

# **Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

Zemědělská fakulta

Studijní program: Zemědělské inženýrství  
Studijní obor: Rostlinné biotechnologie  
Katedra: Rostlinné výroby a agroekologie

## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Téma:**

**Hodnocení úpravy a zpracování semen vybraných  
luskovin na produkci bílkovinných koncentrátů**

Vypracovala: **Bc. Jiřina Stýblová**

Vedoucí diplomové práce: Doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: Ing. Veronika Bártová, Ph.D.

České Budějovice 2010

## Anotace

V diplomové práci byl hodnocen vliv rozdílné úpravy semen (mouka z celých neupravených semen, mouka z děloh semen po namáčení, mouka z děloh semen po naklíčení) u tří druhů luskovin (*Pisum sativum* conv. *sativum* L., *Vicia faba* L., *Lupinus angustifolius* L.) na výtěžnost a složení bílkovinného izolátu získaného pomocí izoelektrické precipitace. Bylo zjištěno, že úprava semen nejvíce ovlivňuje výtěžek vysráženého N (mg) a to ze 45 %. Při stanovení výtěžnosti bílkovin byla hodnota ovlivněna významnou interakcí (úpravou semen a druhem luskovin). Největší podíl byl však vysrážen v neupravených a naklíčených semenech lupiny, kde se hodnoty pohybují kolem 57 %. Dále byla v diplomové práci provedena zpětná precipitace bílkovin, pomocí které jsme získali bílkovinné koncentráty z jednotlivých druhů luskovin. Výtěžky bílkovinných koncentrátů dosahují hodnot v rozmezí 60-80 %. Ze spekter vodorozpustných bílkovin je vidět zřetelně vysoká koncentrace izolovaných bílkovin. Ve variantě naklíčených a namáčených semen vyplývá, že došlo v průběhu úpravy semen k rozpadu bílkovin s vyšší molekulovou hmotností. Dále tyto bílkovinné štěpy přecházejí extrahováním při pH 9,0 do později produkovaných bílkovinných izolátů. Po kyselé precipitaci je na spektru pozorovatelné, že jsou bílkovinné izoláty zpětně rozpustné..

**Klíčová slova:** semena luskovin, *Pisum sativum* conv. *sativum* L., *Vicia faba* L., *Lupinus angustifolius* L., bílkovinné koncentráty

## Annotation

This diploma work was assessed effects of different seed treatment (untreated flour from whole seed, flour from the uterus after soaking seeds, flour from the seeds sprouted cotyledon) by three species of legumes (*Pisum sativum* conv. *Sativum* L., *Vicia faba* L., *Lupinus angustifolius* L.) yield and composition of protein isolate obtained by isoelectric precipitation. It was found that the seeds of change most affects yield precipitated N (mg) and 45%. When determining the value of the yield of protein was affected by significant interactions (treatment and the type of legume seeds). The largest share was, however, precipitate in untreated and germinated lupine seeds, in which values are around 57%. Furthermore, the thesis was to reverse the precipitation of proteins, using which we obtained

protein concentrates from different species of legumes. The yields of protein concentrates reach values in the range of 60-80%. Spectra of soluble proteins is clearly visible high concentration of isolated proteins. Variation of sprouted seeds and soaked that occurred during treatment of seeds for the collapse of proteins with higher molecular weight. Furthermore, these grafts are transferred protein extraction at pH 9.0 in the later produced protein isolates. After acid precipitation is observed on a spectrum that is re-soluble protein isolates.

**Keywords:** legume seeds, *Pisum sativum* conv. *sativum* L., *Vicia faba* L., *Lupinus angustifolius* L., protein concentrates

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Hodnocení úpravy a zpracování semen vybraných luskovin na produkci bílkovinných koncentrátů“ vypracovala samostatně a na základě vlastních zjištění a materiálů uvedených v seznamu použité literatury.

V Českých Budějovicích 2010

.....

Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce Doc. Ing. Janu Bártovi, Ph.D. a také svému konzultantovi Ing. Veronice Bártové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, velkou podporu a pomoc při vypracování diplomové práce. Zároveň bych chtěla poděkovat za pomoc při laboratorních analýzách, poskytnutí podkladových materiálů a informací.

Jiřina Stýblová

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Literární přehled</b> .....	<b>10</b>
2.1	Význam a využití luskovin .....	10
2.1.1	Současná situace pěstování luskovin na zrna v ČR a v EU .....	10
2.2	Struktura semene luskovin .....	12
2.3	Látkové složení semen .....	13
2.3.1	Pozitivní vliv na zdraví lidí .....	15
2.3.2	Využití v krmivářství .....	16
2.3.3	Hospodářská hodnota hrachu .....	16
2.4	Bílkoviny ve vybraných semenech luskovin .....	17
2.4.1	Conglutiny v semenech lupiny .....	20
2.4.2	Bílkoviny v semenech hrachu setého .....	21
2.4.3	Bílkoviny v semenech bobu obecného .....	23
2.5	Bílkovinné koncentráty .....	24
<b>3</b>	<b>Cíl</b> .....	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>Materiál a metodika</b> .....	<b>27</b>
4.1	Popis materiálu .....	27
4.2	Metody .....	28
4.2.1	Příprava materiálu k analýzám .....	28
4.2.2	Příprava proteinového izolátu z mouky semen luskovin (modifikováno dle Fernández-Quintela et al., 1998) .....	29
4.2.3	Analýza bílkovin pomocí technikou SDS-PAGE .....	29
4.2.4	Stanovení sušiny .....	30
4.2.5	Analýza obsahu hrubých dusíkatých látek v sušině semen (obsah N resp. Nx 6.25) .....	31
4.2.6	Detekce separovaných bílkovin na gelu .....	32
4.2.7	Zpracování elektroforetických dat .....	32

<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>33</b>
5.1	Vyhodnocení materiálu před samotnými analýzami .....	33
5.2	Stanovení obsahu dusíku v jednotlivých částech semene (% DM).....	34
5.3	Stanovení rozpustných látek a výtěžnost čisté bílkoviny .....	42
5.4	Elektroforetické vyhodnocení .....	48
<b>6</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>54</b>
6.1	Vyhodnocení materiálu před samotnými analýzami (HTS, Klíčivost, sušina) .....	54
6.2	Stanovení obsahu N v jednotlivých částech semene .....	54
6.3	Stanovení rozpustných látek a výtěžnost čisté bílkoviny .....	55
6.4	Stanovení podílu bílkovin po zpětné rozpustnosti.....	55
6.5	Elektroforetické vyhodnocení .....	56
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>57</b>
<b>8</b>	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>58</b>
<b>9</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>63</b>

# 1 Úvod

Luskoviny jsou jednoleté druhy rostlin z čeledi Fabaceae (Prugar, et al., 2008).

Vzhledem k velkému množství bílkovin jsou luskoviny pěstované na zrno důležitým zdrojem potravy. Velmi často představují nezbytný doplněk jiných zdrojů bílkovin. Jejich kvalitou se řadí hned za bílkoviny živočišného původu. Jsou velkým zdrojem energie, neobsahují cholesterol, přítomny jsou však rostlinné steroly, působící příznivě v prevenci kardiovaskulárních a některých nádorových onemocnění (Prugar et al., 2008). Z hlediska výživového zejména pro diabetiky, je významný nízký glykemický index, který se u luštěnin pohybuje v mezích 29-33. Přítomnost minoritních složek, jako například fytosteroly, saponiny, oligosacharidy, atd., jsou považovány za hlavní odpovědné činitele této vlastnosti (Hedley, 2001; Rambousková & Kavínová, 2006).

Vzhledem k zákazu používání krmiv živočišného původu ve výživě hospodářských zvířat, nabývají ve významu rostlinné bílkoviny. Jejich zdrojem může být lupina, která je proto považovaná za krmné plodiny budoucnosti. Semena lupiny obsahují 28 - 35 % dusíkatých látek a 4-12 % tuku a svojí kvalitou se blíží sóje. Mohou tedy být zdrojem bílkovin pro všechna hospodářská zvířata. Zejména pro skot představují možnou náhražku sójového šrotu a jsou mnohem vhodnější než bob nebo hrách. Lze je zkrmovat i v zeleném stavu. Dříve bránil jejímu využití v krmivářství vysoký obsah hořkých látek. V současné době byly vyšlechtěny odrůdy se sníženým obsahem těchto látek (Honsová., 2005). Bílkoviny v semenech luskovin jsou složeny ze dvou hlavních frakcí: globulinů a albuminů, doplněných u některých druhů menším množstvím glutelinů (Hosnedl et al., 1998).

Očekává se, že bude v příštích letech vzrůstat poptávka po bílkovinách z luskovin s rostoucí světovou populací a nutností snížení rizik spojených s konzumací živočišných zdrojů potravy, zvláště ve vyspělých zemích. Strava obsažená s velkým množstvím bílkovin není jen zdrojem konstruktivním a energetickým, ale rovněž mohou hrát samostatnou bioaktivní roli nebo být prekurzorem biologicky aktivních peptidů různé fyziologické funkce (Duranti, 2006).



## 2 Literární přehled

### 2.1 Význam a využití luskovin

Luskoviny jsou neobyčejně významné. Průměrná spotřeba luskovin u nás je 1-2 kg na osobu a rok.

Jejich semena obsahují podle druhu 19 - 0 % bílkovin, u sóji je však zastoupení až 45 %, jsou proto potřebné pro racionální výživu obyvatel a neopomenutelné v krmných dávkách hospodářských zvířat. Velký význam mají luskoviny jako píce, neboť v zeleném stavu obsahují v sušině 9-15 % bílkovin. Obsahem živin a příznivě působícími účinky náleží k nejkvalitnějším objemným krmivům (Lahola et al., 1990).

Luskoviny lze pěstovat na zrno, na lusky, zelenou hmotu, v čistých i smíšených kulturách jako hlavní a strniskové plodiny i meziplodiny, popřípadě také na zelené hnojení. Dále jsou významným zlepšovatelem úrodnosti půdy a porušovatelem v osevních sledech s velmi příznivými fyto-sanitárními účinky. Obohacují půdu o dusík pro následující plodiny, rozšiřují koloběh živin. Svým mohutným kořenovým systémem zlepšují fyzikální stav půdy. (Lahola et al., 1990), (Špaldon et al., 1982)

#### 2.1.1 Současná situace pěstování luskovin na zrno v ČR a v EU

Česká republika je tradičním pěstitelem a vývozcem luskovin. Hrách zaujímá 85 - 90 % z celkové plochy pozemku luskovin pěstované na zrno, je tudíž nejdůležitějším druhem luskovin pěstované v ČR. Navzdory nízké tržní hodnotě hrachu je pěstován především na vývoz, a to představuje 40-55 % produkce (Hochman, Hýbl & Hosnedl, 2006).

V roce 2006 představoval hrách s osevní plochou 27 148 ha převážnou část výměry luskovin pěstovaných na zrno (70 %). Osevní plocha bobu byla 2 382 ha (6 %) a plocha ostatních luskovin na zrno (mimo sóji) byla 9 493 ha (24 %). Z výměry ostatních luskovin činila odhadem 7 500 ha lupina.

Od roku 2004, kdy byla EU rozšířena o 10 nových členských států, došlo ke zvýšení pěstitelských ploch luskovin na zrno zhruba na 1,9 mil. ha. Největší výměra luskovin na zrno je ve Francii, Španělsku, Velké Británii, SRN a Itálii. Produkce těchto pěti států tvoří téměř 80 % veškeré produkce EU. Celková evropská produkce semen luskovin dosahuje přibližně 5 mil. tun ročně a činí zhruba 8 % světové produkce. Produkce hrachu činí zhruba 3 mil. tun

ročně, produkce bobu cca 1 mil. tun ročně. Nejvyšších průměrných výnosů pěstovaných luskovin je dosahováno v Irsku 4,89 t.ha-1, v Nizozemí 4,84 t.ha-1 a ve Francii 4,15 t.ha-1. Aktuální evropská produkce semen luskovin je nízká, nestačí vysoká poptávka, která se dále zvyšuje. Více než 75 % bílkovinných surovin pro využití v krmivářském průmyslu je zajišťováno dovozem sóji a sójových pokrutin

([http://eagri.cz/public/eagri/file/2854/LUSKOVINY\\_5\\_2007.pdf](http://eagri.cz/public/eagri/file/2854/LUSKOVINY_5_2007.pdf)).

Bob obecný je tradiční plodina ve střední Evropě, ale pěstební plocha značně poklesla za posledních 15 let z důvodu nízké výnosové stability, nízkého využití výnosového potenciálu (40 %) a registrovaných kultivarů vzhledem k vysoké závislosti na půdě a povětrnostních podmínkách (Hochman, Hýbl & Hosnedl, 2006)

**Tabulka č. 1: Plochy, výnosy a produkce hlavních druhů luskovin na zrno v Evropě**

([http://eagri.cz/public/eagri/file/2854/LUSKOVINY\\_5\\_2007.pdf](http://eagri.cz/public/eagri/file/2854/LUSKOVINY_5_2007.pdf))

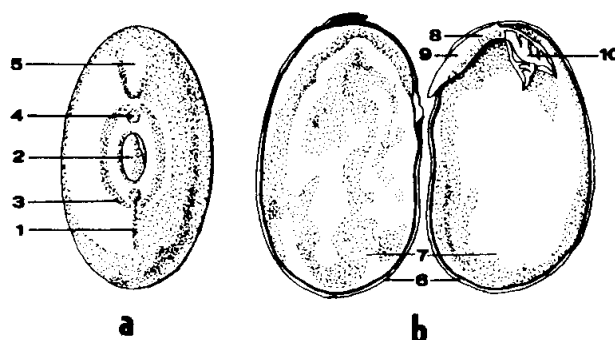
Komodita	Sklizňová plocha tis.ha			Průměrný výnos t.ha <sup>-1</sup>			Produkce tis.t		
	2003	2004	2005	2003	2004	2005	2003	2004	2005
<b>Luskoviny celkem</b>	4024	3860	3895	2,02	2,29	2,04	8130	8837	7942
<b>Fazol</b>	358	491	435	1,42	1,58	1,52	507	775	662
<b>Hrách</b>	2293	2037	2071	2,34	2,59	2,26	5363	5285	4688
<b>Bob</b>	256	284	316	2,34	2,73	2,51	599	775	792
<b>Cizrna</b>	98	103	85	0,94	0,86	0,58	92	89	49
<b>Čočka</b>	51	58	56	0,83	0,94	0,55	43	55	31

Poznámka: pro rok 2005 je pouze odhad

## 2.2 Struktura semene luskovin

Semena luskovin svým tvarem, velikostí a zbarvením je typické pro jednotlivé druhy a odrůdy. Skládají se z osemení, klíčku a velkých děloh. Endosperm většinou chybí nebo je jen málo vyvinut. Zásobní látky pro výživu klíčící rostliny jsou uloženy ve dvou zárodečných lístcích klíčků a dělohách, které vyplňují převážnou část semene.

**Obrázek č. 1: Struktura semene**



a) celé semeno: 1- šev, 2- pupek, 3- chaláza, 4- mikropyle, 5- obrys kořínku,

b) rozpuštěné semeno, 6- osemení, 7- dělohy, 8- klíček, 9- kořínek, 10- děložní lístky

Slupka se skládá z vnějšího a vnitřního osemení. Vnější osemení je tvořeno kutikulou. Pod ní je vrstva palisádových buněk, kde jsou uloženy pigmenty určující barvu semene. Pod palisádovými buňkami je vrstva silnostěnných zprohýbaných buněk. Na ni navazuje parenchymatické pletivo, které je zakončeno vnitřním osemením (Lahola et al., 1990).

Anatomická stavba osemení sehrává důležitou funkci při příjmu vody a může být příčinou výskytu tvrdých semen. Podstata tvrdosti je zpravidla vysvětlována obsahem některých látek, např. pektinů ve vrstvě palisádových buněk. Tvrdosemenost je dědičným znakem některých druhů a odrůd. Tuto vlastnost silně ovlivňují podmínky půdní a zejména průběh vysychání semen. Je nejvíce ovlivňována počasím při dozrávání semen, poškozením semen při sklizni a průběhem vysychání sklizených semen (Hosnedl, Vašák & Mečiar, et al., 1998).

Klíček je uložen mezi dvěma dělohami. V parenchymatických buňkách jsou uloženy zásobní látky, kde převládají bílkoviny, které patří ke globulinům (Lahola et al., 1990).

## 2.3 Látkové složení semen

Chemické složení semen je vhodné pro racionální výživu člověka (vysoký podíl bílkovin, obsah vlákniny, příznivá skladba škrobu) (Prugar, 2008).

Bílkoviny – představují nejvýznamnější složku semen luskovin. Jejich obsah se u pěstovaných druhů pohybuje v rozmezí 200-400 g.kg-1 hmotnosti semen, tj. 22-45 % sušiny (Hosnedl et al., 1998).

**Tabulka č. 2: Látkové složení semen luštěnin (%) (Pokorný & Dostálová, 1996) (Prugar, 2008) (Špaldon et al., 1982)**

Látky	Hrách	Bob
Voda	10,4	10,6
Energie	346	350
Bílkoviny	24,5	24,8
Tuk	1,0	2,5
Sacharidy	62,1	60,4
Vláknina	6,3	14,9
Popel	2,5	3,3

Poznámka: Energie je uvedena v kcal/100g, 1 kcal=4,185 kJ

**Tabulka č. 3: Průměrný obsah živin v 1 kg semen původní hmoty luštěnin (v gramech) (Hosnedl et al., 1998)**

Látky	Hrách setý	Bob obecný	Lupina bílá
Sušina (g)	870	868	887
N-látky (g)	208	262	340
SNL (g)	156	223	306
Tuk (g)	16	14	47
Vláknina (g)	60	75	140
Škrob (g)	451	368	85
Cukry (g)	56	34	48
BNLV (g)	554	480	323
Popel (g)	32	37	37

Poznámka: SNL: dusíkaté látky, BNLV: bezdusíkaté látky

Většina pěstovaných luskovin obsahují v semenech i v zelených částech rostlin chemické sloučeniny, které snižují nutriční hodnotu produktu - antinutriční látky. (ANC), které mohou být bílkovinného původu, tj. inhibitory hydrolysy a lektinů a látky nebílkovinné povahy. K méně škodlivým látkám patří stachyosy, nacházející se např. v semenech hrachu a způsobující plynatost (nadýmání) (Hosnedl et al., 1998).

Jejich antinutriční účinek spočívá v inhibici různých trávicích enzymů, včetně trypsinu, chymotrypsinu a amylasy. Nicméně jejich účinek se obvykle projevuje až v případě, když jsou semena nebo mouka konzumována. Tepelné zpracování může vést ke snížení toxicity, ale nízké teploty nebo nedostatečné vaření nemusí zcela eliminovat jejich toxicitu. Rostliny používají tento typ bílkovin jako obranu proti fytofágním bezobratlovcům a býložravcům (Duranti, 2006). K ANF patří také lektiny, což jsou bílkoviny, které se vratně váží na specifické mono- a oligosacharidy. Vyskytují se především v semenech. Ve srovnání s inhibitory proteze jsou lektiny odolnější vůči tepelným úpravám. Nedostatečně netoxikované potraviny mohou vyvolat zažívací potíže a poškodit střevní epitel. (Prugar et al., 2008)

Toxicita lektinů je dále charakterizována inhibicí růstu u pokusných zvířat a průjemem. Při injekčním podání u lidí může způsobovat nevolnost, nadýmání a zvracení (Duranti, 2006). Antinutriční faktor (ANF) semen luštěnin vede ke snížení stravitelnosti a příjmu semen zvířaty. Výsledkem je doprovodná ztráta stravitelných proteinů v produkci zvířat. Negativní vliv ANF se značně liší podle druhu zvířat a jejich stáří (Hosnedl et al., 1998). Nicméně, mnoho, ale ne všechny lektiny mají hemaglutinující aktivitu (Lis & Sharon, 1986).

Na druhé straně některé antinutriční látky v luštěninách mají i pozitivní účinek na lidský organismus. Je to např. kyselina fytová, která snižuje riziko rakoviny tlustého střeva, a pravděpodobně i prsu a to antioxidantním působením (vázáním železa). Dále to jsou saponiny Bowman - Birkův inhibitor proteze a isoflavony s protirakovinnými účinky. (Cabarello et al., 2003)

Biologická hodnota je snižována obsahem inhibitorů trypsinu. Blokují trávicí enzymy v zažívacím traktu, způsobují hypertofii pankreasu. Na druhé straně jsou to jedny z mála bílkovinných komponentů semen luskovin bohaté na sirné aminokyseliny (cystin) a dokonce se jim přisuzuje protirakovinový účinek.

Taniny snižují krmnou hodnotu, stravitelnost bílkovin a některých aminokyselin. (Hosnedl et al., 1998)

**Tabulka č. 4: Antinutriční látky v semenech luskovin (Hosnedl et al., 1998)**

Luskovina	Látky ovlivňující stravitelnost	
	Inhibitory trypsinu	Taniny
<b>Lupina</b>	Neobsahuje	Neobsahuje
<b>Hrách polní</b>	Nízký obsah	Neobsahuje
<b>Bob obecný</b>	Nízký obsah	Střední obsah
<b>Způsoby zničení</b>	Zahřátím	Odstraněním osemení

### 2.3.1 Pozitivní vliv na zdraví lidí

#### Diabetes

Vzhledem k nízkému glykemickému indexu a vysokému obsahu nestravitelných vláken, jsou semena luskovin nápomocná u diabetiků. Suchá semena mohou přispět k prevenci odbourávání inzulínu a tím snížit riziko k této nemoci.

#### Nemoc i trávicího ústrojí

Důležitou roli hrají luskoviny v tom, že zrychlují transport strávené stravy ve střevním traktu a jeho konečné vylučování. Dochází ke snížení cholesterolu, k neúplnému trávení škrobu a snížení kvasných procesů. Tyto faktory byly považovány za prospěšné v prevenci rakoviny, zvláště tlustého střeva.

#### Nadváha a obezita

Navzdory obsahu tuku, škrobu a bílkovin v semenech luskovin, pomáhají udržovat tělesnou hmotnost. Díky jejich velkému účinku sytosti se omezí celkový denní příjem potravin.

Nutriční klíčová role zrna luskovin je masivní přítomnost makro a mikro živin. (Duranti 2006)

Zvýšené množství některých bílkovin je nežádoucí. Například semena obsahují inhibitor bílkoviny a tím zabraňují správnému průběhu trávení. (Domoney & Stitt, 2007)

### 2.3.2 Využití v krmivářství

Semena luskovin jsou cenným zdrojem bílkovin, škrobu a oleje. Jejich množství se liší v závislosti na druhu.

V krmných směsích představují semena luskovin důležitý zdroj bílkovin pro zvířata a drůbež (Domovy & Stitt, 2007). K pícním účelům se může využívat celá nadzemní hmota v zeleném stavu, nebo v podobě senných mouček. Pro tyto účely jsou vhodné pouze rychleji rostoucí druhy a odrůdy, které produkují velké množství biomasy. Kvalitní pícní hodnotu má i sláma luskovin. Stravitelnost ovlivňují např. taniny (u bobu obecného) a inhibitory trypsinu.

Využití semen luskovin v krmných dávkách, zejména monogastrických zvířat je ovlivňováno nutriční hodnotou a obsahem antinutričních látek v semenech. Obsah antinutričních látek lze před zkrmováním snížit vhodnou úpravou suroviny (zahřívání, máčení, odstranění osemení). Snižování obsahu antinutričních látek v semenech je též jedním z cílů šlechtění a stává se kritériem registrace nových odrůd luskovin pro krmné účely (Hosnedl et al., 1998).

### 2.3.3 Hospodářská hodnota hrachu

Hrách se v Evropě především používá pro výživu prasat, kde se jejich nutriční hodnota dokonale shoduje s nutričními požadavky pro hospodářská zvířata. I když jsou suroviny hrachu bohaté na bílkoviny, je jeho cena stanovena především podle energetického obsahu.

Aby došlo k většímu zkrmování drůbeže hrachem, tak se musí zajistit vyšší množství bílkovin v hrachu a to lze dokázat dvěma způsoby :

- první spočívá v použití přirozené proměnlivosti obsahu bílkovin, který je nalezen v kultivovaném hrášku, třídění dvou druhů zrn hrachu při sklizni a uvedení na trh podle jejich obsahu bílkovin.
- druhý je založen na pěstování hrachu s vyšším obsahem bílkovin a s více stravitelnými aminokyselinami.

Tyto dva způsoby jsou vztaženy na sušinu. Průměrná úroveň bílkovin u hrachu je 24 % a s směrodatná odchylka je 1,42 (Crépon & Prebenda, 2007).

Je také možné zlepšit jejich stravitelnost pro zvířata a zvýšit obsah bílkovin. Na tyto dva cíle byly tedy testovány dvě hypotézy:

1. chovatelé jsou schopni produkovat hrách s průměrným obsahem bílkovin 28 %, aniž by se měnil aminokyselinový profil nebo jejich energetická hodnota,
2. chovatelé jsou schopni vyrábět hrách, ve kterém se stravitelnost metioninu, cystinu a tryptofanu dokáže zvýšit.

Zvýšení obsahu bílkovin musí být provedeno bez poškození energetické hodnoty. Dokonce i mírný pokles energie může mít výrazný dopad na cenu a na množství použitého hrachu (Crépon & Prebenda, 2007).

## 2.4 Bílkoviny ve vybraných semenech luskovin

Bílkoviny semen jsou složeny ze dvou hlavních frakcí: albuminů a globulinů, doplněných u některých druhů menším množstvím glutelinů.

**Albuminy** (10-25 % bílkovin) jsou především složkou zárodku. Jsou to bílkoviny strukturní a enzymatické, vytvářející komplexní struktury se sacharidy, lipidy a nukleovými kyselinami. Jsou výhodnou složkou nutriční jakosti, rozpustné ve vodě, vysolují se ve svých vodných roztocích síranem amonným při nasycení větším než 60 % při teplotě 75°C a nevratně koagulují.

Syntéza albuminů převládá v časných fázích vývinu semen, s postupným zráním potom dochází k převažující syntéze globulinů (Velíšek, 2002).

**Globuliny** utvářejí rozhodující podíl bílkovin zásobního charakteru (hrách a lupina 60-75%, bob 80-90 %). Jsou to slabě kyselé bílkoviny nerozpustné ve vodě, ale rozpustné ve zředěných roztocích solí, např. v 5% roztoku NaCl, kyselin a zásad. Vysolují se síranem amonným při nasycení větším než 40 %, za tepla koagulují. Dominantní globuliny jsou violin a legumin (Velíšek, 2002).



### Podjednotky globulinu

Nejhojnější třída proteinů v luskovinách pěstovaných na zrna jsou globuliny. Jsou obecně klasifikovány do dvou hlavních skupin na základě jejich sedimentačního koeficientu (S) a to na 11S, které se nazývají leguminy a 7S nazvané viciliny a conviciliny. Legumin je vyjádřen jako protein o velikosti 60-80 kDa. Jsou to oligomery, ale obvykle tvoří hexamery. 7S bílkoviny jsou oligomery, obvykle tvořeny trimery. Vicilin je vyjádřen jako protein o velikosti 47-50 kDa, který je tvořen trimery o molekulové hmotnosti 150 kDa (Emmanouil et al., 2006).

Convicilin je vyjádřen jako protein o velikosti 70 kDa, který je tvořen trimery o molekulové hmotnosti 210 kDa (Casey, 2003), (O'Kane, 2004).

Z nutričního hlediska jsou všechny bílkoviny luštěnin skladovány s relativně nízkým obsahem aminokyselin: metionin, cystein a tryptofan. Množství další esenciální aminokyseliny lysinu je mnohem vyšší (Rockland, Radke, 1981), (Ampe, Van Damme, de Castro, Sampaio, Van Montagu, Vanderkerckhove, 1986).

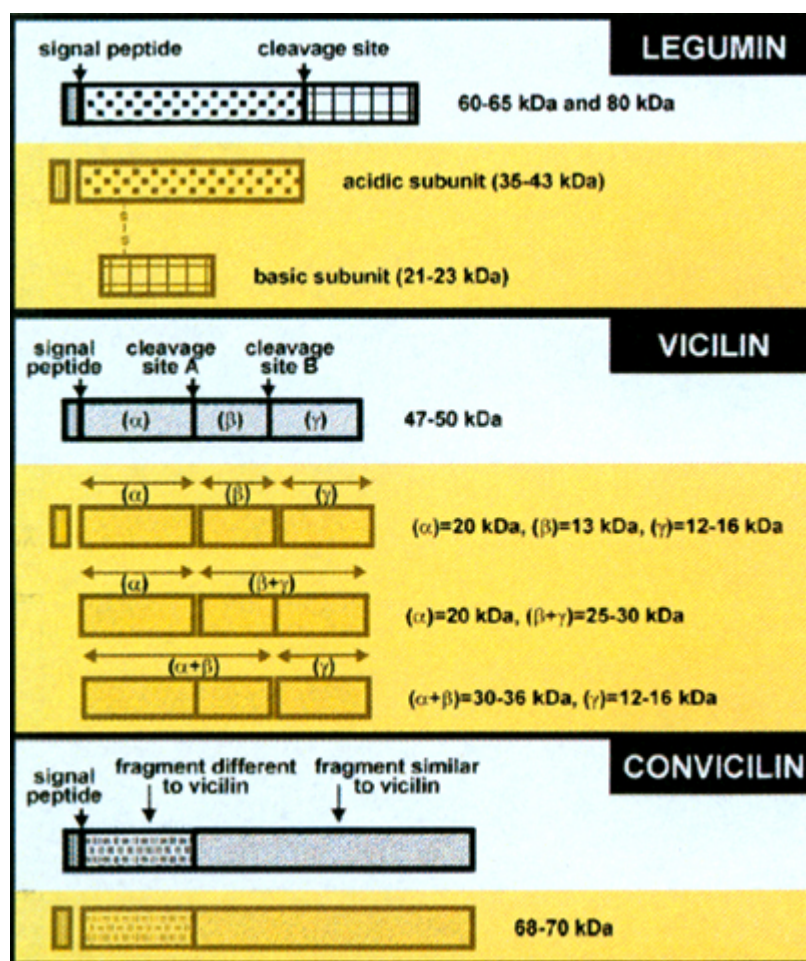
**Gluteliny** nejsou rozpustné ve vodě a etanolu, ale rozpouští se ve zředěných roztocích solí, kyselin, zásad, teplem koagulují.

**Prolaminy** nejsou rozpustné ve vodě, ale rozpustné ve zředěných roztocích solí, kyselin, zásad a v 70% etanolu, nekoagulují za tepla. Do této skupiny se především řadí rostlinné bílkoviny obsahující značné množství vázaného prolinu a glutaminu a neobsahují lysin (Velíšek, 2002), (Duranti, 2006).

Nutriční hodnotu luštěnin ovlivňuje v první řadě skladba bílkovin, tj. obsah esenciálních aminokyselin.

Většina bílkovin, které se v semenech luskovin hromadí, postrádají katalytické účinky, nehrají žádnou strukturální roli v pletivech. Vnitřní prostor membrán je vyplněn základní hmotou, která je bohatá na bílkoviny. Bílkoviny v semenech představují přibližně 20 % (uvedeno v sušině) v hrachu a ve fazolu až 38-40 % (Derbyshire, Wright, Boulter, 1976), (Guéguen, Cerletti, 1994). Proto semena luskovin patří mezi nejbohatší potravinové zdroje bílkovin a aminokyselin pro člověka a výživu zvířat.

Obrázek č. 2: Schematické znázornění zpracování globulinů v hrachu



Všechny proteiny mají signální peptid pro transport do plazmatického retikula, který se odstraní společnou translací během vstupu do ER. Leguminy obsahují dvě podjednotky o 40 a 20 kDa (kyselou a bazickou podjednotku), které zůstanou spojeny disulfidickými můstky. Viciliny mají dvě potenciální oblasti pro štěpení (A a B) v závislosti na izoformě. Štěpení probíhá na dvou místech fragmentu o velikosti 20 kDa. Conviciliny zde nejsou zřetelně vidět, mají jiné posttranslační změny než při odstraňování signálního peptidu. (Tzitzikas et al., 2006)

### 2.4.1 Conglutiny v semenech lupiny

Lupina může být využita na výrobu proteinových koncentrátů a společně s jinými potravinářskými výrobky mohou obohatit jejich nutriční hodnotu a zlepšit jejich technologické vlastnosti a umožňovat tak vyšší kvalitu potravin (Dijkstra, Linnemann, & van Boekel, 2003), (Gladstones, 1998), (Torres, Frias, Granito, Guerra, & Vidal - Valverde, 2007). Nedávné studie *in vivo* ukázaly, že bílkoviny ze semen lupin vykazují dobrou biologickou hodnotu, což dokazuje, že může být lupina vynikajícím zdrojem pro zdravou výživu lidí a zvířat (Martínez-Villaluenga, Urbano, Porres, Frias, Vidal-Valverde, 2007), které by mohly nahradit sójové koncentráty v zemích, kde sója musí být dovážena (Ruin & Hove, 1976). Klíčení lupiny bílé a úzkolisté zvyšuje obsah bílkovin (Gulewicz, Martínéz – Villaluenga, et al., 2008).

V lupině jsou zastoupeny hlavně z bílkovin albuminy (A) a gluteliny + prolaminy (Gt + P). Rozdíly v profilu bílkovin byly nalezeny mezi druhy a kultivary, ale zároveň nevykazovaly elektroforetické rozdíly. Aminokyselinový obsah bílkovin byl u jednotlivých frakcí také studován a byly nalezeny rozdíly mezi kultivary. Obecně lze říci, že obsahují Glu, Gly, Arg, Ala, Leu a Lys (jako esenciální aminokyselina). Jsou ochuzeny o sirté aminokyseliny (Met a Cys) (Hudson, 1979, Petterson, 1998). Thr je nejdůležitější aminokyselina v globulinech. Zatímco Asp, Glu, Gly a Arg a Leu a Lys jsou hlavní složky glutelinových a prolaminových frakcí.

Podle frakcí (Osborne & Campbell, 1898), lze rozdělit bílkoviny lupin na: albuminy rozpustné ve vodě, globuliny jsou rozpustné v soli, prolaminy jsou rozpustné v alkoholu a v kyselinách / alkáliích rozpustné gluteliny (Mandal & Mandal, 2000). Kromě toho také obsahuje nízké hladiny inhibitoru proteáz a dalších komponent s antinutričními účinky (Martínez-Villaluenga et al., 2006).

K určení, jaké bílkoviny se nacházejí v lupině se používá kombinace dvou experimentálních přístupů k identifikaci hlavních bílkovin. Jedním z nich je základní proteomický přístup, včetně 2D elektroforetické separace a hmotnostní spektrometrie vybraných trypsin - stravitelných polypeptidů. Druhý přístup je srovnávací skupina 2D elektroforetická analýza bílkovin.

### Podjednotky conglutinu

Pomocí 2D elektroforetické analýzy je vyzkoumáno, že mají semena lupin čtyři hlavní části bílkovin, a to a- conglutiny, 11S globulin frakce, b-conglutiny, 7S globulin frakce, c-conglutin, d-coglutin

Do první skupiny patří proteiny se sedimentačním koeficientem kolem 11S. Jsou to konglutiny a patří k "leguminům" nebo 11S globulinové skupiny o velikosti 350 až 400 kDa.

Zralý protein se skládá z hexamerů ze sulfidicky spojených podjednotek a to jen z kyselých podjednotek (alfa-polypeptidy) a základních podjednotek (beta-polypeptidy) – konglutin (Wright & Boulter, 1974; (Crhy et al., 1979)(Crevieu-Gabriel, I., 1999), (Crevieu, I., et al. 1998). Na rozdíl od většiny ostatních 11S globulinů jsou glykosylované.

Druhá skupina bílkovin má sedimentační koeficient kolem 7S. Patří sem b - konglutiny a jsou to také jen violinu podobné bílkoviny nebo 7S globuliny. Jsou to trimerní bílkoviny o velikosti od 150 do 280 kDa, v němž monomery se skládají z několika polypeptidů v rozmezí od 16 do více než 70 kDa bez disulfidických můstků.

Lupina dále obsahuje významné množství (5,6 %) c - conglutinu, který se skládá ze dvou heterogenních disulfidicky spojených podjednotek o velikosti 17 a 30 kDa (Magni, Scarafoni, et al., 2007), (Scarafoni et al., 2001) a nízké molekulární bílkoviny podobné jiným 2S albuminům, které nazýváme d- onglutiny (Duranti et al. 1981), (Salmanowicz a Weder, 1997), spojenými dvěma disulfidickými řetězci o velikosti asi 4 a 9 kDa.

Podjednotky všech těchto čtyř zmíněných tříd bílkovin vyplývají z proteolytického štěpení prekurzorů molekul (Derbyshire et al., 1976), (Müntz, 1998), (Müntz et al., 2002).

### **2.4.2 Bílkoviny v semenech hrachu setého**

Hrách je pěstovaný na 85-90 % z celkové plochy pozemku luskovin pěstovaných na zrna. Patří mezi nejdůležitější druhy luštěnin pěstovaných v ČR, jiné druhy v takovém množství pěstované nejsou. Navzdory nízké tržní ceně je hrách pěstovaný především na vývoz, a to představuje 40-55 % produkce (Mrskos et al., 2000).

Použití složek získaných z hrachu byl doposud omezený, protože často mají silnou chuť a mohou způsobit trávicí obtíže. Technologie vyvinutá společností Roquette překonává tyto nevýhody a je založena na 'čistém' zušlechťování (bez chemických rozpouštědel), která umožňuje získat vysoce čistý protein. Bílkovina z hrachu může být také použita (jako neorganická část) ve složení ekologických produktů.

Tato bílkovina má funkční složky, nabízí vynikající vodné vlastnosti s lipidickou vazbou. Jeho emulgační schopnost pomáhá vytvořit konzistentní a atraktivní texturu.

Původ této bílkoviny je jasně identifikovatelný, není geneticky modifikovaný a není na seznamu významných alergenů, které vyžadují varovné označení.

Vyznačuje se zdravým koncentrovaným zdrojem bílkovin. Obsahuje aminokyseliny, které si jsou profilově blízké a organizace FAO (Organizace pro výživu a zemědělství) jej doporučuje pro výživu. Díky odstranění anti - nutričních faktorů během výrobního procesu jsou také vysoce stravitelné (Croy, Gatehouse, Tyler & Boulter, 1980). Dále hrách obsahuje enzymy, vitamíny A1, B1, B2 a lecitin ( Lahola et al.,1990).

#### Velikosti bílkovinných frakcí

Proporce jednotlivých bílkovinných frakcí, které se odhadují integrací FPLC pomocí píků, nebo denzitometrickou kvantifikací pomocí SDS-PAGE gelů je: 33-57 % albuminů, 49,2-81,8 % globulinů, které jsou dále složeny z 24-45 % vicilinů, 17-39 % leguminů a convicilin 3,9-8,3 % (Trstin & Duc, 2007), (Tzitzikas et al., 2006). Legumin je vyjádřen jako protein o velikosti 60-80 kDa. Jsou to oligomery, ale obvykle tvoří hexamery. 7S bílkoviny jsou oligomery, obvykle tvořeny trimery. Vicilin je vyjádřen jako protein o velikosti 47-50 kDa, který je tvořen trimery o molekulové hmotnosti 150 kDa (Emmanouil et al., 2006).

Convicilin je vyjádřen jako protein o velikosti 70 kDa, který je tvořen trimery o molekulové hmotnosti 210 kDa (Casey, 2003), (O'Kane, 2004). Je antigeně odlišný od leguminu, ale poskytuje identickou reakci s vicilinem při testování protilátek proti oběma proteinům (Croy, Gatehouse, Tyler & Boulter, 1980).

### 2.4.3 Bílkoviny v semenech bobu obecného

Bob obecný je tradiční plodina ve střední Evropě (Hochman, Hýbl, Hosnedl, 2006). Přes nesporný význam této plodiny na orné půdě má současná produkce stále klesající tendenci. Podle výhledové zprávy MZ ČR se konstatuje, že došlo v minulých letech k poklesu ploch všech luskovin o více než 13 %, přičemž bob zaujímal pouze 2500 ha z celkových 40587 ha. Bob jako krmná luskovina je významným bílkovinným komponentem v krmných směsích hospodářských zvířat. Lze ho použít jak k zelenému krmení, tak pro použití v sušené formě, čerstvý nebo předem připravený. Výživná hodnota bobu je velmi vysoká a v některých lokalitách je lepší než u krmného hrachu nebo ostatních luskovin. Většinou je využíván pro krmné účely (Sikora, 2006). Z hlediska krmivářského můžeme zařadit bob hned za sóju, a to nejen pro vysoký obsah hrubých bílkovin (32 – 34 %), ale i pro jejich skladbu (Kulovaná, 2001). Zároveň však je obsah bílkovin vyšší než u krmného hrachu (Sikora, 2006).

Bob obecný má vysoký obsah škrobu a aminokyselin především lysinu (Lahola et al., 1990).

Při rozhodování, které krmivo použijeme do krmných směsí, bude rozhodující cena komodity, obsah živin (zvláště N-látek a lysinu) a jejich stravitelnost. Pokud porovnáme tyto ukazatele u krmného hrachu, bobu a sóji, na prvním místě se umístí sója, druhý bude pak bob a poslední hrách. Při srovnání množství aminokyselin u sójového extrahovaného šrotu, bobu a hrachu, tak zjistíme, že sójový šrot svým obsahem nepostradatelných aminokyselin zvláště lysinu, převyšuje ostatní leguminosy. Tudíž je velmi důležité pamatovat na doplnění chybějících aminokyselin do krmných dávek pro zvířata (Sikora, 2006).

## 2.5 Bílkovinné koncentráty

Bílkoviny ze semen luskovin mohou hrát bioaktivní roli samy o sobě a nebo mohou být prekurzory biologicky aktivních peptidů různých fyziologických funkcí. (Kostyra, 1996).

Kromě luskovin, které se pěstují hlavně pro lidskou spotřebu nebo pro výnos důležitých krmiv a zeleného hnojení, jsou semena luskovin využívány i pro jiné účely včetně medicíny, na výrobu tanin a žvýkaček (International legume database & Information service, 2004).

Potravinové suroviny rostlinného původu obsahují poměrně málo bílkovin, a proto se často bílkoviny obohacují. Nejjednodušší metodou je získávání bílkovinných koncentrátů. Bílkovinné koncentráty mohou přispívat ke zlepšení chuti jídla, jsou prekurzorem pro aromatické látky a k vytvoření specifické barvy. Tyto změny se dějí během teplotní enzymatické reakce v produktu a dále probíhají i u uskladněných produktů. Rostlinný materiál se zahřeje, aby se bílkoviny denaturovaly a vyextrahují se tzv. nebílkovinné extraktivní látky. Zbývající materiál je přitom obohacen bílkoviny, kterých má být v koncentrátu alespoň 50 % sušiny. Koncentráty se mohou dále texturovat, aby dostaly vláknitou strukturu podobnou bílkovinám svaloviny, dále se barví a aromatizují. Bílkoviny mohou podstatně přispívat také k fyzikální charakteristice pro přípravu potravin a vytvářet stabilní gely, pěny, emulze a vláknité struktury. Nutriční energie plnohodnotného proteinu je 17 kJ/g (nebo 4 kcal/g). Hodnota je velmi vysoká jako u sacharidů.

Jinou metodou a za to dražší je získávání bílkovinných izolátů. Rostlinný materiál se extrahuje (většinou mírně alkalickým roztokem) za podmínek, kdy je rozpustnost bílkovin co největší. Tato etapa procesu musí být rychlá a alkalita mírná, aby se netvořily antinutriční produkty. Následnou centrifugací, úpravou pH (dojde k vysrážení) a opětovnou centrifugací se získá bílkovinný izolát s více než 90 % bílkovin v sušině. Na obrázku č.3 je schéma získávání bílkovinného koncentrátu, podle něhož jsme v našich analýzách podobně postupovali. Obsah leguminu se pohyboval mezi 5,9 a 24,5% z celkového množství vyextrahovaného hrachového proteinu. Vicilin je nejhojnější protein v hrachu, a jeho obsah se pohyboval mezi 26,3 a 52,0 % z celkového množství vyextrahovaného hrachového proteinu.

Convicilin byl nejméně zastoupený globulin, a jeho obsah se pohyboval v rozmezí 3,9 - 8,3% (Tzitzikas et al., 2006). Obsah bílkovinného koncentrátu promývaného kyselinou byl vyšší než po promytí alkoholem a to o 5,5 % (Wang et al., 2004).

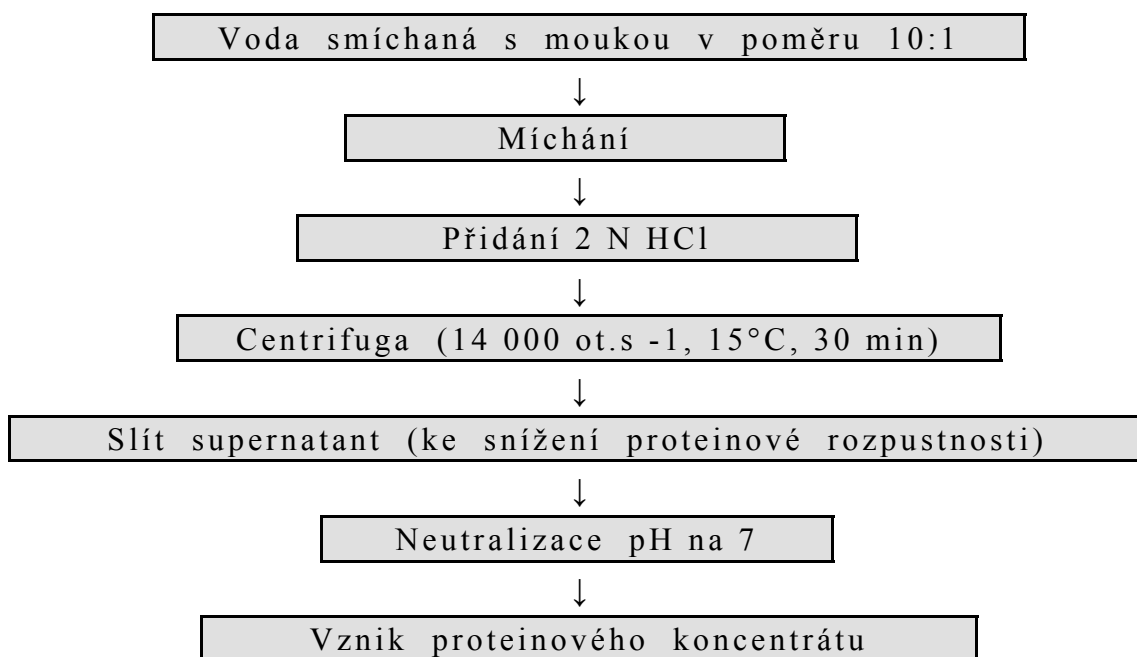
Bílkovinné koncentráty a izoláty se užívají jako přídavek k masným výrobkům nebo jako imitace masa pro vegetariány a k rybám. Syrový materiál, který je obohacen proteiny je například:

- pšenice a kukuřice produkující lepek jako vedlejší produkt ze škrobu,
- okopaniny, kde jsou proteiny izolovány tepelnou koagulací,
- vejce, které se zpracovává v rozdělených formách, a to bílek nebo žloutek,
- mléko, které je zásobárnou proteinu a kaseinu,
- ryba, která je zásobárnou proteinového koncentrátu po extrakci,
- zelené rostliny pěstované pro potravu zvířat, jako je vojtěška, kde jsou proteiny zpracovány tepelnou koagulací (Belin et al., 2009).

Místo rostlinných bílkovin se k tomuto účelu mohou použít také bílkoviny mléka (syrovátky), které jsou hodnotnější, ale také dražší ([http://home.zf.jcu.cz/public/departments/koz/vyz/pred\\_02b.pdf](http://home.zf.jcu.cz/public/departments/koz/vyz/pred_02b.pdf)). Významnost proteinů v budoucnosti závisí na ceně a technologickém procesu. Proteinové koncentráty a proteinové izoláty slouží k zlepšení nutriční hodnoty a k rozšíření fyzikálních vlastností stravy.

### Obrázek č. 3: Vznik proteinového koncentrátu použitím kyselé promývací metody

Tento postup je velice podobný analýze, která byla dělaná v této diplomové práci. (Wang et al., 2004)





### 3 Cíl

Cílem této studie je zhodnotit účinek různých úrovní bílkovinného koncentrátu v syrovém nebo v upraveném stavu a to odlupkováním a mechanickou úpravou jako je vliv namáčení, vliv teploty a času na desintegraci semen hrachu setého, bobu obecného nebo lupiny úzkolisté. A to za účelem získání bílkovinných koncentrátů, které mohou být částečnou náhradou sójového šrotu. Tento postup je založený na isoelektrické precipitaci.

Ze semen je získán homogenní materiál, který podstupuje základním analýzám. U vzniklých bílkovinných koncentrátů je hodnocena a porovnána výtěžnost po precipitaci a jejich složení s ohledem na rozdílnou přípravu semenného materiálu. Dále jsou také stanoveny jednotlivé frakce bílkovin prostřednictvím elektroforetické analýzy.

## 4 Materiál a metodika

### 4.1 Popis materiálu

Semena luskovin byla dodána od podniku Agritec, výzkum šlechtění a služby s. r. o. Šumperk. Hrách setý polní a bob obecný byly sklizeny v roce 2008 a lupina úzkolistá v roce 2007.

- **Hrách setý polní, odrůda TUDOR**

Registrován v roce 2005.

Je to pozdní žlutosemenná odrůda, zrání trvá 108 dní, středně vysoká odolnost proti poléhání před sklizní, vhodnost ke kombajnové sklizni, velmi dobrý zdravotní stav – odolnost proti napadením padlí hrachu, středně vysoká až vysoká odolnost proti napadení hnědou skvrnitostí hrachu, středně vysoká odolnost proti napadení plísní hrachu, hnilobami stonků, listů, lusků a komplexem kořenových chorob.

Obsah dusíkatých látek: 24,2 %.

Hmotnost tisíce semen: 282g.

Sklizeň roku 2008.

(Mezlik, 2009)

- **Bob obecný, odrůda BOREK**

Registrován v roce 1993

Je to poloraná barevně kvetoucí odrůda indeterminačního růstového typu. Doba zrání je 118 dní. Odolnost proti napadení antraknózou bobu je středně vysoká. Na druhé straně má menší odolnost proti poléhání před sklizní a lámání lodyh.

Obsah dusíkatých látek: 32,5 %.

Hmotnost tisíce semen: 505 g.

Sklizeň roku 2008.

(Mezlik, 2009)

- **Lupina úzkolistá, odrůda PROBOR**

Registrována v roce 2008

Středně raná modrokvětá odrůda, rostliny středně vysoké, semena bílá s velmi nízkým obsahem hořkých látek. Doba zrání je 112 dní. Středně vysoká odolnost proti polehání před sklizní. Poměrně vysoká odolnost proti antraknóze a kořenovému vadnutí.

Obsah dusíkatých látek v sušině: 36,6 %.

Hmotnost tisíce semen: 143 g.

Obsah alkaloidů v sušině: 0,02

Sklizeň roku 2007

(Mezlík, 2009)

## **4.2 Metody**

### **4.2.1 Příprava materiálu k analýzám**

V diplomové práci byl hodnocen vliv rozdílné úpravy semen (mouka z celých neupravených semen, mouka z děloh semen po namáčení, mouka z děloh semen po naklíčení) u tří druhů luskovin. Byly vybrány tyto druhy luskovin (hrách setý, bob obecný a lupina úzkolistá). Celá neupravená semena se dala namlít na šrotovníku a poté na mlýnku značky Retsch ZM 100, síta byla použita s velikostí ok 0,2 mm. Naklíčení všech semen se provádělo ve dvou opakováních s navázkou analyzovaného materiálu (semen) 15 g. Semena, která byla namáčená (na 5,5 hodin) a naklíčená byly nejdříve ošetřeny savem o koncentraci 0,01 M na 30 minut (aby došlo ke zničení povrchové mikroflóry a fytopatogenních mikroorganismů), poté propláchnuty 3x destilovanou vodou a následovalo bobtnání (na 5,5 hod ponořeny do destilované vody, každý vzorek do množství 100 ml, při pokojové teplotě 21°C). Po namáčení se provedla preparace semen na jednotlivé části (osemení, klíčky, dělohy) a stanovena sušina gravimetricky. Po preparaci byl materiál zmrazen na -20°C a lyofilizován pomocí lyofilizátoru ALPHA 1-4 LSC (výrobce Martin Christ, spolková republika Německo) po dobu 48 hod na -50°C a tlak  $\square$  0,470 mBaru do konstantní hmotnosti materiálu. Následovala homogenizace všech tří frakcí nejprve předšrotováním na šrotovníku a poté na mlýnku. U semen s označením Y se pracovalo jen s dělohami, semena se Z se nechaly pouze naklíčit v laboratorních klíčidlech v klimaboxu ve tmě při 25°C na 5 dnů u lupiny, 6 dnů u hrachu a na 8 dnů u bobu. Naklíčená semena byla preparovaná jako u varianty Y na 3 díly, lyofilizovány a stanoveny podíly gravimetricky, následovala homogenizace, aby mohl být materiál použit k dalším analýzám.

## **4.2.2 Příprava proteinového izolátu z mouky semen luskovin (modifikováno dle Fernández-Quintela et al., 1998)**

Mouka byla smíchána s destilovanou vodou v poměru 1:10 (w/v) – tuba 1. PH bylo upraveno pomocí 1 M NaOH na hodnotu 9.0 a následovalo míchání (mírně protřepávat) při pokojové teplotě (RT = 20°C) po dobu 20 minut. Vzorky se daly na centrifugu (4 000 g, 10 min, RT). Supernatant se slil do nové Fisher tuby (2). K peletu se přidalo 5 ml destilované vody a důkladně promíchalo (při RT). Následovala další centrifugace (4 000 g, 10 min, RT). Supernatant se opět slil k předchozímu podílu do tuby 2. Provedla se isoelektrická precipitace proteinů ve slitém supernatantu přidáváním 1 M HCl až k dosažení hodnoty pH 4.0. Následovala poslední centrifugace (4 000 g, 10 min, RT) a slití supernatantu do tuby 3 (Fisher tuba, 15 ml), vše se nechalo důkladně vykapat. Nakonec byly pelety (tuby 1 a 2) a supernatant (tuba 3) dány do mrazáku (-20°C).

## **4.2.3 Analýza bílkovin pomocí technikou SDS-PAGE**

### **1. Extrakce bílkovin pro SDS-PAGE analýzu**

K 200 mg homogenizované mouky ze semen luskovin se přidaly 2 ml extrakčního pufru (0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8, 5% 2-merkapt ethanol, 2% SDS). Extrakce probíhala po dobu 4 hodin při teplotě 4°C. Po centrifugaci (10 min, 9000g, 4°C), byl čistý supernatant přenesen do nové mikrocentrifugační zkumavky s příslušným množstvím (4:1) nanášecího pufru (5 x NP: 5 ml 1,25 M Tris-HCl, pH 6,8, 2,3 g SDS, 10 ml glycerolu, 5 mg Bromphenol Blue; k 1 ml se těsně před použitím přidá 340 µl 2-merkapt ethanolu). Před nanesením na gel v množství 10 µl byl vzorek vařen ve vodní lázni.

### **2. Elektroforetická separace (SDS-PAGE) bílkovin z luskovin**

Použita byla diskontinuální desková denaturační elektroforéza na polyakrylamydovém gelu (SE 600, Hoefer, USA) – 4% zaostřovací gel (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8 + SDS) a 10% separační gel (0,375 M Tris-HCl, pH 8,8 + SDS) – v prostředí systému 0,025 M Tris + 0,192 M glycine (pH 8,3) + SDS (Laemmli, 1970). Podrobné složení gelových systému a elektrodového pufru je uvedeno v tab. č. 6. Separace probíhala při proudu 40mA na gelu, napětí 200 V a při teplotě 4°C po dobu 4 hod.

**Tabulka č. 5: Složení roztoků pro SDS – PAGE analýzu bílkovin ze semen  
(Bárta, 2002)**

KOMPONENTA	JEDNOTKA	SEPARAČNÍ GEL	ZAOSTŘOVACÍ GEL 3,75 %
Redestilovaná voda	ml	42	12,15
AC/BIS	ml	26,6	2,5
Pufř A	ml	10	-
Pufř B	ml	-	5
SDS	ml	800	200
Siřičitan sodný	ml	60	20
Persíran amonný	ml	400	150
TEMED	ml	40	20
<b>Poznámky:</b>			
AC/BIS:	30 g akrylamid + 0,8 g BIS/100 ml		
Pufř A:	36,3 g Tris, 48 ml 1M HCl, pH 8,8/100 ml		
Pufř B:	6g Tris, 48 ml 1M HCl, pH 6,8/100 ml		
Siřičitan sodný:	nasyčený vodní roztok		
Persíran amonný:	15% roztok		
SDS:	10% roztok		
Elektrodový pufř 1:	14,4 g glycinu, 3 g Tris, pH 8,3/1000 ml (esterázy, nativní bílkoviny)		
Elektrodový pufř 2:	144g glycin, 3 g Tris, 10 g SDS, pH 8,3/1000 ml (SDS-PAGE)		

#### 4.2.4 Stanovení sušiny

Sušina byla stanovena gravimetricky. Nejdříve se zvažil namočený materiál, a poté vysušený v lyofilizátoru ALPHA 1-4 LSC (výrobce Martin Christ, spolková republika Německo) po dobu 48 hod na -50°C a tlak  $\square$  0,470 mBaru do konstantní hmotnosti materiálu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 6.

Vypočítaly se % jednotlivých částí podle tohoto vzorce:

$$W_{\text{sušiny}} = (m_{\text{sušiny}} / m_{\text{navážky}}) \cdot 100 [\%]$$

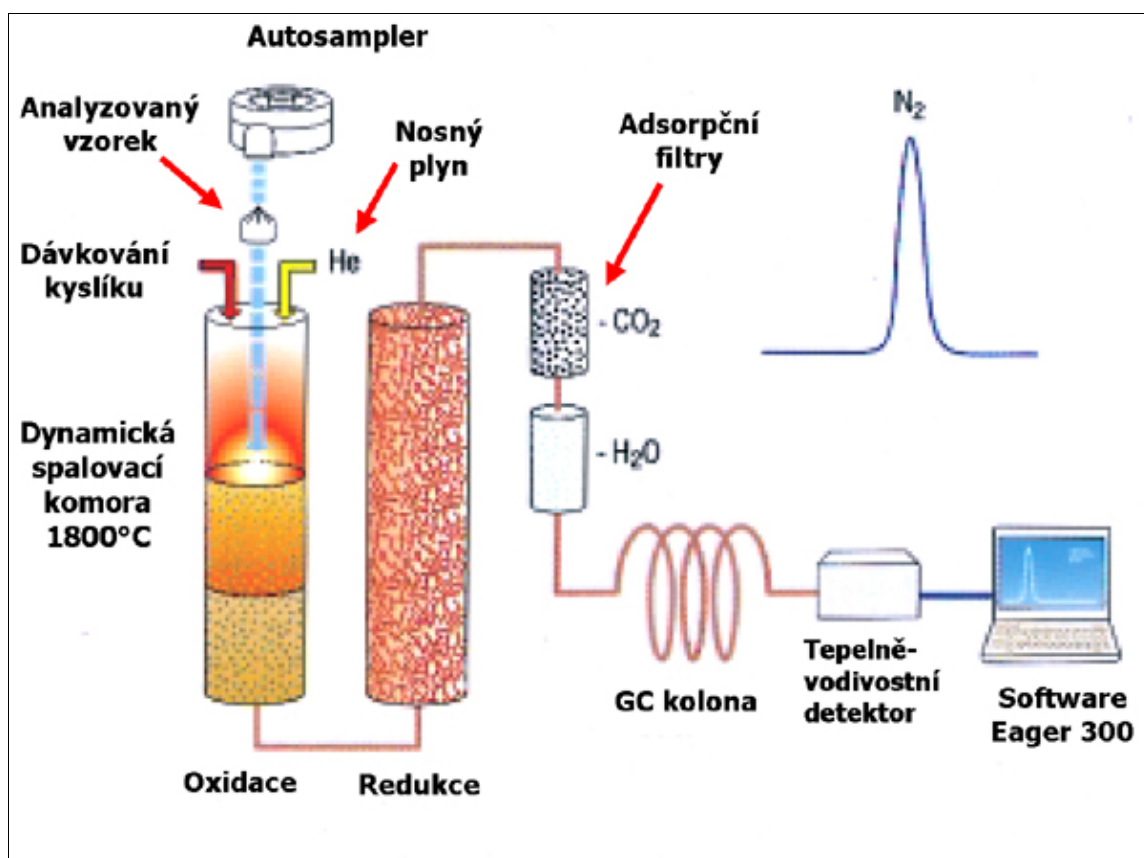
#### 4.2.5 Analýza obsahu hrubých dusíkatých látek v sušině semen (obsah N resp. Nx 6.25)

Pomocí přístroje Flash EA 1112- podstatou je, že se organické látky převedou na redukovaný dusík pomocí mineralizace (materiál se spálí). Konečné stanovení je uskutečněno pomocí tepelně vodivostního detektoru TCD, kde se vytvářejí píky podle vodivosti. Výhodou je, že analýza proběhne rychle.

Detaily byly dodrženy dle zásady výrobce.

Obsah byl stanoven modifikovanou Dumasovou metodou prostřednictvím přístroje Flash EA 1112 (ThermoQuest, 1999), schéma analytického procesu uvedeno na obrázku. Pro stanovení byl použit lyofilizovaný materiál upravený homogenizací. U každého vzorku byla provedena dvě opakování s navázkou analyzovaného materiálu 25 mg.

**Obrázek č. 4: Schéma analytického procesu stanovení obsahu dusíku na přístroji Flash EA 1112 (THERMOQUEST, 1999)**



#### **4.2.6 Detekce separovaných bílkovin na gelu**

Detekce bílkovin byla provedena barvením roztokem Coomassie Brilliant Blue přes noc (barvicí smě – metanol, ledová kys. octová, voda v poměru 5:1:4 + 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250, Sigma Co.). Po detekci bylo odbarveno nesespecifické pozadí (použita směs etanol: kyselina octová: voda v poměru 2.5:1:6.5 s výměnou během odbarvení 2 – 3x) a provedena fixace a dehydratace ve směsi 45% etanolu + 3% glycerolu. Následně byly gely sušeny v celofánu na skle při laboratorní teplotě na vzduchu po 2 – 3 dny (Bárta, 2002).

#### **4.2.7 Zpracování elektroforetických dat**

Elektroforetická spektra bílkovin byla zpracována prostřednictvím digitální obrazové analýzy. Proces zpracování probíhal v následujících krocích:

1. přenos dat - z gelu do elektronické podoby pomocí stolního scanneru (při 200 dpi),
2. úprava počátečního záznamu - volba pozadí, barev do správného odstínu, velikost obrázku, správného formátu (TIFF) (úprava pro software BIO 1D++ (BioProfil) - pomocí programu Adobe Photoshop ver.7),
3. vlastní hodnocení bylo provedeno vizuálním vyhodnocením jednotlivých spekter.

## 5 Výsledky

### 5.1 Vyhodnocení materiálu před samotnými analýzami

#### Stanovení HTS a klíčivosti

Klíčivost u všech třech druhů luskovin byla dosažena nad hodnotu 90 %.

HTS u hrachu byla v průměru 230 g, u bobu 400,7 g a u lupiny 114,4 g

#### Stanovení sušiny v separovaných částech semene

Tento rozbor byl proveden gravimetricky pomocí analytických vah a lyofilizátoru ALPHA 1-4 LSC (výrobce Martin Christ, spolková republika Německo) po dobu 48 hod na -50°C a tlak  $\square$  0,470 mBaru do konstantní hmotnosti materiálu. Z hodnot byla vypočítána sušina v %.

**Tabulka č. 6: Obsah sušiny v celém semeni a v separovaných částech semene.**

Celá semena	sušina (%)	Dělohy	sušina (%)	Osemení	sušina (%)	Klíček	Sušina (%)
Hrách po namáčení	51,575	Hrách po namáčení	53,05	Hrách po namáčení	41,2	Hrách po namáčení	44,8
Bob po namáčení	54,77	Bob po namáčení	59,3	Bob po namáčení	39,95	Bob po namáčení	33,65
Lupina po namáčení	34,22	Lupina po namáčení	33,9	Lupina po namáčení	35,75	Lupina po namáčení	29,9
Hrách naklíčený	45,75	Hrách naklíčený	47,3	Hrách naklíčený	76,2	Hrách naklíčený	22,9
Bob naklíčený	47,905	Bob naklíčený	46,85	Bob naklíčený	75	Bob naklíčený	27,5
Lupina naklíčená	30,005	Lupina naklíčená	32	Lupina naklíčená	68,35	Lupina naklíčená	13,65

Velké množství sušiny se vyskytuje v celém semeni a v dělohách u bobu, který byl podroben úpravě namáčení, kde se hodnoty blížily k 60 %.



Dále je podle tabulky patrné, že u osemení po úpravě namáčení a naklíčení je mezi nimi radikální rozdíl ve množství sušiny cca 20-30%. Největší výnos sušiny má v osemení naklíčený hrách, který činí 76,2 %.

Ve větší míře také převažuje množství sušiny u klíčků hrachu po fázi namočení, jehož hodnota je 44,8 %, na rozdíl od naklíčené lupiny v separovaných klíčcích, která nedosahuje ani 14 %.

## 5.2 Stanovení obsahu dusíku v jednotlivých částech semene (% DM)

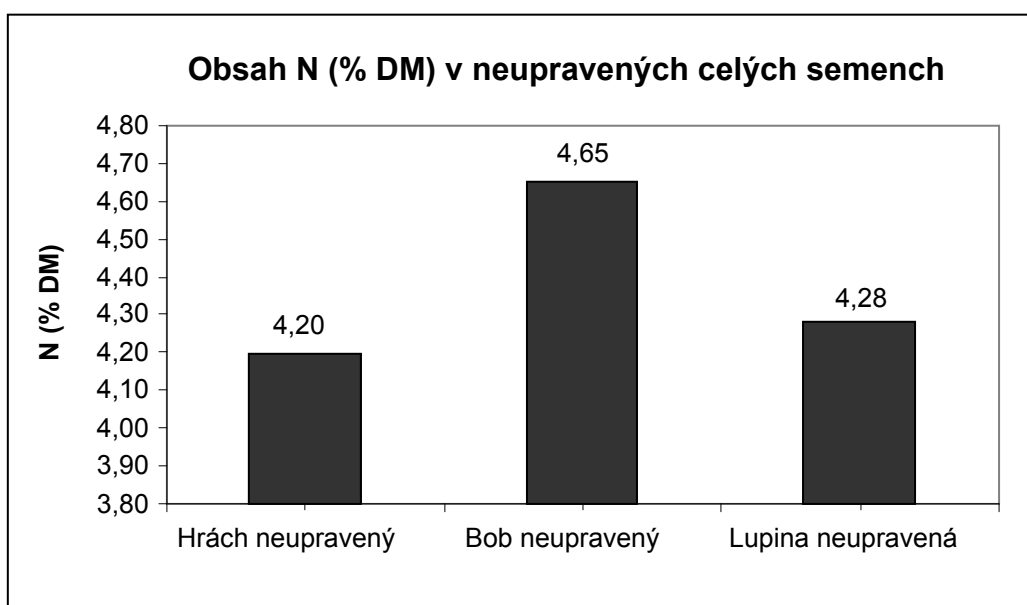
Tato analýza byla stanovena modifikovanou Dumasovou metodou prostřednictvím přístroje Flash EA 1112.

**Tabulka č. 7: Obsah dusíkatých látek v celých semenech v jejich původní textuře**

Druh	Celé semeno	
	N (% DM)	Nx6.25 (% DM)
Hrách neupravený	4,20	26,22
Bob neupravený	4,65	29,06
Lupina neupravená	4,28	26,75

Na úrovni druhu obsahuje bob v neupravené formě semen nejvíce N (%). Jeho hodnota se blíží 5 %. Tyto výsledky jsou uvedeny na obrázku č. 5.

**Obrázek č. 5: Stanovení obsahu dusíku v původním neupraveném stavu celých semen**



V obrázku jsou přehledněji vyjádřena data neupravených materiálů luskovin. Je tedy vidět, že bob obsahuje větší zastoupení dusíku než ostatní druhy luskovin. Rozdíl není až tak veliký, pohybuje se kolem 0,41 %.

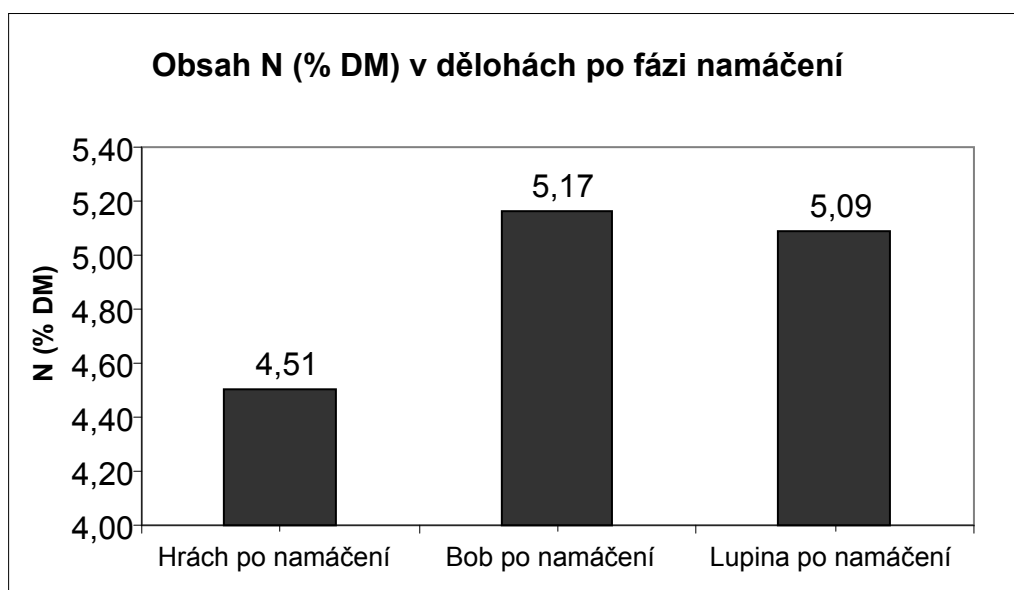
**Tabulka č. 8: Obsah dusíkatých látek v děloze, osemení a klíčku po různých úpravách**

Druh	Děloha		Osemení		Klíček	
	N (% DM)	Nx6.25 (% DM)	N (% DM)	Nx6.25 (% DM)	N (% DM)	Nx6.25 (% DM)
<b>Hrách po namáčení</b>	4,51	28,16	0,62	3,89	6,82	42,63
<b>Bob po namáčení</b>	5,17	32,28	0,68	4,22	7,67	47,95
<b>Lupina po namáčení</b>	5,09	31,83	0,29	1,84	5,95	37,18
<b>Hrách naklíčený</b>	4,57	28,53	0,61	3,80	6,82	42,58
<b>Bob naklíčený</b>	5,23	32,68	0,81	5,03	6,53	40,82
<b>Lupina naklíčená</b>	4,80	30,02	0,31	1,95	5,83	36,41

Obsah N v sušině byl stanoven u klíčků kolem hodnot 6-7 %, u děloh byl obsah přibližně stejný v různých úpravách semen kolem 5 % a v osemení hodnoty nepřevyšovaly 1 %.

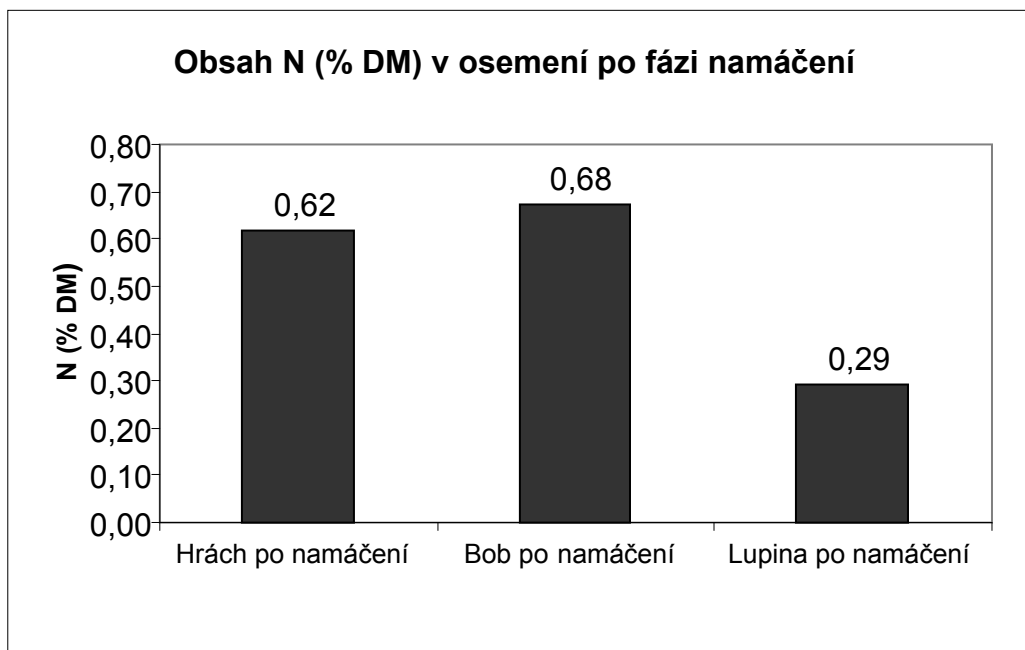
Výsledky některých druhů jsou uvedeny pro zřetelnější porovnání v následujících obrázcích č. 6-8.

**Obrázek č. 6: Stanovení obsahu N v sušině děloh po fázi namáčení**



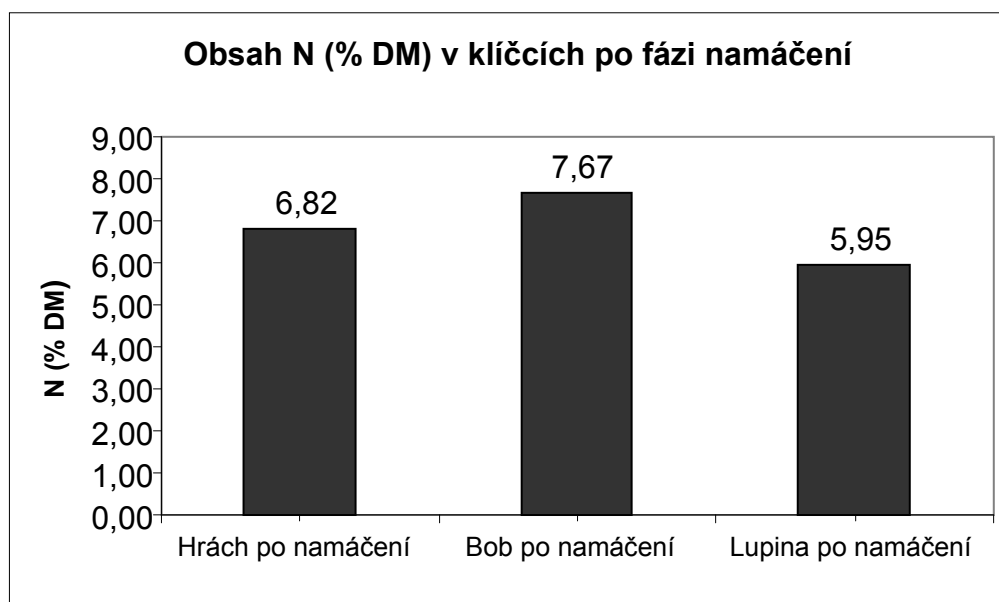
U všech druhů luskovin po úpravě namáčení se hodnoty obsahu dusíku v děložní části pohybují kolem 5 %.

**Obrázek č. 7: Stanovení obsahu N v sušině osemení po fázi namáčení**



V osemení je obsah dusíku nejnižší ve srovnání s ostatními separovanými částmi. Hodnoty jsou tedy malé a po úpravě namočení nepřevýšily 1 %.

**Obrázek č. 8: Stanovení obsahu N v sušině děloh po fázi namáčení**



Po úpravě namáčení klíčků se obsah dusíku pohyboval kolem 6-7 %. Není zde vidět rapidní rozdíl mezi jednotlivými druhy luskovin.

### Statistické hodnocení

Vyhodnocení prostřednictvím metod Factorial ANOVA, Tukey HSD test; na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

**Tabulka č. 9: Stanovení dusíku v neupravené formě semen všech tří druhů luskovin**

Druh	Vysrážený N (mg)	Podíl vysráženého N z celkového N (%)	Zpětně rozpustný N (mg)	Podíl rozpustného N z vysráženého N (%)
Lupina	12,73a	56,64a	9,04a	66,92a
Hrách	13,56a	66,62a	9,30a	70,78a
Bob	16,37a	67,92a	11,54a	73,44a

U těchto neupravených forem semen nejsou žádné průkazné rozdíly vůči druhu luskovin na hladině významnosti  $\alpha \leq 0,05$ .

**Tabulka č. 10:**

<b>Druh</b>	<b>Varianta úpravy semen</b>	<b>Vysrážený N (mg)</b>	
Lupina	Neupravená na výtěžek	10,37	D
Bob	Neupravená na výtěžek	10,45	D
Lupina	Naklíčená na výtěžek	11,23	D
Hrách	Neupravená na výtěžek	11,84	D
Hrách	Naklíčená na výtěžek	14,34	C
Hrách	Namáčená na výtěžek	14,51	C
Lupina	Namáčená na výtěžek	16,58	B
Bob	Namáčená na výtěžek	19,00	A
Bob	Naklíčená na výtěžek	19,67	A

Znázornění, jak byla výtěžnost ovlivněna druhem, úpravou semen a jejich interakcí je uveden v obrázku č. 8.

Rozdílná písmena u středních hodnot znamenají průkazný rozdíl na hladině významnosti  $\alpha \leq 0,05$ .

Pomocí statistického programu se vypočítalo metodou Tukeyho HSD testu na hladině významnosti  $\leq 0,05$  průkazné rozdíly středních hodnot.

**Tabulka č. 11: Podíl vysráženého N z celkového N (%) u různých úprav semen**

Druh	Varianta úpravy semen	Podíl vysráženého N z celkového N (%)	
Lupina	Naklíčená na výtěžek	47,31	E
Bob	Neupravená na výtěžek	48,53	E
Lupina	Neupravená na výtěžek	53,03	De
Hrách	Neupravená na výtěžek	61,82	Cd
Hrách	Naklíčená na výtěžek	68,13	Bc
Lupina	Namáčená na výtěžek	69,58	Bc
Hrách	Namáčená na výtěžek	69,91	Abc
Bob	Namáčená na výtěžek	76,35	Ab
Bob	Naklíčená na výtěžek	78,87	A

Rozdílná písmena u středních hodnot znamenají průkazný rozdíl na hladině významnosti  $\alpha \leq 0,05$ .

Pomocí statistického programu se vypočítalo metodou Tukeyho HSD testu na hladině významnosti  $\leq 0,05$  průkazné rozdíly středních hodnot.

**Tabulka č. 12: Množství zpětně rozpustného N (mg) v různých úpravách semen**

Druh	Varianta úpravy semen	Zpětně rozpustný N (mg)	
Bob	Neupravená na výtěžek	7,47	D
Lupina	Naklíčená na výtěžek	7,47	D
Hrách	Neupravená na výtěžek	8,21	D
Lupina	Neupravená na výtěžek	8,46	D
Hrách	Namáčená na výtěžek	8,62	D
Hrách	Naklíčená na výtěžek	10,28	C
Lupina	Namáčená na výtěžek	11,95	B
Bob	Naklíčená na výtěžek	12,50	B
Bob	Namáčená na výtěžek	14,66	A

Rozdílná písmena u středních hodnot znamenají průkazný rozdíl na hladině významnosti  $\alpha \leq 0,05$ .

Pomocí statistického programu se vypočítalo metodou Tukeyho HSD testu na hladině významnosti  $\alpha \leq 0,05$  průkazné rozdíly středních hodnot.

**Tabulka č. 13: Podíl rozpustného N z vysráženého N (%) u různých variant úpravy semen**

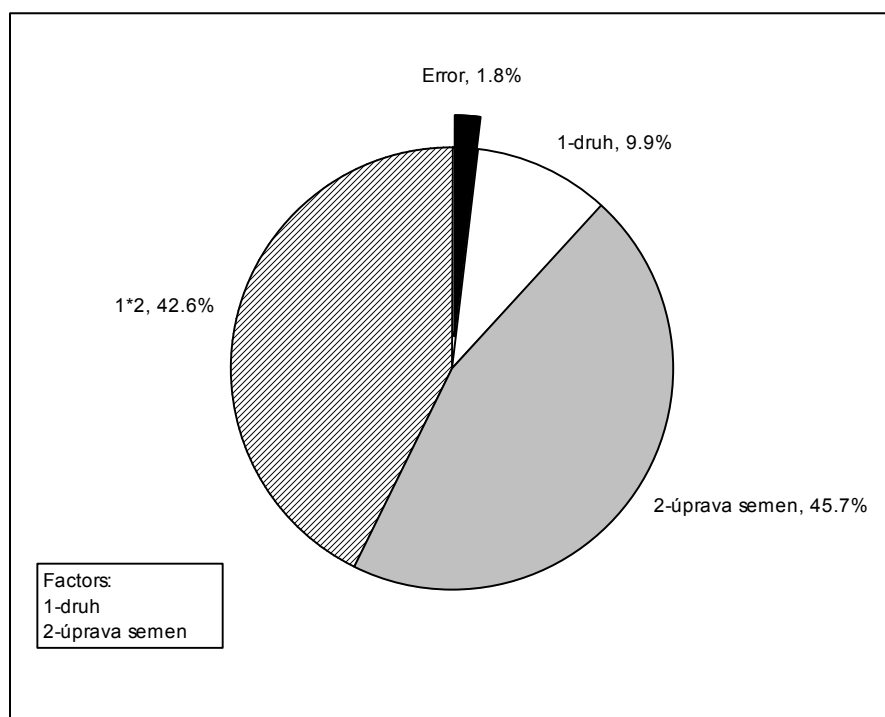
<b>Druh</b>	<b>Varianta úpravy semen</b>	<b>Podíl rozpustného N z vysráženého N (%)</b>	
Hrách	Namáčená na výtěžek	59,61	C
Bob	Naklíčená na výtěžek	63,67	Bc
Lupina	Naklíčená na výtěžek	66,54	Bc
Hrách	Neupravená na výtěžek	69,45	Abc
Bob	Neupravená na výtěžek	71,47	Abc
Hrách	Naklíčená na výtěžek	71,71	Abc
Lupina	Namáčená na výtěžek	72,16	Abc
Bob	Namáčená na výtěžek	77,20	Ab
Lupina	Neupravená na výtěžek	81,61	A

Rozdílná písmena u středních hodnot znamenají průkazný rozdíl na hladině významnosti  $\alpha \leq 0,05$ .

Pomocí statistického programu se vypočítalo metodou Tukeyho HSD testu na hladině významnosti  $\alpha \leq 0,05$  průkazné rozdíly středních hodnot.

## Faktory ovlivňující množství vysráženého dusíku v mg

Obrázek č. 9: Vliv druhu, úpravy semene a jejich interakce na výnos vysráženého dusíku v mg



Graf znázorňuje vliv jednotlivých faktorů na výsledek a jak velkým podílem ovlivňují různé variace množství vysráženého N (mg).

Výsledek nejvíce ovlivňuje úprava semen a to ze 45,7 %. Dále je výsledek ovlivněn druhem luskoviny a to z 9,9 % a ze 42,6 % vzájemnou interakcí těchto dvou variací. 1,8% ní chyba mohla nastat při samotné analýze.

Tabulka č. 14: Výsledky uvedené v tabulce jsou vypočítané pomocí statistického programu Factorial ANOVA (Two.Way ANOVA)

	Suma čtverců odchylek	Stupně volnosti	Průměrný čtverec	F	P	
<b>Intercept</b>	3639,810	1	3639,810	13487,90	0,000000	***
<b>Druh</b>	43,773	2	21,887	81,10	0,000002	***
<b>Varianta</b>	107,920	2	53,960	199,96	0,000000	***
<b>Druh*varianta</b>	52,029	4	13,007	48,20	0,000004	***
<b>Error</b>	2,429	9	0,270			

Pozn.: \*\*\* p-value  $\leq$  0,0001, \*\* p-value  $\leq$  0,001, \* p-value  $\leq$  0,05



F-value: jestli je výsledek významný nebo není

P-value: hladina významnosti

Podle hladiny významnosti nejsou zde žádné průkazné rozdíly.

### 5.3 Stanovení rozpustných látek a výtěžnost čisté bílkoviny

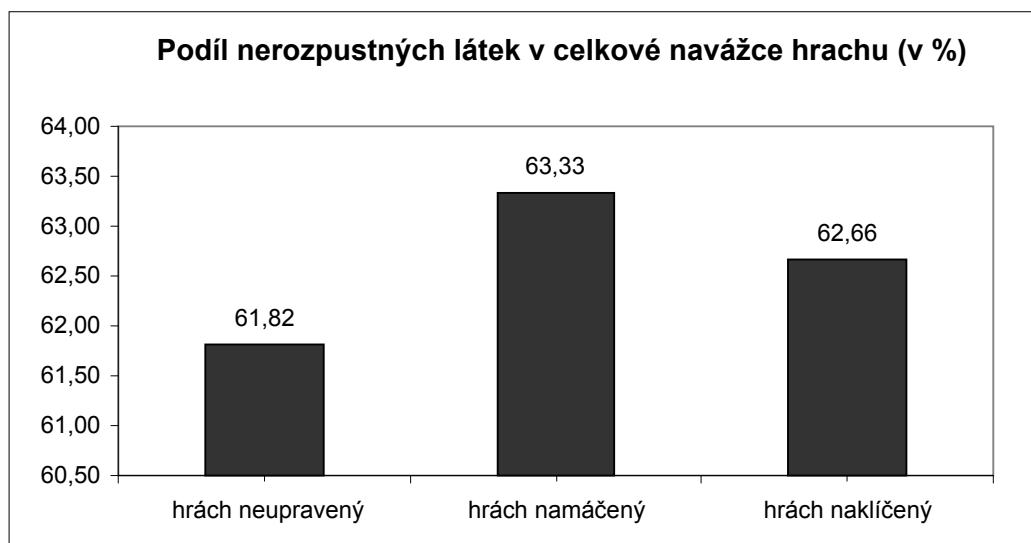
#### Stanovení výtěžnosti nerozpustných a rozpustných látek

Stanovení bylo provedeno z celého množství navážky.

Tabulka č. 15: Podíl nerozpustných a rozpustných látek v peletu

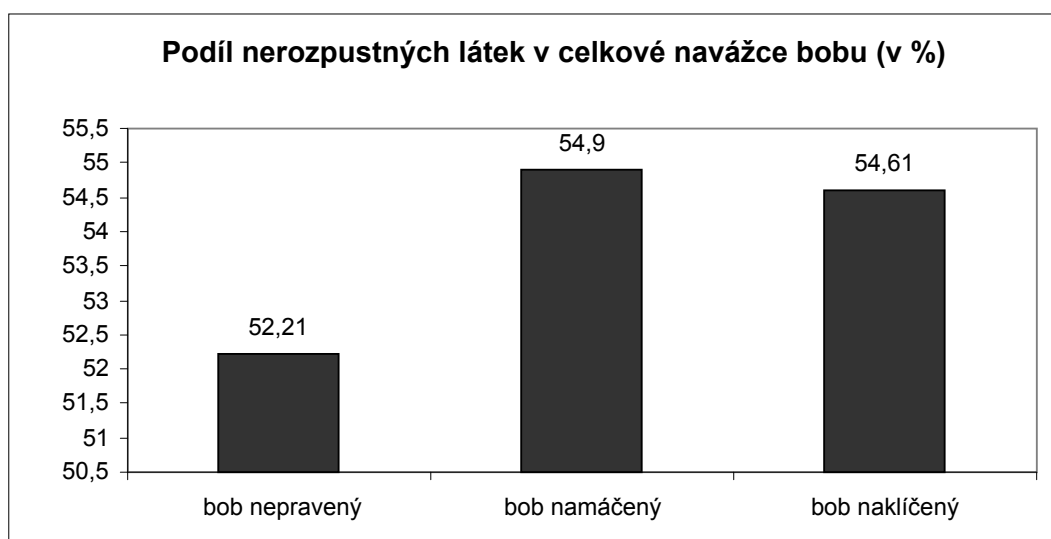
	nerozpustné látky v peletu (%)	rozpustné látky v peletu (%)
hrách neupravený	61,82	38,18
hrách namáčený	63,33	36,67
hrách naklíčený	62,66	37,34
bob nepravený	52,21	47,79
bob namáčený	54,9	45,1
bob naklíčený	54,61	45,39
lupina neupravená	54,63	45,37
lupina namáčená	49,29	50,71
lupina naklíčená	55,6	44,4

**Obrázek č. 10: Stanovení nerozpustného podílu látek v hrachu u rozdílně upravených variant**



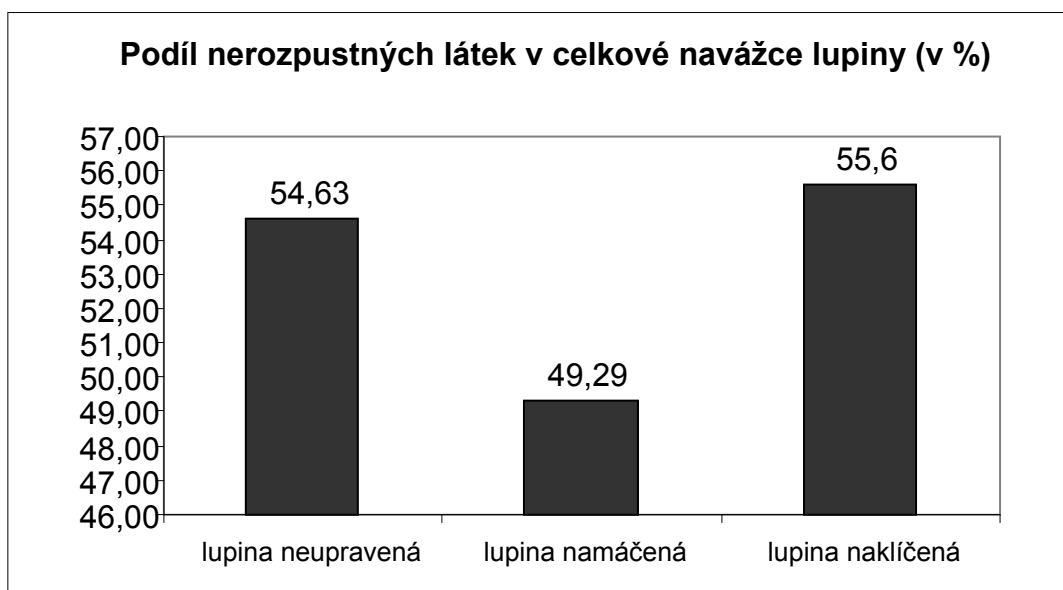
Namočený hrách obsahuje nejvíce nerozpustných látek a to kolem 63 %. Tudiž rozpustných necelých látek je v semeni hrachu 37%.

**Obrázek č. 11: Stanovení nerozpustného podílu látek v bobu u rozdílně upravených variant**



Pouze v neupravené formě obsahuje bob 52 % nerozpustných látek. Ve variantách, které prošly úpravou obsahují semena jen o 2 % více nerozpustných látek.

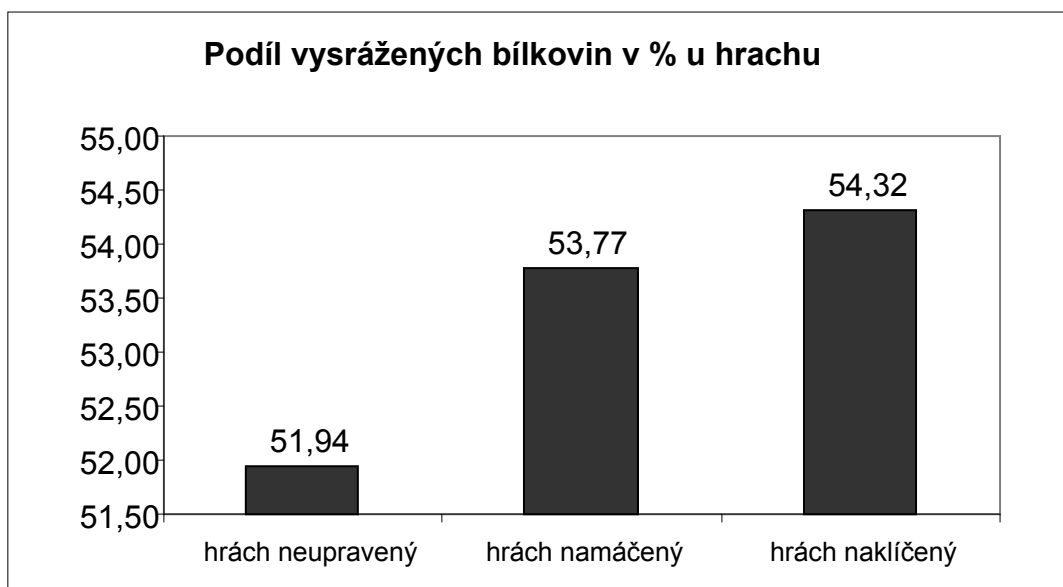
**Obrázek č. 12: Stanovení nerozpustného podílu látek v lupině u rozdílně upravených variant**



Z obrázku je zřetelné největší zastoupení nerozpustných látek u naklíčeného semene lupiny. Nejméně nerozpustných látek produkuje namočená lupina, jejichž obsah se pohybuje do necelých 50 %.

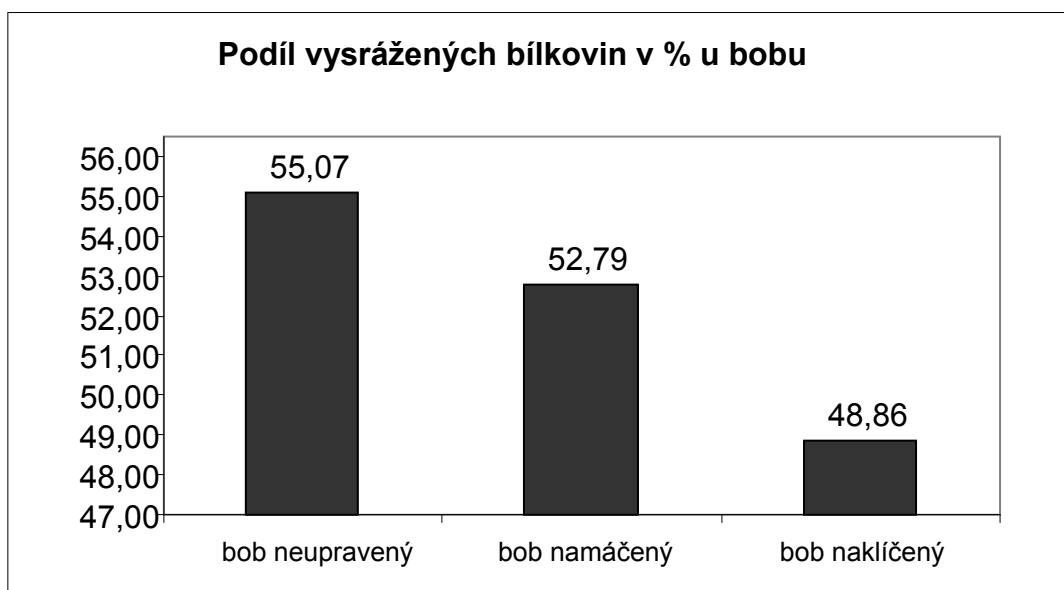
#### Stanovení výtěžnosti čisté bílkoviny

**Obrázek č. 13: Stanovení vysráženého podílu bílkovin u hrachu v rozdílně upravených variantách**



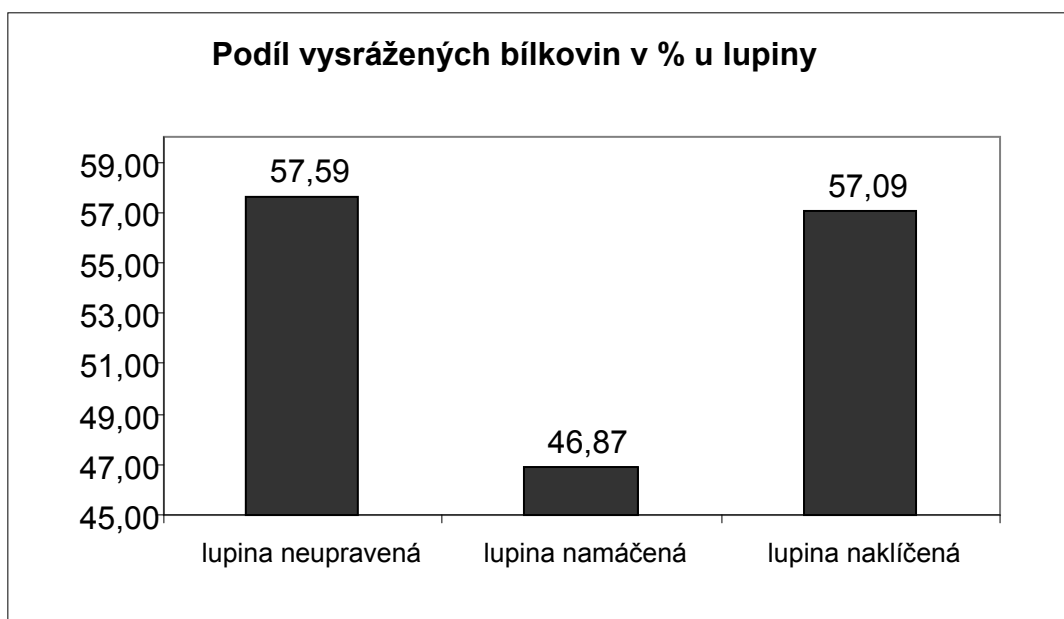
Naklíčený hrách obsahuje nejvíce procent vysrážených bílkovin, hodnoty dosahují téměř 55 %.

**Obrázek č. 14: Stanovení vysráženého podílu bílkovin u bobu v rozdílně upravených variantách**



V původním neupraveném semeni se vyskytuje nejvíce vysrážených bílkovin. Naklíčená semena bobu dosahují rozdílu skoro 10 %.

**Obrázek č. 15: Stanovení vysráženého podílu bílkovin u lupiny v rozdílně upravených variantách**



V porovnání těchto třech úprav materiálu obsahuje namočená lupina výrazně menší podíl vysrážených bílkovin oproti neupravené a naklíčené formě. Rozdíl je až 10 %.

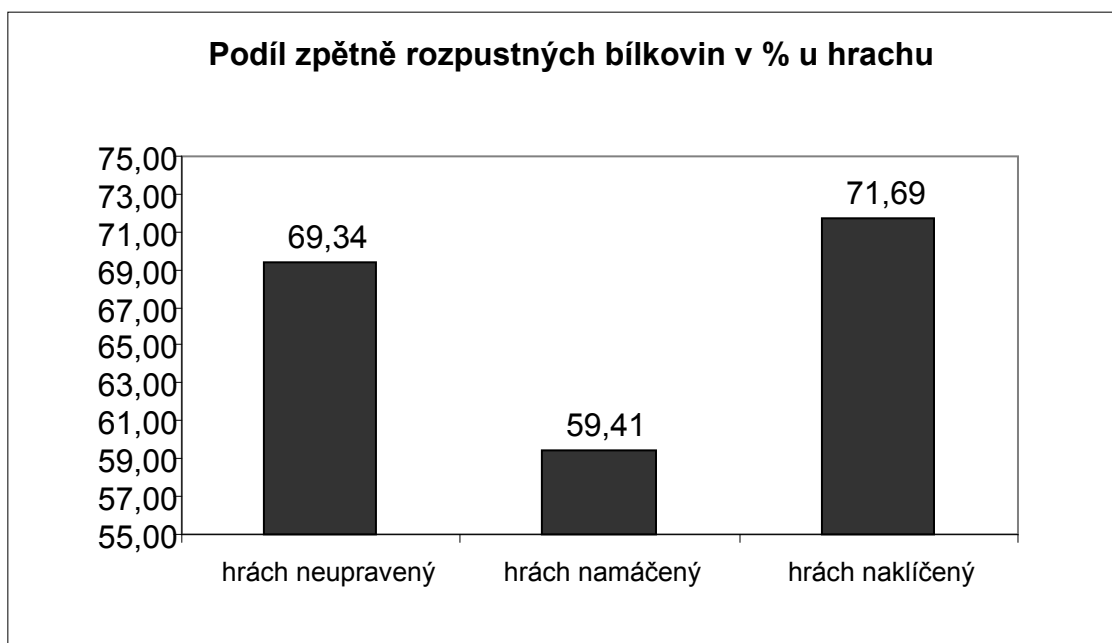
#### 5.4. Stanovení podílu bílkovin po zpětné rozpustnosti

Analýza proběhla po přidání 1M HCl a po úpravě hodnoty pH na 4,0.

**Tabulka č. 16: Stanovení podílu zpětně rozpustných a nerozpustných bílkovin**

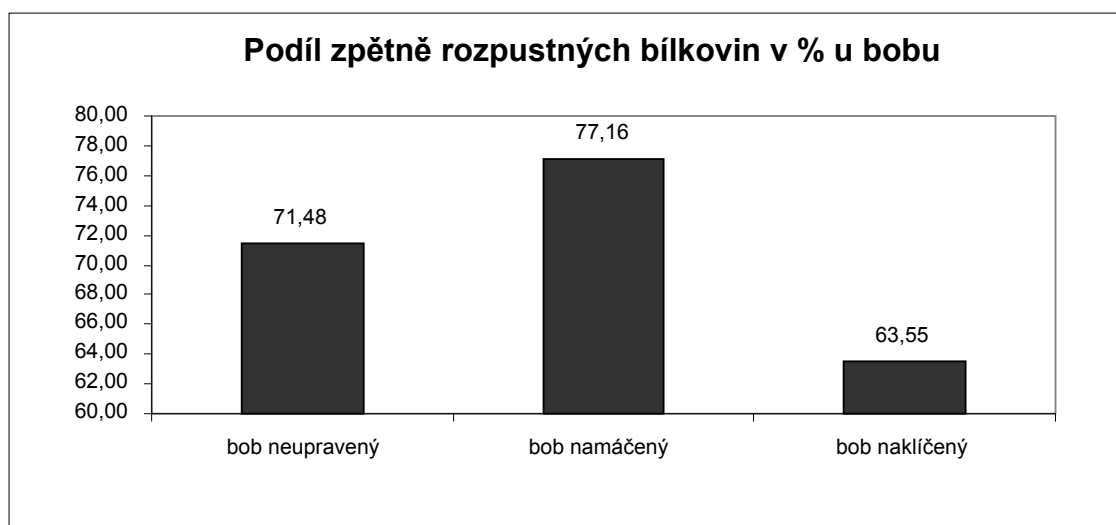
druh	podíl zpětně rozpustných bílkovin (%)	podíl nerozpustných látek v peletu (%)
hrách neupravený	69,34	30,66
hrách namáčený	59,41	40,59
hrách naklíčený	71,69	28,31
bob nepravený	71,48	28,52
bob namáčený	77,16	22,84
bob naklíčený	63,55	36,45
lupina neupravená	81,58	18,42
lupina namáčená	72,07	27,93
lupina naklíčená	66,25	33,75

**Obrázek č. 16: Stanovení zpětně rozpustného podílu bílkovin u hrachu v rozdílně upravených ,variantách**



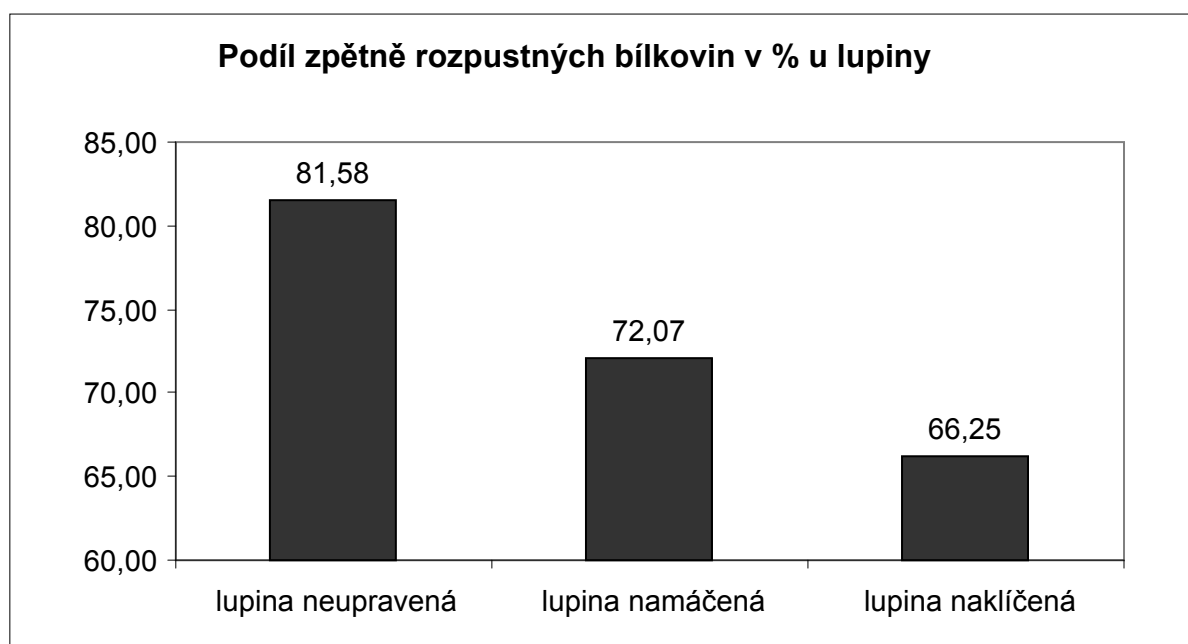
V neupraveném a naklíčeném hrachu je největší podíl zpětně rozpustných bílkovin, jejichž obsah se pohybuje kolem 70 %. Namáčený hrách má necelých 60 % zpětně rozpustných bílkovin.

**Obrázek č. 17: Stanovení zpětně rozpustného podílu bílkovin u bobu  
v rozdílně upravených variantách**



Namáčený bob obsahuje největší podíl zpětně rozpustných bílkovin, kde se pohybuje hodnota kolem 77 %. Oproti tomu naklíčený bob obsahuje pouhých 63,55 % zpětně rozpustných bílkovin.

**Obrázek č. 18: Stanovení zpětně rozpustného podílu bílkovin u lupiny  
v rozdílně upravených variantách**

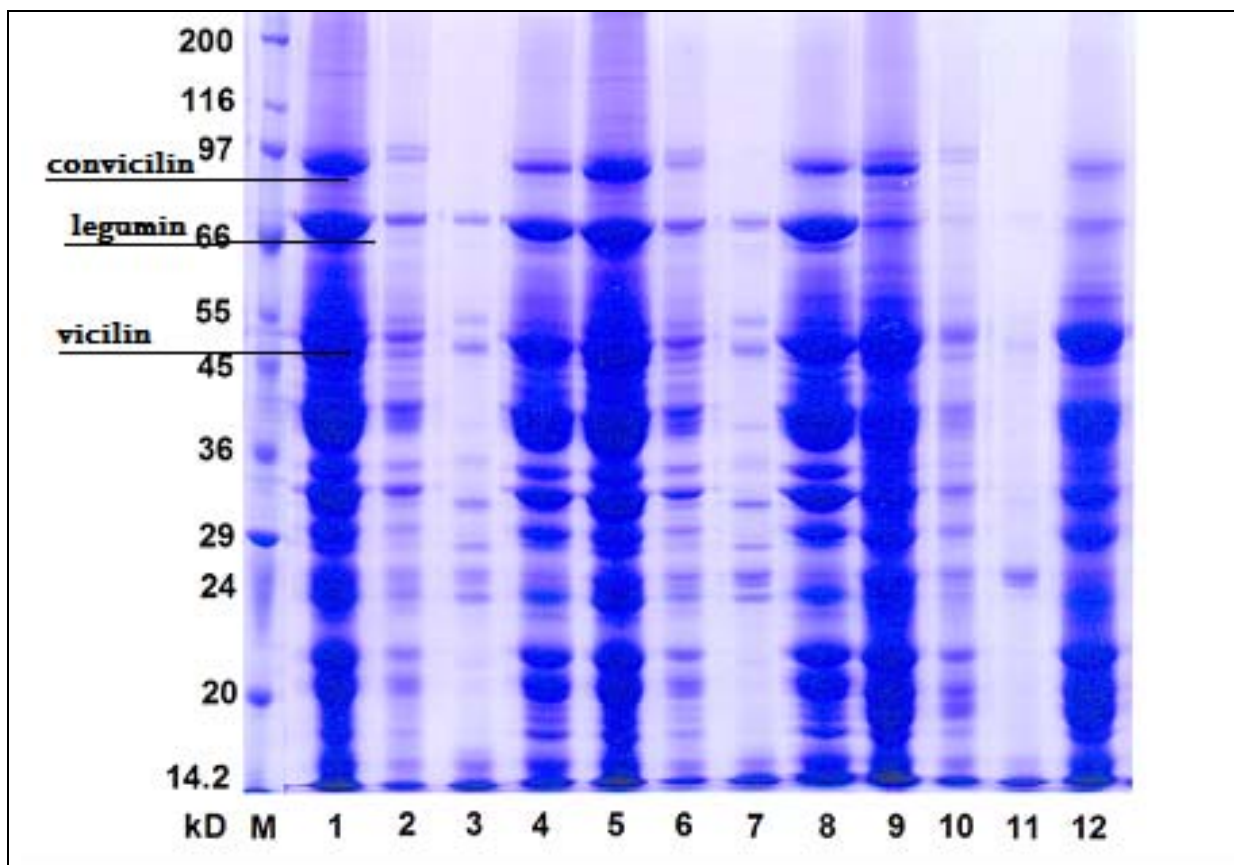


Nejvíce rozpustných bílkovin je obsaženo neupravené formě lupiny. Hodnota přesahuje 80 %. Nejnižší hodnota byla pozorována u naklíčené lupiny.

## 5.4 Elektroforetické vyhodnocení

Elektroforetická spektra bílkovin byla zpracována prostřednictvím digitální obrazové analýzy.

**Obrázek č. 19: Analýza bílkovin semen hrachu pomocí techniky SDS-PAGE:**



**varianta bez úpravy** (1 – vodorozpustné bílkoviny při pH 9.0 před precipitací; 2 – spektrum bílkovin v práci vodě před precipitací; 3 – spektrum bílkovin v supernatantu po provedené precipitaci; 4 – spektrum zpětně rozpustných bílkovin precipitátu)

**varianta namáčená semena s odstraněním osemení a klíčku** (5 – vodorozpustné bílkoviny při pH 9.0 před precipitací; 6 – spektrum bílkovin v práci vodě před precipitací; 7 – spektrum bílkovin v supernatantu po provedené precipitaci; 8 – spektrum zpětně rozpustných bílkovin precipitátu)

**varianta naklíčená semena s odstraněním osemení a klíčku** (9 – vodorozpustné bílkoviny při pH 9.0 před precipitací; 10 – spektrum bílkovin v práci vodě před precipitací; 11 – spektrum bílkovin v supernatantu po provedené precipitaci; 12 – spektrum zpětně rozpustných bílkovin precipitátu)

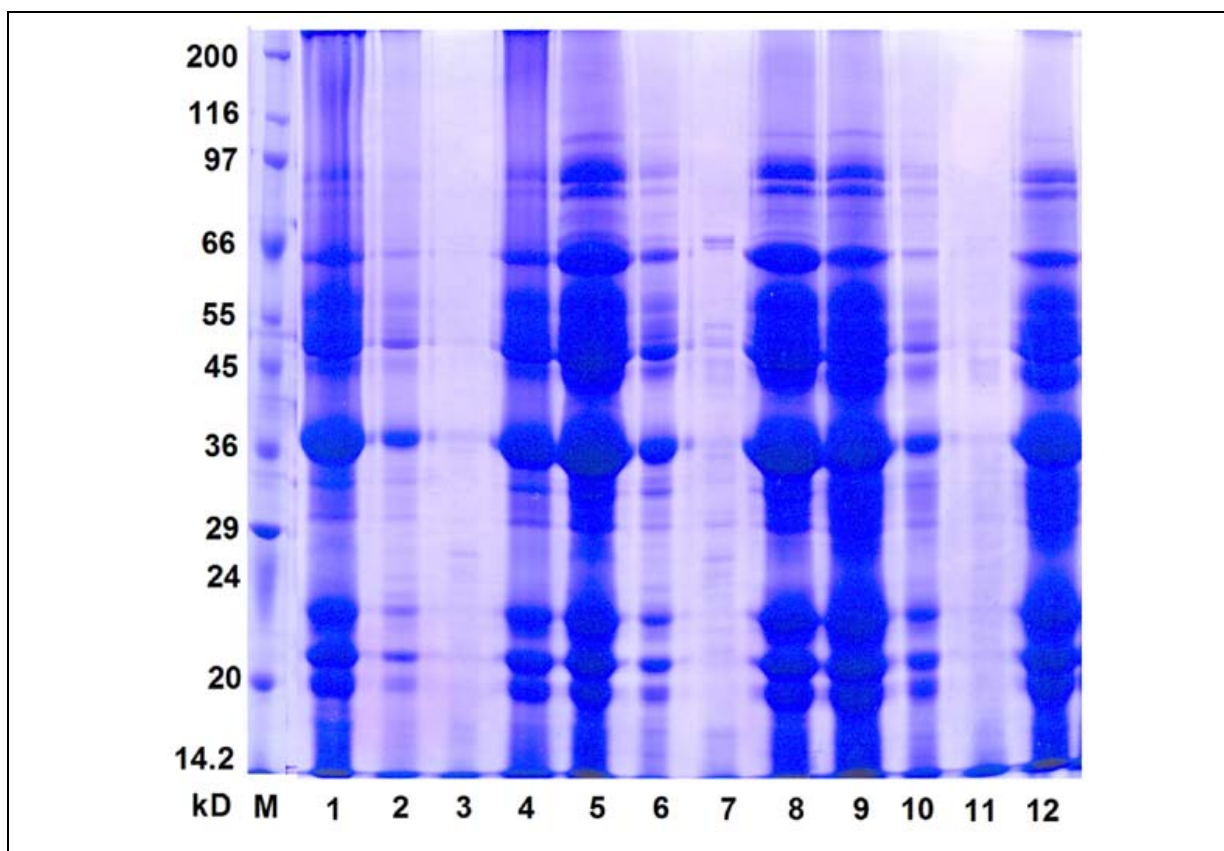
## **Hodnocení změn SDS-PAGE spekter bílkovin hrachu v průběhu procesu tvorby bílkovinných koncentrátů ze zvolených variant úpravy semen**

### **Vizuální hodnocení SDS-PAGE spekter vodorozpuštěných bílkovin hrachu setého (cv. Tudor) před vlastní precipitací**

Dráha 1, 5 a 9 znázorňuje SDS-PAGE spektra bílkovin semen hrachu, které jsou vodorozpuštěné při pH 9. Při vizuálním hodnocení je z těchto spekter zřetelné vysoká koncentrace izolovaných bílkovin. Dráha 9, která představuje variantu naklíčených semen odstraněním osemení a klíčku, vykazuje při porovnání s variantami semen hrachu bez úpravy a variantou namočených semen s odstraněním osemení a klíčku výraznější zastoupení zejména bílkovin s molekulovou hmotností nižší než 24 kDa. Z tohoto spektra lze usuzovat, že došlo v průběhu úpravy semen klíčením k rozpadu bílkovin s vyšší molekulovou hmotností, ale tyto takto vzniklé bílkovinné štěpy či peptidy jsou extrahovatelné při pH 9 a přecházejí do později produkovaných bílkovinných izolátů a dle rozložení spektra bílkovin v dráze 12 jsou tyto bílkovinné štěpy po jejich kyselé precipitaci i zpětně rozpustné. Rozpad vysokomolekulárních bílkovin v průběhu úpravy semen je prezentovaném SDS-PAGE spektru patrné při vzájemném porovnání zastoupení bílkovin convicilinu (90-100 kDa) a leguminu (60-70 kDa) (označeno na obrázku č.19) ve spektru vodorozpuštěných bílkovin varianty bez úpravy semen a varianty namáčených semen – relativní zastoupení těchto dvou bílkovinných systémů v průběhu úpravy semene a zvláště pak u varianty semen naklíčených zřetelně ubývá. Tato výrazná kvalitativní změna hodnocených spekter se projevuje i u v SDS-PAGE profilu získaných bílkovinných koncentrátů respektive jejich zpětně rozpustných frakcí. Varianta semen naklíčených je prezentována spektrem zpětně rozpustných bílkovin, které je výrazně chudší v oblasti convicilinu (90-100 kDa) a leguminu (60-70 kDa). Kromě těchto dvou bílkovinných systému byly u hodnocených spekter zaznamenány také bílkovinné pruhy v oblasti 45 až 55 kDa, které odpovídají bílkovinně vicilin. Dráha 3,7 a 11 znázorňuje SDS-PAGE spektra bílkovin odolných kyselé precipitaci u jednotlivých variant úpravy semen hrachu. Významné je především zjištění nízkého zastoupení nevysrážených bílkovin u varianty naklíčených semen (dráha 11). U zbylých variant úpravy semen zůstává v supernatantu, tedy nevysrážená část bílkoviny legumin a convicilin.



**Obrázek č.20: Analýza bílkovin semen bobu pomocí techniky SDS-PAGE**



**varianta bez úpravy** (1 – vodorozpustné bílkoviny při pH 9.0 před precipitací; 2 – spektrum bílkovin v prací vodě před precipitací; 3 – spektrum bílkovin v supernatantu po provedené precipitaci; 4 – spektrum zpětně rozpustných bílkovin precipitátu)

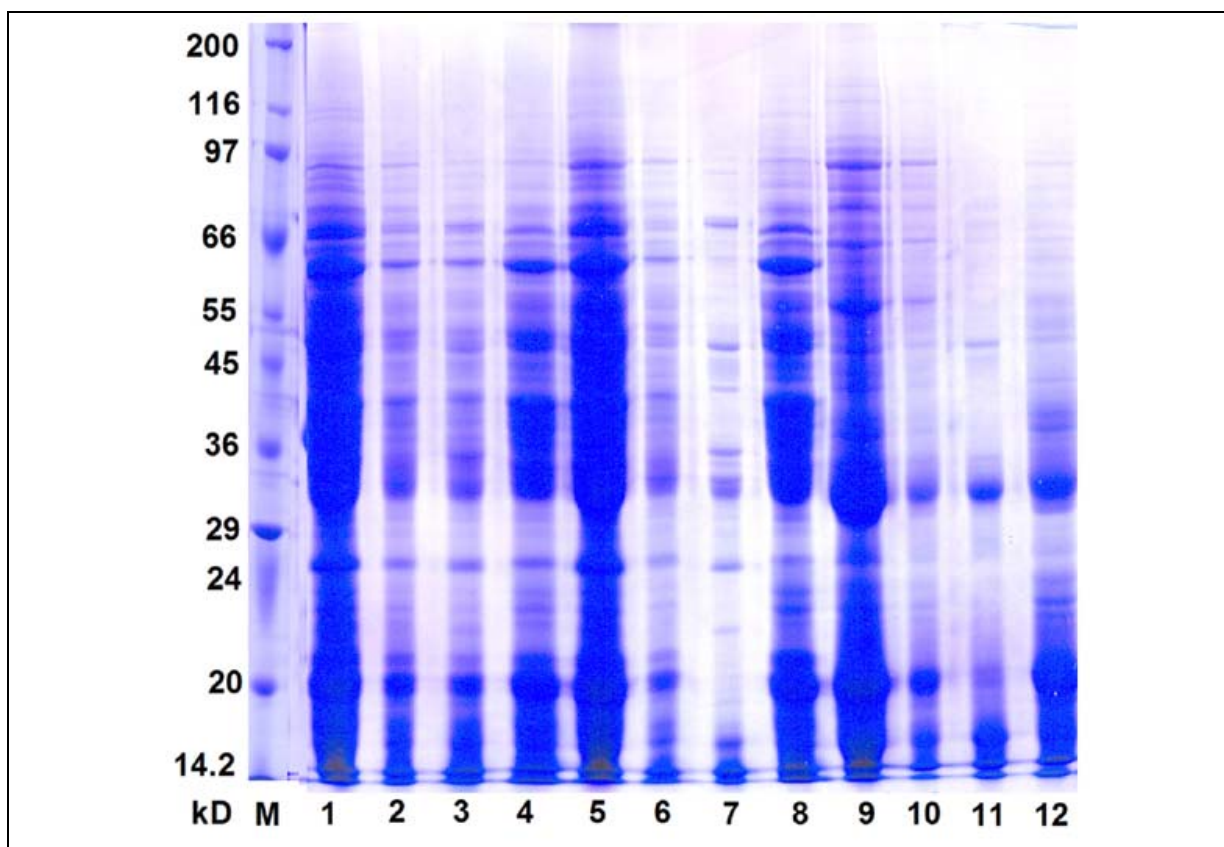
**varianta namáčená semena s odstraněním osemení a klíčku** (5 – vodorozpustné bílkoviny při pH 9.0 před precipitací; 6 – spektrum bílkovin v prací vodě před precipitací; 7 – spektrum bílkovin v supernatantu po provedené precipitaci; 8 – spektrum zpětně rozpustných bílkovin precipitátu)

**varianta naklíčená semena s odstraněním osemení a klíčku** (9 – vodorozpustné bílkoviny při pH 9.0 před precipitací; 10 – spektrum bílkovin v prací vodě před precipitací; 11 – spektrum bílkovin v supernatantu po provedené precipitaci; 12 – spektrum zpětně rozpustných bílkovin precipitátu)

## **Vizuální hodnocení SDS-PAGE spekter vodorozpuitelných bílkovin bobu obecného (cv. Borek) před vlastní precipitací**

Dráha 1, 5 a 9 obrázku 9 znázorňuje SDS-PAGE spektra bílkovin semen bobu, které jsou vodorozpuitelné při pH 9. Při vizuálním hodnocení je z těchto spekter zřetelné vysoká míra vlivu úpravy semen na rozpustnost bílkovin při pH 9 a tím i jejich následných vysrážení při produkci bílkovinných koncentrátů. Dráha 1 prezentuje bílkovinný profil semen bobu bez úpravy. Spektrum je bohaté na bílkoviny kolem 57-45 kDa, kolem 36 kDa a v oblasti nižší molekulové hmotnosti v rozsahu 23 – 19 kDa. Přesto při porovnání těchto základních spekter s bílkovinnými profily dráhy 5 (namáčená semena s odstraněním osemení a klíčku) a dráhy 9 (naklíčená semena s odstraněním osemení a klíčku) je zřetelná vyšší bohatost těchto spekter – došlo k výraznému zvýšení zastoupení bílkovinného pruhu v oblasti 66 kDa, i ve výše zmiňovaných oblastech kolem 57-45 kDa, kolem 36 kDa a v oblasti nižší molekulové hmotnosti v rozsahu 23 – 19 kDa. U varianty naklíčených semen je tento nárůst bohatosti spektra a to zejména v oblasti bílkovin s nižší molekulovou hmotností ještě výraznější. V průběhu úpravy semen a zvláště v případě klíčení dochází pravděpodobně ke štěpení bílkovinných systémů, které se stávají přístupnější (např. jejich uvolnění z pevných vazeb v buněčných strukturách), přecházejí do roztoku při pH 9 a následně je možné tyto bílkoviny vysrážet kyselou precipitací při zachování vysoké zpětné rozpustnosti, jak je patrné z bílkovinných profilů drah 9 a 12.

**Obrázek č. 21: Analýza bílkovin semen lupiny úzkolisté pomocí techniky SDS-PAGE**



**varianta bez úpravy** (1 – vodorozpustné bílkoviny při pH 9.0 před precipitací; 2 – spektrum bílkovin v práci vodě před precipitací; 3 – spektrum bílkovin v supernatantu po provedené precipitaci; 4 – spektrum zpětně rozpustných bílkovin precipitátu)

**varianta namáčená semena s odstraněním osemení a klíčku** (5 – vodorozpustné bílkoviny při pH 9.0 před precipitací; 6 – spektrum bílkovin v práci vodě před precipitací; 7 – spektrum bílkovin v supernatantu po provedené precipitaci; 8 – spektrum zpětně rozpustných bílkovin precipitátu)

**varianta naklíčená semena s odstraněním osemení a klíčku** (9 – vodorozpustné bílkoviny při pH 9.0 před precipitací; 10 – spektrum bílkovin v práci vodě před precipitací; 11 – spektrum bílkovin v supernatantu po provedené precipitaci; 12 – spektrum zpětně rozpustných bílkovin precipitátu)

## **Vizuální hodnocení SDS-PAGE spekter vodorozputných bílkovin lupina úzkolistá (cv. Probor) před vlastní precipitací**

Dráha 1, 5 a 9 obrázku 10 znázorňuje SDS-PAGE spektra bílkovin semen lupiny úzkolisté, které jsou vodorozpuštěné při pH 9. Při vizuálním hodnocení je z těchto spekter zřetelná vysoká rozpustnost i bohaté zastoupení bílkovin v semenech lupiny úzkolisté. Vysoká rozpustnost je zřetelná zejména u varianty semen bez úpravy a varianty namáčená semena, zatímco u varianty semena naklíčená byla zjištěna snížené zastoupení bílkovin s vyšší molekulovou hmotností cca 39 – 66 kDa. Tento stav lze vysvětlit buď rozpadem této frakce bílkovin a jejich přechodem do nižší molekulové skupiny, což ale ze získaných spekter není zřetelné, nebo jejich strukturální změnou v procesu klíčení a znepřístupnění či sníženou rozpustností v testovaných podmínkách pH 9, což lze řešit optimalizací podmínek (zejména pH) převodu bílkovin z naklíčených semen lupiny úzkolisté do roztoku před vlastní kyselou precipitací. Dráhy 4, 8, a 12 prezentují zpětně rozpustné bílkoviny bílkovinných koncentrátů získaných z semenného materiálu pro zvolených variantách úpravy semen lupiny úzkolisté. Z těchto bílkovinných profilů je zřetelné, že bohatost spektra variant semena bez úpravy a semena namáčená se projevuje i v bohatosti spektra zpětně rozpustných bílkovin z bílkovinných koncentrátů vzniklých kyselou precipitací. Přesto je nutné konstatovat, že míra zpětné rozpustnosti při vizuálním hodnocení SDS-PAGE bílkovinných spekter je výrazně omezena oproti bohatosti bílkovinných profilů zpětně rozpustných bílkovin zejména u hrachu setého – podmínky precipitace a následné zpětné rozpustnosti semen lupiny úzkolisté je zřejmě nutné optimalizovat, tak aby lépe vyhovovaly chemickým vlastnostem bílkovin lupiny úzkolisté, zejména pokud se týká hodnot pH pro vysrážení izolovaných bílkovin a podmínek jejich zpětné rozpustnosti.

## 6 Diskuze

Před jakýmkoliv závěrem je nutné okomentovat a diskutovat o jednotlivých výsledcích v celé diplomové práci.

### 6.1 Vyhodnocení materiálu před samotnými analýzami (HTS, Klíčivost, sušina)

Z každého druhu luskovin bylo vybráno tisíc semen a následně zvážena jejich hmotnost. Špaldon (1982) a Mezlík (2009) uvádí HTS v rozmezí u hrachu 282-320 g, bobu 280-650 g a lupiny 130-230 g, tyto hodnoty jsou srovnané s našimi výsledky.

Klíčivosti bylo dosaženo nad 90 %, což je téměř shodné s tím, co uvádí Špaldon (1982).

Semena lupiny obsahují podle Špaldona (1982) 60-65 % sušiny. Výsledky v diplomové práci však vyšly nižší, jelikož byla semena podrobena separaci a jednotlivé části následně upraveny (namáčením a naklíčením).

### 6.2 Stanovení obsahu N v jednotlivých částech semene

V celých neupravených formách semen všech druhů luskovin je kolem 4 % N. Rozdíl N od ostatních druhů luskovin je necelé procento, jež se téměř shodují s výsledky, které uvádí Swanson (1990).

V jednotlivých částech semen jsou patrné rozdíly. Největší podíl N v sušině obsahují klíčky, které dosahují hodnot kolem 6-7 %, což je značný rozdíl oproti osemení, jehož hodnoty N v sušině nepřesahují 1 %.

Úprava materiálu u jednotlivých druhů luskovin má největší vliv na výtěžek vysráženého N (mg), které bylo prokázáno statistickým vyhodnocením na hladině významnosti  $\alpha \leq 0,05$ . Namáčený a naklíčený bob vykazoval největší výtěžek N (mg), podíl vysráženého N z celkového N (%) a zpětně rozpustného N (mg), než ostatní druhy luskovin. Toto zjištění mohlo být ovlivněno fyziologickým procesem a chemickým složením semen po uvedených úpravách.

### **6.3 Stanovení rozpustných látek a výtěžnost čisté bílkoviny**

Namáčený hrách obsahuje největší podíl nerozpustných látek, jehož hodnoty se pohybují kolem 63 %, tudíž rozpustných látek obsahuje zhruba kolem 37 %. Namáčená lupina vykazuje kolem 50 % rozpustných a 50 % nerozpustných látek. Tento rozdíl může být ovlivněn fyziologickým chováním každé luskoviny a v neposlední řadě látkovým složením, které je u každé luskoviny rozdílné.

Guéguen (1994) uvádí v neupraveném semeni hrachu výtěžek čistých bílkovin kolem 40 %, nám se ale podařilo prostřednictvím naklíčení hrachu hodnotu zvýšit až na 55 %.

Z nutričního hlediska lupina obsahuje vysoce hodnotné bílkoviny, jejich výtěžnost se pohybuje kolem hodnot 35-40 %, které uvádí Prugar (2008). Naše hodnoty dosahují až k 50 %. Tento rozdíl mohl být ovlivněn tím, že byla použita v této diplomové práci jiná odrůda lupiny než uvádí Prugar (2008).

Vysoký obsah bílkovin byl také prokázán v neupravené formě semene bobu, kde se hodnoty pohybovaly od 48-55 %. Tento výsledek je téměř shodný s hodnotami 44,2-50,5, které uvádí Špaldon (1982) ve své literatuře.

### **6.4 Stanovení podílu bílkovin po zpětné rozpustnosti**

Při stanovení zpětné rozpustnosti bylo dosaženo u hrachu hodnot v rozmezí 60-72 % bílkovin, avšak největší vliv na výtěžek mělo naklíčení semen.

U bobu se obsah bílkovin pohyboval kolem hodnot 63-77 %, ke stejným závěrům došli Bhatta et al.(1983). Avšak největší výtěžek byl u namáčených semen bobu, kde se v průběhu lyze buňky a dalších fyziologických změn rozpouští největší množství bílkovin.

U lupiny nemá nějak výrazný vliv způsob úpravy semen, protože nejvíce zpětně rozpustných bílkovin obsahuje v neupravené formě.

Bílkoviny jsou rozpustné v určitém pH, nejvíce však v jeho blízkosti isoelektrického bodu, který se pohybuje kolem hodnot 4 pH, jak uvádí Lqari (2002) a Rahma (2006). V jiném pH jsou už výsledky nižší a nemůžeme tak vytěžit největšího možného množství bílkovin.

## 6.5 Elektroforetické vyhodnocení

Ve variantě bez úpravy v semenech hrachu jsou nejvíce viditelné shluky pruhů, které představují bílkovinu legumin o molekulové hmotnosti 60-80 kDa, vicilin o velikosti 47-50 kDa a convicilin o velikosti 70 kDa. Naše studie je srovnatelná s výsledky, které byly získány Tzitzikasem (2006).

Varianta naklíčených semen po úpravě odstranění osemení a klíčku, vykazuje při porovnání s variantami semen hrachu bez úpravy a variantou namáčených semen s odstraněním osemení a klíčku výraznější zastoupení zejména bílkovin s molekulovou hmotností nižší než 24 kDa. Z tohoto spektra lze usuzovat, že došlo v průběhu úpravy semen klíčením k rozpadu bílkovin s vyšší molekulovou hmotností. Podle dostupné literatury nejsou zatím známy žádné výsledky srovnatelné s naším vyhodnocením spekter.

Spektrum je u bobu obecného varianty bez úpravy semen bohaté na bílkoviny kolem 57-45 kDa, kolem 36 kDa a v oblasti nižší molekulové hmotnosti v rozsahu 23 – 19 kDa.

Vysoká rozpustnost je zřetelná zejména u varianty semen lupiny úzkolisté bez úpravy a varianty namáčených semen, zatímco u varianty semen po naklíčení bylo zjištěno snížené zastoupení bílkovin s vyšší molekulovou hmotností cca 39 – 66 kDa. Tento stav lze vysvětlit buď rozpadem této frakce bílkovin a jejich přechodem do nižší molekulové skupiny, což ale ze získaných spekter není zřetelné, nebo jejich strukturální změnou v procesu klíčení a znepřístupnění či sníženou rozpustností v testovaných podmínkách pH 9,0, což lze řešit optimalizací podmínek (zejména úpravou pH).

## 7 Závěr

- Průměrná hmotnost u vybraných semen luskovin je u hrachu odrůda Tudor 115 g, u bobu odrůda Borek 200,3 g a u lupiny odrůda Probor 57,21g. Klíčivost u všech semen přesáhla 90 %
- Naklíčený hrách má v osemeni největší množství sušiny, které činí 76,2 %.
- Bylo zjištěno, že se podíl N (%) rozdílně liší na úrovni úpravě materiálu a různých druhů luskovin. Nejvyšší podíl N (%) byl stanoven v sušině u klíčků kolem hodnot 6-7 %. Oproti tomu nejnižší obsah byl stanoven v osemeni, kde hodnoty nepřevyšovaly 1 %
- Vliv druhu, úpravy semene a jejich interakce ovlivňují množství vysráženého N (mg). Úpravou semen a to ze 45,7 % nejvíce ovlivňuje množství vysráženého N (mg). Dále je výsledek ovlivněn druhem luskoviny a to z 9,9 % a ze 42,6 % vzájemnou interakcí těchto dvou variací. 1,8% ní chyba mohla nastat při samotné analýze
- Hrách po úpravě namočení obsahuje nejvíce nerozpustných látek a to kolem 63 %. Tudiž rozpustných látek je v semeni hrachu 37%.
- Podíl vysrážené čisté bílkoviny je u naklíčeného hrachu největší z těchto variant a to 54,32 %. Bob obsahuje nejvíce čisté bílkoviny v neupravené podobě, hodnota činí 55,07 %. Lupina obsahuje také v neupravené formě největší množství čistých bílkovin, které je 57,59 %.
- Podíl zpětně rozpustných bílkovin u naklíčeného hrachu je kolem 71 %. U bobu je větší podíl zpětně rozpustných bílkovin po úpravě namočení, který dosahuje hodnot kolem 77 %. Největší podíl zpětně rozpustných bílkovin dosáhla lupina v neupravené podobě. Hodnota převyšuje 80 %.
- Při stanovení vizuálního hodnocení elektroforetické analýzy bylo dosaženo největšího množství bílkovin nezávisle na druhu luskovin při pH 9, 0 před precipitací, odlišnosti se projeví na úrovni různých úprav semen.

U hrachu setého byl viditelný nejintenzivnější shluk bílkovin u varianty bez úpravy semen.

U bobu obecného byl viditelný nejintenzivnější shluk bílkovin u varianty naklíčená semena s odstraněním osemeni a klíčku.

U lupiny úzkolisté byl nejintenzivnější shluk bílkovin u varianty namáčená semena s odstraněním osemeni a klíčku.



## 8 Seznam použité literatury

1. Ampe C., Van Damme J., de Castro A, Sampaio M.J., Van Montagu M., Vanderkerckhove J. (1986): Eur J Biochem, p. 159-597.
2. Bárta J., (2002): Studium vlivu dusíkatého hnojení na kvalitu konzumních brambor. Disertační práce. Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita, České Budějovice, p. 191.
3. Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle P. (2009): Food Chemistry 4th revised and extended Edition, p. 8.
4. Bhatta R.S. (1983):Composition and nutritional quality of pea (*Pisum sativum* L.), faba bean (*Vicia faba* L. spp. minor) and lentil (*Lens culinaris* Medik.) meals, protein concentrates and isolates
5. Caballero B., Trugo L.C., Fiklas P.M., (2003): Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition.
6. Casey R., (2003): Pea legumins and vicilins. In Industrial Proteins in Perspective. Progress In Biotechnology, Aalbersberg W.Y., et al., Eds., Elsevier Science: Amsterdam, The Netherlands, vol. 23, p. 49-55
7. Crépon K. & Prebenda F. (2007): Economic value of pea protein in feed.
8. Crevieu I., et al. (1997): J. Agric. Et Food Chem. 45,p. 1295-1300.
9. Crevieu-Gabriel I. (1999): INRA Prod.Amin. 12, p. 147-161.
10. Crhy D.R.D, Gatehouse J.A., Tyler M. & Boulter D., (1980): The purification and characterization of a third storage protein (convicilin) from the seeds of pea (*Pisum sativum* L.), ,191, p.509-516
11. Croy R. R. D., Derbyshire E., Krishna T. G. & Boulter D. (1979): New Phytol. 83,p. 29-35.
12. Derbyshire E., Wright D.J., Boulter D. (1976): Legumin and violin, storage protein of legumes seeds.,Phytochemistry 15, p. 3-24.

13. Derbyshire E., Wright D.J., Boulter D., (1976): Legumin and vicilin,
14. Dijkstra D.S., Linnemann A.R. & Van Boekel T.A., (2003): Towards sustainable production of protein-rich foods: appraisal of eight crops for Western Europe Part II: Analysis of the technological aspects of the production chain. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, p. 481-506.
15. Domovy C. & Stitt M., (2007): Seed protein composition and quantity.
16. Duranti M., Restani P., Poniatowska M., Cerletti P., (1981): The seed globulins of *Lupinus albus*. *Phytochemistry* 20, p. 2071–2075.
17. Gatehouse J. A., Crhy R.R.D., Morton H., Tyler M., Boulter D. (1981): Characterisation and subunit structures of the vicilin storage protein of pea (*Pisum sativum* L.). *Eur.J.Biochem.*, 118, p. 627-633.
18. Gladstones J.S., (1998): Distribution, origin, taxonomy, history and importance., In J. S. Gladstones, C. Atkins, & J. Hamblin (Eds.), *Lupinus as crop Plant: Biology, Production and Utilization*. Wallingford: CAB International.
19. Guéguen J., Cerletti P., (1994): Proteins of some legume seeds, soybean, pea, fababean and lupin. In: Hudson B.J.F, editor. *New and developing sources of food proteins*. New York: Chapman and Hall;. p. 145.
20. Gulewicz P, Martínez-Villaluenga C., Frias J., Ciesiołka D., Gulewicz K., Vidal-Valverde C., (2008): Effect of germination on the protein fraction composition of different lupin seeds, *Food Chemistry* 107, p. 830-844.
21. Hedley C.L., (2001): Carbohydrates in Grain Legume Seeds, *Improving Nutritional Quality and Agronomic Characteristics*, p. 322
22. Hochman M., Hýbl M., Hosnedl V., (2006): Grain legumes in the Czech Republic-current situation.
23. Honsová H., (2005): Využití lupin, *Zemědělec*, roč. 13, č. 9, s. 10-11.
24. Hosnedl V., Vašák J., Mečiar L., et al., (1998): *Rostlinná výroba II – luskoviny, olejníny*.

25. Hudson B.J.F., (1979): The nutritional quality of lupin seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*. 29, p. 245-251.
26. International legume database & Information service (ILDIS),: (2004), World Database of Legumes, Canberra, AUS.
27. Kostyra H., (1996): Food proteins—evolution and nutritional aspects. In: S. Bardocz, E. Gelencsér and A. Pusztai, Editors, *Effects of antinutrients on the nutritional value of legume diets*, COST98 vol. 1, European Commission Directorate-General XII, p. 86.
28. Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, p.680-685.
29. Lis H, Sharon N., (1986): *Annu Rev Biochem*, p. 55-35.
30. Magni Ch., Scarafoni A., Herndl A., Sessa F., Prinsi B., Espen L., Duranti M., (2007): Combined 2D electrophoretic approaches for the study of white lupin mature seed storage proteome, p.997-1007
31. Macháčková A., (21.3.2001): Možnosti využití bobu v současném zemědělství, Šlechtitelská stanice Chlumeč nad Cidlinou, Selgen a.s.
32. Mandal S. & Mandal R.K., (2000): Seed storage proteins and approaches for improvement of their nutritional quality by genetic engineering. *Current Science*, 79, p. 576-589.
33. Martínéz-Villaluenga C., Urbano G., Porres J., Frís J., & Vidal-Valverde C., (2007): Improvement in food intake and nutritive utilization of protein from *L. albus* var. Multolupa protein isolates supplemented with ascorbic acid. *Food Chemistry*, 103, p. 944-951.
34. Mezlík T., (2009): Přehled odrůd, s. 177-187.
35. Mezlík T., (2009): Seznam doporučených odrůd, s. 153-158.
36. Mrskos M. et al.. (2000): Survey of pea and faba bean cultivars, State Institute for Agriculture Supervisit and Testing, Brno, Czech Republic.

37. Müntz K., (1998): Deposition of storage proteins, *Plant Mol. Biol.* 38, p. 77–99.
38. Müntz K., Blattner F.R., Shutov A.D., (2002): Legumains, a family of asparagine-specific cysteine endopeptidases involved in propeptide processing and protein breakdown in plants. *J. Plant Physiol.* 159, p. 1287–1293.
39. O'Kane F.E., Happe R.P., Vereijken J.M., Gruppen H., Van Boekel M.A.J.S., (2004): Characterization of pea vicilin., 1. Denoting convicilin as the  $\alpha$ -subunit of the *Pisum* vicilin family., *J. Agric., Food Chem.*, 52, p. 3141-3148.
40. Petterson D.S., (1998): Composition and food use of lupins. In J. S. Gladstones, C. Atkins, & J. Hamblin (Eds.), *Lupins as crop Plant: Biology, Production and Utilization*. Wallingford: CAB International.
41. Prugar J., et al., (2008): Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí.
42. Rahman E.H. (2006): Functional and electrophoretic characteristics of faba bean (*Vicia faba*) flour proteins as affected by germination, p.577-583
43. Rambousková J., Kavínová M., (2006): Glykemický index potravin, *Výživa a potraviny*, s. 96-98.
44. Rolland L.B., Radke T.M., (1981): *Food Technol*; p. 28-79
45. Ruin Jr. L. P., & Howe E.L., (1976): Conditions affecting production of protein isolate from lupin seed kernels., *Journal of the Science of Food and Agriculture* 27, p. 667-674.
46. Salmanowicz B.P., Weder J.K.P., (1997): Primary structure of 2S albumin from seeds of *Lupinus albus*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 204, p. 129–135.
47. Scarafoni A., Di Cataldo A., Vassilevskaia T.D., Bekman P., Rodriguez- Pousada C., Ceciliani F., Duranti M., (2001): Cloning, sequencing and expression in the seeds and radicles of two *Lupinus albus* conglutin c genes. *Bioch. Bioph. Acta* 1519, p. 147–151.
48. Sikora M., (2006): Bob a jeho využití, *Farmář č.10*, s.18-19.
- storage protein of legumes seeds. *Phytochemistry* 15, p.3–24.

49. Špaldon a kol., (1982): Rostlinná výroba, s. 267-271.
50. Torres A., Frias J., Granito M., Guerra M. & Vidal-Valverde C., (2007): Chemical, biological and sensory evaluation of pasta products supplemented with  $\alpha$ -galactoside free lupine flours. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, p. 74-81.
51. Trstin J. & Duc G. (2007): Protein content and protein composition of pea seeds.
52. Tzitzikas N.E., Vincken J.P., de Groot J., Gruppen H., Visser R. G. F., (2006): Genetic Variation in Pea Seed Globulin Composition, *J.Agric.Food Chemistry*, 54, p. 425-433.
53. Velíšek J., (2002): *Chemie potravin díl 1*.
54. Wang H., Johnson L.A., Wang T. (2004): Preparation of Soy Protein Concentrate and Isolate from Extruded-Expelled Soybean Meals, p. 713-717.
55. Wright D. J. & Boulter D. (1974): *Biochem. J.* 141,p. 413-418.

### **Internetová literatura:**

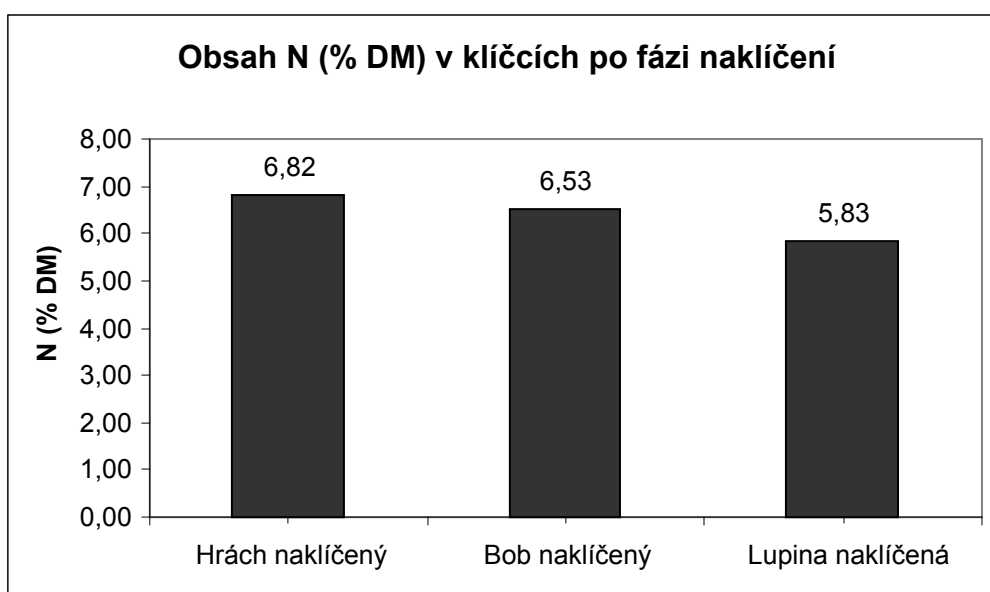
1. [http://eagri.cz/public/eagri/file/2854/LUSKOVINY\\_5\\_2007.pdf](http://eagri.cz/public/eagri/file/2854/LUSKOVINY_5_2007.pdf) 14.3.2010

## 9 Přílohy

### Stanovení obsahu bílkovin

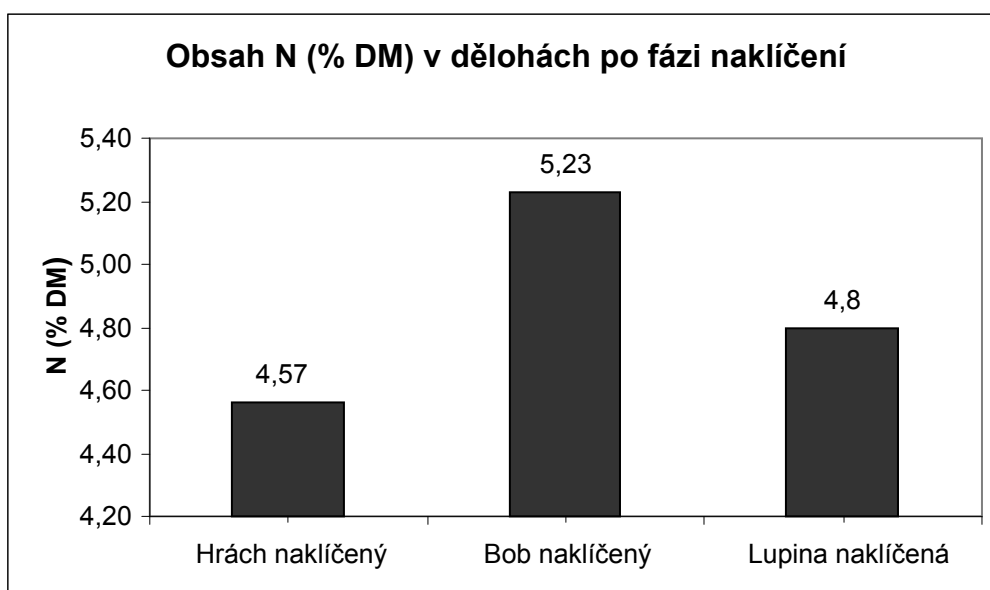
### Stanovení čisté hmotnosti bílkovin v % po provedení testu rozpustnosti

Obrázek č. 22: Stanovení obsahu N v sušině klíčků po fázi naklíčení



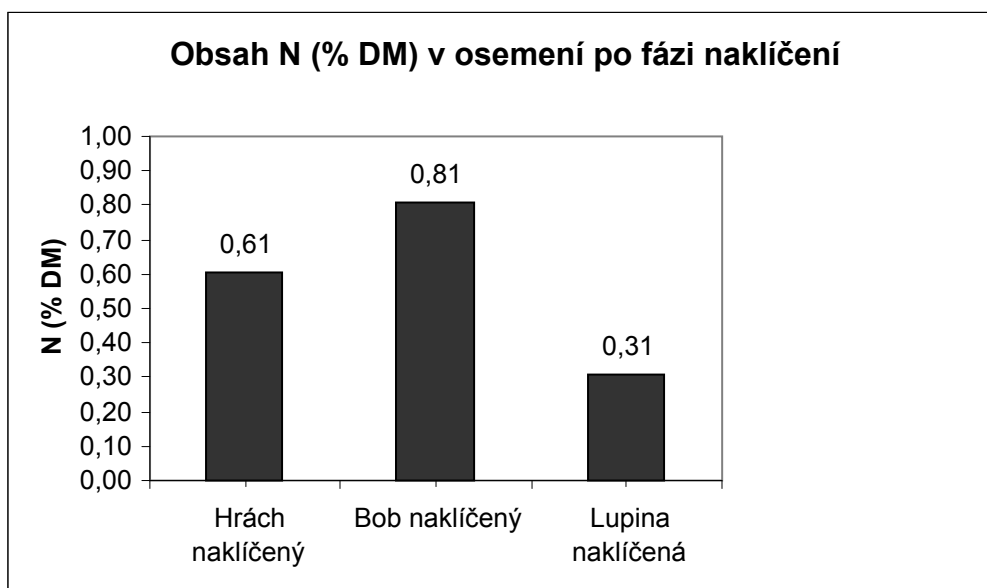
Uvedené množství N v % z grafu je u všech třech druhů luskovin téměř stejný.

Obrázek č. 23: Stanovení obsahu N v sušině v dělohách po fázi naklíčení



U naklíčených semen je nepatrný rozdíl v množství N to u bobu, kde jako jediná luskovina přesahuje 5 %.

**Obrázek č. 24: Stanovení obsahu N v sušině osemení po fázi naklíčení**



V osemení u naklíčených semen obsahuje nejmenší množství N v sušině lupina, docela výrazně se obsah liší od bobu a to o 0.5 %.

**Tabulka č. 17:**

Varianta úpravy semen	Vysrážený N (mg)	Podíl vysráženého N z celkového N (%)	Zpětně rozpustný N (mg)	Podíl rozpustného N z vysráženého N (%)
Neupravená na výtěžek	10,88b	54,46b	8,05b	74,18a
Naklíčená na výtěžek	15,08a	64,77ab	10,09ab	67,31a
Namočená na výtěžek	16,69a	71,95a	11,75a	69,65a

V této tabulce jsou viditelné průkazné rozdíly u neupravené varianty na výtěžek mezi podílem rozpustného N z vysráženého N (%) vůči vysráženého N v mg, podílu vysráženého N z celkového N (%) a zpětně rozpustného N v mg.

U varianty, kde byla semena namočená a použita na výtěžek žádné průkazné rozdíly nejsou.

U naklíčené varianty na výtěžek nejsou průkazné rozdíly u vysráženého N v mg s podílem rozpustného N z vysráženého N (%) a podílu vysráženého N z celkového N (%) se zpětně rozpustným N v mg. Průkazný rozdíl je mezi vysráženým N v g s podílem vysráženého N z celkového N (%) a zpětně rozpustného N v g. Dále je průkazný rozdíl podílu rozpustného N z sráženého N (%) s podílem vysráženého N z celkového N (%) a zpětně rozpustným N v g.

## Faktory ovlivňující množství vysráženého N

**Tabulka č. 18: V tabulce jsou uvedeny hodnoty různých faktorů ovlivňující množství vysráženého dusíku**

Variace	Druh	Hmotnost precipitovaného N (mg)	Směrodatná odchylka	Podíl precipitovaného N z celkového N	Směrodatná odchylka
Druh	Hrách	13,56	1,43	66,62	4,50
Druh	Bob	16,37	4,62	67,92	15,15
Druh	Lupina	12,73	3,02	56,64	10,41
Varianta	Neupravená na výtěžek	10,88	0,76	54,46	6,13
Varianta	Namočená na výtěžek	16,69	2,08	71,95	4,26
Varianta	Naklíčená na výtěžek	15,08	3,84	64,77	14,44
Vzájemná interakce	Hrách neupravený na výtěžek	11,84	0,36	61,82	1,88
Vzájemná interakce	Hrách namáčený na výtěžek	14,51	1,04	69,91	5,01
Vzájemná interakce	Hrách naklíčený na výtěžek	14,34	0,08	68,13	0,40
Vzájemná interakce	Bob neupravený na výtěžek	10,45	0,10	48,53	0,48
Vzájemná interakce	Bob namáčený na výtěžek	19,00	0,33	76,35	1,32
Vzájemná interakce	Bob naklíčený na výtěžek	19,67	0,86	78,87	3,44
Vzájemná interakce	Lupina neupravená na výtěžek	10,37	0,23	53,03	1,16
Vzájemná interakce	Lupina namáčená na výtěžek	16,58	0,55	69,58	2,30
Vzájemná interakce	Lupina naklíčená na výtěžek	11,23	0,07	47,31	0,31

Největší hmotnosti precipitovaného N dosáhl bob a to jak po fázi namáčení, tak naklíčený, o statní semena jsou v rozmezí mezi 10-15 mg.

Podíl precipitovaného N z celkového N u všech semen vykazuje vysoké výsledky kolem 60-70 %. Nejvyšších hodnot dosahoval bob po fázi namáčení.



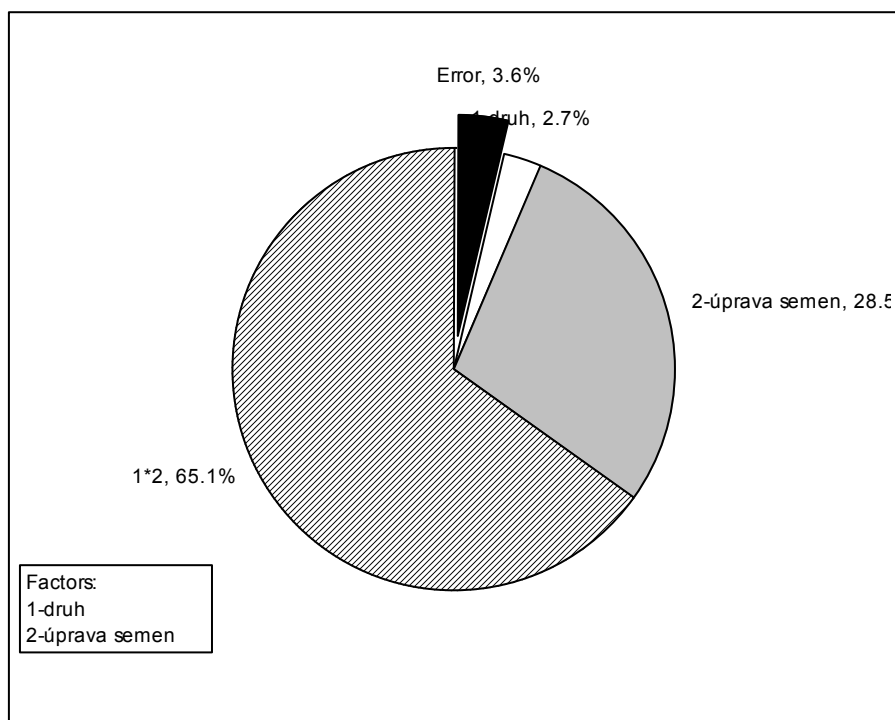
**Tabulka č. 19: V tabulce jsou uvedeny hmotnosti a podíly N a dusíkatých látek v precipitátu**

Variace	Druh	Hmotnost rozp. N z precipitátu	Směrodatná odchylka	podíl rozp. NL v precipitátu %	Směrodatná odchylka
Druh	Hrách	9,04	0,99	66,92	6,30
Druh	Bob	11,54	3,32	70,78	6,88
Druh	Lupina	9,30	2,11	73,44	7,11
Varianta	Neupravená na výtěžek	8,05	0,51	74,18	6,18
Varianta	Namočená na výtěžek	11,75	2,72	69,65	8,72
Varianta	Naklíčená na výtěžek	10,09	2,27	67,31	4,46
Vzájemná interakce	Hrách neupravený na výtěžek	8,21	0,20	69,45	3,83
Vzájemná interakce	Hrách namáčený na výtěžek	8,62	0,01	59,61	4,18
Vzájemná interakce	Hrách naklíčený na výtěžek	10,28	0,19	71,71	0,91
Vzájemná interakce	Bob neupravený na výtěžek	7,47	0,31	71,47	2,30
Vzájemná interakce	Bob namáčený na výtěžek	14,66	0,54	77,20	4,18
Vzájemná interakce	Bob naklíčený na výtěžek	12,50	0,53	63,67	5,46
Vzájemná interakce	Lupina neupravená na výtěžek	8,46	0,30	81,61	1,14
Vzájemná interakce	Lupina namáčená na výtěžek	11,95	0,29	72,16	4,13
Vzájemná interakce	Lupina naklíčená na výtěžek	7,47	0,12	66,54	1,51

Podle daných výsledků vykazuje bob po namočené formě nejvíce hmotnosti rozpustného N z precipitátu. Výsledky ostatních luskovin se pohybují v rozmezí kolem 8-11 mg.

Podíl rozp. NL v precipitátu byl u všech semen kolem 60-70 %, jen u Lupiny v původním stavu přesáhly procenta hodnotu 80.

**Obrázek č. 25: Faktory ovlivňující množství vysráženého N vysráženého N z celkového N (%)**



N množství vysráženého N z celkového N v % má podstatně více vliv úprava semen a to z 28,5 % než druh, který má vliv 2,7 %. Chyba zde nastala o velikosti 3,6 % a vzájemná interakce ovlivnila výsledek ze 65,1 %.

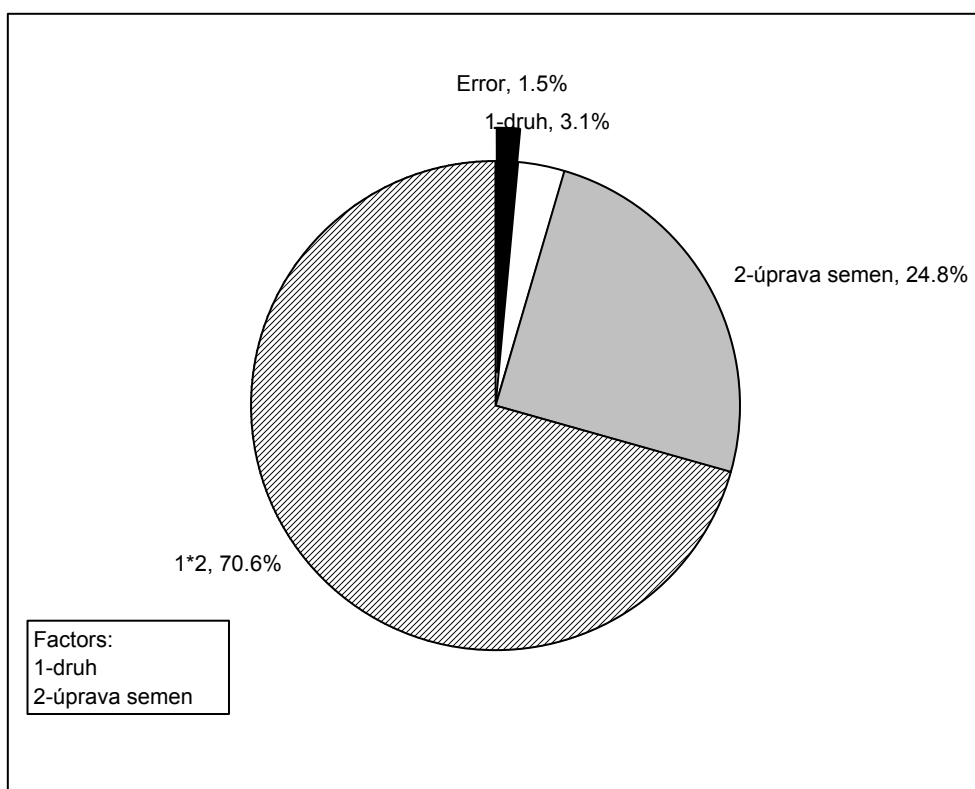
**Tabulka č. 20: Výsledky uvedené v tabulce jsou vypočítané pomocí statistického programu Factorial ANOVA (Two.Way ANOVA)**

	Suma čtverců odchylek	Stupně volnosti	Průměrný čtverec	F	P	
<b>Intercept</b>	73097,40	1	73097,40	13335,81	0,000000	***
<b>Druh</b>	456,91	2	228,46	41,68	0,000028	***
<b>Varianta</b>	927,04	2	463,52	84,56	0,000001	***
<b>Druh*varianta</b>	814,02	4	203,51	37,13	0,000013	***
<b>Error</b>	49,33	9	5,48			

Pozn.: \*\*\* p-value  $\leq$  0,0001, \*\* p-value  $\leq$  0,001, \* p-value  $\leq$  0,05

Podle hladiny významnosti nejsou zde žádné průkazné rozdíly.

**Obrázek č. 26: Faktory ovlivňující množství zpětně rozpustného dusíku**



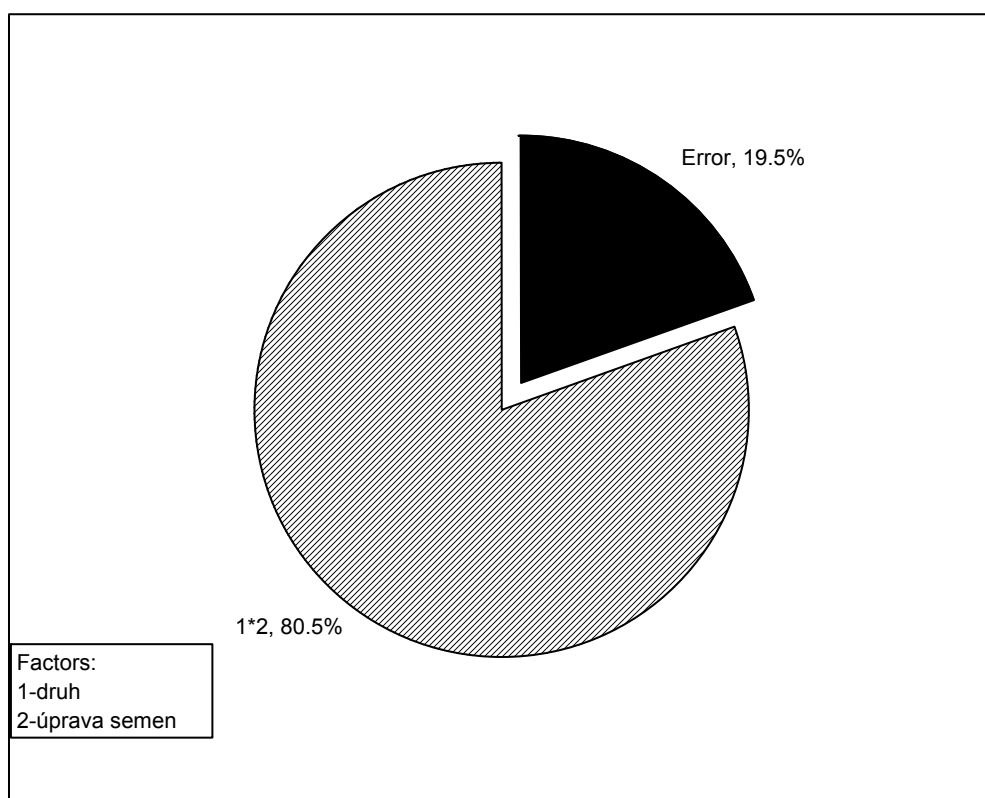
Na výsledek z množství zpětně rozpustného dusíku měla nejvíce vliv úprava semen a to z 24,8 %. Vliv druhu nebyl tak závažný, pouhých 3,1 % a chybovost při analýze byla nepatrná. Největší vliv měla samozřejmě vzájemná interakce a to ze 70,6 %.

**Tabulka č. 21: Výsledky uvedené v tabulce jsou vypočítané pomocí statistického programu Factorial ANOVA (Two.Way ANOVA)**

	Suma čtverců odchylek	Stupně volnosti	Průměrný čtverec	F	P	
<b>Intercept</b>	1785,616	1	1785,616	17148,25	0,000000	***
<b>Druh</b>	22,739	2	11,369	109,19	0,000000	***
<b>Varianta</b>	41,137	2	20,569	197,53	0,000000	***
<b>Druh*varianta</b>	40,268	4	10,067	96,68	0,000000	***
<b>Error</b>	0,937	9	0,104			

Pozn.: \*\*\* p-value  $\leq$  0,0001, \*\* p-value  $\leq$  0,001, \* p-value  $\leq$  0,05

**Obrázek č. 27: Stanovení podílu rozpustného dusíku z vysráženého dusíku v %**



Při stanovení podílu rozpustného N z vysráženého N v % je patrné, že na výsledek měla vliv zřejmě nějaká chyba při provádění analýzy. Tento výsledek je chybný.

**Tabulka č. 22: Výsledky uvedené v tabulce jsou vypočítané pomocí statistického programu Factorial ANOVA (Two.Way ANOVA)**

	Suma čtverců odchylek	Stupně volnosti	Průměrný čtverec	F	P	
<b>Intercept</b>	89157,06	89157,06	1	7559,522	0,000000	***
<b>Druh</b>	64,34	128,68	2	5,455	0,028066	*
<b>Varianta</b>	73,14	146,27	2	6,201	0,020277	*
<b>Druh*varianta</b>	108,99	435,95	4	9,241	0,003004	**
<b>Error</b>	11,79	106,15	9			

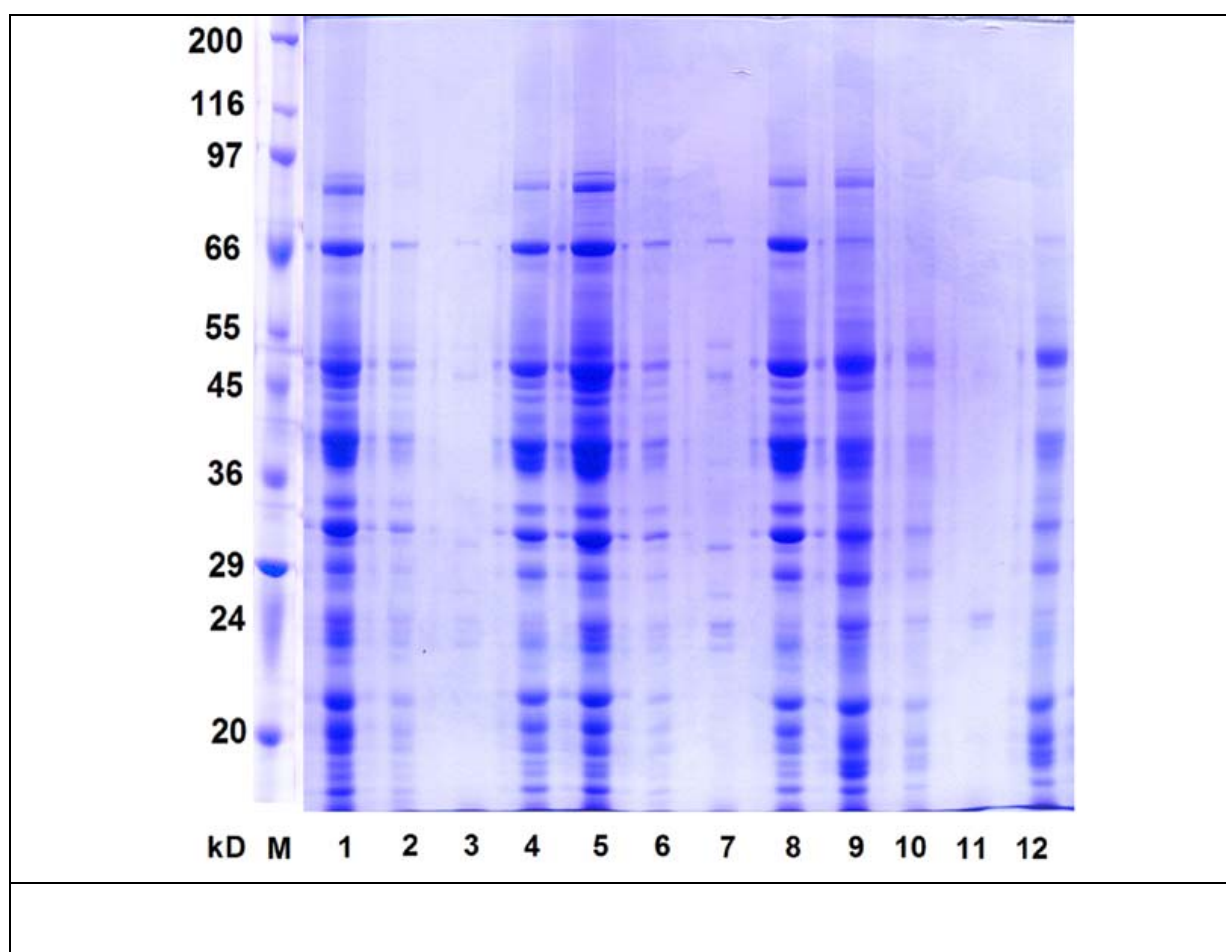
Pozn.: \*\*\* p-value  $\leq$  0,0001, \*\* p-value  $\leq$  0,001, \* p-value  $\leq$  0,05

## Elektroforetické vyhodnocení

Elektroforetická spektra bílkovin byla zpracována prostřednictvím digitální obrazové analýzy.

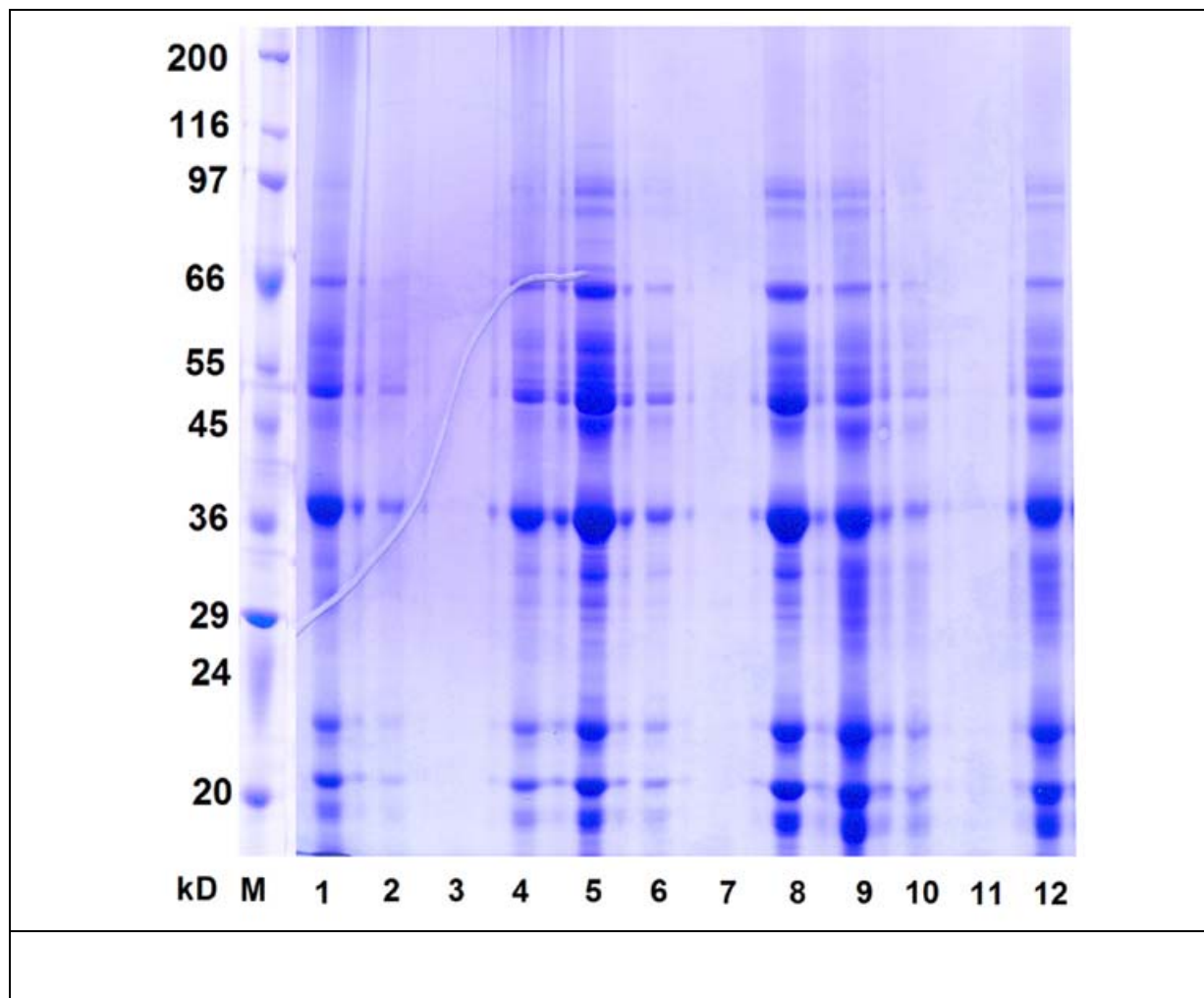
### Obrázek č. 28: Analýza bílkovin semen hrachu pomocí techniky SDS-PAGE - ředěno (1:3)

Popis variant stejný jako u obrázku č. 19 a stejné vyhodnocení výsledků.



**Obrázek č. 29: Analýza bílkovin semen bobu pomocí techniky SDS-PAGE - ředěno (1:3)**

Popis variant stejný jako u obrázku č. 20.



**Obrázek č. 30: Analýza bílkovin semen lupiny úzkolisté pomocí techniky SDS-PAGE - řaděno (1:3)**

Popis variant stejný jako u obrázku č. 21.

