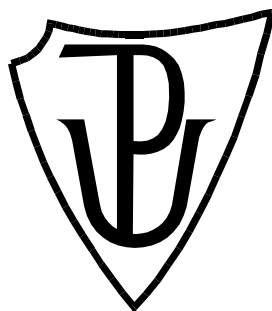


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Antinutriční faktory v hrachu setém

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Radek Dostál
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Ondřej Vrobel
Rok:	2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne *podpis bakaláře*

Poděkování

Rád bych poděkoval Mgr. Ondřeji Vrobelovi za odborné rady, cenné připomínky a trpělivost při vedení mé bakalářské práce. Dále bych rád poděkoval doc. RNDr. Petru Tarkowskému, Ph.D. za cenné připomínky a odborné rady. Poděkování patří také Ing. Miroslavu Hýblovi, Ph.D. za poskytnutý biologický materiál a instituci VÚRV, v.v.i. za poskytnutý prostor k práci.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Radek Dostál
Název práce	Antinutriční faktory v hrachu setém
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení genetických zdrojů zelenin, léčivých rostlin a speciálních plodin; Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.; pracoviště Olomouc
Vedoucí práce	Mgr. Ondřej Vrobel
Rok obhajoby práce	2021

Abstrakt

Hrách patří mezi základní zemědělské plodiny pěstované především v Evropě, a to pro svůj vysoký obsah proteinů. V semenech hrachu se rovněž nachází i antinutriční faktory, látky, jimž je věnována teoretická část práce. Zahrnuty jsou informace o jejich typech, funkci v semenech a biologických účincích. Dále jsou uvedeny i metody stanovení těchto sloučenin. Experimentální část práce byla věnována osvojení si metody spektrofotometrického stanovení obsahu inhibitoru trypsinu. Zejména byl kladen důraz na optimalizaci metody s využitím spektrofotometrického readeru a také na celkovou minimalizaci experimentu. Zavedenou metodou byl posléze stanoven obsah inhibitoru trypsinu ve vybraných komerčně dostupných druzích luskovin a také v odrůdě sóji poskytnuté VÚRV. Právě zde byl zaznamenán nejvyšší obsah inhibitoru, v hrachu byl naopak jeho obsah nejnižší. Zároveň byla osvojena metoda kvantitativní analýzy kyseliny fytové. Ke stanovení byla využita nejprve kapilární elektroforéza, poté byla nahrazena spektrofotometrií. Vysoký obsah kyseliny fytové byl zaznamenán u druhů, v nichž byl vysoký i obsah inhibitoru trypsinu.

Klíčová slova	hrách setý, antinutriční faktory, inhibitor trypsinu
Počet stran	52
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Radek Dostál
Title	Antinutritional factors in pea
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Genetic Resources for Vegetables, Medicinal and Special Plants, Crop Research Institute, Olomouc
Supervisor	Mgr. Ondřej Vrobel
The year of presentation	2021

Abstract

Pea is one of the staple crops. This leguminous crop is predominantly cultivated in Europe. Its significance lies in the high protein content. It also contains special compounds called antinutritional factors. These compounds are the main topic of the theoretical part of this thesis. The theoretical part also provides information about types of antinutritional factors, their function in seeds, and also the biological effects. Furthermore, there are also listed the main methods for determining these compounds. The aim of the experimental part of this thesis was to optimize the method of spectrophotometric determination of trypsin inhibitor content. The optimization was done by minimizing the experiment and also by using a spectrophotometric reader for the determination. The optimized method was then used for the determination of the content of trypsin inhibitor in selected commercially available legume species and the soybean variety provided by VÚRV. The soybean variety contained the highest amount of trypsin inhibitor. On the other hand, the pea contained the lowest amount of trypsin inhibitor. Another aim of the experimental part was to develop the method for the quantitative determination of phytic acid. This was done by using capillary electrophoresis first, then the spectrophotometric determination was used instead. The samples with the high trypsin inhibitor content contained a high amount of phytic acid.

Keywords	pea, antinutritional factors, trypsin inhibitor
Number of pages	52
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1	Hrách setý	10
2.1.1	Chemie hrachu.....	10
2.1.2	Proteiny	12
2.1.3	Antinutriční faktory	12
2.1.3.1	Inhibitor trypsinu	13
2.1.3.2	Kyselina fytová.....	17
2.1.3.3	Lektiny	19
2.1.3.4	Oligosacharidy	20
2.1.3.5	Třísloviny.....	22
2.1.4	Ekologická funkce ANF	24
2.2	Stanovení ANF	25
2.2.1	Účel stanovení	25
2.2.2	Metody stanovení	26
2.2.2.1	Stanovení inhibitoru trypsinu	26
2.2.2.2	Stanovení kyseliny fytové.....	27
2.2.2.3	Stanovení oligosacharidů.....	29
2.2.2.4	Stanovení lektinů	29
2.2.2.5	Stanovení tříslovin.....	29
2.2.3	Alternativní metody stanovení ANF	30
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
3.1	Materiál a přístroje.....	31
3.1.1	Chemikálie.....	31
3.1.2	Biologický materiál	31
3.1.3	Instrumentace a pomůcky.....	32
3.1.4	Software.....	33
3.2	Příprava zásobních roztoků a biologického materiálu.....	33
3.2.1	Homogenizace biologických vzorků	33
3.2.2	Odtučnění semen sóji luštinaté.....	33
3.2.3	Chemikálie pro stanovení obsahu inhibitoru trypsinu.....	33
3.2.3.1	Tris pufr	33
3.2.3.2	Pracovní roztok HCl	33
3.2.3.3	Zásobní roztok trypsinu	34
3.2.3.4	Zásobní roztok enzymového substrátu	34
3.2.4	Chemikálie pro stanovení obsahu kyseliny fytové.....	34

3.2.4.1	Wadeovo činidlo	34
3.3	Metody	34
3.3.1	Stanovení obsahu inhibitoru trypsinu	34
3.3.2	Stanovení obsahu kyseliny fytové pomocí kapilární elektroforézy	35
3.3.2.1	Vlastní analýza standardů a vzorku	35
3.3.3	Spektrofotometrické stanovení obsahu kyseliny fytové	36
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	38
4.1	Stanovení obsahu inhibitoru trypsinu	38
4.1.1	Optimalizace metody	38
4.1.2	Porovnání obsahu inhibitoru trypsinu v různých druzích luskovin	41
4.2	Stanovení obsahu kyseliny fytové v luskovinách	42
4.2.1	Stanovení pomocí kapilární elektroforézy	42
4.2.2	Spektrofotometrické stanovení	43
5	ZÁVĚR	45
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	46
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	52

CÍLE PRÁCE

1. Vypracovat literární rešerši s klíčovými slovy: hrách setý, antinutriční faktory, inhibitor trypsinu.
2. Zavedení metody kvantitativní analýzy obsahu inhibitoru trypsinu.
3. Stanovení obsahu inhibitoru trypsinu ve zvolených biologických materiálech.
4. Zavedení metody kvantitativní analýzy kyseliny fytové.

1 ÚVOD

Hrách je významnou plodinou s vysokým obsahem proteinů, díky čemuž představuje již od starověku nedílnou součást lidské stravy spolu s dalšími luskovinami. Stejně tak je i důležitým krmivem hospodářských zvířat. Kromě proteinů jsou v semenech hrachu přítomny antinutriční faktory, jimž je věnována teoretická část práce. Tyto sloučeniny slouží ve zralých semenech jako zdroje makroprvků, ale také poskytují ochranu rostliny před predátory. Nutriční hodnota semen se taktéž odvíjí od obsahu antinutričních faktorů, a proto jsou předmětem zájmu mnoha výzkumů napříč vědními obory.

Experimentální část práce je věnována stanovení inhibitoru trypsinu, jedné z antinutričních látek, díky které lze sledovat kvalita dané luskoviny. Tato sloučenina svou vazbou na proteolytický enzym trypsin znemožňuje jeho navázání na substrát, čímž nedochází k jeho přeměně na barevný produkt. To se následně projevuje poklesem absorbance roztoku, přičemž pokles je přímo úměrný obsahu inhibitoru v daném roztoku. Množství inhibitoru lze stanovit pomocí spektrofotometrie, rychlé metody s nízkými provozními náklady. V této práci je k měření využita 96-jamková mikrotitrační deska, a také je kladen důraz na minimalizaci experimentálního měřítka – jeden z hlavních cílů optimalizace této metody.

Obsah inhibitoru trypsinu se napříč luskovinami mění. Druhým cílem experimentální části je proto porovnání obsahu této látky v různých komerčně dostupných druzích luskovin, aby se zjistilo, která má vyšší nutriční hodnotu, tedy nižší obsah inhibitoru. Pozornost je rovněž věnována stanovení obsahu inhibitoru trypsinu v odrůdě sóji poskytnuté genetickými zdroji VÚRV.

Dalším cílem experimentální části práce je zavedení metody kvantitativní analýzy obsahu kyseliny fytové v různých druzích luskovin. Kyselina fytová je silné chelatační činidlo, jehož přítomnost v živočišném organismu vede k deficitu minerálních látek. Pro účely analýzy jejího obsahu je použita kapilární elektroforéza s nepřímou detekcí kyseliny fytové, která neabsorbuje v UV oblasti záření. Druhou zvolenou metodou stanovení je spektrofotometrická analýza s využitím Wadeova činidla.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Hrách setý

Luskoviny jsou dvouděložné semenné rostliny, jež se řadí do čeledi bobovitých (*Fabaceae*). Čeleď čítá zhruba 800 rodů a přes 20 tisíc druhů (Lewis *et al.*, 2005). Často se zaměňují pojmy luskoviny za luštěniny, FAO (1994) definuje pojem „luštěniny“ jako skupinu luskovin, jejichž semena jsou sklízena v době úplné zralosti. Významným zástupcem luskovin je hrách setý (*Pisum sativum* L.).

Tato jednoděložná rostlina má původ na Středním Východě a ve Středomoří, kde byla domestikována už před více než deseti tisíci lety (Abbo *et al.*, 2010). Už tehdy sloužila spolu s dalšími luskovinami jako důležitý zdroj proteinů lidské stravy a tuto roli si zachovala dodnes. V 19. století se z hrachu mimo jiné stala experimentální rostlina pro Mendela (1866) při stanovení základů dědičnosti (Smýkal, 2014).

Lodyha dorůstá obvykle výšky 90-180 cm u druhů s normálními listy, existují však druhy, jejichž listy byly modifikovány na drobné úponky, a jejich výška činí pouhých 60-120 cm – jedná se o typ hrachu Afila, někdy označovaný jako pololistý typ. Květy hrachu vyrůstají ze článků ve stonku a dochází v nich k samoopylení. Poté uzrává lusk nesoucí čtyři až devět semen (McKay *et al.*, 2003). Semena hrachu mohou být kulatá nebo vráscitá (*P. sativum* ssp. *hortense*), rovněž existují varianty hrachu, jejichž semena mají žluté či oranžové jádro (*P. sativum* ssp. *arvense*). Ke krmným účelům se využívají zralá semena poddruhu *arvense* (hrách setý rolní), a to buď loupaná (komerčně dostupná v obchodních řetězcích), nebo i se slupkou (krmivo pro zvířata). Oproti tomu jsou semena poddruhu *hortense* (hrách setý zahradní) sklízena nezralá a v prodeji jsou jak čerstvá, tak i konzervovaná či zamrazovaná (Rubiales *et al.*, 2019). Existují také poddruhy hrachu, u kterých se mohou konzumovat i celé lusky (*P. sativum* var. *macrocarpum*).

Dnes tvoří hrách setý zhruba 60 % produkce luštěnin v Evropě (v roce 2018 se vypěstovalo 10 milionů tun luštěnin, z toho 6,2 milionů tun hrachu), pěstován je ve více než 90 zemích světa v čele s Čínou, Ruskem a Kanadou. V České republice činila produkce luštěnin za rok 2019 téměř 75 tisíc tun, z čehož přes 90 % činil hrách setý (FAOSTAT, 2019).

2.1.1 Chemie hrachu

Luskoviny spolu s obilovinami a okopaninami představují základ zemědělské produkce (Cordain, 1999). Z této skupiny plodin jsou luskoviny výjimečné především díky

vysokému obsahu proteinů, proto slouží jako hlavní zdroj bílkovin zejména v chudších oblastech světa (Boye *et al.*, 2010). Nutriční složení luskovin je druhově specifické (viz Tab. 1).

Hrách setý je pěstován především díky vysokému obsahu sacharidů a proteinů. Kromě toho jsou v jeho semenech přítomny bioaktivní složky jako inhibitory enzymů, lektiny, oligosacharidy nebo fenolové sloučeniny. Mnohé z nich mají převážně negativní vliv na trávicí soustavu (enzymové inhibitory inhibují trávicí enzymy, fytát tvoří cheláty s kovy), bývají proto označovány jako antinutriční faktory (Guillamon *et al.*, 2008). V mírných dávkách mohou mít tyto látky pozitivní vliv na organismus – například u zvířat způsobují zvýšení výkonu a zvýšení kvality jejich masa, proto se luskoviny využívají i ke zkrmování (Sońta a Rekiel, 2020).

Podstatnou nevýhodou pěstování luskovin je skutečnost, že pro svůj růst vyžadují mnohem větší přísun fosforu než jiné plodiny. Způsobeno je to přítomností kořenových hlízek, které fosfor využívají k tvorbě ATP. Ten následně slouží jako zdroj energie při symbiotické a energeticky náročné fixaci dusíku (Vance *et al.*, 2003). Nedostatek půdního fosforu může způsobit snížení produkce luskovin, což by byl problém v chudých a rozvojových oblastech, kde luskoviny díky svému vysokému obsahu proteinů tvoří důležitou součást jídelníčku (Amarakoon *et al.*, 2012).

Tab. 1 Nutriční složení různých druhů luskovin (hodnoty jsou uvedeny v %).

Luskovina	Proteiny	Lipidy	Minerály	Vláknina	Sacharidy
Cizrna (<i>Cicer arietinum</i>)	17,1	5,3	3,0	3,9	60,9
Sója (<i>Glycine max</i>)	43,2	19,5	19,5	3,7	20,9
Čočka (<i>Lens esculenta</i>)	25,1	0,7	2,1	0,7	59,0
Vigna (<i>Vigna catjang</i>)	24,1	1,0	3,2	3,8	54,5
Hrách setý (<i>Pisum sativum</i>)	19,7	1,1	2,2	4,5	56,5
Kajan indický (<i>Cajanus cajan</i>)	22,3	1,7	3,5	1,5	57,6
Fazole červená (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	22,9	1,3	3,2	4,8	60,6

Převzato z Kamboj *et al.*, 2018

2.1.2 Proteiny

Jak již bylo zmíněno výše, z celkového složení hrachu tvoří proteiny 20-30 %, z čehož 65-80 % zastupují globuliny a 10-20 % albuminy (Karaca *et al.*, 2011).

Globuliny jsou rozpustné ve vodném prostředí v přítomnosti solí a jsou citlivější na změnu pH. Hrají roli zásobních proteinů a dělí se na dvě hlavní frakce charakterizované svými sedimentačními koeficienty – leguminy (11S) a viciliny (7S). Oba typy představují oligomerní proteiny a vyskytují se převážně v semenech. Leguminy mají hexamerní strukturu a molekulovou hmotnost 300-400 kDa, viciliny jsou trimerní molekuly s molekulovou hmotností 145-190 kDa (Boulter a Croy, 1997).

Albuminy jsou ve vodě rozpustné a zahrnují i enzymy. Mají obecně nižší molekulovou hmotnost (5-80 kDa) a vyšší obsah aminokyselin methioninu a cysteinu v porovnání s globuliny. Mají nejvyšší nutriční hodnotu z hlediska aminokyselinového složení, do skupiny těchto proteinů však řadíme i některé bioaktivní a/nebo antinutriční složky jako inhibitory trypsinu, lektiny či inhibitory amylas (Boye *et al.*, 2010).

Mimo svou vysokou nutriční hodnotu se mohou proteiny také vázat na žlučové kyseliny v gastrointestinálním traktu, čímž zvyšují metabolismus cholesterolu a snižují tak riziko aterosklerózy (vaz Patto *et al.*, 2015).

2.1.3 Antinutriční faktory

Semena luskovin obsahují velké množství bioaktivních složek, které jsou rostlinami produkovány za účelem obrany před predátory nebo jako zásobárny energie potřebné během klíčení (Roberts a Wink, 1998). Souhrnně tyto sloučeniny označujeme jako antinutriční faktory (ANF), jelikož snižují biologickou dostupnost živin – buď inhibicí trávicích enzymů (inhibitor trypsinu a chymotrypsinu), nebo tvorbou chelátů s minerály (kyselina fytová). Ojediněle mohou být ANF pro organismus toxické, pokud jsou konzumovány ve větším množství (Singh *et al.*, 2017).

Souhrnné označení „antinutriční faktory“ však podle některých teorií není zcela správné. Champ (2002) zmiňuje epidemiologické studie, podle nichž mají ANF zdraví prospěšné účinky (prevence rakoviny a koronárních onemocnění), jsou-li pravidelně konzumovány. Svými vlastnostmi jsou sice řazeny mezi ANF, aktivní jsou ale jen v případě, že se semeno nebo mouka konzumují tepelně neupravené, vařením se totiž všechny ANF inaktivují (López-Martínez *et al.*, 2017). Konvenční předúpravy jako aplikace enzymů, ozařování nebo fermentace navíc umožňují odstranění ANF ze semen

ještě za syrova (Nadeem *et al.*, 2010), využití luskovin jako krmiva není proto limitováno přítomností těchto látek (Avilés-Gaxiola *et al.*, 2018).

ANF obsažené v luskovinách můžeme rozdělit na dvě skupiny. První skupina zahrnuje sloučeniny proteinové povahy, včetně lektinů, aglutininů, inhibitorů trypsinu, chymotrypsinu a amylas. Do druhé skupiny řadíme látky neproteinové povahy jako jsou kyselina fytoová, fenolické sloučeniny a saponiny (López-Martínez *et al.*, 2017).

2.1.3.1 Inhibitor trypsinu

Inhibitory proteas (PI), k nimž řadíme i inhibitor trypsinu (TI), jsou proteinové molekuly vyskytující se v semenech plodin, zejména luskovin (Champ, 2002). Tyto sloučeniny inhibují aktivitu trávicích enzymů tvorbou neaktivního komplexu enzym-inhibitor, čímž se významně podílejí na regulaci proteolýzy v daném organismu (Srp a Mareš, 2016).

PI lze klasifikovat na reverzibilní a ireverzibilní podle mechanismu interakce s proteasami. Reverzibilní inhibitory tvoří nekovalentní protein-proteinové komplexy s proteasami, čímž stericky blokují jejich katalytická místa a znemožňují tak vazbu substrátu. Oproti tomu jsou ireverzibilní inhibitory napadány proteasami a tím vznikají kovalentní inhibiční komplexy proteasa-inhibitor (Bode a Huber, 2000).

Inhibitory proteas během evoluce prošly řadou strukturních změn a specializací. V současnosti jsou děleny do rodin, přičemž se daná rodina specializuje pouze na jednu třídu proteas. Existuje ale pár výjimek, jako jsou například Kunitzovy proteasové inhibitory (KTI), které se zaměřují na dvě až tři třídy proteas – serinové, cysteinové a aspartátové. Některé KTI mají na svém povrchu dokonce několik různých reaktivních center, díky čemuž jsou tyto inhibitory multifunkční a umožňují současně inhibovat proteasy z různých tříd (Srp a Mareš, 2016).

KTI jsou od 70. let 20. století studovány na úrovni prostorové struktury, a to převážně pro popis a pochopení jejich funkce v rostlinách. Je známo, že tvoří součást komplexního anti-proteolytického systému umožňujícího blokovat trávicích proteas patogenů a herbivorního hmyzu (Suse, 2002), geny KTI jsou tudíž atraktivní i pro možnou konstrukci transgenních rostlin odolných proti škůdcům (Schlüter *et al.*, 2010).

Kromě KTI jsou další významnou skupinou serinových proteasových inhibitorů Bowmanovy-Birkovy inhibitory trypsinu (BBI), které se od KTI liší svou strukturou. KTI je tvořen jedním nebo dvěma polypeptidovými řetězci s celkovou molekulovou hmotností 20 kDa. Obsahuje čtyři cysteinové zbytky, které tvoří uvnitř řetězce disulfidové můstky

a inhibují aktivitu trypsinu. Oproti tomu má BBI ve své struktuře jen jeden polypeptidový řetězec o celkové molekulové hmotnosti 8 kDa. Součástí řetězce jsou dvě aktivní domény, které slouží pro inhibici aktivity trypsinu nebo chymotrypsinu, a sedm disulfidových můstků (Srinivasan *et al.*, 2005; Sharma, 2015).

Druhou významnou třídu představují aspartátové PI, které tvoří poměrně malou skupinu PI přítomných zejména v bramborech. Během evoluce vznikly jen několikrát, a to jako odpověď těchto rostlin na aspartátové proteasy přítomné v trávicím traktu hmyzích herbivorů, jako je například mandelinka bramborová. Jsou silnými bifunkčními inhibitory aspartátových proteas typu katepsinu D a serinových proteas trypsinového a chymotrypsinového typu (Brunelle *et al.*, 1999).

Cysteinové PI jsou další studovanou třídou, byť ne tak známou v porovnání se serinovými proteasami. Jedná se o bifunkční inhibitory inhibující cysteinové proteasy z rodiny C1 (rodina papainu) a také serinové proteasy z rodiny S1. Nejlépe byl dosud popsán inhibitor BbCI z bauhínie, který inhibuje cysteinové proteasy jako katepsin L nebo cruzipain a serinové proteasy typu elastas (Hansen *et al.*, 2007). Mechanismus inhibice cysteinových PI není známý, ale pravděpodobně obsahuje reaktivní centrum těchto inhibitorů na rozdíl od KTI více než jednu strukturní smyčku. Cysteinové PI jsou si totiž prostorovou architekturou velmi podobné s clitocypinem (rodina I48), který k blokaci cysteinových proteas využívá dvě strukturní smyčky (Renko *et al.*, 2010).

Klasifikace PI se odvíjí od dělení samotných proteolytických enzymů – proteas. Tyto enzymy patří do třídy hydrolas, tedy enzymů schopných katalyzovat hydrolytické štěpení vazeb, zde je konkrétně katalyzováno štěpení peptidových vazeb v proteinech. Široce přijímaná klasifikace proteolytických enzymů je založena na chemické povaze skupin odpovědných za katalýzu. Rozeznávají se proteasy serinové, threoninové, cysteinové, aspartátové a metalokatalytické/metaloproteasy (Rawlings a Barrett, 2013).

Serinové, threoninové a cysteinové proteasy se od zbylých dvou typů liší v tom, že nukleofil katalytického místa je zde součástí aminokyseliny, zatímco u aspartátových proteas a metaloproteas je nukleofilem aktivovaná molekula vody. Například u serinových proteas je katalytické místo tvořeno triádou složenou z histidinu, aspartátu a serinu, kde nukleofilem je hydroxylová skupina serinového zbytku. Tato hydroxylová skupina může napadat peptidovou vazbu, histidin pak slouží jako donor protonu. Podobně je tomu u threoninových proteas, kde je nukleofilem hydroxylová skupina threoninu. V případě cysteinových proteas slouží jako nukleofil sulfhydrylová skupina cysteinu. Aspartátové proteasy využívají aspartátová residua jako ligandy aktivované vody,

u metaloproteas se na aktivovanou vodu vážou dvojmocné kationty kovů (Zhu-Salzman a Zeng, 2015).

Mezi serinové proteasy jsou řazeny i enzymy trypsin (EC 3.4.21.4) a chymotrypsin (EC 3.4.21.1). Tyto látky jsou vylučovány slinivkou břišní v neaktivní formě jako prekurzory trypsinogen a chymotrypsinogen. Prostřednictvím pozitivní zpětné vazby se aktivuje trypsin, který dále převádí chymotrypsinogen spolu s dalšími neaktivními formami na aktivní. Trypsin i chymotrypsin mají podobnou terciární strukturu, byť každý štěpí proteiny na odlišných pozicích v polypeptidovém řetězci vlivem přítomnosti různých vazebných míst pro substrát. Optimální rozsah pH pro oba enzymy je mezi 7 a 8, jelikož působí v tenkém střevě, kde je alkalické prostředí (Hartwig a MAK Commission, 2017).

Pokud se dostanou do těsné blízkosti enzym a inhibitor, dochází k přímé blokaci aktivního místa proteasy, nedochází ke konformačním změnám a vytváří se komplex mezi enzymem a inhibitorem. Reaktivní místo, které zprostředkovává vazbu inhibitoru na enzym, má tvar smyčky (z angl. protease binding loop), jejíž konvexní struktura je vysoce kompatibilní s konkávní strukturou aktivního místa enzymu. Síla interakce reaktivní smyčky s aktivním místem enzymu může být rovněž ovlivněna aminokyselinovými residui, jež se nachází před nebo za touto smyčkou (Krowarsch *et al.*, 2003). Je známo, že například trypsin štěpí peptidové řetězce nejčastěji v oblasti bazických aminokyselin Arg nebo Lys, proto je reaktivní smyčka inhibitorů (zpravidla Kunitzových) tvořena především těmito aminokyselinovými residui, aby bylo docíleno jakési napodobení stavby daného peptidového substrátu (Laskowski a Kato, 1980; Bode a Huber, 1992).

Konformace reaktivních smyček KTI je stabilizována buď interakcí s konzervovaným zbytkem Asn14, nebo pomocí disulfidových můstků a vodíkových interakcí. To způsobuje, že reaktivní smyčky nejsou efektivně štěpeny, přestože jsou v těsné blízkosti katalytických zbytků trypsinu (Ravichandran *et al.*, 2001).

Pakliže komplex enzymu s inhibitorem disociuje, vzniká volný enzym a směs nemodifikovaných a modifikovaných inhibitorů. Modifikované inhibitory mohou být následně specificky štěpeny na peptidové vazbě mezi Arg63 a Ile64. U rafinovaných struktur mezi hovězím pankreatickým inhibitorem trypsinu (BPTI) a hovězím pankreatickým trypsinem (BPT) bylo zjištěno, že peptidová vazba zde není specificky štěpena, ale zůstává téměř neporušena, pouze se slabě mimoplošně deformuje atom karbonylového kyslíku (Bode a Huber, 1992).

Negativní účinek TI spočívá v jeho odolnosti vůči pepsinu a kyselému pH v žaludku, a také v jeho schopnosti tvořit stabilní komplex s trypsinem, jak již bylo uvedeno výše. Inaktivace trypsinu v zažívacím traktu indukuje uvolňování hormonu pankreozymín-cholecystokininu ze střevní sliznice. Tento hormon stimuluje pankreatické acinární buňky k produkci většího množství trypsinu. Tím, že se produkuje více trypsinu než je obvyklé, dochází ke zvýšenému požadavku na aminokyselinu cystein, což vede k významné ztrátě aminokyselin bohatých na síru. Tato negativní zpětná vazba způsobuje hypertrofii/hyperplazii pankreatu, potlačení růstu a jiné karcinogenní účinky (Sharma, 2020).

Výše zmíněné účinky byly pozorovány ve výzkumu, kdy se hlodavcům a ptákům podávala strava sestávající z volných aminokyselin, sójových proteinů, KTI a BBI. U obou typů pokusných organismů došlo k hypertrofii a hyperplazii pankreatu, hypersekreci trávicích enzymů a deficitu endogenních proteinů bohatých na síru. Jelikož mají proteiny ze semen sóji obecně nedostatek sirných aminokyselin, zkoumaní živočichové přestali růst (Lajolo a Genovese, 2002).

Navzdory vysoké afinitě k enzymům jsou všechny PI obsažené v luštěninách termolabilní a jelikož se luštěniny před konzumací tepelně upravují, nepředstavují PI pro člověka významný problém. Navíc lze pro snížení obsahu PI v luštěninách využít i metod genového inženýrství (Greiner a Domoney, 2004). V Tab. 2 je vypsán seznam některých druhů luskovin včetně obsahu TI v nich.

Tab. 2 Porovnání obsahu TI v různých druzích luskovin.

Latinský název	Český název	TIA (U·mg ⁻¹)	Zdroj
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fazol obecný	3,10 ± 0,24	Alonso <i>et al.</i> , 2000
<i>Cicer arietinum</i>	Cizrna beraní	8,10-12,10	Singh a Jambunathan, 1981
<i>Lens culinaris</i>	Čočka jedlá	7,40	Świeca a Baraniak, 2014
<i>Pisum sativum</i>	Hrách setý	2,20	Habiba, 2002
<i>Vigna unguiculata</i>	Vigna čínská	7,52 ± 0,34	Rivas-Vega <i>et al.</i> , 2006
<i>Vicia faba</i>	Bob obecný	4,47 ± 0,21	Alonso <i>et al.</i> , 2000
<i>Cajanus cajan</i>	Kajan indický	4,75 ± 0,10	Sangronis a Machado, 2007
<i>Glycine max</i>	Sója luštinatá	94,10	Yalcin a Basman, 2015
<i>Vigna mungo</i>	Vigna zlatá	0,61-1,03	Chitra a Sadasivam, 1986

Převzato a upraveno dle: Avilés-Gaxiola *et al.*, 2018

2.1.3.2 Kyselina fytová

Myo-inositol-(1,2,3,4,5,6) hexakis-fosfát (kyselina fytová, fytát = konjugovaná báze kyseliny) patří mezi hlavní zdroje fosforu (60-90 %) v pletivech klíčících rostlin a rostlin v raných vývojových stádiích (Loewus, 2002). Představuje běžnou složku rostlinné potravy, vyšší množství jsou přítomna zejména v obilovinách a luskovinách (viz Tab. 3). Denní příjem fytátu činí u lidí, jejichž strava je smíšená, zhruba 150-1400 mg, u vegetariánů pak v průměru 2000-2600 mg. Vyšší příjem fytátu u vegetariánů způsobuje sníženou dostupnost minerálních látek (Reddy, 2002).

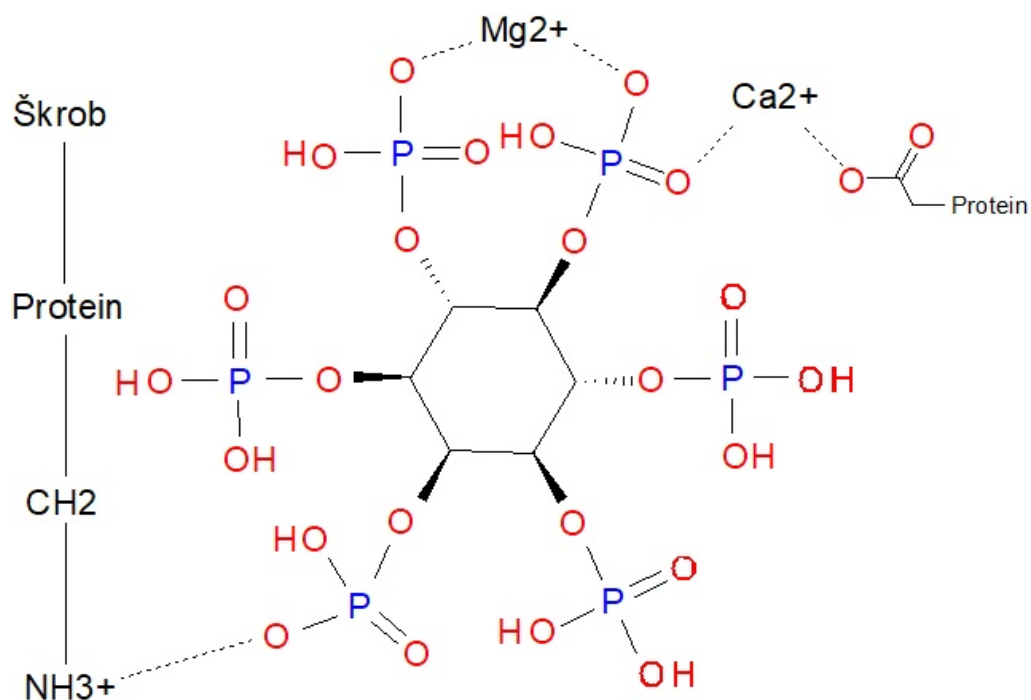
Podle počtu navázaných fosfátových skupin členíme myo-inositol fosfáty do kategorií IP₁ až IP₆. Menší z těchto molekul, IP₁ až IP₄, mají nízkou schopnost tvorby komplexů s anorganickými kationty, navíc jsou v luskovinách přítomny v nižších koncentracích než IP₅ a IP₆, případně se v některých druzích vůbec nevyskytují. Hlavními zástupci myo-inositol fosfátů v luskovinách jsou IP₅ a IP₆, přičemž v největších koncentracích je přítomen právě IP₆ – kyselina fytová (M_r = 660,04), viz Obr. 1 (Burbano *et al.*, 1995).

Díky přítomnosti šesti fosfátových skupin jde o velmi silné chelatační činidlo. Může tvořit vazby v rámci jedné molekuly, případně se řetězit s více molekulami fytátu a následně se vázat na živiny. Tvoří komplexy převážně s dvojmocnými kovy jako Cu²⁺, Fe²⁺, Zn²⁺ nebo Ca²⁺, což následně zapříčiňuje nízkou biologickou dostupnost a jejich následný deficit v organismu (Konietzny a Greiner, 2003). Dále dochází k interakcím fytátu s proteiny, mezi něž patří i trávicí enzymy jako pepsin, trypsin, chymotrypsin nebo α-amylasu. Tím dojde ke snížení jejich aktivity a živiny jsou poté hůře stravitelné (Urbano *et al.*, 2000).

Tab. 3 Obsah fytátu ve vybraných plodinách a produktech z nich.

Plodina/produkt	Obsah fytátu (mg·g ⁻¹)
Rýže natural (vařená)	12,7-21,6
Rýže loupaná (vařená)	1,2-3,7
Pšeničný chléb	3,2-7,3
Žitný chléb	1,9-4,3
Ovesné vločky	8,4-12,1
Hrách setý (vařený)	1,8-11,5
Sója luštinatá	9,2-16,7
Čočka jedlá (vařená)	2,1-10,1
Fazol obecný (vařený)	8,3-13,4

Upraveno dle: Greiner a Konietzny, 2006



Obr. 1 Strukturní vzorec kyseliny fytové a schéma její interakce s proteiny a kationty kovů. Upraveno dle: Nikmaram *et al.*, 2017.

Proti těmto negativním účinkům se organismy brání enzymy zvanými fytasy. V přírodě jsou hojně distribuovány v rostlinách, mikroorganismech a ojedinele v některých živočišných tkáních (Haros *et al.*, 2007). Snižují obsah fytátu v lidské i živočišné potravě hydrolyzou fytátu za vzniku nižších esterů myo-inositolu a fosfátu. IUPAC-IUBMB (z angl. the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) dosud rozeznává tři třídy fytas dle polohy fosfodiesterové vazby, na níž iniciují defosforylaci: 3-phytasy (EC 3.1.3.8), 5-phytasy (EC 3.1.3.72) a 4/6-phytasy (EC 3.1.3.26) (Bohn *et al.*, 2008).

Během degradace katalyzované fytasami vzniká několik izomerů myo-inositolfosfátů, které mohou mít různé fyziologické vlastnosti. Identifikace těchto izomerů by mohla pomoci lépe specifikovat přirozeně se vyskytující fytasy a mechanismy jejich působení. Dnes se využívá enzymatická degradace fytátu pomocí fytas zejména při úpravách krmiv, aby došlo ke zvýšení dostupnosti minerálů a proteinů (Muzquiz *et al.*, 2012).

Navzdory výše zmíněným negativním účinkům na organismus se však někteří autoři domnívají, že fytát může disponovat prospěšnými účinky. Rimbach a Pallauf (1997) tvrdí, že fytát jako silné chelatační činidlo může tvořit cheláty s těžkými kovy přítomnými v potravě (kadmium a olovo) a snižovat tak míru jejich toxicity. Fytát má navíc podle

Lajola *et al.* (2004) antioxidantní vlastnosti *in vitro*, nicméně molekulární mechanismy tohoto procesu nebyly zcela objasněny. Minihane a Rimbach (2002) naopak zjistili, že za podmínek *in vivo* se kyselina fytová nejevila jako antioxidant.

U některých myo-inositolfosfátů se uvádí příznivé účinky jako snižování rizika kardiovaskulárních chorob, prevence tvorby ledvinových kamenů nebo snížení rizika rakoviny tlustého střeva (Champ, 2002). Právě protirakovinné účinky fytátu jsou podle Steera a Gibsona (2002) zapříčiněny jeho antioxidantními vlastnostmi a tvorbou chelátů s kationty kovů.

2.1.3.3 Lektiny

Název „lektin“ má původ v latinském označení „legere“, v překladu „sbírat/číst“, což dobře vystihuje vlastnosti lektinů. Jde o skupinu glykoproteinů neimunogenního původu s jednou nebo více katalytických domén schopných reverzibilně se vázat na mono nebo oligosacharidy (Liu *et al.*, 2010), včetně těch, které jsou součástí jiných glykoproteinů, glykolipidů nebo glykokonjugátů. Díky interakcím se sacharidy mohou lektiny působit jako antinutriční látky a chránit tak rostlinu před fytofágními škůdci (Candido *et al.*, 2011). Pokud je známa specifita glykoproteinů k příslušnému sacharidu, označujeme je pojmem „lektiny“. Pakliže není známa sacharidová specifita, používá se označení „hemaglutininy“ (Sze a Tzi, 2011). Existuje mnoho druhů lektinů rostlinného nebo živočišného původu lišících se povahou a rozsahem jejich antinutričních účinků, rovněž se jedná o vysoce specifické molekuly odolné vůči proteolýze a stabilní v širokém rozmezí pH (Sagar a Dhall, 2018).

Rostlinné lektiny dělíme do čtyř hlavních skupin: hololektiny, merolektiny, superlektiny a chimerolektiny. Dle specifity sacharidu, na který se lektiny vážou, je lze také rozdělit mezi dvanáct skupin rostlin (Vandenborre *et al.*, 2011), přičemž luskoviny tvoří skupinu největší, velmi bohatou na různé druhy lektinů. Ty si jsou z hlediska složení aminokyselin velmi podobné, liší se však ve své vazebné specifitě a kvartérní struktuře (Koundal a Rajendran, 2003).

Lektiny poškozují lumenální epitelální membrány a způsobují tak narušení metabolismu sacharidů, lipidů a proteinů. To se projeví zvětšením nebo dokonce atrofií cílové tkáně a dojde ke změně imunologického a hormonálního stavu organismu. U fytofágního hmyzu se tento efekt projeví narušením růstu a vývoje daného živočicha (Chakraborti *et al.*, 2009).

Tab. 4 Obsah lektinů ve vybraných druzích luskovin (jednotky uvedeny v závorkách).

Luskovina	Obsah lektinů (HU)	Obsah lektinů – ELISA ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
Sója luštinatá var. Ostrumi	40,0 ± 0,00	4,80 ± 0,10
Čočka jedlá var. Magda	500,0 ± 1,67	8,00 ± 0,27
Fazol obecný var. Gernikesa	24,09 ± 0,50	5,50 ± 0,50
Hrách setý var. Iceberg	0,32 ± 0,00	neanalyzováno
Vikev čočková var. Taranto	0,63 ± 0,00	neanalyzováno

Převzato a upraveno dle: Muzquiz *et al.*, 2012

Díky těmto vlastnostem jsou lektiny považovány za potenciální biopesticidy a mnoho lektinových genů vykazujících insekticidní aktivitu bylo úspěšně zavedeno do genomu pšenice, rýže nebo brambor. Implementace podobně vyšlechtěných rostlin podle všeho nemá na životní prostředí negativní dopad. Díky své odolnosti vůči škůdcům mohou takto vypěstované rostliny zlepšit životní prostředí, jelikož je nebude potřeba ošetřovat chemickými insekticidy a herbicidy (Velkov *et al.*, 2005).

Navzdory insekticidním vlastnostem lektinů však přesto zůstává otázkou jejich toxicita pro savce. Vasconcelos a Oliveira (2004) uvádějí, že fytohemaglutininy způsobují aglutinaci červených krvinek, tudíž jsou pro savce toxické. Pro šlechtění transgenních plodin odolných vůči hmyzu je tak potřeba využít pouze ty druhy lektinů, které nejsou spojeny s potenciální toxicitou a podobnými nežádoucími účinky na savčí organismus (Sagar a Dhall, 2018).

Obsah lektinů v luskovinách se měří v jednotkách HU (z angl. haemagglutination unit), kdy 1 HU definujeme jako množství materiálu v posledním ředění, v němž bylo aglutinováno 50 % buněk. Podle výsledné hodnoty, hemaglutinační aktivity, se posléze stanovuje celkový obsah lektinů v příslušné luskovině (Muzquiz *et al.*, 2012). Obsah lektinů ve vybraných druzích luskovin je uveden v Tab. 4.

2.1.3.4 Oligosacharidy

Název pochází z řeckého označení ολίγοι [*oligoí*] = několik, a σάκχαρ [sáchar] = sladký. Oligosacharidy sestávají zpravidla z tří až deseti monosacharidových jednotek spojených glykosidickými vazbami. K nejznámějším zástupcům rostlinných oligosacharidů řadíme α -galaktosidy, z nichž nejrozšířenější jsou rafinosové.

Rafinosa představuje hlavního zástupce rafinosových oligosacharidů. Strukturně se jedná o trisacharid sestávající z galaktosy, glukosy a fruktosy. Rafinosa je přítomna ve všech částech rostliny, během růstu dochází k jejímu hromadění v kořenech a semenech

(Muzquiz a Wood, 2007). Stachyosa patří mezi rafinosové tetrasacharidy, skládá se z dvou jednotek α -D-galaktosy doplněných o jednotku α -D-glukosy a β -D-fruktosy. Mezi jednotkami galaktosy a glukosy vznikají vazby α -(1 \rightarrow 6), zatímco jednotky glukosy a fruktosy jsou spojeny vazbou α -(1 \leftrightarrow 2)- β .

Rafinosa a stachyosa svou osmotickou aktivitou pomáhají luskovinám překonávat stres způsobený suchem, vysokými teplotami nebo vysokou salinitou. Mohou rovněž sloužit jako zhášče reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) a zabránovat tak například peroxidaci membránových fosfolipidů (ElSayed *et al.*, 2014).

Hladiny oligosacharidů se liší napříč jednotlivými druhy luskovin, pohybují se v rozmezí od 0,4 do 16,1 % sušiny. V některých luskovinách (sója, cizrna, arašíd) chybí rafinosový pentasacharid verbaskosa, množství celkových α -galaktosidů je tak nižší (Rao a Belavady, 1978; Rupérez, 1998). V Tab. 5 je uveden seznam vybraných luskovin a množství oligosacharidů v nich přítomných.

Když se oligosacharidy dostanou do trávicího traktu, dochází k jejich úplné hydrolyze pomocí enzymů invertasy a α -galaktosidasy. U monogastričních živočichů chybí α -galaktosidasa, oligosacharidy (zejména α -galaktosidy) tedy nemohou být stráveny v tenkém střevě a rozkládány jsou až anaerobně bakteriemi tlustého střeva. Během tohoto procesu vzniká vodík, methan a oxid uhličitý, což způsobuje nadýmání. Při konzumaci velkého množství α -galaktosidů se změní osmotický tlak v tenkém střevě, čímž dojde ke snížení jeho absorpční kapacity. Nadýmání je pak doprovázeno průjemem a bolestmi břicha (Zhang *et al.*, 2019).

Snížená schopnost trávit α -galaktosidy má ale i svá pozitiva. V nestrávené formě tvoří α -galaktosidy součást vlákniny a mohou působit jako probiotikum v tlustém střevě. Při anaerobním metabolismu α -galaktosidů dochází ke zvyšování populace bifidobakterií, které potlačují hnilobu střev, stimulují imunitní systém a zvyšují odolnost organismu vůči infekci (Mitsuoka, 1996; Eiwegger *et al.*, 2004).

Tab. 5 Obsah α -galaktosidů a jejich dílčích složek v různých druzích luskovin.

Luskovina	Sacharosa (mg·g ⁻¹)	Rafinosa (mg·g ⁻¹)	Stachyosa (mg·g ⁻¹)	Verbaskosa (mg·g ⁻¹)	Celkové α - galaktosidy (mg·g ⁻¹)
Lupina bílá	28,8 ± 1,20	6,35 ± 0,34	61,3 ± 0,93	11,7 ± 1,81	79,3 ± 1,40
Sója luštinatá	40,8 ± 0,33	9,30 ± 0,18	40,7 ± 0,89	-	50,0 ± 1,04
Čočka jedlá	10,4 ± 1,29	2,92 ± 0,39	22,6 ± 0,99	21,9 ± 0,77	47,5 ± 1,87
Cizrna beraní	21,5 ± 1,17	6,53 ± 0,87	22,9 ± 0,92	-	29,4 ± 2,30
Podzemnice olejná	77,6 ± 2,87	4,68 ± 0,31	6,69 ± 0,09	-	11,4 ± 0,35

Upraveno dle: Pedrosa *et al.*, 2012.

2.1.3.5 Třísloviny

Třísloviny jsou ve vodě rozpustné polyfenolové sloučeniny s molekulovou hmotností od 500 do více než 3000 Da. Vyskytují se v cévních svazcích kořene, stonku, listů či pupenů, v hojném zastoupení se nachází zejména v lesních plodech a kakaových bobech, v menších množstvích pak v luskovinách (Tab. 6), obilovinách a alkoholických nápojích. Označení „tříslovina“ (z angl. „tannin“) bylo poprvé zavedeno už koncem 18. století a pochází z použití těchto sloučenin v koželužství k činění kůží (třísloviny interagují a sráží proteiny včetně kolagenu). Rostlinné extrakty s obsahem tříslovin se k těmto účelům využívají už od starověku. Povahou reakcí se podobají fenolům (Serrano *et al.*, 2009). Přesto existují druhy tříslovin, které nejsou rozpustné ve vodě a jejich molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí od 3 do 30 kDa – tvoří sítě s polysacharidy buněčných stěn (Le Bourvellec *et al.*, 2004).

Třísloviny lze tedy definovat jako unikátní skupinu fenolových metabolitů o poměrně vysoké molekulové hmotnosti, které dokážou tvořit stabilní komplexy s proteiny a sacharidy. Jsou rozděleny na základě jejich chemické struktury, anebo dle jejich rozpustnosti a extrahovatelnosti. Podle chemických struktur jsou rozeznávány čtyři hlavní skupiny tříslovin: proantokyanidiny/kondenzované třísloviny, hydrolyzovatelné třísloviny, florotaniny a komplexní třísloviny (Serrano *et al.*, 2009).

Proantokyanidiny jsou polyhydroxyflavanové oligomery a polymery. Základní jednotky – monomerní flavanoly – se mezi sebou liší počtem a polohou hydroxylových skupin a stereochemií na uhlíku C3. Mezi nejběžnější monomery patří diastereomery (+)-katechin/(–)-epikatechin, (–)-gallokatechin/(–)-epigallokatechin a (+)-afzelechin/(–)-epiafzelechin (Tab. 7), přičemž jejich příslušné oligo- a polymery nazýváme prokyanidiny, prodelfinidiny a propelargonidiny (Sanoner *et al.*, 1999).

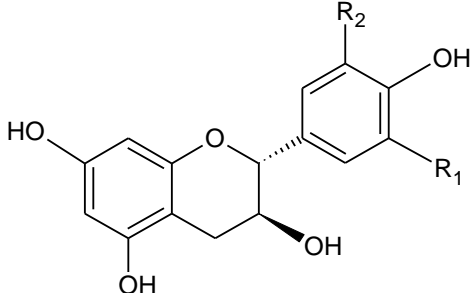
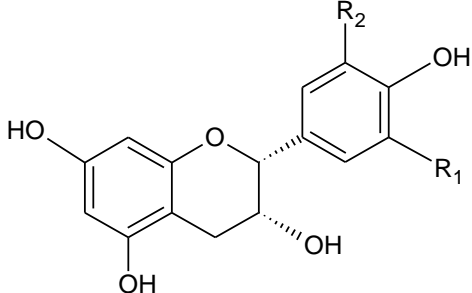
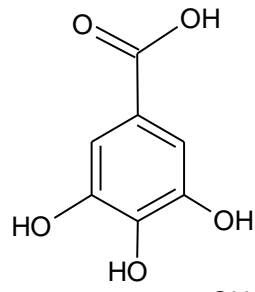
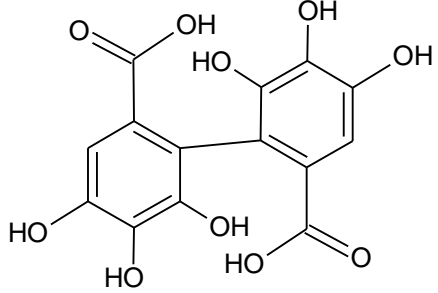
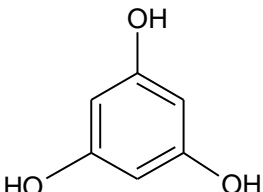
Tab. 6 Obsah tříslovin ve vybraných druzích luskovin.

Luskovina (latinský název)	Obsah tříslovin (mg·100 g ⁻¹)
Fazole mungo	890 ± 0,79
Cizrna beraní	770 ± 0,86
Čočka jedlá	915 ± 0,76
Fazole červená ledvina	1100 ± 0,89
Fazole navy	980 ± 0,90

Upraveno dle: Rehman a Shah, 2005.

V určitých polohách mohou být proantokyanidiny esterifikovány kyselinou gallovou nebo sacharidy, čímž vznikají mimo jiné i červeně zbarvené antokyanidiny, odtud plyne označení „proantokyanidiny“ (Serrano *et al.*, 2009).

Tab. 7 Dělení tříslovin a strukturní vzorce jejich monomerních jednotek.

Skupina tříslovin	Monomer	Strukturní vzorec monomeru
Proantokyanidiny	(+)-katechin $R_1=OH$, $R_2=H$ (+)-afzelechin $R_1=H$, $R_2=H$ (-)-galkatechin $R_1=OH$, $R_2=OH$	
	(-)-epikatechin $R_1=OH$, $R_2=H$ (-)-epiafzelechin $R_1=H$, $R_2=H$ (-)-epigalkatechin $R_1=OH$, $R_2=OH$	
Hydrolyzovatelné třísloviny	Kyselina gallová	
	Kyselina hexahydroxydifenová	
Florotaniny	Floroglucinol	

Převzato a upraveno dle: Serrano *et al.*, 2009.

Hydrolyzovatelné třísloviny jsou polyestery sacharidů (a jiných nearomatických polyhydroxysloučenin) a organických kyselin. V přítomnosti zředěné kyseliny dochází k jejich hydrolyze na příslušný sacharid a organickou kyselinu. Sacharidovou složkou bývají zpravidla glukosa, fruktosa, xylosa nebo sacharosa. Podle kyselé složky se odvíjí název dané skupiny tříslovin, a to galotaniny (kyselina gallová) nebo ellagitaniny (kyselina hexahydroxydifenová). Ellagitaniny jsou často smíšené estery s kyselinou gallovou a hexahydroxydifenovou (Serrano *et al.*, 2009).

Florotaniny se nacházejí v mořských chaluhách a vyznačují se svou specifickou strukturou. Představují oligomerní nebo polymerní deriváty floroglucinolu (1,3,5-trihydroxybenzenu, viz Tab. 7), v nichž jsou jednotlivé jednotky floroglucinolu spojeny vazbami aryl-aryl (fukoly), etherovými vazbami (floretholy, hydroxyfloretholy, fuhaloly) nebo oběma typy těchto vazeb (fukofloretholy) (Serrano *et al.*, 2009).

Kromě dělení dle chemické struktury můžeme rozdělit třísloviny podle jejich rozpustnosti. Mezi rozpustné řadíme třísloviny, které lze snadno extrahovat vodnými a organickými rozpouštědly (oligomerní proantokyanidiny a hydrolyzovatelné třísloviny o nízké molekulové hmotnosti). Naopak mezi nerozpustné patří vysokomolekulární třísloviny a třísloviny, které tvoří komplexy se sacharidy a proteiny. V přírodě se vyskytují častěji než rozpustné třísloviny – v píceňkách je 55 až 86 % proantokyanidinů vázáno na proteiny (Mupangwa *et al.*, 2000).

Antinutriční vlastností tříslovin je jejich schopnost interagovat s minerály, proteiny nebo trávicími enzymy. Například mezi hydroxylovou skupinou tříslovin a karbonylovou skupinou proteinu se tvoří vodíková vazba a následkem toho vzniká nestravitelný komplex (Raes *et al.*, 2014). Naopak mezi pozitivní vlastnosti tříslovin patří jejich schopnost působit jako antioxidant. Zhášejí ROS a zabraňují peroxidaci lipidů (Gyamfi a Aniya, 2002).

2.1.4 Ekologická funkce ANF

Stejně jako mnoho jiných plodin jsou i luskoviny vystavovány řadě abiotických či biotických stresových faktorů, mezi něž patří bakterie, viry nebo houby. Tyto stresory mohou napadat danou rostlinu a způsobovat různé vady a nemoci, což vede ke snížení celkové produkce příslušné plodiny.

Výše zmíněné patogeny syntetizují specifické hydrolytické enzymy zvané proteasy. Pomocí nich mohou ničit strukturální proteiny přítomné v buněčné stěně rostliny a následně

tak získají rostlinné živiny. Dle aktivity proteas se odvíjí schopnost patogenu napadnout rostlinu a také závažnost vzniklých vad či onemocnění (Yarullina *et al.*, 2016).

Luskoviny v rámci svých obranných mechanismů syntetizují a hromadí velké množství PR (z angl. pathogenesis-related) proteinů. Dle jejich funkce je můžeme rozdělit do skupin PR-1 až PR-17, přičemž do skupiny PR-6 spadají již zmiňované PI. Tyto proteiny mají protektivní funkci. Vážou se do aktivních míst proteas daného patogenu, čímž je aktivita těchto proteas inhibována. Patogeny se tím pádem nemohou živit rostlinnými aminokyselinami, platí to jak pro mikroorganismy, tak i pro živočichy. Luskoviny jsou odolné vůči širokému spektru patogenů díky produkci různých druhů PI, které vykazují vyšší stabilitu a inhibiční aktivitu oproti PI přítomným v jiných rostlinách (Rodríguez-Sifuentes *et al.*, 2020).

Dawei *et al.* (2016) studovali aktivitu serinových PI u čtyř odrůd sóji, z nichž dvě byly citlivé na hlístice druhu *Heterodera glycines* a dvě byly vůči tomuto druhu rezistentní. Po naočkování hlístic na rostliny se u všech druhů sóji zvýšila aktivita PI, u těch citlivých se sice hlístice invazivně šířily, ale pouze v oblasti kořenů, kde je aktivita PI nižší oproti zbytku rostliny. Z výzkumu tedy vyplývá, že s rostoucí aktivitou PI se zvyšuje nejen odolnost plodiny vůči napadení patogeny, ale také se zabraňuje jejich invazivnímu šíření v dané části rostliny.

V současnosti slouží k ochraně rostlin před stresovými faktory agrochemikálie. Řada z nich je však pro ostatní organismy toxická, tudíž musí být nahrazeny ekologicky šetrnějšími látkami. Právě PI produkované luskovinami se nabízí jako jedna z udržitelných alternativ. K dispozici je široká škála jejich uplatnění v transgenních rostlinách nebo jako součást biopesticidů. Nepoškozují životní prostředí a účinné jsou především proti hmyzu, hlísticím a houbám (Rodríguez-Sifuentes *et al.*, 2020).

2.2 Stanovení ANF

Mezi hlavní ANF, které se stanovují, patří inhibitory proteas, kyselina fytová, oligosacharidy, lektiny a třísloviny. Stanovovány jsou ve všech komerčně dostupných luskovinách.

2.2.1 Účel stanovení

Množství ANF v luskovině vypovídá o kvalitě dané plodiny. Řada ANF interaguje s proteiny a minerály, anebo způsobují zdravotní komplikace. Čím je nižší obsah ANF,

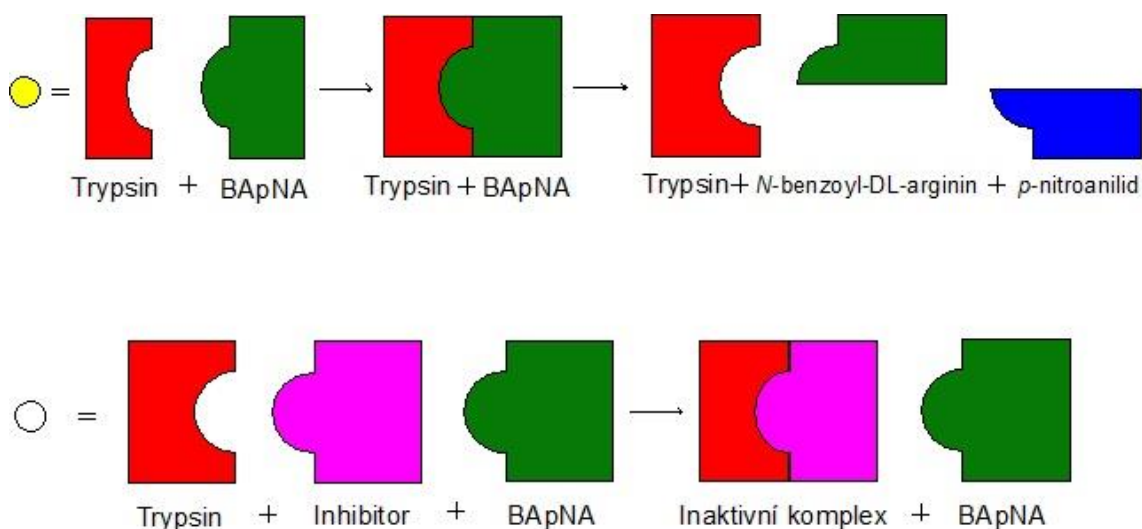
tím je zvýšena biologická dostupnost všech živin, tedy se zvyšuje nutriční hodnota luskoviny (Amarakoon *et al.*, 2012).

Stanovení ANF probíhá rovněž po úpravě analyzované luskoviny (loupání, namáčení, vaření, germinace, autoklávování...) za účelem zjištění úbytku hladin sledovaných ANF. Díky tomu lze zefektivnit metody snižování obsahu konkrétních ANF ve vybraných druzích luskovin. Například množství inhibitoru trypsinu v cizrně beraní (*Cicer arietinum* L.) se vařením sníží o 82 %, zatímco u fazolí (*Phaseolus vulgaris* L.) se stejnou úpravou sníží množství jen o zhruba 30 % (Sharma, 2020).

2.2.2 Metody stanovení

2.2.2.1 Stanovení inhibitoru trypsinu

Stanovení obsahu inhibitoru trypsinu (TIA) se provádí standardizovanou metodou American Association of Cereal Chemists (AACC) vyvinutou Kakade *et al.* (1974), v níž je syntetický substrát, N α -Benzoyl-DL-arginin-4-nitroanilid hydrochlorid (BAPNA), podroben působení trypsinu za přítomnosti extraktu z drcených semen vybrané luskoviny (viz Obr. 2). Vzniká barevný produkt, ve kterém lze spektrofotometricky stanovit koncentraci inhibitoru měřením absorbance při $\lambda=410$ nm. Výsledná hodnota je porovnána s absorbancí standardu, vyjádřena procentuální inhibice trypsinu a obsah inhibitoru přepočítán na TIA $\cdot g^{-1}$, tedy množství inhibitoru (mg nebo μg) na jeden gram vzorku (Sueiro *et al.*, 2015).



Obr. 2 Mechanismus inhibice trypsinu, převzato a upraveno dle: Coelho, 2013.

Z hlediska reakčního mechanismu jde o kompetitivní inhibici, proto se měření podle Kakade *et al.* (1974) provádí s několika různými ředěními extraktu a následnou extrapolací na nulovou koncentraci. Byť se volí vhodná ředění ve snaze minimalizovat nepřesnost extrapolace, v průběhu let došlo k postupným optimalizacím metody.

Původní metoda byla schválena AACC poprvé v roce 1973 jako metoda 71-10 a opětovně schválena v roce 1999 jako metoda 22-40.01. Smith *et al.* (1980) přišli s alternativou, a sice použitím jen jednoho ředění. K tomu zavedli upravené podmínky extrakce včetně přísnější kontroly pH. Tato úprava byla přijata v roce 2001 Mezinárodní organizací pro standardizaci (ISO) v normě ISO 14902, znovu schválená pak byla roku 2012 (Sueiro *et al.*, 2015).

Hlavními rozdíly mezi metodami AACC 22-40.01 a ISO 14902 jsou velikost částic, na niž je při přípravě vzorku daná luskovina redukována, dále postup extrakce a také samotný substrát enzymatické reakce. Tyto faktory mají podstatný vliv na výsledné hodnoty TIA a výsledné hodnoty jsou tak vzájemně nesrovnatelné (Sueiro *et al.*, 2015).

Obsah TI v luskovinách se obvykle vyjadřuje v jednotkách TIU (z angl. trypsin inhibitor unit) nebo TIA (z angl. trypsin inhibitor activity). Obojí je definováno jako množství inhibovaného trypsinu v mg nebo g, přičemž mezi TIA a TIU platí, že 1,0 mg TI/g je odpovídá 1,9 TIU/mg (Kakade *et al.*, 1974). Smith *et al.* (1980) uvádějí i možnost vztahování TIA na celkový protein obsažený v semenu (CP).

V experimentální části práce budou provedeny experimenty, v nichž bude stanovován obsah inhibitoru trypsinu v semenech hrachu setého. Výchozí metodou bude metoda popsaná Smithem *et al.* (1980). Cílem práce je optimalizovat tuto metodu na modernější instrumentaci a sjednotit nesrovnalosti, které se za dlouhou dobu vyskytly.

2.2.2.2 Stanovení kyseliny fytové

V současné době neexistuje jednoduchá a komerčně dostupná kvantitativní metoda stanovení kyseliny fytové. Obecně přijímaná metoda AOAC 986.11 je založena na extrakci drcených semen luskoviny s HCl a následné analýze vzorku pomocí HPAEC (z angl. High Performance Anion Exchange Chromatography) s detektorem vodivosti. Ten se používá k detekci všech oddělených eluentů, přičemž se do směsi přidává aniontový supresor pro potlačení rušivých složek. Identifikace a kvantifikace kyseliny fytové je zjištěna pomocí retenčního času a porovnáním vzniklých píků se standardy jednotlivých inositolfosfátů (Kasim a Edwards, 1998).

Výše popsaná metoda je však složitá a čítá řadu omezení. Pro každou samostatnou analýzu je zapotřebí těžkopádné aniontoměničové čištění a svou roli hraje i inherentní předpoklad, že se čistí pouze kyselina fytová. Tento předpoklad by byl životaschopný pro nezpracovaná zrna, v nichž tvoří fytát asi 97 % všech inositolfosfátů. Není však akceptovatelný při analýze zpracovaných krmiv nebo potravin, v nichž může být přítomno vyšší množství nižších forem inositolfosfátů (například IP₃ nebo IP₅). Po eluci těchto forem by došlo k nadhodnocení celkového obsahu kyseliny fytové (Lehrfeld a Morris, 1992).

Druhou užívanou metodou je spektrofotometrické stanovení kyseliny fytové. Princip spočívá v zahřívání kyselého extraktu vzorku s roztokem železitých kationtů (Fe³⁺) o známé koncentraci. Obsah kyseliny fytové se určuje jako pokles absorbance vzorku oproti původnímu roztoku Fe³⁺, do reakční směsi je přidáván 2,2-bipyridin a měří se při $\lambda=419$ nm. Výsledek je pak vyjádřen v mg PA/g DW – množství kyseliny fytové (mg) v jednom gramu sušiny (Luo a Xie, 2013).

Tato metoda je sice cenově dostupná, má však své nedostatky. Hlavním problémem byly interference kovových iontů, změna iontové síly roztoku po extrakci fytátu, citlivost metody a její reprodukovatelnost. Došlo proto k jejímu zdokonalení. Nově je používán glyoxal bis(2-hydroxyanilin) (GBHA), který reaguje s vápenatými kationty v zásaditém prostředí a poskytuje barevný produkt měřitelný při $\lambda=500$ nm. V přítomnosti kyseliny fytové reagují vápenaté ionty s fosfátovými skupinami této kyseliny a vzniká bezbarvý komplex. To se projeví poklesem absorbance roztoku, přičemž míra poklesu absorbance je přímo úměrná koncentraci kyseliny fytové. Výsledek je uváděn ve formě % m/m (procentuální zastoupení kyseliny v daném množství vzorku luskoviny) (Agostinho *et al.*, 2016).

Ke stanovení myo-inositolfosfátů se dále využívá i kapilární zónová elektroforéza (CZE, z angl. Capillary Zone Electrophoresis). Založena je na migraci iontů v elektrickém poli, přičemž myo-inositolfosfáty díky zápornému náboji přirozeně putují k anodě. Protože však elektroosmotický tok (EOF, z angl. Electroosmotic Flow) unáší všechny molekuly směrem ke katodě, pohybují se i anionty tímto směrem. Rychlost pohybu je ovlivněna velikostí náboje i velikostí dané molekuly. K urychlení analýzy se používají buď elektrolyty o nízkém pH (3,0 a nižší), čímž dochází k potlačení EOF protonací silanolových skupin na stěně kapiláry, anebo je možno využít různá aditiva, která způsobí obrácení směru chodu EOF. Mezi takové sloučeniny patří polyaminy nebo surfaktanty, jako například cetyltrimethylammonium bromid (Simonet *et al.*, 2003).

Obsah jednotlivých myo-inositolfosfátů se pak určuje pomocí nepřímé detekce založené na UV, fluorescenční nebo amperometrické detekci, není tedy zapotřebí provádět derivatizaci sloučenin. Další výhodou CZE je, že dokáže rychle detekovat přítomnost molekul s různými velikostmi jejich nábojů. Metoda je tak podstatně kratší než chromatografické techniky a současně se zabraňuje ztrátě materiálu v důsledku adsorpce na stacionární fázi. Nevýhodou pak je zvýšená hladina šumu, který vzniká v důsledku přidání chromoforu do reakční směsi, a tak zároveň snížení citlivosti. Také může dojít k překryvu píků v důsledku vyšších hodnot pH (více než 3, současně se zvyšuje EOF), a nelze tedy jednotlivé myo-inositolfosfáty zcela přesně identifikovat a kvantifikovat (Buscher *et al.*, 1994).

2.2.2.3 Stanovení oligosacharidů

Vybrané druhy oligosacharidů (sacharosa, rafinosové oligosacharidy a ciceritol) lze stanovit metodou HPLC. Drcená semena dané luskoviny se extrahují v ethanolu za přítomnosti arabinosy jako interního standardu. Po centrifugaci se ze supernatantu vysráží polysacharidy a proteiny pomocí ethanolu, vzorek se opětovně centrifuguje a výsledný supernatant obsahuje pouze nízkomolekulární sacharidy. Takto připravený supernatant se odpaří, znovu rozpustí v destilované vodě, přefiltruje přes mikrofiltr a analyzuje metodou HPAEC-PAD (PAD z angl. Pulsed Amperometric Detection). Výsledek se uvádí v jednotkách $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DM}$ = množství sacharidů (g) v kilogramu sušiny (Ekvall *et al.*, 2007).

2.2.2.4 Stanovení lektinů

Stanovení aktivity lektinů se provádí extrakcí drcených semen luskoviny ve fyziologickém roztoku fosfátového pufru, následnou centrifugací, sériovým ředěním supernatantu a reakcí zředěných alikvotů s trypsinizovanými králíčími erytrocyty. Jedna jednotka hemaglutinační aktivity (HA) je definována jako převrácená hodnota nejvyššího ředění poskytujícího pozitivní aglutinaci (Luo a Xie, 2013).

2.2.2.5 Stanovení tříslovin

Stanovení obsahu tříslovin se provádí reakcí methylcelulosity a síranu amonného s extraktem ze semen luskoviny, po terminaci reakce centrifugací se měří absorbance supernatantu při $\lambda=280 \text{ nm}$, jde tedy o spektrofotometrii v UV oblasti. Výsledná hodnota je vyjádřena v $\text{g}/100 \text{ g}$ – množství epikatechinových ekvivalentů na 100 g vzorku (Carbas *et al.*, 2020).

2.2.3 Alternativní metody stanovení ANF

Standardní metody stanovení obsahu ANF v luskovinách jsou sice osvědčené, mají však řadu omezení: jsou časově náročné, vyžadují technické znalosti, použití škodlivých činidel nebo rostoucí počet matric. Vymyšleny byly proto alternativní přístupy založené na spektroskopii využívající Fourierovu transformaci (FTIR, z angl. Fourier-transform infrared spectroscopy). Tím je umožněn přístup k vícerozměrné analýze, kdy lze spektra korelovat s chemickými daty a získat tak analytické kalibrace. Vzhledem k jednoduchosti, rychlosti a spolehlivosti tohoto přístupu došlo k jeho širokému rozšíření, a to zejména v zemědělsko-potravinářském průmyslu (Carbas *et al.*, 2020).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a přístroje

3.1.1 Chemikálie

Trypsin (Sigma-Aldrich, Německo)

BAPNA; *N*α-benzoyl-DL-arginin *p*-nitroanilid hydrochlorid (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina fytová; *myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisfosfát, 50% roztok (w/w) (Sigma-Aldrich, Německo)

PDC; Kyselina pyridin-2,6-dikarboxylová (Sigma-Aldrich, Německo)

CTAB; Hexadecyltrimethylamoniumbromid (Sigma-Aldrich, Německo)

DAH; 1,6-diaminohexan (Sigma-Aldrich, Německo)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan; 2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina chlorovodíková (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina octová; kyselina ethanová (Sigma-Aldrich, Německo)

Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, Německo)

Bezvodý chlorid vápenatý (Lach:Ner, Česko)

Organické kyseliny (pyrohroznová, jantarová, jablečná, citronová) (Sigma-Aldrich, Německo)

Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Lach:Ner, Česko)

Dihydrát kyseliny šřavelové (Sigma-Aldrich, Německo)

Dihydrát molybdenanu sodného (Sigma-Aldrich, Německo)

Hydroxid sodný p.a. (Penta Chemicals, Česko)

Voda vysoké čistoty (deionizovaná, Milli-Q)

Methanol (Honeywell, USA)

n-hexan (Sigma-Aldrich, Německo)

Disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové p.a. (Lach:Ner, Česko)

Hexahydrát chloridu železitého (Sigma-Aldrich, Německo)

Dihydrát kyseliny 5-sulfosalicylové (Sigma-Aldrich, Německo)

3.1.2 Biologický materiál

Biologický materiál byl zčásti poskytnut firmou SELGEN (genetický materiál určený pro šlechtitelské účely) a zčásti zakoupen v komerčních řetězcích. Sója luštinatá byla poskytnuta z genetických zdrojů VÚRV.

Materiál poskytnutý firmou SELGEN:

Hrách setý (*P. sativum* L., odrůda Impuls)

Hrách setý (*P. sativum* L., odrůda Avatar)

Materiál zakoupený v komerčních řetězcích:

Čočka jedlá (*L. culinaris* L.); označení etikety – čočka (Tesco Stores ČR a.s.)

Čočka červená (*L. culinaris* L.); označení etikety – čočka červená půlená (Tesco Stores ČR a.s.)

Hrách setý (*P. sativum* L.); označení etikety – hrách (Tesco Stores ČR a.s.)

Hrách setý (*P. sativum* L.) – loupaný žlutý; označení etikety – hrách (Tesco Stores ČR, a.s.)

Fazole mungo (*V. radiata* L.); označení etikety – fazole mungo (Tesco Stores ČR a.s.)

3.1.3 Instrumentace a pomůcky

Spektrofotometrický reader Epoch 2 (BioTek, USA)

Horkovzdušná sušárna UNB 500 (Memmert GmbH + Co.KG, Německo)

Automatické pipety o objemech 2-20 µl; 20-200 µl; 100-1000 µl; 1-5 ml (Eppendorf, Německo; Labnet International, USA)

Sestava kapilární elektroforézy (Agilent Technologies, USA)

Systém pro přípravu vody vysoké čistoty MilliQ (Millipore, Německo)

Analytické váhy (Kern, Německo)

Laboratorní sklo (kádinky, odměrné baňky aj.; Simax, Česko)

Plastové mikrozskumavky (Eppendorf, Německo)

Mikrocentrifuga Labnet PRISM (Labnet International, Edison, USA)

Ultrazvuková lázeň, Bandelin Sonorex Digitec DT 102 HR-C (Bandelin Electronic, Německo)

Mikrozskumavkový třepač Multi-Tube Vortex Mixer DMT-2500 (MIULAB, Hangzhou, Čína)

pH metr, Multifunction meter CX-505 (Elmetron, Polsko)

Třepačka vortex V-1 plus (Biosan, Lotyšsko)

Polypropylenové vialky (Macherey-Nagel, Německo)

Plastové stříkačky o objemu 15 a 25 ml (Braun, Česko)

Stříkačkové filtry o velikosti pórů 0,22 a 0,45 µm (Chromservis, Česko)

Elektrický mlýnek na kávu Silvercrest SKME 180 B1 (Lidl Česká republika v.o.s., Česko)

Laboratorní síta (oko 0,5 mm a 0,16 mm) (závod Ivančice, Stavební strojírenství n.p. Brno, Česko)

3.1.4 Software

Pro vypracování této bakalářské práce byl použit balíček Microsoft Office 365. Ke kresbě chemických vzorců byl použit nástroj ChemSketch a pro úpravu obrázků program Zoner Callisto 5 (obojí freeware licence).

3.2 Příprava zásobních roztoků a biologického materiálu

3.2.1 Homogenizace biologických vzorků

Vzorky poskytnutého i zakoupeného materiálu byly rozemlety v elektrickém mlýnku na kávu a přesety přes síto o jemnosti 0,5 mm. Z prosetého materiálu byla polovina přeseta přes druhé síto o jemnosti 0,16 mm. Následně byly homogenizované vzorky skladovány v chladničce při teplotě 4-8 °C do doby dalšího zpracování.

3.2.2 Odtučnění semen sóji luštinaté

Po homogenizaci byl 1 g sóji o zrnitosti 0,16 mm ($n=2$) smíchán s 5 ml hexanu a centrifugován při 6000 g 13 min. Supernatant byl odebrán, zbytkový hexan odpařen v digestoři a odtučněný vzorek zvážen. Proces byl dvakrát opakován pro dostatečné extrakce interferujících lipofilních látek.

3.2.3 Chemikálie pro stanovení obsahu inhibitoru trypsinu

3.2.3.1 Tris pufr

Bylo naváženo 3,0285 g Tris, 1,11 g CaCl_2 , rozpuštěno ve vodě, upraveno na pH 8,2 pomocí HCl a doplněno vodou na celkový objem 500 ml. Výsledné koncentrace složek byly $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Tris) a $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (CaCl_2).

3.2.3.2 Pracovní roztok HCl

Bylo naváženo 277 mg CaCl_2 , rozpuštěno ve vodě, přidáno 41,4 μl 37% HCl a doplněno vodou na objem 500 ml. Koncentrace jednotlivých složek byly: $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (CaCl_2) a $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (HCl).

3.2.3.3 Zásobní roztok trypsinu

Byly naváženy 4 mg trypsinu a rozpuštěny ve 20 ml pracovního roztoku HCl (výsledná koncentrace trypsinu $0,2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Takto připravený zásobní roztok byl před měřením ředěn 10x na finální koncentraci trypsinu $20 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

3.2.3.4 Zásobní roztok enzymového substrátu

Bylo naváženo 20 mg *N* α -benzoyl-DL-arginin *p*-nitroanilid hydrochloridu a rozpuštěno v 500 μl DMSO (koncentrace BAPNA $40 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Před měřením byl roztok 100krát zředěn Tris pufrem na finální koncentraci BAPNA $0,4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

3.2.4 Chemikálie pro stanovení obsahu kyseliny fytové

3.2.4.1 Wadeovo činidlo

Bylo naváženo 12,49 mg $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 87,4 mg dihydrátu kyseliny sulfosalicylové a doplněno vodou na objem 25 ml.

3.3 Metody

3.3.1 Stanovení obsahu inhibitoru trypsinu

Výchozí metodou pro potřeby této bakalářské práce byla metoda dle Liu (2019) s drobnými modifikacemi (viz Tab. 8). Podle tohoto postupu byly provedeny všechny experimenty týkající se stanovení obsahu TI v hrachu setém.

Bylo naváženo 30 mg vzorků hrachu o zrnitosti 0,16 mm ($n=3$), přidáno 1,5 ml NaOH ($0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a směs byla zvortexována. Následně byly vzorky 15 min sonikovány ($T=25 \text{ }^\circ\text{C}$) a poté zcentrifugovány (10 min, 10200 g). Supernatant byl posléze zředěn 10x na celkový objem 300 μl .

Poté byl připraven pracovní roztok BAPNA o koncentraci $0,4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a pracovní roztok trypsinu o koncentraci $20 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Dále byly předeřhřáty sušárna a spektrofotometrický reader na teplotu $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Do jamek mikrotitrační desky byly napipetovány potřebné chemikálie podle Tab. 8. Před přidavkem roztoku trypsinu byly mikrotitrační deska s reakčními směsmi a roztok umístěny na 10 min do sušárny pro teplotu na požadovanou teplotu. Pak byl napipetován roztok trypsinu do vybraných jamek, mikrotitrační deska byla umístěna do spektrofotometrického readeru a byla měřena absorbance při $\lambda=410 \text{ nm}$ po dobu 20 min.

Tab. 8 Rozdíly mezi optimalizovanou metodou a metodou dle Liu (2019); B = blank, S = standard, SPL = vzorek, SPLB = blank vzorku, BAPNA = roztok N α -benzoyl-DL-arginin *p*-nitroanilid hydrochloridu (0,4 mg·ml⁻¹), Trypsin = roztok trypsinu (20 μ g·ml⁻¹), HAc = 30% kyselina octová, HCl = pracovní roztok HCl.

Metoda dle Liu (2019)			Optimalizovaná metoda		
Složka	Mikrozkumavky	Objem (ml)	Složka	Jamky	Objem (μ l)
BAPNA	B, S, SPL, SPLB	5,0	BAPNA	B, S, SPL, SPLB	150
Zředěný extrakt	SPL + SPLB	2,0	Zředěný extrakt	SPL + SPLB	60
Voda	B + S	2,0	Voda	B + S	60
Trypsin	B, S, SPL, SPLB	2,0	Trypsin	S + SPL	60
HAc	B, S, SPL, SPLB	1,0	roztok HCl	B + SPLB	60

Z naměřených hodnot byla vypočtena procentuální inhibice trypsinu vzorkem hrachu, množství tohoto inhibovaného trypsinu a hodnota TIA. V případě analýzy obsahu TI v různých druzích luskovin bylo jedinou modifikací tohoto postupu použití jiného ředění (100x, 120x a 150x) pro vzorky sóji luštinaté.

3.3.2 Stanovení obsahu kyseliny fytové pomocí kapilární elektroforézy

K měření byla použita kapilára o délce 80,5 cm (efektivní délka 72 cm) a vnitřním průměru 50 μ m. Před analýzou byla promývána 10 min NaOH (0,1 mol·l⁻¹) a 10 min vodou, nakonec 15 min pufrům (příprava viz níže).

Byla připravena sada různých pufrů o různém složení a pH (viz Tab. 9), které sloužily během analýz jako základní elektrolyty (ZE). K úpravě pH na požadovanou hodnotu byl použit NaOH (1 mol·l⁻¹). Do polypropylenových vialek bylo pipetováno vždy 500 μ l příslušných pufrů.

3.3.2.1 Vlastní analýza standardů a vzorku

Do polypropylenových vialek byly postupně napipetovány standardy kyselin a následovala jejich analýza, která probíhala při napětí -30 kV po dobu 15 min. Detekce probíhala při vlnové délce 350 nm, referenční vlnová délka byla 200 nm.

Po ukončení série měření byl aktuální pufr vyměněn za nový a experiment byl zopakován. Postupně tak byly k měření použity všechny připravené pufrů.

Tab. 9 Složení pufrů používaných při kapilární elektroforéze; PDC = kyselina pyridin-2,6-dikarboxylová, CTAB = hexadecyltrimethylammoniumbromid, DAH = 1,6-diaminohexan, MES = kyselina 2-(*N*-morfolin)ethansulfonová, EDTA = kyselina ethylendiamintetraoctová.

Pufr	Koncentrace složek	Objem (ml)	pH
1 (PDC + CTAB)	5 mmol·l ⁻¹ (PDC), 5 mmol·l ⁻¹ (CTAB)	100	5,6
2 (PDC + CTAB)	5 mmol·l ⁻¹ (PDC), 0,5 mmol·l ⁻¹ (CTAB)	50	5,6
3 (PDC + CTAB)	5 mmol·l ⁻¹ (PDC), 0,2 mmol·l ⁻¹ (CTAB)	50	5,6
4 (PDC + CTAB)	5 mmol·l ⁻¹ (PDC), 0,2 mmol·l ⁻¹ (CTAB)	50	3,0
5 (PDC + DAH)	5 mmol·l ⁻¹ (PDC), 1 mmol·l ⁻¹ (DAH)	50	5,6
6 (PDC + DAH)	5 mmol·l ⁻¹ (PDC), 0,2 mmol·l ⁻¹ (DAH)	50	5,6
7 (PDC + DAH)	5 mmol·l ⁻¹ (PDC), 0,2 mmol·l ⁻¹ (DAH)	50	3,0
8 (PDC + CTAB + MES)	5 mmol·l ⁻¹ (PDC), 0,5 mmol·l ⁻¹ (CTAB), 30 mmol·l ⁻¹ (MES)	50	5,6
9 (PDC + CTAB + MES)	5 mmol·l ⁻¹ (PDC), 0,5 mmol·l ⁻¹ (CTAB), 5 mmol·l ⁻¹ (MES)	50	5,6
10 (PDC + CTAB + EDTA)	5 mmol·l ⁻¹ (PDC), 0,2 mmol·l ⁻¹ (CTAB), 1 mmol·l ⁻¹ (EDTA)	50	5,6

3.3.3 Spektrofotometrické stanovení obsahu kyseliny fytové

Do mikrozkušavek bylo naváženo 75 mg mletých vzorků luskovin (n=3) o zrnitosti 0,5 a 0,16 mm, smícháno s 1,5 ml 2,4% HCl, umístěno na třepačku a extrahováno při 500 rpm po dobu 16 h. Poté byly zkumavky zcentrifugovány (1000 g, 10 °C, 20 min) a vzniklý supernatant odebrán do nových mikrozkušavek obsahujících 150 mg NaCl.

Tyto zkumavky byly umístěny na třepačku a extrahovány po dobu 20 min při 500 rpm. Pak byly ponechány v chladničce při 6 °C po dobu 60 min a následně zcentrifugovány (1000 g, 10 °C, 20 min).

Ze vzniklého supernatantu bylo odebráno 40 µl a naředěno 960 µl vody. Po promíchání bylo z naředěné směsi odebráno 600 µl, k tomu přidáno 200 µl Wadeova činidla, krátce zvortexováno, zcentrifugováno (1000 g, 10 °C, 10 min) a poté byla měřena absorbance takto připravené směsi při $\lambda=500$ nm.

Pro sestavení kalibrační řady byl postupně ředěn Milli-Q vodou zásobní roztok kyseliny fytové o koncentraci $14,32 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Koncentrace jednotlivých bodů kalibrační řady jsou následující: 0,20; 0,18; 0,16; 0,14; 0,12; 0,10; 0,08; 0,06; 0,04; 0,02; $0,01 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Po sestavení kalibrační řady bylo odebráno postupně $600 \mu\text{l}$ jednotlivých roztoků, ke každému přidáno $200 \mu\text{l}$ Wadeova činidla, směs byla promíchána a po 15 min byla změřena absorbance při $\lambda=500 \text{ nm}$. Získané hodnoty byly vyneseny do grafu, byla provedena lineární regrese a ze získané rovnice přímky byly vypočítány koncentrace všech reálných vzorků.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Stanovení obsahu inhibitoru trypsinu

Experimentálně zjištěné hodnoty absorbancí byly zaznamenány do tabulky. Pak byl pro všechny vzorky vypočítán rozdíl absorbancí v 10-minutovém intervalu (zpravidla mezi 2. a 12. min) a byla provedena korekce výsledné hodnoty optickou dráhou příslušné jamky. Získané hodnoty byly použity pro výpočet procentuální inhibice.

Procentuální inhibice trypsinu vzorkem hrachu byla spočítána podle následujícího vzorce:

$$I = \frac{(A_S - A_B) - (A_{SPL} - A_{SPLB})}{(A_S - A_B)}$$

kde I je inhibice trypsinu v % a hodnoty A_B , A_S , A_{SPL} a A_{SPLB} vyjadřují absorbanci blanku, standardu, vzorku a blanku vzorku při $\lambda=410$ nm (po korekci optickou dráhou).

Množství inhibovaného trypsinu v μg bylo získáno vynásobením celkového množství trypsinu v jedné jamce (1,2 μg) procentuální inhibicí.

Hodnota TIA pak byla vypočítána podle vzorce:

$$TIA = \frac{i \cdot V_C \cdot f}{V \cdot m}$$

kde TIA je obsah inhibitoru trypsinu v $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, i je množství inhibovaného trypsinu v μg , V_C je celkový objem extraktu v ml, f je zředovací faktor, V je použitý objem zředěného extraktu v ml a m je hmotnost vzorku hrachu v g.

4.1.1 Optimalizace metody

Řada následujících prací pracovala za odlišných podmínek, čímž došlo k ovlivnění výsledků do takové míry, že je mezi sebou nebylo možno porovnávat (Kakade *et al.*, 1974; Smith *et al.*, 1980; Sueiro *et al.*, 2015; Liu, 2019). Cílem těchto experimentů byla především optimalizace zastaralých postupů na modernější instrumentaci s použitím 96-jamkové mikrotitrační desky. K účelům optimalizace posloužil hrách setý (odrůda Impuls) poskytnutý firmou SELGEN, u nějž byla hodnota TIA uváděná výrobcem 4,1 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, a výchozí metodou, která byla optimalizována, byla metoda stanovení dle Liu (2019).

Prvotním cílem bylo celou metodu minimalizovat. Jmenovitě šlo o snížení navážky vzorku z 1 g na 30 mg, snížení objemu použitého extrakčního činidla (0,01 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaOH) z 50 ml na 1,5 ml a snížení celkového objemu reakční směsi. Z původních 10 ml nejdříve na 1 ml, aby se v rámci testování metody ověřila její

funkčnost. Následně byl celý experiment upraven tak, aby šlo měření provést v 96-jamkové mikrotitrační desce, kde objem jedné jamky činí 300 μ l.

Tímto bylo docíleno úspornější provedení experimentu a současně bylo sníženo riziko vzniku systematických chyb.

Jednou významnou nevýhodou této metody je úzký dynamický rozsah. Liu (2019) uvádí, že měřený vzorek musí směřovat k inhibici mezi 30 a 70 %. Z tohoto důvodu je vhodné provádět měření TIA vzorků v několika různých ředěních extraktu. V oblasti inhibice 30-70 % je závislost absorbance roztoků na obsahu inhibitoru lineární. Pokud je inhibice vyšší než 70 %, respektive nižší než 30 %, zvyšuje se relativní chyba měření nad $\pm 3,5$ % (Liu a Markakis, 1989).

Experiment byl proveden za účelem zjištění, zda se budou lišit výsledné hodnoty TIA, pokud u stejných vzorků bude jako zahajovací složka použit substrát BAPNA nebo roztok trypsinu. V Liu (2019) označuje příslušné postupy jako „S-last“ (zahájení substrátem) a „E-last“ (zahájení enzymem) a za vhodnější je považována ta, při níž se zahajuje reakce enzymem. Sueiro *et al.* (2015) naopak při porovnávání metod AACC a ISO zjistili, že vyšší hodnoty TIA poskytuje metoda AACC, při níž je použit jako zahajovací složka substrát.

Výsledky získané po provedení obou způsobů stanovení ukázaly, že hodnota TIA je o bezmála 40 % vyšší v případě použití substrátu jako zahajovací složky. Protože však bylo měření zatíženo (pokaždé) vyšší chybou než v případě zahájení enzymem, pro další analýzy byl jako vhodnější vybrán postup, při němž se zahajuje enzymem. Výsledná enzymatická reakce navíc není zdaleka tak ovlivnitelná faktory jako jsou různá ředění vzorku, interference extrakčního činidla nebo přítomnost Ca^{2+} v reakční směsi.

Luštěniny představují velmi tvrdý biologický materiál, který se obtížně homogenizuje, a aby bylo možné provést jeho účinnou extrakci, je nutné redukovat velikost extrahovaných částic a zvýšit tak plochu kontaktu částice s extrakčním činidlem. Sledován byl tedy i vliv zrnitosti vzorků na hodnoty TIA.

Vzorky o zrnitosti 0,16 mm (metoda AACC používá velikost 0,15 mm, pro experimenty bakalářské práce bylo použito síto o velikost oka 0,16 mm) poskytovaly vyšší hodnoty TIA oproti vzorkům o zrnitosti 0,5 mm (metoda ISO) (Liu, 2019). Ze získaných výsledků vyplývá, že vzorek o zrnitosti 0,16 mm vykazuje vyšší TIA než 0,5 mm vzorek (viz Tab. 10), což odpovídá literatuře. Při dalších měřeních byl proto používán biologický materiál o zrnitosti 0,16 mm.

Tab. 10 Hodnoty TIA ve vzorku hrachu setého (Impuls) při použití různých zrnitostí a extrakčních postupů (n=3).

Doba extrakce (min)	Způsob extrakce	Zrnitost (mm)	TIA (mg·g ⁻¹)
15	sonikace	0,16	5,7±0,5
15	sonikace	0,50	5,4±0,5
180	750 rpm, třepačka	0,16	5,6±0,3
180	750 rpm, třepačka	0,50	4,7±0,4
960	750 rpm, třepačka	0,16	4,9±0,3
960	750 rpm, třepačka	0,50	4,2±0,3

Také byly testovány různé typy extrakce, aby se zjistilo, která poskytuje vyšší hodnoty TIA. Jmenovitě šlo o extrakci na třepačce při 750 rpm po dobu 16 h, extrakci při 750 rpm po dobu 3 h a sonikaci 15 min, vše při laboratorní teplotě. Ukázalo se, že jemné částice jsou už po 15 min sonikaci při laboratorní teplotě dostatečně extrahovány, čímž je zabráněno zbytečným prodlevám nebo možným změnám v biologickém materiálu a s tím spojené případné degradaci inhibitoru. Není tedy zapotřebí zakládat extrakci den předem, jako tomu bylo u 16 h extrakce, 15 min dlouhá sonikace navíc poskytuje nejvyšší hodnoty TIA (viz Tab. 10).

Další změnou v postupu bylo odstranění posledního kroku analýzy, a to inhibice reakční směsi 30% kyselinou octovou. Vzhledem k tomu, že optimalizovaná metoda využívá měření pomocí spektrofotometrického readeru, který dokáže odečítat absorbance celé mikrotitrační desky v každé minutě, byl tento krok vynechán. Strojová přesnost odečtu hodnot absorbancí tak snižuje chyby vzniklé lidským faktorem. Další výhodou tohoto způsobu měření je, že lze sledovat vývoj absorbancí v čase a díky tomu lépe určit úsek lineárního nárůstu absorbancí. Často pozorovaným jevem byl nelineární nárůst hodnot v prvních několika minutách. Proto byly odečítány změny absorbancí v úseku 2.-12. min, případně pozdější. Tyto chyby mohly být způsobeny např. nepřesnostmi v pipetování či temperování desky a jednotlivých složek reakční směsi.

Podle literatury bylo možné pracovat i s L-BAPNA místo racemické směsi DL-BAPNA, která byla použita také v našich experimentech. Jelikož je však substrát L-BAPNA takřka 10x dražší než racemická směs, nebyl pro potřeby bakalářské práce používán.

Ve snaze zjistit, zda bude měření s použitím starých chemikálií poskytovat stejné či různé výsledky oproti novým chemikáliím, byly porovnány čerstvě připravené roztoky

BAPNA, Trypsin, pracovní roztok HCl a Tris pufr se stejnými roztoky připravenými o pět měsíců dříve.

Smith *et al.* (1980) uvádějí, že je vhodné používat vždy čerstvě připravené roztoky, anebo roztoky staré maximálně 14 dní. Na základě získaných výsledků bylo zjištěno, že hodnota TIA se stářím použitých chemikálií prakticky nemění a chemikálie jsou tedy dlouhou dobu stabilní. Nebylo proto nutné pro každou analýzu připravovat nové chemikálie.

4.1.2 Porovnání obsahu inhibitoru trypsinu v různých druzích luskovin

Všechny úpravy popsané v předchozích bodech byly použity pro stanovení obsahu TI v různých druzích luskovin. Vzorky sóji i po mnohonásobně vyšším zředění než ostatní vzorky poskytovaly vysoké hodnoty TIA.

Tab. 11 Výsledné hodnoty TIA v různých druzích luskovin, zrnitost 0,16 mm (n=3).

Luskovina	TIA (mg·g ⁻¹)
Hrách setý (odrůda Impuls) (<i>Pisum sativum</i>)	4,2±0,2
Hrách setý (<i>Pisum sativum</i>)	3,3±0,1
Loupaný hrách (<i>Pisum sativum</i>)	3,1±0,5
Čočka jedlá (<i>Lens culinaris</i>)	5,8±0,2
Čočka červená (<i>Lens culinaris</i>)	5,7±0,2
Fazole mungo (<i>Vigna mungo</i>)	7,6±0,5
Sója luštinatá (<i>Glycine max</i>)	68,7±5,2

4.2 Stanovení obsahu kyseliny fytové v luskovinách

4.2.1 Stanovení pomocí kapilární elektroforézy

Cílem bylo zavést zcela novou metodu stanovení obsahu kyseliny fytové (PA) v luskovinách, při níž by se povedlo zároveň oddělit od sebe kromě PA i jednotlivé inositolfosfáty. Jelikož PA neabsorbuje záření v UV oblasti, bylo nutné zvolit vhodné pufrы, které by v této oblasti absorbovaly a šel by tak nepřímo stanovit obsah PA v analyzovaných vzorcích. Inspirací pro tento experiment byla metoda popsaná v článku od Soga a Ross (1997).

Jako součást základního elektrolytu (ZE) byla zvolena kyselina pyridin-2,6-dikarboxylová (PDC), jelikož má vysokou hodnotu molárního extinkčního koeficientu ϵ a zároveň se její mobilita nejvíce blíží mobilitě námi stanovovaných aniontů. Kromě PDC byl součástí pufru surfaktant cetyltrimethylammonium bromid (CTAB), který slouží k modifikaci elektroendoosmotického toku (EOF), konkrétně k obrácení směru jeho chodu (Soga a Ross, 1997).

Podle tohoto výchozího článku byl proveden postup, přičemž byly použity dvě různé koncentrace CTAB. V pufru č. 1 byly velmi vysoké propady a změny základní linie (baseline), což mohlo být zapříčiněno vysokou koncentrací CTAB. Proto byla jeho koncentrace v pufru č. 2 snížena. Propad baseline, který mohl interferovat s analyty, byl podstatně nižší, avšak nyní docházelo k propadům pokaždé v jiném čase.

Místo CTAB byl zvolen polykationt 1,6-diaminohexan (DAH) umožňující modifikovat EOF obdobně jako CTAB. Inspirací pro tento krok byl článek Znaleziiona *et al.* (2008). Propady baseline se tak posunuly do oblasti elektroferogramu, kde nehrozila interference s analyty. Základní linie se však neustále dynamicky měnila, a to i po změně pH z 5,6 na 3,0.

Do směsi byla přidána kyselina 2-(*N*-morfolin)ethansulfonová (MES), která má v dané oblasti pH (5,6) dobrou pufrací kapacitu a navíc neabsorbuje v UV oblasti záření. Přidáním MES do směsi však došlo k výraznému potlačení EOF, což mělo za následek nežádoucí prodloužení analýzy.

I po těchto provedených krocích bylo možno identifikovat jen fosfát a některé organické kyseliny s podobnou elektroforetickou mobilitou (mobility kyselin měřeny za účelem vyvarování se případné komigraci látek), PA nikoliv. To mohlo být zapříčiněno

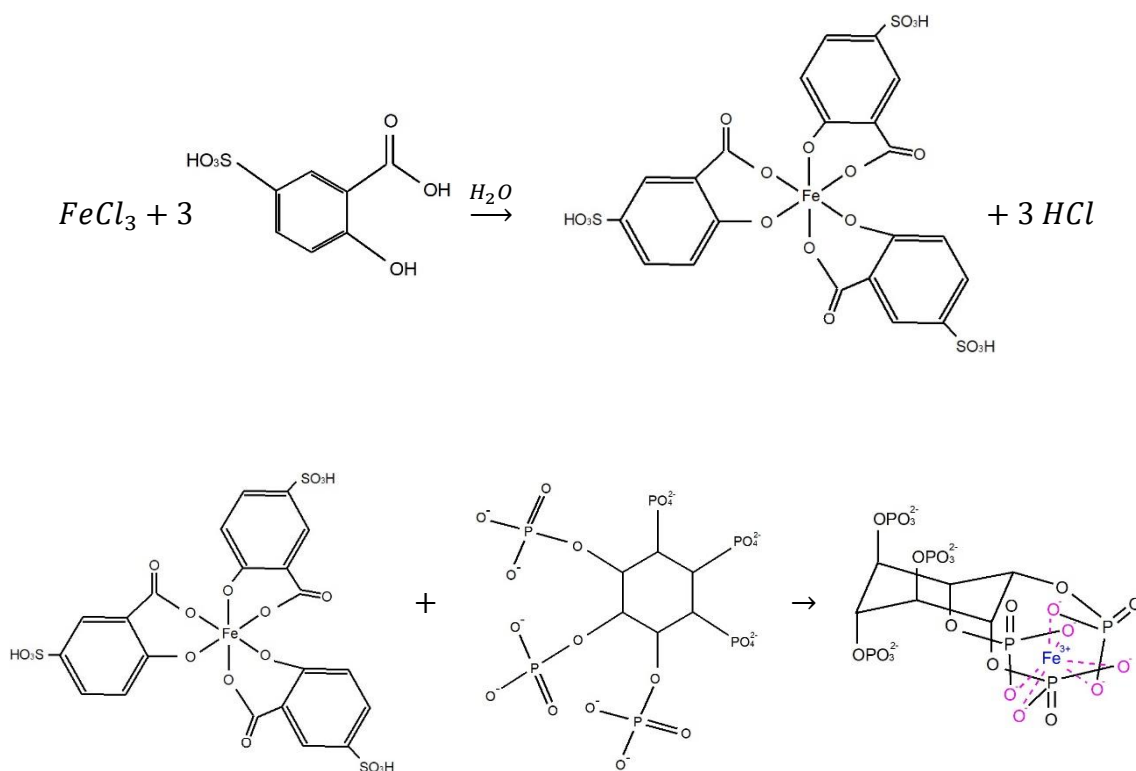
tím, že právě PA může chelatovat ionty kovů přítomných v pufru, čímž dochází ke změně elektroforetických vlastností jak kovových kationtů, tak i PA.

Jelikož PDC neumožňovala dostatečnou chelataci kationtů, byla do směsi přidána kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), která tvoří jedny z nejstabilnějších komplexů s kationty kovů, a měla by tak chelatovat všechny kationty přítomné ve vzorku.

Tyto pokusy byly ale také neúspěšné a PA se identifikovat nepovedlo, bylo taktéž možné, že docházelo ke komigraci s fosfátem, který byl přítomen ve standardu PA. Navzdory všem úpravám původního postupu se nepodařilo nalézt vhodné podmínky pro provedení analýzy kyseliny fytové pomocí kapilární zónové elektroforézy s nepřímou detekcí.

4.2.2 Spektrofotometrické stanovení

Při reakci kyseliny sulfosalicylové s železitými ionty ve vodném prostředí vzniká fialový komplex. Pokud je v roztoku přítomna PA, vytěšňuje ionty Fe^{3+} z tohoto komplexu a vzniká bezbarvý produkt:



Obr. 3 Schéma vzniku barevného komplexu Fe^{3+} s kyselinou sulfosalicylovou a následný vznik bezbarvého komplexu Fe^{3+} s kyselinou fytovou, upraveno dle: Pozdnyakov *et al.*, 2007.

Inspirací byla metoda popsaná v článku od Gao *et al.* (2007), pouze došlo k její minimalizaci. Další změnou bylo použití koncentrovanějšího roztoku Wadeova činidla (v původním článku uvedena koncentrace $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,03%, pro naše experimenty byl použit roztok o koncentraci $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,05% = 0,03% FeCl_3) za účelem získání absorbancí standardů v rozmezí od 0,2 do 1,0. Také byla použita rozdílná teplota chlazení. V našem případě byly vzorky chlazeny 60 min při 6 °C, nikoliv při 4 °C, jak uváděli autoři. Extrakce č. 2 v NaCl byla prováděna kvůli interferujícím látkám, které jsou tímto krokem precipitovány.

Po sestavení kalibrační křivky byla z rovnice přímky vypočítána koncentrace reálných vzorků v $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a následně přepočítána na jednotky $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ podle vzorce:

$$X_{PA} = \frac{c_{PA} \cdot f \cdot V_C}{m}$$

kde X_{PA} je obsah kyseliny fytové v $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, c_{PA} je koncentrace kyseliny fytové ve zředěném extraktu v $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, f je ředící faktor, V_C je celkový objem hrubého extraktu v ml a m je hmotnost mletého vzorku v g.

Výsledky byly posléze přepočítány na procentuální obsah kyseliny fytové v semenech dané luskoviny. Hodnoty se pohybovaly v jednotkách procent, obsah PA spadl do rozsahu uvedeného v literatuře (Gao *et al.*, 2007). Ve vzorcích sóji luštinaté nebylo množství PA stanovováno.

Jedním z nedostatků této metody je neschopnost přesně stanovit obsah PA u vzorků, kde je nižší obsah PA, a tedy vyšší obsah anorganického fosfátu (P_i). P_i může precipitovat Fe^{3+} ionty, čímž dochází ke zvýšení absorbance, a tudíž nadhodnocení celkového obsahu PA ve vzorku (Gao *et al.*, 2007).

Tab. 11 Výsledný obsah kyseliny fytové (PA) ve vybraných biologických materiálech, zrnitost 0,16 mm(n=3).

Luskovina	Obsah PA ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
Hrách setý (odrůda Impuls) (<i>Pisum sativum</i>)	34,4±2,9
Hrách setý (<i>Pisum sativum</i>)	26,4±1,1
Loupaný hrách (<i>Pisum sativum</i>)	31,3±3,4
Čočka jedlá (<i>Lens culinaris</i>)	28,2±3,1
Čočka červená (<i>Lens culinaris</i>)	28,2±1,5
Fazole mungo (<i>Vigna mungo</i>)	40,6±5,6

5 ZÁVĚR

Cílem teoretické části práce bylo podání informací o antinutričních faktorech v hrachu setém. Uvedeny byly informace především o inhibitoru trypsinu a kyselině fytové. Část bakalářské práce je věnována i ostatním antinutričním faktorům, a to konkrétně lektinům, oligosacharidům a tríslovinám. V teoretické části jsou rovněž popsány metody stanovení těchto látek v luskovinách.

Byla zavedena optimalizovaná metoda stanovení obsahu inhibitoru trypsinu v luskovinách. Šlo především o minimalizaci experimentálního měřítka, snížení provozních nákladů a uzpůsobení metody pro práci v 96-jamkové mikrotitrační desce.

Byl porovnán obsah inhibitoru trypsinu v různých druzích luskovin. Z komerčně dostupných druhů bylo nejvyšší množství této látky obsaženo ve vzorcích fazole mungo, a to $7,6 \pm 0,5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, naopak nejnižší ve vzorcích loupaného hrachu a hrachu setého, a sice $3,1 \pm 0,5$ a $3,3 \pm 0,1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ respektive.

Vzorky sóji luštinaté poskytnuté genetickými zdroji VÚRV obsahovaly vysoké množství inhibitoru trypsinu v porovnání s ostatními druhy analyzovaných luskovin, $68,7 \pm 5,2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$.

Zároveň byla zavedena metoda kvantitativní analýzy obsahu kyseliny fytové ve vybraných biologických materiálech. Zprvu byla pro tyto účely zvolena kapilární elektroforéza, po neúspěšných měřeních byla nahrazena spektrofotometrickým stanovením. Výsledný obsah fytátu byl nejvyšší ve vzorcích fazolí mungo, $40,6 \pm 5,6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, nejnižší množství fytátu bylo detekováno ve vzorcích hrachu setého, $26,4 \pm 1,1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. Hrách setý je z vybraných plodin nejvhodnější pro běžnou konzumaci právě díky tomu, že obsahuje nejnižší množství antinutričních faktorů, jak inhibitoru trypsinu, tak i kyseliny fytové.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abbo S., Lev-Yadun S., Gopher A. (2010): Agricultural origins, centers and noncenters, a Near Eastern reappraisal. *Critical Reviews in Plant Sciences* **29**, 317-328.
- Agostinho A. J., Oliveira W. D., Anunciao D. S., Santos J. C. C. (2016): Simple and Sensitive Spectrophotometric Method for Phytic Acid Determination in Grains. *Food Analytical Methods* **9**, 2087-2096.
- Alonso R., Aguirre A., Marzo F. (2000): Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chemistry* **68**, 159-165.
- Amarakoon D., Thavarajah D., McPhee K., Thavarajah P. (2012): Iron-, zinc-, and magnesium-rich field peas (*Pisum sativum* L.) with naturally low phytic acid: A potential food-based solution to global micronutrient malnutrition. *Journal of Food Composition and Analysis* **27**, 8-13.
- Avilés-Gaxiola S., Chuck-Hernández C., Serna Saldívar S. O. (2018): Inactivation methods of trypsin inhibitor in legumes: A review. *Journal of Food Science* **83**, 17-29.
- Bode W., Huber R. (1992): Natural protein proteinase inhibitors and their interactions with proteinases. *European Journal of Biochemistry* **204**, 433-451.
- Bode W., Huber R. (2000): Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochimica et Biophysica Acta* **1477**, 241-252.
- 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* **9**, 165-191.
- Boulter D., Croy R. R. D. (1997): The structure and biosynthesis of legume seed storage proteins: A biological solution to the storage of nitrogen in seeds. *Advances in Botanical Research* **27**, 1-84.
- Boye J., Zare F., Pletch A. (2010): Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International* **43**, 414-431.
- Boye J. I., Aksay S., Roufik S., Ribereau S., Mondor M., Farnworth E., Rajamohamed S. H. (2010): Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International* **43**, 537-546.
- Brunelle F., Nguyen-Quoc B., Cloutier C., Michaud D. (1999): Protein Hydrolysis by Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, Digestive Proteases: The Catalytic Role of Cathepsin D. *Archives of Insect Biochemistry and and Physiology* **42**, 88-98.
- Burbano C., Muzquiz M., Osagie A., Ayet G., Cuadrado C. (1995): Determination of phytate and lower inositol phosphates in Spanish legumes by HPLC methodology. *Food Chemistry* **62**, 321-326.
- Buscher B. A. P., Irth H., Andersson E., Tjaden U. R., Vandergreef J. (1994): Determination of inositol phosphates in fermentation broth using capillary zone electrophoresis with indirect UV detection. *Journal of Chromatography A* **678**, 145-150.
- Candido E. de S., Pinto M. F., Pelegrini P. B., Lima T. B., Silva O. N., Pogue R. *et al.* (2011): Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. *The Faseb Journal* **10**, 3290-3305.
- Carbas B., Machado N., Oppolzer D., Ferreira L., Brites C., Rosa E. A. S., Barros A. I. R. N. A. (2020): Comparison of near-infrared (NIR) and mid-infrared (MIR) spectroscopy for the determination of nutritional and antinutritional parameters in common beans. *Food Chemistry* **306**, 1-10.
- Coelho L. C. B. B. (2013): Plant Lectins and Trypsin Inhibitors: Detection, Structure, Functions and Biological Activities. In: Lectins and trypsin inhibitors from plants: biochemical characteristics and adverse effects on insect larvae, 1st ed., (Paiva P. M. G., Pontual E. V., Napoleão T. H. a Coelho L. C. B. B. eds.), Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, New York, USA, 1-5.

- Cordain L. (1999): Cereal grains: humanity's double-edged sword. In: *Evolutionary Aspects of Nutrition and Health. Diet, Exercise, Genetics and Chronic Disease*. (Simopoulos A. P. ed.), Karger, Basel, Switzerland, 19-73.
- Dawei L., Shaoxu Y., Jingsheng C., Lijie C., Yuxi D. (2016): Effects on trypsin inhibitor in roots of resistant soybeans after *Heterodera glycines* invasion. *International Journal of Agriculture and Biology* **18**, 965-968.
- Ekvall J., Stegmark R., Nyman M. (2007): Optimization of extraction methods for determination of the raffinose family oligosaccharides in leguminous vine peas (*Pisum sativum* L.) and effects of blanching. *Journal of Food Composition and Analysis* **20**, 13-18.
- ElSayed A. I., Rafudeen M. S., Golladack D. (2014): Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress. *Plant Biology* **16**, 1-8.
- FAO (1994): Definition and Classification of Commodities, 4. Pulses and Derived Products, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 1 strana
- FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistic Division): dostupné online <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, cit: 1.4.2021.
- Gao Y., Shang C., Saghai Maroof M. A., Biyashev R. M., Grabau E. A., Kwanyuen P., Burton J. W., Buss G. R. (2007): A Modified Colorimetric Method for Phytic Acid Analysis in Soybean. *Crop Science* **47**, 1797-1803.
- Greiner R., Konietzny U. (2006): Phytase for food application. *Food Technology and Biotechnology* **44**, 125-140.
- Greiner R., Domoney C. (2004): The potential of genetically modified legume and oilseed crops for food and non-food use. In: *Proceedings of the fourth international workshop on antinutritional factors in legume seeds and oilseeds* 100. (Muzquiz M., Hill G. D., Pedrosa M. M., Burbano C. eds.), EAAP, Toledo, Spain, 261-276.
- Guillamon E., Pedrosa M. M., Burbano C., Cuadrado C., de Cortes Sánchez M., Muzquiz M. (2008): The trypsin inhibitors present in seed of different grain legume species and cultivar. *Food Chemistry* **107**, 68-74.
- Gyamfi M. A., Aniya Y. (2002): Antioxidant properties of Thonningianin A, isolated from the African medicinal herb, *Thonningia sanguinea*. *Biochemical Pharmacology* **63**, 1725-1737.
- Habiba R. A. (2002): Changes in anti-nutrients, protein solubility, digestibility, and HCl-extractability of ash and phosphorus in vegetable peas as affected by cooking methods. *Food Chemistry* **77**, 187-192.
- Hansen D., Macedo-Ribeiro S., Veríssimo P., Yoo Im S., Sampaio M. U., Oliva M. L. (2007): Crystal structure of a novel cysteineless plant Kunitz-type protease inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **360**, 735-740.
- Haros M., Bielecka M., Honke J., Sanz Y. (2007): Myo-inositol hexakisphosphate degradation by *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697. *International Journal of Food Microbiology* **117**, 76-84.
- Hartwig A., MAK Commission (2017): Trypsin and Chymotrypsin [MAK Value Documentation, 2016]. In: *The MAK-Collection for Occupational Health and Safety: Annual Thresholds and Classifications for the Workplace*. Vol. 2, No. 3, (Hartwig A., MAK Commission, van Kampen V. eds.), Wiley-VCH, Weinheim, Baden-Württemberg, Germany, 1170-1176.
- Chakraborti D., Sarkar A., Mondal H. A., Das S. (2009): Tissue specific expression of potent insecticidal, *Allium sativum* leaf agglutinin (ASAL) in important pulse crop, chickpea (*Cicer arietinum* L.) to resist the phloem feeding *Aphis craccivora*. *Transgenic Research* **18**, 529-544.
- Champ M. M. J. (2002): Non-nutrient bioactive substances of pulses. *British Journal of Nutrition* **88**, 307-319.
- Chitra R., Sadasivam S. (1986): A study of the trypsin inhibitor of black gram (*Vigna mungo* (L.) Hepper). *Food Chemistry* **21**, 315-320.
- Kakade M. L., Rackis J. J., McGhee J. E., Puski G. (1974): Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chemistry* **51**, 376-382.
- Kamboj R., Nanda V. (2018): Proximate composition, nutritional profile and health benefits of legumes—A review. *Legume Research* **41**, 325-332.

- Karaca A. C., Low N., Nickerson M. (2011): Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Research International* **44**, 2742-2750.
- Kasim B. A., Edwards H. M. (1998): The Analysis for Inositol Phosphate Forms in Food Ingredients. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **76**, 1-9.
- Konietzny U., Greiner R. (2003): Phytic acid: nutritional impact. In: *Encyclopaedia of food science and nutrition*. (Caballero B., Trugo L., Finglas P. eds.), Elsevier, London, UK, 4555-4563.
- Koundal K. R., Rajendran P. (2003): Plant insecticidal proteins and their potential for developing transgenics resistant to insect pests. *Indian Journal of Biotechnology* **2**, 110-120.
- Krowarsch D., Cierpicki T., Jelen F., Otlewski J. (2003): Canonical protein inhibitors of serine proteases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**, 2427-2444.
- Lajolo F. M., Genovese M. I. (2002): Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 6592-6598.
- Lajolo F. M., Genovese M. I., Pryme I. F., Dale M., (2004): Beneficial (antiproliferative) effects of different substances. In: *Proceedings of the fourth international workshop on antinutritional factors in legume seeds and oilseeds* 110. (Muzquiz M., Hill G. D., Pedrosa M. M., Burbano C. eds.), EAAP, Wageningen, The Netherlands, 123-135.
- Laskowski M., Kato I. (1980): Protein inhibitors of proteinases. *Annual Review of Biochemistry* **49**, 593-626.
- Le Bourvellec C., Guyot S., Renard C. M. G. C. (2004): Non-covalent interactions between procyanidins and apple cell wall material. Part I: Effect of some environmental parameters, *Biochimica et Biophysica Acta* **1672**, 192-202.
- Lehrfeld J., Morris E. R. (1992): Overestimation of Phytic Acid in Foods by the AOAC Anion-Exchange Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 2208-2210.
- Lewis G., Schrire B., Mackinder B., Lock M. (2005): *Legumes of the World*, Royal Botanic Gardens, Kew, UK, 577 stran.
- Liu B., Bian H. J., Bao J. K. (2010): Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Letters* **287**, 1-12.
- Liu K., Markakis P. (1989): An improved colorimetric method for determining antitryptic activity in soybean products. *Cereal Chemistry* **66**, 415-422.
- Liu K. (2019): Soybean Trypsin Inhibitor Assay: Further Improvement of the Standard Method Approved and Reapproved by American Oil Chemists' Society and American Association of Cereal Chemists International. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **96**, 635-645.
- Loewus F. (2002): Biosynthesis of phytate in food grains and seeds. In: *Food phytates*. (Reddy N. R., Sathe S. K. eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 53-61.
- López-Martínez L. X., Leyva-López N., Gutiérrez-Grijalva E. P., Heredia J. B. (2017): Effect of cooking and germination on bioactive compounds in pulses and their health benefits. *Journal of Functional Foods* **38**, 624-634.
- Luo Y. W., Xie W. H. (2013): Effect of different processing methods on certain antinutritional factors and protein digestibility in green and white faba bean (*Vicia faba* L.). *Cyta-Journal of Food* **11**, 43-49.
- McKay K., Schatz B., Endres G. (2003): *Field pea production*. North Dakota State University, Fargo, North Dakota, USA, 8 stran.
- Minihane A.M., Rimbach G. (2002): Iron absorption and the iron binding and anti-oxidant properties of phytic acid. *International Journal of Food Science and Technology* **37**, 741-748.
- Mitsuoka T. (1996): Intestinal flora and human health. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* **5**, 2-9.
- Mupangwa J. F., Acamovic T., Topps J. H., Ngongoni N. T., Hamudikuwanda H. (2000): Content of soluble and bound condensed tannins of three tropical herbaceous forage legumes. *Animal Feed Science and Technology* **83**, 139-144.
- Muzquiz M., Varela A., Burbano C., Cuadrado C., Guillamón E., Pedrosa M. M. (2012): Bioactive compounds in legumes: pronutritive and antinutritive actions. Implications for nutrition and health. *Phytochemistry Reviews* **11**, 227-244.

- Muzquiz M., Wood J. A. (2007): Antinutritional Factors. In: *Chickpea Breeding and Management*. (Yadav S. S., Redden R. J., Chen W. a Sharma B. eds.), CABI Publishing, Wallingford, UK, 143-166.
- Nadeem M., Anjum F. M., Amir R. M., Khan M. R., Hussain S., Javed M. S. (2010): An overview of anti-nutritional factors in cereal grains with special reference to wheat-A review. *Pakistan Journal of Food Sciences* **20**, 54-61.
- Nikmaram N., Leong S. Y., Koubaa M., Zhu Z., Barba F. J., Greiner R., Oey I., Roohinejad S. (2017): Effect of extrusion on the anti-nutritional factors of food products: An overview. *Food Control* **79**, 62-73.
- Vaz Patto M. C., Amarowicz R., Arye A. N. A., Boye J. I., Chung H. J., Martín-Cabrejas M. A., Domoney C. (2015): Achievements and challenges in improving the nutritional quality of food legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences* **34**, 105-143.
- Pedrosa M. M., Cuadrado C., Burbano C., Allaf K., Haddad J., Gelencsér E., Takács K., Guillamón E., Muzquiz M. (2012): Effect of instant controlled pressure drop on the oligosaccharides, inositol phosphates, trypsin inhibitors and lectins contents of different legumes. *Food Chemistry* **131**, 862-868.
- Pozdnyakov I. P., Plyusnin V. F., Tkachenko N., Lemmetyinen H. (2007): Photophysics of Fe(III)-sulfosalicylic acid complexes in aqueous solutions. *Chemical Physics Letters* **445**, 203-207.
- Raes K., Knockaert D., Struijs K., Van Camp J. (2014): Role of processing on bioaccessibility of minerals: Influence of localization of minerals and antinutritional factors in the plant. *Trends in Food Science and Technology* **37**, 32-41.
- Rao P.U., Belavady B. (1978): Oligosaccharides in Pulses: Varietal Differences and Effects of Cooking and Germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **26**, 316-319.
- Ravichandran S., Dasgupta J., Chakrabarti C., Ghosh S., Singh M., Dattagupta J. K. (2001): The role of Asn14 in the stability and conformation of the reactive-site loop of winged bean chymotrypsin inhibitor: crystal structures of two point mutants Asn14 -> Lys and Asn14 -> Asp. *Protein Engineering* **14**, 349-357.
- Rawlings N. D., Barrett A. J. (2013): Introduction: Serine Peptidases and Their Clans. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 3rd ed., (Barrett A. J., Rawlings N. D., Woessner J. eds.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 2491-2523.
- Reddy N. R. (2002): Occurrence, distribution, content, and dietary intake of phytate. In: *Food phytates*. (Reddy N. R., Sathe S. K. eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 25-51.
- Rehman Z., Shah W. H. (2005): Thermal heat processing effects on antinutrients, protein and starch digestibility of food legumes. *Food Chemistry* **91**, 327-331.
- Renko M., Sabotič J., Mihelič M., Brzin J., Kos J., Turk D. (2010): Versatile Loops in Mycocybins Inhibit Three Protease Families. *Enzyme Catalysis and Regulation* **285**, 308-316.
- Rimbach G., Pallauf J. (1997): Cadmium accumulation, zinc status, and mineral bioavailability of growing rats fed diets high in zinc with increasing amounts of phytic acid. *Biological Trace Element Research* **57**, 59-70.
- Rivas-Vega M. E., Goytortúa-Bores E., Ezquerra-Brauer J. M., Salazar-García M. G., Cruz-Suárez L. E., Nolasco H., Civera-Cerecedo R. (2006): Nutritional value of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) meals as ingredients in diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). *Food Chemistry* **97**, 41-49.
- Roberts M. F., Wink M. (1998): Introduction. In: *Alkaloids. biochemistry, ecology, and medicinal applications*. (Roberts M. F., Wink M. eds.), Plenum Press, New York, U.S.A., 1-7.
- Rodríguez-Sifuentes R., Marszałek J. E., Chuck-Hernández C., Serna-Saldívar S. O. (2020): Legumes Protease Inhibitors as Biopesticides and Their Defense Mechanisms against Biotic Factors. *International Journal of Molecular Sciences* **21**:9 <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/9/3322>
- Rubiales D., González-Bernal M. J., Warkentin T., Bueckert R., Vaz Patto M. C., McPhee K., McGee R., Smýkal P. (2019): Advances in pea breeding. In: *Achieving sustainable cultivation of vegetables*, 1st ed., (Hochmuth G. ed.), Burleigh Dodds Science Publishing, Cambridge, UK, 1-31.

- Rupérez P. (1998): Oligosaccharides in raw and processed legumes. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* **206**, 130-133.
- Sagar D., Dhall H. (2018): Legumes: Potential source of entomotoxic proteins – A review. *Legume Research* **41**, 639-646.
- Sangronis E., Machado C. J. (2007): Influence of germination on the nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* and *Cajanus cajan*. *LWT – Food Science and Technology* **40**, 116-120.
- Sanoner P., Guyot S., Marnet N., Molle D., Drilleau J.-F. (1999): Polyphenols profiles of French cider apple varieties (*Malus domestica* sp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 4847-4853.
- Schlüter U., Benchabane M., Munger A., Kiggundu A., Vorster J., Goulet M. C., Cloutier C., Michaud D. (2010): Recombinant protease inhibitors for herbivore pest control: a multitrophic perspective. *Journal of Experimental Botany* **61**, 4169-4183.
- Serrano J., Puupponen-Pimiä R., Dauer A., Aura A.-M., Saura-Calixto F. (2009): Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition and Food Research* **53**, S310-S329.
- Sharma A. (2020): A review on traditional technology and safety challenges with regard to antinutrients in legume foods. *Journal of Food Science and Technology-Mysore* <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13197-020-04883-8>
- Sharma K. (2015): Protease inhibitors in crop protection from insects. *International Journal of Current Research and Academic Review* **3**, 55-70.
- Simonet B. M., Rios A., Grases F., Valcarcel M. (2003): Determination of myo-inositol phosphates in food samples by flow injection-capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **24**, 2092-2098.
- Singh B., Singh J. P., Shevkani K., Singh N., Kaur A. (2017): Bioactive constituents in pulses and their health benefits. *Journal of Food Science and Technology* **54**, 858-870.
- Singh U., Jambunathan R. (1981): Studies on desi and kabull chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars: levels of protease inhibitors, levels of polyphenolic compounds and in vitro protein digestibility. *Journal of Food Science* **46**, 1364-1367.
- Smith C., van Megen W., Twaalfhoven L., Hitchcock C. (1980): The determination of trypsin inhibitor levels in foodstuffs. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **31**, 341-350.
- Smykal P. (2014): Pea (*Pisum sativum* L.) in biology prior and after Mendel's discovery. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* **50**, 52-64.
- Soga T., Ross G. A. (1997): Capillary electrophoretic determination of inorganic and organic anions using 2,6-pyridinedicarboxylic acid: effect of electrolyte's complexing ability. *Journal of Chromatography A* **767**, 223-230.
- Soñta M., Rekiel A. (2020): Legumes – use for nutritional and feeding purposes. *Journal of Elementology* **25**, 835-849.
- Srinivasan A., Giri A. P., Harsulkar A. M., Gatehouse J. A., Gupta V. S. (2005): A Kunitz trypsin inhibitor from chickpea (*Cicer arietinum* L.) that exerts anti-metabolic effect on podborer (*Helicoverpa armigera*) larvae. *Plant Molecular Biology* **57**, 359-374.
- Srp J., Mareš M. (2016): Kunitzovy proteasové inhibitory z rostlin: strukturní a funkční diverzita. *Chemické Listy* **110**, 761-768.
- Steer T. E., Gibson G. R. (2002): The microbiology of phytic acid metabolism by gut bacteria and relevance for bowel cancer. *International Journal of Food Science and Technology* **37**, 783-790.
- Sueiro S., Hermida M., González M., Lois A., Rodríguez-Otero J. L. (2015): A Comparison of the ISO and AACC Methods for Determining the Activity of Trypsin Inhibitors in Soybean Meal. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **92**, 1391-1397.
- Sze K. L., Tzi B. N. (2011): Lectins: production and practical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **89**, 45-55.
- Świeca M., Baraniak B. (2014): Influence of elicitation with H₂O₂ on phenolics content, antioxidant potential and nutritional quality of *Lens culinaris* sprouts. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **94**, 489-496.

- Urbano G., López-Jurado M., Aranda P., Vidal-Valverde C., Tenorio E. J., Porres E. (2000): The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function? *Journal of Physiology and Biochemistry* **56**, 283-294.
- Vance C. P., Uhde-Stone C., Allan D. L. (2003): Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* **157**, 423-447.
- Vandenborre G., Smagghe G., Van Damme E. J. M. (2011): Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. *Phytochemistry* **72**, 1538-1550.
- Vasconcelos I. M., Oliveira J. T. A. (2004): Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon* **44**, 385-403.
- Velkov V. V., Medvinsky A. B., Sokolov M. S., Marchenko A. I. (2005): Will transgenic plants adversely affect the environment? *Journal of Biosciences* **30**, 515-548.
- Yalcin S., Basman A. (2015): Effects of infrared treatment on urease, trypsin inhibitor and lipoxygenase activities of soybean samples. *Food Chemistry* **169**, 203-210.
- Yarullina L. G., Akhatova A. R., Kasimova R. I. (2016): Hydrolytic enzymes and their proteinaceous inhibitors in regulation of plant–pathogen interactions. *Russian Journal of Plant Physiology* **63**, 193-203.
- Zhang J., Song G., Mei Y., Li R., Zhang H., Liu Y. (2019): Present status on removal of raffinose family oligosaccharides – a Review. *Czech Journal of Food Sciences* **37**, 141-154.
- Zhu-Salzman K., Zeng R. (2015): Insect response to plant defensive protease inhibitors. *Annual Review of Entomology* **60**, 233-252.
- Znaleziona J., Petr J., Knob R., Maier V., Ševčík J. (2008): Dynamic coating agents in CE. *Chromatographia* **67**, S5-S12.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ANF	antinutriční faktory
BAPNA	N α -Benzoyl-DL-arginin-4-nitroanilid hydrochlorid
BBI	Bowmanův-Birkův inhibitor trypsinu
BPT	hovězí pankreatický trypsin
BPTI	hovězí pankreatický inhibitor trypsinu
CP	celkové proteiny (angl. crude protein)
CTAB	cetyltrimethylammonium bromid
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAH	1,6-diaminohexan
DMSO	dimethylsulfoxid
EOF	elektroendoosmotický tok
FTIR	angl. Fourier-transform infrared spectroscopy
GBHA	glyoxal bis(2-hydroxyanilin)
HA/HU	angl. haemagglutination activity/unit
HPAEC	angl. High performance anion exchange chromatography
HPAEC-PAD	angl. HPAEC – Pulsed Amperometric Detection
KTI	Kunitzův inhibitor trypsinu
MES	kyselina 2-(<i>N</i> -morfolin)ethansulfonová
PDC	kyselina pyridin-2,6-dikarboxylová
PI	proteasové inhibitory
PR	angl. pathogenesis-related
TI	inhibitor trypsinu
TIA/TIU	angl. trypsin inhibitor activity/unit
ZE	základní elektrolyt