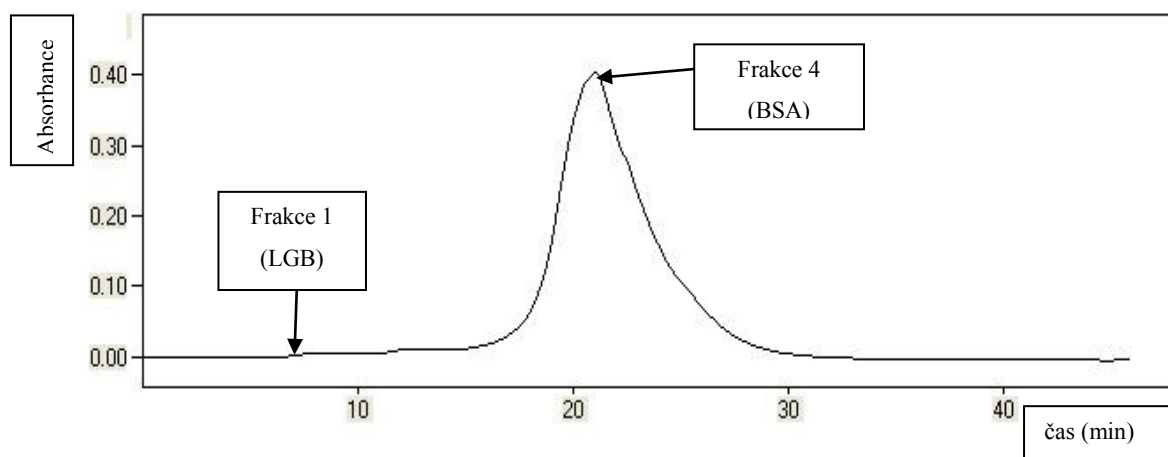
dostatečná pro vysolení sérových proteinů. Následné chromatogramy nejevily žádné známky degradace proteinů. Touto izolační metodou se podařilo získat: **referenční syrovátku** (zjištěno kjelhdalovou metodou), která je základní položkou kalibrací všech mléčných laboratoří na světě.

## 11.3 Vyhodnocení chromatografických a elektroforetických stanovení

### 11.3.1 Syrovátka – metoda IEC–katex

Vzorek syrovátky byl připraven odstraněním tuku a kaseinu výše uvedenými postupy. Následně byly ke vzorku přidány stabilizační soli a syrovátka byla analyzována pomocí metody IEC-katex. Záznam analýzy je zobrazen na OBR. Č13. Byly zaznamenány časy odběru jednotlivých frakcí (TAB. Č9.) Tyto získané frakce byly stanoveny elektroforetickým dělením (OBR. Č14.) a současně byly změřeny jednotlivé koncentrace metodou dle Bradfordové (TAB. Č10.).

#### OBR. Č13. Syrovátka záznam analýzy

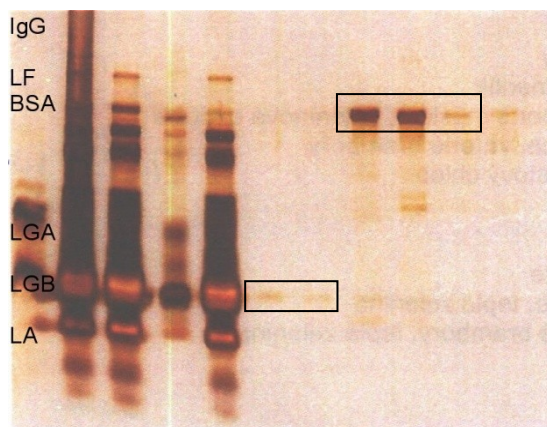


TAB. Č9. Retenční časy frakcí, dráha vzorku

Odebrané frakce	Retenční čas (min)	Číslo dráhy na gelu
1	7 – 10	6
2	11 – 14	7
3	15 – 18	8
4	21 – 24	9
5	28 – 31	10

Při každé analýze byly odebrány frakce tak, aby bylo získáno spektrum zastoupení jednotlivých proteinů. Vždy na počátku, v nejvyšším bodě a na konci píku. Takto byl zaručen sběr všech dostupných frakcí.

**OBR. Č14. Elektroforeticky identifikované proteiny vzorku Syrovátky**



1. dráha marker – IgG-imunoglobulin G, LF- laktoferrin, BSA– serum albumin, LGA, LGB-  $\beta$ - laktoglobulin, LA-lactalbumin

2. – 4. dráha – popisuje změnu vzorku během izolačního postupu. Vysoká koncentrace proteinů je charakterizována neostrými bandy. Dráha 2 – sraženina vzniklá úpravou pH na pI, dráha 3.– supernatant po odstředění a dráha 4. – sediment vzniklý po odstředění upraveného vzorku.

5. dráha – FT – je zde patrný úbytek BSA

6. – 7. dráha – první dvě odebrané frakce – je zde viditelný obsah LGB

8. – 9. dráha – nevyšší hodnota odezvy detektoru, současně nejostřejší band na elektroforéze. Byla zde potvrzena přítomnost BSA

10. dráha – nejnižší hodnota odezvy detektoru, minimální obsah BSA

Metoda IEC s kolonou Capto-S je vhodná pro získání BSA ze vzorku proteinu, protože složení kolony má dostatečnou dělicí kapacitu právě pro daný protein.

**TAB. Č10. Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové**

Vzorek	Absorbance (A) při 595nm	Koncentrace proteinů (mg/ml)

Frakce 1 (LGB)	0,009	0,003
Frakce 2 (LGB)	0,028	0,010
Frakce 3 (BSA)	0,344	0,128
Frakce 4 (BSA)	0,472	0,175
Frakce 5 (BSA)	0,022	0,008

Pozn. Výpočet byl proveden podle vzorce :  $C = (A \cdot (V_{celk.}/V_{vz}))/K$  (str.30.)

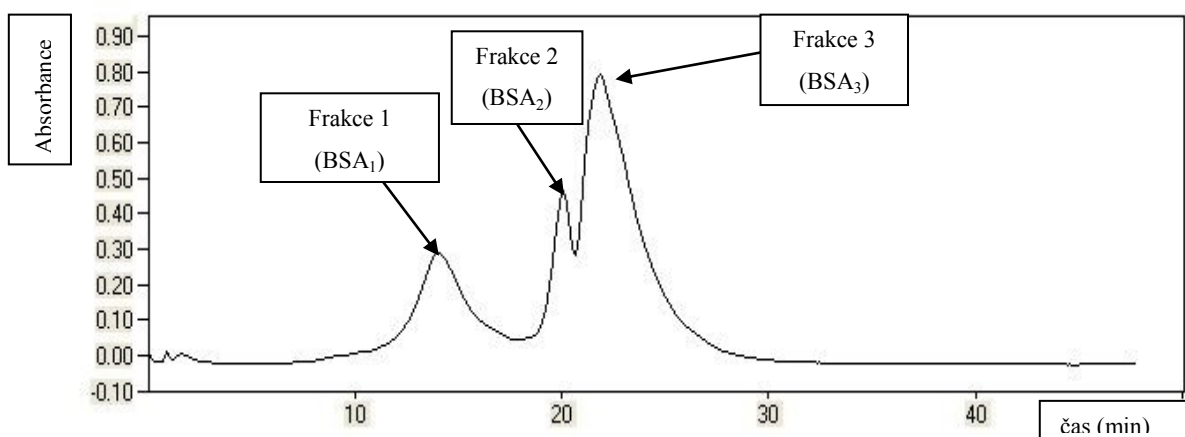
$V_{celk.} = 1000\mu l$ ,  $V_{vz} = 20\mu l$  a  $K = 0,0537$  (konstanta přístroje použitého k měření)

### 11.3.2 Mléko z mlékomatu – metoda IEC – katex a následný IEC – anex FT

Vzorek mléka z mlékomatu byl připraven odstraněním tuku a kaseinu výše uvedenými postupy. Následně ke vzorku byly přidány stabilizační soli a byl analyzován pomocí metody IEC-katex,. Záznam analýzy je zobrazen na OBR.Č15. Byly zaznamenány časy odběru jednotlivých frakcí (TAB. Č11.). Tyto získané frakce byly stanoveny elektroforetickým dělením (OBR. Č16.) a současně byly změřeny jednotlivé koncentrace frakcí metodou dle Bradfordové (TAB. Č12.)

Získaný FT po IEC – katex byl stanoven pomocí IEC – anex. Záznam analýzy popisuje OBR. Č17., jednotlivé retenční časy jsou zaznamenány v TAB. Č13.. a následné elektroforetické dělení vzorku popisuje OBR. Č18.

#### OBR. Č15. Mléko z mlékomatu – záznam analýzy IEC – katex



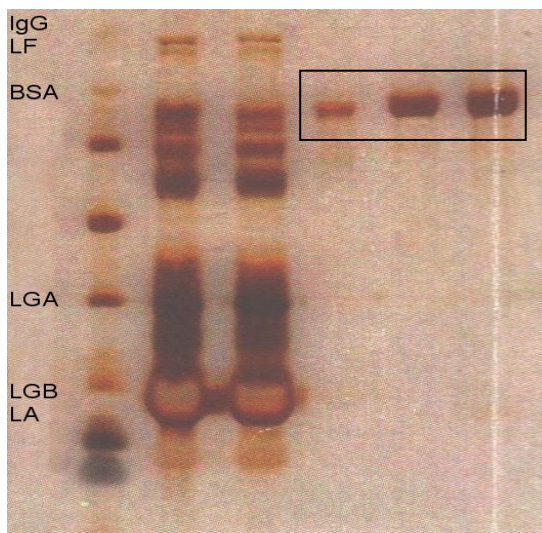
TAB. Č11. Retenční časy frakcí, dráha vzorku

Odebrané frakce	Retenční čas (min)	Číslo dráhy na gelu
-----------------	--------------------	---------------------

1	12,5-17,5	4
2	18,5-20,5	5
3	20,5-26,5	6

*Pozn. Frakce byly odebírány ručně, aby bylo docíleno oddělení jednotlivých piků.*

**OBR. Č.16. Elektroforeticky identifikované proteiny vzorku mléka z mlékomatu**



1. dráha marker – IgG-imunoglobulin G, LF- laktoferrin, BSA– serum albumin, LGA, LGB-  $\beta$ - laktoglobulin, LA-lactalbumin

2. dráha – popisuje vlastní vzorek před úpravou pro IEC – katex

3. dráha – FT

4. dráha – frakce 1., která obsahuje BSA<sub>1</sub>

5. dráha – frakce 2., která obsahuje BSA<sub>2</sub>

6. dráha – frakce 3., která obsahuje BSA<sub>3</sub>

Při zhodnocení výsledků předchozí analýzy je patrné, že vzorek mléka z mlékomatu obsahuje několik sérotypů proteinu BSA. Ze záznamu analýzy je patrné, že jsou zde dominantní tři různé genové variace proteinu BSA.

**TAB. Č12. Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové**

Vzorek	Absorbance (A) při 595nm	Koncentrace proteinů (mg/ml)
Vzorek mléka z mlékomatu	1,65	1,536
FT	1,555	1,448
Frakce 1 (BSA <sub>1</sub> )	0,0330	0,0307
Frakce 2 (BSA <sub>2</sub> )	0,0575	0,0535
Frakce 3 (BSA <sub>3</sub> )	0,0811	0,0755

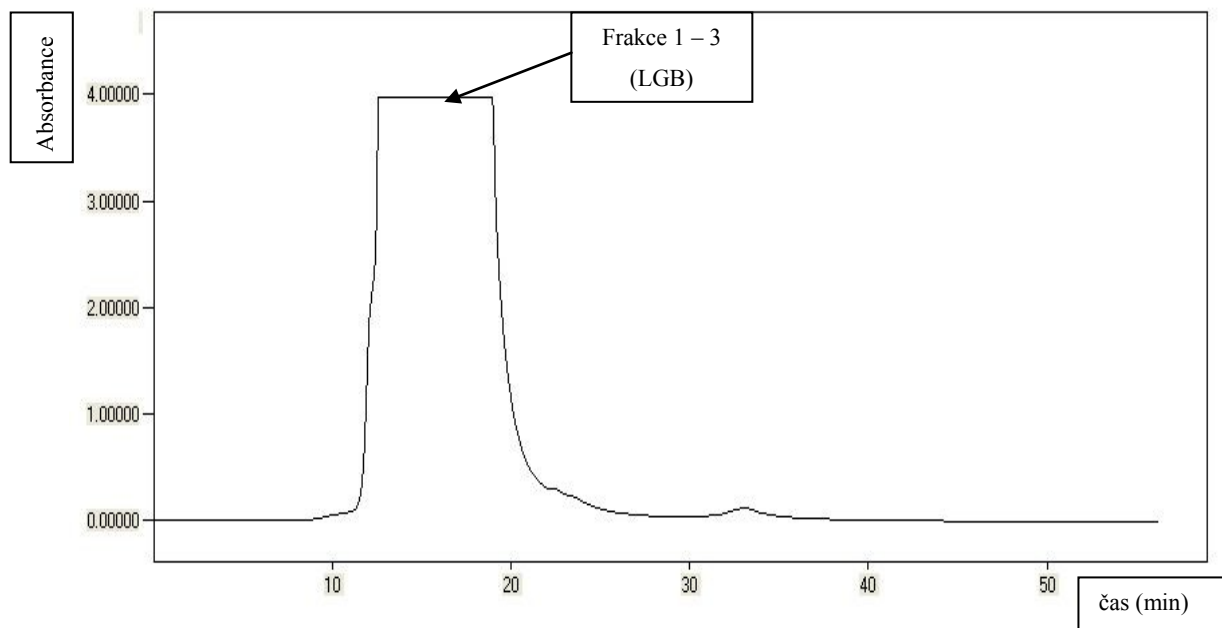
*Pozn. Výpočet byl proveden podle vzorce :  $C = (A \cdot (V_{\text{celk.}}/V_{\text{vz}}))/K$  (str.30.)*

*$V_{\text{celk.}} = 1000\mu\text{l}$ ,  $V_{\text{vz}} = 20\mu\text{l}$  a  $K = 0,0537$  (konstanta přístroje použitého k měření)*

Měření úbytku proteinů v FT potvrzuje pouze již výše uvedené zjištění, že je oddělena pouze část proteinů. Pokles koncentrace proteinů v FT je o 0,09 mg/ml, což je koncentrace úbytku proteinu BSA. Součet koncentrací jednotlivých frakcí se neshoduje s úbytkem 0,09 mg/ml, protože dochází k přenesení proteinu do menšího obsahu roztoku a tím je vysvětlen jev zvýšení koncentrace proteinu.



**OBR. Č17. Mléko z mlékomatu – záznam analýzy IEC – anex**

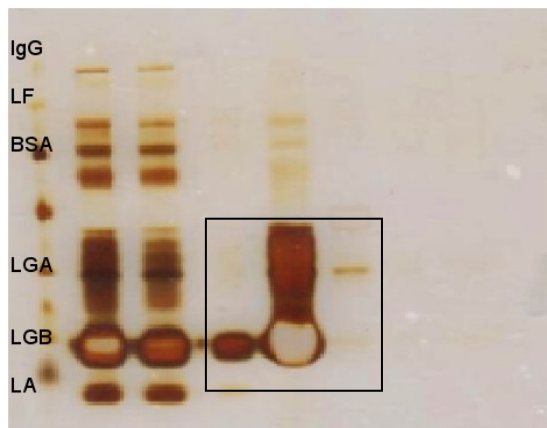


*Pozn. Bylo dosaženo maximální meze detekce což znamená, že na koloně se navázalo velké množství proteinu(LGB).*

**TAB. Č13. Retenční časy frakcí, dráha vzorku**

Odebrané frakce	Retenční čas (min)	Číslo dráhy na gelu
1	8,6 – 15,6	4
2	15,7 – 22,7	5
3	22,7 – 25,7	6

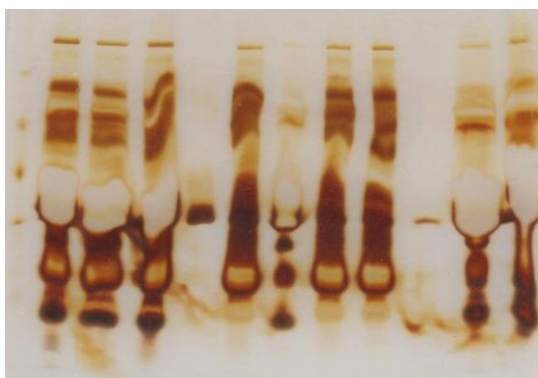
**OBR. Č18. Elektroforeticky identifikované proteiny, mléko z mlékomatu metoda IEC - anex**



1. dráha marker – IgG-imunoglobulin G, LF- laktoferrin, BSA– serum albumin, LGA, LGB-  $\beta$ - laktoglobulin, LA-lactalbumin
2. dráha – FT po IEC – katex
3. dráha – FT po IEC – Anex
4. dráha – frakce 1., která obsahuje LGB
5. dráha – frakce 2., která obsahuje LGB
6. dráha – frakce 3., která obsahuje nepatrné množství LGA

Stanovením FT po katexu metodou IEC - anex je patrné, že po analýze IEC – katex nejsou proteiny degradovány a mohou být použity pro další stanovení. Podle výše získaných dat byl na koloně Capto – Q vázán LGB a nepatrné množství LGA.

**OBR. Č19. Elektroforeticky rozdělené proteiny, získané z neředěného vzorku mléka z mlékomatu IEC katex, bez přídavku stabilizačních solí**



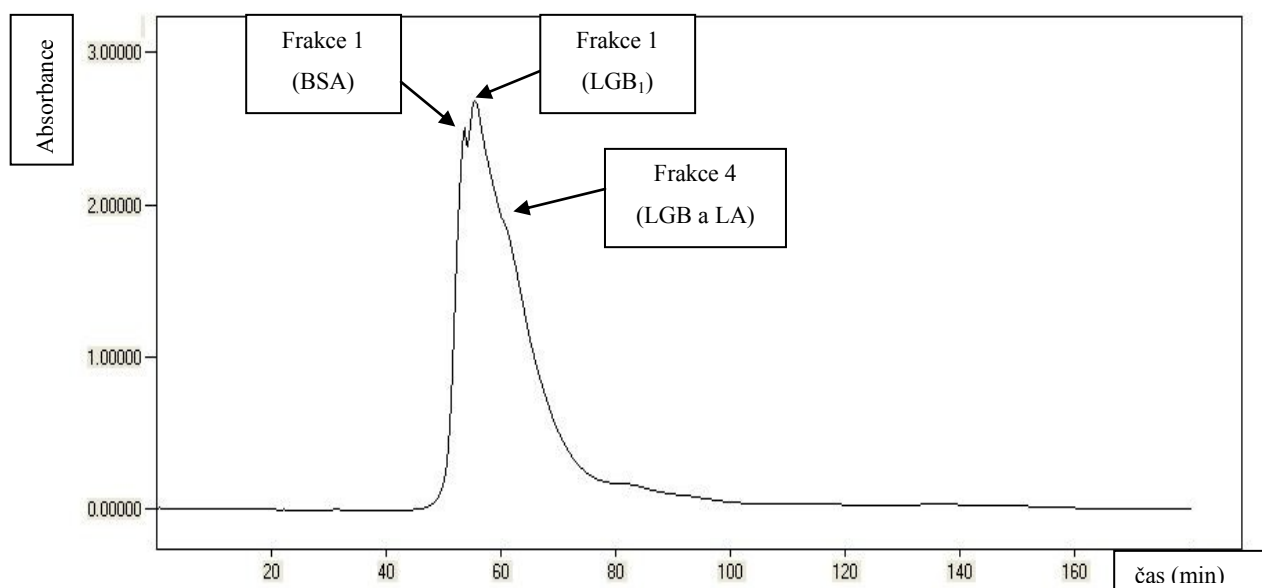
Jak je patrné z přiloženého gelu je nutno vzorek ředit je zde příliš mnoho proteinů a elektroforetické dělení je neúčinné a nelze porovnat se standardy. Prázdné bubliny indikují

přítomnost mnoha proteinů o stejné molekulové hmotnosti. Bez přidavku stabilizačních solí jsou proteiny během dělení degradovány.

### 11.3.3 Mlezivo – metoda GPC

Vzorek mleziva byl upraven na syrovátku pomocí výše popsaného postupu. K odstranění kaseinu byla použita kyselina chlorovodíková a sraženina kaseinu byla odstředěna. Izolace sérových proteinů byla provedena pomocí síranu amonného na konečný obsah 70hm.%. Takto připravený vzorek se dávkoval na chromatograf. Záznam analýzy je přiložen (OBR. Č20.), byly zaznamenány jednotlivé retenční časy frakcí (TAB. Č14.) a ze získaných frakcí bylo uděláno elektroforetické stanovení (OBR. Č21.). Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové nemohlo být provedeno, protože přítomnost amonných solí ovlivňuje vybarvovací proces.

#### OBR. Č20. Mlezivo – záznam analýzy metoda GPC

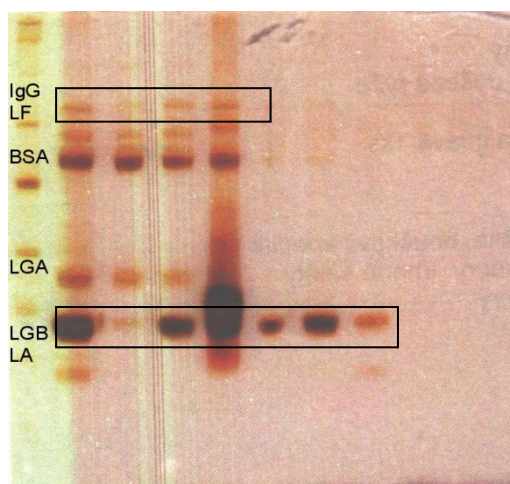


Mlezivo není pravé mléko, obsahuje pouze menší část proteinů a velké množství solí, které ovlivňují frakcionační proces. Jedná se o vysolení na 70hm.% při vyšší koncentraci je již obsah solí v roztoku příliš vysoký a dochází k hydrolýze mléčných proteinů. Tento jev byl pozorován pouze u mleziva.

#### TAB. Č14. Retenční časy frakcí, dráha vzorku

Odebrané frakce	Retenční čas (min)	Číslo dráhy na gelu
1	58-61	2
2	64-67	3
3	67-70	4
4	70-73	5
5	76-79	6
6	85-88	7
7	121-124	8

**OBR. Č21. Elektroforeticky rozdělené proteiny po GPC Mlezivo**



1. dráha marker – IgG-imunoglobulin G, LF- laktoferrin, BSA– serum albumin, LGA, LGB-  $\beta$ - laktoglobulin, LA-lactalbumin

2. dráha – frakce 1 – směs proteinů největší zastoupení LGB<sub>1</sub> a BSA

3. dráha – frakce 2 – směs proteinů největší zastoupení BSA

4. dráha – frakce 3 – směs proteinů největší zastoupení LGB<sub>2</sub> a BSA

5. dráha – frakce 4 – směs proteinů největší zastoupení LGB<sub>3</sub>

6 – 8. dráha – frakce 5 - 7 – pouze LGB<sub>4</sub>

Z výše uvedeného gelu je patrné, že v mlezivu jsou zastoupeny především proteiny podílející se na správném fungování imunitního systému (LGB,BSA,IgG). Ve vzorku bylo potvr-

zeno více proteinů jednoho druhu v různé genové variaci, např. poloha LGB proteinu, byl zde zastoupen v mnoha drahách, což ukazuje na různý genotyp.

**OBR. Č22. Elektroforeticky rozdělené proteiny po GPC Mlezivo vysoleno na 80hm.%**

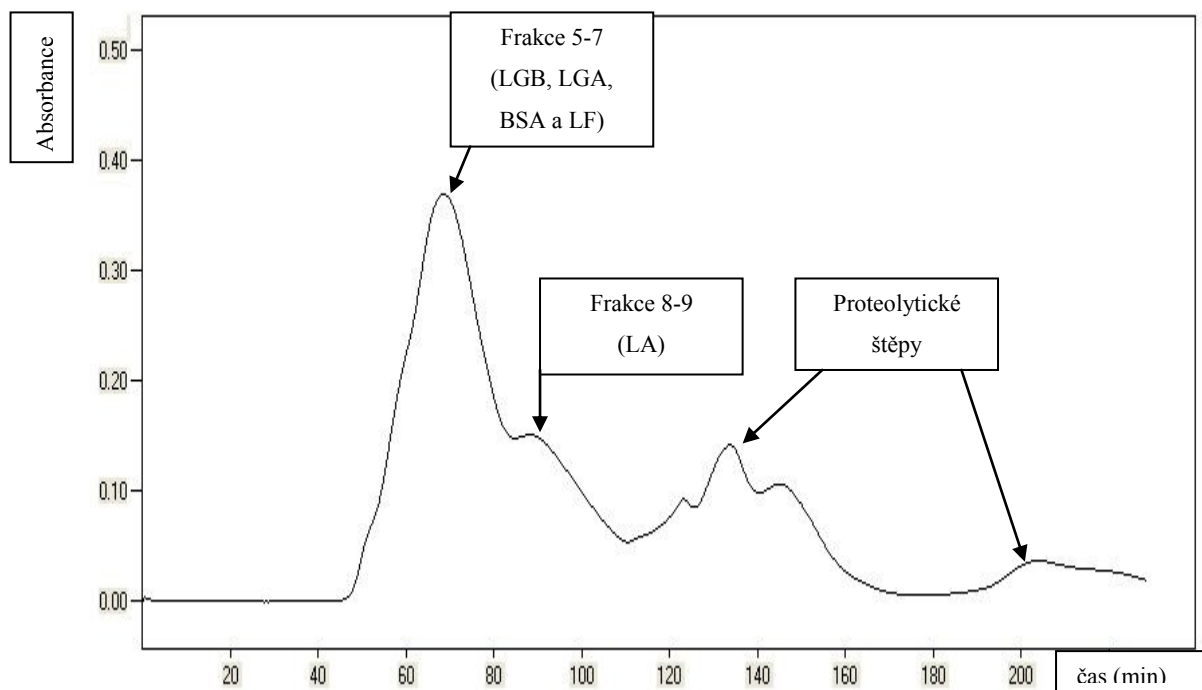


Mléčné proteiny jsou degradovány a metodou izolace při vysolení na 80% byla část z nich degradována. Takto degradované proteiny není možné dále využít pro následné analýzy.

**11.3.4 Mléko z mlékomatu – metoda GPC**

Vzorek mléka z mlékomatu byl upraven na syrovátku pomocí výše popsaného postupu. K odstranění kaseinu byla použita kyselina chlorovodíková a sraženina kaseinu byla odstředěna. Izolace sérových proteinů byla provedena pomocí síranu amonného na konečný obsah 70hm.%. Takto připravený vzorek se dávkoval na chromatograf. Záznam analýzy je přiložen (OBR. Č23.), taktéž jednotlivé retenční časy frakcí (TAB. Č15.) a ze získaných frakcí bylo uděláno elektroforetické stanovení (OBR. Č24.). Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové nemohlo být provedeno, protože přítomnost amonných solí ovlivňuje vybarvovací proces.

**OBR. Č23. Mléko z mlékomatu záznam analýzy GPC**

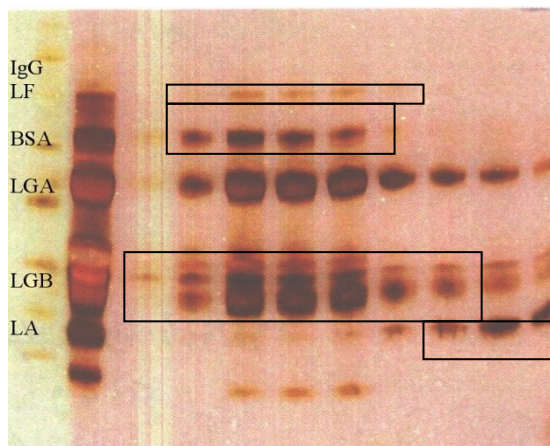


Záznam analýzy dokazuje, že proteiny jsou děleny s mnohonásobně větší účinností, než při IEC.

**TAB. Č15. Retenční časy frakcí GPC syrovátky z mleziva**

Odebrané frakce	Retenční čas (min)	Číslo dráhy na gelu
1	49-52	3
2	52-55	4
3	55-58	5
4	58-61	6
5	61-64	7
6	64-67	8
7	67-70	9
8	79-82	10
9	82-85	11

**OBR. Č24. Elektroforeticky identifikované proteiny po GPC**



1. dráha marker – IgG-imunoglobulin G, LF- laktoferrin, BSA– serum albumin, LGA, LGB-  $\beta$ - laktoglobulin, LA-lactalbumin
2. dráha – vzorek mléka z mlékomatu vysolen na 70hm.%
3. dráha – frakce 1., která obsahuje nepatrné množství LGB
4. dráha – frakce 2., která obsahuje několik genotypů LGB, malé množství BSA a LGA
- 5 – 7. dráha – frakce 3 – 5, které obsahují několik genotypů LGB, velké množství BSA a LGA, dokonce se podařilo vyizolovat i jeden z nejnáchylnějších proteinů na degradaci a to LF
- 8 – 9. dráha – frakce 6 – 7, které obsahují větší množství LGA a některé genotypy LGB
- 10 – 11. dráha – frakce 8 – 9, které obsahují velké množství LA

### 11.4 Srovnání metody IEC a GPC

Srovnáme-li metody IEC a GPC podle výše prezentovaných výsledků dostáváme celkem jasné závěry. Metoda IEC vyhrává v zisku jednoho proteinu na jedné koloně. Byly vyizolovány proteiny BSA a LGB bez přítomnosti dalších frakcí. Kdyby se daná analýza prováděla pořád dokola vždy se získaným FT, docílíme zisku čistých proteinů na kolonách o různé iontové síle. Nicméně daný postup je pro komerční použití nevyhovující a zdlouhavý. Typ IEC se používá spíše v lékařství, kosmetice a všude tam kde je třeba konkrétního proteinu. UHT mléko podávalo obdobné výsledky jako mléko z mlékomatu.

Metoda GPC oproti IEC získává skupinu proteinů, může sloužit k popisu složení či potvrzení přítomnosti proteinu ve vzorku. V odvětví analýzy potravin a obecně v průmyslu je

metoda GPC ekonomičtější a podává rozhled ve složení daného vzorku. Nicméně oproti IEC nedokážeme oddělit pouze jeden protein. Další zhoršení je problém s amonnými soli v roztoku proteinů po vysolení je vždy nutné získané proteiny odsolit a to buď před nebo po GPC. V TAB. Č16. jsou uvedeny nejosvědčenější kombinace jednotlivých

**TAB.Č16. Kombinace jednotlivých metod pro stanovení pomocí IEC a GPC**

Vzorek	pH <sup>1</sup>	Centrifugace <sup>2</sup>	Příprava <sup>3</sup>	Identifikace <sup>4</sup>	Kvalita proteinů <sup>5</sup>
Syrovátka	3,65	10000RPM 4 <sup>0</sup> C 30min.	Přídavek stab. solí	IEC –kolona Capto-S	Získ pouze BSA
Syrovátka	3,65	10000RPM 4 <sup>0</sup> C 30min.	Vysolení 50-70%	IEC- Capto- S a Capto-Q	Nefunkční ana- lýza
Syrovátka	3,65	13500RPM 4 <sup>0</sup> C 30min.	Přídavek stab. solí	IEC- Capto- S a Capto-Q	Získ skupiny dvou proteinů (BSA a LGB)
Syrovátka	3,65	10000RPM 4 <sup>0</sup> C 30min.	Vysolení 50-70%	GPC-Sephacryl S-100, HiPrep 16/60	Spektrum pro- teinů (BSA,LGB,LA)
Mlézivo	6,3	10000RPM 4 <sup>0</sup> C 30min.	Přídavek stab. solí	IEC- Capto- S a CaptoQ	Získ skupiny dvou proteinů (BSA a LGB)
Mlézivo	6,3	10000RPM 4 <sup>0</sup> C 30min.	Vysolení 50%	IEC- Capto- S	Nefunkční ana- lýza
Mlézivo	6,3	10000RPM 4 <sup>0</sup> C 30min.	Vysolení 50%	GPC-Sephacryl S-100, HiPrep 16/60	Spektrum pro- teinů (IgG,BSA,LGB LA)
Mléko z mlékomatu	6,8	10000RPM 4 <sup>0</sup> C 30min.	Vysolení 50-70%	GPC-Sephacryl S-100, HiPrep 16/60	Spektrum pro- teinů (LGB, BSA,LA, LF)



Mléko z mlékomatu	6,8 Upraven na 8,5	10000RPM 4 <sup>0</sup> C 30min.	Při 70% vysolení vznik sra- ženiny	GPC-Sephacryl S-100, HiPrep 16/60	Hydrolytické štěpy proteinů
Mléko z mlékomatu	6,8	10000RPM 4 <sup>0</sup> C 30min.	Přídavek stab. solí	IEC- Capto- S a Capto-Q	Zisk skupiny dvou proteinů (BSA a LGB)
UHT	6,8	10000RPM 4 <sup>0</sup> C 30min.	Přídavek stab. solí	IEC- Capto- S a Capto-Q	Skupina dvou proteinů (LGB a BSA)
UHT	6,8	10000RPM 4 <sup>0</sup> C 30min.	Vysolení 50%	GPC-Sephacryl S-100, HiPrep 16/60	Spektrum pro- teinů (slabší)
UHT	6,8	10000RPM 4 <sup>0</sup> C 30min.	Vysolení 70%	GPC-Sephacryl S-100, HiPrep 16/60	Spektrum pro- teinů (silné)

<sup>1)</sup> pH před úpravou vzorku

<sup>2)</sup> použité parametry centrifugace během izolačního postupu

<sup>3)</sup> popis přípravy vzorku před chromatografickým stanovením

<sup>4)</sup> Identifikace izolovaných vzorků za použití metody a kolony

<sup>5)</sup> Kvalita získaných proteinů po elektroforetickém stanovení na gelu

Výše uvedená kombinace metod jednoduše popisuje systém přípravy vzorku až po konečný produkt. Se vzorky bylo pracováno za laboratorní teploty. Hodnota pH je vždy upravena na hodnotu pI kaseinu. Centrifugace při vyšších otáčkách nijak neovlivňovala hlavní dělicí proces. Každý vzorek byl stanovován cca 20x při použití různých kombinací metod, z nichž právě ty uvedené v tabulce podávali uspokojivé výsledky.

### 11.5 Srovnání výsledků práce s odbornou literaturou

Pro metodu IEC jsou v publikaci [14,19] uvedeny výsledky, které byly dosaženy při použití kolony DAE – TP (1,5cmx18cm). Jedná se o silně katexovou kolonu, chromatografic-

kým dělením byl získán LGB protein ve dvou genotypech. V mém případě byl získán pomocí katexové koly Hi Trap<sup>TM</sup> Capto<sup>TM</sup>S protein BSA ve třech genotypech.

Při použití IEC s anexovou kolonou podle publikací [14,19,30,31] bylo v odborných článkách uvedeno, že bylo dosaženo LA, BSA, LF a LGB proteinů, které zde byly přítomny ve směsi. Při použití metody uvedené v mé práci se s kolonnou Hi Trap<sup>TM</sup> Capto<sup>TM</sup>Q docílilo zisku pouze proteinu LGB ve dvou genotypech. Srovnáme-li použité metody pro IEC, je zde ukázán rozdíl v konečném zisku jednotlivých produktů, kdy s použitím metod uvedených výše v práci je možné vyizolovat pouze konkrétní protein (BSA, LGB str. 54-58).

Vlastní dělicí proces je ovlivněn složením kolony, na kterém závisí jaký protein se

Metoda GPC byla použita na základě publikace [17], ve které byly popsány chromatograficky oddělené vzorky, vždy jako směs proteinů. Ke stanovení byla použita kolona typu TSK – G3000 SW (30cmx8mm), při použití metody se docílilo zisku spektra proteinů jako v mé práci s kolonou. Sephacryl S-100, HiPrep 16/60.

V publikacích [16,32] jsou popsány postupy frakcionace jednotlivých genotypů proteinů. Pomocí kolon v rozmezí od 6,5-300 (kDa), jednotlivé byly proteiny rozděleny na své genotypy ( např. LGB<sub>1,2,3,4</sub>), čehož se v mé práci podařilo docílit ve směsi proteinů a s použitím pouze jedné kolony u proteinu LGB (OBR. Č24.).

## ZÁVĚR

Moderní analýzy se nezabývají jen množstvím či přítomností, ale i ziskem jednotlivých složek surovin. Kravské mléko je poměrně dostupným artiklem a je tedy i hlavním zdrojem mléčných proteinů. Pro zisk mléčných proteinů bylo zvoleno právě z důvodu jeho snadné dostupnosti. V posledních letech se z mléčného séra snažíme vyizolovat fungující enzymy, čisté bílkoviny a mnohé další látky. Všechny tyto látky mají příznivý vliv na lidské zdraví, a proto se práce zabývá možností izolace sérových proteinů. Získané poznatky v této práci byly následně použity pro zisk jednotlivých proteinů v Universitním institutu na Universitě Tomáše Bati ve Zlíně. Z jednotlivých chromatografií byla použita metoda IEC, kterou byl získán a potvrzen čistý Lactoferrin, který se uplatňuje v kosmetických přípravcích, nebo v lékařství.

V izolačních metodách se nejvíce osvědčila metoda vysolení pomocí síranu amonného, ale pro plošné využití v potravinářství je nutné vždy proteiny před a nebo po odsolit. V práci je popsána dvojí dialýza jednou ve vodě podruhé za pomoci pufru. Obě metody podávají obdobné výsledky při dělení proteinů, i když v pufru se část proteinů degraduje.

V práci bylo dokázáno, že nejlepší metoda pro izolaci sérových proteinů je metoda GPC. Získává se zde spektrum proteinů (LGB, LA, BSA, LGA, IgG a LF). Kdybychom poté jednotlivé frakce opět dělily na koloně o jiné hustotě gelu, než nabízí kolona Sephacryl-100, dostaneme se k jednotlivým frakcím poměrně jednoduchým způsobem. Při metodě IEC se dostaneme ke zdárnému výsledku také, ale vždy pro jeden protein (např. BSA) vybrat konkrétní kolonu (např. Capto-S).

Stanovení frakcí pomocí ICP-MS, bylo provedeno pouze jako ukázkové dělení a pouze poukazuje na možnosti detekce v dnešní analýze potravin. Metoda MS je velice přesná, ale velmi zdlouhavá a využitelná pouze při specifických parametrech.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] FOX, P.ed.; MCSWEENEY, P.L.H. Dairy Chemistry and Biochemistry. London: Blackie Academica Professional, 1998.
- [2] TOWLER, G.; SINNOTT, R. Separation of Fluids. Chapter 16 n.p.: 2013. ISBN:9780080966595.
- [3] VELÍŠEK, J. Chemie potravin 1. Vyd. 1. Tábor: OSSIS, 1999. 328 s. ISBN 8090239137.
- [4] Heftmann, E. Chromatography: Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods - Part A: Fundamentals and techniques. Elsevier, 2004. ISBN:0080472249
- [5] Hoffmann, E. Stroobant, V. Mass Spectrometry: Principles and Applications. John Wiley & Sons, 2013
- [6] BŘEZINA, P.; JELÍNEK, J. Chemie a technologie mléka. I. Část. Praha: MON. 1990.
- [7] PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P.A. Handbook of Hydrocolloids (2nd Edition). Woodhead Publishing. 2009.
- [8] VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. Milk and Milk Products: Technology, Chemistry and Microbiology. An Aspen publication. 2001. ISBN 0-8342-1955-7
- [9] VOET, D.; VOET, J. Biochemistry 4th edition.2011.
- [10] ŠKROBÁK, F.; Metody izolace a identifikace mléčných proteinů. Bakalářská Práce. Universita Tomáše Bati ve Zlíně. 2012.
- [11] KOUICHIROU. S.; MAMORU.T.; BO.L. Identification of lactoperoxidase in mature human milk. Nutr. Biochem. 2000
- [12] KOUICHIROU. S.; HIROTHOSI. H.; BO.L. Purification and quantification of lactoperoxidase in human milk with use of immunoabsorbents with antibodies against recombinant human lactoperoxidase1. Nutr. Biochem. 2001
- [13] RONG RONG.LU.;SHI.Y.X.; ZHANG. R.J.Y. Isolation of lactoferrin from bovine colostrum by ultrafiltration couplet with strong kation exchange chromatography on a production scale. 2006.
- [14] Tirang.R.N.; MAHOUND.D.; MOHAMAD.P. Isolation of  $\alpha$ -laktalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin, and bovine serum albumin from cow's milk use gel filtration and anion-exchange chromatography including evaluation of their antigenicity. 2002.

- [15] BOESMAN-FINKELSTEIN. M. FINKELSTEIN.A.R. Sequential purification of lactoferrin, lysozyme and secretory immunoglobulin A from human milk. 1982.
- [16] WU.M.; WANG.X.; THANG.Z. RUTAO.W. Isolation an purification of bioactive proteins from bovine kolostrum. 2008.
- [17] LIANG.M.; CHEN.V.Y.T.; CHEN.H-L. CHEN. W. A simple and direkt isolation of whey components from raw milk by gel filtration chromatography and structural characterization by fourer trensrform raman spectroscopy. 2006.
- [18] ELAGAMY.E.I.; RUPPANNER.R.; ISMAIL. A.; CHAMPPANGE.C.P.; ASSAF.R. Purification and characterization of lactoferrin, lactoperoxidase, lysozyme, and immunoglobulins from camel's milk. 1994.
- [19] YE.X.; YOSHIDA.S.; NG.T.B. Isolation of lactoperoxidase, lactoferrin,  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin from bovine renet whey usány ion exchange chromatography. 2000.
- [20] DONNEL.R.; HOLLAND.J.W.; DEETH.H.C. ALEWOOD.P. Milk proteomics. 2004.
- [21] PELLEGRINO.L.; TIRELLI.A.; A sensitive HPLC Metod to detect hen's egg white lysozyme in milk and dairy products.
- [22] KAWAKAMI.H.; Physicochemical and biochemical characteristics of basic proteins in milk. Milk Science 2013 Vol. 62 No. 3 pp. 85-104
- [23] KORHONEN, H. J.; ARMAND, M.; FLOURIS, A. D.; Production and properties of health-promoting proteins and peptides from bovine colostrum and milk. **Cellular and Molecular Biology**, 2013, 59, 1, pp 12-24
- [24] GREK, E.; TYMCHUK, A.; Intensification of the process of whey protein denaturation in milk. **Food Chemistry and Technology (Maisto Chemija ir Technologija)**, 2013, 47, 2, pp 23-31, 16 ref.
- [25] YUKSEL, Z.; ERDEM, Y. K.; Detection of the milk proteins by RP-HPLC. **GIDA - Journal of Food**, 2010, 35, 1, pp 5-11, 18 ref.
- [26] WEDHOLM, A.; HALLÉN, E.; LARSEN, L. B.; Comparison of milk protein composition in a Swedish and a Danish dairy herd using reversed phase HPLC. **Acta Agriculturae Scandinavica. Section A, Animal Science**, 2006, 56, 1, pp 8-15, 31 ref.

- [27] FELIPE, X; LAW, A. J. R.; Preparative-scale fractionation of bovine, caprine and ovine whey **proteins** by gel permeation chromatography. **Journal of Dairy Research**, 1997, 64, 3, pp 459-464, 10 ref.
- [28] DIOSADY, L. L.; BERGEN, I.; HARWALKAN, V. R.; High performance liquid chromatography of whey **proteins**. **Milchwissenschaft**, 1980, 35, 11, pp 671-674, 4 ref.
- [29] EL-HATMI, H.; JRAD, Z.;KHORCHANI, T.; DARY, A.; GIRARDET, J. M.; FAYEN, B.; Fast **protein** liquid **chromatography** of camel  $\alpha$ -lactalbumin fraction with radical scavenging activity. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, 2013, 26, 4, pp 309-316, 32 ref.
- [30] SAUFI, S. M.; FEE, C. J.; Simultaneous anion and cation exchange **chromatography** of **whey proteins** using a customizable mixed matrix membrane. **Journal of Chromatography, A**, 2011, 1218, 50, pp 9003-9009
- [31] TUHRAN, K. N.; ETZEL, M. R.; **Whey protein** isolate and  $\alpha$ -lactalbumin recovery from lactic acid whey using cation-exchange chromatography. **Journal of Food Science**, 2004, 69, 2, pp FEP66-FEP70, 34 ref.
- [32] SEDMEROVA, V.; HELESICOVA, H.; Preparation of individual whey protein and casein fractions by column chromatography and gel filtration. **Prumysl Potravin**, 1972, 23, 5, pp 148-151, 11 ref.
- [33] DOULTANI, S.; TURHAN, K. N.; ETZEL, M. R.; **Whey protein** isolate and glycomacropeptide recovery from whey using ion exchange chromatography. **Journal of Food Science**, 2003, 68, 4, pp 1389-1395, 30 ref.
- [34] Hill, A. R.; Manji, B.; Kakuda, Y.; Myers, C.; Irvine, D. M.; Quantification and characterization of **whey protein** fractions separated by anion exchange **chromatography**. **Milchwissenschaft**, 1987, 42, 11, pp 693-696, 19 ref.
- [35] Nissen, A.; Bendixen, E.; Ingvarsten, K. L.; Røntved, C. M.; Expanding the bovine milk proteome through extensive fractionation. **Journal of Dairy Science**, 2013, 96, 12, pp 7854-7866
- [36] NG, P. K.; SNYDER, M. A.; Purification of  $\beta$ -lactoglobulin with a high-capacity anion exchanger: high-throughput process development and scale-up considerations. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2013, 93, 13, pp 3231-3236, 24 ref.

- [37] DVOŘÁK.M.; Studium vztahu mikrostruktury pšeničného lepku a kvantitativní zastoupení lepkových proteinů. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. 2013.
- [38] SERVA electrophoresis GmbH.; SERVA Unstained SDS PAGE Protein Marker. (6,5-200 kDa).

## SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

APS	peroxodisíran amonný
BSA	Sérum albumin
CFU	colony forming unit (jednotka pro počet mo)
EAK	Esenciální aminokyseliny
EMP	Elektromagnetické pole
GMP	Glykomakro peptid
GPC	Gelová permeační chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEC	Iontoměničová chromatografie
IgG	Imunoglobulin
kDa	Jednotka aminokyselin
LA	$\alpha$ - laktalbumin
LF	Laktoferrin
LGA	skupina serových proteinů
LGB	$\beta$ - laktoglobulin
MES	2-( <i>N</i> -morpholino)ethanesulfonic acid
MO	Mikroorganismy
MS-ICP	Hmotnostní spektrometr se zdrojem ICP
pI	Izoelektrický bod
RIL	Residua inhibičních látek
RPM	Otáčky za minutu
SB	Somatické buňky
SDS	dodecyl sulfát sodný
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TRICIN	N-(2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)glycin
TRIS	Tris((hydrxymethyl)aminomethan
UHT	Tepelné ošetření mléka
UV	Ultrafialový detektor



## SEZNAM OBRÁZKŮ

OBR. Č1. Kaseinová micela.....	19
OBR. Č2. Obecný vzorec triacylglycerolu.....	21
OBR. Č3. Vzorec Laktózy.....	22
OBR. Č4. Elektroforetický postup analýzy.....	26
OBR. Č5. Chromatograf.....	28
OBR. Č6. Chromatogram.....	29
OBR. Č7. Schéma hmotnostního spektrometru.....	31
OBR. Č8. Obecné spektrum analýzy.....	32
OBR. Č9. Tuk po centrifugaci.....	37
OBR. Č10. Ukázka záznamu chromatogramu při čerpání vzorku na kolonu.....	44
OBR. Č11. Ukázkový chromatogram analýzy vzorku proteinu metodou IEC- katex.....	44
OBR. Č12. Ukázkový chromatogram analýzy vzorku proteinu metodou GPC.....	46
OBR. Č13. Syrovátka záznam analýzy.....	52
OBR. Č14. Elektroforeticky identifikované proteiny vzorku Syrovátky .....	53
OBR. Č15. Mléko z mlékomatu – záznam analýzy IEC – katex.....	54
OBR. Č.16. Elektroforeticky identifikované proteiny vzorku mléka z mlékomatu.....	55
OBR. Č17. Mléko z mlékomatu – záznam analýzy IEC – anex.....	57
OBR. Č18. Elektroforeticky identifikované proteiny, mléko z mlékomatu metoda IEC – anex.....	58
OBR. Č19. Elektroforeticky rozdělené proteiny, získané z neředěného vzorku mléka z mlékomatu IEC katex, bez přísady stabilizačních solí.....	58
OBR. Č20. Mlezivo – záznam analýzy metoda GPC.....	59
OBR. Č21. Elektroforeticky rozdělené proteiny po GPC Mlezivo.....	60
OBR. Č22. Elektroforeticky rozdělené proteiny po GPC Mlezivo vysoleno na 80hm.%.....	61
OBR. Č23. Mléko z mlékomatu záznam analýzy GPC.....	62

**OBR. Č24. Elektroforeticky identifikované proteiny po GPC .....63**

## SEZNAM TABULEK

TAB. Č1. Chemické parametry frakcí kaseinů.....	18
TAB. Č2. Chemické parametry sérových bílkovin.....	20
TAB. Č3. Složení markeru pro identifikaci mléčných proteinů.....	27
TAB. Č4. Naměřené hodnoty pH jednotlivých vzorků .....	38
TAB. Č5. Tabulka postupu pro vysolení pomocí síranu amonného.....	39
TAB. Č6. Použité koncentrace vysolení síranem amonným .....	41
TAB. Č7. Dialyzované vzorky.....	42
TAB. Č8. Tabulka pro namíchání zaostřovacího a separačního gelu.....	47
TAB. Č9. Retenční časy frakcí, dráha vzorku.....	52
TAB. Č10. Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové.....	54
TAB. Č11. Retenční časy frakcí, dráha vzorku.....	55
TAB. Č12. Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové.....	56
TAB. Č13. Retenční časy frakcí, dráha vzorku.....	57
TAB. Č14. Retenční časy frakcí, dráha vzorku.....	60
TAB. Č15. Retenční časy frakcí GPC syrovátky z mleziva .....	62
TAB.Č16. Kombinace jednotlivých metod pro stanovení pomocí IEC a GPC.....	64-65