

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství
Studijní obor: Rostlinné biotechnologie
Katedra: Katedra rostlinné výroby a agroekologie
Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Hodnocení vlivu klíčení na profily zásobních bílkovin v
semenech vybraných druhů luskovin

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Konzultant diplomové práce: Ing. Adéla Brabcová

Autor: Bc. Josef Marek

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Josef MAREK**
Osobní číslo: **Z11682**
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Rostlinné biotechnologie**
Název tématu: **Hodnocení vlivu klíčení na profily zásobních bílkovin v semenech vybraných druhů luskovin**
Zadávací katedra: **Katedra rostlinné výroby a agroekologie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Cílem diplomové práce (DP) bude hodnocení změn v profilech zásobních proteinů semen luskovin v průběhu klíčení. V průběhu klíčení dochází v semenech luskovin k syntéze řady nových proteinů, zejména hydrolytických enzymů, a rovněž při něm dochází k postupné hydrolyze zásobních látek, včetně odbourávání zásobních proteinů. Mění se tak vlastnosti proteinů a zvyšuje se jejich stravitelnost. Vlastní řešení DP bude probíhat v laboratořích řešitelského pracoviště. Pro řešení budou vybrány 2-3 druhy luskovin - hrách setý polní, lupina bílá nebo úzkolistá a bob obecný. Řešení DP bude probíhat dle následujícího schématu:

- 1) výběr druhů a genotypů;
 - 2) provedení naklíčení semen - kontrola a dvě varianty doby klíčení;
 - 3) lyofilizace, mletí a extrakce proteinů;
 - 4) analýza získaných vzorků na gelové denaturační elektroforese (SDS-PAGE) nebo na čipové elektroforese;
 - 5) digitalizace sušených gelů a vyhodnocení získaných dat pomocí specializovaného software;
 - 6) zpracování dat do tabulek, obrázků či grafů, statistické vyhodnocení získaných dat.
- Součástí DP bude podrobný literární přehled o dosavadním stavu řešené problematiky a výsledky budou podrobeny diskuzi.

Rozsah grafických prací: 10-15 stran

Rozsah pracovní zprávy: 30-40 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

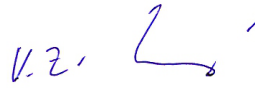
- Duranti M. (2006): Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia* 77: 67-82.
- Gulewicz P., Martínez-Villaluenga C., Frias J., Ciesiolka D., Gulewicz K., Vidal-Valverde C. (2008): Effect of germination on the protein fraction composition of different lupin seeds. *Food Chemistry* 107: 830-844.
- Martínez-Villaluenga C., Gulewicz P., Frias J., Gulewicz K., Vidal-Valverde C. (2008): Assessment of protein fractions of three cultivars of *Pisum sativum* L.: effect of germination. *Eur. Food Res. Technol.* 226:1465-1478.
- Nakai S., Modler H.W. (1996): Food proteins - properties and characterization. Wiley-VCH, New York, 544 p.

Vedoucí diplomové práce: **prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.**
Katedra rostlinné výroby a agroekologie


Konzultant diplomové práce: **Ing. Adéla Brabcová**
Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Datum zadání diplomové práce: **7. října 2013**

Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2014**


prof. Ing. Milošlav Šoch, CSc., Dr.h.c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13
370 05 České Budějovice
L.S.


prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 7. října 2013

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě archivovaných Zemědělskou fakultou JU elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne

Podpis

Poděkování

Rád bych poděkoval prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. za pomoc a cenné připomínky při zpracování diplomové práce. Dále bych poděkoval Ing. Adéle Brabcové a doc. Ing. Janu Bártovi, Ph.D za pomoc a ochotu v laboratoři i mimo ní.

Mé díky patří také rodině a přátelům.

Abstrakt

Cílem diplomové práce bylo hodnocení změn v profilech zásobních proteinů semen luskovin v průběhu klíčení. Pro řešení byly vybrány 4 druhy luskovin: hrách setý polní, lupina úzkolistá, bob obecný a sója luštinatá. Analýzy proteinů v semenech luskovin byly prováděny na začátku, uprostřed a na konci klíčení. Ze získaného lyofilizovaného a homogenizovaného materiálu byly vyextrahovány proteiny, které byly analyzovány pomocí gelové denaturační elektroforézy (SDS-PAGE). Výsledky prokázaly, že během klíčení semen dochází ke štěpení zásobních proteinů na menší peptidy sloužící pro tvorbu nových proteinů. Ve spektrech proteinů naklíčených semen hrachu setého se snížila intenzita proteinových pruhů v zónách o velikosti 48-45 kDa a 40-36 kDa a zvýšilo se zastoupení proteinových pruhů v zónách charakterizovaných hmotnostmi 25-23 kDa a 19-7 kDa. Ve spektrech proteinů naklíčených semen lupiny úzkolisté nebyly detekovány proteinové pruhy nad 39 kDa a zvýšilo se zastoupení proteinových pruhů v oblastech o velikosti 15-7 kDa.

Klíčová slova: klíčení semen luskovin, proteiny, SDS-PAGE elektroforéza, *Glycine max* L., *Lupinus angustifolius* L., *Pisum sativum* L., *Vicia faba* L.

Abstract

The aim of the diploma thesis was to assess changes in pattern of legume storage proteins during germination. Four species of legumes were chosen for analyses – *Glycine max* L., *Lupinus angustifolius* L., *Pisum sativum* L. and *Vicia faba* L. Seeds for analyses were sampled at the beginning, middle and end of germination. Proteins were extracted from lyophilised and homogenised material. These proteins were analysed by SDS-PAGE electrophoresis. The results proved that during seed germination the seed storage proteins cleave into smaller peptides, which forms new proteins. The intensity of protein bands in pea seeds was decreased in the area at around 48-45 kDa and 40-36 kDa and the intensity of the proteins bands was increased at around the protein bands 25-23 kDa and 19-7 kDa. In lupine were not detected the protein bands over 39 kDa and during germination amount of protein bands in areas 15-7 kDa was increased.

Keywords: germination of legume seeds, storage proteins, SDS-PAGE electrophoresis, *Glycine max* L., *Lupinus angustifolius* L., *Pisum sativum* L., *Vicia faba* L.

Obsah

Abstrakt.....	ii
Abstract.....	iii
Obsah.....	iv
1. Úvod.....	1
2. Literární přehled.....	2
2.1. Význam a využití naklíčených semen luskovin.....	2
2.2. Stavba klíčícího semene luskovin.....	3
2.3. Globuliny.....	4
2.3.1. Leguminy.....	5
2.3.2. Viciliny.....	5
2.4. Albuminy.....	6
2.5. Lektiny.....	7
2.6. Inhibitory trypsinu.....	8
2.7. Inhibitory amylas.....	9
2.8. Enzymy účastníci se procesu klíčení.....	11
2.8.1. Proteasy a peptidasy.....	11
2.8.2. α -amylasy.....	14
2.8.3. α -galaktosidasy.....	14
2.8.5. Fytasy.....	15
2.8.6. Polyfenoloxidasý.....	16
2.8.7. Lipoxygenasy.....	18
3. Cíle diplomové práce.....	19
4. Materiál a metody.....	20
4.1. Popis materiálu.....	20
4.2. Metody.....	21
4.2.1. Příprava materiálu k analýzám.....	21
4.2.2. Extrakce proteinů pro SDS-PAGE elektroforézu	23
4.2.3. Analýza proteinů pomocí SDS-PAGE elektroforézy.....	23
4.2.4. Detekce proteinových pruhů	25
4.2.5. Vyhodnocení dat SDS-PAGE elektroforézy.....	25
5. Výsledky.....	26
5.1. Stanovení HTS a klíčivosti semen.....	26
5. 3. Statistické vyhodnocení.....	37
6. Diskuse.....	39
7. Závěr.....	41
8. Seznam použité literatury.....	43
9. Přílohy.....	70

1. Úvod

Luskoviny jsou jednoleté druhy rostlin patřící do čeledi bobovité (*Fabaceae*), která je třetí největší čeledí mezi kvetoucími rostlinami a patří do ní 16 000 – 19 000 rostlin, zařazených v cca 750 rodech. V potravinářství se využívá téměř 60 domestikovaných druhů luskovin (Prugar et al., 2008).

V současné době plocha pěstovaných luskovin dle statistiky FAO činí kolem 74 mil. ha (Potměšilová, 2012). Sója je nejpěstovanější luskovinou, ale z hlediska světových statistik není zařazována jako luskovina, nýbrž jako olejina (Potměšilová, 2012; Prugar et al., 2008). Podle odhadu z USDA by světová produkce sóji měla v roce 2012/13 dosáhnout 108,97 mil. ha (Potměšilová, 2012). V Evropě plochy pěstovaných luskovin stoupaly do začátku 90. let, kdy se ustálily na 1,3 mil ha. V poslední době je zaznamenáván mírný pokles pěstovaných ploch luskovin (Prugar et al., 2008). Plocha pěstovaných luskovin ČR v roce 2011 činila 22 316 ha (Potměšilová, 2012).

Vyluštěná zralá semena luskovin se nazývají luštěniny. Konzumují se také nezralé čerstvé plody (lusky) a semena některých druhů, u nás pouze hrachu, fazolí, cizrny, čočky a některých dalších druhů a v krmivářství se využívá bob koňský, lupina bílá, peluška a některé druhy vikve. Ze všech luskovin má v lidské výživě díky svému odlišnému složení největší využití sója. Převážná část pěstované sóji je geneticky modifikovaná (Prugar et al., 2008). Sója je díky svému vysokému obsahu proteinů ceněna hlavně u vegetariánů (Messina, Messina, 2010).

Luštěniny jsou významným zdrojem bílkovin hned za bílkovinami živočišného produktu. Na rozdíl od živočišných produktů, luštěniny neobsahují nasycené tuky. Limitujícími aminokyselinami jsou sírné aminokyseliny. Obsahují také řadu vitamínů skupiny B, především thiamin, riboflavin, nikotinovou kyselinu a kyselinu listovou, minerální látky (Ca, Fe, P, K, Zn, Mg, Mn aj.), s výjimkou sóji mají nízký obsah tuku. Obsahují 55-85% nenasycených kyselin. Přítomnost rostlinných sterolů působí příznivě jako prevence kardiovaskulárních a některých nádorových onemocnění (Prugar et al., 2008). Luskoviny rovněž mají nízký glykemický index v mezích 29-33, což je výhodné zejména pro diabetiky (Hedley 2001; Rambousková, Klavínová, 2007). Semena luskovin lze efektivně připravit ke konzumaci klíčením (Vidal-Valverde et al., 1993).

2. Literární přehled

2.1. Význam a využití naklíčených semen luskovin

Klíčení je jedna z nejdůležitějších metod zlepšujících nutriční hodnotu semen luskovin. Během klíčení semen se zvyšuje biologická dostupnost, obsah minerálů, vitamínů, stravitelnost a snižuje se obsah antinutričních látek (Satya et al., 2010).

Na trhu v ČR lze sehnat naklíčená semena fazole zlaté (*Vicia radiata*). Méně běžná jsou k dostání naklíčená semena čočky a cizrny. Nutriční význam a efekt naklíčených semen luštěnin byl znám již po řadu minulých staletí. Z naklíčených semen hrachu se zejména na venkově připravoval o Velikonocích tradiční pokrm zvaný pučálka. Obsahoval velké množství enzymů, vitamínů a byl bojem proti jarní únavě (Prugar et al., 2008).

Klíčením se hydrolyzují a mobilizují dostupné polysacharidy, v semenech stoupá obsah cukrů (Jood et al., 1988).

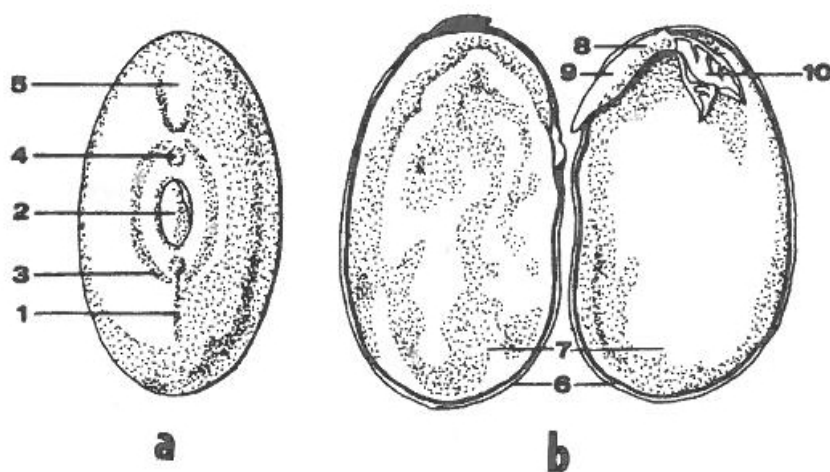
Negativním jevem při klíčení semen luskovin je nárůst nežádoucích mikroorganismů (Prugar et al., 2008). Růstu mikroorganismů lze zabránit skladováním naklíčených semen za vysokého tlaku (Dostálová et al., 2007; Kadlec et al., 2008; Prugar et al., 2008). Ošetřená naklíčená semena luskovin jsou zdrojem vitamínu C, B-komplexu, bílkovin, sacharidů, vápníku a lze je přidávat do salátů (Paulíčková et al., 2005; Zátopková et al., 2004; Prugar et al., 2008).

Tabulka č. 1: Průměrné složení semen luskovin (Pokorný, Dostálová, 1996)

	Hrách	Čočka	Fazole	Boby	Cizrna
Voda	10,4	10,5	11,4	10,6	10,7
Energie	346	346	345	350	368
Bílkoviny	24,5	24,7	21,5	24,8	19,5
Tuk	1	1	1,3	1,4	5,7
Sacharidy	62,1	61,2	62,7	60,4	61,7
Vláknina	6,3	10,4	10,6	14,9	6,1
Popel	2,5	2,6	3,5	3,3	2,7

2.2. Stavba klíčícího semene luskovin

Semeno luskovin je složeno z osemení a klíčků s velkými dělohami. Dělohy tvoří 89,6- 93%, 6-9,3% osemení a klíček 0,8-1,3% hmotnosti semene. Klíček je uložen mezi dělohami. Parenchymatické buňky děloh jsou vyplněné zásobními látkami, převážně proteiny (Lahola et al., 1990).



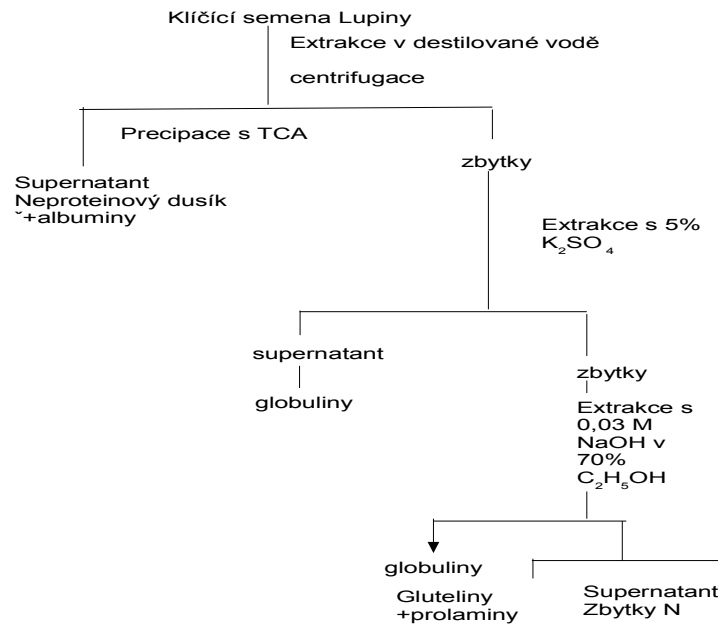
Obrázek č. 1: Složení semene luskovin (Lahola et al., 1990)

a) pupková část: 1. šev, 2. pupek, 3. chaláza, 4. mikropyle, 5- obrys kořínků;
b) rozpůlené semeno: 6. osemení, 7. dělohy, 8. klíček, 9. koříněk.

Zásobní proteiny se zachovávají během vysoušení při zrání i při proteolýze během klíčení semen luskovin (Casey et al., 1986; Duranti, 2006). Klíčení semen luskovin je doprovázeno metabolismem zásobních proteinů umístěných v dělohách. Hydrolýzou těchto molekul jsou produkovány aminokyseliny a peptidy v zásobních pletivech, či jsou využity vyvíjejícími se rostlinami. Tyto aminokyseliny a jejich deriváty jsou využívány pro syntézu nových proteinů, zásobních mezičlánků a k tvorbě energie potřebné k růstu před začátkem fotosyntézy (Ashton, 1976; Derbshire et al., 1976).

Podle Osbornovy frakcionace se proteiny rozdělují na ve vodě rozpustné albuminy, v solném roztoku rozpustné globuliny, v alkoholu rozpustné prolaminy a kyselá a zásaditá

rozpustné gluteliny (Osborne, Campbell, 1898; Mandal, Mandal, 2000). Globuliny se dále dělí na leguminy a viciliny (Sgarbieri, Whitaker, 1982).



Obrázek č. 2: Schéma proteinové frakcionace semene lupiny (Gulewitz et al., 2008)

2.3. Globuliny

Převážnou část zásobních proteinů tvoří globuliny. Mobilizace globulinů při klíčení je zahajována cystein proteinázou (Schleret et al., 2001). Globuliny jsou rozpustné ve slané vodě (Duranti, 2006; Osborne, 1924). Podle sedimentačního koeficientu se rozdělují na 11S (leguminy) a na 7S (viciliny) globuliny (Casey, Domoney, 1999; Duranti, 1997; Duranti, 2006; Martínez et al., 2008; Nunes et al., 2006).

V globulinové frakci jsou z neesenciálních aminokyselin zastoupeny asparagin, glutamin, glycin a arginin a z esenciálních aminokyselin leucin, fenylalanin, lysin a thyrosin (Martínez-Villaluenga et al., 2008).

2.3.1. Leguminy

Mezi leguminové lupinové globuliny, které patří do 11S globulinové rodiny se řadí α -conglutin (Duranti et al., 1981). α -conglutin je zásobní protein účastnící se proteolytické degradace při klíčení a nachází se v zásobních vakuolách děložních buněk (Duranti et al., 1984; Duranti et al., 1991).

α -conglutin je oligomerní protein složený z hexamerů, ale před proteolytickou přeměnou převládají podjednotky v trimerech (Duranti et al., 1992). Monomerní podjednotky váží okolo 62 a 72 kDa (Casey et al., 1985). Každá monomerní jednotka α -conglutinu je složena ze zásadité a kyselá podjednotky (Müntz, 1998). Podjednotky jsou spojené disulfidickou vazbou (Casey et al., 1985; Müntz, 1989). α -conglutin mění vazby 19 kDa polypeptidů, které postupně mizí 7 den klíčení semen lupiny (Ferreira et al., 1995).

2.3.2. Viciliny

Viciliny jsou nejznámější zásobní proteiny, zaujímají až 70-80% zásobních proteinů semene luskovin (Bewley, Black, 1994). Viciliny jsou glykosylované oligomery o hmotnosti 150-170 kDa vytvořené ze 3 shodujících se podjednotek o hmotnosti 40-70 kDa bez disulfidického spojení. Všechny viciliny jsou vysoce heterogenní a obsahují rozdílné typy podjednotek, tedy představují vysoký stupeň polymorfismu uvnitř každého druhu. Tato heterogenita je způsobena expresí multigenní rodiny a postranskripčními úpravami během glykosylace (Casey et al., 1986; Derbyshire et al., 1976; Ferreira et al., 2003; Nielsen et al., 1989; Wright, 1988).

Viciliny se rozkládají během klíčení semen a mobilizují se dříve než leguminy (Tiedemann et al., 2000; Schlereth et al., 2001).

Úplná degradace při klíčení je podporována zásobní funkcí β -conglutinu (Duranti et al., 1984). β -conglutin se řadí do 7S globulinové rodiny, nebo také do vicilinových globulinů (Blagrove, Gillespie, 1975). β -conglutin je trimérem proteinem vytvořený z monomerů s hmotností od 16 do 70 kDa (Duranti et al., 1992). Během 11ti denního klíčení *Lupinus albus* L. se koncentrace β -conglutinu snižuje mezi 5 a 11 dnem (Ferreira et al., 1995). β -conglutin je lokalizován v dělohách semen (Duranti et al., 1992; Magni et al., 2007). β -conglutin se degraduje před α -conglutinem (Duranti et al., 1984).

Během klíčení semen a při proteolýze v in vitro testech zůstává zachován γ -conglutin (Duranti et al., 1995). γ -conglutin je neobvyklým 7S proteinem, který je rozpustný ve vodě i v solném roztoku (Duranti et al., 1981). Při kyselém pH je γ -conglutin tetramerem, či hexamerem, ale je detekován jako oligomer vytvářející obě formy (Blagrove, Gillespie, 1975; Duranti et al., 2000). V kyselém prostředí se γ -conglutin disociuje na monomery okolo 50 kDa (Duranti, 1986a; Duranti, 1986b). Každý monomer je složen z 2 disulfidických podjednotek okolo 17 a 29 kDa (Restani et al., 1981). Obě podjednotky jsou heterogenní, protože se vytváří posttranslační proteolýzou. Endogenní proteolýza přeměňuje před-polypeptidy na 2 zralé podjednotky (Ilgoutz et al., 1997). γ -conglutin se nachází v proteinových orgánech vyvíjejících se semen rodu *Lupinus* a byl také identifikován v apoplastických regionech klíčících lupinových děloh (Duranti et al., 1994; Pernollet, 1978; Shewry et al., 1995; Weber, Neumann, 1980).

Předpokládá se, že produkty z vicilinového katabolismu mohou chránit semeno v kritické fázi klíčení před patogeny (Sales et al., 1996). Například na živném médiu zastavovaly viciliny růst konidií fytopatogenních hub, růst kvasinek a okyselovaly médium s buňkami kvasinek (Gomes et al., 1997; Gomes et al., 1998).

Viciliny *Vigna unguiculata* jsou asociované s chitinem, chitosanem a plně acetylovaným chitinem (Sales et al., 1996). Růst hub také inhibovaly viciliny izolované z *Gossypium hirsutum* (Chung et al., 1997). Viciliny z *V. unguiculata* se váží na chitinovou strukturu larev *Callosobruchus maculatus* a hrají hlavní roli v ochraně před škůdci (Sales et al., 2000; Sales et al., 2001)

2.4. Albuminy

Albuminy jsou bílkoviny rozpustné ve vodě, nad 60 % nasycení síranem amonným se vysolují z vodných roztoků a při 75°C koagulují (Velíšek, Hajšlová 2009). Zásobní role albuminů se přisuzuje 2S albuminové třídě, která dodává síru při klíčení (Müntz, 1998). Do 2S albuminové rodiny patří δ -conglutin (Blagrove & Gillespie, 1975). δ -konglutin je monomerní protein složený ze 2 podjednotek o hmotnostech 4 a 9 kDa (Salamowich, Weder, 1997).

V albuminové, glutelinové a prolaminové frakci představují asparagin, glutamin a glycin neesenciální aminokyseliny a esenciální aminokyseliny zde zastupuje lysin (Martínez-Villaluenga et. al., 2008).

Převážná část albuminů jsou metabolickými enzymy, zásobními proteiny v dělohách semen, nebo chrání rostlinu v podobě inhibitorů hydrolas a lektinů (Casey, 1999; Domoney, 1999). Inhibitory proteas a lektiny, kromě ochranné funkce v rostlině mají také antikarcinogenní účinky (Casey, 1999; Domoney, 1999; Mathers, 2002).

2.5. Lektiny

Lektiny jsou všudypřítomné glykoproteiny vážící se na sacharidy (Lis, Sharon, 1986). Většina lektinů je podobná protilátkám stmelujícím červené krvinky (Beuth, Stoffel, 1998). Moderní definice zařazuje pod lektiny všechny proteiny alespoň s jedním centrem jiným než je katalytické, které se váže na specifické monosacharidy, deriváty monosacharidů a oligosacharidy. Lektiny mají vyšší afinitu k oligosacharidům sloužícím jako hlavní složka živočišných glykoproteinů. Lektiny pomocí interakce s těmito sacharidy jsou schopné srážet červené krvinky. 60% lektinů se v nezměněné podobě se váže na cukerné receptory epitelů tenkého střeva a snižují životaschopnost buněk těchto epitelů.

Lektiny jsou velice toxické intravenózně, některé vykazují toxicitu i při orální aplikaci. Akutní toxicita je většinou nízká, ale dlouhodobý příjem lektinů i v malém množství může být škodlivý. Konzumování syrových fazolí a nedostatečně uvařených fazolí vyvolává žaludeční potíže, zvracení a průjemy. Sójové lektiny jsou lépe v tenkém střevě štěpeny než fazolové, ale také ony také působí toxicky a antinutričně.

Lektiny snižují svojí biologickou aktivitu při proteolýze. V teple denaturují, proto se tepelná úprava používá v potravinářství na detoxikaci lektinů. Ke snížení obsahu lektinů se také využívá máčení. Samotné máčení a vaření však nepostačuje k detoxikaci. Např. fazole je nutné vařit 90 minut, či vyluhovat fazole ve vodě po dobu 16 hodin, poté stačí fazole vařit pouze 4-10 minut. Další možnost k omezení obsahu lektinů je autoklávování při vyšším tlaku.

Nejvýznamnější procesem k detoxikaci lektinů v semenech je klíčení, kdy dochází k značnému poklesu obsahu lektinů. K úbytku lektinů v semenech luskovin stačí 4 – 6 dnů klíčení.

Nejméně toxické lektiny luskovin jsou u čočky, hrachu a sóji, nejvíce toxicky působící jsou lektiny v některých fazolích (měsíční aj.) (Velíšek, Hajšlová, 2009).

2.6. Inhibitory trypsinu

Na antinutričním účinku a toxicitě se podílí i inhibitory trypsinu snižující biologickou hodnotu semen (Velíšek, Hajšlová, 2009; Hosnedl et al., 1998).

Inhibitory trypsinu blokují trávicí enzymy a způsobují hypertrofii pankreasu. Obsah inhibitorů trypsinu se liší podle variet, forem a odrůd luskovin. Hrách a bob mají stejný obsah inhibitorů trypsinu, v semeni sóji je obsah inhibitorů trypsinu desetinásobně vyšší.

Kladnou vlastností inhibitorů trypsinu je jejich obsah sirných aminokyselin a protirakovinné účinky (Hosnedl et al., 1998). Inhibitory trypsinu mají v rostlinách insekticidní funkci, inhibují proteasy produkované hmyzem a patogenními mikroby, chrání rostlinu před abiotickým stresem (Mu' zquiz et al., 2004; Ryan., 1990; Zavala et al., 2004; Jime' nez, 2008; Saarikoski et al., 1996; Tamayo et al., 2000; Zhang et al., 2004).

K nejrozšířenějším a nejvýznamnějším inhibitorům trypsinu v rostlinách patří Kunitzovy inhibitory (Ryan et al., 1990). V hrachu byly zjištěny 2 Kunitzovy inhibitory TP-1 a TP-2 kódovány geny *CaPTI-1* a *CaPTI-2*. Před klíčením byly geny Kunitzových inhibitorů zahajující transkripci v celku. TPI-1 mají v semenech ochrannou funkci, zabraňují předčasné degradaci zásobních proteinů v zárodečné ose, brání buňku před některými proteinázami spouštějícími buněčnou smrt. TPI-2 indikují klíčení během prodlužování zárodečné osy (Herna' ndez-Nistal et al., 2009).

Také v dělohách klíčících semen sóji byly pozorovány nové formy odlišných Kunitzových inhibitorů trypsinu od inhibitorů v neklíčících semenech (Hartl et al., 1986). Na nativních Kunitzových inhibitech ze sóji byly vyzkoušeny 3 typy proteas (K1, K2 a K3). Cysteinové protease K1 se zaznamenala maximální aktivita 4 den při pH 4 během rozvíjení semen, proteasa K2 vykazovala maximální aktivitu 8 den při pH 4 a protease K3 se zvýšila aktivita mezi 10 a 14 dnem při pH 8 (Wilson et al., 1988).

Dalšími inhibitory trypsinu jsou Bowman-Birkovy ze sójových bobů, které patří do skupiny inhibitorů s molekulární hmotností okolo 8000 a s vysokým obsahem cysteinu vytvářejícího 7 disulfidických můstků (Savelkoul et al., 1992; Tukamoto et al., 1983).

Pokles inhibitorů trypsinu byl zjištěn na hrachu a fazolích (Rahma et al., 1987; Ibrahim et al., 2002; Subbulakshmi et al., 1976). Aktivita inhibitoru trypsinu se ve Francouzské fazoli během 10 dnů klíčení snížila o 30% (Nielson, Liener, 1988). Obsah Bowman-Birkova inhibitoru v dělohách semen sóji (*Glycine max*) poklesl až za 13 dní (Tan-Wilson et al., 1982).

Tabulka č.2: Degradace trypsin inhibitorové aktivity během klíčení luskovin (Subbulakshmi et al., 1976; Kakade et al., 1969; Babar et al., 1988; Erlanger et al., 1961; Chang, Harrold 1988; Kakade et al., 1974; Tan-Wilson et al., 1982; Savelkoul et al., 1992)

Luskovina	TIA v nenaklíčených semenech (g)	Doba klíčení (dny)	Degradace inhibitoru trypsinu
<i>Dolichos biflorus</i> (Horse gram)	50200		
<i>Phaseolus aconitifolius</i> (fazol měsíční)	4300	3	40
<i>Canavalia ensiformis</i> (Jack bean)	12	1,5	31
<i>Phaselus vulgaris</i> (fazol obecný)	17	6	3
<i>Glycine max</i> (sója)	-	13	100

2.7. Inhibitory amylas

Inhibitory amylas zabraňují inhibicí pankreatické amylasy trávení škrobu (Savelkoul et al., 1992; Jaffe et al., 1973).

Marsal a Landa (1975) popsali inhibitor α -amylas phaseolamin s molekulární hmotností pohybující se od 45000 do 50000. Phaseolamin měl specifickou aktivitu pro živočišné α -amylasy neshodující se s rostlinnými, bakteriálními a houbovými enzymy. Phaseolamin má ochrannou funkci, inhibuje trávicí amylasy hmyzu a dalších predátorů.

Také Powers a Whitaker (1977) purifikovali α -amylasový inhibitor z *Phaseolus vulgaris* s molekulární hmotností 49000 obsahující 2 podjednotky, inhibující prasečí pankreatickou amylasu a lidskou α -amylasu ve slinách.

Stejně jako všechny inhibitory i obsah inhibitorů amylas lze snížit klíčením. Například klíčením *Phaseolus vulgaris* L. se aktivita inhibitorů α -amylas po 5 dnech snížila o 67,1% a klíčením "kidney bean" po 7 dnech o 40% (Sathe et al., 1983; Kotaru et al., 1987).

Inhibitory α -amylas mají potencionální využití v prevencích a v terapiích proti obezitě a cukrovce. Výzkum zjistil u obézních a diabetických osob, kterým byl podáván orálně pšeničný inhibitor α -amylasy snížení koncentrace glukózy v krvi (Lankisch et al., 1998).

Dále pomocí regulace proteas zabraňují degradaci zásobních proteinů během syntézy, zpracovávání a balení do bílkovinných těl při zrání semen, chrání zárodečný vak při tvorbě endospermu a embrya (Abe et al., 1987; Baumgartner et al., 1976; Poerio et al., 1989; Welham et al., 2000; Sin et al., 2006).

2.8. Enzymy účastnící se procesu klíčení

Klíčící luskoviny jsou také zdrojem enzymů zahrnutých do metabolismu dusíku (Dey, 1984).

2.8.1 Proteasy a peptidasy

Předpokládá se, že antinutriční proteinové faktory lektiny, inhibitory amylas a trypsinu jsou inaktivovány během klíčení enzymy zvanými proteasy (Savelkoul et al., 1992).

Například při klíčení semen hrachu třetí den se snížila aktivita inhibitorů trypsinů a zvýšila se proteasová aktivita (Petrova et al., 2010).

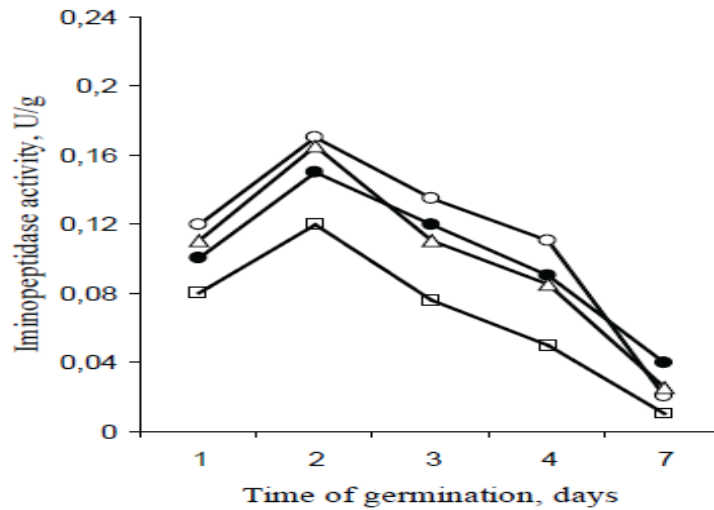
Enzymy způsobující hydrolýzu zásobních proteinů jsou lokalizovány v různých částech buňky (Mikkonen, 1986). Stádia štěpení uvnitř proteinových těl jsou způsobena kombinací působení exopeptidas a endopeptidas (Müntz et al., 1985; Shutov, Vaintraub, 1987). V proteinových tělech *Phaseolus vulgaris* jsou umístěny karboxypeptidasy, v cytoplasmě namphtylamidasy (neutrální aminopeptidasy) a alkalické peptidasy (Mikkonen et al., 1986; Mikonen, Mikola, 1986; Mikkonen et al., 1986).

Příkladem endopeptidas je asparagynil endopeptidasa (3.4.22.34) purifikovaná z fazolové mouky (Abe et al., 1993). Enzym má substrátovou specifitu ke karboxylové straně asparaginylových zbytků a je zapojen do posttranslační proteolýzy a další transpeptidace prekursoru molekuly concanavalinu A, lektinu fazolových semen (Ishii, 1994; Min, Jones, 1994; Bowles, 1986).

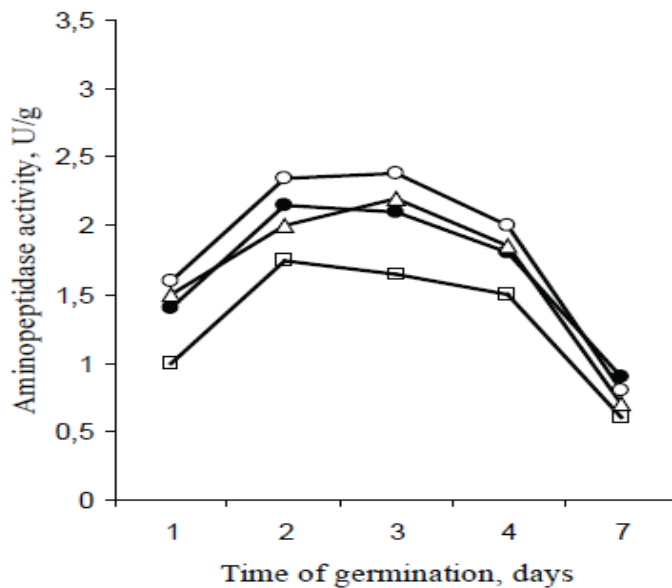
Proteasy se rozdělují do 2 kategorií. První kategorie proteas je během vývoje semen v inaktivní formě a aktivuje se proteolytickým štěpením, změnou pH a iontovým prostředím během klíčení (Bewley et al., 2000). Proteasy aktivované kovy se nazývají metaloproteasy (Goll et al., 2003). V semenech *Lathyrus sativus* byla identifikována metaloproteasa závislá na Zn^{2+} s maximální kaseinolýtickou aktivitou při pH 8. Největší inhibiční účinek pro tuto metaloproteasu měl z inhibitorů specifických pro aspartát, cystein, serin a metaloproteasu 1, 10-phenanthroline. Po přidání Zn^{2+} k metaloprotease byl tento inhibitor překonán. Pomocí gelatin-PAGE se zjistily 3 zóny proteolytické aktivity a

větší mobility. Proteasová frakce se rozložila do 3 izoform s molekulární hmotností 25, 18 a 14 kDa jako důkaz rozdílných skupin na gelatin-PAGE (Ramakrisna et al., 2010).

a)



b)



Obrázek č.3: Aminopeptidasové a iminopeptidasové aktivity během klíčení. Grafické znázornění iminopeptidasové a) a aminopeptidasové b) aktivity během klíčení 4 odrůd semen čočky (□ – Ilina, Δ - Stanka, ○- Nadejda, ●- Tadjiksava). U klíčících semen čočky byly zaznamenány největší změny v aminopeptidasové a iminopeptidasové aktivitě druhý den (Petrova et al., 2010).

Další proteasy jsou aktivovány např. vápenatými ionty (Ca^{2+}) a syntetizují se při klíčení semen *de novo* (Khan et al., 2009; Bewley et al., 2000). Klíčením a vývojem semen luskovin jsou proteasy využívány pro mobilizaci zásobních proteinů (Muntz, 2007).

První sada proteas aktivuje další nespesifické proteasy a vyštěpením jedné ze dvou kritických vazeb zásobních proteinů zlepšují substrát pro následnou proteolýzu (He et al., 2007). Následná proteolýza kombinovaná se změnami pH a obsah Ca^{2+} uvnitř zásobních vakuol redukuje množství vnitromolekulárních vazeb a zesiluje náchylnost zásobních proteinů k dalším zásahům proteas (He et al., 2007; Ferreira et al., 2003; Ahn et al., 2004).

Proteolýza a hydrolýza peptidických vazeb enzymy je nejvýznamnějším procesem v přírodě (Antonov, 1991). Proteolytické enzymy degradují proteiny klíčením a transportují je do vegetativních orgánů. Plní tím nejdůležitější úlohu v biochemických a fyziologických vlastnostech rostliny jako je produktivita, stupeň proteinizace, klíčení semen a obranné reakce atd. (Mosolow, Valueva, 1993).

Klíčení semen má 3 stádia proteolýzy. Při prvním stádiu jsou aminokyseliny uvolněny a následně využity pro syntézu enzymů zodpovědných za přeměnu zásobních substancí do forem vyhovujících pro transport. V druhém stádiu jsou hydrolyzovány zásobní proteiny na aminokyseliny pro růst semen, následující třetí stádium probíhá během stárnutí zásobního pletiva, buněčné proteiny a enzymy jsou rozloženy do aminokyselin, které jsou využity semenáčky před autotrofním růstem (Mikola, 1983).

Při klíčení semen jsou proteasy přemístěny do specifických vakuol, aktivují se, štěpí zásobní proteiny a zlepšují stravitelnost proteinů (Shutov, Vaintraub, 1987; Muntz, 1996, 1998, 2007; Persson et al., 1998; Lasekan, 1996; Kataria et al., 1992).

Štěpení proteinů uvnitř proteinových těl je způsobeno karboxypeptidasami a kyselými proteasami v prvním kroku proteolýzy (Mikkonen et al., 1986). První krok klíčení zahajují endopeptidasy (proteinas A), jenž katalyzují limitovanou proteolýzu nerozpustných zásobních proteinů přeměnou do rozpustných proteinů. Poté upravené globuliny podléhají proteinase B, karboxypeptidasam, aminopeptidasam a dipeptidasam, které nejsou schopny zpracovávat původní proteiny neklíčících semen, ale rozkládají rozpustné peptidy do aminokyselin (Müntz et al., 1985; Shutov, Vaintraub, 1987).

Proteasy patří k více než 60% enzymů komerčně aplikovaných převážně ve farmacii, medicíně a v biotechnologiích (Barret et al., 1998; Schaller, 2004; Van der Hoom, 2008). V různých průmyslových aplikacích pro zlepšení fyzikálně-chemických

vlastností se izolované enzymy z luskovin imobilizují do matic (Das et al., 1997; Kayastha, Srivastava, 2001; Tripathi et al., 2007; Dwevedi *et al.*, 2009; Kumar et al., 2009).

Proteasy jsou využívány k rozpouštění želatinového šrotového filmu, obnovují pění během skladování piva a při výrobě sušenek snižují obsah proteinů v mouce (Oh et al., 2004).

2.8.2. α -amylasy

α -amylasy oproti proteasám v klíčících semenech rozvíjejí a degradují škrobová zrna (Persson et al., 1998; Lasekan, 1996; Kataria et al., 1992). Respektive α – amylasy jsou endo-amylasy katalyzující hydrolýzu α -D-(1,4) glykosidické vazby ve škrobu a zvyšují v luskovinách obsah monosacharidů a disacharidů (Whitaker, 1988; Lajolo, Genovese, 2002; Akinlosattu et al., 1991). U hrachu klíčícího během 0, 1, 2 až 3 dní byla zjištěna největší aktivita α -amylas. α - amylasová aktivita se během 3 dnů zvýšila z 85,6 na 720,9 $\mu\text{molů maltosy/ml/ min}$. Aktivita β -amylas však nebyla zaznamenána (Uriyo et al., 2001).

Amylasy se používají při výrobě chleba, detergentů, v tvorbě cukru ze škrobu a produkci sirupů z kukuřice (Tripathi et al., 2004; Kumari et al., 2010; Kumari, Kayastha, 2011).

2.8.3 α -galaktosidasy

Také enzymy α -galaktosidasy umožňují rozkládat komplex oligosacharidů a polysacharidů v luskovinách a zelenině na jednodušší cukry, dávají jídlu větší stravitelnost a snižují plynatost střev. Pokusy zjistily, že 6 hodinové máčení semen čočky následované 70-80 hodinovým klíčením při teplotě 20°C, postačuje na 50-60% redukcii α -galaktosidů a zároveň zachovává 80% obsah proteinů a polysacharidů (Petrova et al., 2010). α -galaktosidasy mají využití při žaludečních problémech (Herman, Shannon, 1985).

2.8.4. β – galaktosidasy

β – galaktosidasy katalyzují hydrolýzu terminálních neredukujících zbytků β – D-galaktózy v β – D-galaktosidech. β – galaktosidasy jsou rozšířenou skupinou glykosyl hydrolas u mikroorganismů, rostlin a živočichů (Nichtl et al., 1998). Podle substrátové specifity se β -galaktosidasy rozdělují do 2 skupin, jedna skupina je složena z $\text{exo-}\beta$ (1 \rightarrow 4)-D galaktanas a má specifitu k pektinovým β -(1 \rightarrow 4)-D galaktanům, druhá třída preferuje nitrofenyl- β -galaktosidy (Kotake et al., 2005). Z klíčících semen luskovin byla největší β – galaktosidasová aktivita zaznamenána u lupiny (Buckeridge, Reid, 1994).

β -galaktosidasy jsou využívány v potravinářském průmyslu, hlavně k vylepšení lahodnosti, sladkosti, chuti a stravitelnosti produktů, k výrobě produktů s hydrolyzovanou laktosou pro lidi, kteří trpí špatným trávením laktosy, v mléčných nefermentovaných produktech a pro obnovení laktosy ze syrovátky, v produkci galakto-oligosacharidů (Mlichova, Rosenberg, 2006).

2.8.5. Fytasy

Klíčení semen luskovin je jednoduchá nechemická metoda, jak zvýšit obsah fytas (Centeno et al., 2001). Zvyšováním fytasové aktivity v klíčících semenech se zmenšuje obsah fytové kyseliny (Bau et al., 1997). Klíčení semen luskovin zesiluje fytasovou aktivitu a snižuje obsah fytové kyseliny daleko lépe než máčení (Egli et al., 2002).

Fytasy umožňují degradovat kyselinu fytovou na myo-inosol a kyselinu fosforečnou (Egli et al., 2002). Ve většině semen je fosfor ve formě kyseliny fytové a tvoří komplex s minerály a stopovými prvky (Persson et al., 1998; Kamchan et al., 2004). Obsah kyseliny fytové vytváří negativní korelaci mezi stravitelností škrobů a proteinů luskovin (Kataria et al., 1989). Fytasy se rozdělují do 3 tříd zahajující defosforylaci kyseliny fytové v různých pozicích na inosolovém kruhu a produkují různé izomery nižší inosol fosfátu (Bohn et al., 2008). Tyto 3 třídy fytas se nazývají 3-fytasy (EC 3.1.3.8), 5-fytasy (EC 3.1.3.72) a 4/6 fytasy (EC 3.1.3.26) (Maiti et al., 1974; Greiner et al., 2002).

Protože fytasy zlepšují příjem fosfátu z fytátu, slouží jako doplněk stravy v dietě pro prasata a drůbež. Fytasy se také uplatňují při výrobě chleba, proteinových izolátů z rostlin a při frakcionaci obilných otrub (Hamada, 1996; Hegeman et al., 2001). Přidáváním

mikrobiálních fyto se degraduje obsah kyseliny fytové v doplňcích stravy ze sóji (Davidsson et al., 1994, 1997).

2.8.6. Polyfenoloxidas

Fytová kyselina a taniny vytvářejí s proteiny komplex, který je snadno redukován enzymy (Alonso et al., 2000). Taniny jsou ve vodě rozpustné sloučeniny s molekulární hmotností od 500 do 3000 a rozdělují se do 2 skupin, hydrolyzovatelné a zahuštěné taniny (Goldstein, Swain, 1963; Gupta, Haslam, 1979; Marquardt et al., 1977). Hydrolyzovatelné taniny se rozkládají na cukry a rozpoznatelné fenolové karboxylové kyseliny. Zahuštěné taniny jsou nerozdělitelné a patří k nejrozšířenějším rostlinným taninům (Marquardt, 1989; Mangan, 1998). Zahuštěné taniny se skládají z oligomerů flavan-3-olů a ze spřízněných flavanolových zbytků, které jsou typickými producenty antokyanů při kyselé degradaci (Mangan, 1988). Nerozpustné taniny snižují stravitelnost proteinů a sacharidů jako výsledek formování nerozpustných enzymaticky-odolných komplexů s taniny (Reddy et al., 1985). Předpokládá se, že komplex taninů a bílkovin je odpovědný za růstovou depresi, snižuje stravitelnost proteinů, zvyšuje fekální dusík a má karcinogenní efekt (Deshpande, 1986).

Ztráta taninů je zapříčiněna polyfenolasovou aktivitou (Reddy et al., 1985). Polyfenoloxidas katalyzují hydroxylaci různých monofenolů a aerobní oxidaci difenolů (Boyer, 1977).

Polyfenoloxidasová aktivita se zkoumala u různých semen luskovin: cizrny (*Cicer arietum*), *Cajanus cajan*, *Phaseolus aureus* a *Phaseolus mungo*, které se nechaly klíčit během 0, 12 a 24 hodin. Zatímco polyfenoloxidasová aktivita se klíčením zvýšila, obsah taninů se snížil (Rao, Deosthale, 1987).

Tabulka č.3: Změny v taninovém obsahu během klíčení semen luskovin (Rao,Deosthale, 1982)

Luskovina	Obsah taninů v nenaklíčených semenech (mg/100g DM)	Klíčení Čas (dny) (mg/100g)	Taninová degradace (%)
<i>Cajanus cajan</i> (Pigeonpea)	1141	2	60
<i>Cicer arietinum</i> (cizrna)	165	2	60
<i>Phaseolus mungo</i> (mungo)	836	2	50
<i>Phaseolus aureus</i> (Greengram)	612	2	50

Jedním z enzymů patřící do polyfenoloxidas účastníci se formování, zrání a klíčení semen je katecholasa (Aniszewski et al, 2008; Sahbaz et al., 2009). Katecholasy katalyzují difenoly na chinony, které chrání rostlinu před patogeny (Yoruk, Marshall, 2003; Lei et al., 2004; Mayer, 2006). Dále katecholasy brání buněčné struktury před mechanickým poškozením.

Katecholasová aktivita byla zjišťována polarograficky na semenech *Lupinus albus*, *Lupinus angustifolius*, *Lupinus luteus* a *Lupinus polyphyllus*. Nejmenší katecholasovou aktivitu vykazují embrya a největší dělohy.

Katecholasy mohou být vyžívány jako genetické markery a v dalších biotechnologických a molekulárních aplikacích u luskovin (Aniszewski, 2010).

2.8.7 Lipoxygenasy

Lipoxygenasové izoenzymy (EC1.13.11.12) se liší od předchozích enzymů oxidační katalýzou více nasycených kyselin a uvolňováním zásobních tuků při klíčení semen luskovin (Rackis et al., 1979; Wang et al., 1999). Lipoxygenasy vytváří velmi reaktivní prvky jako volné radikály, které reagují s chlorofylem, karoteinoidy, kyselinou askorbovou, fenoly a také s α -tokoferolem (Gomboeva et al., 2001). Mají také roli při tvorbě biologicky aktivních sloučenin, zapojují se do biosyntézy regulátorů jako je kyselina jasmínová, její methyl ester chrání rostlinu před biotickým a abiotickým stresem (Babitha et al., 2004; Blée, 1998; Porta, Rocha-Sosa, 2002; Robinson et al., 1995).

Při měření aktivity lipoxygenas v dělohách po klíčení byla L1 nejučinnější 9 den po klíčení při pH 9 a u lipoxygenas L2, L3 při pH 6,8 (Hildebrand, Himowitz, 1983). Zralé sójové boby obsahují velké množství lipoxygenas L1, L2 a L3 (Hildebrand, Hymowitz, 1983). V současnosti už bylo naklonováno několik úseků cDNA kódující lipoxygenasy L1, L2, genomické DNA kódujících lipoxygenasy L-3 a SC514 sójových bobů (Shibata et al., 1987; Shibata et al., 1988; Yenofsky et al., 1988).

Další 3 nové lipoxygenasy L-4, L-5 a L-6, byly identifikovány purifikováním za použití iontové, či iontové výměnné chromatografie. Lipoxygenasa L 4 má shodnou aminokyselinovou sekvenci s L1, L2 a L3, ale není identická s žádnou z nich. Všechny 3 izoenzymy mají optimální pH 6,5, jako substrát preferují linolovou kyselinu před linolenovou. (Kato et al., 1992).

Jiným příkladem lipoxygenas je lipoxygenasa purifikovaná z hrachu o hmotnosti 93 kDa. Lipoxygenasa měla největší substrátovou aktivitu u linoleové kyseliny a nejnižší u olejové kyseliny. Optimální pH pro lipoxygenasu bylo 5,5. Kinetická studie odhalila aktivitu lipoxygenasy V_{\max} při 151,1 U/min srovnatelná s hodnotou $0,44 \cdot 10^{-3}$ M (Szymanowska et al., 2009). Detekcí lipoxygenasové aktivity u klíčících sójových bobů inkubovaných 144 hodin byla zjištěna degradace lipoxygenas I a lipoxygenas II + III při 35°C (Kumar et al., 2006).

Uvažuje se o aplikaci lipoxygenas v potravinářství. Fyzikální a chemické vlastnosti mohou být užitečné při přípravě a skladování jídla (Robinson et al., 1995). Lipoxygenasy hrají důležitou úlohu v pekařství jako bělicí činidla, zvyšují mísící toleranci a zlepšují reologii těsta (Cumbee et al., 1997).

3. Cíle diplomové práce

Cílem diplomové práce bylo vyhodnocení změn v profilech zásobních proteinů semen luskovin v průběhu klíčení.

Řešení DP probíhalo podle následujícího schématu:

- 1) výběr odrůd a genotypů
- 2) provedení naklíčení semen – kontrola a dvě varianty klíčení
- 3) lyofilizace, mletí semen a extrakce proteinů
- 4) analýza získaných vzorků na gelové denaturační elektroforéze (SDS-PAGE)
- 5) digitalizace sušených gelů a vyhodnocení dat pomocí specializovaného software.
Statistické vyhodnocení získaných dat. Zpracování dat do tabulek, obrázků a grafů.

4. Materiál a metody

4.1. Popis materiálu

Semena luskovin byla získána z kolekce luskovin udržované na pracovišti Agritec, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o. Šumperk.

Bob obecný: Merkur

(*Vicia faba* L.)

Merkur je poloraná barevně kvetoucí odrůda. Středně až méně odolná proti lámání lodyh, poléhání před sklizní, napadení strupovitostí, rzí bobovou a hnědou skvrnitostí. Obsah N-látek je středně vysoký až nízký (Anonym, 2013). Hmotnost tisíce semen je 515 g (Horáková et al., 2009).

Hrách setý-polní: Sponsor

(*Pisum sativum* L.)

Sponsor je středně raná odrůda. Rostliny jsou středně dlouhé s bílou barvou květů. Semeno je žluté, vejčitého tvaru. Středně odolná proti poléhání, napadení plísní šedou, strupovitosti, virózám. Má vysoký výnos semen. Obsah N-látek je středně vysoký až nízký. Aktivita trypsin inhibitoru je středně vysoká (Anonym, 2013). HTS je 249 g (Horáková et al., 2009).

Lupina úzkolistá: Boruta

(*Lupinus angustifolius* L)

Podle zkoušek užitné hodnoty odrůda Boruta má dobu zralosti 104 dnů. Rostlina dosahuje výšky 72 cm. Hmotnost tisíce semen je 141 g (Mezlík, Meřinská 2006).

Sója luštinatá: Bohemians
(*Glycine max* L)

Bohemians je velmi raná odrůda. Rostliny jsou středně vysoké, barva květu je fialová. HTS je 224 g (Mezlík, 2013). Semeno má žlutou barvu pupku. Středně odolná proti poléhání před sklizní, výška nasazení prvního lusku je středně vysoká. Odolná proti praskání lusku. Obsah dusíkatých látek v sušině středně vysoký až nízký a obsah tuku středně vysoký (Anonym, 2013).

4.2. Metody

4.2.1. Příprava materiálu k analýzám

Pro SDS-PAGE elektroforézu byla připravena semena luskovin lupiny úzkolisté, hrachu setého, sóji luštinaté a bobu obecného. Od každého druhu luskoviny bylo vybráno a naváženo 50 semen vždy ve dvou opakováních. Semena byla dezinfikována 10 minut v 2% roztoku Sava, které obsahuje účinnou látku chlornan draselný. Vydezinfikovaná semena luskovin byla omyta a ponechána nabobtnat po dobu 4 hodin v destilované vodě. Na laboratorní klíčovnice s navlhčeným filtračním papírem bylo vloženo 50 semen ve dvou opakováních a poté se semena nechala klíčit při pokojové teplotě 22°C. Semena byla odebírána na začátku, uprostřed a na konci klíčení. Počet odebraných semen a dny odběru jsou uvedeny v tabulce č. 4. Odebrané vzorky semen byly zlyofilizovány ve vakuu (lyofilizátor ALPHA Martin Christ, Německo) při -50°C po dobu 48 h. Po lyofilizaci byla semena zhomogenizována pomocí laboratorního mlýnu.

Tabulka č.4: Odběr semen na začátku, uprostřed a na konci klíčení

Luskovina	Opakování	Dny odběru	Množství odebraných semen
Hrách	1.	0	10
Hrách	2.	0	10
Hrách	1.	2	16
Hrách	2.	2	18
Hrách	1.	3	24
Hrách	2.	3	19
Lupina	1.	0	10
Lupina	2.	0	10
Lupina	1.	2	10
Lupina	2.	2	10
Lupina	1.	4	28
Lupina	2.	4	25
Sója	1.	0	10
Sója	2.	0	10
Sója	1.	2	10
Sója	2.	2	10
Sója	1.	4	22
Sója	2.	4	22
Bob	1.	0	10
Bob	2.	0	10
Bob	1.	4	11
Bob	2.	4	11
Bob	1.	8	28
Bob	2.	8	26

4.2.2. Extrakce proteinů pro SDS-PAGE elektroforézu

K 50 mg navaženého zhomogenizovaného materiálu bylo přidáno 500 μ l extrakčního pufru (0,0625 M Tris-HCl o pH 6,8 + 2% SDS + 5% 2-merkaptoetanolu). Směs byla důkladně promíchána a extrahována po dobu 3 hodin. Po uplynutí doby extrakce byla směs centrifugována (6000 rpm, 4°C, 5 minut). Supernatant po centrifugaci byl přenesen do 1,5 ml mikrozkušavek a povařen ve vodní lázni po dobu 3 minut. Po ochlazení lze vzorek hned použít pro analýzu nebo jej lze zamrazit (-20°C) pro pozdější analýzu.

4.2.3. Analýza proteinů pomocí SDS-PAGE elektroforézy

Pro analýzu proteinů semen luskovin byla použita desková vertikální elektroforéza (model SE 600, Hoefer). Na SDS-PAGE elektroforézu byl připraven 10 % separační a 3,75 % zaostřovací gel. Podrobné složení gelu je uvedeno v tabulce č. 5.

K 40 μ l vody bylo přidáno 10 μ l vzorků s 12,5 μ l nanášecího pufru (5X LB: 5 ml 1,25 M Tris-HCl [pH 6,8] + 2,3 g SDS + 10 ml glycerolu + 5 mg BPB) s merkaptoethanolem. Vzorky byly naneseny v množství 10 μ l na gel vždy ve dvou opakováních. Na oba gely byl také přidán v množství 10 μ l marker ColorBurst Electrophoresis Marker, 8-220 kDa.

Separace proteinů byla provedena při napětí 200 V v prostředí Tris-Glycinového pufru (do 1 l = 144 g glycinu + 30,3 g Trisu + 10g SDS) po dobu 4 hodin.

Tabulka č. 5: SDS-PAGE elektroforéza (denaturační systém)

	Separáční gel (10%)	Zaostřovací gel (3,75 %)
H ₂ O	42 ml	12,15 ml
AC/BIS	26,6 ml	2,5 ml
Pufr A	10 ml	-
Pufr B	-	5 ml
SDS	800 µl	200 µl
Siřiřitan sodn�	60 µl	20 µl
Persíran amonn�	400 µl	150 µl
TEMED	40 µl	20 µl
Poznámky:		
Persíran amonn� 15%	0,75 g + 5 ml H ₂ O	
Acrylamid (30%)	37, 5:1	
Pufr A:	36,3 g Tris/100 ml, upraven� pH pomocí HCl na 8,8	
Pufr B:	6 g Tris/ 100 ml, upraven� pH pomocí HCl na 6,8	

4.2.4. Detekce proteinových pruhů

Detekce proteinových pruhů proběhla přes noc v barvivu Coomassie Brilliant Blue (1g CCB + 500 ml ethanolu + 100 ml kyseliny octové + 400 ml H₂O), poté byl gel ponechán po dobu cca 4 hodin v odbarvovacím roztoku (250 ml ethanolu + 100 ml kyseliny octové + 650 ml H₂O). Gel byl zafixován ve fixačním roztoku (450 ml ethanolu + 30 ml glycerolu + 500 ml H₂O) a osušen.

4.2.5 Vyhodnocení dat SDS-PAGE elektroforézy

Zpracování dat probíhalo dle následujících bodů:

1. Gel byl převeden do elektronické podoby oskenováním.
2. Získané fotografie byly upraveny v grafickém software (oříznutí fotografie, upravení velikosti, invertování).
3. Data spekter proteinů byla vyhodnocena pomocí speciálního software Bioprofil.
4. Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu STATISTIKA. Použitými testovacími testy byla ANOVA $P < 0,05$ a Fisherův LSD test.

5. Výsledky

5.1. Stanovení HTS a klíčivosti semen

Pro stanovení HTS a klíčivosti semen byly vybrány 4 druhy semen luskovin: hrách setý-polní, lupina úzkolistá, sója luštinatá a bob obecný. Průměrná hmotnost tisíce semen luskovin se pohybovala od 364,7 do 569,7 g. Klíčivost semen se pohybovala od 80 do 99 %. HTS a klíčivost semen luskovin jsou uvedeny v tabulce č. 6.

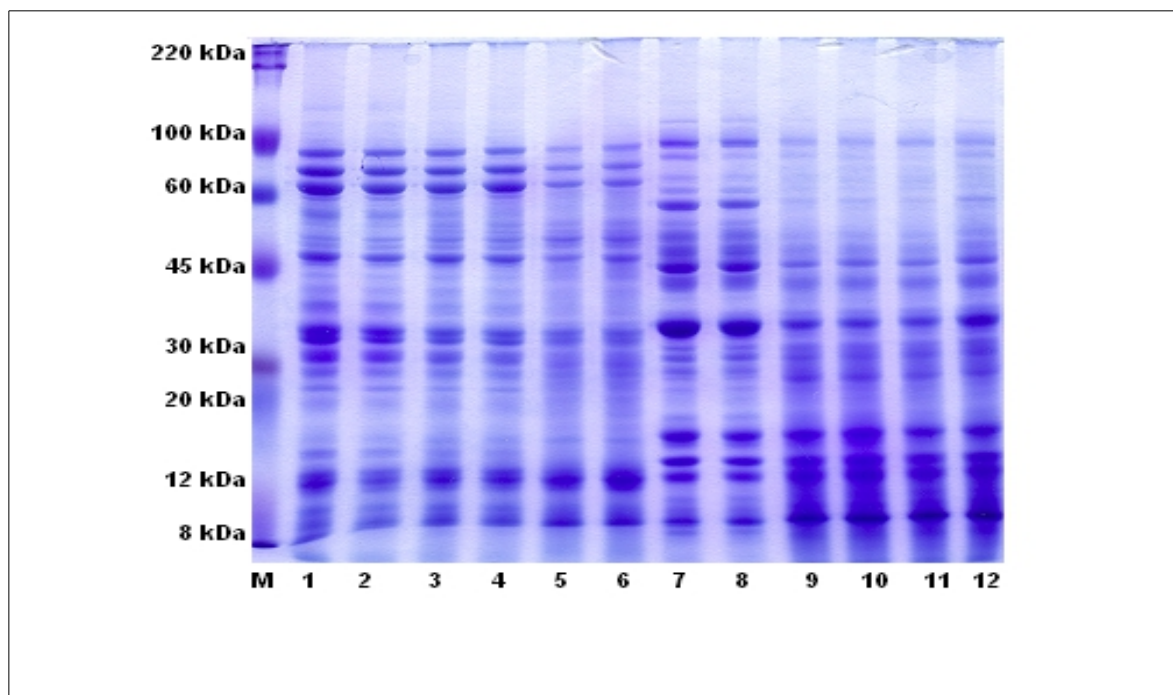
Tabulka č.6: Hmotnost tisíce semen a klíčivost semen luskovin

Luskovina	Průměrná HTS (g)	Směrodatná odchylka	Klíčivost (%)
Hrách setý-polní	364,7	2,4	98
Lupina úzkolistá	119,7	0,4	80
Sója luštinatá	210,1	5,9	99
Bob obecný	569,7	0,99	88

5.2. Vyhodnocení SDS-PAGE elektroforézy

Pro detekci proteinů pomocí SDS-PAGE elektroforézy byla vybrána nenaklíčená semena, semena uprostřed procesu klíčení a semena na konci klíčení sóji luštinaté a bobu obecného vždy ve dvou opakováních (obr. č.4). Molekulové hmotnosti proteinů a relativní zastoupení (abundance) proteinů v % pocházejí z vyhodnocení spekter proteinů pomocí programu Bioprofil. Pro relativní zastoupení proteinů v jednotlivých zónách během klíčení semen byl zhotoven graf (obr. č.5 a 6).

Spektra proteinů naklíčených semen se odlišovala od spekter proteinů nenaklíčených semen nižší intenzitou proteinových pruhů proteinových o vysokých molekulových hmotnostech a zvýšením zastoupením proteinových pruhů o nižších molekulových hmotnostech (obr. č. 4). Během klíčení semen se snížilo relativní zastoupení proteinů v zónách nad 60 kDa, mezi 60-20 kDa a zvýšilo se zastoupení v oblasti do 20 kDa (obr. 5 a 6).



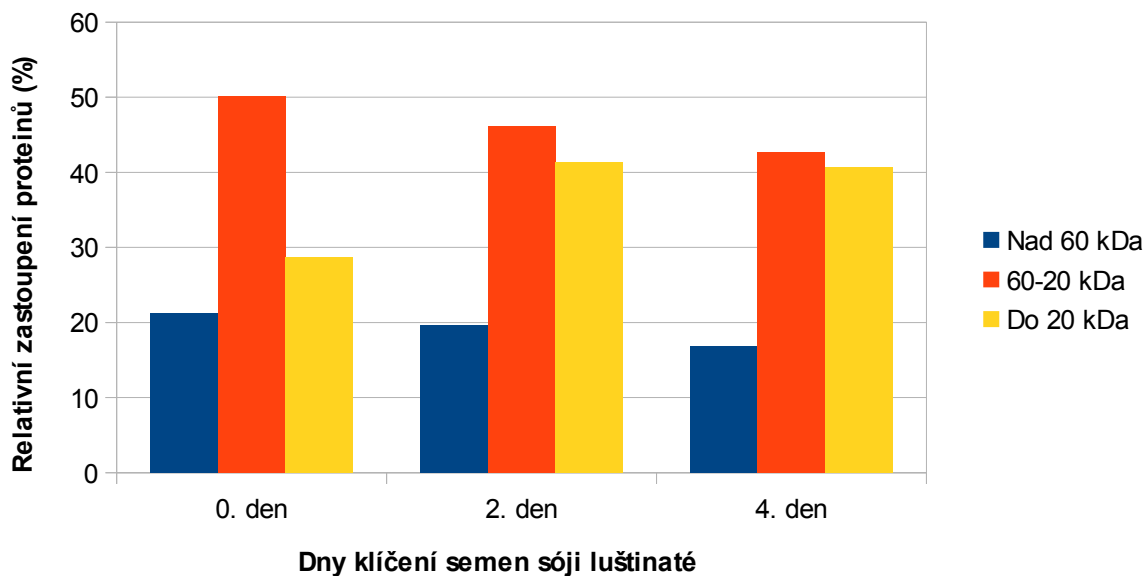
Obrázek č. 4: Spektra proteinů semen sóji luštinaté a bobu obecného

M-marker, 1,2-spektra proteinů nenaklíčených semen , 3,4-spektra proteinů naklíčená semen sóji ze 2. dne, 5,6 – spektra proteinů nenaklíčených semen sóji ze 4. dne
7,8-spektra proteinů nenaklíčených semen bobu, 9,10 - spektra proteinů naklíčených semen bobu ze 4. dne, 11,12- spektra proteinů naklíčených semen bobu z 8. dne

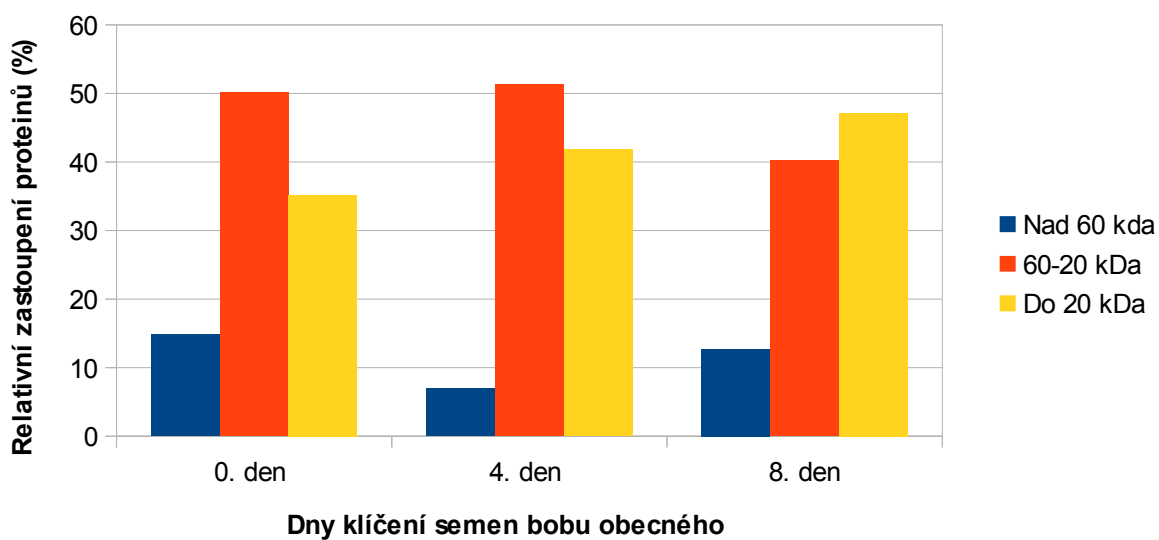
Tabulka č. 7: Molekulové hmotnosti proteinů u semen luskovin v jednotlivých fázích klíčení.

		0	0	2	2	4	4	0	0	4	4	8	8
	M (kDa)	Sója luštinatá (kDa)						Bob obecný (kDa)					
1	220	148,3	149,9	148,3	148,3	148,3	148,3	153	153	151,4	151,4	146,7	146,7
2	100	89,6	89,6	89,6	91,3	93	93,9	124,3	125,7	122,9	122,9	127,1	121,5
3	60	74,9	74,1	74,9	75,7	78	78,8	97,4	97,4	98,3	97,4	98,3	97,4
4	45	64,5	62,2	62,2	62,7	65,1	66,4	85,3	85,3	85,3	83,7	75,7	86,2
5	30	55,4	55,4	55,6	59,5	57	53,4	69,8	69,8	69,1	67	67	74,9
6	20	50,6	50,2	50,2	52,9	53,4	49,8	61,6	61,1	61,6	60	62,2	63,9
7	12	49,1	48,8	48,3	51,4	50	46,2	57	57,4	58,1	58,1	55,8	58,1
8	8	46,9	46,3	46,3	49,8	46,5	42,5	53,1	53,4	50,4	50,2	50,2	55,8
9		44,5	44,2	44	46	37	36,6	50,6	50,6	47,4	47,8	47,8	51,2
10		42,9	42,7	42,6	43,9	35,3	35,3	47,6	47,2	45	45,5	45,5	48
11		41,3	41,3	41	40,7	31,9	29,3	44,6	44,9	43,1	43,4	43,3	45,7
12		37,7	37,2	37	36,5	28,7	26,6	43,3	43,7	38	41,7	41,7	43,5
13		35,9	35,9	35,5	35,1	23,7	22,5	37	37,4	33,1	40,9	38,4	41,9
14		32,4	32,6	31,1	31,1	14,7	17,1	33,6	33,8	31,3	38	32,1	38,8
15		28,4	27,7	26,8	26,4	13,8	14,7	31,1	31,1	24,6	36,5	25,2	32,8
16		23,4	22,5	22,3	22	10,7	13,7	27,1	27,4	14,9	31,9	22,3	26,1
17		19,1	19,6	14,6	14,7	5	11	21,5	21,7	14,1	24,9	17,1	15,3
18		14,9	14,8	14,2	13,9		5	16,4	19,1	13,8	22	15,1	14,1
19		14,3	14,3	13,8	13,8			14,7	16,4	13,2	15	14,4	11,5
20		13,9	13,9	12,5	12,4			14	14,8	11,2	14	14,1	9,1
21		13,7	13,8	11,2	11			13,8	14	5,1	13,8	13,8	5,5
22		12,4	12,5	5,8	5,4			11,1	13,8		11	11,6	
23		11,5	11,2					9,2	12,3		5,4	9,4	
24		9,4	10,3					5,7	11			5,5	
25		6	6						9,4				
25									5,2				

M-marker



Obrázek č. 5: Relativní zastoupení proteinů (abundance) v zónách molekulových hmotností nad 60 kDa, mezi 60-20 kDa a do 20 kDa v jednotlivých dnech klíčení semen sóji luštinaté



Obrázek č. 6: Relativní zastoupení proteinů (abundance) v zónách molekulových hmotností nad 60 kDa, mezi 60-20 kDa a do 20 kDa v jednotlivých dnech klíčení semen bobu obecného.

Vyhodnocení spekter proteinů semen sóji luštinaté

Ve spektrech proteinů nenaklíčených semen sóji luštinaté na obr. č. 4 byly detekovány proteinové pruhy o přibližných velikostech kolem 93 kDa, 75 kDa, 65 kDa, 46 kDa, 37-28 kDa, 14-11 kDa a 9-6 kDa. Hydrolýza proteinů se projevila během 2. dne klíčení semen sóji na spektrech proteinů ve snížené intenzitě proteinových pruhů v oblastech kolem 37-28 kDa. 4. den klíčení semen byl zaznamenán patrný pokles intenzity proteinových pruhů o přibližných velikostech kolem 93 kDa, 75 kDa, 65 kDa, 46 kDa, 37-28 kDa a zvýšila se intenzita proteinových pruhů v oblastech kolem 14-11 kDa a 9-6 kDa.

U nenaklíčených semen sóji luštinaté abundance (relativní zastoupení proteinů) (obr. č. 5) v zónách nad 60 kDa dosahovala 21%, mezi 60-20 kDa 50% a do 20 kDa 29%. Během 4. dnů klíčení semen se snížila abundance proteinů v zónách nad 60 kDa na 17 %, mezi 60-20 kDa na 43% a v zóně do 20 kDa se abundance proteinů zvýšila na 41%.

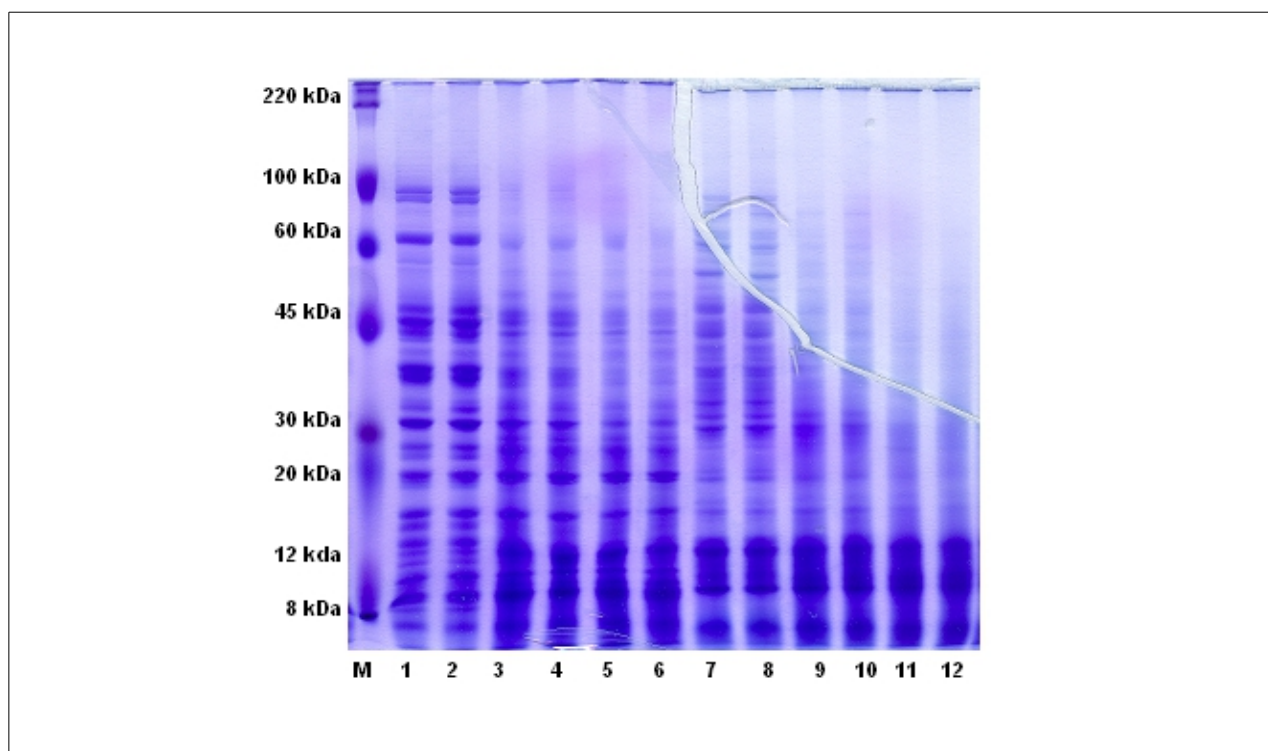
Vyhodnocení spekter proteinů bobu obecného

Spektra proteinů nenaklíčených semen (obr. č. 4) bobu obecného obsahovala proteinové pruhy o přibližných molekulových hmotnostech kolem 97 kDa, 54 kDa, 43 kDa, 37 kDa, 16 kDa, 15 kDa, 13 kDa a 9-6 kDa. Během 4. a 8. dne klíčení semen došlo ve spektrech proteinů k snížení intenzity proteinových pruhů o přibližných molekulových hmotnostech kolem 97 kDa, 54 kDa, 43 kDa, 37 kDa a k zvýšení zastoupení proteinů v oblasti o nižších molekulových hmotnostech kolem 15-6 kDa oproti spektrům proteinů nenaklíčených semen bobu obecného.

U nenaklíčených semen bobu obecného (obr. č. 6) abundance proteinů nad 60 kDa dosahovala 15 %, mezi 60-20 kDa 50% a do 20 kDa 35%. 4. den klíčení semen se abundance proteinů zvýšila v oblasti do 20 kDa na 42%. Během 8. dnů klíčení semen se abundance proteinů v oblasti mezi 60-20 kDa snížila na 40% a v zóně do 20 kDa se zvýšila na 47%.

Pro detekci proteinů pomocí SDS-PAGE elektroforézy byla vybrána nenaklíčená semena, semena uprostřed procesu klíčení a semena na konci klíčení hrachu setého-polního a lupiny úzkolisté vždy ve dvou opakování. Molekulové hmotnosti proteinů a abundance proteinů pocházejí z vyhodnocení spekter proteinů pomocí programu Bioprofil. Pro relativní zastoupení (abundance) proteinů během klíčení semen byl zhotoven graf (obr. č 8 a 9).

Spektra proteinů naklíčených semen se od spekter proteinů nenaklíčených semen odlišovala ztrátou proteinových pruhů, nižší intenzitou proteinových pruhů o vysokých molekulových hmotnostech a zvýšením zastoupením proteinových pruhů o nižších molekulových hmotnostech (obr. č. 7). Během klíčení semen se snížilo relativní zastoupení proteinů v zónách nad 60 kDa, mezi 60-20 kDa a zvýšilo se zastoupení v oblasti do 20 kDa (obr. 8 a 9).



Obrázek č.7: Spektra proteinů semen hrachu setého-polního a lupiny úzkolisté

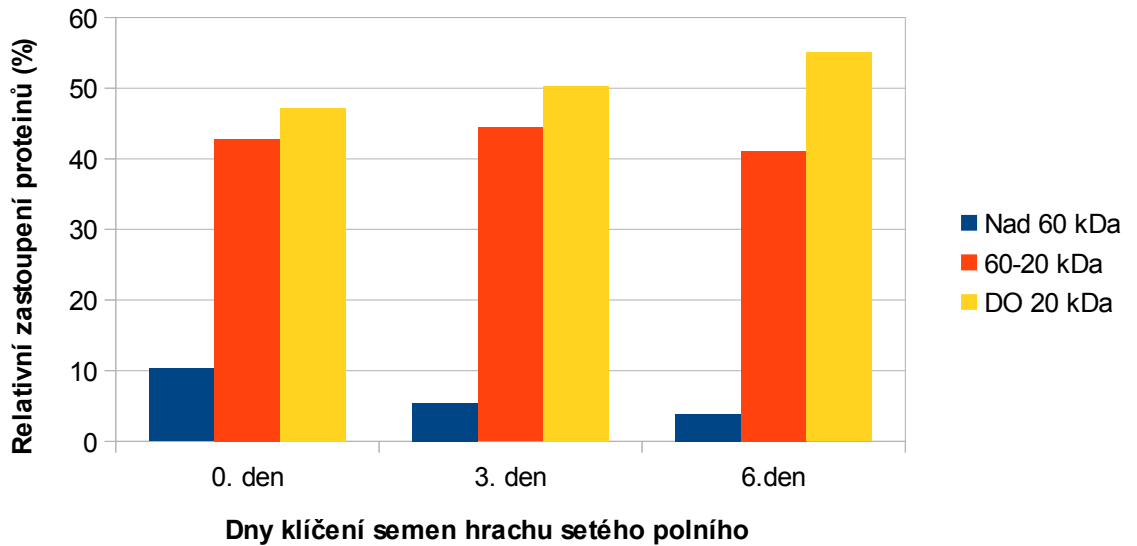
M-marker, 1,2- spektra nenaklíčených semen hrachu, 3,4- spektra naklíčených semen hrachu ze 3. dne, 5,6- spektra proteinů naklíčených semen hrachu z 6. dne

7, 8-spektra nenaklíčená semen lupiny, 9,10-spektra naklíčených semena lupiny z 2. dne, 11,12-spektra proteinů naklíčených semen lupiny ze 4. dne

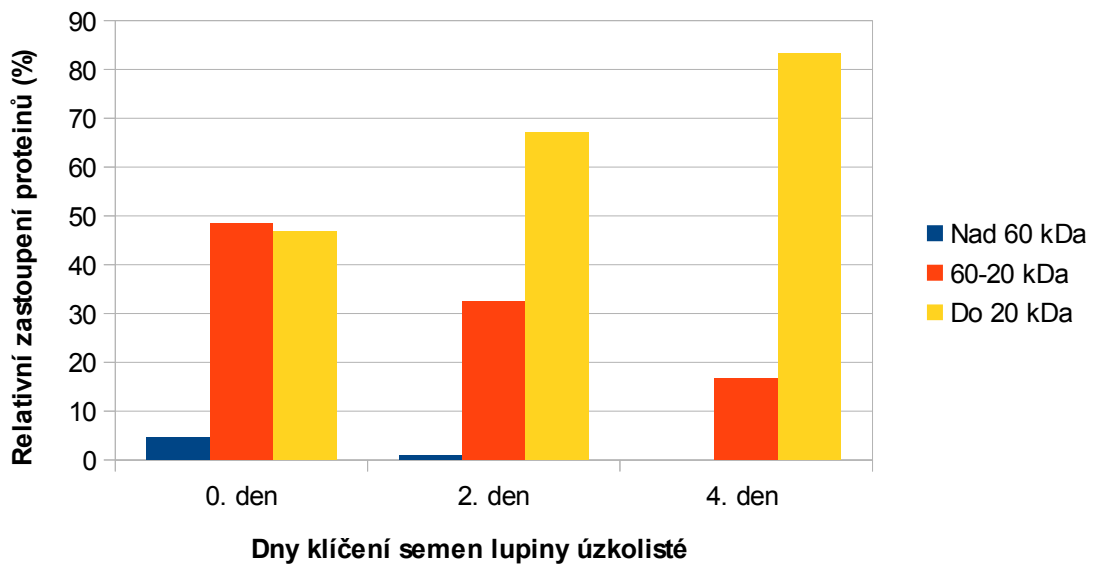
Tabulka č.8: Molekulové hmotnosti proteinů u semen luskovin v jednotlivých fázích klíčení.

		0	0	3	3	6	6	0	0	2	2	4	4
	M	Hrách setý (kDa)						Lupina úzkolistá (kDa)					
1	220	97,6	96,8	99,2	99,2	92,7	65,3	91,1	92,7	51,5	80,2	39,8	36,3
2	100	91,1	90,3	93,5	91,9	63,6	54,7	81,7	80,9	48	60,5	38,9	34,9
3	60	63,6	63,1	62,5	61,5	61,5	51	78,7	65,3	45,3	56,4	37,5	19,4
4	45	57	56,8	55,4	55,2	55,2	46,2	61,5	60,5	44	47,5	34,2	15
5	30	48,2	48,2	51	50,6	50,6	44,9	54,7	54,3	43,2	44,8	32,6	13,8
6	20	46,1	45,7	47,2	47,2	47,2	44,1	52,3	47,9	41,5	43,3	25,5	11,8
7	12	45	44,6	46,4	46,1	46,1	43,1	48,4	44,7	34,4	41,3	18,6	6,7
8	8	43,1	43,1	44,8	44,7	44,9	39,9	44	43,6	31,6	34,9	14,8	
9		41,2	41,3	43	43	44,1	36,1	43,4	40,8	27,1	32,1	13,7	
10		40,6	40,3	41	40,4	43,1	32,6	40,7	37	18,6	18,8	11,7	
11		36,3	35,7	39,4	35,7	39,9	28,4	36,8	34,2	14,7	14,8	6,5	
12		32,8	32,6	35,9	32,6	36,1	24,6	34,2	31,6	13,7	13,7		
13		25,8	25,8	32,4	24,3	32,6	18,8	31,6	20	11,6	11,6		
14		23,1	23,4	28,4	18,6	28,4	14,6	18,2	18,4	6,5	6,5		
15		18,6	18,6	24,6	14,5	24,6	13,6	14,7	14,8				
16		14,6	14,7	18,8	13,4	18,8	12,8	13,6	13,6				
17		14,2	14,2	14,6	12,8	14,6	11	11,5	11,5				
18		13,8	13,8	13,6	11,3	1,6	7,2	6,7	6,6				
19		13,6	13,6	12,8	7	12,8							
20		13,3	13,3	10,9		11							
21		12,3	12,6	6,8		7,1							
22		10,5	10,8										
23		8,9	9,2										
24		6,8	6,7										

M-marker



Obrázek č. 8: Relativní zastoupení proteinů (abundance) v zónách molekulových hmotností nad 60 kDa, mezi 60-20 kDa a do 20 kDa v jednotlivých dnech klíčení semen hrachu setého polního.



Obrázek č. 9: Relativní zastoupení proteinů v zónách molekulových hmotností nad 60 kDa, mezi 60-20 kDa a do 20 kDa v jednotlivých dnech klíčení semen lupiny úzkolisté.

Vyhodnocení spekter proteinů semen hrachu setého

Spektra proteinů nenaklíčených semen hrachu setého (obr. č. 7) obsahovala proteinové pruhy o přibližných molekulových hmotnostech kolem 99 kDa, 93 kDa, 65 kDa, 48-45 kDa, 40-36 kDa, 32 kDa, 25 kDa, 23 kDa a 19-7 kDa. Ve spektrech proteinů naklíčených semen ze 3. dne byl zaznamenán pokles intenzity proteinových pruhů o přibližných molekulových hmotnostech kolem 99 kDa, 93 kDa, které jsou na gelu méně viditelné, 65 kDa, 48-45 kDa, 40-36 kDa a 32 kDa. Naopak v oblastech s nižší molekulovou hmotností kolem 25-23 kDa a 19-7 došlo k zvýšení zastoupení proteinových pruhů. Spektra proteinů naklíčených semen z 6. dne s porovnáním se spektry naklíčených semen ze 3. dne se vyznačovala ztrátou proteinových pruhů o přibližných molekulových hmotnostech kolem 99 a 93 kDa.

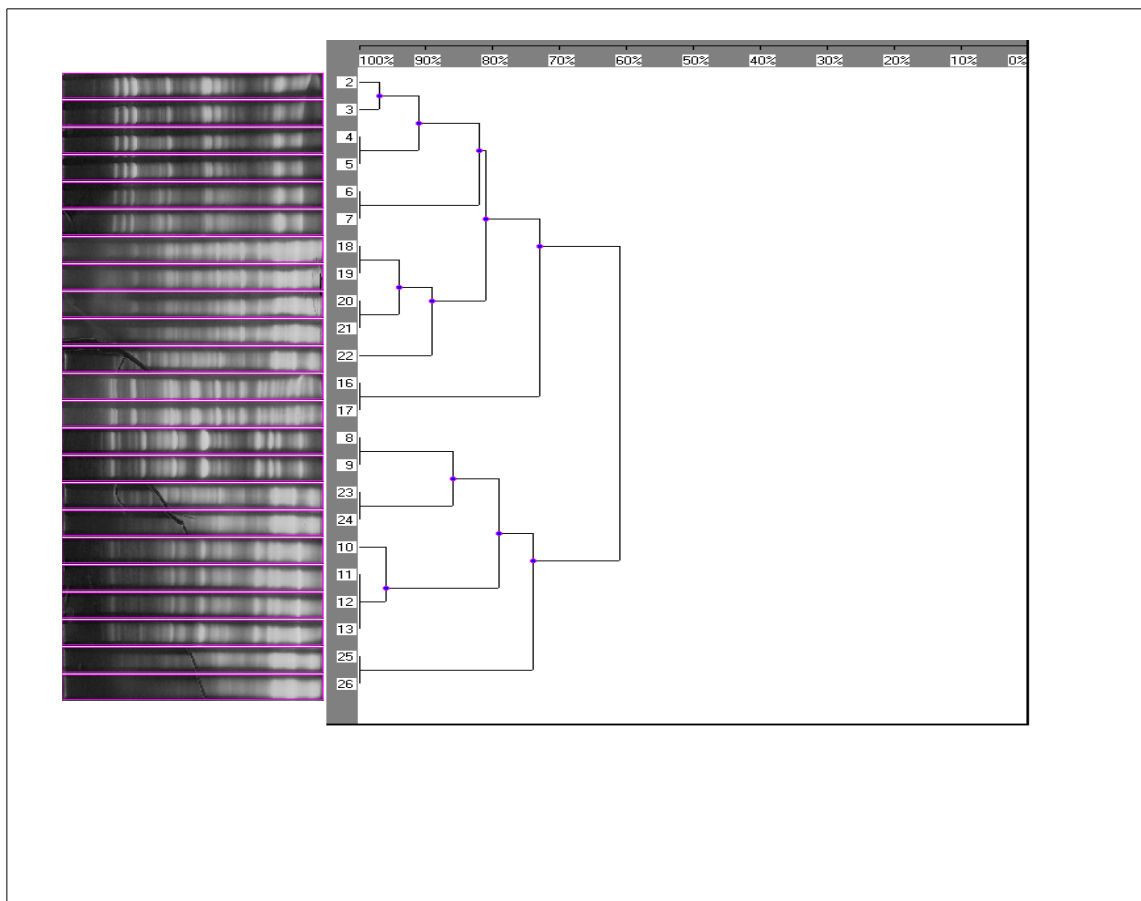
U nenaklíčených semen hrachu setého (obr. č. 8) abundance proteinů do 60 kDa zaujímal 10%, mezi 60-20 kDa 43 % a do 20 kDa 47%. 3. den klíčení semen abundance proteinů v zóně nad 60 kDa klesla na 5%, mezi 60-20 kDa na 45% a v zóně do 20 kDa stoupla na 50%. Během 6. dnů klíčení semen abundance proteinů v zóně nad 60 kDa se snížila na 4%, mezi 60-20 kDa na 41% a do 20 kDa se abundance proteinů zvýšila na 55%.

Vyhodnocení spekter proteinů semen lupiny úzkolisté

Spektra proteinů nenaklíčených semen lupiny úzkolisté na obr. č. 7 obsahovala proteinové pruhy o přibližných molekulových hmotnostech kolem 93 kDa, 81 kDa, 65 kDa, 54 kDa, 48-45 kDa, 37 kDa, 32 kDa a 15-12 kDa, 7 Kda. Spektra proteinů semen naklíčených ze 2. dne se vyznačovala ztrátou proteinů o přibližných molekulových hmotnostech kolem 93 kDa, sníženou intenzitou proteinových pruhů v oblasti kolem 81-32 kDa a zvýšeným zastoupením proteinových pruhů v zóně kolem 15-7 kDa. Ve spektrech proteinů naklíčených semen ze 4. dne nebyly detekovány proteiny nad 39 kDa.

U nenaklíčených semen lupiny úzkolisté (obr. č. 9) abundance proteinů v zóně nad 60 kDa dosahovala 5%, mezi 60-20 kDa 49 % a do 20 kDa 47%. 2. den klíčení semen klesla abundance proteinů na 1%, mezi 60-20 kDa 32% a do 20 kDa se abundance proteinů zvýšila na 67%. Během 4 dnů klíčení semen se abundance proteinů v zóně nad 60 kDa

snížila na 0%, mezi 60-20 kDa na 17% a v zóně do 20 kDa se abundance proteinů zvýšila na 83%.



Obrázek č. 10: Podobnost mezi druhy luskovin

2,3- spektra proteinů nenaklíčených semen sóji, 4,5-spektra proteinů naklíčených semen sóji z 2. dne, 6,7-spektra proteinů semen sóji ze 4. dne

8,9-spektra proteinů nenaklíčených semen bobu, 10,11-spektra proteinů naklíčených semen z 4. dne, 12,13-spektra proteinů naklíčených semen ze 8. dne

16,17-spektra proteinů nenaklíčených semen hrachu, 18,19- spektra naklíčených semen z 3. dne, 20,21- spektra proteinů naklíčených semen hrachu ze 6. dne

22,23-spektra proteinů nenaklíčených semen lupiny úzkolisté, 24,25-spektra proteinů naklíčených semen lupiny úzkolisté z 2. dne, 26- spektrum proteinů naklíčených semen lupiny úzkolisté ze 4. dne

Proteinové pruhy kolem 93 kDa byly detekovány ve spektrech proteinů hrachu setého, bobu obecného a lupiny úzkolisté. Ve spektrech naklíčených semen hrachu a bobu měly proteinové pruhy kolem 93 kDa nižší intenzitu oproti spektrům proteinů nenaklíčených semen.

Intenzita proteinových pruhů přibližně kolem 65 kDa se snížila ve spektrech naklíčených semen sóji luštinaté, hrachu setého a lupiny úzkolisté.

Intenzita proteinových pruhů v zóně přibližně kolem 45 kDa klesla ve spektrech proteinů naklíčených semen bobu obecného a lupiny úzkolisté.

Intenzita proteinových pruhů přibližně kolem 37 kDa klesla u spekter proteinů naklíčených semen sóji luštinaté, bobu obecného, hrachu setého a lupiny úzkolisté.

Proteinovými pruhy přibližně kolem 32 kDa se shodovala spektra proteinů hrachu setého, spektra nenaklíčených a naklíčených semen lupiny úzkolisté z 2. dne.

Zóna do 15 kDa u spekter proteinů naklíčených semen lupiny úzkolisté a bobu obecného měla vyšší zastoupení proteinových pruhů oproti spektrům proteinů nenaklíčených semen bobu obecného a lupiny úzkolisté.

5. 3. Statistické vyhodnocení

Úkolem statistického vyhodnocení bylo odlišit relativní zastoupení proteinů v jednotlivých zónách spekter proteinů u semen luskovin na konci klíčení. Proteiny byly ve spektrech rozděleny do 3 zón-nad 60 kDa, mezi 60-20 kDa a do 20 kDa. Poté % relativního zastoupení proteinů, která pocházejí z vyhodnocení spekter proteinů pomocí programu Bioprofil, byla v jednotlivých zónách sečtena. Pro statistické odlišení relativního zastoupení proteinů v jednotlivých zónách byl použit Fisherův LSD test v programu STATISTIKA. Rozdílná písmena v tabulce č. 9 vyjadřují rozdíl v relativním zastoupení proteinů v jednotlivých zónách na konci klíčení semen luskovin. Pro relativní zastoupení proteinů byl zhotoven graf (obr. č. 10).

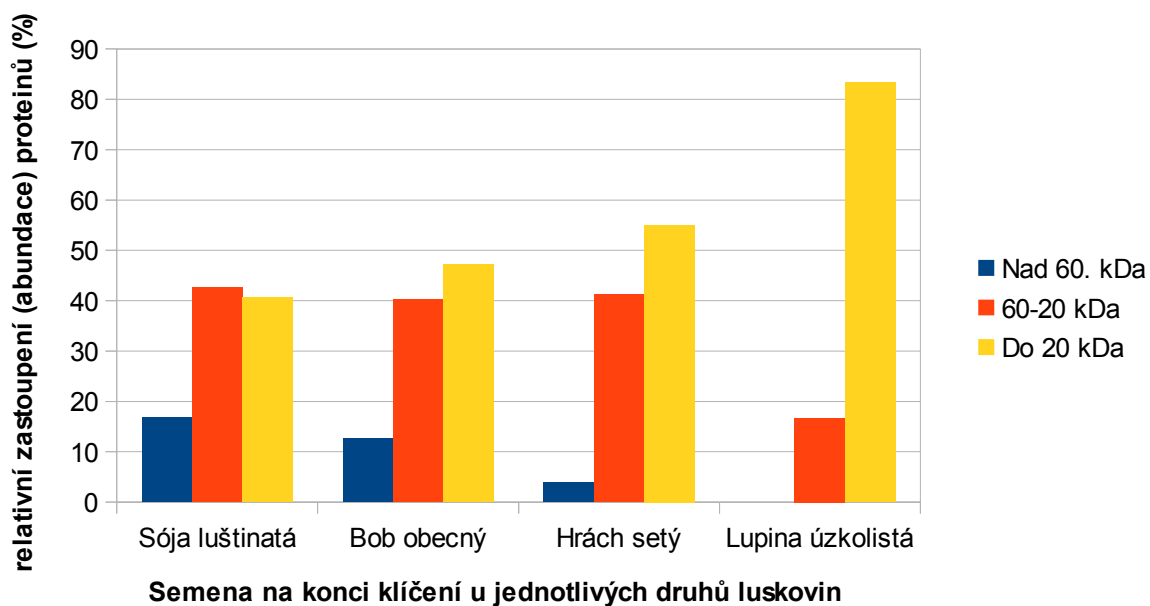
Tabulka č.9: Porovnání abundancí proteinů mezi jednotlivými druhy luskovin na konci klíčení pomocí Fisherova LSD testu

Fisherův LSD test			
Luskovina	Zóny	Abundance	Porovnání
Lupina úzkolistá	Nad 60 kDa	0	a
Hrách setý	Nad 60 kDa	3,9	a
Bob obecný	Nad 60 kDa	12,7	b
Lupina úzkolistá	20-60 kDa	16,7	b
Sója luštinatá	Nad 60 kDa	16,8	b
Bob obecný	20- 60 kDa	40,2	c
Sója luštinatá	Do 20 kDa	40,65	c
Hrách setý	20-60 kDa	41,15	c
Sója luštinatá	20-60 kDa	42,7	cd
Bob obecný	Do 20 kDa	47,15	d
Hrách setý	Do 20 kDa	55,05	e
Lupina úzkolistá	Do 20 kDa	83,3	f

Nejvíce statisticky odlišné v abundanci proteinů byly zóny do 20 kDa u semen hrachu setého-polního a lupiny úzkolisté na konci klíčení

Další statistická hodnocení jsou uvedena v příloze č.9

Obrázek č.10: Relativní zastoupení (abundance) proteinů (%) v zónách molekulových hmotností nad 60 kDa, mezi 60-20 kDa a do 20 kDa na konci klíčení semen luskovin.



Největší relativní zastoupení (abundance) proteinů ze všech semen luskovin na konci klíčení bylo u semen lupiny úzkolisté v zóně do 20 kDa.

6. Diskuse

Pomocí SDS-PAGE elektroforézy se podařilo prokázat změny v relativním zastoupení proteinů způsobené hydrolýzou během klíčení semen u jednotlivých druhů luskovin (Savelkoul et al., 1992).

U semen sóji luštinaté se projevovaly změny v proteinech 2. den klíčení semen, což je v souladu s výsledky Savelkoul et al. (1992). U bobu obecného byly změny v zastoupení proteinů pozorovány 4. den klíčení semen. Savelkoul et al. (1992) uvádí, že u semen bobu obecného dochází ke změnám ve spektru proteinů již během 2. a 3. dne klíčení.

Změny ve spektrech proteinů během klíčení semen lukovin se projevovaly ztrátou proteinových pruhů, sníženou intenzitou vysokomolekulárních proteinových pruhů a zvýšeným zastoupením proteinových pruhů nízkomolekulárních.

Ve spektrech proteinů naklíčených semen bobu obecného a lupiny úzkolisté se zvýšilo zastoupení proteinových pruhů do 15 kDa o nižších molekulových hmotnostech v porovnání se spektry proteinů nenaklíčených semen. Proteinové pruhy o nižších molekulových hmotnostech podle Ahmed et al. (1995) mohou být aminokyselinami, či peptidy o nižších molekulových hmotnostech, které vznikají štěpením zásobních proteinů během klíčení semen rodu *Lupinus* a bobu obecného.

Spektra proteinů nenaklíčených semen lupiny úzkolisté obsahovala proteinové pruhy o velikostech 93 kDa, 65 kDa, 48-45 kDa a 37 kDa. Ve spektrech naklíčených semen lupiny úzkolisté nebyly detekovány 93 kDa, 65 kDa, 48-45 kDa. Tyto výsledky se nejvíce shodují s výsledky Rumiya et al. (2012).

Ve spektrech proteinů naklíčených semen hrachu setého nebyly detekovány proteinové pruhy o velikostech 99 kDa, 93 kDa a 65 kDa, byl zaznamenán pokles proteinových pruhů o velikosti přibližně mezi 48-45, 40-36 kDa a zvýšila se intenzita proteinových pruhů přibližně mezi 25-23 kDa, což odpovídá výsledkům Martínez-Villaluenga et al. (2008). Ve spektrech proteinů naklíčených semen sóji z 2. dne klesla intenzita proteinových pruhů v oblastech přibližně mezi 37-25 kDa v oblastech, které uvádí Savelkoul et al. (1992). Ahmed et al. (1995) tvrdí, že tyto postupně snižující proteiny jsou zdrojem aminokyselin sloužící pro stavbu nových proteinů.

V diplomové práci se podařilo zhodnotit změny v profilech zásobních proteinů u klíčících semen luskovin. Výsledky z SDS-PAGE elektroforézy dokázaly, že během

klíčení semen luskovin dochází k postupnému odbourávání zásobních proteinů pomocí hydrolytických enzymů a vytvářejí se nové proteiny (Ahmed et al., 1995). Tyto výsledky jsou v souladu se zjištěními ostatních autorů. Zjištěné změny ve spektru proteinů naklíčených semen se lišily podle druhu luskoviny. Spektra proteinů naklíčených semen bobu obecného a hrachu setého měla nižší intenzitu pruhů o vysokých molekulových hmotnostech obdobně jako ve studiích Ahmed et al.(1995) a Martinez-Villaluenga et al. (2008). U semen lupiny úzkolisté byl poněkud odlišný charakter spektra zásobních proteinů. Spektra proteinů semen lupiny úzkolisté na konci klíčení se odlišovala od spekter proteinů nenaklíčených semen ztrátou velkého množství proteinových pruhů o vysokých molekulových hmotnostech a zvýšenou intenzitou proteinových pruhů o nižších molekulových hmotnostech. Tyto výsledky byly potvrzeny ve studiích Ahmed et al.(1995) a Rumiya et al.(2012). Detekce proteinů pomocí SDS-PAGE elektroforézy u klíčících semen luskovin by mohla být využita pro stanovení biologické aktivity semen v semenářství a ve šlechtění rostlin. Pro důkladnější analýzu proteinů je možné před SDS-PAGE elektroforézu zařadit frakcionaci proteinů podle Osbornovy metody a určit, které skupiny rozpustných proteinů se účastní klíčení semen. U jednotlivých skupin proteinů naklíčených semen luskovin lze s použitím vysokotlaké chromatografie (HPCL) stanovit zastoupení aminokyselin (Martínez-Villaluenga et al., 2008). Dále je možné u klíčících semen luskovin změřit enzymatickou aktivitu a zjistit obsah inhibitorů trypsinu, lektinů, které jsou součástí rozpustných proteinů albuminů a slouží jako ochrana před škůdci (Casey, 1999; Domoney, 1999). Klíčící semena luskovin se rovněž používají v biotechnologických aplikacích jako zdroje enzymů (Das et al., 1997; Kayastha & Srivastava, 2001; Tripathi et al., 2007; Dwevedi et al., 2009; Kumar et al., 2009). Podrobnější uplatnění enzymů je uvedeno v literárním přehledu.

7. Závěr

Cílem diplomové práce bylo hodnocení změn v zásobních profilech proteinů semen během klíčení u 4 druhů luskovin: sóji luštinaté, bobu obecného, hrachu setého-polního a lupiny úzkolisté pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Během klíčení semen docházelo ke štěpení proteinů na menší peptidy. V jednotlivých spektrech proteinů se tyto změny projevovaly ztrátou, sníženou intenzitou proteinových pruhů o vysokých molekulových hmotnostech a zvýšeným zastoupením proteinových pruhů o nižších molekulových hmotnostech. Relativní zastoupení proteinů během klíčení semen se lišilo podle druhu luskoviny:

* U sóji luštinaté během klíčení semen klesla intenzita proteinových pruhů o přibližných molekulových hmotnostech kolem 93 kDa, 65 kDa, 46 kDa, 37-28 kDa a zvýšila se intenzita proteinových pruhů kolem 14-11 kDa, 9-6 kDa. Relativní zastoupení (abundance) proteinů se během klíčení sóji luštinaté v zónách nad 60 kDa snížilo z 21% na 17%, mezi 60-20 kDa z 50% na 43% a v zónách do 20 kDa se zvýšilo z 29% na 41%.

* U bobu obecného během klíčení semen se snížila intenzita proteinových pruhů o přibližných molekulových hmotnostech kolem 97 kDa, 54 kDa, 43 kDa, 37 kDa a zvýšilo se zastoupení proteinových pruhů v oblasti 15-6 kDa. Relativní zastoupení (abundance) proteinů se během klíčení semen bobu obecného v zónách nad 60 kDa snížilo z 15% na 13%, mezi 60-20 kDa z 50% na 40% a v zónách do 20 kDa se zvýšilo z 35% na 47%.

* U hrachu setého během klíčení semen se ztratily proteinové pruhy o přibližných molekulových hmotnostech kolem 99 kDa, 93 kDa, snížila se intenzita proteinových pruhů o přibližných velikostech 65 kDa, 48-45 kDa, 40-36 kDa, 32 kDa a zvýšilo se zastoupení proteinových pruhů v rozpětí mezi 25-23 kDa, 19-7 kDa. Relativní zastoupení (abundance) proteinů se během klíčení semen hrachu snížilo v zónách nad 60 kDa z 10% na 4%, mezi 60-20 kDa z 43% na 41% a v zónách do 20 kDa z 47% na 55%.

* U lupiny úzkolisté během klíčení semen nebyly detekovány proteinové pruhy nad 39 kDa a zvýšilo se zastoupení proteinových pruhů v rozpětí mezi 15-6 kDa. Relativní zastoupení (abundance) proteinů se během klíčení semen lupiny úzkolisté snížilo v zónách nad 60 kDa z 5% na 0%, mezi 60-20 kDa z 49% na 17% a v zónách do 20 kDa z 67% na 83%.

Pomocí SDS-PAGE elektroforézy se podařilo prokázat změny v relativním zastoupení proteinových pruhů v různých fázích klíčení semen luskovin. Pro důkladnější analýzu by bylo vhodné zařadit před SDS-PAGE elektroforézou frakcionaci proteinů podle Osbornovy metody a určit, které rozpustné skupiny proteinů se účastní při klíčení semen luskovin.

8. Seznam použité literatury

Abe K., Emori Y., Kondo H., Suzuki K. S., Arai S. (1987): Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). *Journal of Biological Chemistry*, vol. 262, 16793–16797 pp.

Abe Y., Shirane K., Yokosawa H., Matsushita H., Mitta M., Kato I., Ishii S. (1993): Asparaginyl endopeptidase of jack bean seeds. *Journal of Biological Chemistry*, vol.268, 3525-3529 pp.

Ahn J. W., Kim M., Lim J.H., Kim G.T., Pai H.S. (2004): Phytoalbumin controls the proliferation and differentiation fates of cells in plant organ development. *Plant Journal*, vol. 38, 969–81.pp.

Ahmed A. R. F., Abdel-Rahim E. A-M., Abdel-Fatah O. M., Erdmann V. A., Lippmann C. (1995): The changes of protein patterns during one week of germination of some legume seeds and roots. *Food chemistry*, vol. 52, 433-437 pp.

Akinlonsattu A., Akinyele I.O. (1991): Effect of soaking, dehulling and fermentation on the oligosaccharides and nutrient content of cowpeas (*Vigna unguiculata*) *Food chemistry*, vol. 41, 43-53 pp.

Alonso R, Aguirre A, Marzo F (2000): Effects of extrusion and traditional processing methods on antineutrinos and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chemistry*, vol. 68, 159–165 pp.

Aniszewski T. (2010): Comparison of catecholase activity (PPO) activity in whole seeds and their components (testa, cotyledon and embryo) of four legume species from genus *Lupinus*. *Legume Research*, vol. 33, 157-163 pp.

Aniszewski T., Lieberei R., Gulewicz K. (2008): Research on catecholases, laccases and cresolases in plants. Recent progress and future needs. *Acta Biologica Cracoviensia Botanica*, vol. 50, 7-18 pp.

Antonov V.K. (1991): *Khimiya proteoliza (Chemistry of Proteolysis)*. Moscow, Nauka, 504 pp.

Ashton F.M. (1976): Mobilization of storage proteins of seeds. *Annual Review of Plant Physiology*, vol. 27, 95-117 pp.

Babitha M. P., Prakash H. S., & Shetty H. S. (2004): Purification and properties of lipoxygenase induced in downy mildew resistant pearl millet seedlings due to infection with *Sclerospora graminicola*. *Plant Science*, vol.166, 31–39 pp..

Babar V.S., Chavan J.K., Kadam S.S. (1988): Effects of heat treatments and germination on trypsin inhibitor activity and polyphenols in jack bean (*Canavalia ensiformis* L. DC). *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 38, 319-324 pp.

Barrett A. J., Rawlings N. D., & Woessner J. F., Bacillolysin. In: A. J. Barrett A.J., Rawlings N.D.,& J Woessner J.F.(Eds.), *Handbook of proteolytic enzymes*. San Diego: Academic (1998)

Bau H., Villaume C., Nicolas J., Mcjean L. (1997): Effect of germination of chemical composition, biochemical constituents and antinutritional factors of soybean (*Glycine max*) seeds. *Journal of Science Food and Agriculture*, vol. 73, 1–9 pp.

Baumgartner B., Chrispeels M.J. (1976): Partial characterization of a protease inhibitor which inhibits the major endopeptidase present in the cotyledons of mung bean. *Plant Physiology*, vol. 58, 1–6 pp.

Becker-Ritta A. B., Martinellia A.H.S., Mitidierib S., Federa V., Wassermann G.E., Santia L., Vainsteina M.H.,c, J.T.A. Oliveirad J.T.A., Fiuzae L.M., Pasqualia G.,f, Carlini C.R. (2007): Antifungal activity of plant and bacterial ureases. *Toxicon*, vol. 50, 971–983 pp.

Beuth J, Stoffel B. (1998): Experimental and clinical evaluation of the immunoactive potency of mistletoe lectin-1. In: Bardocz S., Pfüller U., Pusztai A., editors. Effects of antinutrients on the nutritional value of legume diets. COST98, vol. 1. European Commission Directorate-General XII; 176 pp.

Bewley, J. D., & Black, M. (1994): *Seeds: physiology of development and germination* (2nd ed.). New York: Plenum Press, 445 pp.

Bewley D.J., Hempel F.D., McCormick S., Zambryski P. (2000): Reproductive development. In: Buchanan BB, Gruissem W., Jones R.L., editors . *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists. 988–1043 pp.

Blagrove R. J., & Gillespie J. M. (1975): Isolation, purification and characterisation of the seed globulins of *Lupinus albus*. *Australian Journal of Plant Physiology*, vol. 2, 13-27 pp.

Blée E. (1998): Phytooxylipins and plant defense reactions. *Progress in Lipid Research*, vol. 37, 33–72 pp.

Bohn L., Meyer A.S., Rasmussen S.K. (2008): Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *Journal of Zhejiang University Science-B*, vol. 9, 165–191 pp.

Bowles D.J., Marcus S.E., Pappin D.J.C., Findlay J.B.C., Eliopoulos E., Maycox P.R., Burgess J. (1986): Post-translational processing of concanavalin A precursors in jackbean cotyledons. *Journal of Cell Biology*, vol. 102, 1284-1297 pp.

Boyer R.F. (1977): A spectrophotometric assay of polyphenoloxidase activity. *Journal of Chemical Education*, vol. 54, 585-586 pp.

Buckeridge M. S., Reid J. S. (1994): Purification and properties of a novel β galactosidase or exo-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactanase from the cotyledons of germinated *Lupinus angustifolius* L. seeds. *Planta*, vol. 192, 502–511 pp.

Casey R. (1999): Distribution and some properties of seed globulins. In: Shewry P.R., Casey R. (Eds.) *Seed proteins*. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 159-169 pp.

Casey R., Domoney C., Ellis N. (1985): Legume storage proteins and their genes. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, vol. 3, 1-95 pp.

Casey R., Domoney C., Ellis N. (1986): *Seeds: physiology of development germination*. *Oxford Surveys Plant of Molecular Cell Biology*, 3:1

Casey, R., Domoney, C., & Ellis, N. (1986): Legume storage protein and their genes. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, vol.3, 2–95 pp.

Casey R., Domoney C. (1999): In: Shewry R., Casey R. (ed.) *Seed proteins*. Kluwer, Amsterdam, 171-208 pp.

Cumbee B., Hildebrand D. F., Addo K. (1997): Soybean flour lipoxygenase isozymes effects on wheat flour dough rheological and breadmaking properties. *Journal of Food Science*, vol. 62, 281–283 pp.

Centeno C., Viveros A., Brenes A., Canales R., Lozano A., de la Cuadra C. (2001): Effect of several germination conditions on total P, phytase, and acid phosphatase activities and inositol phosphate esters in rye and barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, 3208-3215 pp.

Das N., Prabhakar P., Kayastha A. M. & Srivastava R.C. (1997): Enzyme entrapped inside the reversed micelle in the fabrication of a new urea biosensor. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 54, 330-332 pp.

Davidsson L., Galan P., Cherouvrier F., Kastenmayer P., Juillerat M.A., Hercberg S., Hurrell R.F. (1997): Bioavailability in infants of iron from infant cereals: effect of dephytinization. *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 65, 916-200 pp.

Davidsson L., Galan P., Kastenmayer P., Cherouvrier F., Juillerat M.A., Hercberg S., Hurrell R.F. (1994): Iron bioavailability studied in infants: The influence of phytic acid and ascorbic acid in infant formulas based on soy isolate. *Pediatr Research*, vol. 36, 816-822 pp.

Derbyshire E., Wright D.J., Boulter D. (1976): Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry*, vol. 15, 3-24 pp.

Desphande S.S, Cheryan M., Salunkhe D.K. (1986): Tannin analysis of food products. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 24, 401-449pp.

Dey P. M. (1984): Biochemistry of the multiple forms of glycosidases in plants. In: Meister, A. (Ed.), *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, vol. 56. John Wiley and Sons, Inc., New York, 180-186 pp.

Domash V.I., Sharplo T.P., Zabrelko S.A., Sosnovskaya T.F. (2008): Proteolytic Enzymes and Trypsin Inhibitors of Higher Plants under Stress Conditions. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, vol. 34, 318-322 pp.

Domoney C. (1999): Inhibitors of legume seeds. In P. R. Shewry, & R. Casey (Eds.), *Seed proteins*. Amsterdam: Kluwer Academic Publisher, 635-655 pp.

Dostálová J., Kadlec P., Strohalm J., Culková, Houška M. (2007): Application of high-pressure processing for preservation of germinated legumes, *High Pressure Research*, vol. 27, 135-39 pp.

Dostálová J., Prugar: (ed.) (2008): In: Prugar J. (ed.) *Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí*, Výzkumný ústav pivovarský a sladářský a.s., Praha, 202 pp.

Downing W.L., Mauxion F., Fauvarque M., Reviron M., de Vienne D., Vartanian N., J. Giraudat J. (1992) : A *Brassica napus* transcript encoding a protein related to the Kunitz protease inhibitor family accumulates upon water stress in leaves, not in seeds. *Plant Journal*, vol. 2, 685–693 pp.

Duranti M. (1986a): Enzymatic subunit splitting of lupin storage proteins. *Die Nahrung*, vol. 30, 271-274 pp.

Duranti M. (1986b): The structure of lupin seed protein. *Die Nahrung*, vol. 30, 221-227 pp

Duranti M. (2006): Grain legume proteins and nutraceutical properties, *Fitoterapia*, vol. 77, 67-82 pp.

Duranti M., Cucchetti E., & Cerletti P. (1984): Changes in composition and subunits in the storage proteins of germinating lupin seeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 32, 490-493 pp.

Duranti M., Faoro F., & Harris N. (1994): The unusual extracellular localization of conglutin γ in germinating *Lupinus albus* seeds rules out its role as a storage protein. *Journal of Plant Physiology*, vol. 143, 711- 716 pp.

Duranti M., Gius M. (1997): Legume seeds: protein content and nutritional value. *Field Crops Research*, vol. 53, 31-45 pp.

Duranti M., Gius C., Sessa F., & Vecchio G. (1995): The saccharide chain of lupin seed conglutin γ is not responsible for the protection of native protein from degradation by trypsin, but facilitates the refolding of the acid-treated protein to the resistant conformation. *European Journal of Biochemistry*, vol. 230, 886-891 pp.

Duranti M., Guerrrieri N, Cerletti P., Vecchio G. (1992): The legumin precursor from white lupin seed. *European Journal of Biochemistry*, vol. 206, 941-947 pp.

Duranti M., Restani P., Poniatowska M., & Cerletti P. (1981): The seed globulins of *Lupinus albus*. *Phytochemistry*, vol. 20, 2071-2075 pp.

Duranti M., Sessa F., & Carpen A. (1992): Identification, purification, and properties of the precursor of conglutin β , the 7S storage globulin of *Lupinus albus* L. seeds. *Journal of experimental Botany*, vol. 43, 1373-1378 pp.

Duranti M., Sessa F., Scarafoni A., Bellini T, & Dallochio (2000): Thermal stabilities of lupin seed conglutin γ protomers and tetramers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, 1118-1123 pp.

Dwevedi A., Kayastha A. M. (2009): Stabilization of β -galactosidase (from peas) by immobilization onto Amberlite MB-150 beads and its application in lactose hydrolysis. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, vol. 57, 2009, 682-688 pp.

Dwevedi A., Kayastha A. M. SOYBEAN: A Multifaceted Legume with Enormous Economic Capabilities, *Soybean - Biochemistry, Chemistry and Physiology*, 188 pp.

Dwevedi A., Singh A. K., Singh D. P., Srivastava O. N., Kayastha A. M. (2009): Lactose nano-probe optimized using response surface methodology. *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 25, 784-790 pp.

Erlanger B.F., Kakowsky N., Cohen W. (1961): The preparation and properties of two new chromogenic substrates for trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol 95, 271-278 pp.

Egli I., Davidsson I., Juillerat M.A., Barclay D., Hurrell R.F. (2002): The Influence of Soaking and Germination on the Phytase Activity and Phytic Acid Content of Grains and Seeds Potentially Useful for Complementary Feeding. *Journal of Food Science* , vol. 67, 3484-3488 pp.

Ferreira R. B., Freitas R. L., & Teixeira A. R. (2003a): The structure of *Lupinus* seed storage proteins. Recent developments. *Current Topics in Plant Biology*, vol. 4, 139–150 pp.

Ferreira R. B., Freitas R. L., & Teixeira A. R. (2003b): Self-aggregation of legume seed storage proteins inside the protein storage vacuoles is electrostatic in nature, rather than lectin-mediated. *FEBS Letters*, vol. 534, 106–110 pp.

Ferreira R.B., Freitas R.G.,Teixeira A.R. (2003): Self-aggregation of legume seed storage proteins inside the protein storage vacuoles is electrostatic in nature, rather than lectin-mediated. *FEBS Letters*, vol. 534, 106–110. pp.

Ferreira R.B., Melo T.S., Teixeira A.N. (1995): Catabolism of the Seed Storage Proteins from *Lupinus albus*: Fate of Globulins during Germination and Seedling Growth. *Australian Journal of Plant Physiology*, vol. 22, 373-381 pp.

Goldstein J.L., Swain T. (1963): Changes in tannins in ripening fruits. *Phytochemistry*, vol. 2, 371-383 pp.

Goll D.E., Thompson V.F., Li H., Wei W., Cong J.(2003): The calpain system. *Physiology Reviews*, vol. 83, 731–801 pp.

Gomboeva S. B., Shumaev K. B., Gessler, N. N., & Lankin, V. Z. (2001): The mechanism of oxidation of β -carotene and polyunsaturated fatty acids. *Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology*, vol. 377, 402–405 pp..

Gomes V. M., Mosqueda M.-I., Blanco-Labra A., Sales M. P., Fernandes K. V. S., Cordeiro R. A., et al. (1997): Vicilin storage proteins from *Vigna unguiculata* (legume) seeds inhibit fungal growth. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 45, 4110–4115 pp.

Gomes V. M., Okorokov L. A., Rose T. L., Fernandes K. V. S., & Xavier-Filho J. (1998): Legume vicilins (7S storage globulins) inhibit yeast growth and glucose stimulated acidification of the medium by yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1379, 207–216 pp.

Greiner R., Larsson-Alminger M., Carlsson N-G., Muzquiz M., Burbano C., Cuadrado C., Pedrosa M.M., Goyoaga C. (2002): Pathway of dephosphorylation of myo-inositol hexakisphosphate by phytases of legume seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, 6865–6870 pp.

Gulewitz P., Martínez-Villaluenga C., Frias J., Ciesiolka D., Gulewitz K., Vidal-Vaverde C.(2008): Effect of germination on the protein fraction composition of different lupin seeds. *Food chemistry*, vol. 107, 830-844 pp.

Gupta R.K., Haslam E. (1979): Vegetable tannins:structure and biosynthesis.In: Hulse J.H.(Ed.) Polyphenols in cereals and legumes. International Development Research Center. Ottawa, Canada, 15 pp.

Hamada J. S. (1996): Isolation and identification of the multiple forms of soybean phytases. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 73, 1996, 1143-1151 pp.

Hartl P.M., Tan-Wilson A.L., Wilson K.A. (1986): Proteolysis of Kunitz soybean trypsin inhibitor during germination. *Phyto*, vol. 25, 23-26 pp.

He F. , Huang F., Wilson K. A., Tan-Wilson A. (2007): Protein storage vacuole acidification as a control of storage proteinization in soybeans. *Journal of Experimental Botany*, vol. 58, 1059–1070 pp.

Hedley C.L. (2001): *Carbohydrates in Grain Legume Seeds. Improving nutritional quality and Agronomic Characteristic*. CABI Publishing Oxon UK, 322 pp.

Hegeman C. E., Elizabeth A., Grabau E. A. (2001): A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings. *Plant Physiology*, vol. 126, 1598-1608 pp.

Herman E. M., Shannon L. M. (1985): Accumulation and subcellular localization of α -galactosidase-hemagglutinin in developing soybean cotyledons. *Plant Physiology*, vol. 77, 886-890 pp.

Herman, E. M. & Shannon, L. M. (1985): Accumulation and subcellular localization of α -galactosidase-hemagglutinin in developing soybean cotyledons. *Plant Physiology*, vol. 77, 886-890 pp.

Herna'ndez-Nistal J., Mart'ın I., Teresa Jim'enez T., Dopico B., Labrador E. (2009): Two cell wall Kunitz trypsin inhibitors in chickpea during seed germination and seedling growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 47, 181-187 pp.

Hildebrand D.F., Hymowitz T. (1983): Lipoxygenase activities in developing and germinating soybean seeds with and without lipoxygenase-1. *Botanical Gazette*, vol. 144, 212-216 pp.

Horáková V., Dvořáčková O., Mezlík T. (2009): *Seznam doporučených odrůd: Pšenice ozimá, pšenice jarní, ječmen ozimý, tritikale ozimé, oves setý pluchatý, hrách polní*. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno, 216 pp.

Hosnedl V., Vašák J., Mečiar L. et al. (1998): Rostlinná výroba –II. Luskoviny, olejniny. 165 pp.

Chang K.C., Harrold R.L. (1988): Changes in selected biochemical components, in vitro protein digestibility and amino acids in two bean cultivars during germination. *Journal of Food Science*, vol. 53, 783-787 pp.

Chung R.P.-T., Neumann G.M., & Polya G.M. (1997): Purification and characterization of basic proteins with in vitro antifungal activity from seeds of cotton, *Gossypium hirsutum*. *Plant Science*, vol. 127, 1–16 pp.

Ibrahim S. S., Habiba R. A., Shatta A. A., Embaby H. E. (2002): Effect of soaking, germination, cooking and fermentation on antinutritional factors in cowpeas. *Nahrung/Food*, vol. 46, 92-95 pp.

Ilgoutz S.C., Knittel N., Lin J.M., Sterle S., & Gayler K.R. (1997): Transcription of genes for conglutin gamma and a leginsulin-like protein in narrow-leafed lupin. *Plant Molecular Biology*, vol. 34, 613-627 pp.

Ishii S. (1994): Legumain: asparaginyl endopeptidase. In: Barrett A.J. (Ed.), *Methods in Enzymology*, vol. 244, Academic Press, Orlando, (1994), 604-615 pp.

Jaffe W.G., Moreno R., Wallis V.(1973): Amylase inhibitors in legume seeds. *Nutrition Reports International*, vol. 7, 169-174 pp.

Jime' nez T., Marti'n I., Herna' ndez-Nistal J., Labrador E., Dopico B. (2008): The accumulation of a Kunitz trypsin inhibitor from chickpea (TPI-2) located in cell walls is increased in wounded leaves and elongating epicotyls. *Physiologia Plantarum*, vol. 132, 306–317 pp.

Jood S., Chauhan B.M., Kapoor AC. (1988): Contents and digestibility of carbohydrates of chickpea and black gram as affected by domestic processing and cooking. *Food Chemistry*, vol. 30, 113–127 pp.

Kadlec P., Dostálová J., Houska M., Strohalm J., Bubník J. (2006): Evaluation of α -galactosides decrease during storage of germinated pea seeds treated by high pressure. *Journal of food Engineering*, vol. 77, 364-367 pp.

Kakade M.D., Rackis J.J., McGhee J.E., Puski G. (1974): Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: A collaborative analysis of improved procedure. *Cereal Chemistry*, vol. 51, 376-382 pp.

Kakade M.L., Simon N., Liener I.E. (1969): An evaluation of natural versus synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. *Cereal Chemistry*, vol. 46, 518-526 pp.

Kamchan A., Puwastien P., Sirichakwal P.P., Kongachuichai K. (2004): *in Vitro* calcium bioavailability of vegetables, legumes and seed. *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 17, 311-320 pp.

Kataria A., Chauhan B.M. et al. (1989): Antinutrients and protein digestibility of mung bean as affected by domestic processing and cooking. *Food Chemistry*, vol. 32, 9-17 pp.

Kataria A., Chauhan B.M. Punia D. (1992): Digestibility of proteins and starch (*in vitro*) of amphidiploids (black gram \times mung bean) as affected by domestic processing and cooking. *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 42, 117-125 pp.

Kato T., Ohta H., Tanaka K., Shibata D. (1991): Appearance of New Lipoxygenases in Soybean Cotyledons after Germination and Evidence for Expression of a Major New Lipoxygenase Gene. *Plant physiology*, vol. 98, 324-330 pp.

Kayastha A. M. & Srivastava, P. K. (2001): Pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) urease immobilized on glutaraldehyde-activated chitosan beads and its analytical applications. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, vol. 96, 41-53 pp.

Kim S., Hong Y., An C.S., Lee K. (2001): Expression characteristic of serin protease inhibitors II under variable environmental stresses in hot pepper (*Capsicum annuum* L.) Plant Science, vol. 161, 27–33 pp.

Kishore D., Kayastha A.M. (2012): A β -galactosidase from chick pea (*Cicer arietinum*) seeds: Its purification, biochemical properties and industrial applications. Food Chemistry, vol. 134, 1113 – 1122 pp.

Konopska-Waliszkiewitz L. (1988): Protein composition of cotyledons and aulerione grain in *Lupinus luteus* L. seeds during germination. Biologia Plantarum., vol. 30, 199-203 pp.

Kotake T., Dina S., Konishi T., Kaneko S., Igarashi K., Samejima M., Watanabe Y., Kimura K., Tsumuraya Y. (2005): Molecular cloning of a β -galactosidase from radish that specifically hydrolyzes β -(1->3)- and β -(1->6)-galactosyl residues of arabinogalactan protein. Journal of Plant Physiology, vol. 138, 1563–1576 pp.

Kotaru M., Kimoto F., Yoshikawa H., Ikeuchi I. (1987): Changes of α -amylase inhibitor activity in kidney beans during heating and germination . Journal of Japan Society of Nutrition and Food Science., vol. 40, 240-243 pp.

Kumar V., Rani A., Pandey V., Chauhan G.S. (2006): Changes in lipoxygenase isozymes and trypsin inhibitor activity in soybean during germination at different temperatures. Food Chemistry, vol. 99, 563-568 pp.

Kumari, A., Kayastha, A.M. (2011): Immobilization of soybean (*Glycine max*) α -amylase onto Chitosan and Amberlite MB-150 beads: Optimization and characterization. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, vol. 69, 8-14 pp.

Kumari A., Singh, V. K., Fitter J., Polen, T. & Kayastha A. M. (2010): α -Amylase from germinating soybean (*Glycine max*) seeds - Purification, characterization and

sequential similarity of conserved and catalytic amino acid residues. *Phytochemistry*, vol. 71, 1657-1666 pp.

Lahola J., Grohmann L., Hofírek P., Hochman M., Horák A., Chalupa A., Chalupová L., Kolář I., Kolařík J., Ondřej M., Pavelková A., Rubeš L., Stryk J., Střída J., Šmirous P. (1990): *Luskoviny: pěstování a využití*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 224 pp.

Lajolo F.M., Genovese M.I. (2002): Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. *Journal of Agriculture of Food Chemistry*, vol. 50, 6592–6598 pp.

Lankisch M., Layer P., Rizza R.A., Di Magno E.P. (1998): Acute postprandial gastrointestinal and metabolic effects of wheat amylase inhibitor (WAI) in normal, obese, and diabetic humans. *Pancreas*, vol. 17, 176-181 pp.

Lasekan O.O. (1996): Effect of germination on α -amylase activities and rheological properties of sorghum (*Sorghum bicolor*) and acha (*Digiteria exilis*) grain. *Journal of Food Technology*, vol. 33, 329-331 pp.

Lei D.F., Feng Y., Jiang D.Z. (2004): Characterization of polyphenol oxidases from plants. *Progress in Natural Sciences*, vol. 14, 553-561 pp.

Lis H., Sharon N. (1986): Lectin as Molecules and as Tools. *Annual Review of Biochemistry*, vol. 55, 35-67 pp.

Mandal S., Mandal R. K. (2000): Seed storage proteins and approaches for improvement of their nutritional quality by genetic engineering. *Current Science*, vol. 79, 576–589 pp.

Mangan J.L. (1988): Nutritional effects of tannins in animal feeds. *Nutrition Research Reviews.*, vol. 1, 209-231 pp.

Magni C., 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. *Phytochemistry*, vol. 68, 997-1007 pp.

Maiti I.B., Majumber A.L., Biswas B.B. (1974): Purification and mode of action of phytase from *Phaseolus aureus*. *Phytochemistry*, vol. 13, 1047–1051 pp.

Marquardt R.R. (1989): Dietary effects of tannins, vicine and convicine. In: Huisman J, Van Der Poel A.F.B., Liener I.E.(Eds.) Recent advances of research in antinutritional factors in legume seed. Pudoc. Wageningen, 141-155 pp.

Marquardt R.R., Ward T.T., Campbell L.D., Cransfield P.E. (1977): Purification and characterization of a growth inhibitor in faba beans (*Vicia faba* L. var minor). *Journal of Nutrition*, vol. 107, 1313-1324 pp.

Martínez-Villaluenga C., Gulewicz P., Frias J., Gulewicz K., Vidal-Valverde C. (2008): Assessment of protein fractions of three cultivars of *Pisum sativum* L.: effect of germination. *European Food Research and Technology*, vol. 226, 1465-1478 pp.

Marshall J.J., Lauda C.M. (1975): Purification and properties of phaseolamin , an inhibitor of α -amylase from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Biological Chemistry*, vol. 250, 8030-8037 pp.

Mathers J.C. (2002): Pulses and carcinogenesis: potential for the prevention of colon, breast and other cancers. *British Journal of Nutrition*, vol. 88, 273-279 pp.

Mayer A. M. (2006): Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? *Phytochemistry*, vol. 67, 2318 – 2331 pp.

Messina M., Messina V. (2010): The role of Soy in vegetarians diets. *Nutrients*, vol. 2, 855-888 pp.

Mezlik T. (2013): Seznam doporučených odrůd sóje 2013. Ústřední zkušební ústav zemědělský, Brno.

Mezlik T., Meřinská S. (2006): Výsledky zkoušek užitné hodnoty ze sklizně 2006: Lupina úzkolistá. Ústřední a zkušební ústav zemědělský. Brno, 14 pp.

Mikkonen A. (1986): Activities of some peptidases and proteinases in germinating kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum*, vol. 68, 282-286 pp.

Mikkonen A., Bergie R., Grant G., Puzstai A. (1986): Intracellular localisation of some peptidases and -mannopeptidases in cotyledons of resting kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum*, vol. 68, 75-80 pp.

Mikkonen A., Mikola J. (1986): Separation and partial characterization of two alkaline peptidases from cotyledons of resting kidney beans, *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum*, vol. 68, 81-85 pp.

Mikola J., Proteinases, peptidases and inhibitors of endogenous proteinases in germinating seeds. In : Daussant J., Mosse J., Vaughan J. (Eds) *Seed proteins*, Acad. Press., London (1983), 35-52 pp.

Min W., Jones D.H. (1994): In vitro splicing of concanavalin A is catalyzed by asparaginyl endopeptidase. *Structural Biology*, I , 502-504 pp.

Mlichova, Z., & Rosenberg, M. (2006): Current trends of β -galactosidase application in food technology. *Journal of Food and Nutrition Research*, vol. 45, 47-54 pp.

Mosolov V.V., Valueva T.A., Rastitel'nye belkovye inhibitory proteoliticheskikh fermentov In: Kretovich, V.L.,(Ed.), *Plant Protein Inhibitors of Proteolytic Enzymes*. Moscow: Bakh Institute of Biochemistry RAN, 1993.

Muntz K. (1996): Proteases and proteolytic cleavage of storage proteins in developing and germinating dicotyledonous seeds. *Journal of Experimental Botany*, vol. 47, 605-622 pp.

Müntz K. (1989): Intracellular protein sorting and the formation of protein reserves in storage tissue cells of plant seeds. *Biochemie und Physiologie der Pflazen*, vol. 185, 315-335 pp.

Muntz K. (1996): Proteases and proteolytic cleavage of storage proteins in developing and germinating dicotyledonous seeds. *Journal of Experimental Botany*, vol. 47, 605–22. pp.

Müntz K. (1998): Deposition of storage proteins. *Plant Molecular Biology*, vol. 38, 77-99 pp.

Muntz K. (2007): Protein dynamics and proteolysis in plant vacuoles. *Journal of Experimental Botany*, vol. 58, 2391–407 pp.

Müntz K., Bassüner R., Lichtenfeld C., Scholz G., Weber E. (1985): Proteolytic cleavage of storage proteins during embryogenesis and germination of legume seeds. *Physiologie Végétale*, vol. 23, 75-94 pp.

Muntz, K., Belozersky, M. A., Dunaevsky, Y. E., Schlereth, A., & Tiedemann, J. (2001). Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *Journal of Experimental Botany*, vol. 52, 1741–1752 pp.

Muzquiz M., Varela A., Burbano C., Cuadrado C., Guillamo'n E., Pedrosa M. M. (2012): Bioactive compounds in legumes: pronutritive and antinutritive actions. Implications for nutrition and health. *Phytochem Reviews.*, vol. 11, 227-244 pp.

Mu'zquiz M., Welham T., Altares P., Goyoaga C., Cuadrado C., C. Romero V., Gullamo'n E., Domoney C. (2004): The effect of germination on seed trypsin inhibitors in *Vicia faba* and *Cicer arietinum*. *Journal of Science of Food and Agriculture*, vol. 84, 556–560 pp.

Nielsen N. C., Dickinson C. D., Cho T. J., Thanh V. H., Scallon, B. J., Fischer R. L., et al. (1989): Characterization of the glycinin gene family in soybean. *Plant Cell*, vol. 1, 313-328 pp.

Nielsen S.S., Liener I.E. (1988): Effect of germination on trypsin inhibitor and hemagglutinating activities in (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Food Science*, vol. 53, 298-301 pp.

Nichtl A., Buchner J., Jaenicke R., Rudolph R., & Scheibel, T. (1998): Folding and association of β -Galactosidase. *Journal of Molecular Biology*, vol. 282, 1083–1091 pp.

Nunes M., Raymundo A., Sousa I. (2006): *European Food Research and Technology*, vol. 222, 622-628 pp.

Oh C. J., Lee H., Kim H. B., An C. S. (2004): Isolation and characterization of a root nodule-specific cysteine proteinase cDNA from soybean. *Journal of Plant Biology* , vol. 47, 216-220 pp.

Okamoto T., Miura-Izu Y., Ishi S., Minakinawa T. (1996): Asparaginyl endopeptidase in developing and germinating legume seeds: immunological detection and quantitation. *Plant Science*, vol. 115, 49-57 pp.

Osborne T.B. (1924): *The vegetable proteins*. London: Longmans, Green and CO

Osborne, T. B., Campbell G. F. (1898): Proteins of the pea. *Journal of the American Chemical Society*, vol. 20, 348–362 pp.

Paulíčková I., Dostálová J., Culková J., Bervidová M., Kadlec P., Houška M., Strohalm J, Průchová J. (2005): Vliv vysokého tlaku na sensorické vlastnosti naklíčených semen čočky. In: Sborník příspěvků „XXXVI. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin“, Skalský Dvůr, 120-125 pp.

Pernollet J.C. (1978): Protein bodies of seeds: ultrastructure, biochemistry, biosynthesis and degradation. *Phytochemistry*, vol. 17, 1973-1980 pp.

Persson H., Turk M., Nyman M., Sandberg A-S. (1998): Binding of Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} to inosol tri-, tetra-, penta- and hexaphosphates *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 46, 3194 – 3200 pp.

Peterman T.K., Siedow J.N. (1985): Behavior of lipoxygenase during establishment, senescence, and rejuvenation of soybean cotyledons. *Plant Physiology*, vol. 78, 690-695 pp.

Petrova T., Marinova M., Tchobanov B. (2010): Dynamics of some hydrolytic enzymes during the sprouts production from lentil seeds (*Lens culinaris*). *Biotechnology & Biotechnological Equipment.*, vol. 24, 2102-2107 pp.

Poerio E., Carranzo L., Garzillo A.M., Buonocore V. (1989): A trypsin inhibitor from the water-soluble fraction of wheat kernel. *Phytochemistry*, vol. 28, 1307–1311 pp.

Pokorný J., Dostálová J. (1996): Luštěniny-jejich složení a výživová hodnota, vol. 51, 133-135 pp.

Porta, H., & Rocha-Sosa, M. (2002). Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiology*, vol. 130, 15–21 pp.

Potměšilová J. (2012): Situační a výhledová zpráva. LUSKOVINY, Ministerstvo zemědělství, 43 pp.

Powers J.H., Whitaker J.K. (1977): Purification and some physical and chemical properties of red kidney (*Phaseolus vulgaris*) α -amylase inhibitor. Journal of Food Biochemistry, vol. 1, 217-238 pp.

Rackis, J. J., Hinig, D. H., Sessa, D. J., & Steggerd, F. R. (1979). Flavorproblems of vegetable food protein. Journal of American Oil Chemists Society, vol. 56, 262–271 pp.

Rahma, F. H., El-Bedawey, A. A., El-Adawy, T. A., Goma, M. A., Lebensm. (1987): Wiss. Technol., vol. 20, 271-276 pp.

Ramakrishna V., Rajasekhar S., Reddy L. S. (2010): Identification and Purification of Metalloprotease from Dry Grass Pea (*Lathyrus sativus* L.) Seeds. Applied Biochemistry and Biotechnology, vol. 160, 63–71pp.

Rambousková J., Kavínová M.: Glykemický index, vol. 51 , 96-98 pp.

Ramiyati, Anthony P. J., Vijay J. (2012): Effect of Germination on the Nutritional and Protein Profile of Australian Sweet Lupin (*Lupinus Angustifolius* L.). Food and Nutrition Sciences, vol. 3, 621-626 pp.

Rao P.U., Deosthale Y.G. (1987): Polyphenoloxidase activity in germinated seeds. Journal of Food Science., vol. 52, 1549-1551 pp.

Rao P.U., Deosthale Y.G. (1982): Tannin content of pulses : varietal differences and effects of germination and cooking. Journal of the Science of Food and Agriculture, vol. 33, 1013-1551 pp.

Reddy N.R., Pierson M.D., Sathe S.K., Salunkhe D.K. (1985): Dry bean tannins: a review of nutritional implications. Journal of the American Oil Chemists Society 62, vol. 3, 541–549 pp.

Restani P., Duranti M., Cerletti P., Simoneti P. (1981): Subunit composition of the seed globulins of *Lupinus albus*. *Phytochemistry*, vol. 20, 2077-2083 pp.

Robinson, D. S., Wu, Z., Domoney, C., & Casey, R. (1995). Lipoxygenases and a quality of foods. *Food Chemistry*, vol. 54, 33–43 pp.

Ryan C.A. (1990): Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, vol. 28 425–449 pp.

Saarikoski P., Clapham D., Von Arnold S. (1996): A wound-inducible gene from *Salix viminalis* coding for a trypsin inhibitor. *Plant Molecular Biology* , vol. 31, 465–478 pp.

Sahbaz R., Lieber R., Aniszewski T. (2009): Polyphenoloxidase (PPO, catecholase) activity during germination and early seedling growth of Cicer milkvetch (*Astragalus cicer* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, vol. 82, 163–169 pp.

Sales M. P., Gerhardt, I. R., Grossi-de-Sa, M. F., & Xavier-Filho, J.(2000): Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? *Plant Physiology*, vol. 124, 515–522 pp

Sales, M. P., Gomes, V. M., Fernandes, K. V. S., & Xavier-Filho, J. (1996): Chitin binding proteins from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 29, 319–326 pp.

Sales, M. P., Pimenta, P. P., Paes, N. S., Grossi-de-Sa, M. F., & Xavier-Filho, J. (2001): Vicilins (7 S storage globulins) of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds bind to chitinous structures of the midgut of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) larvae. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 34, 27–34 pp.

Salmanowich B. P., & Weder J.K.P (1997): Primary structure of 2S albumin from seeds of *Lupinus albus*. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung*, vol. 204, 129-135 pp.

Sathe S.K., Deshpande S.S., Reddy N.D., Goll D.E., Salunke D.K. (1983): Effects of germination on proteins, raffinose oligosaccharides, and antinutritional factors in the great northern beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Science*, vol.48, 1796-1800 pp.

Satya S., Kaushik G., Naik S. N. (2010): Processing of food legumes: a boon to human nutrition, *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, vol. 3, 183-195 pp.

Savelkoul F.H.M.G., Boer H., Tamminga S., Schepers A.J., Elburg L. (1992): In vitro enzymatic hydrolysis of protein and protein pattern change of soya and faba beans during germination. *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 42, 275-284 pp.

Savelkoul F. H. M. G., Van Der Poel A. F. B., Tamminga S. (1992): The presence and inactivation of trypsin inhibitors, tannins, lectins and amylase inhibitors in legume seeds during germination. A review, *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 42, 71-85 pp.

Sgarbieri V.C., Whitaker J.R. (1982): Physical, chemical, and nutritional properties of common bean (*Phaseolus*) proteins. *Advances in Food Research*, vol. 28, 93-166 pp.

Shewry P. R., Napier J. A., Tatham A.S. (1995): Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell*, vol. 7, 945-956 pp.

Shibata D., Kato T., Tanaka K. (1991): Nucleotide sequences of a soybean lipoxygenase gene and the short intergenic region between an upstream lipoxygenase gene. *Plant Molecular Biology*, vol. 16, 353-359 pp.

Shibata D., Steczko J., Dixon J.E., Andrews P.C., Hermodson M., Axelrod B. (1988): Primary structure of soybean lipoxygenase L-2. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 263, 6816-6821 pp.

Shibata D., Steczko J., Dixon J.E., Hermodson M., Yazdanparast R., Axelrod B. (1987): Primary structure of soybean lipoxygenase-I. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 262, 10080-10085 pp.

Shutov A.D., Vaintraub I. A. (1987): Degradation of storage proteins in germinating seeds. *Phytochemistry*, vol. 26, 1557–1566. pp.

Schaller, A. (2004): A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta*, vol. 220, 183–197 pp.

Schlereth, A., Standhardt, D., Mock, H. P., & Muntz, K. (2001): Stored cysteine proteinases start globulin mobilization in protein bodies of embryonic axes and cotyledons during vetch (*Vicia sativa* L.) seed germination. *Planta*, vol. 212, 718–727 pp.

Sin S.-F., Yeung E.C., Chye M.L. (2006): Downregulation of *Solanum americanum* genes encoding proteinase inhibitor II causes defective seed development. *Plant Journal*, vol. 46, 58–70 pp.

Stotz H.U., Kroymann J., Mitchell O. (1999): Plant–insect interactions, *Current Opinion of Plant Biology*, vol. 2, 268–272 pp.

Subbulakshmi G., Ganesh Kumar K., Venkataraman L.V. (1976): Effect of germination on the carbohydrates, proteins, trypsin inhibitor, amylase inhibitor and hemagglutinin in horsegram and mothbean. *Nutrition Reports International*, vol. 13, 19-31 pp.

Szymanowska U., Jakubczyk A., Baraniak B., Kur A. (2009): Characterisation of lipoxigenase from pea seeds (*Pisum sativum* var. Telephone L.). Food Chemistry, vol.116, 906-910 pp.

Tamayo M.C., Rufat M., Bravo J.M., San Segundo B.(2000):Accumulation of a maize proteinase inhibitor in response to wounding and insect feeding, and characterization of its activity toward digestive proteinase of *Spodoptera littoralis* larvae. Planta, vol. 211, 62–71 pp.

Tan-Wilson A. L., Rightmire B.R., Wilson K.A.(1982): Different rates of metabolism of soybean proteinase inhibitors during germination. Plant Physiology, vol. 70, 493-497 pp.

Tiedemann, J., Newbohn, B., & Muntz, K. (2000): Different function of vicilin and legumin are reflected in the histopattern of globulin mobilization during germination of vetch (*Vicia sativa* L.). Planta, vol.211, 1–12 pp.

Tripathi, P.; Dwevedi, A. & Kayastha, A. M. (2004). Purification and partial characterization of α -amylase from soybean (*Glycine max*). Oriental Pharmacy and Experimental Medicine, vol. 4, 227-234 pp..

Tsukamoto I., Miyoshi M., Hamaguchi Y.(1983): Purification and characterization of three trypsin inhibitors from beans *Phaseolus vulgaris* „Kintoki“. Cer. Chem., vol. 60, 281-286 pp.

Uriyo G.M. (2001): Changes in enzyme activities during germination of cowpeas (*Vigna unguiculata*, cv. California blackeye). Food chemistry, vol. 73, 7-10 pp.

Van der Hoorn, R. A. (2008): Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. Annual Review of Plant Biology, vol. 59, 191–223 pp.

Velišek J., Hajšlová J. (2009): Chemie potravin 1. OSSIS, Havlíčkův Brod, 602 pp.

Velíšek J., Hajšlová J. (2009): Chemie potravin 2. OSSIS, Tábor, 623 pp.

Vidal-Valverde C., Frias J., Prodanov M., Tabera J., Ruiz R., Bacon J. (1993): Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, vol. 197, 449-452 pp.

Wang C., Croft K.P.C., Järlfors U., Hildebrand D.F. (1999): Subcellular Localization Studies Indicate That Lipoxygenases 1 to 6 Are not involved In Lipid Mobilisation during soybean Mobilisation.. Plant Physiology, vol. 120, 227-335 pp.

Weber E., & Neumann D.(1980): Protein bodies, storage organelles in plant seeds. Biochemie und Physiologie der Pflazen, vol. 175, 279-306 pp.

Welham T., Domoney C. (2000) : Temporal and spatial activity of a promoter from a pea enzyme inhibitor gene and its exploitation for seed quality improvement. Plant Science, vol. 159, 289–299 pp.

Whitaker J.R. (1988): α -Amylase inhibitors of higher plants and microorganisms. In: Food proteins. Kinsella JE, Soule WG (eds) Proceedings of the protein. Co-products Symposium, American Oil Chemists' Society, Champaign II, USA, 354–380 pp.

Wilson K.A., Papastoitis G., Hartl P., Tan-Wilson A.L. (1988): Survey of the proteolytic activities degrading the Kunitz trypsin inhibitor and glycinin in germinating soybeans (*Glycine max*). Plant physiology, vol. 88, 355-360 pp.

Wright D. J. (1988): The seed globulins. In: B. J. F. Hudson (Ed.) Developments in Food Proteins. London: Elsevier Applied Science

Yenofsky R.L., Fine M., Liu C. (1988): Isolation and characterization of a soybean (*Glycine max*) lipoxygenase-3 gene. Molecular and General Genetics, vol. 211, 215-222 pp.

Yoruk, R.; Marshall, M. R. (2003): Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. *Journal of Food Biochemistry*, vol. 27, 361-422 pp.

Youssef M. M., El-Aal M.H.A., Shekib L.A.E, Ziena H.M. (1987): Effects of dehulling, soaking and germination on chemical composition, mineral elements and protein patterns of faba beans (*Vicia faba* L.). *Food Chemistry*, vol. 23, 129-380 pp.

Zátopková M. (2004): Nestravitelné sacharidy a jejich změny během technologického zpracování luštěnin. *Disertační práce VŠCHT Praha*, 147 pp.

Zavala J. A., Patankar A.G., Gase K., Hui D., Baldwin I.T. (2004): Manipulation of endogenous trypsin proteinase inhibitor production in *Nicotiana attenuata* demonstrates their function as antiherbivore defenses. *Plant Physiology*, vol. 134, 1181–1190 pp.

Zhang H., Xie X., Xu Y., Wu N. (2004) : Isolation and functional assessment of a tomato proteinase inhibitor II gene. *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 42, 437– 444 pp.

Internetové zdroje:

Anonym 1:

<http://nou.ukzuz.cz/ido/index.html?id=F&lang=cz&fulltext=bob+obecn%C3%BD&submit=Vyhledat> [cit. 15. 7. 2013]

Anonym 2:

<http://nou.ukzuz.cz/ido/index.html?id=F&lang=cz&fulltext=Hr%C3%A1ch+set%C3%BD-poln%C3%AD&fulltext=Hr%C3%A1ch+set%C3%BD&submit=Vyhledat> [cit. 15. 7. 2013]

Anonym 3:

<http://nou.ukzuz.cz/ido/index.html?id=F&lang=cz&fulltext=Soja+lu%C5%A1inat%C3%A1&fulltext=Bohemians&submit=Vyhledat> [cit. 15. 7. 2013]

9. Přílohy

Příloha č.1: Hodnocení statistické průkaznosti vlivu jednotlivých faktorů na abundanci proteinů (relativní zastoupení proteinů) na začátku klíčení semen.

ANOVA					
	Suma čtverců odchylek	Stupeň volnosti	Průměrné číslo	F	P
Intercept	26746,73	1	26746,73	65758,491	0,000000
Druh	0,01	3	0,00	0,001	0,999964
Interval molekulové hmotnosti	5389,08	2	2694,54	680,869	0,000001
Druh*interval molekulové hmotnosti	864,27	6	144,05	36,398	0,000001
Error	47,49	12	3,96		

Abundance proteinů (relativní zastoupení proteinů) na začátku klíčení semen luskovin byla ovlivněna intervalem molekulové hmotnosti, vzájemnou interakcí druhu a intervalu molekulové hmotnosti. Abundance proteinů nebyla ovlivněna druhem.

Příloha č.2: Porovnání abundancí (relativního zastoupení proteinů) podle oblastí molekulových hmotností a druhu luskoviny na začátku klíčení semen.

LSD TEST			
Luskovina	Oblasti	Abundance	Porovnání
Lupina úzkolistá	Nad 60 kDa	4,7	a
Hrách setý	Nad 60 kDa	10,3	b
Bob obecný	Nad 60 kDa	14,8	c
Sója luštinatá	Nad 60 kDa	21,25	d
Sója luštinatá	Do 20 kDa	28,7	e
Bob obecný	Do 20 kDa	35,15	f
Hrách setý	20-60 kDa	42,8	g
Lupina úzkolistá	Do 20 kDa	46,85	gh
Hrách setý	Do 20 kDa	47,15	h
Lupina úzkolistá	20-60 kDa	48,55	h
Bob obecný	20-60 kDa	50,15	h
Sója luštinatá	20-60 kDa	50,2	h

Rozdílná písmena vyjadřují statistickou odlišnost. Nejvíce statisticky odlišné v relativním zastoupení proteinů na začátku klíčení semen luskovin byly oblasti nad 60 kDa u lupiny, hrachu, sóji, bobu a oblasti do 20 kDa u sóji a bobu.

Příloha č.3: Hodnocení statistické závislosti vlivu druhu a intervalu molekulové hmotnosti na abundanci proteinů v polovině klíčení semen.

ANOVA					
	Suma čtverců	Stupeň volnosti	Průměrné číslo	F	P
Intercept	27249,82	1	27249,82	726,8153	0,000000
Druh	35,40	3	11,80	0,3148	0,814465
Interval molekulové hmotnosti	7925,05	2	3962,53	105,6897	0,000000
Druh*interval molekulové hmotnosti	1405,67	6	234,28	6,2487	0,003575
Error	449,91	12	37,49		

Na základě hladiny významnosti 0,05 byla abundance proteinů v polovině klíčení semen ovlivněna intervalem molekulové hmotnosti a vzájemnou interakcí druhu a intervalu molekulové hmotnosti. Abundance proteinů nebyla ovlivněna druhem.

Příloha č.4: Porovnání abundancí proteinů podle oblastí u jednotlivých semen luskovin v polovině klíčení.

LSD			
Luskovina	Oblasti	Abundance	Porovnání
Lupina úzkolistá	Nad 60 kDa	0	a
Hrách setý	Nad 60 kDa	3,9	a
Bob obecný	Nad 60 kDa	12,7	b
Lupina úzkolistá	20-60 kDa	16,7	b
Sója luštinatá	Nad 60 kDa	16,8	b
Bob obecný	20- 60 kDa	40,2	c
Sója luštinatá	Do 20 kDa	40,65	c
Hrách setý	20-60 kDa	41,15	c
Sója luštinatá	20-60 kDa	42,7	cd
Bob obecný	Do 20 kDa	47,15	d
Hrách setý	Do 20 kDa	55,05	e
Lupina úzkolistá	Do 20 kDa	83,3	f

Nejvíce statisticky odlišné v abundanci proteinů byly oblasti do 20 kDa u semen hrachu a lupiny v polovině klíčení semen luskovin.

Příloha č. 5: Hodnocení vlivu druhu a intervalu molekulové hmotnosti proteinů na abundanci proteinů u spekter proteinů na konci klíčení semen luskovin.

ANOVA					
	Suma čtverců	Stupeň volnosti	Průměrné číslo	F	P
Intercept	26706,68	1	26706,68	5154,072	0,000000
Druh	0,01	3	0,00	0,01	0,999982
Interval molekulové hmotnosti	9328,29	2	4664,15	900,125	0,000000
Druh*interval molekulové hmotnosti	3395,46	6	565,91	109,214	0,000000
Error	62,18	12	5,18		

Na základě hladiny významnosti 0,05 byla abundance proteinů na konci klíčení semen ovlivněná intervalem molekulové hmotnosti a vzájemnou interakcí intervalu molekulové hmotnosti a druhu. Abundance nebyla ovlivněna druhem.

Příloha č. 6 :Vliv jednotlivých faktorů na abundanci proteinů (relativní zastoupení proteinů) během klíčení semen luskovin.

ANOVA					
	Suma čtverců	Stupně volnosti	Průměrné číslo	F	P
Intercept	80701,53	1	80701,53	5191,896	0,000000
Druh	12,21	3	4,07	0,262	0,852428
Doba klíčení	1,7	3	0,85	0,055	0,946938
Interval molekulové hmotnosti	20691,09	2	10345,55	665,576	0,000000
Druh*doba klíčení	23,21	6	3,87	0,247	0,956590
Druh*interval molekulové hmotnosti	4514,83	6	752,47	48,410	0,000000
Doba klíčení* interval molekulové hmotnosti	1951,33	4	487,83	31,385	0,000000
Druh*doba klíčení* interval molekulové hmotnosti	1150,57	12	95,98	6,168	0,000010
Error	559,57	36	15,54		

Na základě hladiny významnosti 0,05 byla abundance proteinů ovlivněná intervalem molekulové hmotnosti, vzájemnou interakcí druhu a intervalu molekulové hmotnosti, vzájemnou interakcí doby klíčení semen a intervalu molekulové hmotnosti, vzájemnou interakcí druhu, vzájemnými interakcemi doby klíčení, intervalu molekulové hmotnosti a intervalu molekulové hmotnosti. Abundance proteinů nebyla ovlivněna druhem, dobou klíčení a vzájemnou interakcí doby klíčení a druhu.